

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana V. Šatrić

**KARAKTERIZACIJA SVOJSTAVA
KAČKAVALJA SA SMANJENIM SADRŽAJEM
NATRIJUM-HLORIDA TOKOM ZRENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Ana V. Šatrić

**CHARACTERIZATION OF THE PROPERTIES OF
KAČKAVALJ WITH REDUCED SODIUM
CHLORIDE CONTENT DURING RIPENING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentor:

dr Jelena Miočinović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Članovi Komisije:

dr Nikola Tomić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

(uža naučna oblast: Upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane)

dr Katarina Kanurić, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu-Tehnološki fakultet Novi Sad

(uža naučna oblast: Prehrambeno inženjerstvo)

dr Milica Mirković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

(uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija)

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je rezultat višegodišnjeg rada, truda i zalaganja tokom kog sam imala priliku da sarađujem sa izuzetnim ljudima kojima želim da izrazim neizmernu zahvalnost.

Najveću zahvalnost želim da izrazim mojoj mentorki, prof. dr Jeleni Miočinović, na nesebičnoj podršci, pomoći i trudu, a čiji saveti i zalaganja su bili od neizmerne važnosti tokom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem se profesorki Miočinović na tome što je prepoznala potencijal ove doktorske disertacije i bila velika motivacija u svim izazovnim okolnostima. Hvala na neiscrpoj podršci i razumevanju, znanju i iskustvu koje je prenela na mene tokom izrade ove disertacije. Mnoge životne i profesionalne lekcije sam naučila od profesorke Miočinović i iskreno sam zahvalna na tome.

Takođe, zahvaljujem se i mojim dragim kolegama članovima Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda na dugogodišnjoj saradnji. Posebno se zahvaljujem prof. dr Igoru Tomaševiću koji mi je pružio podršku i omogućio rad novim digitalnim metodama kao što su Computer Vision System i 3D skeniranje, samim tim bez njegove pomoći ova disertacija ne bi imala pun potencijal. Takođe se zahvaljujem i prof. Iliji Đekiću sa Katedre za upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane na pomoći u radu novim metodama 3D skeniranju i korisnim savetima. Od srca se zahvaljujem i dr Zorani Miloradović na podršci, stručnoj pomoći i smernicama.

Izuzetnu zahvalnost želim da izrazim Aleksandru Mančiću, profesoru Mlekarske škole „Dr Obren Pejić“, kao i Nenadu Đorđeviću, direktoru Mlekarske škole „Dr Obren Pejić“ na velikoj pomoći i ukazanoj mogućnosti da ostvarim eksperimentalni deo disertacije u proizvodnom pogonu mlekarske škole.

Želim da izrazim zahvalnost mojim dragim kolegama, prof. dr Milici Mirković i doc. dr Nemanji Mirkoviću, sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju na divnoj saradnji i kolegijalnosti. Veliko hvala i prof. dr Nikoli Tomiću sa Katedre za upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane na pruženom znanju i pomoći iz oblasti senzorne analize i savetima koji su bili od izuzetnog značaja.

Takođe se zahvaljujem prof. dr Vladimiru Pavloviću sa Katedre za matematiku i fiziku, kao i prof. dr Stevi Leviću sa Katedre za hemiju i biohemiju na velikoj pomoći u realizaciji dela eksperimenta vezan za skenirajuću elektronsku mikroskopiju, jer su doprineli unapređivanju vrednosti ove disertacije. Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Katarini Kanurić na izuzetno vrednim sugestijama i savetima tokom pisanja disertacije.

Na kraju, neizmernu zahvalnost dugujem svojim najbližima, dragim roditeljima i bratu, koji su me naučili radu, poštovanosti i istrajnosti. Hvala na безусловnoj ljubavi i podršci u životu, na tome što ste uvek verovali u mene. Mom izuzetnom suprugu i najvoljenijoj ćerki Sofiji hvala na najvećoj motivaciji, безусловnoj ljubavi i podršci, kao i na tome što su izvor moje najveće radosti u životu.

Karakterizacija svojstava kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida tokom zrenja

REZIME

Poslednjih godina, sve više su aktuelna istraživanja na temu mogućnosti smanjenja unosa natrijum-hlorida putem hrane. Svetska Zdravstvena Organizacija je prepoznala smanjenje sadržaja natrijum-hlorida u hrani kao jednu od pet prioriternih aktivnosti u prevenciji i kontroli nezaraznih bolesti. Naime, natrijum-hlorid negativno utiče na zdravlje ljudi jer može dovesti do hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, hroničnih bolesti bubrega, osteoporoze i povećanog rizika od moždanog udara. Stoga su veoma značajna istraživanja na temu mogućnosti smanjenja sadržaja natrijum-hlorida u hrani bilo smanjenjem dodatog natrijum-hlorida ili delimičnom zamenom natrijum-hlorida drugim odgovarajućim solima, kao što je kalijum-hlorid.

Kačkavalj, kao jedan od najpopularnijih tradicionalnih sireva na srpskom tržištu predstavlja značajan izvor natrijum-hlorida i kao takav je pogodan sa aspekta ispitivanja mogućnosti smanjenja sadržaja natrijum-hlorida. Istraživanja koja su se bavila analizom kačkavalja su još uvek nedovoljna, stoga ova doktorska disertacija u prvom delu obuhvata analize hemijskih, teksturalnih i mikrobioloških svojstava, parametre proteolize i boje sireva koji su na tržištu deklarirani kao kačkavalj, kao i njihovu usaglašenost sa nacionalnim standardom.

Većim delom disertacije su obuhvaćene navedene analize za ispitivanje kačkavalja sa uobičajenim sadržajem soli; 30% smanjenim sadržajem natrijum-hlorida, i zamenom 30% natrijum-hlorida kalijum-hloridom tokom šest meseci zrenja, kako bi se ispitala mogućnost proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem soli i uticaj smanjenja na tok zrenja i druge različite aspekte kvaliteta proizvoda. Takođe, ispitan je efekat smanjenja natrijum-hlorida i zamene natrijum-hlorida kalijum-hloridom kačkavalja na bioaktivnost sireva, odnosno ispitana je antioksidativna, antimikrobna i angiotenzin-konvertujući enzim inhibitorna aktivnost tokom zrenja. Metodom skenirajuće elektronske mikroskopije analizirana je mikrostruktura sirne grude i sireva, a korišćene su i savremene metode kao što su kompjuterski vizuelni sistem za ispitivanje parametara boje i trodimenzionalno skeniranje za ispitivanje trodimenzionalnog modela sira. Sprovedena je i senzorna analiza ispitivanih sireva koja je obuhvatala ispitivanje senzornog kvaliteta i testiranje potrošača primenom hedonske skale i „upravo onako kako odgovara” skale.

Karakterizacija kačkavalja je sprovedena u cilju očuvanja i boljeg razumevanja kvaliteta tradicionalnog kačkavalja, kao i istraživanja glavnih faktora koji utiču na njegova svojstva. S druge strane, istraživanje i karakterizacija kačkavalja sa smanjenim ili delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida predstavlja značajan doprinos u dobijanju proizvoda koji je u skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi, a koji je preporučen za konzumiranje potrošačima, čak i onih iz kategorije osetljivih i bolesnih grupa ljudi, pri čemu je sačuvan njegov standardni kvalitet.

Ključne reči: kačkavalj, natrijum-hlorid, kalijum-hlorid, smanjenje sadržaja soli, bioaktivnost, kompjuterski vizuelni sistem, mikrostruktura, 3D skeniranje, senzorna analiza, proteoliza

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnologija animalnih proizvoda

UDK broj: 637.354.62:661.833'032.1(043.3)

Characterization of the properties of kačkavalj with reduced sodium-chloride content during ripening

ABSTRACT

In recent years, more and more research on the possibility of reducing sodium chloride intake through food has been conducted. The World Health Organization has recognized the reduction of sodium chloride content in food as one of the five priority activities in the prevention and control of noncommunicable diseases. Hence, sodium chloride has a negative effect on human health because it can lead to hypertension, cardiovascular diseases, chronic kidney diseases, osteoporosis and an increased risk of stroke. Therefore, research into the possibility of reducing the sodium chloride content in food, either by reducing added sodium chloride or by partially replacing sodium chloride with other suitable salts such as potassium chloride, is very important.

Kačkavalj, as one of the most popular traditional cheeses on the Serbian market, represents a significant source of sodium chloride and as such is suitable from the aspect of investigating the possibility of reducing the sodium chloride content. Studies that conducted the analysis of kačkavalj are still insufficient, therefore this doctoral dissertation in the first part includes the analysis of chemical, textural and microbiological properties, proteolysis parameters and color of kačkavalj declared on the market as kačkavalj cheese, as well as its compliance with the national standard.

The major part of the dissertation includes the aforementioned analyzes for the examination of cheeses with the usual salt content; 30% reduced sodium chloride content, and replacement of 30% sodium chloride with potassium chloride during six months of ripening, in order to examine the possibility of producing cheeses with reduced salt content and the effect of the reduction on the ripening rate and other different aspects of product quality. Additionally, the effect of reduction of sodium chloride and the replacement of sodium chloride with potassium chloride of the investigated kačkavalj cheese on the bioactivity of cheeses, that is, antioxidant, antimicrobial and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity were examined during ripening. The microstructure of the cheese curd and cheeses was analyzed using the method of scanning electron microscopy, and novel methods were also applied, such as a computer visual system to examine color parameters and three-dimensional scanning to examine a three-dimensional model of the cheese. A sensory analysis of the examined cheeses was also carried out, which included testing the sensory quality and consumer tests with the hedonic scale and the "just about right" scale.

The characterization of kačkavalj was conducted in order to preserve and improve understanding of the quality of traditional cheese, as well as to investigate the main factors that affect properties of cheese. On the other hand, the research and characterization of cheese with reduced or partially replaced sodium chloride content represents a significant contribution to obtaining a product that is in line with novel trends in human nutrition which is recommended for consumption by consumers, even those from the category of sensitive and ill group of people, while preserving its standard quality.

Keywords: kačkavalj, sodium chloride, potassium chloride, salt reduction, bioactivity, computer vision system, microstructure, 3D scanning, sensory analysis, proteolysis

Academic expertise: Technological engineering

Field of Academic Expertise: Animal Source Food Technology

UDC: 637.354.62:661.833'032.1(043.3)

SADRŽAJ

LISTA SKRAĆENICA	I
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Proizvodnja i svojstva kačkavalja	3
2.1.1. Tradicionalni sirevi i pojam tradicionalne hrane	3
2.1.1.1. Značaj sira kačkavalj	4
2.1.2. Postupak proizvodnje Pirotskog kačkavalja	5
2.1.2.1. Kvalitet mleka za proizvodnju kačkavalja	6
2.1.2.2. Izrada baskije	7
2.1.2.3. Prevođenje baskije u kačkavalj	8
2.1.2.4. Zrenje i nega kačkavalja	10
2.1.3. Mikrobiota kačkavalja	11
2.1.3.1. Uticaj soli na rast autohtonih BMK	13
2.2. Značaj soli u proizvodnji sireva	14
2.2.1. Značaj soli u ishrani ljudi	14
2.2.2. Smanjenje soli u proizvodnji sireva	16
2.3. Bioaktivnost sireva	17
2.3.1. Antimikrobna aktivnost	19
2.3.2. Antioksidativna aktivnost	20
2.3.3. Antihipertenzivna aktivnost	22
2.3.4. Faktori koji utiču na bioaktivnost sireva	23
2.3.4.1. Termički tretman mleka u proizvodnji sira	24
2.3.4.2. Koagulanti	24
2.3.4.3. Starterska i nestarterska mikrobiota	25
2.3.4.4. Temperatura i vreme zrenja	25
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	27
4. MATERIJAL I METOD RADA	28
4.1. Nabavka sireva deklarirani kao kačkavalj sa domaćeg tržišta	28
4.2. Proizvodnja kačkavalja sa različitim sadržajem soli	28

4.3. Fizičko-hemijske analize sireva	29
4.1. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva	31
4.1.1. Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija i azotnih materija rastvorljivih u fosfovolframskoj kiselini.....	31
4.1.2. Elektroforetska ispitivanja toka zrenja sireva.....	31
4.1.2.1. Priprema uzoraka sireva za izvođenje elektroforeze.....	31
4.1.2.2. Urea elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	31
4.2. Analiza teksture sireva	31
4.3. Mikrobiološka analiza sireva.....	32
4.4. Ispitivanje bioaktivnosti sireva.....	32
4.5. Trodimenzionalno skeniranje sireva.....	34
4.6. Analiza mikrostrukture sireva	35
4.7. Određivanje parametara boje sireva pomoću kompjuterskog vizuelnog sistema.....	35
4.8. Senzorna analiza sireva	36
4.8.1. Ispitivanje senzornog kvaliteta sireva	36
4.8.2. Ispitivanje prihvatljivosti sireva	39
4.9. Statistička analiza rezultata	40
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	41
5.1. Svojstva sireva definisanih kao kačkavalj na domaćem tržištu	41
5.1.1. Hemijski sastav i pH vrednost sireva	41
5.1.2. Proteolitički parametri sireva	44
5.1.3. Teksturalna svojstva sireva.....	46
5.1.4. Bakterije mlečne kiseline	47
5.1.5. Boja sireva.....	48
5.1.6. Hijerarhijska klaster analiza	50
5.2. Svojstva kačkavalja sa različitim sadržajem soli.....	51
5.2.1. Fizičko-hemijska svojstva sireva.....	51
5.2.2. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva	53
5.2.3. Elektroforetska ispitivanja sireva	54
5.2.4. Mikrostruktura sirne grude i sireva	58
5.2.5. Mikrobiološka analiza sireva.....	63
5.2.6. Teksturalna svojstva sireva.....	68

5.2.7. Trodimenzionalno skeniranje sireva	69
5.2.8. Boja sireva	71
5.2.9. Bioaktivnost sireva	73
5.2.9.1. Antimikrobna aktivnost sireva	73
5.2.9.2. Antioksidativna aktivnost sireva	75
5.2.9.3. ACE inhibitorna aktivnost sireva	80
5.2.10. Senzorna analiza sireva	82
5.2.10.1. Senzorni kvalitet sireva	82
5.2.10.2. Ispitivanje prihvatljivosti sireva	83
6. ZAKLJUČCI	88
7. LITERATURA	93
BIOGRAFIJA KANDIDATA	118
Izjava o autorstvu	119
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	120
Izjava o korišćenju	121

LISTA SKRAĆENICA

3D - trodimenzionalno

5% PTA - 5% fosfovolframska kiselina

a* - udeo crvene boje (Redness)

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ACE - angiotenzin-konvertujući enzim

ANOVA - statistička metoda analize varijanse (Analysis of variance)

ATCC – Američka organizacija za distribuciju standardnih referentnih mikroorganizama (American Type Culture Collection)

b* - udeo žute boje (Yellowness)

BMK – bakterije mlečne kiseline

CDC – Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention)

CFU – jedinica mere broja živih kolonija (Colony forming unit)

CN - kazein

CVS - kompjuterski vizuelni sistem (Computer Vision System)

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil slobodni radikal

EFSA - Evropska Agencija za Bezbednost Hrane (The European Food Safety Authority)

EU – Evropska Unija

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

FIL-IDF - Međunarodna mlekarska federacija (International Dairy Federation)

HCA - hijerarhijska klaster analiza (Hierarchical cluster analysis)

HHL - hipuril-histidil-leucin

HPLC - tačna hromatografija visokih performansi

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (International Organization for Standardization)

JAR - skala „upravo onako kako odgovara” (Just about right scale)

KCl – kalijum-hlorid

L* - svetloća (Lightness)

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (Minimum inhibitory concentration)

MSM – mast u suvoj materiji

N - azot (Nitrogen)

NaCl - natrijum-hlorid

NSBMK – nestarterske bakterije mlečne kiseline

PTAN – azotne materije rastvorljive u 5% fosfovolframskoj kiselini

RN – u vodi rastvorljive azotne materije

SD - standardna devijacija

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

TPA - Analiza profila teksture (Texture Profile Analysis)

UN – ukupne azotne materije

Urea Page – urea poliakrilamidna elektroforeza

VBMS – voda u bezmasnoj materiji sira

WHO – Svetska Zdravstvena Organizacija (World Health Organisation)

1. UVOD

Kačkavalj pripada grupi sireva parenog testa (Pasta-filata) poreklom sa Mediterana, koji su široko rasprostranjeni u zemljama kao što su Italija, Makedonija, Bugarska, Rumunija, Grčka, Turska, Albanija i dr. Kačkavalj u Srbiji ima vekovnu tradiciju proizvodnje, a najpoznatiji se proizvodi u jugoistočnom delu Srbije u opštini Piroć, kao i u ostalim opštinama u oblasti Stare planine i nosi oznaku geografskog porekla na nacionalnom nivou (Mioćinović i Miloradović, 2019). Osim zaštite geografskog porekla i duge tradicije proizvodnje, ovom siru je dat poseban značaj time što je Institut za standardizaciju Srbije (1997) ustanovio nacionalni standard koji propisuje zahteve kvaliteta kačkavalja.

Kačkavalj se proizvodi specifičnim postupkom karakterističnim za ovu vrstu sira, a njegova svojstva zavise od mnogih faktora kao što su vrsta i kvalitet mleka, postupak proizvodnje, mikrobiota, uslovi i dužina zrenja. Tradicionalni sirevi se proizvode od sirovog mleka i imaju izraženija senzorna svojstva od sireva koji se proizvode od pasterizovanog mleka zbog čega su prepoznatljivi i cenjeni.

Imajući u vidu da se kvalitet sira najvećim delom formira tokom zrenja, proteoliza, kao jedan od najvažnijih biohemijskih procesa zrenja, ima veliki uticaj na aromatski profil i teksturu sira. Osim toga što na proteolizu sira utiču brojni parametri kao što su aktivnost enzima plazmin i himozin, peptidaze i proteinaze koje potiču od bakterija mlečne kiseline, vreme, vlažnost i temperatura zrenja, pH vrednost i sastav sira, posebno se može izdvojiti i značaj sadržaja soli (Mioćinović i sar., 2014).

Osim toga što sadržaj soli utiče na proteolitičke procese i formiranje krajnjeg kvaliteta sira, sve veća pažnja se skreće na uticaj soli na zdravlje potrošača. Poslednjih godina, u skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi i sve većom brigom o zdravlju, veoma su aktuelna ispitivanja mogućnosti smanjenja unosa soli putem hrane, smanjenjem dodatog sadržaja natrijum-hlorida ili delimičnom ili potpunom zamenom natrijum-hlorida drugim pogodnim solima, kao što je kalijum-hlorid (KCl). Ovakva istraživanjima na kačkavalju do sada nisu sprovedena.

Natrijum-hlorid (NaCl), poznat kao kuhinjska so, ima široku primenu u prehrambenoj industriji, a najčešće se koristi za povećanje stabilnosti hrane tokom skladištenja, kao i poboljšanje ukusa. Međutim, tokom poslednjih decenija, upotreba kuhinjske soli u hrani predstavlja veliku zabrinutost među zdravstvenim agencijama sveta zbog štetnog dejstva natrijuma, koji je uglavnom povezan sa hipertenzijom, kardiovaskularnim i drugim oboljenjima. Negativan uticaj soli na zdravlje ljudi je razlog zbog kog je visok unos soli putem hrane važno pitanje za savremeno društvo, pa je smanjenje sadržaja soli prepoznato kao jedno od pet prioritarnih intervencija u prevenciji i kontroli nezaraznih bolesti od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (engl. World Health Organization - WHO, 2016).

Imajući u vidu da sirevi predstavljaju izvor soli, kao takvi su značajani u pogledu intervencije smanjenja sadržaja soli. Ovo je posebno značajno za pojedine vrste sireva kojima pripadaju tradicionalni kačkavalj i beli sirevi u salamuri. S obzirom da je potrošnja sireva u porastu širom sveta, treba dati poseban značaj smanjenju sadržaja natrijum-hlorida u sirevima.

Sirevi, kao prehrambeni proizvodi, bogati su nutritivno važnim komponentama, stoga predstavljaju važan izvor proteina, kao i izvor biološki aktivnih supstanci. Prilikom razgradnje proteina tokom perioda zrenja, nastaju jedinjenja koji ne samo da doprinose formiranju ukusa i teksture zrelog sira, već i postižu bioaktivnost u određenom periodu zrenja. Naročito sekundarna proteoliza tokom zrenja može dovesti do stvaranja bioaktivnih komponenti, a pojava

bioaktivnosti zavisi od faze zrenja sira. Rezultati studija su pokazali da specifične sekvence oslobođenih peptida sira pokazuju antimikrobna, antioksidativna i antihipertenzivna biološka svojstva (Santiago-López i sar., 2018).

Imajući u vidu da su kod nas studije koje uključuju analize kačkavalja prilično ograničene, ova disertacija se u početnom delu bavi analizom kvaliteta sireva, koji su na tržištu deklarirani kao kačkavalj. Sagledavanje usaglašenosti sireva sa tržišta sa zahtevima kvaliteta propisanih standardom su značajna, jer ukazuju na status ovih tradicionalnih sireva na tržištu, kao i radi očuvanja njihovog kvaliteta.

Uprkos dugoj tradiciji proizvodnje, detaljna karakterizacija kačkavalja savremenim metodama istraživanja može pomoći u isticanju vrednosti tradicionalnih proizvoda. S obzirom da tradicionalni sirevi predstavljaju deo nacionalne baštine, posebnu pažnju treba posvetiti njihovom održanju. U tom smislu, sveobuhvatna karakterizacija kačkavalja je sprovedena u cilju očuvanja i boljeg razumevanja kvaliteta kačkavalja, kao i istraživanja glavnih svojstava koja utiču na kvalitet kačkavalja.

Veći deo disertacije se bavi analizom hemijskih, teksturalnih i mikrobioloških svojstava, samim tokom proteolize, ispitivanjem parametara boje i drugih parametara kvaliteta, kao i senzornim atributima, kako bi se okarakterisao tradicionalni kačkavalj. S druge strane, proučavanje i karakterizacija kačkavalja sa smanjenim ili delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida predstavlja značajan doprinos u dobijanju sira u skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi. Shodno tome u radu je kroz različite analize ispitan stepen varijabilnosti tradicionalnog kačkavalja u odnosu na eksperimentalne varijante sa 30% smanjenim sadržajem soli i zamenom 30% natrijum-hlorida kalijum-hloridom. Poseban akcenat je stavljen na ispitivanje biološke aktivnosti, koja je praćena kroz ispitivanje antimikrobne, antioksidativne i antihipertenzivne aktivnosti, što je po prvi put vršeno na siru kačkavalj. Na kraju, kada se uzme u obzir odstupanje u pogledu sadržaja soli u odnosu na uobičajeni, neophodno je uzeti u obzir mišljenje potrošača. Stoga je u radu posebna pažnja posvećena senzornoj analizi svih varijanti sireva, kako bi se utvrdila prihvatljivost proizvoda od strane potrošača.

Doprinos ove disertacije se ogleda u sticanju novih saznanja tokom zrenja tradicionalnog kačkavalja koji ima veliki komercijalni značaj, a sa druge strane, poseban doprinos je u karakterizaciji varijanti kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida, i delimičnom zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom, koji mogu da prošire postojeći asortiman sireva ovog tipa, kao i da ispune zahteve savremenih preporuka za ishranu potrošača.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Proizvodnja i svojstva kačkavalja

2.1.1. Tradicionalni sirevi i pojam tradicionalne hrane

Tradicionalni sirevi predstavljaju kulturološko nasleđe i rezultat su akumuliranog empirijskog znanja koje se prenosi sa generacije na generaciju (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Svaki tradicionalni sir je usko povezan sa teritorijom svog porekla i preovlađujućim klimatskim uslovima. Botanički sastav pašnjaka utiče na senzorna svojstva proizvedenih sireva, posebno na njihov ukus, naročito kod tradicionalno proizvedenih sireva koji se proizvode od sirovog mleka (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Specifična svojstva sira kačkavalj su u direktnoj vezi sa svojstvima sirovog mleka, autohtonom mikrobiotom, načinom ishrane životinja, klimatskim uslovima područja, vegetacijom, fermentacijom i procesom zrenja, itd. Tradicionalni sirevi su smatrani prirodnim i domaćim mlečnim proizvodima koji su se proizvodili od davnina od sirovog mleka raznih životinja, korišćenjem tradicionalnih tehnologija. Ono što ih posebno odlikuje su njihova specifična senzorna svojstava i blagotvorno dejstvo na zdravlje ljudi (Teneva i sar., 2018).

U periodu industrijalizacije proizvodnje hrane, tradicionalni sirevi imaju značajnu ulogu u ishrani potrošača koji vode računa o prirodi i poreklu kupljenog proizvoda (Sarić i sar., 2007; Santa i Srbinovska, 2014). Međutim, tradicionalnim sirevima pretila industrijska proizvodnja, što bi naposljetku moglo da doprinese do gubitka kulturnog identiteta (Mijačević i dr., 2005a; Santa i Srbinovska, 2014). „Tradicionalna hrana” je pojam koji je oduvek bio tema diskusije i interesovanja, jer je ona osnova ishrane u različitim kulturama i društvima (Rocillo-Aquino i sar., 2021). Koncept tradicionalne hrane je poslednje decenije zastupljen u literaturi u mnogim studijama. Pojam „tradicionalna hrana” predstavlja koncept koji uključuje poreklo, sastav, preradu i upotrebu hrane, ali i način konzumiranja (Teneva i sar., 2018). Jordana (2000) je o ovom konceptu izvela sledeće: „Da bi bio tradicionalan, proizvod mora biti vezan za teritoriju i takođe mora biti deo tradicije, koje će nužno obezbediti njegov kontinuitet tokom vremena”. Evropska komisija je 2006. godine dala sledeću definiciju „tradicionalnog” u vezi sa hranom: „Tradicionalno znači dokazanu upotrebu na tržištu za vremenski period koji pokazuje prenos između generacija; ovaj vremenski period treba da bude onaj koji se generalno pripisuje jednoj ljudskoj generaciji, najmanje 25 godina” (EU, 2006; Guerrero i sar., 2009;). Prema Evropskom izvoru informacija o hrani (engl. European Food Information Resource), tradicionalna hrana je „hrana sa specifičnim svojstvom ili svojstvima, koje je jasno razlikuju od drugih sličnih proizvoda iste kategorije u smislu upotrebe „tradicionalnih sastojaka” (sirovine primarnih proizvoda) ili „tradicionalnog sastava” ili „tradicionalni tip proizvodnje i/ili prerade” (Teneva i sar., 2018; Trichopoulou i sar., 2007).

Međutim, ispitivanje mišljenja potrošača u šest različitih evropskih zemalja (Italija, Španija, Norveška, Belgija, Francuska i Poljska) dovelo je do drugačijih rezultata na temu kako potrošači definišu pojam „tradicionalna hrana”, a ono glasi „da je to proizvod koji se često konzumira ili povezuje sa određenim proslavama i/ili godišnjim dobima, koji se obično prenosi sa generacije na generaciju, napravljen sa pažnjom na specifičan način u skladu sa gastronomskim nasleđem, sa malo ili bez obrade/manipulacije, koji je prepoznatljiv i poznat zbog njegovih senzornih svojstava i povezanosti sa određenim lokalnim područjem, regionom ili zemljom” (Guerrero i sar., 2009; Vanhonacker i sar., 2008). Prema Dozet i sar. (2004), autohtona proizvodnja mlečnih proizvoda ne bi trebalo da se posmatra kao povratak u stara vremena, već kao osnova za razvoj novih proizvoda i za poboljšanje kvaliteta postojećih.

2.1.1.1. Značaj sira kačkavalj

Sirevi parenog testa (Pasta-filata) su široko rasprostranjeni, imaju dugu tradiciju, a njihovo poreklo je iz oblasti severnog Mediterana. Kačkavalj je jedan od najpopularnijih sireva u mnogim mediteranskim zemljama. Njihova proizvodnja datira iz jedanaestog i dvanaestog veka (Santa i Srbinovska, 2014), a danas imaju široku primenu u ishrani i mogu se koristiti kao stoni sir ili dodatak brojnim jelima. Kačkavalj pripada ovoj raznovrsnoj grupi sireva parenog testa, sa dugom tradicijom proizvodnje i potrošnje u Srbiji, kao i u drugim zemljama Balkana, ali pod različitim nazivima (Licitra i sar., 2017; Miocinovic i Miloradovic, 2019). Sirevi tipa kačkavalj su najpoznatiji sirevi parenog testa u ovom području, koji se vekovima proizvode i konzumiraju. U većini zemalja u ovoj oblasti zovu se jednostavno Kačkavalj ili Kaškaval sa malim razlikama u pravopisu (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Međutim, postoje varijacije tog imena, kao što su Caciocavallo u Italiji, Kašar u Turskoj i Albaniji, Kaseri u Grčkoj (Guinee i sar., 2015; Kindstedt i sar., 2004; Kožev, 2006). Najpoznatiji kačkavalj u Srbiji se proizvodi u opštini Pirot u jugoistočnom delu Srbije, kao i u ostalim opštinama na Staroj planini (Miočinić i Miloradović, 2019) i odlikuju se oznakom geografskog porekla (Ostojić i sar., 2012) što ukazuje na značaj ove vrste sira koja je predmet istraživanja doktorske disertacije.

Istorijski podaci ukazuju na to da su proizvodnju kačkavalja na Balkansko poluostrvo prenela nomadska plemena sa istoka (Pejić, 1956). Tehnologija proizvodnje ovog sira je bila najviše rasprostranjena u oblasti Balkanskog poluostrva i u Italiji, kao i delovima Rusije, Turske, Tunisa, Egipta, Alžira i Maroka (Mijačević i sar., 2005b). Tokom vremena, u svakoj od ovih zemalja sa razvijenom proizvodnjom sireva, razvile su se neke varijante ovog tipa sira koje se izdvajaju po svojstvima i kvalitetu, među kojima je i Pirotski kačkavalj u Srbiji.

Pirotski kačkavalj je bio je među prvim sirevima proizvedenih u tipu sireva parenog testa poreklom iz Srbije (Stevanovic i sar., 2016). Istorijski podaci takođe ukazuju da se kačkavalj pojavljuje na balkanskim prostorima oko sredine XVI veka (Ostojić i sar., 2011). Ovaj sir je italijanskog porekla, kog su ljudi sa Jadranskog primorja doneli u nameri da se proširi na čitavo Balkansko poluostrvo (Ostojić i sar., 2011).

Pirotski kačkavalj je kao takav bio opšte poznat, a u prošlosti su se značajne količine kačkavalja izvozile u Beč i Budimpeštu. Postoje istorijski podaci koji govore o tome da su 1903. godine u Beč i Budimpeštu izveze količine 160 vagona kačkavalja (Mijačević i sar., 2005b). Najznačajniji kačkavalj koji je do tada bio poznat kao Staroplaninski i Dojkinački danas je prepoznat najčešće kao Pirotski kačkavalj iz razloga što je Pirot predstavljao administrativni i kulturni centar tog regiona (Ostojić i sar., 2011; Mijačević i sar., 2005b).

U pirotskim planinskim predelima se širio „kačkavaljski zanat” gde su čuvana stada ovaca, najčešće je to bila pirotka pramenka. Prvobitno se Pirotski kačkavalj proizvodio isključivo od ovčijeg mleka, uz upotrebu primitivnog pribora, niskih higijenskih uslova i vršenja prerade na mestu proizvodnje (Ostojić i sar., 2012). Vremenom se način proizvodnje sira kačkavalj proširio na ostale predele pa su se pojavili i sirevi kačkavalj poreklom iz Dimitrovgrada, Bele Palanke, Svrlijga, Sokobanje, kao i banatski sir (Milanović, 2006). Međutim, razvojem industrijalizacije i korišćenjem novih uređaja za proizvodnju, kao i unapređenje nivoa higijene, kravlje mleko preuzima ulogu u proizvodnji Pirotskog kačkavalja (Ostojić i sar., 2012). Tokom prošlog veka, Pirotski kačkavalj je bio izuzetno prepoznatljiv proizvod, a njegov izvoz je značajan, stoga se mogao naći na stolovima Bele kuće, Damaska, Bagdada, a njegova prodaja je bila zastupljena u Grčkoj, kao i širom Evrope (Stevanovic i sar., 2016).

Geografsko poreklo kravljeg mleka koje se koristi za proizvodnju Pirotskog kačkavalja je najvećim delom smešteno na Staroj planini, a delimično se proteže i preko ravničarskih krajeva u podnožju Stare planine (Ostojić i sar., 2012). Na ovom području tradiciju dugu poslednjih sto godina odlikuje proizvodnja kačkavalja, koji nosi naziv jednog od najpoznatijih sireva Pirotski kačkavalj. Pirotski kačkavalj su tradicionalno proizvodili parenjem zrelih baskija i ručnom obradom sirnog testa (Milosavljević i sar., 2010). Ono što je dalo posebnu vrednost i značaj Pirotskog kačkavalja jeste proces zrenja i soljenja u specifičnim klimatskim uslovima Stare planine (Mijačević i sar., 2005a). Prostor na koji se proteže obuhvata područje opštine Pirot, kao i delom područja opština Knjaževac i Dimitrovgrad (Ostojić i sar., 2012).

Specifičan ukus Pirotskog kačkavalja nastaje i zbog uticaja metaboličkih proizvoda autohtone mikrobiote, jer se starter kulture ne dodaju pri proizvodnji Pirotskog kačkavalja. Ono što odlikuje autohtonu mikrobiotu su brzi rast i razvoj, kao i doprinos specifičnim senzornim svojstvima samog proizvoda (Danilović i sar., 2020).

Značaj ove vrste sira sagledava se i iz činjenice da je Institut za standardizaciju Srbije (1997) ustanovio nacionalni standard za kačkavalj koji propisuje zahteve kvaliteta koji moraju biti ispunjeni. Nacionalni standard određuje zahteve za dve vrste sira kačkavalj (kačkavalj i kačkavalj krstaš) u pogledu težine (5-10 kg i do 3 kg), minimalnog sadržaja suve materije (56% i 54%), minimuma masti u suvoj materiji (45% za oba) kao i period zrenja (minimalno 8 i 4 nedelje). Na tržištu se mogu naći različiti sirevi deklarirani kao kačkavalj.

Proteoliza nije specifično izražena kod sireva tipa kačkavalj. Koeficijent zrelosti je uobičajeno oko 20%, iako se u studijama mogu naći različite vrednosti (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Treba napomenuti da se značajan deo rastvorljivog azota proizvodi tokom fermentacije grude, kao i da se tokom procesa parenja i mešanja delimično gubi u vodi ili salamuri (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Sirevi kačkavalj su opisani kao sirevi sa velikim sadržajem soli (2,5–3,5%), slanog pikantnog ukusa (Guinee i sar., 2015).

2.1.2. Postupak proizvodnje Pirotskog kačkavalja

Kačkavalj, kao sir parenog testa, se proizvodi specifičnim tehnološkim postupkom karakterističnim za ovu vrstu sira, a koji obezbeđuje jedinstvenu teksturu sira. Proizvodnja se odlikuje dvema različitim fazama. U prvoj fazi sirna gruda zri/fermentiše do određenog stepena kiselosti, koja nastaje kao rezultat aktivnosti autohtone mikrobiote ili dodatih starter kultura. U drugoj fazi se gruda potapa u toplu vodu (surutku ili slani rastvor) i mesi ručno ili mašinski što značajno doprinosi nastanku karakteristične mikro i makro strukture sira (Kindstedt i sar., 2010). Nakon formiranja finalnog oblika, sirevi se ostavljaju na proces zrenja u određenom vremenskom intervalu koji zavisi od varijante koja se proizvodi.

Postupak proizvodnje kačkavalja može da varira i zavisi od toga da li je tradicionalni ili industrijski. U daljem tekstu je opisana proizvodnja Pirotskog kačkavalja koji je najvećim delom i predmet ove doktorske disertacije.

Postupak proizvodnje Pirotskog kačkavalja se sprovodi kroz tri faze (Ostojić i sar., 2012):

- izrada baskije,
- prevođenje baskije u kačkavalj i
- zrenje i nega kačkavalja.

Kvalitet mleka kao početne sirovine za proizvodnju kačkavalja je veoma značajan i važan za dobijanje sireva određenih svojstava i bezbednosti. Posebno je značajno za tradicionalnu proizvodnju kačkavalja, stoga će u narednom tekstu biti opisani najvažniji faktori koji utiču na kvalitet mleka.

2.1.2.1. Kvalitet mleka za proizvodnju kačkavalja

Za tradicionalnu proizvodnju sira kačkavalj se upotrebljava sirovo mleko, samim tim kvalitet sirovog mleka je od izuzetne važnosti jer utiče na kvalitet finalnog proizvoda. Različiti faktori utiču na kvalitet sirovog mleka od kojeg se proizvodi sir kačkavalj, a jedni od najvažnijih su: rasa životinje, ishrana, laktacija, uslovi čuvanja životinje i higijena, zdravstveno stanje životinje.

U zavisnosti od rase životinje od koje dobijamo mleko, količina i sastav sirovog mleka će se razlikovati. Naime, varijacije u sastavu različitih vrsta mleka mogu biti velike, a najviše su prisutne u pogledu sadržaja mlečne masti i suve materije. Jedna od najzastupljenijih rasa u pogledu goveda je simentalac i goveda u tipu simentalke rase od druge polovine XIX veka pa sve do danas (Ostojić i sar., 2012). Uticaj rase na kvalitet mleka je od velike važnosti iz razloga što tzv. sirarske rase daju mleko najpovoljnije za proizvodnju sireva, pre svega usled adekvatnog sadržaja proteina (Mančić i Mančić, 2005). Takođe, oplemenjivanje putem selekcije se sprovodi kako bi se povećala mlečnost kod simentalke rase, pri čemu se i uvoze i grla simentalke rase koje poseduju visoki genetski potencijal za proizvodnju mleka (Ostojić i sar., 2012).

Pored simentalke rase koja preovlađuje u predelu Stare planine, značajno je spomenuti i meleze u tipu simentalke rase, još poznato kao domaće šareno goveće, koje je nastalo kao rezultat pretapanja buše u simentalca (Petrović i sar., 2004). Takođe, buša je zastupljena autohtona rasa na predelima Stare planine i njen značaj je poseban zbog očuvanja biodiverziteta (Ostojić i sar., 2012). Plodnost ove rase je oko 85 - 90%, a period njene laktacije može da traje oko 8 meseci, pri čemu mlečna mast je najčešće u intervalu od 4 do 6% (Ostojić i sar., 2012). U cilju održive poljoprivrede, autohtone rase goveda su od velike važnosti. Autohtone rase proizvode mleko sa najboljim odnosom masti i proteina (Mančić i Mančić, 2004). Još jedna prednost uzgajanja autohtonih rasa jeste što one upotrebljavaju pašu i samim tim zahtevaju manje ulaganja.

Ishrana životinje je takođe jedan od ključnih faktora koji utiče na kvalitet mleka koje se koristi za proizvodnju sira, kao i na samu količinu mleka. Mleko koje je najpogodnije za proizvodnju sira jeste ono koje dobijeno od životinje koja upotrebljava pašu, odnosno hrani se raznovrsnim biljkama, naročito onim koje su bogate mineralnim materijama, posebno kalcijumom. Takođe, prednost ovog načina ishrane je višestruka. Naime, životinja ima mogućnost izbora trave koje će da pojede i postoji manja prisutnost štetnih mikroorganizama koje se mogu naći u silaži. Takođe, poslednjih godina je sve više prisutna upotreba pesticida koji putem ishrane životinja utiču na kvalitet mleka (Akhtar, 2017; Nudda i sar., 2014; Uzun i sar., 2020).

Loša higijena i neadekvatni uslovi čuvanja krava je dosledno povezano sa rizikom od nastanka mastitisa, odnosno inflamacije mlečne žlezde i povećanim brojem somatskih ćelija. Pojava mastitisa kod obolele životinje izaziva promene u mleku, najčešće promena boje, pojava ugrušaka, a najmerodavniji pokazatelj jeste povećan broj leukocita (Hristov i sar., 2005). Prekomeran broj somatskih ćelija u mleku može dovesti do povećane proteolitičke i lipolitičke aktivnosti sireva, što može rezultirati proizvodom neprijatnog ukusa i promenjenih svojstava. Razlog značajnih razlika u osobinama mleka koje karakteriše povećan broj somatskih ćelija kod kravljeg, kozjeg i ovčjeg sira, vezan je uglavnom za broj somatskih ćelija, vrstu sira i proces proizvodnje sira (Moradi i sar., 2021). U proizvodnji sira postoji direktna veza između kvaliteta i broja somatskih ćelija (Panthi i sar., 2017). Na primer, korišćenje mleka sa prekomernim brojem somatskih ćelija može negativno uticati na koagulaciju, zrenje, randman, hemijski sastav i teksturu (Moradi, 2021; Panthi i sar., 2017). Takođe, dolazi i do promene sastava mleka, kao i smanjenja količine.

Jedan od najvažnijih uslova za mleko visokog kvaliteta jesu dobra poljoprivredna praksa i visok nivo higijene muže. Primena korektivnih mera u higijenskim uslovima muznih krava značajno utiče na poboljšanje mikrobiološkog kvaliteta mleka (Radulović i sar., 2017). Takođe, broj dana kojima se krava muže od momenta teljenja je usko povezan sa dobrom higijenom krave i uslovima čuvanja (Robles i sar., 2023). U studiji Hristov i sar. (2005) se pokazalo da su slobodan način gajenja i adekvatna dezinfekcija vimena muznih krava superiorniji u odnosu na vezane sisteme. Ukoliko je povećan broj mikroorganizama, a posebno onih neželjenih koji su indikatori loših higijenskih uslova i postupaka u proizvodnji i zrenju sireva, može doći do bržeg stvaranja mana proizvoda. Mane koje mogu da se jave su neželjena senzorna svojstva, kao posledica razgradanje masti i proteina, usled enzimske aktivnosti velikog broja mikroorganizama.

2.1.2.2. Izrada baskije

Izrada baskije započinje izborom mleka od kojeg će se proizvoditi kačkavalj, kao i provera kvaliteta mleka. U cilju uklanjanja nečistoća koje mogu biti prisutne u mleku neophodno je izvršiti prečišćavanje mleka. Prečišćavanje se obavlja pomoću platnenih cedila, kao i uz pomoć centrifugalnog prečišćivača.

U proizvodnji punomasnog Pirotskog kačkavalja standardizacija mlečne masti se ne vrši, već se mleko prerađuje sa sadržajem masti onakvim kakvim je primljeno u mlekaru, iz razloga što se tokom termičke obrade baskije (parenja) dodatno gubi mlečna mast (Ostojić i sar., 2012). U industrijskim uslovima operacija standardizacije mlečne masti se vrši u cilju podešavanja odnosa proteina i mlečne masti u mleku. Kada je u pitanju mlečna mast, kačkavalj treba da ispuni zahtev koji propisuje nacionalni standard (Institut za standardizaciju Srbije, 1997) u pogledu zahteva kvaliteta, prema kome kačkavalj treba da sadrži najmanje 45% mlečne masti u suvoj materiji.

Koagulacija mleka podrazumeva prelaz tečnog sistema u sistem gela, pri čemu gel čini proteinski matriks koji je nastao u toku koagulacije. Koagulacija mleka počinje dodatkom sirila u zagrejano mleko na temperaturi podsiravanja (28-33 °C) i odvija se tokom 40 minuta. Završetak koagulacije se može utvrditi empirijski, tako što se kažiprstom pomeri gel na gore pri čemu se dešava cepanje gela i pojavljuje bistra surutka.

Kada je koagulacija završena i postignuta adekvatna gotovost gela, pristupa se obradi gruša. Naime, rezanje gela i formiranje sirnog zrna se odvija pomoću harfe u potezima uzduž i popreko, pri čemu nastaju sirna zrna ujednačene veličine, poput kukuruznog zrna.

Nakon što se izvršilo formiranje sirnog zrna, sledeći postupak je odvajanje surutke oko jedne trećine i mešanje pomoću harfe ili mešalice. U ovom periodu surutka koja se izdvojila bi trebalo da bude žućkasto-zelenkaste boje što ukazuje da je koagulacija izvršena adekvatno. Nakon 10 do 15 minuta pristupa se drugom dogrevanju i sušenju sirnog zrna pri temperaturi od 38-42 °C tokom 30 do 40 minuta. Drugo dogrevanje i sušenje sirnog zrna se odvija u cilju izdvajanja vode iz sirnog zrna. Završetak sušenja se može ustanoviti empirijski, tako što se stiskanjem mase u šaci sirna zrna lepe i trljanjem između šaka razdvajaju (Mančić i Mančić, 2005). Nakon ovog postupka, odvija se odvajanje gruša ili surutke pomoću sirarskog cedilla i perforiranih ploča i formiranje sirne grude koja se naziva baskija. Izdvojeni gruš (Slike 1. i 2.) dalje podleže procesu presovanja koje se vrši pod pritiskom 5 - 10 kg mase na kg sirne mase tokom 30 - 45 minuta, nakon čega se formirana gruda seče u obliku blokova 5 - 10 kg težine. Nakon toga, baskija se ostavlja na zrenje koje se odvija na temperaturama prostorije i leti traje 6 - 24 časa, a zimi 1 - 3 dana.



Slike 1. i 2. Izdvojeni sirni gruši pred proces presovanja tokom proizvodnje kačkavalja

Zrenje baskije predstavlja proces fermentacije koji nastaje usled aktivnosti bakterija mlečne kiseline koje razlažu mlečni šećer laktozu i stvaraju mlečnu kiselinu pri čemu dolazi do disocijacije koloidnog kalcijum fosfata. Usled nastalih promena dolazi do promene mikrostrukture sirnog testa i baskija postaje pogodna za dalji proces odnosno parenje i razvlačenje. Zrenje baskije se završava kada se dostigne kiselost vrednosti 160 – 180 °SH ili pH vrednosti 5,1 – 5,2 (Ostojić i sar., 2012). Smanjenje pH vrednosti do oko 5,1 – 5,3 se još naziva i proces „čedarizacije”, odnosno proces acidifikacije i predstavlja veoma važnu operaciju u toku proizvodnje sireva parenog testa. Pomenuto smanjenje pH vrednosti utiče na pojavu demineralizacije ili disocijacije koloidnog kalcijum fosfata što posredno utiče na reološka svojstva proteinskog matriksa koji je nosilac strukture sira (Miočinović, 2020). Acidifikacija takođe utiče na inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama. Empirijski se zrelost može utvrditi pomoću metode tzv. „tiganjske probe”, tako što se jedan mali komad baskije pari i ako se rasteže i pocepa na konce ili tanke niti znači da je dostignuta zrelost. Ukoliko se komad nakon parenja brzo rastapa i kida znači da nema elastičnost i baskija je prezrela, a ukoliko se teško rastapa i ne rasteže baskija nije zrela (Ostojić i sar., 2012; Mančić i Mančić, 2005).

2.1.2.3. Prevođenje baskije u kačkavalj

Nakon što je baskija dostigla određenu zrelost odnosno kiselost, pristupa se njenom prevođenju u kačkavalj. Naime, baskija se mašinski seče na uniformne listiće debljine oko 0,5 cm. Korpa od leskovog pruća za parenje se napuni isečenim listićima dovoljno za jednu pogaču sira i potopi u vodu sadržaja jedne trećine vode za parenje od prethodnog dana i dve trećine dodate sveže vode, kako bi se smanjio gubitak masti prilikom parenja, a pri temperaturi 72-75 °C (Mančić i Mančić, 2005). Parenje sirne mase se najčešće podvodi kao kritična kontrolna tačka u postupku proizvodnje sireva parenog testa.



Slike 3 i 4. Ručno parenje i razvlačenje sirnog testa

Sadržaj korpe se ručno meša pomoću štapa i rasteže dok ne postane ujednačene plastične strukture (Slike 3. i 4.) (Danilović i sar., 2020). Masa se povremeno izvlači ručno i mesi da postane ujednačena i prebacuje na sirarski sto gde se dalje ručno obrađuje. Tokom termičke obrade sirna masa se rasteže pri čemu se struktura menja i dobija fibrozni karakter u kome je inkorporirana mlečna mast, što dalje utiče na formiranje funkcionalnih svojstava kao što su: topivost, rastegljivost, promena boje i slično (Miočinović, 2020).



Slika 5. Ručno natiranje i soljenje sirne mase tokom tradicionalne proizvodnje kačkavalja

Natiranje podrazumeva ručnu obradu tople sirne mase koja je prebačena na sirarski sto pri čemu je sirarski majstor iskustveno mesi, razvlači i nekoliko puta preklapa i tom prilikom soli ravnomerno po celoj masi formirajući takozvanu pogaču sira (Slika 5.). Pri završetku, sirarski majstor je priprema za kalupljenje pri čemu formira i odvaja đubek, dok mesto prekida koji se naziva pupak predstavlja najosetljivije mesto na formiranoj pogači sira (Slike 6. i 7.) (Miočinović, 2020). Masu stavlja u pripremljeni kalup pri čemu se masa izbode na više mesta kako bi se izdvojio inkorporirani vazduh. U industrijskoj proizvodnji sireva parenog testa, uključujući kačkavalj, parenje i razvlačenje se obavlja u specijalnim mašinama tzv. transporterima u kojima se sirna masa istovremeno mesi i pari, nakon čega se vrši kalupljenje. Sirevi dobijeni na ovaj način imaju drugačija teksturalna svojstva u odnosu na tradicionalno proizveden kačkavalj.



Slike 6 i 7. Kalupljenje sirne mase, formiranje i odvajanje đubeka

2.1.2.4. Zrenje i nega kačkavalja

Pre prenošenja sireva u komore za zrenje, pristupa se najpre procesu sušenja (Slika 8.). Ovaj proces podrazumeva slaganje sireva u komori za sušenje uz povremeno okretanje pri uslovima sušenja, koji podrazumevaju temperaturu 22-26 °C i relativnu vlažnost 65-75% tokom 3 do 4 dana (Ostojić i sar., 2012).



Slika 8. Sirevi u komori za sušenje

Nakon procesa sušenja, vrši se prenos sireva u komore za zrenje gde se sirevi ređaju na police. U komori za zrenje je optimalna temperatura 15-18 °C, dok je relativna vlažnost 75-85% (Kurčubić i sar., 2015). Dosoljavanje tokom procesa zrenja se odvija ravnomerno pomoću soli koja je neophodna da bude suva i čista. Tokom procesa zrenja i dosoljavanja, neophodno je negovati sireve, odnosno brisati ih suvom krpom radi uklanjanja neželjenih nečistoća i plesni koje se mogu pojaviti.

Minimalni period procesa zrenja kačkavalja ili kačkavalja krstaša definisan je nacionalnim standardom (Institut za standardizaciju Srbije, 1997) i podrazumeva period zrenja od najmanje 8 nedelja kad je u pitanju kačkavalj i 4 nedelje kad je u pitanju kačkavalj krstaš. Nakon procesa zrenja, kačkavalj se pakuje (najčešće se vakuumira), deklarise kao Pirotski kačkavalj i po potrebi skladišti na temperaturi od 0-6 °C do isporuke (Kurčubić i sar., 2015).

Zrenje kačkavalja podrazumeva niz biohemijskih reakcija koje utiču na senzorne atribute i kvalitet finalnog proizvoda. Proteoliza je ključan biohemijski proces u zrenju sira, a odvija se kroz enzimski sistem formiran od proteaza različitog porekla: mleko (plazmin), sirilo (himozin), nativna mikrobiota mleka (proteaze bakterija mlečne kiseline). Razlaganje kazeina ovim enzimskim sistemom dovodi do stvaranja peptida koji utiču na teksturu i ukus sira tokom zrenja (Perna i sar., 2014). Naime, tokom početnog perioda zrenja, kazein se razlaže na peptide velikih molekulskih masa, što se još naziva i primarna proteoliza. Sekundarna proteoliza podrazumeva dalje razlaganje do stvaranja srednjih i malih peptida, kao i aminokiselina (Ayyash i Shah, 2011a; Upadhyay i sar., 2006). Daljom razgradnjom aminokiselina mogu nastati produkti kao što su: indol, fenol, krezol, vodonik-sulfid, ugljen-dioksid, amonijak i dr. Ovi produkti imaju značajnu ulogu u formiranju ukusa i mirisa sira. Samim tim, senzorna svojstva i kvalitet sira u velikoj meri zavise od toka i obima proteolize tokom zrenja. Brojni faktori utiču na proteolizu uključujući postupak proizvodnje, hemijski sastav, vrste prisutnih mikroorganizama i enzima, pH

vrednost, temperaturu, dužinu trajanja i uslove zrenja, kao i koncentraciju soli (Rowney i sar., 2004; Miočinović i sar. 2014).

Veliki značaj u tradicionalnoj proizvodnji kačkavalja ima autohtona mikrobiota, jer se prilikom proizvodnje ne dodaju komercijalne starter kulture. Takođe, mikrobiota tradicionalnih sireva proizvedenih od sirovog mleka pokazuju veću raznolikost u odnosu na sireve proizvedenih od pasterezovanog mleka, u pogledu nestarterskih bakterija mlečne kiseline, čijim delovanjem može doći do stvaranja bioaktivnih peptida (Samelis i sar., 2019).

Proizvodi glikolize, proteolize i lipolize, koji nastaju tokom zrenja, imaju veliki uticaj na ukus sira. S obzirom da se starter kulture ne dodaju pri proizvodnji Pirotskog kačkavalja, ukus u najvećem delu potiče od metaboličkih proizvoda autohtone mikrobiote. Prednosti autohtone mikrobiote su brzi rast i razvoj, kao i proizvodnja specifičnih senzornih svojstava proizvoda (Danilović i sar., 2020). Mnoge studije su se bavile ispitivanjem uticaja procesa proizvodnje sira sa autohtonom mikrobiotom ili sa dodavanjem starter kulture na fizičko-hemijska, mikrobiološka i senzorna svojstva kačkavalja tokom zrenja (Gobbetti i sar., 2002; Cagno i sar., 2012; Bonanno i sar., 2013).

Prema Guinee i sar. (2015), primenom UREA elektroforeze je uvrđeno da je tokom zrenja kačkavalja, ali i drugih sireva kao što su čedar, mocarela i gauda, koncentracija intaktnog β -kazeina bila znatno veća od koncentracije α_{s1} -kazeina. Svi navedeni sirevi su pokazali prisustvo produkta degradacije β -kazeina, a to su β -CN (f29–209) ($\gamma 1$), β -CN (f106–209) ($\gamma 2$) i β -CN (f108–209) ($\gamma 3$). Postojanje γ -CN u siru kačkavalj tokom zrenja, potvrđuje aktivnost plazmina, koji opstaje i nakon parenja tokom proizvodnje kačkavalja. Takođe, α_{s1} -kazein je hidrolizovan u siru do fragmenata veće elektroforetske pokretljivosti uključujući α_{s1} -CN (f102–199), α_{s1} -CN (f24–199), α_{s1} -CN (f33), α_{s1} -CN (f60-) i α_{s1} -CN (f24-) (Guinee i sar., 2015). U sirevima kačkavalj, α_{s1} -kazein se hidrolizuje tokom fermentacije grude ostatkom sirila mnogo više nego β -kazein. Međutim, tokom procesa parenja, zaostalo sirilo se inaktivise u velikoj meri. Stoga, tokom zrenja, hidroliza β -CN pomoću plazmina postaje značajna, što se zaključuje iz prisustva γ -kazeina u elektroforetogramima (Carić, 1993).

Proteoliza kačkavalja i sličnih sireva najčešće nije izrazito intenzivna. Naime, koeficijent zrelosti koji predstavlja sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija kao udeo u ukupnim azotnim materijama je najčešće oko 20%, iako se u literaturi mogu naći i vrednosti kao što su 10% ili 30%. Takođe, važno je napomenuti da značajan deo rastvorljivog azota, oko 25–30% u zreлом siru, nastaje tokom fermentacije grude, kao i da se delimično gubi u vodi tokom procesa parenja (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). Tokom zrenja se povećava sadržaj malih peptida, kao i slobodnih aminokiselina. Ukupan sadržaj slobodnih aminokiselina kreće se od 2,2 do 4,5 g/kg sira (Carić, 1993; Simov i sar., 2006).

2.1.3. Mikrobiota kačkavalja

Tradicionalna proizvodnja kačkavalja iz sirovog mleka, podrazumeva izostanak dodavanja starter kultura, što rezultira velikom raznolikošću sastava prisutne mikrobiote. Kao posledica veoma raznolikog biodiverziteta bakterija mlečne kiseline koje učestvuju u zrenju sireva, ovi sirevi se odlikuju bogatim senzornim svojstvima, zbog čega su i cenjeni među potrošačima. Ovakvi bogati ekosistemi prisutnih mikroorganizama se direktno odražavaju na kvalitet sireva (McSweeney i sar., 1993; De Angelis i sar., 2001; Marino i sar., 2003).

Sastav mikrobiote je veoma varijabilan i velikim delom uslovljen higijenom muže i svim sledećim koracima tokom njegove proizvodnje, pri čemu primena visoke temperature tokom parenja sirnog testa, igra najvažniju ulogu u smanjenju broja prisutnih bakterija, sprečavajući rast neželjene mikrobiote. S obzirom da se parenje baskije odvija na 72–75°C, vrši se veliki uticaj na prisutnu mikrobiotu. Za ovaj visoki termički tretman se može reći da predstavlja način

pasterizacije, što ima uticaj na promenu sastava mikrobiote a samim tim utiče i na biohemijske promene tokom proizvodnje i zrenja kačkavalja. Pored toga što ovaj termički tretman ima za cilj smanjenje ukupnog broja prisutnih bakterija, ovaj tretman ima važnu ulogu i u postizanju bezbednosti proizvoda, što je od presudnog značaja pogotovo u sredinama gde higijena prilikom dobijanja mleka nije na dovoljno visokom nivou, kao što su domaćinstva koja se bave tradicionalnom proizvodnjom. Imajući u vidu da termički tretman eliminiše veliki broj bakterija, mikrobiota koja preživi igra krucijalnu ulogu u svim fazama zrenja sira i formiranju jedinstvenih senzornih svojstava gotovog proizvoda.

Imajući u vidu da se nestarterske bakterije mlečne kiseline (NSBMK) javljaju i u sirevima proizvedenim i od sirovog i termički tretiranog mleka, njihovi izvori porekla su veoma različiti. Razlika je u tome što kod sireva od sirovog mleka ova mikrobiota ima ulogu i starterske i nestarterske mikrobiote. Stoga rast NSBMK u siru zavisi od velikog broja faktora, a u prvom redu njihov broj je određen inicijalnim brojem u sirnoj grudi koji je pod uticajem faktora kao što su mikrobiota sirovog mleka, temperatura skladištenja, termizacija, pasterizacija (ako je ima) i širina kontaminacije mleka ili sirne grude ingredijentima, opremom, osobljem ili sredinom tokom proizvodnje sireva tj. nakon termičkog tretmana (McSweeney, 1995; Rehman, 2000).

S obzirom da se u tradicionalnoj proizvodnji kačkavalja ne dodaju starter kulture, NSBMK poreklom iz sirovine i okruženja čine ključnu mikrobiotu koja je odgovorna za veliki deo biohemijskih promena u siru tokom njegove proizvodnje i zrenja. Njihova uloga nije tako izražena u proizvodnji kiseline kao što je to slučaj kod sireva sa starterskim bakterijama, ali je njihov doprinos veoma važan u formiranju senzornih svojstava (Beresford i Williams, 2004). Beresford i sar. (2001) su pokazali da su primarni faktori koji kontrolišu rast bakterija u siru sadržaj vode, koncentracija soli, pH, redoks potencijal, temperatura zrenja. Radulović (2010) je utvrdila da laktobacili predstavljaju dominantnu mikrobiotu tradicionalnog kačkavalja. Laktobacili su bili prisutni 44,4%, od kojih je mezofilnih bilo 18,5% i 25,9% termofilnih. Okruglaste bakterije su bile zastupljene 55,55%, pri čemu su termofilne bile prisutne 33,33%, a mezofilne laktokoke su predstavljale 22,22% od ukupnog broja prisutnih BMK. S obzirom na postupak proizvodnje kačkavalja nije iznenađujuća dominacija termofilnih bakterija mlečne kiseline.

Dominantnost mikrobiote tradicionalnih sireva zavisi i od njihove zrelosti. Tako su na primer Hayaloğlu i sar. (2002) i Öner i sar. (2006) pokazali da se kod belih sireva u salamuri proizvedenih od sirovog mleka, u ranijim fazama zrenja, kao dominantna mikrobiota javljaju vrste roda *Lactococcus*. Nasuprot njima, Beresford i sar., (2001) su utvrdili da najveći udeo mikrobiote većine sireva čine mezofilni laktobacili. Međutim, iako su laktobacili najrasprostranjeniji u okruženju i značajno zastupljeni u sirovom mleku, često ih prerastaju laktokoke. Za njih se može reći da se najčešće nalaze tokom faze zrenja različitih sireva i čine nestartersku mikrobiotu. Ova dominantnost laktobacila se posebno odnosi na sireve dobijene iz sirovog mleka, ali je karakteristična i za sireve dobijene u industrijskim uslovima u kojima se primenjuje termički tretman mleka.

Za laktobacile je karakteristično da imaju veoma složen proteolitički sistem, što im omogućava razgradnju kazeina do peptida i aminokiselina, neophodnih za njihovu ishranu, a istovremeno ova jedinjenja doprinose formiranju karakterističnog ukusa i mirisa sireva. Williams i sar., (2001) su utvrdili da je primarni značaj vrste *Lactobacillus casei* u proteolitičkim promenama tokom zrenja sireva, što doprinosi nastanku željenog ukusa. Imajući u vidu da se ova vrsta odlikuje jakim proteolitičkim sistemom, može doprineti ubrzanom zrenju sireva (Beresford i Cogan, 1997). Smatra se da vrsta *Lactobacillus plantarum* daje specifičnost kvalitetu proizvoda, kao veoma rasprostranjena autohtona vrsta koja se javlja, ne samo u proizvodima od mleka, već i u proizvodima biljnog porekla. Prisustvo heterofermentativnih vrsta nije tipično za poslednje faze zrenja, ali su identifikovani kao nestarterska mikrobiota u prethodnim fazama zrenja različitih sireva (Corroler i sar., 1998).

Aydemir i sar. (2015) su utvrdili dominantnost laktobacila u kašar tradicionalnom turskom siru parenog testa (64,5%), gde je *Lb. casei* bio zastupljen (41,6%), a *Lb. plantarum* (13,0%) tokom zrenja. Slično ovome, Aran i sar. (1998) su utvrdili da je *Lb. casei* subsp. *casei* dominantan sa (34,3%) i *Lb. plantarum* (7,5%) tokom zrenja kašar sira sa tendencijom porasta tokom zrenja.

Za *Lb. plantarum* i *Lb. casei* subsp. *casei* se može reći da su često prisutni u sastavu NSBMK. Ovi laktobacili su se našli u dominantnoj mikrobioti mnogih sireva, kao što su Caciocavallo (Corsetti i sar., 2001; Coppola i sar., 2003;) čedar sir (Peterson i Marshall, 1990; Jordan i Cogan, 1993), turski sir kašar (Aydemir i sar., 2015), italijanski Montasio (Marino i sar., 2003) i dr. Mezofilne laktokoke su utvrđene kao dominantna mikrobiota nekoliko tradicionalnih sireva, dok je kod drugih sireva dominantna samo u prvom periodu faze zrenja (Pogačić i sar., 2011), kada ima važnu ulogu u zakišeljavanju mleka i gruš, a kasnije, tokom formiranja teksture sira, se njen značaj smanjuje.

Neke vrste roda *Lactococcus* kao što su *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* se javljaju kao prirodna mikrobiota mnogih autohtonih sireva i imaju važnu ulogu u aci-difikaciji. Međutim, poznata je njihova uloga i u proteolitičkim promenama tokom zrenja sira, obzirom da se sojevi ovih vrsta mogu javiti kao jaki proteoliti. Proučavajući BMK tokom 60 dana zrenja Pirotskog kačkavalja, Danilović i sar. (2020) su izolovali 315 izolata i identifikovali ih kao *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pd. pentosaceus*, *Lactobacillus casei/rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* i *Streptococcus macedonicus*. Utvrdili su da se u kasnijim fazama zrenja povećava broj laktobacila *Lb. casei* i *Pd. acidilactici*. Mikrobiološki profil BMK sličan profilu Pirotskog kačkavalja je utvrđen i u drugim tradicionalnim sirevima mediteranskog regiona, kao što su Caciovallo Molise (Coppola i sar., 2003), Caciocavallo Pugliese (Morea i sar., 2007) i Montasio (Marino i sar., 2003). Prema podacima o metaboličkim funkcijama različitih vrsta BMK, svaka od njih ima svoju ulogu tokom proizvodnje i zrenja sira, pri čemu su neke značajne u prvim fazama, a neke u kasnijim fazama zrenja. Kompleksnost mikrobiote tradicionalnog sira kao što je kačkavalj i smenjivanjem dominantnosti pojedinih vrsta, ostvaruju se glikolitičke, proteolitičke i lipolitičke promene, produkcija komponenata arome i bioaktivnih jedinjenja tokom zrenja i formiranje specifičnog autentičnog kvaliteta.

2.1.3.1. Uticaj soli na rast autohtonih BMK

S obzirom da je procenat soli u tradicionalnim sirevima relativno visok, a pri tome i veoma varijabilan, jedna od bitnih osobina prisutnih bakterija mlečne kiseline je sposobnost rasta pri visokim koncentracijama soli. Ovakva ispitivanja su veoma bitna kada je u pitanju mikrobiota autohtonih sireva jer ona značajno utiče na proces zrenja sireva, odnosno tok i obim biohemijских promena, što se direktno odražava na formiranje senzornih svojstava sira. Kao što je već pomenuto BMK u kačkavalju su prisutne u velikom broju, pa je za očekivati da imaju izraženu sposobnost rasta pri povišenoj koncentraciji soli.

Više autora su ispitivali tolerantnost izolata BMK na prisustvo različitih koncentracija soli, pri čemu je potvrđeno da izvestan broj laktobacila može da raste u prisustvu većeg sadržaja soli. Veliku toleranciju na 9-12% NaCl pokazale su neke vrste iz roda *Lactobacillus*, prema podacima El-Gendi i sar., (1983). Prema istraživanjima Salama i sar. (1995), u određenim uslovima, fenotipske karakteristike vrste *L. lactis* ssp. *cremoris* mogu da se promene, tako da ova vrsta vrlo uspešno može da raste na 40 °C, 4% soli i na pH 9,2. Takođe radovi O'Sullivan i Condon (1997) su pokazali da rast *Lactococcus* sp. u blago kiseloj sredini (pH 5), povećava njihovu otpornost na povećanu koncentraciju soli i povišene temperature.

Radulović i sar. (2007) su ispitivali sposobnost rasta autohtonih BMK u prisustvu 2%, 4% i 6,5% soli i nakon inkubacije na optimalnim temperaturama je utvrđeno da svi izolati dobro rastu u prisustvu

2% soli. U prisustvu 4% soli dobar porast je pokazalo 87,78% izolata iz Sjeniškog sira i 86,91% izolata iz Homoljskog sira, a u prisustvu 6,5% soli dobro je raslo 51,11%, odnosno 48,05% izolata.

Prema podacima koji se odnose na autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz Pirotskog kačkavalja (Radulović 2010), takođe je evidentirana sposobnost rasta autohtonih BMK pri višim koncentracijama soli. Pokazano je da 100% svih ispitivanih izolata nesmetano raste pri 2% i 4% soli, a pri ekstremno 6,5% soli dobar porast je pokazalo čak 59,25% izolata. Ovakvi rezultati su ujedno i objašnjenje za veliku prisutnost BMK u sirevima sa relativno velikim sadržajem soli i biohemijskim promenama koje se dešavaju tokom zrenja sireva.

2.2. Značaj soli u proizvodnji sireva

Soljenje je važna operacija u proizvodnji sireva jer so ima višestruki značaj. Sadržaj soli je važan sa nutritivnog aspekta, ali ima i uticaj na tok zrenja sireva i formiranje njihovog sastava, kao i svojstva kroz uticaj na aktivnost enzima. U ovom delu posebna pažnja je posvećena značaju soli u ishrani ljudi, kao i mogućnosti smanjenja sadržaja soli u proizvodnji sireva.

2.2.1. Značaj soli u ishrani ljudi

Poznato je da je so izrazito sveprisutna u ishrani, čak se veruje da je dodavanje soli u hranu, pored one koja je prirodno prisutna u hrani, počelo u poslednjih 5.000 do 10.000 godina i to otkrićem svojstava konzervisanja hrane koju so poseduje (Mill i sar., 2021; He i sar., 2007).

Kuhinjska so (natrijum-hlorid) je glavni izvor natrijuma u ishrani i uprkos tome što predstavlja esencijalni mikronutrijent koji poseduje važnu ulogu u funkcionisanju mnogih telesnih funkcija, uključujući nervne, mišićne, apsorpciju hranljivih materija i održavanje acidobaznog balansa u telu (Dotsch i sar., 2009), natrijum je takođe prepoznat i kao uzročnik mnogih zdravstvenih oboljenja.

Poslednjih godina se sve veća pažnja skreće na uticaj kuhinjske soli na zdravlje potrošača. U skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi i sve većom brigom o zdravlju, veoma su aktuelna ispitivanja mogućnosti smanjenja unosa kuhinjske soli putem hrane. Razlog tome je štetan uticaj natrijuma koji se povezuje sa hipertenzijom, kardiovaskularnim i drugim oboljenjima (Aburto i sar., 2013; Cruz i sar., 2011; Mohan i Campbell, 2009). Vodeći uzrok smrti širom sveta su kardiovaskularne bolesti, a procenjuje se da 17 miliona ljudi svake godine premine zbog ovog uzročnika, što predstavlja 30% svih globalnih smrtnih slučajeva (WHO, 2010). Glavni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti je visok krvni pritisak, a preterani unos natrijuma je izuzetno važan uzročnik (He i Macgregor, 2013; Trieu i sar., 2015). Visok unos soli putem hrane, pored kardiovaskularnih bolesti, može takođe biti povezan sa drugim zdravstvenim oboljenjima, kao što su rak želuca, astma, kalcijum-oksalatno kamenje i drugo (Obligado i Goldfarb, 2008; Doyle i Glass 2010).

Hipertenzija je izuzetno značajan problem javnog zdravlja na globalnom nivou, a posebno u Sjedinjenim Američkim Državama (Adamowicz i sar., 2023). Naime, prema Centrima za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Centers for Disease Control and Prevention - CDC), hipertenzija je bila primarni uzročnik skoro 500.000 smrtnih slučajeva u 2018. godini (CDC, 2018). Iako se pokazalo da je visok unos natrijuma jedan od najvažnijih faktora rizika za hipertenziju i druge kardiovaskularne bolesti, adekvatna ishrana može dovesti do smanjenja arterijskog krvnog pritiska (Choi i sar., 2020; He i sar., 2013; Mente i sar., 2016; Mills i sar., 2016). U studiji Hendriksen i sar. (2014), autori su utvrdili da smanjenje unosa soli u holandskoj populaciji za oko 30% dovodi do nižih nivoa krvnog pritiska i posledično do znatno niže incidence kardiovaskularnih bolesti, kao i mortaliteta nastalih ovim uzročnikom.

Ogihara i sar. (2002) takođe sugerišu da ishrana sa visokim sadržajem soli bi mogla biti faktor koji indukuje insulinsku rezistenciju. Takođe, studije ukazuju da su osobe koje su imale ishranu sa visokim unosom natrijuma bile gojaznije i imali su tendenciju da imaju loš profil lipida (Hoffmann i Cubeddu, 2009; Mill i sar., 2020). U studiji Ribeiro i sar. (2024), utvrđen je veći unos soli kod osoba koje boluju od hipertenzije i dijabetesa nego kod osoba bez ovih stanja. Može se zaključiti da visok unos soli kod osoba sa dijabetesom i/ili hipertenzijom ukazuje na potrebu za efikasnim strategijama za smanjenje unosa soli, naročito u grupama povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti (Ribeiro i sar., 2024). Ukazano je da čak i skromno smanjenje natrijuma u ishrani smanjuje pojavu kardiovaskularnih bolesti, ali posledično takođe smanjuju i ekonomsko opterećenje povezano sa lečenjem bolesnih osoba (Bibbins-Domingo i sar., 2010).

Visok unos soli, pored kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije, je usko povezan sa pojavom moždanog udara (Virani i sar., 2021), hronične bolesti bubrega i osteoporoze (He i sar., 2020). Takođe, autori studije su pokazali da ishrana koja uključuje malo voća i povrća, a visok sadržaj natrijuma može dovesti do povećane resorpcije kostiju (Morris i sar., 2006). Takase i sar. (2023) su utvrdili da prekomerni unos soli smanjuje gustinu kostiju nezavisno od starosti i bolesti osoba. Smanjenjem unosa soli ostvarili bi se benefiti populacije sa više aspekata. Naime, osobe bi imale benefite posebno od smanjenja pojave moždanog udara, starije odrasle osobe od smanjenja slučajeva koronarne bolesti srca, a mlađe osobe od niže stope mortaliteta (Bibbins-Domingo i sar., 2010). Dakle, sagledavajući negativne zdravstvene efekte visokog unosa soli putem ishrane, oboljenja na koje ovaj faktor utiče se mogu sprečiti dijetalnim intervencijama, koje podrazumevaju smanjenje soli u ishrani.

Stoga je smanjenje sadržaja natrijum-hlorida u hrani prepoznato od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO, 2016) kao jedno od pet prioritarnih aktivnosti u prevenciji i kontroli nezaznavnih bolesti. Iz navedenih razloga, poslednjih godina aktuelna su istraživanja na temu mogućnosti smanjenja sadržaja natrijuma u hrani bilo smanjenjem dodatog NaCl ili delimičnom ili potpunom zamenom NaCl drugim pogodnim solima, kao što je KCl (Bansal i Mishra, 2020; Dugat-Bony i sar., 2019; Miocinovic i sar., 2022). Svetska Zdravstvena Organizacija je dala preporuku o smanjenju unosa natrijuma za 30% putem hrane (WHO, 2012). Što bi značilo da je prepoznat i postavljen cilj da se smanji unos soli populacije za 30%, sa ciljem u proseku 5 grama dnevno do 2025. godine (Beaglehole i sar., 2011). Svetska Zdravstvena Organizacija je takođe izdala preporuku da je maksimalni unos soli 5 g na dnevnom nivou (WHO, 2023). Međutim, procenjuje se da čak 99,2% odraslih ljudi širom sveta konzumira više od preporučenog unosa soli od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (Mozaffarian i sar., 2014). Mnoštvo zemalja je ovo prepoznalo kao problem od izuzetne važnosti i stoga je 75 zemalja razvilo nacionalnu strategiju koja se odnosi na smanjenje sadržaja natrijuma u prehrambenim proizvodima (Trieu i sar., 2015). U studiji Trieu i sar. (2015) pokrenuto je sprovođenje strategije smanjenja soli širom sveta u kontekstu globalnog cilja da se smanji unos soli za 30% do 2025. godine. Strategija je višestruka i podrazumeva utvrđivanje i reformulaciju namirnica sa visokim sadržajem natrijuma, označavanje na prednjoj strani ambalaže, a sa druge strane podrazumeva i edukaciju potrošača i intervencije u ustanovama javnih institucija, kao što su škole, bolnice i drugo. Primarne intervencije koje su prepoznate u cilju smanjenja unosa soli su smanjenje natrijuma u prerađenoj hrani, podizanje svesti potrošača o smanjenju soli i praćenje potrošnje soli u populaciji, kao i reformulacija hrane (Cappuccio, 2011).

Pošto je smanjenje natrijuma u ljudskoj ishrani jedan od glavnih ciljeva zdravstvenih agencija, nastao je veliki izazov za prehrambenu industriju koja mora da sprovede reformulaciju namirnica sa visokim sadržajem natrijuma (Dugat-Bony i sar., 2019). Međutim, procenjuje se da prerađena hrana, uključujući i sireve, doprinosi preko 70% unosu natrijuma ishranom (Appel i Anderson, 2010; EFSA, 2006).

Sirevi predstavljaju značajan izvor kuhinjske soli i kao takvi su značajni sa aspekta ispitivanja mogućnosti smanjenja njenog sadržaja (Miocinovic i sar., 2022). Sirevi su prepoznati kao jedan od izvora unosa soli putem hrane (Tabela 1.). Štaviše, potrošnja sira je u porastu širom sveta, što dalje implicira da je potrebno da se smanji nivo soli u različitim vrstama sireva (Bansal i Mishra, 2019).

Tabela 1. Unos soli konzumiranjem sireva u različitim državama (Bansal i Mishra, 2019)

Unos soli (%)	Država	Referenca
3,8% do 11%	Sjedinjene Američke Države	CDC (2012)
10%	Nemačka	Bisig (2017)
7,5%	Švajcarska	Bisig (2017)
4% do 7%	Australija	Charlton i sar. (2010), Grimes i sar. (2011)
3,2% do 5,4%	Kanada	Fischer i sar. (2009)
4%	Ujedinjeno Kraljevstvo	Hashem i sar. (2014)
2,8%	Novi Zeland	Ministry of Health (2003)

2.2.2. Smanjenje soli u proizvodnji sireva

Još od davnina je ustanovljeno da proces soljenja poseduje značajan konzervišući efekat. Uz proces soljenja, fermentacija i dehidratacija takođe imaju ovaj efekat. Međutim, pored spomenutog, so ima značajnu ulogu i u drugim aspektima tokom proizvodnje i zrenja, kao što su uticaj na sadržaj vode, ukus, nutritivni aspekt, kontroliše rast mikroorganizama odgovornih za zrenje sira, poseduje inhibitorno dejstvo prema patogenim mikroorganizmima, utiče na aktivnost pojedinih enzima tokom zrenja, utiče na hidratisanost i konformaciju proteina što određuje reološka svojstva i teksturu sira i deluje kao pojačivač ukusa (Dugat-Bony i sar., 2019; Cruz i sar., 2011; Puđa, 2009). S obzirom na značajni uticaj soli na kvalitet sira, sprovedena su različita istraživanja u cilju ispitivanja najniže koncentracije soli koja se može primeniti tokom proizvodnje, a da se ne naruši kvalitet sira (Bibiana i sar., 2022).

U literaturi se uticaj smanjenja soli u proizvodnji sireva na pH vrednost pominje kod različitih sireva, pri čemu je pokazano da zavisi od vrste sira i nivoa smanjenja soli. Naime, kada je u pitanju sir mocarela smanjivanjem sadržaja natrijum-hlorida nije došlo do značajnih promena pH vrednosti čak i kod sireva sa 35% i 60% smanjene soli u odnosu na kontrolni uzorak (Arboatti i sar., 2014). Slične rezultate su utvrdili Ganesan i sar. (2014) koji su pokazali da kod sira mocarela sa smanjenim sadržajem soli nije došlo do značajne razlike pH vrednosti, dok je kod sireva čedar ustanovljeno smanjenje pH vrednosti koja je kod kontrolnih uzoraka bila 5,3, a onih sa smanjenim sadržajem soli 5,0 – 5,1. Ovakva pojava se može komentarisati da se kod sira čedar niža pH vrednost javila iz razloga brzog razlaganja laktoze do mlečne kiseline kao rezultat manjeg sadržaja soli i bolje aktivnosti bakterija mlečne kiseline, dok se kod sira mocarela promena pH vrednosti nije javila usled verovatno inaktivacije bakterija mlečne kiseline tokom termičke obrade (Kindstedt i sar., 2004).

Prilikom istraživanja sira čedar kod kog je zamenjen 50% NaCl pomoću KCl u odnosu na kontrolni sir sa 100% NaCl nije bilo značajnih razlika u pogledu proteolize, ukusa, i teksture. Takođe, u istom istraživanju se pokazalo da prilikom zamene 50% NaCl solima kalcijum-hlorid (CaCl_2) ili magnezijum-hlorid (MgCl_2) to nije bio slučaj jer su se rezultati teksture i ukusa značajno razlikovali (Fitzgerald i Buckley, 1985). Katsiari i sar. (2001) su ustanovili da zamena 25% i 50% NaCl pomoću KCl u proizvodnji sira Kefalograviera nije pokazala značajan uticaj na obim i tok proteolize tokom 6 meseci zrenja. Prema McMahon i sar. (2014) nije bilo značajne razlike u sadržaju u vodi rastvorljivih azotnih materija između ispitivanih čedar sireva koji su imali 10 – 70% zamene NaCl pomoću KCl.

Smanjenje soli u siru parenog testa kao što je kačkavalj nije jednostavno jer sadržaj natrijum-hlorida ima važnu ulogu u proizvodnji sira, naime ono utiče na zrenje, tehnološko-funkcionalna svojstva i senzorna svojstva (Ganesan i sar., 2014). Takođe, veliki uticaj ima i na rast mikroorganizama, aktivnost enzima, kao i sinerezis grude što posledično ima uticaj na kvalitet sira (Cruz i sar., 2011; Guinee i Fox, 2004). Međutim, prema Bibiana i sar. (2022), smanjenje sadržaja NaCl ili zamena 40% NaCl pomoću KCl može biti dobra strategija za proizvodnju polutvrdih i tvrdih sireva sa smanjenim sadržajem soli, a koji su senzorno prihvatljivi i bez značajnih uticaja na fizičko-hemijska svojstva sireva (pH vrednost, suhu materiju, proteolizu, rasta mikroorganizama, teksturu i boju sireva).

Do sada istraživanja o mogućnosti smanjenja sadržaja kuhinjske soli u kačkavalju nisu vršena u našoj zemlji. Ispitivanje mogućnosti smanjenja i zamene kuhinjske soli u ovim sirevima bi doprinelo dobijanju proizvoda preporučenog za konzumiranje brojnim grupama ljudi, čak i onih iz kategorije osetljivih i/ili bolesnih. Takođe, poslednjih godina se može primetiti da su potrošači svesniji odnosa između hrane i zdravlja i često zahtevaju zdraviju hranu, iz tog razloga mlečna industrija kontinuirano traži alternativne načine kako smanjiti sadržaj soli u siru uz održavanje zadovoljstva potrošača (Bibiana i sar., 2022).

2.3. Bioaktivnost sireva

Poznato je da mlečni proizvodi imaju dobrobiti za ljudsko zdravlje. Blagotvorno dejstvo mlečnih proizvoda je posledica biološki aktivnih jedinjenja kao i delovanja metabolita bakterija mlečne kiseline (BMK). Mleko sadrži mnoge komponente koje unapređuju zdravlje, uključujući bioaktivne peptide. Mnogi biološki aktivni peptidi mleka pokazuju multifunkcionalna svojstva – specifična peptidna sekvenca može da ispolji dve ili više različitih bioloških aktivnosti, zato se smatraju visoko izraženim sastojcima funkcionalne hrane koji unapređuju zdravlje (Teneva i sar., 2018). Stoga, proteini mleka su prepoznati kao sastavni deo funkcionalne hrane, koja je prevashodno namenjena hroničnim bolesnicima koji pate od kardiovaskularnih bolesti, gojaznosti i dijabetesa tipa 2 (Iwaniak, 2020).

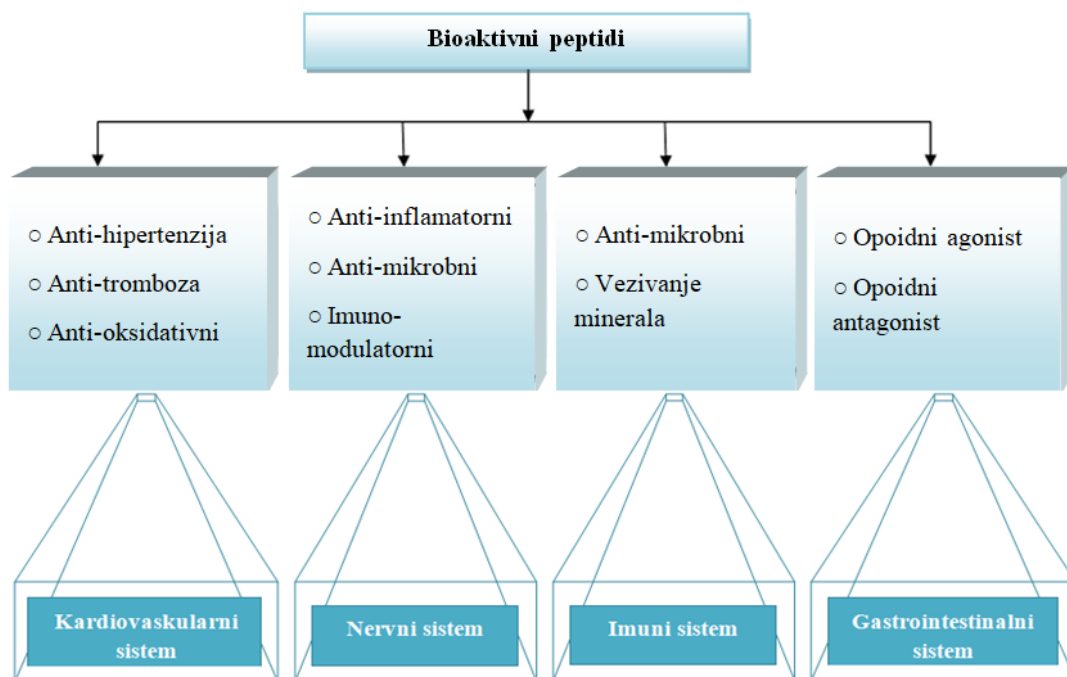
Mleko, kao hranljiva sredina je bogato proteinima, a naročito proizvodi koji su nastali fermentacijom mleka i gubitkom vode, kao što su sirevi. Tokom proteolize koja se odvija tokom proizvodnje i zrenja sireva, nastaju peptidi različitih veličina, prvo oni veliki nerastvorljivi u vodi, a zatim peptidi srednje veličine rastvorljivi u vodi, a od njih procesima hidrolize nastaju mali peptidi i aminokiseline. Proteinski ekstrakt sira, koji sadrži u vodi rastvorljive peptide, može pokazivati više različitih bioaktivnosti i na taj način imati pozitivnog uticaja na ljudsko zdravlje (Silva i sar., 2019).

Oslobađanje peptida i aminokiselina tokom proteolitičkih promena ima dvojak uticaj. Prvi se odnosi na njihov uticaj na formiranje ukusa i teksture gotovog proizvoda, a sa druge strane, novonastali peptidi mogu pokazivati bioaktivna svojstva i time doprinosti nastanku zdravstvenih efekata kod potrošača (Saito i sar., 2000).

Imajući u vidu da se kvalitet sira najvećim delom formira tokom zrenja, proteoliza je jedan od najvažnijih biohemijskih procesa i ima veliki uticaj na aromu i teksturu sira. Na proteolizu sira utiču: aktivnost enzima kao što su plazmin i himozin, peptidaze i proteinaze koje potiču od bakterija mlečne kiseline, vreme, vlažnost i temperatura zrenja, pH vrednost i sastav sira, posebno sadržaj soli (Miocinovic i sar., 2014). Tokom zrenja sireva, odnosno tokom proteolitičkih promena, nastaju jedinjenja odnosno peptidi koji mogu da ispoljavaju bioaktivnost. Specifične sekvence oslobođenih peptida potencijalno mogu da pokažu biološka svojstva uključujući antioksidativnu, antimikrobnu, antiinflamatornu, imunomodulatornu i opioidnu aktivnost, kao i inhibiciju enzima koji konvertuje angiotenzin.

Bioaktivna jedinjenja koja se mogu pronaći u siru su pored peptida i egzopolisaharidi, masne kiseline, organske kiseline, vitamini, γ -aminobuterna kiselina i konjugovana linolna kiselina (Santiago-López i sar., 2018). Enzimskom hidrolizom kazeina mogu da nastanu antioksidativna jedinjenja, pa je stoga antioksidativno svojstvo sira povezano u velikoj meri i sa stepenom razgradnje kazeina (Chen i sar., 2019). Antimikrobna uloga se ogleda u podsticanju prirodne odbrane organizma od patogenih mikroorganizama. Ukoliko se sagledava bioaktivnost proizvoda od mleka, očekuje se da ukupno antibakterijsko dejstvo bude značajno prema širokom spektru patogenih bakterija.

Bioaktivnost peptida se ogleda u tome što imaju sposobnost da se vežu za specifične receptore na određenim ćelijama i utiču na njihove fiziološke funkcije (FitzGerald i Murray, 2006). Mnogi istraživači su ispitivali zdravstvene efekte nastalih bioaktivnih peptida i utvrdili da se najčešći oblici bioaktivnosti ispoljavaju kroz stimulaciju antimikrobne aktivnosti (Arruda i sar., 2012; Silva i sar., 2012), snižavanje krvnog pritiska (Corrêa i sar., 2014; Otte i sar., 2007b), snižavanju holesterola, antitrombične i antioksidativne aktivnosti (Silva i sar., 2012; Timón i sar., 2014), imunomodulatorne, opioidne aktivnosti i dr. (Akalin, 2014). Rafiq i sar. (2021) su predstavili šemu zdravstvenih efekata bioaktivnih peptida na kardiovaskularni sistem, nervni sistem, imuni sistem i gastrointestinalni sistem (Slika 9.).



Slika 9. Različite fiziološke funkcije bioaktivnih peptida iz mleka (Rafiq i sar., 2021)

Osim toga što su mnoga istraživanja vršena na utvrđivanju postojanja zdravstvenih efekata, sa druge strane brojni autori su se bavili izolacijom i identifikacijom samih bioaktivnih peptida koji doprinose zdravstvenim efektima. Prema specifičnim fiziološkim funkcijama, bioaktivni peptidi su grupisani kao kazomorfini, ACE inhibitorni peptidi, fosfopeptidi, imunopeptidi, katoplatelini, citomodulatorni, antimikrobni, antiopoidni, kazokinini, laktokinini i dr. (Upadhyay i sar., 2006; Benkerroum, 2010). Većina bioaktivnih peptida nastaje razgradnjom α_1 -kazeina, zatim β -kazeina, α_2 -kazeina i κ -kazeina (Hodgkinson i sar., 2019; Nielsen i sar., 2017).

Rafiq i sar. (2021) su kategorisali različite bioaktivne peptide iz različitih frakcija proteina mleka i to iz α -CN, β -CN: kazomorfini, kazokinini, imunopeptidi, fosfopeptidi, koji su pokazivali ACE inhibitorno, imunomodulatorno i antiopoidno dejstvo; iz α -LA, β -LG: α -laktorfin, β -laktorfin, laktokinini sa ACE inhibitornim i antiopoidnim dejstvom; iz laktoferina laktoferoksini, laktofericin; iz γ -CN kazoplatelini sa antitrombičnim dejstvom.

2.3.1. Antimikrobna aktivnost

Poznato je da mleko i proizvodi od mleka, osim svoje nutritivne vrednosti, mogu imati i jedinstvene metaboličke efekte, kao što je antimikrobna aktivnost. Antimikrobni peptidi su pozitivno naelektrisani oligopeptidi dužine 12–50 aminokiselina, koji se javljaju kao produženi oligopeptidi ili formiraju sekundarne strukture (Wang i sar., 2016). Njihov mehanizam inhibitornog delovanja na mikroorganizme se ogleda u prodiranju i oštećenju ćelijske membrane ili intracelularnih ciljeva, što rezultira uništenjem samih ćelija (Kumar i sar., 2018). Smatra se da strukturni sastav peptida ima glavnu ulogu u mehanizmu delovanja antimikrobnih fragmenata. Poznato je da ovi peptidi selektivno narušavaju fizički integritet i permeabilizaciju bakterijske ćelijske membrane, zahvaljujući interakcijama koja se dešavaju elektrostatičkim vezama između katjonskih peptida i negativno naelektrisanih komponenti prisutnih na bakterijskom omotaču, kao što su fosfatne grupe unutar lipopolisaharida gram negativnih bakterija ili lipoteihoične kiseline prisutne na površinama gram pozitivnih bakterija (Jenssen, i sar., 2006).

Ova bioaktivnost može nastati tokom dobijanja samog proizvoda od mleka, a takođe i tokom varenja pod dejstvom proteaza prisutnih u gastrointestinalnom traktu (Haque i sar., 2009). Pored toga što se mnoga istraživanja odnose na razne zdravstvene efekte bioaktivnih peptida, još uvek je nedovoljno ispitano da li ovi peptidi mogu da izdrže visoku proteolitičku aktivnost u gastrointestinalnom traktu dovoljno dugo da ispolje efekat pre nego što budu u potpunosti razgrađeni i da li je njihova permeabilnost kroz crevni epitel takva da mogu da dođu do ciljnog tkiva ili organa u dovoljnim koncentracijama. Pored toga što je poznato da dipeptidi i tripeptidi mogu prodrati u crevni epitel i izvršiti određenu biološku funkciju, za duže oligopeptide još uvek nema jasnih dokaza (Miner-Williams i sar., 2014). Međutim, antimikrobni peptidi koji su stabilni u odnosu na proteolizu, nisu podložni epitelnoj apsorpciji i verovatno mogu imati neposredan efekat na mikrobiom creva. Imajući u vidu da antimikrobni peptidi mogu inhibirati rast patogena kao što su *Helicobacter pylori* (Chen i sar., 2007), *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Dallas i sar., 2013), antimikrobni peptidi mogu imati veliki značaj u održavanju zdravog gastrointestinalnog trakta i kontroli mikrobnog balansa organa za varenje. Ulm i sar. (2012) su pokazali da antimikrobni peptidi mogu da ispolje svoj antimikrobni efekat i putem imunomodulacije iako tačni mehanizmi nisu sasvim jasni.

U cilju identifikacije bioaktivnih peptida u hrani, potrebno je uzeti u obzir individualni sastav aminokiselina peptida, rastvorljivost, dužinu, amfifilne karakteristike i sličnost sekundarne strukture sa poznatim okarakterisanim endogenim peptidima u organizmu, kao i sa peptidima koje proizvodi crevna mikrobiota (Torrent i sar., 2012). Mleko i neki proizvodi od mleka, kao što je jogurt, su već okarakterisani i identifikovani kao efikasni protiv specifičnih patogena (Fadaei i sar., 2012). Takođe utvrđeno je da je ovčije i kozje mleko bogato bioaktivnim peptidima koji potiču uglavnom iz α -, β - i κ -kazeina (Atanasova i sar., 2010). Sve su veća interesovanja u

pogledu ispitivanja antimikrobnih peptida iz surutke, a takođe i u sirevima, kao najrasprostranjenijim proizvodima od mleka (Anagnostopoulos i sar., 2018).

Pritchard i sar. (2010) su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost vodenog proteinskog ekstrakta dobijenog iz australijskog čedar sira u odnosu na *Escherichia coli* i *Bacillus cereus*. Takođe, Silva i sar. (2012), su utvrdili da postoji antimikrobna aktivnost vodenog proteinskog ekstrakta iz Coalho sira, protiv *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Fialho i sar., (2018) su identifikovali 30 rastvorljivih peptida iz Canastra zanatskog sira sa izraženom antimikrobnom aktivnošću protiv *Escherichia coli*. Autori su istakli da je formiranje antimikrobnih peptida najvećim delom zavisno od prisutne mikrobiote, tim pre što se ovaj sir proizvodi od sirovog mleka bez dodavanja starter kulture. Mikrobiološki sastav sireva je veoma različit i zavisi od faktora kao što su: temperatura, pH, koncentracija soli i dobra proizvođačka praksa. Takođe, autori su istakli da je u proizvodnji ovog sira i dodavanje soli varijabilno, što prouzrokuje značajne razlike u fizičkom, hemijskom i mikrobiološkom sastavu sireva, pa i nastanku bioaktivnih peptida. Fialho i sar., (2018) su ispitivali prisustvo antimikrobnih peptida u uzorcima Canastra tradicionalnog Minas sira tokom 30 dana zrenja. Ekstrahovani rastvorljivi peptidi iz sireva su frakcionisani tečnom hromatografijom reverzne faze i njihove frakcije su procenjene na inhibitorno dejstvo *E. coli*. Detektovano je 6 antimikrobnih peptida, od kojih su 4 poticala iz α _{s1}-kazeina i njihovi fragmenti su pripadali isracidinu (α _{s1}-kazein 1-23) koji je dobro poznat antimikrobni peptid. Preostala dva peptida su bili poreklom iz β -kazeina i mada su izolovani u drugim studijama, njihove biološke aktivnosti su još uvek nisu poznate.

2.3.2. Antioksidativna aktivnost

Oksidativni stres se smatra jednim od glavnih uzročnika pojave različitih oboljenja, kao što su npr. kardiovaskularne bolesti, koje su sve zastupljenije (Hsieh i sar., 2015). Pod antioksidativnom aktivnošću se podrazumeva aktivnost određenih jedinjenja koja imaju sposobnost da odlože ili spreče oksidaciju lako oksidujućih jedinjenja, čak i ako su prisutni u malim koncentracijama (MacDonald-Wickset i sar., 2006). Imajući u vidu da se bioaktivnost dovodi u vezu sa koncentracijom peptida male molekulske mase, mnogi autori su pokazali da je antioksidativna aktivnost u direktnoj korelaciji sa koncentracijom malih peptida (Kudoh i sar., 2001; Virtanen i sar., 2007; Gomez-Ruiz i sar., 2008).

Antioksidativna aktivnost bioaktivnih peptida se ogleda u tome što ovi peptidi pokazuju sposobnost sprečavanja stvaranja slobodnih radikala ili uklanjanja slobodnih radikala, koji mogu prouzrokovati različita oboljenja kao što su arterioskleroza, različita srčana oboljenja, kancer i dr. (Perna i sar., 2015).

Za slobodne radikale se smatra da su prekursori antioksidanta glutaciona, koji pokazuje antioksidativnu aktivnost, sprečavajući negativan efekat faktora stresa (Hernández-Ledesma, i sar., 2008; Ricci-Cabello i Olalla-Herrera, 2012; Shahidi i Zhong, 2010). Sulfhidrilna jedinjenja su poznata kao jedinjenja koja dobro uklanjaju slobodne radikale, pa samim tim i aminokiseline koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistein, mogu biti prevedene u redukovani glutation koji štiti od oksidativnih oštećenja (Kinsella i Whitehead 1989).

Antioksidativna svojstva peptida zavise od njihovog sastava, strukture, hidrofobnosti i prisustva aminokiselinskih ostataka i njihovog položaja u peptidnoj sekvenci (Rajapakse i sar., 2005). Utvrđeno je da prolin, kao hidrofobna aminokiselina, ima izraženu antioksidativnu aktivnost (Gomez-Ruiz i sar., 2004; Hernandez-Ledesma i sar., 2005). Takođe i aromatične aminokiseline, (triptofan, tirozin i fenilalanin) inhibiraju lanac reakcija slobodnih radikala i pokazuju antioksidativni efekat (Inda, 2000; Ramirez-Rivas i sar., 2022).

Poslednjih decenija, dosta je istraživanja posvećeno ispitivanju peptida dobijenih iz mleka i različitih mlečnih proizvoda, koji imaju sposobnost eliminacije slobodnih radikala. Meira i sar. (2012) su identifikovali antioksidativne peptide iz β -CN (211–220) i α _{s1}-CN (121–130) iz rokfor sira, pri čemu su ovi peptidi imali bar jednu reziduu prolina. Brojna istraživanja su pokazala da bioaktivni peptidi izolovani iz sireva mogu imati multifunkcionalna svojstva, tako da neki antioksidativni bioaktivni peptidi pokazuju i ACE inhibitornu aktivnost (Hernandez-Ledesma i sar., 2005). Tako su Ardo i sar. (2009), Ong i sar. (2007), Ryhanen i sar. (2001) utvrdili prisustvo antioksidativnih i ACE inhibitornih peptida u vodenom ekstraktu festivo, čedar, gaude i drugih polutvrdih sireva.

Higurashi i sar. (2008) su pokazali da antioksidativni peptidi iz sira mogu imati supresivno dejstvo na akumulaciju abdominalne masnoće i može sprečiti razvoj metaboličkog sindroma. Sa druge strane, povećanje antioksidativne aktivnosti bi moglo doprineti sprečavanju oksidacionih reakcija tokom skladištenja sira i povećati njegovu nutritivnu vrednost (Gomez-Ruiz i sar., 2008).

Interesantna su istraživanja promena antioksidativne aktivnosti tokom zrenja sireva. Tako su Gupta i sar. (2009), ustanovili povećanje antioksidativne aktivnosti u čedar siru tokom zrenja, dostižući maksimalnu vrednost nakon četvrtog meseca. Nasuprot tome, Bottesini i sar. (2013) su pokazali da je antioksidativna aktivnost u siru Parmigiano Reggiano ostala nepromenjena tokom zrenja. Perna i sar. (2015) su ispitivali antioksidativnost tokom 150 dana zrenja Caciocavallo sireva proizvedenih od mleka različitih rasa krava (smeđe goveče i holštajn rasa), pri čemu su pokazali da rasa utiče na sastav mleka, a samim tim i na formiranje bioaktivnih peptida. Sirevi dobijeni od mleka smeđeg govečeta su pokazivali bolju antioksidativnost, kao posledica većeg sadržaja proteina u mleku.

Koliko je važan sastav sirovine iz koje nastaju bioaktivni peptidi, pokazuju i rezultati Ramirez-Rivas i sar. (2022), koji su ispitivali antioksidativnost Requeson sira, koji se dobija iz surutke. Pokazalo se da antioksidativnost ovog sira vremenom opada, što je u suprotnosti sa većinom sireva koji se dobijaju od mleka. Imajući u vidu da je glavna proteinska frakcija mleka kazein (80%), a da se Requeson sir dobija iz surutke gde su dominantni proteini surutke (20%), autori su objasnili prisustvom različitih proteina. Paralelno, ovi autori su ispitivali i uticaj sadržaja soli na sposobnost formiranja antioksidativnih peptida u Requeson siru i utvrdili da uzorci sa 1,5% NaCl i 1,5% (NaCl+KCl, 1:1) daju bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke sa 1% NaCl i uzorke koji nisu soljeni (Ramirez-Rivas i sar., 2022).

Ghandi i Shah (2016) su ispitivali uticaj različitih koncentracija soli na antioksidativnost i ACE inhibitornu aktivnost peptida polutvrdog sira Akawi (koji se odlikuje visokim sadržajem soli) sa 10% NaCl, 7,5% NaCl, 7,5% NaCl+KCl (1:1), 5% NaCl i 5% NaCl+KCl (1:1), pri čemu je utvrđeno da ni u pogledu antioksidativnosti, ni ACE inhibicije nisu postojale značajne razlike tokom 30 dana zrenja. Grupa autora Solieri i sar. (2020) su ispitivali biološku aktivnost sira Parmigiano Reggiano tokom 12 meseci zrenja, sa sniženim sadržajem soli i masti. Uzorci sireva sa velikim sadržajem soli i masti su pokazali niži stepen proteolize u odnosu na uzorke sa malim sadržajem soli i masti. Takođe, u uzorcima sa malim sadržajem soli i masti su pokazali značajno povećanje antioksidativnosti i ACE inhibicije tokom 12 meseci zrenja. Autori su zaključili da sniženjem soli i masti u Parmigiano Reggiano siru se postižu bolji zdravstveni efekti, koji nastaju kao rezultat povećanja sadržaja peptida sa bioaktivnim svojstvima.

2.3.3. Antihipertenzitivna aktivnost

Hipertenzija je jedan od glavnih uzročnika kardiovaskularnih bolesti u svetu. Procenjuje se da 7,6 miliona prevremenih smrti se javlja kao posledica povećanja krvnog pritiska (Arima i sar., 2011; Otte i sar., 2007a; Tonouchi i sar., 2008). Postoje brojni razlozi pojave visokog krvnog pritiska, a sama bolest se kontroliše primenom raznih lekova, promenom životnih navika, smanjenjem telesne mase, redukcijom unosa alkohola, kao i smanjenjem unosa masne i slane hrane. Naravno, primat ima odgovarajuća terapija, koja može biti u obliku vazodilatatora, diuretika, blokatora Ca-kanala i angiotenzin-konvertujućeg enzima inhibitora, tj. ACE inhibitora (Rafiq i sar., 2021).

Angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) ima veoma važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska. Kao deo renin-angiotenzin sistema, ACE reguliše periferni arterijski pritisak tako što katališe konverziju angiotenzin I u angiotenzin II, koji predstavlja veoma moćan vazokonstriktor, uzrokujući kontrakciju krvnih sudova što rezultira povećanjem krvnog pritiska. Takođe, angiotenzin II povećava krvni pritisak pražnjenjem aldosterona iz nadbubrežnog korteksa koji na kraju povećava ponovnu apsorpciju natrijuma i vode (Sieber i sar. 2010).

ACE inhibitorni peptidi su u fokusu mnogih istraživača, ali njihova struktura još uvek nije potpuno definisana. Većina ACE inhibitornih peptida je kratkog lanca u kome se nalaze hidrofobne aminokiseline na C-terminalnoj poziciji i prolin, lizin ili arginin rezidue (Murray i FitzGerald, 2007). Istraživanja su pokazala da postoji veliki interes za prirodnim peptidima, poreklom iz hrane, koji pokazuju antihipertenzitivnu aktivnost i mnogi ACE inhibitorni peptidi su izolovani iz različitih mlečnih proizvoda, kao što su fermentisana mleka (Chen i sar., 2007) i različite vrste sireva (Ryhanen i sar., 2001; Tonouchi i sar., 2008; Rafiq i sar., 2017). U tabeli 2. su prikazani ACE inhibitorni peptidi koji su identifikovani u proteinskom ekstraktu različitih vrsta sireva.

Tabela 2. ACE inhibitorni peptidi različitih vrsta sireva (Rafiq i sar., 2017)

Vrsta sira	Bioaktivni peptidi	Bioaktivnost	Reference
Čedar	α_{S1} - i β -CN fragmenti	ACE inhibitorna, antioksidativna	Ong i sar. (2007) Gupta i sar. (2009)
Mocarela	β -CN f(58–72)	ACE inhibitorna	Smacchi i Gobbetti (1998)
Gauda	α_{S1} -CN f(1-9), β -CN f(60–66)	ACE inhibitorna, citomodularna	Saito i sar. (2000) Gobbetti i sar. (2004)
Festivo	α_{S1} -CN f(1–9), f(1–7), f(1–6)	ACE inhibitorna	Ryhanen i sar. (2001)
Mančego	α_{S1} -, α_{S2} -, β -CN	ACE inhibitorna	Gomez-Ruiz i sar. (2002)

Osim navedenih, ACE inhibitori su detektovani u nekoliko različitih varijeteta komercijalnih sireva proizvedenih različitim tehnologijama i uslovima zrenja kao što su Prato (Baptista i sar., 2017), čedar, (Lu i sar., 2016), 9 različitih vrsta švajcarskih (Bütikofer i sar., 2008) i španskih sireva (Gómez-Ruiz i sar., 2006). Okamoto i sar. (1995) su ispitivali ACE inhibiciju različitih vrsta sireva i utvrdili da je najveću aktivnost pokazao kamember i crveni čedar sir, dok je najmanju aktivnost pokazao plavi sir i kotidž sir. Takođe, brojna istraživanja su vršena na kamember, rokfor, tilzit, gauda, edam, harzer, havarti, ementaler i parmezan sirevima (Meisel i sar., 1997; Bütikofer i sar., 2007; Saito i sar., 2000; Sieber i sar., 2010).

Iako postoji potencijalni antihipertenzivni efekat peptida dobijenih iz sira, uglavnom se radi o određivanju ACE inhibitorne aktivnosti ekstrakata sira ili izolovanih peptida, in vitro. Međutim postoje podaci o efektu peptida iz gauda sira na smanjenje krvnog pritiska in vivo. U studiji koju su sprovedi Saito i sar. (2000) sa hipertenzivnim miševima, peptidi rastvorljivi u vodi iz sira gauda su pokazali efekat snižavanja sistolnog krvnog pritiska. Autori su utvrdili da su dve

peptidne sekvence α_1 -CN (f1-9) i β -CN (f60-68) bile odgovorne za smanjenje hipertenzije. Rafiq i sar. (2017) su ispitivali uticaj vrste mleka koja su upotrebljena za dobijanje čedar sira i poredili bioaktivnost proteinskih ekstrakata dobijenih iz proizvedenih sireva. Čedar sir je proizveden od kravljeg i bivoljeg mleka i autori su utvrdili da vrsta mleka i uslovi zrenja sira imaju veliki uticaj na antihipertenzivnu aktivnost peptida dobijenih iz ovih sireva. Odnos između proteolize i ACE inhibicije kod različitih vrsta sireva su pokazali Pripp i sar., (2006). Oni su ustanovili da se inhibitorna aktivnost povećava sa razvojem proteolize, kao i da se bioaktivnost smanjuje ukoliko proteoliza tokom zrenja premaši određeni nivo. Addeo i sar. (1992) su takođe ukazali na povezanost ACE inhibitornih peptida i proteolize parmezan sira, pri čemu su utvrdili da se bioaktivni peptidi poreklom iz α_1 -kazeina mogu izolovati iz sireva zrelih 6 meseci, ali se tokom daljeg zrenja peptidi razgrađuju i nakon 15 meseci zrenja, nisu bili detektovani. Takođe, Smacchi i Gobbetti (1998) su izolovali ACE inhibitorne peptide iz nekoliko italijanskih sireva u kraćem i srednjem periodu zrenja.

Različite studije su dale veoma dobar uvid u povezanost procesa zrenja sira i pojave bioaktivnih peptida u siru. Proučavanje strukturne aktivnosti među različitim ACE inhibitornim peptidima ukazuje na to da je vezivanje na ACE pod jakim uticajem C-terminalne tripeptidne sekvence supstrata i važnu ulogu imaju supstrati koji imaju uglavnom hidrofobne aminokiselinske rezidue (Gobbetti i sar., 2004; Pripp i sar., 2004). Dalje, primena različitih starter kultura i dopunskih kultura su pokazale značajan uticaj na formiranje ACE inhibitornih peptida (Pripp i sar., 2006).

U mančego sirevima proizvedenim sa različitim starterima kulturama su identifikovani različiti ACE inhibitorni peptidi (Gomez i sar., 2002). Takođe, značajan uticaj mogu imati i dopunske kulture, pa su Ong i Shah (2008b) ispitivali formiranje ACE inhibitornih peptida u čedar siru gde su dodate dopunske kulture, pri čemu je identifikovano nekoliko bioaktivnih peptidnih sekvenci tokom zrenja. Slični podaci su dobijeni i kod festivo sira koji je sadržao 12 različitih sojeva *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* sp. (Ryhänen i sar., 2001). Takođe, Ong i sar., (2007) su utvrdili uticaj različitih dopunskih kultura na ACE inhibiciju čedar sira.

2.3.4. Faktori koji utiču na bioaktivnost sireva

S obzirom da se tokom proizvodnje sira gubi voda iz mleka, tj. postiže veći sadržaj proteina, a učestvuju enzimi različitog porekla, jasno je zašto su sirevi nosioci brojnih bioaktivnih peptida. Tokom samog procesa proizvodnje i procesa zrenja sira, u proteolitičkim promenama učestvuju nativni enzimi mleka (plazmin), sirilo, kao i enzimi starterskih ili nestarterskih bakterija (Gobbetti i sar., 2002). Na formiranje bioaktivnih peptida utiču i vrsta mleka, termički tretmani prilikom proizvodnje različitih vrsta sireva, starterska i nestarterska mikrobiota, dužina zrenja i uslova kao što su temperatura, relativna vlažnost, pakovanje i dr. (Sahingil i sar., 2019). S obzirom da je proces zrenja najduža faza u dobijanju krajnjeg proizvoda, tokom ovog procesa se odigravaju brojne biohemijske promene, u kojima su proteolitičke promene najdominantnije. Imajući u vidu da je kazein najzastupljeniji protein, razumljivo je da se tokom zrenja najobimnije promene dešavaju baš na kazeinu, tako što se razgrađuje u različite peptide. Smatra se da većina bioaktivnih peptida nastaje iz α_1 -kazeina, zatim β -kazeina i α_{S2} -kazeina i na kraju κ -kazeina (Hodgkinson i sar., 2019), koji nastaju tokom dobijanja sireva (Silva i sar., 2012). Sam proces proteolize rezultira nastankom velikih u vodi nerastvorljivih i srednjih u vodi rastvorljivih peptida, čijom se daljom hidrolizom dobijaju manji peptidi i aminokiseline (Huma i sar., 2018). Mnogi autori su pokazali da zahvaljujući aktivnostima proteolitičkih sistema, mogu nastati različiti bioaktivni peptidi, kao rezultat razgradnje kazeina (Smacchi i Gobbetti, 1998; Saito i sar., 2000; Donkor i sar., 2007).

Bioaktivni peptidi se obično sastoje od 3-20 aminokiselinskih ostataka, a ovi peptidi nisu aktivni u proteinskom molekulu (Sahingil i sar., 2019). Pored toga što kazein predstavlja glavni supstrat za formiranje različitih bioaktivnih peptida, neki bioaktivni peptidi se mogu oslobađati od određenih sekvenci specifičnih aminokiselina kao rezultat proteolitičke aktivnosti tokom zrenja sira. Oni mogu delovati kao regulatorna jedinjenja, koja pokazuju različita svojstva, kao što su ACE inhibitori, antioksidativni, imunomodulatorni itd. (Smacchi i Gobbetti, 1998; Jao i sar., 2012; Gupta i sar., 2013).

Prema Kalle i sar. (2024), mali peptidi, od kojih su mnogi odgovorni za bioaktivnost, efikasno se ekstrahuju vodom iz sira. Ovaj ekstrakt rastvorljiv u vodi (WSE) prvenstveno sadrži male i srednje peptide, slobodne aminokiseline, i njihove soli (Kalle i sar., 2024). Postoji mnogo eksperimenata izvedenih na ispitivanju bioaktivnosti, koja koriste ekstrakt rastvorljiv u vodi iz raznih sireva.

2.3.4.1. Termički tretman mleka u proizvodnji sira

Termički tretman mleka direktno utiče na enzimski profil sireva na razne načine, kao što su denaturacija proteina, aktivacija plazminogena, redukcija prisutnih mikroorganizama i inaktivacija enzima, što rezultira različitim peptidnim profilom u sirevima dobijenim iz sirovog ili pasterizovanog mleka. Uticaj primene termičkog tretmana pasterizacije mleka i dogrevanja tokom proizvodnje sireva parenog testa su bili predmet interesovanja različitih autora. Bütikofer i sar. (2007) su ispitivali 44 uzorka komercijalnih sireva različitih vrsta i utvrdili prisustvo veće koncentracije antihipertenzivnih peptida VPP (Val-Pro-Pro) i IPP (Ile-Pro-Pro) u sirevima dobijenih od sirovog mleka, što su autori pripisali proteolitičkoj aktivnosti proteinaza i peptidaza nestarterskih bakterija mlečne kiseline, koje doprinose ubrzanju razgradnje kazeina do malih peptida. Hayaloglu i sar. (2010) su ispitivali zavisnost formiranja bioaktivnih peptida od primene tretmana pasterizacije mleka i visokih temperatura dogrevanja u proizvodnji Malatya sira. Primenujući temperature dogrevanja 60, 70, 80 i 90 °C, autori su utvrdili da je razgradnja α_1 -kazeina intenzivnija u odnosu na β -kazein. Takođe, ovim istraživanjem je utvrđeno da tretman pasterizacije mleka ima značajno veći uticaj na formiranje peptida, nego navedene temperature dogrevanja tokom obrade gruš i proizvodnje sireva.

Fox i sar. (2000) su ukazali da režim temperature dogrevanja tokom proizvodnje sireva u intervalu od 31 °C do 55 °C ima veliki uticaj na formiranje bioaktivnih peptida različitih vrsta sireva. Takođe, Costabel i sar. (2015) su ispitivali uticaj temperatura od 50 °C i 56 °C na aktivnost himozina i razgradnju proteina kod Reggianito sireva, pri čemu je utvrđeno da je bolja aktivnost enzima postignuta primenom niže temperature.

2.3.4.2. Koagulanti

Himozin predstavlja koagulant koji se najčešće koristi u proizvodnji sireva, pri čemu rezidualni himozin ima važnu ulogu u primarnoj proteolizi, koja se odigrava u ranim fazama zrenja sira. Hidrolizom veze Phe23-Phe24 α_1 -kazeina i veze Leu192-Tyr193 β -kazeina započinje zrenje sireva (Ardö i sar., 2017). Ovi hidrolitički procesi su odgovorni za nastanak α_1 -CN (f1-23), a kasnije i β -CN (f193-209), koji su detektovani kao bioaktivni peptidi (Birkemo i sar., 2009; Rojas-Ronquillo i sar., 2012). S obzirom da postoje koagulanti različitog porekla (životinjski, mikrobiološki, biljni i dr.), za očekivati je da će i njihova aktivnost biti drugačija, zavisno od vrste koagulanta, a samim tim i peptidni profil i bioaktivnost dobijenih sireva. Na primer, Timón i sar., (2019) i Baptista i Gigante (2021) su pokazali da se primenom koagulanta mikrobiološkog porekla u proizvodnji tvrdog sira dobija veća antioksidativnost u odnosu na ostale.

2.3.4.3. Starterska i nestarterska mikrobiota

Bakterije mlečne kiseline mogu biti prisutne u sirevima kao deo starterske i/ili nestarterske mikrobiote, zavisno od toga da li se dodaju kao starter u proizvodnju ili se proizvodnja odigrava pod uticajem nativnih nestarterskih bakterija. Samim tim i nivo proteolize zavisi od broja, vrste i aktivnosti prisutnih bakterija mlečne kiseline (FitzGerald i Murray, 2006). Bakterije mlečne kiseline ne spadaju u jake proteolite, ali imaju složen proteolitički sistem, koji se sastoji od različitih proteinaza i peptidaza koje imaju važnu ulogu u zrenju sireva. Kao posledica ove aktivnosti, bakterije mlečne kiseline značajno doprinose formiranju bioaktivnih peptida u siru.

Kada je u pitanju povećanje formiranja bioaktivnih peptida, najčešće se razmatra primena dopunskih kultura, koje imaju jači proteolitički sistem od samog startera. Ovakav pristup uključuje i probiotske bakterije, čime se postiže razvoj funkcionalnosti sireva (Baptista i sar., 2020; Ong i sar., 2008a; Ong i sar., 2008b). Kada se razmatra izbor dopunskih kultura, mora se voditi računa, ne samo o tome koliko dopunska kultura doprinosi boljoj produkciji bioaktivnih peptida, već i o sposobnosti izabrane kulture da ispuní sve zahteve koji su predviđeni tokom tehnološkog procesa proizvodnje i zrenja sira. Tako su termofilne kulture kao što je *Lactobacillus helveticus* veoma primenljive za proizvodnju tvrdih i polutvrdih sireva, gde se primenjuju temperature preko 40 °C (de Azambuja i sar., 2017; Galli i sar., 2019).

Pored toga što se *Lb. helveticus* koristi kao starter kultura u proizvodnji tvrdih sireva kao što su ementaler, parmezan, provolone, mocarela i dr., može se primeniti i kao dopunska kultura, kao npr., kod čedar sira. Tako su Maeno i sar. (1996) i Seppo i sar. (2002) koristili *Lb. helveticus* u cilju dobijanja peptida u različitim proizvodima od mleka, pri čemu je utvrđeno da se iz β -kazeina mogu dobiti antihipertenzivni peptidi.

Što se tiče mezofilnih kultura, mezofilni laktobacili se koriste kao dopunske kulture uglavnom u proizvodnji mekih sireva. Međutim, pokazalo se da *L. lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris* primenjene u proizvodnji čedar sira se znatno razlikuju u pogledu hidrolize. *L. lactis* ssp. *cremoris* je pokazao bolju sposobnost hidrolize formirajući male peptide i slobodne aminokiseline (Crow i sar. 1995). Ong i sar. (2007) su pokazali da različite bakterije kao što su *L. casei* 279, *Bifidobacterium longum* 1941, *B. animalis* B94 ssp. *lactis*, *Lb. casei* 279 i *Lb. acidophilus* 4962 u čedar siru doprinose produkciji antihipertenzivnih bioaktivnih peptida u visokim koncentracijama. Takođe, pokazano je da se *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., mogu uspešno koristiti u proizvodnji niskomasnih probiotskih sireva, sa ciljem dobijanja bioaktivnih peptida (Ryhanen i sar., 2001).

2.3.4.4. Temperatura i vreme zrenja

S obzirom da temperature i dužina zrenja značajno utiču na biohemijske promene tokom zrenja, za očekivati je da ovi faktori imaju važan uticaj i na proteolitičke promene, a samim tim i formiranje bioaktivnih peptida u siru (Ong i Shah, 2008a). Osim toga, ranija istraživanja su pokazala da temperature tokom zrenja imaju uticaj na sastav sireva, sastav prisutne mikrobiote, teksturu i celokupan kvalitet sireva. Takođe, prema Ong i Shah (2009), povećanjem temperature zrenja sa 4 °C na 8 °C se povećava i nivo proteolize u čedar siru tokom 24 nedelja. Ong i Shah (2008a) su pokazali da povećanje temperature zrenja čedar sira sa 4 na 8 i 12 °C značajno doprinosi povećanju ACE inhibitorne aktivnosti. Takođe, Meyer i sar. (2009) su poredili tri temperature zrenja (4, 8 i 12 °C) i utvrdili da sa porastom temperature se ubrzava proteoliza, a samim tim i formiranje bioaktivnih peptida. Jasno je da duži period zrenja doprinosi većem stepenu proteolize, a samim tim i nastanku bioaktivnih peptida. Ovo potvrđuju istraživanja različitih autora, koji su pokazali da dužina zrenja utiče na razvoj proteolize i promenu peptidnih profila tokom zrenja (Galli i sar., 2019; Baptista i sar., 2020). Objašnjenje leži u činjenici da je proteoliza dinamičan proces, pa neki bioaktivni peptidi nastaju na početku zrenja, kao što su

frakcije α_1 -CN (f1-23) i β -CN (f193-209), kao rezultat primarne proteolize i aktivnosti rezidualnog koagulanta, da bi tokom zrenja, glavnu ulogu preuzeli drugi proteolitički agensi, odnosno najvećim delom proteaze i peptidaze starterskih i nestarteskih bakterija (Baptista i sar., 2020). Korelaciju između proteolize i nastanka bioaktivnih peptida tokom zrenja su pokazali mnogi autori. Ong i Shah (2008b) su dokazali povećanje antihipertenzitivne aktivnosti tokom 6 meseci zrenja čedar sira, a slične podatke su dobili i Baptista i sar. (2020), koji su isto povećanje bioaktivnosti dokazali u Prato siru tokom 4 meseca zrenja.

Međutim, postoje podaci koji ukazuju da se bioaktivnost peptida tokom dužeg perioda zrenja počinje smanjivati. Utvrđeno je da dužim perodom zrenja može doći do prekomerne proteolize i hidrolize bioaktivnih peptida, što sveukupno ima za posledicu smanjenje bioaktivnosti (Ong i Shah 2008b; Baptista i sar., 2020). Kocak i sar. (2020) su dokazali povećanje antihipertenzitivne i antioksidativne aktivnosti u kozjem siru do 60 dana zrenja, a posle toga bioaktivnost se smanjivala. Takođe, Gomez-Ruiz i sar. (2006), Rafiq i sar. (2021) su dokazali da ne postoji linearna korelacija između koncentracije bioaktivnih peptida i dužine zrenja sireva. Većina autora zastupa stav da za svaku vrstu sira treba odrediti koji je to period zrenja kada se bioaktivni peptidi formiraju u najvećoj koncentraciji, uzimajući u obzir specifičnosti tehnološkog postupka proizvodnje i uslova zrenja koji su od značaja za nastanak bioaktivnih peptida (Baptista i Gigante 2021).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Proučavanje i karakterizacija kačkavalja sa smanjenim ili delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida predstavlja značajan doprinos u dobijanju sira koji je u skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi, a koji može imati i dodatni efekat na zdravlje potrošača. Poslednjih godina, uz sve veću brigu o zdravlju, veoma su aktuelna ispitivanja mogućnosti smanjenja unosa soli putem hrane. Shodno tome, ispitivanje bioaktivnosti kačkavalja sa smanjenim i delimično zamenjenim sadržajem soli tokom zrenja je po prvi put vršeno na ovoj vrsti sira, što predstavlja značajan doprinos u postizanju ciljeva vezanih za smanjenje unosa soli putem hrane.

Uprkos dugoj tradiciji proizvodnje, kačkavalj je još uvek nedovoljno proučen, te karakterizacija kačkavalja može pomoći u isticanju vrednosti tradicionalnih proizvoda. U tom smislu, sveobuhvatna karakterizacija kačkavalja je bila sprovedena u cilju očuvanja i boljeg razumevanja kvaliteta kačkavalja. Stoga, ova doktorska disertacija je podeljena u dve glavne celine:

Prvi cilj disertacije odnosio se na ispitivanje različitih parametara kvaliteta sireva deklariranih kao kačkavalj dostupnih na domaćem tržištu, kao i ispitivanje usaglašenosti sa zahtevima nacionalnog standarda (Institut za standardizaciju Srbije, 1997).

Drugi cilj disertacije se odnosio na ispitivanje svojstava tradicionalnog kačkavalja, kao i kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom. U okviru ovog eksperimenta su proizvedene tri serije kačkavalja sa različitim sastavom, kao i vrstom soli. Cilj ovog dela istraživanja bio je ispitivanje efekta smanjenja i zamene natrijum-hlorida na različite parametre kvaliteta proizvoda tokom šest meseci zrenja.

U skladu sa navedenim, postavljeni su sledeći podciljevi doktorske disertacije koji obuhvataju:

- Analiza hemijskih, teksturalnih i mikrobioloških svojstava, boje i stepena proteolize sireva deklariranih kao kačkavalj sa domaćeg tržišta, kao i sagledavanje usaglašenosti sa zahtevima nacionalnog standarda (Institut za standardizaciju Srbije, 1997);
- Ispitivanje sastava, proteolitičkih parametara, mikrobiote, senzornih i teksturalnih svojstava i bioaktivnosti kačkavalja sa uobičajenim sadržajem natrijum-hlorida, sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida, kao i delimičnom zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom tokom 6 meseci zrenja;
- Ispitivanje mikrostrukture i parametara boje sira, kao i trodimenzionalnog modela sira pomoću trodimenzionalnog skeniranja sira kačkavalj sa uobičajenim i smanjenim sadržajem natrijum-hlorida, kao i delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom tokom zrenja.

4. MATERIJAL I METOD RADA

Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom najvećim delom su sprovedena na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu u laboratoriji Odeljenja za tehnologiju mleka, kao i drugim laboratorijama u okviru fakulteta. Sirevi kačkavalj koji su predmet dela istraživanja su proizvedeni u pogonu za preradu mleka Mlekarske škole „Dr Obren Pejić” u Pirotu.

4.1. Nabavka sireva deklarisan kao kačkavalj sa domaćeg tržišta

U cilju ispitivanja prvog dela doktorske disertacije izvršena je nabavka 12 sireva koji su deklarisan kao kačkavalj sa domaćeg tržišta, a koji bi trebalo da ispunjavaju zahteve nacionalnog standarda (Institut za standardizaciju Srbije, 1997). Sirevi su obeleženi oznakama C1 – C12 i svi su definisani kao sirevi parenog testa. Sirevi C1 – C9 su proizvedeni u industrijskim uslovima, dok su C10 – C12 proizvedeni tradicionalnim postupkom proizvodnje. Sirevi su transportovani u prenosnom rashladnom sistemu do laboratorije, gde su obeleženi šiframa od C1 do C12 i čuvani na temperaturi frižidera od 4 °C do analize.

4.2. Proizvodnja kačkavalja sa različitim sadržajem soli

Proizvodnja kačkavalja krstaša (koji se u disertaciji navodi kao kačkavalj) u cilju ispitivanja uticaja smanjenja sadržaja natrijum-hlorida i delimične zamene natrijum-hlorida kalijum-hloridom je obavljena u tri ponavljanja (Slike 10. i 11.). Varijante sireva koje su proizvedene su sledeće:

1. sir kačkavalj (kontrolni K) koji je proizveden prema uobičajenom tehnološkom postupku proizvodnje uz dodavanje natrijum-hlorida (2%);
2. sir kačkavalj sa 30% smanjenim sadržajem natrijum-hlorida (S);
3. sir kačkavalj sa 30% zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom (M).



Slike 10 i 11. Sirevi proizvedeni u pogonu za preradu mleka Mlekarske škole “Dr Obren Pejić”

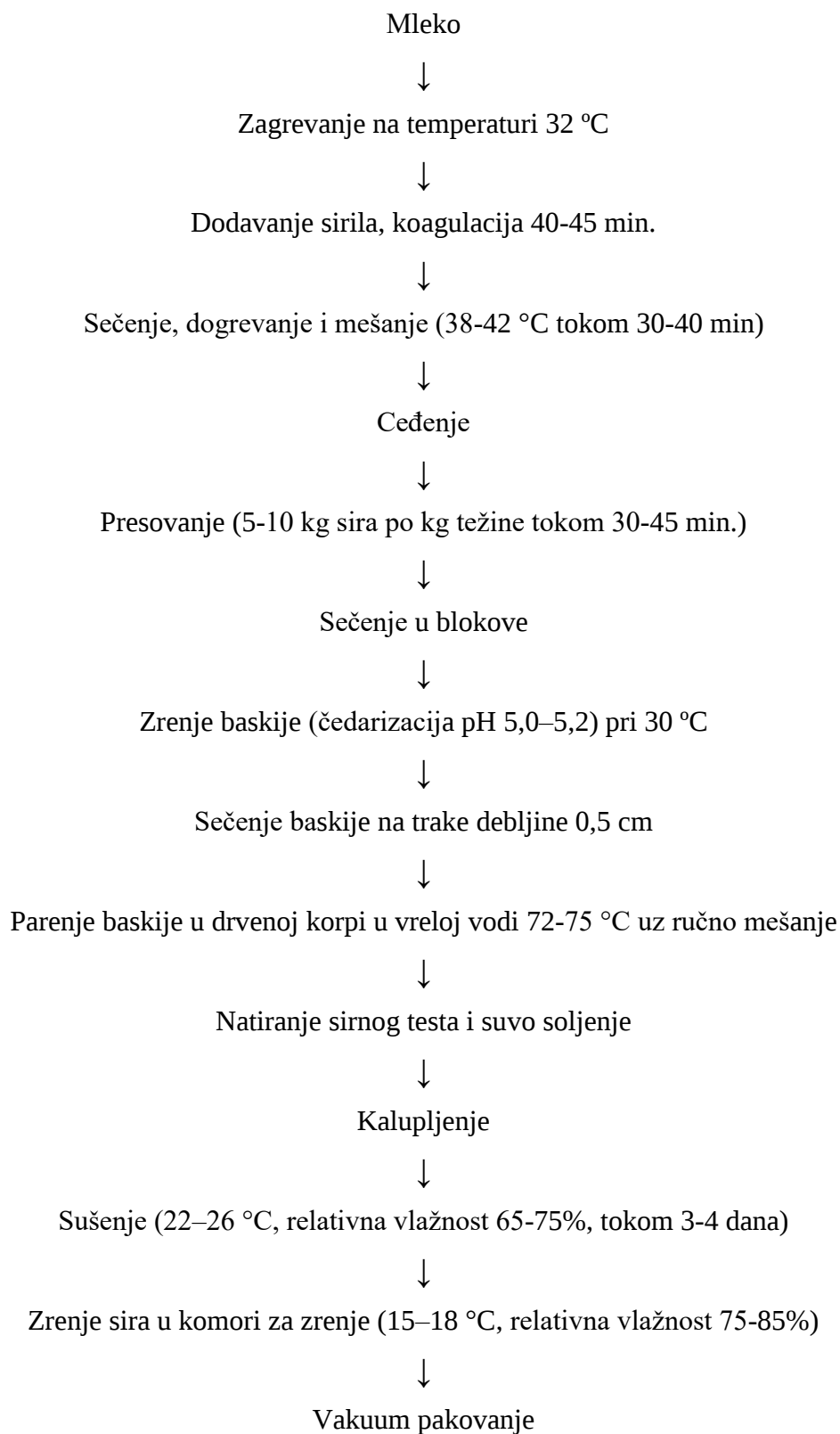
Sve varijante sireva su proizvedene od sirovog kravljeg mleka, tradicionalnim postupkom, bez dodavanja starter kulture (Šema 1.). Sastav mleka koje je upotrebljeno za proizvodnju sira kačkavalj analizirano je korišćenjem analizatora mleka Hrimacheck (Biotrend Plus, Bugarska) za određivanje sadržaja: mlečne masti, suve materije bez masti, proteina i laktoze. Sastav mleka koji

se koristio za proizvodnju sireva kačkavalj je bio sledeći: 4,1% mlečne masti, 10,08% suve materije bez masti, 3,7% sadržaja proteina i 5,5% laktoze.

Sirovo mleko je zagrejano u duplikatoru izrađenog od nerđajućeg čelika (sa maksimalnom zapreminom od 1250 L) na temperaturi od 32 °C kada je dodato sirilo (Valiren, Mayasan Biotech, Istanbul, Turska) i koagulacija je trajala 40-45 min. Gel je tada bio obrađen sečenjem i mešanjem harfom i zatim su sirna zrna zagrevana u surutki na temperaturi od 38–42 °C tokom 40 minuta dok se ne postigne adekvatna čvrstina zrna. U sledećem koraku, sirna masa je premeštena u presu od nerđajućeg čelika i presovana pod pritiskom od 5–10 kg sira po kg težine tokom 30-45 min. Presovana gruda je zatim isečena na komade zvane „baskija“. Zrenje grude (baskije) je sprovedeno u cilju postizanja adekvatne kiselosti skladištenjem u komori za zrenje pri temperaturi 30 °C, u periodu od 4 do 12 časova, dok baskija ne postigne kiselost pH 5,0–5,2. Zrenje grude tokom proizvodnje kačkavalja se još naziva i „čedarizacija“. Nakon postizanja kiselosti vrši se obrada baskije pri čemu se ona mehanički seče na dugačke, tanke komade sa debljinom od 0,5 cm. Komadi se zatim stavljaju u drvenu korpu i potapaju u duplikator sa toplom vodom (72-75 °C), mešajući ručno drvenim štapom (5–10 min), dok se ne oformi homogena kompaktna sirna masa (rastegljivo testo prijatnog ukusa). Parenje sirne mase („razvučena gruda“) odnosi se na jedinstveni proces plastifikacije i istežanja koji doprinosi karakterističnoj teksturi zajedničkoj svim sirevima parenog testa. U sledećem koraku, sprovedeno je ručno mešenje sirnog testa pri čemu je vršeno dodavanje određene količine i vrste soli u zavisnosti od varijante sira koja se proizvodio. Zatim je sirna masa stavljena u kalupe pri čemu se formirao finalni oblik sira, nakon čega je sledio proces sušenja pod definisanim uslovima temperature 22–26 °C i relativne vlažnosti 65-75% tokom 3-4 dana. Zrenje sira je obavljeno u komori za zrenje pri kontrolisanim uslovima temperature 15–18 °C i relativne vlažnosti 75-85%. Zrenje sireva je trajalo ukupno šest meseci, tokom kojih su vršene analize sireva.

4.3. Fizičko-hemijske analize sireva

Fizičko-hemijske analize u cilju dobijanja sastava uzoraka sireva su sprovedene sledećim metodama: sadržaj suve materije standardnom metodom sušenja na temperaturi 102 ± 2 °C (FIL-IDF, 2004); sadržaj mlečne masti prema metodi (FIL-IDF, 2008); ukupan sadržaj proteina prema Kjeldahl metodi analizom sadržaja ukupnih azotnih materija pomnožen sa faktorom 6,38 (FIL-IDF, 2014); sadržaj sadržaj soli prema Volhard metodi (FIL-IDF, 1988). Iz dobijenih podataka izračunati su sadržaj mlečne masti u suvoj materiji sira, kao i sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira. Digitalni pH-metar Consort C 931 (Consort, Turnhout, Belgija) je korišćen u cilju određivanja pH vrednosti uzoraka sireva. Sve analize su sprovedene u tri ponavljanja.



Šema 1. Dijagram toka proizvodnje Pirotskog kačkavalja krstaša (Mančić i Mančić, 2005)

4.1. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva

4.1.1. Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija i azotnih materija rastvorljivih u fosfovolframskoj kiselini

Ispitivanje sadržaja u vodi rastvorljivih azotnih materija sprovedeno je metodom prema Kuchroo i Fox (1982), a na osnovu kojeg je izračunat koeficijent zrelosti kao sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija kao udeo u ukupnim azotnim materijama. Sadržaj azotnih materija rastvorljivih u 5% (v/v) fosfovolframskoj kiselini ispitan je metodom prema Stadhousers-u (1960).

4.1.2. Elektroforetska ispitivanja toka zrenja sireva

4.1.2.1. Priprema uzoraka sireva za izvođenje elektroforeze

Priprema uzoraka sireva je podrazumevala homogenizaciju 0,4 g uzorka sira koji je potom rastvoren u 5ml pufera pH 7,6. Nakon toga je izvršeno temperiranje u vodenom kupatilu na temperaturi 40 °C u toku 1 h. Filtracija kroz papirnu vatu je sprovedena kad je sadržaj ohlađen na sobnu temperaturu. Nakon toga je sledilo centrifugiranje na temperaturi 4 °C pri 5000 obrtaja/min u trajanju 10 min., kako bi se sloj masti izdvojio na površinu. Potom je pomoću mikropipete izvršeno izdvajanje 100 µl dobijenog supernatanta koji je pomešan sa 300 µl pufera (pH 7,6) kome su prethodno dodati β-merkaptotanol (Merck, Nemačka) i par zrna boje bromfenolplavo. Radni uslovi podrazumevaju korišćenje elektrodnog pufera, kao i 4% gela za koncentrovanje pH 7,6 i 12% gela za razdvajanje pH 8,9.

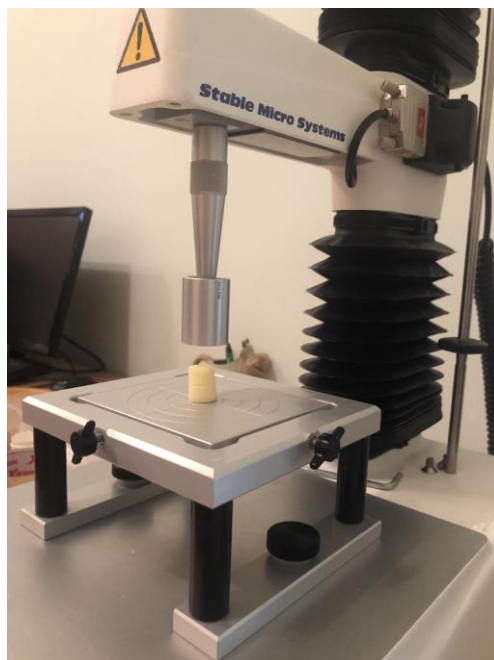
4.1.2.2. Urea elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Urea elektroforeza na poliakrilamidnom gelu je sprovedena prema metodi Andrews (1983). Urea elektroforeza je izvedena nanošenjem 5µl pripremljenih uzoraka sireva na gel uz korišćenje elektroforetske jedinice Twin Plate TV200YK (Consort, Turnhout, Belgija). Analiza je obavljena na poliakrilamidnim gel pločama dimenzija 100 x 200 x 1 mm koristeći Tris-glicin elektrodni pufer pri konstantnoj jačini električne struje od 60 mA i maksimalnom naponu od 300V tokom 3 h. Primenjen je 4% gel za koncentrovanje (pH 7,6) i 12% gel za razdvajanje (pH 8,9). Korišćenjem 0,23% rastvora Coomassie Blue R-250 je vršeno bojenje tokom 90 min., dok je odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru 8% sirćetne kiseline i 18% etanola. Denzitometrija gel elektroforetograma ispitanih sireva je izvršena korišćenjem programa ImageJ u cilju sagledavanja razgradnje kazeinskih frakcija. Površina traka β-CN, α_{S1}-CN i produkata degradacije određeni su kao procenat od ukupne površine. Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja.

4.2. Analiza teksture sireva

Teksturalna svojstva sireva ispitana su pomoću analizatora teksture Texture Analyzer TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK) sa celijom koja pruža opterećenje od 5 kg i upotrebom softverskog programa Exponent istog proizvođača. Sirevi su ispitani metodom analize profila teksture (engl. texture profile analysis) primenom aluminijumskog cilindra kao alata prečnika 25 mm (P/25) (Slika 12.). Uzorci sira su isečeni pomoću oštrog cilindričnog rezača i komprimovani u dva koherentna ciklusa sa 25% deformacije od početne visine uzorka. Parametri teksture koji su ispitani pomoću ove analize su sledeći: tvrdoća, elastičnost, kohezivnost i žvkljivost. Tvrdoća je sila koja je potrebna za postizanje date deformacije (Chevanan i sar., 2006). Elastičnost je mera povratka u prvobitno, nedeformisano, stanje nakon primenjene sile kompresije tokom analize (Chevanan i sar., 2006). Kohezivnost je stepen do kojeg uzorak može da se sabije pre nego što se slomi ili pukne (Tomić, 2021). Žvkljivost se odnosi na energiju koja je potrebna za

žvakanje čvrste hrane do momenta kada se proguta (Dinkci i sar., 2011). Tvrdća, elastičnost, i kohezivnost su primarni parametri teksture. Žvkljivost je sekundarni parametar teksture, a u zavisnosti je od parametara tvrdoće, elastičnosti i kohezivnosti. Analiza profila teksture je sprovedena merenjem osam uzoraka svakog sira.



Slika 12. Analiza profila teksture sira pomoću analizatora teksture Texture Analyzer TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK)

4.3. Mikrobiološka analiza sireva

Mikrobiološka analiza je sprovedena u tri ponavljanja. Aseptički je uzorkovano 10g uzorka sira u sterilnim uslovima i razblaženo u 90 ml natrijum citrata (2% (w/v)). Potom je izvršena homogenizacija u trajanju od 3 minuta pomoću Stomacher uređaja (Interlab, BagMixer 400P) (Mirković i sar., 2021). U cilju određivanja broja prisutnih bakterija mlečne kiseline (BMK) primenjena je metoda razređenja zasejavanjem na selektivne podloge MRS (Merck, Darmstadt, Nemačka) za štapićaste BMK i M17 (Merck, Darmstadt, Nemačka) za okruglaste BMK. Mezofilne i termofilne BMK su razdvojene temperaturom inkubacije na 30 °C i 42 °C tokom 48 h, respektivno. Zasejane MRS podloge su bile inkubirane anaerobno (GasPak Jar, BBL, Kansas, SAD).

4.4. Ispitivanje bioaktivnosti sireva

Analizirane su antimikrobna, antioksidativna i ACE inhibitorna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli. U cilju ekstrakcije i određivanja u vodi rastvorljivih azotnih materija, primenjena je metoda prema Kuchroo i Fox (1982), nakon čega su dobijeni proteinski ekstrakti liofilizovani.

Metodama određivanja antioksidativnog kapaciteta pomoću inhibicije ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) radikala prema Re i sar. (1999) i određivanja slobodno-radikalskog kapaciteta pomoću DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala modifikovanom metodom prema Xiao i sar. (2020) je ispitana antioksidativnost dobijenih liofilizovanih proteinskih ekstrakata sira. Sva merenja su rađena u triplikatu.

ABTS ispitivanje je sprovedeno tako što je pripremljen rastvor ABTS (7 mM) pomešan sa 2,45 mM kalijum persulfata (finalna koncentracija), a zatim čuvan u mraku na sobnoj temperaturi 12–16 h pre upotrebe. Nakog toga, dodat je pufer PBS (pH 7,4) sve dok nije postignuta apsorbanca od 0,70 na talasnoj dužini 734 nm i temperaturi od 30 °C. Rastvor ABTS je dodat u zapremini od 1 ml u 10 µl pripremljenog rastvora uzorka različitih koncentracija (25, 50 i 100 mg/ml) i merenje je vršeno na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan) na talasnoj dužini 734nm. Sva merenja su vršena u odnosu na slepu probu. ABTS (%) je dobijen iz sledeće jednačine:

$$\text{ABTS (\%)} = (A_{\text{slepe probe}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{slepe probe}} \times 100$$

DPPH ispitivanje je sprovedeno tako što je pripremljen rastvor uzorka određene koncentracije (25, 50 i 100 mg/ml) u zapremini 200 µl, dodat u DPPH rastvor zapremine 1 ml i pomešan sa Tris-HCl puferom (pH 7,4) u epruveti za ispitivanje. Nakon što je dodat rastvor ispitivanog uzorka, brzo je promešano i rastvor je čuvan na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon toga, apsorbanca ovako dobijenog rastvora očitana je na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan), na talasnoj dužini 517 nm. DPPH (%) je dobijen iz sledeće jednačine:

$$\text{DPPH (\%)} = (A_1 - A_2) \times 100 / A_1, \text{ gde je}$$

A1 - apsorbanca dodatka etanola umesto ispitivanog uzorka i

A2 - apsorbanca rastvora uzorka za ispitivanje.

Ispitivanje antimikrobnosti liofilizovanih proteinskih ekstrakata sira je izvedeno modifikovanom metodom prema Campos i sar. (2022) u koncentracijama 25, 50 i 100 mg/ml. U cilju određivanja antimikrobne aktivnosti sireva, upotrebljene su sledeće bakterijske kulture: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonneri* ATCC 29950, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, kao i kvasac *Candida albicans* ATCC 10231. Ovi veoma poznati izabrani patogeni mikroorganizmi pripadaju ATCC (engl. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, SAD). Sva merenja su vršena u triplicatu.

Ispitivanje ACE inhibicije je sprovedeno prema metodi Sahingil i sar. (2014) koja se zasniva na potencijalu ispitivanog proteinskog ekstrakta da inhibira delovanje ACE enzima. ACE inhibitorna aktivnost je sprovedena tako što je 20 µl pripremljenog rastvora uzorka pomešano sa 50 µl rastvora HHL (hipuril-histidil-leucin). Nakon toga, dodato je 5 µ ACE (0,5 U/ml) i inkubirano na 37 °C/ 60min. Posle inkubacije, dodato je 62,5 ml 1M HCl kako bi se zaustavila reakcija. Smeša je centrifugirana (5000 rpm, 30 min, 4 °C) nakon dodavanja 375 ml etil acetata. Supernatant je sušen do potpuno suvog uzorka na temperaturi od 120 °C, a zatim je dodata ista zapremina vode. Merenje je vršeno na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan) na talasnoj dužini 228 nm. Sva merenja su vršena u triplicatu. Procenat aktivnosti ACE inhibicije izračunat je na sledeći način:

$$\text{ACE inhibicija (\%)} = (1 - (A - C) / (B - D)) \times 100, \text{ gde je}$$

A - apsorbanca sa ACE, HHL i ACE-inhibitornim uzorkom,

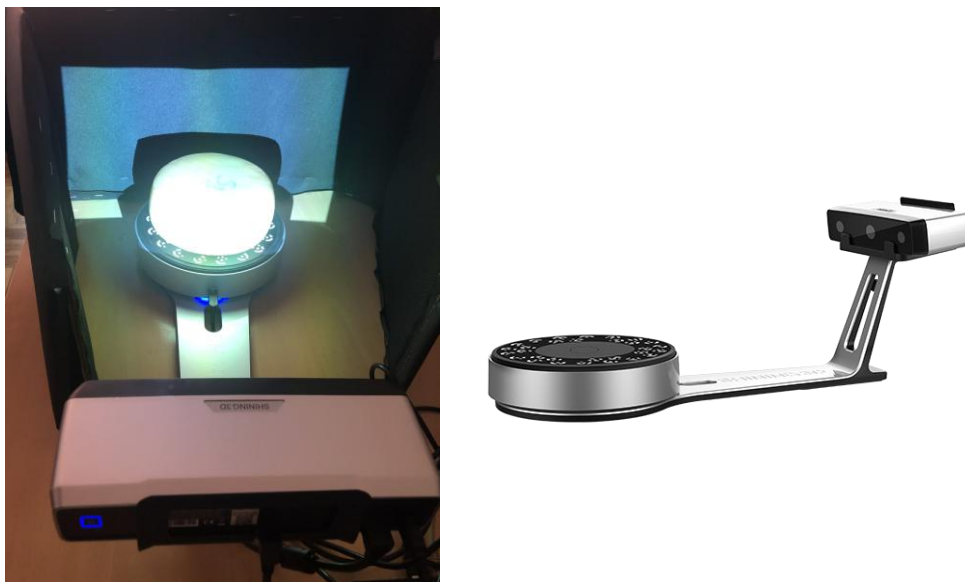
B - apsorbanca sa ACE i HHL, bez ACE-inhibitornog uzorka,

C - apsorbanca sa HHL i ACE-inhibitornim uzorkom, bez ACE i

D - apsorbanca sa HHL bez ACE i ACE-inhibitornog uzorka.

4.5. Trodimenzionalno skeniranje sireva

Tri varijante sireva kačkavalja su ispitane trodimenzionalnim (3D) skeniranjem korišćenjem Shining 3D EinScan-SP 3D uređaja (Shining 3D, Hangzhou, Kina) i softvera za obradu podataka istog proizvođača. Primenjena metoda 3D skeniranja sireva je opisana u studiji Satric i sar. (2024). U cilju sprečavanja smetnji koje iz pozadine sira kao objekta koji se skenira mogu da nastanu, skeniranje je izvršeno u mračnoj sobi uz korišćenje crne pozadine (Slike 13. i 14.).



Slike 13 i 14. 3D skeniranje sira (levo) pomoću Shining 3D EinScan-SP 3D uređaja (desno)
(<https://www.shining3d.com/>)

Kalibracija skenera je prethodila svakom skeniranju sireva i bila je obavljena korišćenjem kalibracione table prema uputstvu proizvođača (Slika 15.). Podešavanje osvetljenosti i režim teksture je bio podešen tokom skeniranja sireva. Rotacija okretne ploče skenera je omogućila da se svaka strana sira skenira. Kako bi i donja strana sira bila skenirana, sirevi su zatim ponovo postavljeni okrenuti za ugao od 90 stepeni. Režim koji je prilikom skeniranja bio primenjen je vodonepropusni režim sa visokim nivoom detalja. Podaci dobijeni skeniranjem sireva su obrađeni komandom pod nazivom „meshing“. Za obradu podataka i formiranje 3D modela sira korišćen je softver EXScan S_v3.0.0.1 (Shining 3D, Hangzhou, Kina). Ovakav način obrade podataka je omogućio precizno izračunavanje 3D skenirane zapremine sira (mm^3). Tokom perioda zrenja od 6 meseci smanjenje zapremine sira je prikazan kao procenat (%) početne zapremine sira. Takođe, uzorci nisu imali površinsku hrapavost ili druge nečistoće koje bi mogle dovesti do lažnih rezultata. 3D skeniranje je sprovedeno u sledećim tačkama zrenja sireva: početak zrenja (1. dan), 30, 90 i 180 dana u tri ponavljanja.



Slika 15. Kalibracija Shining 3D EinScan-SP 3D uređaja (Shining 3D, Hangzhou, Kina) pomoću kalibracione table

4.6. Analiza mikrostrukture sireva

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy, SEM) je primenjena u cilju sagledavanja mikrostrukture grude i sireva. Skenirajuća elektronska mikroskopija je izvedena na sledećim uzorcima: pre fermentacije baskije, posle fermentacije baskije, posle obrade (nakon sečenja, potapanja i mešanja u vrućoj vodi na temperaturi 75 °C, kao i ručnog razvlačenja i mešanja sa solju), kontrolnog sira, sira sa 30% NaCl zamenjenog sa KCl i sira sa 30% smanjenog NaCl nakon prvog dana zrenja na temperaturi od 15 – 18 °C. Uzorci su isečeni iz unutrašnjosti sira i pripremljeni prema Kuo i Gunasekaran (2009). Sušenje uzoraka sira na kritičnoj tački pomoću tečnog ugljen-dioksida je izvršeno korišćenjem sušača na kritičnoj tački (Critical Point Dryer, Quorum, K850, Velika Britanija). Nakon toga, uzorci su presvlačeni zlatom (50nm) na uređaju za uparavanje (SCD 005 sputter coater, BAL-TEC, Scan, Nemačka) u trajanju od 100 s na 30 mA. Skenirajuća elektronska mikroskopija je izvedena pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JEOL JSM-6390 LV (JEOL, Tokio, Japan) na 13 kV pri uvećanjima od 1000x, 2500x i 5000x. Analiza je sprovedena u tri ponavljanja, a u radu su predstavljeni izabrani mikrofotografije mikrostrukture sireva.

4.7. Određivanje parametara boje sireva pomoću kompjuterskog vizuelnog sistema

Parametri boje sireva su određeni korišćenjem kompjuterskog vizuelnog sistema prema metodi opisanoj u studijama Tomasevic i sar. (2019a; 2019b) u sledećim periodima zrenja: 1, 30, 90 i 180 dana (Slika 16.). Parametri boje koji su ispitani kod svakog analiziranog uzorka sira koji su ispitani su L^* , a^* i b^* . Svaki uzorak sira je analiziran u tri ponavljanja sa pet do osam merenih tačaka na površini uzorka za svako ponavljanje. Povećanje broja ponavljanja prilikom vršenja analize poboljšava preciznost pri utvrđivanju parametara boje (Milovanovic i sar., 2020).



Slika 16. Kompjutersko vizuelni sistem (Tomasevic, 2018)

4.8. Senzorna analiza sireva

Senzorno ispitivanje je realizovano u Laboratoriji za senzornu analizu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Samostalni rad ocenjivača je bio obezbeđen, koji je podrazumevao odvojena radna mesta. Takođe, tokom ispitivanja, radni uslovi u prostoriji za ocenjivanje su održavani u skladu sa standardom ISO 8589:2007. Senzorna analiza je obuhvatila ispitivanje objektivnog senzornog kvaliteta i testiranje potrošača u cilju ispitivanja prihvatljivosti proizvoda.

4.8.1. Ispitivanje senzornog kvaliteta sireva

Senzorno ocenjivanje kvaliteta različitih varijanti kačkavalja je sprovedeno primenom korigovanog petobalnog bod sistema (Radovanović i Popov Raljić, 2001). Senzorni panel se sastojao od 9 ocenjivača doktora nauka odabranih iz redova osoblja Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa iskustvom u ocenjivanju senzornog kvaliteta proizvoda od mleka.

Ocenjivačima je priloženo uputstvo za senzorno ocenjivanje kvaliteta kačkavalja pre sprovođenja samog ocenjivanja (Tabela 3.). Parametri kvaliteta koji su ispitani ovom analizom su sledeći: spoljni izgled, miris, tekstura i ukus. Tokom sprovođenja analize korišten je raspon bodova od 1 do 5 uz mogućnost davanja polubodova (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) (Slika 17.). Broj bodova prikazan u zagradama u uputstvu odnosi se na bodove koje je potrebno oduzeti od maksimalno mogućeg broja bodova (5), kako bi se dobila konačna ocena. Prema uputstvu, kvalitet proizvoda je podeljen u sledećih šest kategorija:

- Odličan kvalitet (ocena $> 4,5$) – izražena pozitivna svojstva, bez nedostataka.
- Vrlo dobar kvalitet ($3,5 < \text{ocena} \leq 4,5$) – manji nedostaci.
- Dobar kvalitet ($2,5 < \text{ocena} \leq 3,5$) – uočljivi nedostaci, koji nisu ispod minimalnih zahteva kvaliteta.
- Nezadovoljavajući kvalitet ($1,5 < \text{ocena} \leq 2,5$) – nedostaci koji su ispod minimalnih zahteva kvaliteta, ali bi proizvod uz odgovarajuću doradu mogao da se koristi prema prvobitnoj nameni.
- Veoma loš kvalitet ($0,5 \leq \text{ocena} \leq 1,5$) – znatni nedostaci izraženi u toj meri da se proizvod ne može upotrebljavati prema prvobitnoj nameni.
- Potpuni škart u pogledu kvaliteta i/ili pokvaren proizvod ($0 \leq \text{ocena} < 0,5$) – nije za ljudsku ishranu.

Svim navedenim parametrima kvaliteta je dodeljen koeficijent važnosti kojim je izvršena korekcija date ocene. Na osnovu uticaja svakog parametra kvaliteta na ukupan kvalitet proizvoda izabrani su koeficijenti važnosti, a čiji zbir iznosi 20: opšti izgled-3, miris-3, tekstura-5 i ukus-9. Zbirom pojedinačnih korigovanih ocena dobija se jedinstveni kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet. Ovaj pokazatelj se izražava kao procenat (%) od maksimalno mogućeg kvaliteta. Kada se ova vrednost podeli sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobija se ponderisana srednja ocena koja predstavlja ukupni senzorni kvalitet sira. Senzorno ocenjivanje kvaliteta sireva kačkavalja je sprovedeno prvog i šestog meseca zrenja sira sa dva ponavljanja.

Šifra uzorka: _____

Grupa svojstava	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Spoljni Izgled (presek,boja)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Miris	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Tekstura	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ukus	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
NAPOMENA:											

Slika 17. Prikaz ocenjivačkog lista korištenog za senzorno ocenjivanje kvaliteta kačkavalja

Tabela 3. Uputstvo za senzornu ocenu kvaliteta kačkavalja

Grupa svojstva	Opis nivoa kvaliteta / mana	
1. Posmatrajte površinu kačkavalja krstaša, boju i izgled, a zatim nožem presecite uzorak kako biste ocenili izgled preseka.		
Opšti izgled (Vizuelni utisci)	Kačkavalj krstaš je proizvod ujednačene blede žute do intenzivno žute boje u pogledu testa (boja kore je svetložuta do zlatnožuta), glatke teksture preseka sa mogućom pojavom malog broja šupljika nepravilnog oblika veličine 1-2 mm nastalih pri obradi.	
	Nekarakteristična ili neujednačena boja	(oduzeti maks. 4)
	Oštećen i deformisan sir	(oduzeti maks. 3)
	Prisustvo pukotina	(oduzeti maks. 3)
	Šupljike neodgovarajuće veličine ili u velikom broju	(oduzeti maks. 4)
	Sluzava površina	(oduzeti maks. 3)
2. Prinesite uzorak ispod nosa i udišite i izdišite kroz nos		
Miris (Olfaktorni utisci)	Proizvod bi trebalo da ima prijatan mlečni miris.	
	Previše oštar miris koji potiče od kiseline (relativno jak, paleći osećaj u nosnoj sluzokoži koji izazivaju proizvodi kao što su senf ili sirće)	(oduzeti maks. 4)
	Miris neke netipične kiseline (npr. sirćetna)	(oduzeti maks. 2)
	Miris na kvasce i/ili stran, netipičan miris, neprijatan miris (npr. na neku od životinjskih masti, na karton i sl.)	(oduzeti maks. 5)
3. Pritisnite uzorak između palca i kažiprsta, odlomite deo koji ćete staviti u usta, pritisnite ga jezikom o nepce.		
Tekstura (Palpatorni utisci)	Proizvod bi trebalo da je srednje čvrste i povezane teksture. Testo proizvoda je monolitne delimično lisnate strukture.	
	Izražena krta/lomljiva tekstura	(oduzeti maks. 3)
	Suva, zrnasta, brašnjava tekstura	(oduzeti maks. 3)
	Suviše meka ili suviše tvrda tekstura	(oduzeti maks. 4)
4. Uneti u usta dovoljnu količinu uzorka kako bi se ocenila ukusnost.		
Ukus (Gustativni utisci)	Proizvod bi trebalo da ima prijatan, mlečno-kiseo i slan ukus, specifičan za kravlje mleko.	
	Kiselost previše izražena: oštar, paleći osećaj u usnoj i nosnoj šupljini	(oduzeti maks. 4)
	Nedovoljno ili previše izražena slanost	(oduzeti maks. 2)
	Prazan ukus, dominira kiselost i slanost	(oduzeti maks. 2)
	Ukus na zagorelo mleko	(oduzeti maks. 3)
	Prisustvo arome netipične kiseline (npr. sirćetne)	(oduzeti maks. 4)
	Sir “rezi” (osećaj peckanja na jeziku kao pri konzumiranju gaziranih pića)	(oduzeti maks. 3)
	Netipičan ukus na životinjske masti (npr. ovčiji ili kozji loj)	(oduzeti maks. 5)
	Prisustvo gorčine i oporosti (nabiranje površine jezika, naročito u korenu)	(oduzeti maks. 4)
	Strani ukus, na kvasce, na plastiku, na karton, užeglo, metal i sl.	(oduzeti maks. 5)

4.8.2. Ispitivanje prihvatljivosti sireva

U cilju ispitivanja stepena prihvatljivosti primenjene su hedonska skala i „upravo onako kako odgovara” skala.

Ukupan broj testiranih potrošača je bio 220. Uzorci sireva su ocenjivani u pogledu prihvatljivosti u dva vremenska preseka tokom zrenja: 30. i 180. dana zrenja. Oba puta u ocenjivanju je učestvovalo po 110 potrošača. Potrošači koji su bili angažovani za testiranje su najvećim delom bili studenti Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, najčešće raspona godina manje od 20, kao i između 20 i 40. Takođe, bili su ispitani i potrošači godina starosti između 40 i 60, kao i više od 60. U svrhu testiranja su odabrani samo oni potrošači koji često ili bar povremeno konzumiraju sireve.

Hedonska skala je primenjena za ispitivanje tri varijante sira kačkavalj sa različitim sadržajem i zamenom soli u pogledu stepena prihvatljivosti za teksturu, ukus i ukupnu prihvatljivost proizvoda. Skala koja je primenjena se sastojala od devet bodova, od boda 1 što je podrazumevalo „izuzetno mi se ne dopada”, bod 5 je podrazumevalo „niti mi se dopada niti mi se ne dopada”, do boda 9 što je podrazumevalo „izuzetno mi se dopada” (Slika 18.).

U kojoj meri Vam se dopada PROIZVOD kao celina								
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Izuzetno mi se ne dopada				Niti mi se dopada Niti mi se ne dopada				Izuzetno mi se dopada
U kojoj meri Vam se dopada UKUS proizvoda								
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Izuzetno mi se ne dopada				Niti mi se dopada Niti mi se ne dopada				Izuzetno mi se dopada
U kojoj meri vam se dopada TEKSTURA proizvoda								
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Izuzetno mi se ne dopada				Niti mi se dopada Niti mi se ne dopada				Izuzetno mi se dopada

Slika 18. Prikaz hedonske skale korištene za senzorno ispitivanje kačkavalja

Skalom „upravo onako kako odgovara” je ispitan intenzitet osećaja prilikom konzumacije tri varijante kačkavalja sa različitim sadržajem i zamenom soli. Slanost, intenzitet ukusa i tvrdoća sireva su bili atributi koji su ispitani na ovaj način. Skala je bila ponderisana vrednostima od 1 do 9. „Nedovoljno izraženo” je podrazumevalo bod 1, „upravo onako kako treba” je podrazumevalo bod 5, a „previše izraženo” je podrazumevalo bod 9 (Slika 19.).

U kojoj meri Vam se dopada SLANOST proizvoda								
□	□	□	□	□	□	□	□	□
Nedovoljno slano				Otprilike onako kako treba				Previše slano
U kojoj meri Vam se dopada INTENZITET UKUSA proizvoda								
□	□	□	□	□	□	□	□	□
Nedovoljno intenzivan ukus				Otprilike onako kako treba				Previše intenzivan ukus
U kojoj meri vam se dopada TVRDOĆA proizvoda								
□	□	□	□	□	□	□	□	□
Previše meko				Otprilike onako kako treba				Previše tvrd

Slika 19. Prikaz „upravo onako kako odgovara” skale korišćenje za senzorno ispitivanje kačkavalja

4.9. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza podataka na prvom mestu obuhvatila je primenu različitih modela analize varijanse (ANOVA) u cilju testiranja uticaja ispitivanih faktora (period zrenja i sastav soli) na ispitivane promenljive/karakteristike. Prilikom analize podataka dobijenih senzornim ispitivanjem, ocenjivači su tretirani kao promenljiva sa slučajnim nivoom faktora. Za višestruko poređenje parova srednjih vrednosti merenja, nakon primene ANOVA, korišćen je Tukey HSD test. Ove analize urađene su na nivou statističke značajnosti od 0,05.

Hijerarhijska analiza grupisanja (engl. hierarchical cluster analysis) izvedena je primenom Ward-ove metode grupisanja na bazi euklidskog rastojanja, kako bi se ispitala potencijalna sličnost ili različitost između uzoraka sireva kačkavalja uzetih sa domaćeg tržišta (Miočinović i sar., 2022).

Za analizu podataka korišćeni su sledeći softveri: Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD) i SPSS program (IBM SPSS Statistics 21).

Analiza pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti (engl. mean drop analysis) koristi podatke prikupljene primenom „upravo onako kako odgovara” skale i podatke dobijene primenom hedonske skale (Lawless i Heymann, 2010; Schraidt, 2009). Analiza pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti se sastojala od 4 koraka: (1) sažimanje „onako kako bi trebalo da bude” skale od 9 podeljaka u 3 kategorije (nedovoljno izraženo, kako odgovara i previše izraženo) za svaki atribut; (2) izračunavanje aritmetičke srednje vrednosti ocena ukupne prihvatljivosti proizvoda dobijenih primenom hedonske skale; (3) izračunavanje pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti, tako što je izačunata razlika srednjih vrednosti ocena ukupne prihvatljivosti između „kako odgovara” kategorije i kategorija „previše“ ili „premalo“; (4) Primena ANOVA u cilju ispitivanja statističke značajnosti pada ocene prihvatljivosti (Rothman, 2007; Tomić, 2021).

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Svojstva sireva deklariranih kao kačkavalj na domaćem tržištu

Nacionalni standard definiše uslove za dva tipa sira kačkavalj: kačkavalj i kačkavalj krstaš, u pogledu mase 5 - 10 kg i do 3 kg, minimalnog sadržaja suve materije 56% i 54% i perioda zrenja od najmanje 8 nedelja i 4 nedelje, respektivno. Pored toga, neophodno je da se ispuni uslov minimuma sadržaja masti u suvoj materiji od 45%.

5.1.1. Hemijski sastav i pH vrednost sireva

U cilju ispitivanja da li sirevi koji su deklarirani kao kačkavalj dostupni na domaćem tržištu ispunjavaju zahteve nacionalnog standarda za uslove kvaliteta (Institut za standardizaciju Srbije, 1997) neophodno je bilo ispitati hemijski sastav sireva.

Hemijski sastav uzoraka sireva deklariranih kao kačkavalj sa domaćeg tržišta prikazani su u tabeli 4. Rezultati su pokazali varijacije u parametrima hemijskog sastava sireva kačkavalj, što je verovatno posledica različitih postupaka proizvodnje ove vrste sireva.

Prema sadržaju vode u bezmasnoj materiji sira koji je varirao od 55,71% do 67,06%, svi analizirani sirevi pripadaju grupi polutvrdih sireva, koja je definisana regulativom (Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura) i podrazumeva sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira između 54% i 69%. Ove vrednosti su uobičajene za sireve parenog testa koje odlikuje određeni period zrenja.

U smislu definisanog minimuma suve materije, čak šest od dvanaest (50%) ispitivanih sireva nije ispunilo uslove nacionalnog standarda, odnosno imalo je manji sadržaj suve materije od propisane vrednosti 54%. Sadržaj suve materije ovih šest sireva se kretao u intervalu od 51,52 do 52,88%.

Svi ispitivani sirevi su deklarirani da imaju minimalno 45% sadržaja masti u suvoj materiji. Međutim, ustanovljeno je da četiri od dvanaest sireva (30%) nisu ispunili uslove nacionalnog standarda, odnosno nisu imali minimum od 45% sadržaja masti u suvoj materiji. Sadržaj masti u suvoj materiji ovih sireva se kretao u intervalu od 36,08 do 42,78%.

Prema rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, termin kačkavalj se upotrebljava iako sirevi prema parametrima sastava nisu u potpunosti usklađeni sa nacionalnim standardom. Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu uspostavljanja bolje kontrole deklarisanja proizvoda od strane regulatornih tela. Adekvatno deklarisanje proizvoda je veoma važno kako se ne bi potrošači dovodili u zabludu, a takođe i radi očuvanja kvaliteta, posebno u slučaju kačkavalja kada postoji precizno definisan standard.

Neispunjenost uslova definisanih nacionalnim standardom za ovu vrstu sira najverovatnije je povezana sa različitim uslovima i periodom zrenja, kao i razlikama u tehnološkom postupku proizvodnje.

Statističke razlike ($p < 0,05$) utvrđene su između ispitanih sireva kačkavalj dostupnih sa domaćeg tržišta u pogledu sadržaja suve materije, mlečne masti, masti u suvoj materiji sira, vode u bezmasnoj materiji sira i NaCl.

Tabela 4. Hemijski sastav sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Uzorak sira	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	MSM (%)	VBMS (%)	NaCl (%)	Ukupni proteini (%)
C1	51,87±0,11 ^{a,b}	22,00±0,00 ^{a,b}	42,41±0,09 ^{b,c}	61,70±0,15 ^{d,e}	3,25±0,16 ^{d,e}	27,09±0,09 ^{e,f}
C2	55,43±0,13 ^{c,d}	20,00±0,00 ^a	36,08±0,09 ^a	55,71±0,16 ^a	3,69±0,52 ^e	30,79±0,29 ^g
C3	52,88±0,32 ^b	24,00±0,00 ^{b,c}	45,38±0,28 ^{c,d}	61,99±0,43 ^{d,e}	2,07±1,42 ^{a,b,c,d}	27,61±0,10 ^{e,f}
C4	52,72±0,58 ^b	29,50±0,50 ^f	55,96±1,57 ^g	67,06±1,30 ^g	1,36±0,78 ^{a,b}	26,68±1,23 ^{d,e,f}
C5	51,52±0,82 ^a	25,50±1,50 ^{c,d}	49,53±3,70 ^{e,f}	65,11±2,41 ^{f,g}	1,62±0,12 ^{a,b,c}	24,59±0,08 ^{a,b,c,d}
C6	55,98±0,11 ^d	25,75±0,75 ^{c,d}	46,00±1,39 ^{c,d,e}	59,29±0,69 ^c	1,53±0,10 ^{a,b,c}	24,05±1,60 ^{a,b,c}
C7	52,64±0,87 ^b	25,75±0,75 ^a	40,84±0,28 ^b	60,33±0,72 ^{c,d}	0,93±0,07 ^a	28,32±1,64 ^f
C8	52,71±0,12 ^b	21,50±0,50 ^{c,d}	48,38±0,90 ^{d,e,f}	63,48±0,37 ^{e,f}	0,93±0,40 ^a	23,25±0,19 ^a
C9	57,27±0,09 ^e	24,50±0,50 ^{c,d}	42,78±0,94 ^{b,c}	56,59±0,49 ^{a,b}	1,03±0,08 ^a	26,08±0,90 ^{c,d,e,f}
C10	54,96±0,13 ^c	28,00±0,50 ^{e,f}	50,94±0,85 ^f	62,56±0,38 ^{d,e}	2,89±0,06 ^{c,d,e}	23,35±0,13 ^{a,b}
C11	58,71±0,13 ^f	29,00±1,00 ^f	49,40±1,82 ^{d,e,f}	58,16±1,01 ^{b,c}	2,78±0,21 ^{b,c,d,e}	25,65±0,08 ^{b,c,d,e}
C12	57,19±0,15 ^e	26,50±1,00 ^{d,e}	46,34±1,81 ^{c,d,e}	58,26±0,91 ^{b,c}	2,91±0,18 ^{c,d,e}	27,08±0,11 ^{e,f}

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

MSM - sadržaj mlečne masti u suvoj materiji sira.

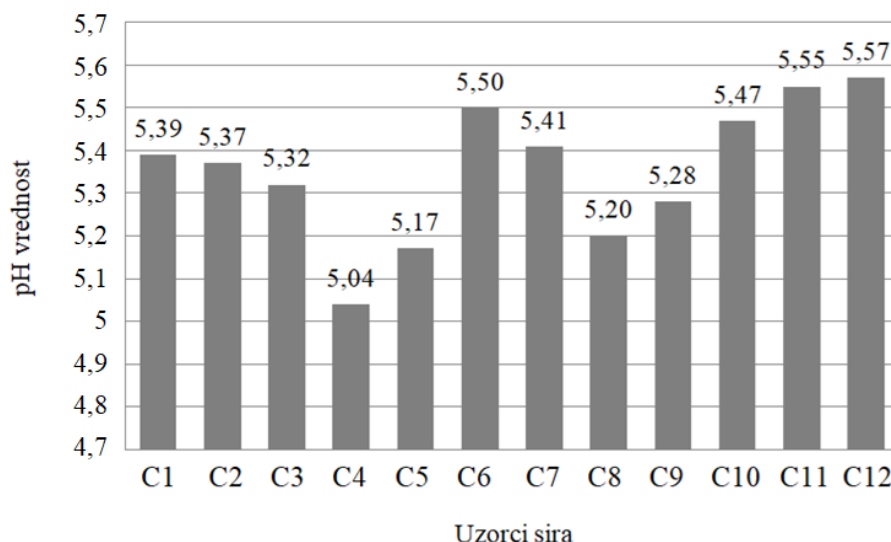
VBMS - sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira.

Sadržaj suve materije sireva se kretao u intervalu od 51,52 do 58,71%. Prema literaturnim podacima sadržaj suve materije kačkavalja je veoma varijabilan. Primera radi, Ivanova i sar. (2021b) navode da je na kraju zrenja sadržaj suve materije kačkavalja bio 58,21% što je znatno veća vrednost u odnosu na naše rezultate većine ispitivanih sireva. Andronoiu i sar. (2015) su utvrdili da se sadržaj suve materije povećava tokom zrenja od 51,45% do 58,28%.

Sadržaj mlečne masti ispitivanih sireva se kretao u intervalu od 20,00 do 29,50%. Sadržaj mlečne masti, kao i masti u suvoj materiji, zavisi prvenstveno od sastava mleka, kao i željenog sastava budućeg sira. Literaturni podaci ukazuju da se sadržaj mlečne masti kačkavalja uobičajeno kreće od 24,5 do 28,0% (Kamber, 2008; Sahan i sar., 2008; Santa i Srbinovska, 2014). Ivanova i sar. (2021b) su odredili da je na kraju zrenja sadržaj mlečne masti kačkavalja bio 27,5%.

U pogledu pH vrednosti (Grafik 1.), većina ispitivanih sireva bila je u intervalu uobičajenom za ovu vrstu sira koja iznosi od 5,1 do 5,7 (Kamber, 2008; Sahan i sar., 2008). Prema podacima drugih autora, pH vrednosti kačkavalja iz regiona Galičnika i Lazaropolja Severne Makedonije su bile 5,34 i 5,16 (Santa i Srbinovska, 2017), što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Uočeno je da postoje značajne varijacije u sadržaju soli među ispitivanim sirevima kačkavalj analiziranih u ovoj disertaciji koji se kretao od 0,93 do 3,69%. Pojedini sirevi (oko 40%) se mogu čak okarakterisati kao sirevi sa velikim sadržajem soli (2,78-3,69%), što je verovatno posledica tradicionalnog načina proizvodnje, gde je visok sadržaj soli korišćen kao sredstvo za poboljšanje kvaliteta sira dobijenog od mleka lošeg mikrobiološkog statusa (Guinee i sar., 2015). Značajne varijacije i veliki sadržaj NaCl (3,8%) utvrđene su i u studiji Mijačević i Bulajić (2004). Nesumnjivo, velika razlika između sireva može uticati na njihova svojstva. Međutim, tradicionalno proizvedeni kačkavalj (Pirotski kačkavalj, uzorci C10, C11 i C12) koji ima oznaku geografskog porekla na nacionalnom nivou prema parametrima sastava definisanih u elaboratu se odlikuje relativno visokim nivoom soli od najviše 2,5% (Ostojić i sar., 2012). Na osnovu navedenih rezultata i ustanovljenih značajnih varijacija, kao i velikog sadržaja soli u pojedinim sirevima, javlja se potreba za standardizacijom sadržaja soli u ovom tipu sira, kao i smanjenjem, što je u skladu sa savremenom strategijom ishrane (Sun i sar., 2021).



Grafik 1. pH vrednosti sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Rezultati su pokazali da je sadržaj proteina uzoraka ispitivanih kačkavalja bio u intervalu od 23,25% do 30,79% (Tabela 4). Sadržaj proteina nije definisani parametar sastava prema regulatornim propisima, a najvećim delom zavisi od sastava mleka i tehnološkog postupka proizvodnje. Širok interval variranja sadržaja proteina ukazuje na različitost između ispitivanih sireva što je ustanovljeno i razmatranjem prethodno navedenih parametara sastava. Ivanova i sar. (2021b) su ustanovili da je sadržaj proteina kačkavalja $24,63 \pm 1,23\%$, dok Santa i Srbinovska (2014) navode $23,05 \pm 1,71\%$.

Rezultati su pokazali varijacije u okviru hemijskog sastava sireva kačkavalj dostupnih na domaćem tržištu. Ovo nesumnjivo odražava različite metode proizvodnje sireva koje obuhvataju kvalitet i vrstu sirovog mleka, upotrebu starter kultura, trajanje i uslove perioda zrenja itd.

5.1.2. Proteolitički parametri sireva

Parametri proteolize ispitivanih sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta, vrednosti RN/UN (%) i PTAN/UN (%) prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Proteolitički parametri sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Uzorak sira	RN (%)	PTAN (%)	RN/UN (%)	PTAN/RN (%)	PTAN/UN (%)
C1	$1,06 \pm 0,00^h$	$0,08 \pm 0,01^d$	$25,06 \pm 0,15^e$	$7,91 \pm 0,01^c$	$1,99 \pm 0,01^{d,e}$
C2	$0,53 \pm 0,01^b$	$0,02 \pm 0,00^{a,b,c}$	$10,99 \pm 0,11^b$	$4,18 \pm 0,06^{a,b,c}$	$0,46 \pm 0,00^{a,b}$
C3	$0,32 \pm 0,01^a$	$0,02 \pm 0,00^{a,b,c}$	$7,41 \pm 0,15^a$	$5,60 \pm 0,27^{b,c}$	$0,41 \pm 0,01^{a,b}$
C4	$0,63 \pm 0,01^d$	$0,07 \pm 0,00^d$	$15,1 \pm 0,84^c$	$11,89 \pm 0,08^d$	$1,74 \pm 0,06^{c,d,e}$
C5	$0,61 \pm 0,01^{c,d}$	$0,01 \pm 0,00^a$	$15,89 \pm 0,27^c$	$0,61 \pm 0,01^a$	$0,10 \pm 0,00^a$
C6	$0,56 \pm 0,00^{b,c}$	$0,01 \pm 0,00^{a,b}$	$14,84 \pm 0,99^c$	$1,96 \pm 0,20^{a,b}$	$0,29 \pm 0,05^{a,b}$
C7	$0,93 \pm 0,02^f$	$0,12 \pm 0,00^e$	$21,08 \pm 0,78^d$	$13,27 \pm 0,19^d$	$2,75 \pm 0,11^e$
C8	$0,91 \pm 0,01^f$	$0,03 \pm 0,00^{a,b,c}$	$24,93 \pm 0,04^e$	$3,75 \pm 0,16^{a,b,c}$	$0,93 \pm 0,04^{a,b,c,d}$
C9	$0,30 \pm 0,01^a$	$0,02 \pm 0,00^{a,b,c}$	$7,30 \pm 0,50^a$	$7,21 \pm 0,41^c$	$0,53 \pm 0,07^{a,b,c}$
C10	$1,00 \pm 0,05^g$	$0,05 \pm 0,05^{c,d}$	$27,31 \pm 1,55^f$	$5,29 \pm 4,32^{b,c}$	$1,49 \pm 1,26^{b,c,d}$
C11	$0,82 \pm 0,04^e$	$0,05 \pm 0,00^{b,c,d}$	$20,37 \pm 1,02^d$	$5,64 \pm 0,20^{b,c}$	$1,15 \pm 0,02^{a,b,c,d}$
C12	$0,29 \pm 0,01^a$	$0,02 \pm 0,00^{a,b,c}$	$6,72 \pm 0,24^a$	$5,86 \pm 1,22^{b,c}$	$0,39 \pm 0,07^{a,b}$

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija.

Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

RN – sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija;

PTAN – sadržaj azotnih materija rastvorljivih u 5% fosfovolframskoj kiselinu;

UN – sadržaj ukupnih azotnih materija.

Koeficijent zrelosti RN/UN (%) sireva kačkavalj sa tržišta bio je u veoma širokom intervalu od 6,72% do 27,31%, što ukazuje na značajne varijacije ($p < 0,05$) sireva različitih proizvođača i neujednačen stepen zrelosti. Na osnovu prikazanih rezultata mogu se primetiti veoma niski koeficijenti zrelosti pojedinih sireva što može ukazivati na kratak period zrenja. Naime, iako je prema standardu definisan minimalni period zrenja kačkavalja od 4 odnosno 8 nedelja (kačkavalj krstaš i kačkavalj) još uvek ne postoji numerički pokazatelj koji bi služio kao indikator za proveru ovog zahteva. Na osnovu toga možemo zaključiti da bi u budućem periodu trebalo uraditi analizu velikog broja sireva sa različitim stepenom zrelosti i na osnovu toga definisati

interval koeficijenta zrelosti koji bi mogao da posluži kao parametar kontrole kvaliteta ove vrste sira.

Podaci iz literature takođe pokazuju velike varijacije koeficijenta zrelosti za različite vrste sireva parenog testa. Pappa i sar. (2019) utvrdili su da je koeficijent zrelosti zrelog sira kačkavalj (90 dana) u rasponu od 16,6% do 22,9%. Kačkavalj proizveden na tradicionalan način bez dodavanja starter kulture odlikuje se višim koeficijentom zrelosti u odnosu na industrijski proizvedene sireve (Guinee i sar., 2015). Sulejmani i Hayaloglu (2016) su pokazali da su makedonski sirevi kačkavalj koji su sazrevali na 5 °C tokom 120 dana imali veoma nizak stepen proteolize, a koeficijent zrelosti je bio samo oko 10%. Evidentno je da primarna proteoliza zavisi od brojnih faktora, naročito od trajanja i uslova tokom perioda zrenja, ali i od načina proizvodnje sira. Interesantno je primetiti da veoma niska vrednost RN/UN (%) kod pojedinih sireva nije povezana sa velikim sadržajem soli. Ovo je donekle iznenađujuće, dok sa druge strane, poznato je da na primarnu proteolizu utiču razlike u aktivnosti sirila, vremenu zrenja i temperature, kao i starter kultura. Može se uočiti da su neki od ispitivanih sireva kačkavalj pokazali nizak stepen proteolize, ali je većina uzoraka sireva bila u saglasnosti sa podacima iz literature.

Tabela 6. Kazeinske frakcije sireva kačkavalj na domaćem tržištu (% ukupne površine trake)

Uzorci sira	Kazeinske frakcije			
	α_s_1 kazein (%)	β kazein (%)	Produkti degradacije α_s_1 kazeina (%)	Produkti degradacije β kazeina (%)
C1	22,74±0,08 ^a	20,84±0,06 ^a	35,77±0,25 ^a	20,65±0,23 ^a
C2	28,25±0,21 ^b	20,76±0,07 ^a	31,94±0,09 ^b	19,06±0,20 ^b
C3	27,06±0,02 ^c	23,09±0,02 ^b	32,65±0,05 ^c	17,20±0,05 ^c
C4	25,24±0,07 ^d	26,34±0,07 ^c	33,54±0,07 ^d	14,88±0,07 ^d
C5	26,26±0,07 ^e	23,13±0,03 ^{b,e}	32,74±0,04 ^c	17,87±0,08 ^e
C6	19,96±0,07 ^f	21,38±0,02 ^d	37,34±0,04 ^e	21,31±0,04 ^f
C7	30,52±0,04 ^g	23,25±0,06 ^e	26,36±0,04 ^f	19,87±0,05 ^g
C8	22,65±0,05 ^a	19,47±0,08 ^f	38,84±0,04 ^g	19,04±0,07 ^b
C9	29,82±0,06 ^h	24,35±0,04 ^g	27,80±0,04 ^h	18,03±0,06 ^e
C10	25,95±0,06 ⁱ	19,28±0,03 ^h	31,99±0,05 ^b	22,78±0,02 ^h
C11	26,76±0,03 ^j	27,98±0,04 ⁱ	29,22±0,04 ⁱ	16,04±0,06 ⁱ
C12	26,23±0,05 ^e	21,17±0,03 ^j	35,42±0,05 ^j	17,18±0,03 ^c

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05).

Slobodne aminokiseline, dipeptidi i tripeptidi su rastvorljivi u PTA i obično se formiraju aktivnošću starterskih i nestarterskih bakterija na kazeinu i peptidima (Tarakci, 2004). Ove frakcije ukazuju na aktivnost peptidaza u siru (Cagno i sar., 2006). Kada je u pitanju PTAN/UN, rezultati analize sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta ukazali su na značajne razlike (p<0,05). Utvrđeno je da su vrednosti PTAN/UN sireva bile u rasponu od 0,10% do 2,75% (Tabela 5.). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Pappa i sar. (2019) koji su pokazali da je sadržaj PTAN/UN od 1,1% do 2,5% nakon 30 dana odnosno 180 dana zrenja sira kačkavalj. U drugoj studiji, interval za PTAN/UN (%) u Dil siru parenog testa bio je od 0,94% do 1,68% (Hayaloglu i Karabulut, 2013). Takođe, uočava se širok raspon vrednosti RN/UN i PTAN/UN u okviru

ispitivanih sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta, što može biti rezultat diverziteta: sastava i kvaliteta mleka, primenjenih termičkih tretmana, mikrobiote i njihove aktivnosti u proteolizi, sastava sira, vremena i uslova zrenja sira.

Urea poliakrilamidna gel elektroforeza je korišćena da bi se dobio profil proteolize sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta. Dobijeni rezultati frakcija kazeina su prikazani u tabeli 6. Udeo frakcija α_1 kazeina (%) svih ispitivanih uzoraka sira bio je u rasponu od minimuma 19,96% do maksimuma 30,52%. Frakcija β kazeina (%) svih uzoraka sira je između minimuma 19,28% i maksimuma 27,98%.

Elektroforetsko ispitivanje sireva čedar, mocarela i gauda, najčešće pokazuje da je koncentracija netaknutog β kazeina uglavnom veća od koncentracije α_1 kazeina (Guinee i sar., 2015). Formirane su takozvane proteinske trake niske pokretljivosti kroz gel elektroforeze koje su odgovarale produktima razgradnje α_1 kazeina (%) i β kazeina (%). Produkti degradacije α_1 kazeina (%), kao što se može videti iz tabele 6., su između minimuma od 26,36% i maksimuma od 38,84%, a produkti degradacije β kazeina (%) između minimuma 14,88% i maksimuma 22,78%. Rezultati pokazuju hidrolizu α_1 kazeina i β kazeina i formiranje produkata degradacije što ukazuje na aktivnost i rezidualnog himozina i plazmina (Guinee i sar., 2015; Miocinović i sar., 2012).

5.1.3. Teksturalna svojstva sireva

Analiza profila teksture (TPA) se često sprovodi kako bi se sagledala svojstva koja su važna prilikom konzumiranja proizvoda (Dinkci i sar., 2011). TPA parametri kao što su tvrdoća, elastičnost, kohezivnost i žvkljivost analiziranih sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta i njihova korelacija sa parametrima hemijskog satava prikazani su u tabelama 7. i 8.

Tabela 7. Tekstura sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Uzorci sira	Tvrdoća (g)	Elastičnost	Kohezivnost	Žvkljivost
C1	827±170 ^a	0,62±0,08 ^{c,d}	0,35±0,09 ^{a,b,c}	180±62 ^a
C2	5232±408 ^g	0,81±0,01 ^f	0,61±0,04 ^{e,f}	2619±350 ^e
C3	1624±112 ^{b,c}	0,75±0,01 ^{e,f}	0,65±0,03 ^f	803±101 ^c
C4	1594± 77 ^{b,c}	0,45±0,03 ^b	0,26±0,01 ^{a,b}	189±20 ^a
C5	893±83 ^a	0,72±0,04 ^{d,e,f}	0,54±0,04 ^{d,e,f}	351±62 ^{a,b}
C6	2874±276 ^e	0,66±0,03 ^{c,d,e}	0,45±0,05 ^{c,d}	866±165 ^c
C7	3493±211 ^f	0,74±0,01 ^{d,e,f}	0,46±0,04 ^{c,d,e}	1203±135 ^d
C8	1530±135 ^b	0,41±0,05 ^{a,b}	0,22±0,02 ^a	140±22 ^a
C9	2730±382 ^{d,e}	0,73±0,03 ^{d,e,f}	0,40±0,07 ^{b,c,d}	798±180 ^c
C10	2166 ±515 ^{c,d}	0,31±0,04 ^a	0,25±0,20 ^a	150±74 ^a
C11	2928±180 ^{e,f}	0,59±0,04 ^c	0,21±0,03 ^a	379±95 ^{a,b}
C12	2393 ±463 ^{d,e}	0,66±0,16 ^{c,d,e}	0,29±0,03 ^{a,b}	478±201 ^b

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

Tabela 8. Korelacija između teksturalnih svojstava i parametara hemijskog sastava sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Varijable	Suva materija	Mlečna mast	MSM	VBMS	NaCl	pH	Ukupni proteini
Tvrdoća	0,526	-0,188	-0,612*	-0,754**	0,250	0,394	0,561
Elastičnost	0,079	-0,396	-0,719**	-0,541	0,065	0,135	0,672*
Kohezivnost	-0,278	-0,474	-0,580*	-0,200	0,048	-0,105	0,530
Žvkljivost	0,178	-0,502	-0,784**	-0,633*	0,268	0,153	0,746**

*Korelacija je značajna na nivou 0,05.

**Korelacija je značajna na nivou 0,01.

MSM - sadržaj mlečne masti u suvoj materiji sira.

VBMS - sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira.

Rezultati su ukazali na širok raspon vrednosti, od 827 g do 5232 g u pogledu tvrdoće koja je jedan od glavnih parametara teksturalnih svojstava sira. Dva uzorka sira (C1 i C5) od ukupno 12 ispitivanih uzoraka su pokazali statistički značajno niže vrednosti tvrdoće ($p < 0,05$). Ovo svojstvo teksture je uglavnom rezultat sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira, što ukazuje visoki negativni koeficijent korelacije. Pored toga, mora se naglasiti da na tvrdoću sireva u velikoj meri utiče i sadržaj mlečne masti u suvoj materiji sira što je takođe pokazano relativno visokim negativnim koeficijentom. Upravo značaj sadržaja mlečne masti za reološka i teksturalna svojstva sirnog testa su dovela da se sirevi klasifikuju na ekstra tvrde, tvrde, polutvrde i meke prema parametru sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira (Puđa, 2009; Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura). Ovo je jedan od razloga zašto nije ustanovljena značajna korelacija u pogledu sadržaja suve materije već samo sadržaja mlečne masti u suvoj materiji sira i vode u bezmasnoj materiji sira.

Kada sagledamo korelacije između parametara analize profila teksture i hemijskog sastava, zanimljivo je da su ustanovljene neke značajne korelacije. Elastičnost sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta bila je u širokom intervalu od 0,31 do 0,81 i u negativnoj korelaciji sa MSM (-0,719) i VBMS (-0,541). Kohezivnost i žvkljivost su takođe bili u negativnoj korelaciji sa MSM. Zanimljivo je da su tradicionalno proizvedeni Pirotski kačkavalji (uzorci C10, C11 i C12) niže kohezivnosti od većine ostalih ispitanih sireva što je verovatno posledica različitog načina parenja, mešenja i kalupljenja sirnog testa. Utvrđena je pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja proteina i elastičnosti (nivo 0,05) i žvkljivosti (nivo 0,01). Sa druge strane, zabeležena je negativna korelacija između sadržaja mlečne masti u suvoj materiji i svih analiziranih parametara analize profila teksture. Takođe, negativna korelacija je zabeležena između vode u bezmasnoj materiji sira i žvkljivosti (0,05) i tvrdoće (nivo 0,01). Poznato je da parametri kao što su sadržaj proteina i vode imaju značajan uticaj na parametre teksture (Eroglu i sar., 2015).

5.1.4. Bakterije mlečne kiseline

Broj ćelija bakterija mlečne kiseline (BMK) u sirevima kačkavalj sa domaćeg tržišta prikazan je u tabeli 9.

Dobijeni rezultati su pokazali da su svi sirevi kačkavalj imali broj ćelija mezofilnih i termofilnih BMK iznad 6 log cfu/g za, osim broja termofilnih BMK (MRS) u uzorku C3 (5,54 log cfu/g) i C5 (5,79 log cfu/g), a za termofilne BMK (M17) u uzorku C8 (5,26 log cfu/g) i C11 (5,98 log cfu/g), koji su bili niži.

Statistička analiza je pokazala da postoje značajne razlike između broja mezofilnih i termofilnih BMK ($p < 0,05$) u uzorcima kačkavalja. Broj ćelija ukazuje da po pitanju hemijskih svojstava proizvodnja sira se razlikuje u različitim regionima Srbije. Takođe, neki sirevi kačkavalj su proizvedeni sa dodatkom starter kultura, dok su neki tradicionalno dobijeni od sirovog mleka. Utvrđeni broj ćelija mezofilnih i termofilnih BMK je u skladu sa prethodnim istraživanjima Pirotskog kačkavalja (Danilović i sar., 2020; Mijačević i sar., 2005a). U Pirotskom kačkavalju, broj ćelija mezofilnih i termofilnih BMK na kraju zrenja bio je iznad 6 log cfu/g. Pappa i sar. (2019) su takođe primetili da je broj ćelija mezofilnih i termofilnih BMK iznad 6 log cfu/g nakon 90 dana zrenja sira kačkavalj.

Tabela 9. Ukupan broj mezofilnih i termofilnih BMK (log cfu/g) u sirevima kačkavalj na domaćem tržištu

Uzorci sira	Mezofilne BMK (MRS)	Termofilne BMK (MRS)	Mezofilne BMK (M17)	Termofilne BMK (M17)
C1	7,93±0,00 ^{c,d}	7,52±0,04 ^{g,h}	8,28±0,07 ^{d,e}	7,26±0,19 ^e
C2	7,20±0,37 ^{a,b}	7,15±0,22 ^{f,g,h}	7,49±0,17 ^{b,c}	6,93±0,27 ^{d,e}
C3	7,93±0,11 ^{c,d}	5,54±0,13 ^a	7,70±0,02 ^{b,c,d}	7,00±0,21 ^{d,e}
C4	8,28±0,04 ^d	6,27±0,25 ^{b,c,d}	7,90±0,34 ^{b,c,d,e}	6,68±0,11 ^{c,d}
C5	8,00±0,01 ^{c,d}	5,79±0,14 ^{a,b}	8,24±0,18 ^{d,e}	6,76±0,05 ^{c,d,e}
C6	8,10±0,07 ^{c,d}	6,94±0,08 ^{e,f}	7,46±0,22 ^b	7,04±0,15 ^{d,e}
C7	7,81±0,12 ^{b,c,d}	6,54±0,13 ^{c,d,e}	7,89±0,11 ^{b,c,d,e}	6,76±0,25 ^{c,d,e}
C8	7,81±0,55 ^{b,c,d}	6,10±0,09 ^{b,c}	7,79±0,26 ^{b,c,d,e}	5,26±0,05 ^a
C9	8,27±0,10 ^d	7,64±0,09 ^h	8,11±0,18 ^{c,d,e}	7,96±0,06 ^f
C10	7,48±0,11 ^{b,c}	7,00±0,19 ^{e,f,g}	8,34±0,28 ^e	6,85±0,04 ^{d,e}
C11	6,65±0,34 ^a	6,08±0,28 ^{a,b,c}	6,65±0,05 ^a	5,98±0,33 ^b
C12	7,71±0,03 ^{b,c,d}	6,77±0,31 ^{d,e,f}	7,67±0,38 ^{b,c,d}	6,25±0,09 ^{b,c}

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

5.1.5. Boja sireva

Ispitivanje parametara boje sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta sprovedeno je kompjuterskim vizuelnim sistemom, a rezultati su prikazani u tabeli 10. Vrednost L^* je parametar koji predstavlja svetlost od crne (0) do bele (100) sireva, što znači da što je veća L^* vrednost proizvod je svetliji. Što se tiče ovog parametra, rezultati istraživanja su pokazali da su vrednosti L^* bile između 87,25 i 92,08 i nije bilo značajnih razlika u okviru svih ispitivanih sireva ($p < 0,05$).

Tabela 10. Parametri boje CIELAB (L^* , a^* , b^*) sireva kačkavalj na domaćem tržištu

Uzorci sira	L^*	a^*	b^*
C1	90,50±0,51 ^a	0,17±0,38 ^d	12,96±1,37 ^a
C2	90,09±0,73 ^a	0,39±0,50 ^b	15,78±1,44 ^b
C3	90,40±0,71 ^a	0,08±0,28 ^c	15,60±1,35 ^b
C4	92,08±0,50 ^a	0±0,00 ^{c,d}	16,29±1,49 ^{b,c}
C5	87,25±18,17 ^a	0±0,00 ^{c,d}	18,33±4,00 ^d
C6	90,33±0,64 ^a	0,21±0,41 ^d	16,50±1,02 ^{b,c}
C7	88,54±18,44 ^a	0,92±0,28 ^a	11,79±1,06 ^a
C8	91,54±0,83 ^a	0±0,00 ^{c,d}	22,67±2,04 ^f
C9	90,04±0,62 ^a	0,08±0,28 ^c	20,88±1,96 ^e
C10	91,38±0,71 ^a	0±0,00 ^{c,d}	15,75±1,67 ^b
C11	91,25±0,68 ^a	0±0,00 ^{c,d}	17,83±2,22 ^{c,d}
C12	88,75±18,28 ^a	0±0,00 ^{c,d}	12,88±1,33 ^a

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

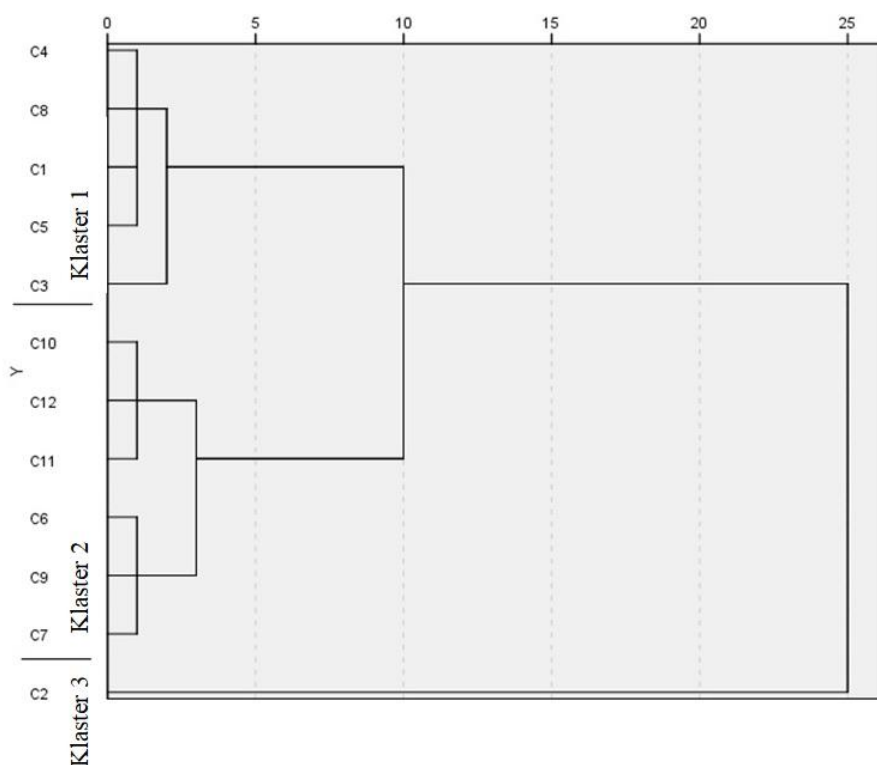
Različita slova (^{a-f}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

Prema Dinkçi i sar. (2011) vrednost L^* kašar sira parenog testa varirala je od 85,38 do 87,25 tokom zrenja. Sa odmicanjem zrenja sira vrednosti L^* se menjaju i sir najčešće postaje tamniji zbog Maillard-ove reakcije koja se javlja tokom zrenja (Jo i sar., 2018; Dinkçi i sar., 2011). Na varijacije boje mogu uticati i mnogi faktori, kao što su genetski i negenetski (Milovanović i sar., 2020).

Vrednost a^* predstavlja opseg boja od crvene (+) do zelene (-), a vrednost b^* predstavlja opseg boja od žute (+) do plave (-). Štaviše, postojale su značajne razlike ($p < 0,05$) obe vrednosti a^* i b^* između uzoraka sira. Vrednosti a^* i b^* bile su u intervalu od 0,00 do 0,92 i od 11,79 do 22,67, respektivno. Slično ovim rezultatima, Eroglu i sar. (2015) utvrdili su L^* , a^* i b^* vrednosti sira kašar koje su bile između 63,90 i 79,03, -1,19 i 1,18, 7,04 i 21,44, respektivno. Odstupanja u sastavu uzoraka sira, posebno u sadržaju masti, mogu biti razlog za varijacije vrednosti boje (Eroglu i sar., 2015).

5.1.6. Hijerarhijska klaster analiza

Hijerarhijska klaster analiza (engl. Hierarchical cluster analysis, HCA) podataka dobijenih iz svih parametara sireva kačkavalj sa domaćeg tržišta prikazana je na slici 20. Svi ispitivani sirevi kačkavalj sa domaćeg tržišta su grupisani u tri klastera. Na osnovu analiziranih podataka svih parametara dobijenih u ovoj disertaciji, uočeno je da većina uzoraka sireva iz jednog klastera pripada određenom regionu. Naročito uzorci sireva označeni sa C10, C11 i C12 koji se proizvode u istom regionu opštine Pirot i grupisani su na istoj poziciji na HCA dendrogramu. Dakle, ovo ukazuje da region porekla sirovine, kao i tradicionalna proizvodnja sira i postupak ručne obrade igraju važnu ulogu u konačnim svojstvima sira.



Slika 20. Dendrogram hijerarhijske analize grupisanja primenjene na podacima svih parametara sireva kačkavalj na domaćem tržištu

5.2. Svojstva kačkavalja sa različitim sadržajem soli

5.2.1. Fizičko-hemijska svojstva sireva

Hemijski sastav tradicionalnog sira kačkavalj (označen kao kontrolni slovom K), kao i varijanti sa smanjenim sadržajem NaCl (označen slovom S) i delimično zamenjenim NaCl KCl-om (označen slovom M), su od značaja za utvrđivanje da li su sirevi usaglašeni sa nacionalnim standardom za uslove kvaliteta kačkavalja (Institut za standardizaciju Srbije, 1997). Rezultati prikazani u tabeli 11. su pokazali da sve tri varijante sira kačkavalj (K, M, S) ispunjavaju uslove utvrđene nacionalnim standardom (Institut za standardizaciju Srbije, 1997) za sir kačkavalj krstaš. U pogledu definisane suve materije, sve varijante kačkavalja sadrže suvu materiju iznad definisanog minimuma od 54%: između 55,64% i 56,50% u 30. danu (minimalni period zrenja); 58,53% i 60,14% u 90. danu; i 60,28% i 60,66% u 180. danu zrenja. Pored toga, uslov za minimalan sadržaj mlečne masti u suvoj materiji koji je 45% ispunjavaju sve varijante sira kačkavalj kao što je prikazano u tabeli 11.

Prema rezultatima sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira, kao što je i očekivano, sve ispitane varijante sireva kačkavalj pripadaju grupi polutvrdih sireva. Grupa sireva je definisana prema regulativi (Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura) koja je za grupu polutvrdih sireva odredila sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira između 54% i 69%. Štaviše, nije bilo daljih statističkih razlika između ovih varijanti sira, što sugerise da smanjenje sadržaja NaCl za 30% kao i zamena sa KCl za 30% ne utiče na hemijski sastav sira. Slične rezultate pokazao je i Lavasani (2022) koji je ukazao da različite mešavine NaCl i KCl kod Iranskog sira u salamuri od ultrafiltriranog mleka ne utiču na sadržaj vode, suve materije, mlečne mast, ukupan azot/suvu materiju. Zbog toga je smanjenje sadržaja soli od značaja za savremenu strategiju ishrane i treba ga sprovesti u različitim vrstama sireva s obzirom da ne utiče značajno na hemijski sastav.

Tokom perioda zrenja većina parametara sastava kačkavalja koja uključuju sadržaj suve materije, odnosno vode u bezmasnoj materiji sira, mlečne masti su pokazale značajne promene do 90 dana. Ustanovljeno je povećanje ovih parametara sastava kao posledica isušivanja sira.

pH vrednost sireva neposredno nakon proizvodnje za varijante K, M i S je iznosila 5,28, 5,31 i 5,30, dok je nakon 30. dana zrenja bila u intervalu od 5,33 do 5,37. Promene pH vrednosti tokom zrenja nisu bile posebno izražene. Vrednosti pH ustanovljene u ovom radu su u saglasnosti sa literaturnim podacima, a takođe i odgovaraju ovoj vrsti sira. U studiji Talevski i sar. (2017), pH vrednost sira kačkavalj 30. dana zrenja se kretala između 5,32 i 5,40, dok Santa i Srbinovska (2014) navode da je pH vrednost kačkavalja nakon 6 meseci zrenja bila u opsegu od 5,28 do 5,47. Slične rezultate su pokazali i Ruzic-Muslic i sar. (2011) u studiji u kojoj se pH vrednost kačkavalja kretala od 5,30 do 5,47, kao i u studiji Sahan i sar. (2008) gde je pH vrednost kačkavalja 90. dana zrenja bila 5,42. Povećanje pH vrednosti od 1. do 30. dana tokom zrenja sira je povezano sa aktivnošću BMK koje su opstale nakon obrade sirnog testa tokom proizvodnje i koje učestvuju u proteolitičkim promenama stvarajući alkalna jedinjenja (Kožev, 2006).

Tabela 11. Hemijski sastav i pH vrednost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
Suva materija (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	51,43±1,00	53,15±1,40	52,11±0,40
30	b	56,50±0,95	56,12±0,62	55,64±0,45
90	c	58,53±0,88	60,14±0,37	59,93±0,95
180	c	60,32±0,71	60,28±1,10	60,66±0,86
Mlečna mast (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	26,67±0,52	26,50±0,87	26,75±0,90
30	b	28,50±1,32	28,17±0,29	28,33±0,58
90	c	30,50±1,32	30,17±0,76	30,00±1,00
180	c	30,83±1,04	30,33±0,58	30,67±1,15
MSM (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	51,86±1,59	49,91±2,80	51,33±1,40
30	a	50,47±3,05	50,20±1,07	50,92±0,63
90	a	52,11±1,75	50,20±1,62	50,09±1,76
180	a	51,11±1,27	50,35±1,88	50,55±1,18
VBMS (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	66,23±1,55	63,77±2,56	65,39±0,42
30	b	60,86±2,32	61,09±1,11	61,90±0,17
90	c	59,67±0,86	57,09±1,15	57,25±1,46
180	c	57,36±0,59	57,03±2,05	56,73±0,33
Sadržaj soli (%)				
Značajnost*		a	a	b
1	a	1,81±0,06	1,80±0,08	1,25±0,05
30	b	1,91±0,03	1,90±0,01	1,39±0,03
90	c	2,10±0,03	2,00±0,03	1,43±0,05
180	d	2,23±0,06	2,19±0,03	1,46±0,02
Ukupni proteini (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	22,61±0,44	24,21±0,95	22,87±1,45
30	b	24,11±0,77	25,01±0,64	24,69±0,39
90	b	25,12±0,50	25,33±1,99	25,01±1,80
180	c	26,78±0,25	27,24±0,64	27,59±0,23
pH vrednost				
Značajnost*		a	b	ab
1	a	5,28±0,04	5,31±0,05	5,30±0,02
30	ab	5,33±0,06	5,36±0,04	5,37±0,03
90	b	5,32±0,09	5,44±0,04	5,40±0,02
180	ab	5,31±0,05	5,35±0,05	5,32±0,01

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-c}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05).

MSM - sadržaj mlečne masti u suvoj materiji sira.

VBMS - sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira.

5.2.2. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva

Proteoliza je jedan od najvažnijih biohemijskih procesa tokom zrenja sira. Tokom proteolize dolazi do mnogih hemijskih promena, pre svega se dešava razgradnja proteina koji se prvo razlažu do primarnih, a zatim do sekundarnih produkata razgradnje. Razgradnjom prvo nastaju polipeptidi, zatim peptidi manje molekulske mase, a onda i aminokiseline. U daljem toku zrenja biohemijskim procesima aminokiseline se mogu dalje razgraditi u različita jedinjenja. Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija raste tokom zrenja u skladu sa razgradnjom proteina. U cilju sagledavanja toka i obima proteolize, neophodno je praćenje frakcija azota koje se formiraju tokom zrenja. Određivanje u vodi rastvorljivih azotnih materija (RN) i određivanje azotnih materija rastvorljivih u 5% fosfovolframskoj kiselini (PTAN) su metode koje su pogodne za ekstrakciju peptida koji nastaju prilikom proteolitičkih promena. Za ekstrakciju peptida malih molekulske mase (< 600 daltona) se koristi 5% PTA (Christensen i sar., 1991).

Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija i azotnih materija rastvorljivih u fosfovolframskoj kiselini sireva kačkavalj sa smanjenim sadržajem NaCl i zamenjenim NaCl tokom zrenja su prikazane su u tabeli 12. Smanjenje ili zamena sadržaja NaCl nisu pokazali značajan uticaj na parametre proteolitičkih promena tokom zrenja kačkavalja, a koji su posmatrani kroz parametre RN (%), PTAN (%), RN/UN (%), PTA/RN (%) i PTA/UN (%).

Ovi rezultati ukazuju na to da je proteoliza tekla ujednačeno kod kontrolnog kačkavalja i varijanti kačkavalja sa smanjenim sadržajem NaCl i zamenjenim NaCl pomoću KCl.

Parametar RN/UN (%) se još naziva i koeficijent zrelosti sira i predstavlja sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija izražen kao udeo u ukupnim azotnim materijama. Ovaj parameter se povećava kako odmiče zrenje sira: od 10,82 - 12,88% 1. dana do 31,79 - 33,42% 180. dana kod svih varijanti kačkavalja. Takođe, pH vrednost sira utiče na sadržaj rastvorljivog azota (RN), samim tim određivanje RN je pogodno kod sireva kod kojih su male promene pH vrednosti tokom zrenja.

Koeficijent zrelosti sira (RN/UN (%)) 30. dana kada je dostigao svoju zrelost, bio je 20,08%, 22,01% i 22,03% za varijante K, M i S, respektivno. Ovi rezultati su u skladu rezultatima različitih autora (Alichanidis i Polichroniadou, 2008; Carić, 1993) koji su utvrdili da se koeficijent zrelosti zrelih sireva kačkavalj kretao oko 20%. Pappa i sar. (2019) su utvrdili da se koeficijent zrelosti zrelog sira kačkavalj kretao od 16,6 do 22,9%, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije.

U studiji Yalcin i sar. (2021) su pokazali rezultate PTAN (%) ispitivanog kašar sira koji je u 30. danu bio 0,05%, što je u skladu sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji. Rezultati su pokazali da je PTAN (%) kontrolnog sira 30. dana zrenja bio 0,05%, dok su sirevi sa smanjenim i zamenjenim sadržajem NaCl bili 0,06%. Takođe, sadržaj PTAN (%) se tokom zrenja povećavao za sve ispitivane varijante kačkavalja, što je u skladu sa rezultatima studije Yalcin i sar. (2021).

Kao što se iz tabele 12. uočava tokom zrenja povećava se sadržaj PTA/RN (%) i PTA/UN (%) tokom celokupnog perioda zrenja, ali je statistički značajno povećanje ustanovljeno u drugoj fazi zrenja odnosno nakon 90. dana. Ovo je i očekivano s obzirom da sekundarna proteoliza nastaje delovanjem enzima koji se oslobađaju u drugoj fazi zrenja, a doprinose formiranju malih peptida i slobodnih aminokiselina.

Tabela 12. Proteolitički parametri kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
RN (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	0,46±0,03	0,41±0,09	0,44±0,01
30	b	0,76±0,10	0,86±0,03	0,85±0,10
90	c	0,93±0,15	1,06±0,07	1,05±0,17
180	d	1,33±0,10	1,42±0,25	1,44±0,13
PTAN (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	0,02±0,00	0,02±0,01	0,03±0,01
30	ab	0,05±0,01	0,06±0,00	0,06±0,02
90	b	0,07±0,01	0,09±0,02	0,09±0,03
180	c	0,17±0,05	0,23±0,11	0,21±0,07
RN/UN (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	12,88±0,83	10,82±2,56	12,36±0,61
30	b	20,08±2,23	22,01±1,32	22,03±2,55
90	c	23,72±4,38	26,88±3,34	26,99±4,70
180	d	31,79±2,16	33,42±6,20	33,31±3,28
PTAN/RN (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	5,31±0,14	5,69±2,30	6,08±1,84
30	a	6,49±0,26	6,90±0,49	7,25±2,00
90	a	7,97±0,14	8,47±2,24	8,23±2,19
180	b	12,77±3,28	15,95±5,90	14,07±3,60
PTAN/UN (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	0,68±0,06	0,64±0,35	0,75±0,23
30	ab	1,30±0,10	1,51±0,07	1,59±0,47
90	b	1,89±0,38	2,23±0,32	2,23±0,78
180	c	4,05±1,23	5,53±2,72	4,76±1,68

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-d}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

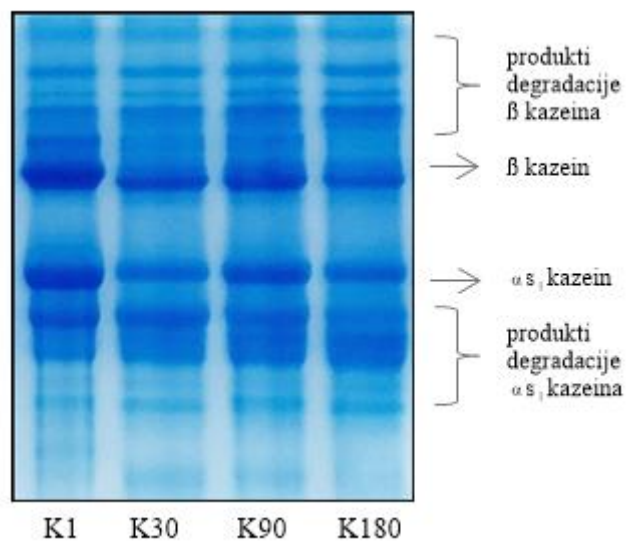
RN – sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija;

PTAN – sadržaj azotnih materija rastvorljivih u 5% fosfovolframskoj kiselini;

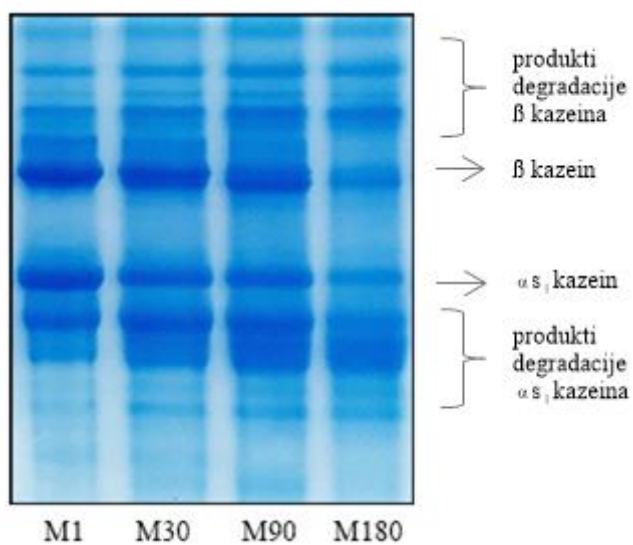
UN – sadržaj ukupnih azotnih materija.

5.2.3. Elektroforetska ispitivanja sireva

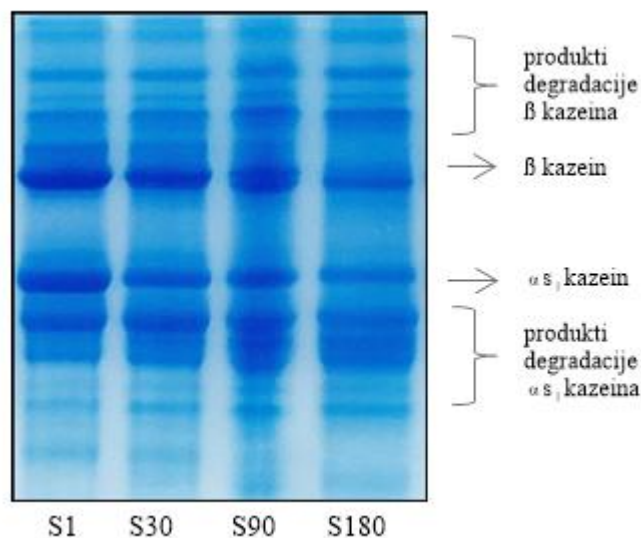
Urea PAGE elektroforegrami dobijeni tokom zrenja kačkavalja sa različitim sadržajem natrijum-hlorida su prikazani na slikama 21., 22. i 23., respektivno. Urea PAGE je sprovedena u cilju sagledavanja toka proteolitičkih promena tokom zrenja sireva. U različitim studijama je objašnjeno da je, u poređenju sa nativnim PAGE ili urea-PAGE metodama elektroforeze, SDS-PAGE metoda koja je više primenjiva za razdvajanje proteina mleka ili jogurta jer može istovremeno da odredi kazein i proteine surutke (Jansson i sar. 2019; Nurup i sar. 2020). Međutim, u cilju sagledavanja razgradnje proteina tokom zrenja sireva, više se primenjuje metoda urea-PAGE. Prilikom primene urea-PAGE elektroforeze, razdvajanje proteina se dešava na osnovu odnosa mase molekula i naelektrisanja. Pomoću ove metode se vrši razdvajanje i identifikacija frakcija proteina kazeina. Stoga, UREA-page elektroforeza je najpodesnija metoda u cilju frakcionisanja i identifikaciju proteina sira tokom zrenja (Sharma i sar. 2021).



Slika 21. Urea Page elektroforegram kontrolnog sira kačkavalj tokom 180 dana zrenja (K1, K30, K90 i K180)



Slika 22. Urea Page elektroforegram sira kačkavalj sa 30% zamjenjenim NaCl KCl-om tokom zrenja (M1, M30, M90 i M180)



Slika 23. Urea Page elektroforegram sira kačkavalj sa 30% smanjenim sadržajem NaCl tokom zrenja (S1, S30, S90 i S180)

Tokom zrenja sireva kačkavalj α_{s1} -I-kazein (f24–199) koji nastaje razgradnjom α_{s1} kazeina kao i produkti degradacije β -kazeina (koji se još navode i kao γ -kazeini) su prisutni od ranih faza što ukazuje na aktivnost himozina i plazmina još u toku proizvodnje i u početnim fazama zrenja (Sulejmani i Hayaloglu, 2016). Himozin koji se dodaje u cilju koagulacije mleka, primarno deluje na α_{s1} -kazein, dok se pomoću plazmina, nativnog enzima mleka, prevashodno hidrolizuje β -kazein (Hinz i sar., 2012).

Sagledavajući elektroforetske frakcije prikazane na slikama 21., 22. i 23. moglo se uočiti da ne postoje značajne kvalitativne razlike toka proteolize ispitanih sireva kačkavalja dobijenim uobičajenim postupkom soljenja, sira kačkavalj sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i sira kačkavalj sa delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom tokom zrenja. Tok razgradnje kazeina tokom zrenja je sličan kod sve tri ispitane varijante sireva kačkavalj. Stoga, može se primetiti da smanjenjem soli ili zamenom vrste soli tokom proizvodnje sira kačkavalj se ne utiče značajno na tok primarne proteolize. Takođe, može se primetiti razgradnja α_{s1} -kazeina, kao i β -kazeina, koje napreduju sa odmicanjem perioda zrenja sireva. Takođe, α_{s1} -kazein je ostao nerazgrađen do kraja zrenja, a njegova razgradnja je najintenzivnija u početnoj fazi zrenja, gde se primećuje značajno prisustvo α_{s1} -I-kazeina (f 24–199) koja predstavlja frakciju nastalu razgradnjom α_{s1} -kazeina.

Što se tiče β -kazeina, on je kao i α_{s1} -kazein, ostao delimično nerazgrađen do kraja zrenja, a njegova razgradnja tokom zrenja je bila u manjem obimu u odnosu na razgradnju α_{s1} -kazeina. Pored toga, mogu se primetiti i formirane proteinske frakcije sa niskom elektroforetskom pokretljivošću, koje odgovaraju produktima degradacije β -kazeina. Produkti degradacije β -kazeina se nalaze u prostoru iznad frakcije β -kazeina, dok se produkti degradacije α_{s1} -kazeina nalaze ispod frakcije α_{s1} -kazeina. Razgradnjom kazeina nastaju sledeći produkti: α_{s1} -kazein (f24–199), α_{s1} -kazein (f121–199), dok se razgradnjom β -kazeina formiraju frakcije β -kazein (f106–209), β -kazein (f29–209), i β -kazein (f108–209) (koji se još navode i kao γ_1 -, γ_2 -, i γ_3 -kazein, respektivno) (Hinz i sar., 2012). Pomenuti produkti β -kazeina još poznatiji kao γ -kazeini se mogu sagledati u gornjem delu na slikama 21., 22. i 23. U pogledu β -kazeina i njegovih produkata degradacije, značajne razlike između ispitanih varijanti sireva kačkavalj nisu ustanovljene.

Tabela 13. Kazeinske frakcije kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja (% ukupne površine trake)

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
α_1 kazein (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	23,53±0,04	23,29±0,06	23,54±0,41
30	b	18,30±0,22	18,26±0,32	18,29±0,03
90	c	17,57±0,12	17,43±0,35	17,68±0,10
180	d	16,59±0,08	16,58±0,05	16,20±0,25
β kazein (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	21,19±0,13	21,64±0,45	21,29±0,33
30	b	24,98±0,04	24,66±0,33	24,77±0,07
90	c	24,11±0,07	24,56±0,10	24,72±0,11
180	d	20,45±0,25	20,60±0,30	20,25±0,14
Produkti degradacije α_1 kazeina (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	25,34±0,31	25,25±0,23	25,14±0,09
30	b	30,12±0,08	30,51±0,42	30,28±0,34
90	b	30,59±0,17	30,67±0,11	30,27±0,20
180	c	33,29±0,17	33,10±0,09	33,55±0,13
Produkti degradacije β kazeina (%)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	29,94±0,28	29,83±0,44	30,03±0,35
30	b	26,60±0,13	26,58±0,39	26,66±0,28
90	c	27,73±0,19	27,34±0,17	27,33±0,20
180	a	29,67±0,45	29,72±0,60	30,01±0,18

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-d}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

Rezultati primenjene urea poliakrilamidne gel elektroforeze su prikazani u tabeli 13. Ovom metodom su ispitivane kazeinske frakcije tokom zrenja u cilju dobijanja profila proteolize kačkavalja sa različitim sadržajem soli. Sagledavajući udeo kazeinskih frakcija, kao i njihove produkte degradacije u tabeli 13., pokazalo se da ne postoje značajne statističke razlike ispitanih sireva kačkavalja dobijenim uobičajenim postupkom soljenja, sira kačkavalj sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i sira kačkavalj sa delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom tokom zrenja.

Udeo frakcija α_1 kazeina (%) svih ispitivanih uzoraka sira bio je u intervalu od 23,29% do 23,54% 1. dana zrenja, dok je 180. dana bio od 16,20% do 16,59%. Udeo frakcija β kazeina (%) svih uzoraka sira je bio u intervalu od 21,19% do 21,64% 1. dana zrenja, dok je 180. dana bio od 20,25% do 20,60%. Sagledavajući ove rezultate, možemo da zaključimo da je razgradnja α_1 -kazeina bila veća u odnosu na β -kazein tokom zrenja kod kačkavalja. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa Guinee i sar. (2015) koji su u svojoj studiji utvrdili da je tokom zrenja kačkavalja, koncentracija intaktnog β -kazeina bila znatno veća od koncentracije α_1 -kazeina. Hidroliza α_1 kazeina i β kazeina, što utiče na formiranje produkata degradacije, ukazuje na aktivnost i rezidualnog himozina i plazmina (Miocinović i sar., 2012).

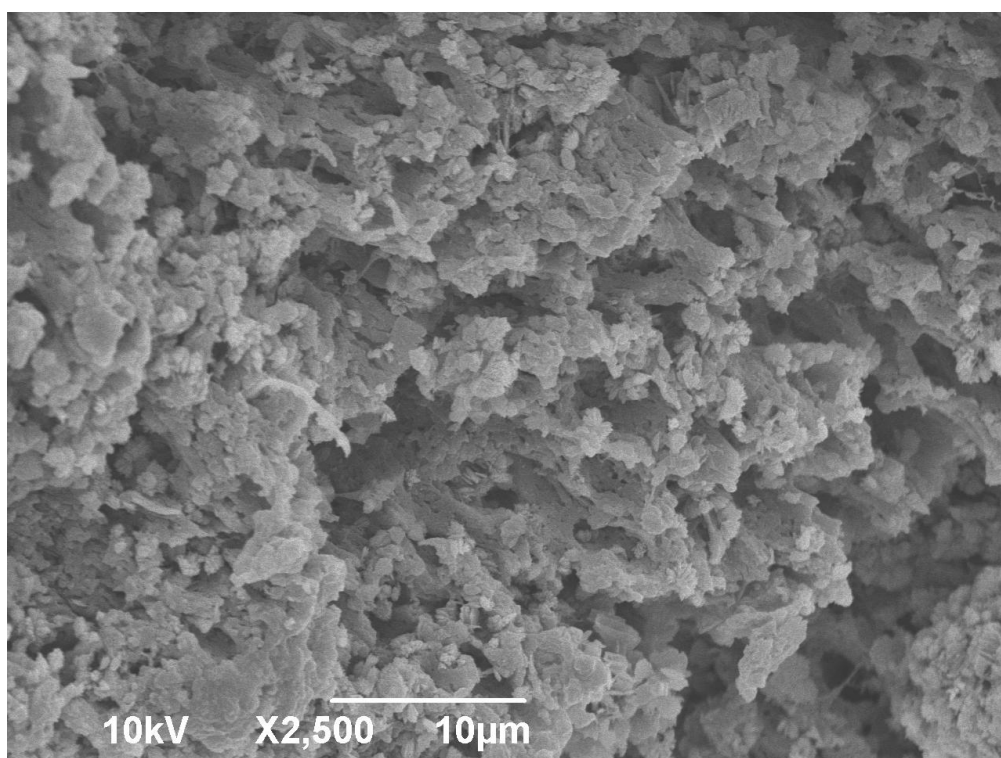
Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima različitih studija (McMahon, 2014; Katsiari i sar., 2001). Rezultati studije Fitzgerald i Buckley (1985) su pokazali da zamena do 50% KCl pomoću NaCl nije uticala na tok proteolize u siru čedar, kao i u studiji Reddy i Marth (1993) gde nisu pronađene značajne razlike u proteolizi sireva napravljenih sa različitim mešavinama NaCl i KCl. Takođe, zamena NaCl pomoću KCl nije imala značajan uticaj na tok zrenja mocarela sira analiziranog Urea Pag elektroforezom (Ayyash i Shah, 2011b). Takođe, funkcionalna svojstva sireva parenog testa, kao što je sir kačkavalj, zavise od obima primarne proteolize (Kindstedt i sar., 2010). Stoga, intenzivna proteoliza obično negativno utiče na rastegljivost i topivost sira kačkavalj (Topcu i sar., 2020).

Izostanak razlike u proteolitičkim promenama tokom zrenja sireva kačkavalja proizvedenih sa različitim sadržajem i vrstom soli ukazuju da ovaj parameter nije odlučujući za tok proteolize. Naime, kao što je napomenuto, agensi koji učestvuju u proteolitičkim promenama su brojni i obuhvataju himozin, plazmin i enzime, u ovom slučaju, nestarterske mikrobiote. Zaključci ovog istraživanja ukazuju da primenjeni sadržaj i vrsta soli nisu uticali značajno na aktivnost navedenih agenasa proteolitičkih promena i stoga nije ustanovljen njihov uticaj na tok zrenja.

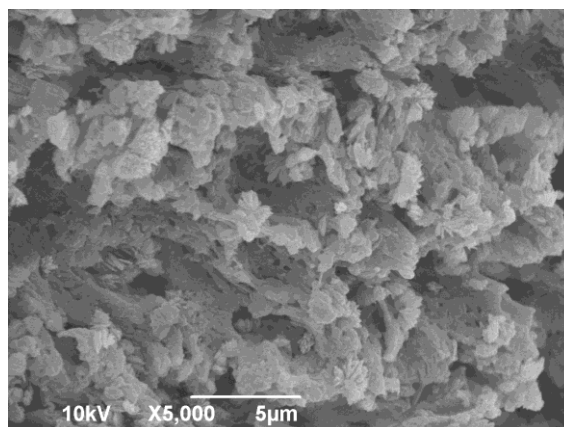
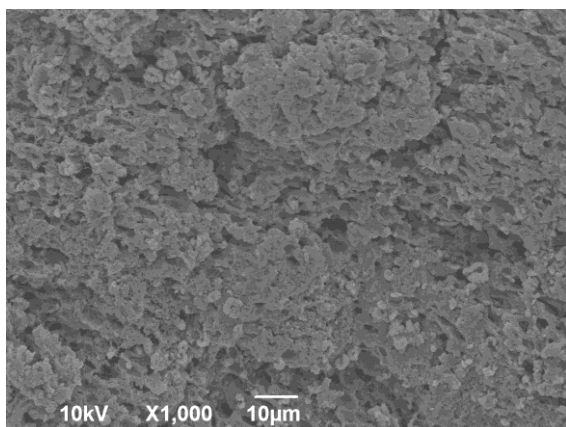
5.2.4. Mikrostruktura sirne grude i sireva

Analiza mikrostrukture sira je od velike važnosti i neophodna je kako bi se izvršila potpuna karakterizacija sira (Du Vale i Castelli, 2013).

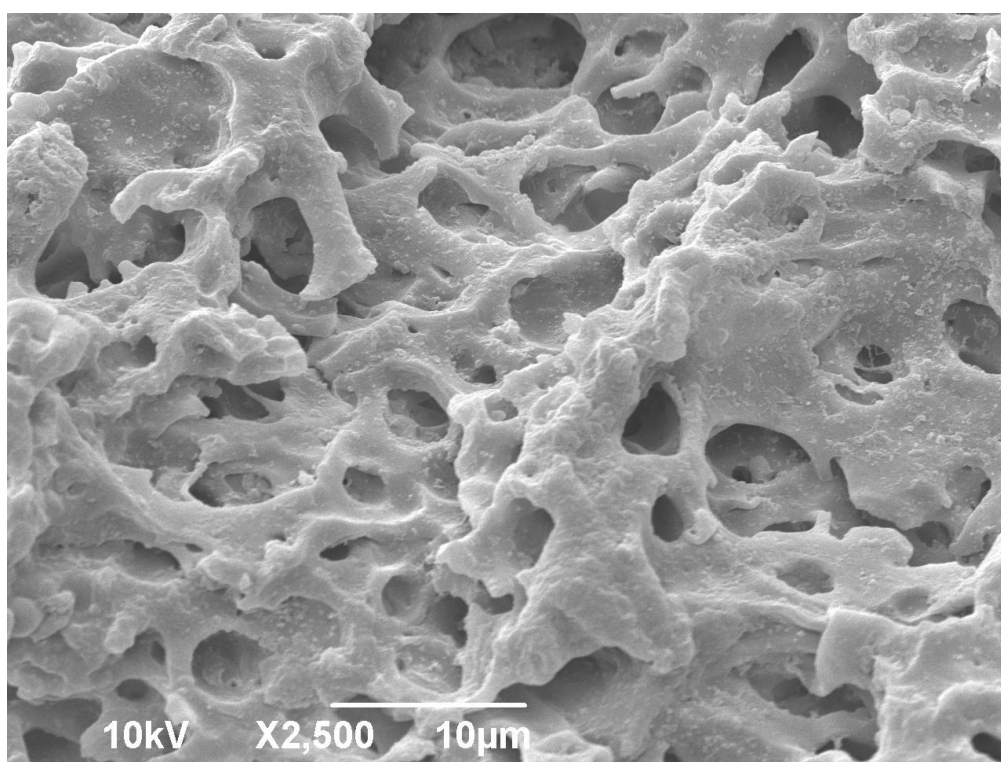
Mikrostruktura sirne grude kačkavalja sa različitim sadržajem natrijum-hlorida pre i nakon fermentacije, kao i nakon obrade (parenje, ručno mešenje i soljenje) pri različitim uvećanjima je prikazana na slikama 24 – 32.



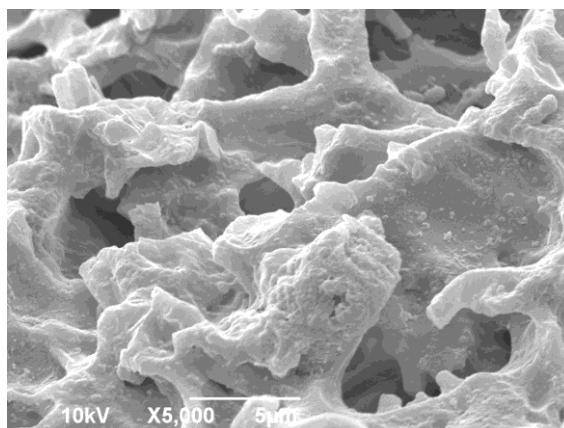
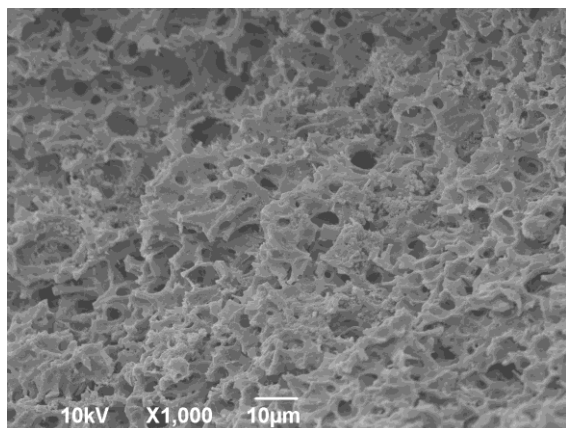
Slika 24. Prikaz mikrostrukture sirne grude kontrolnog kačkavalja pre fermentacije pri uvećanju od 2500x



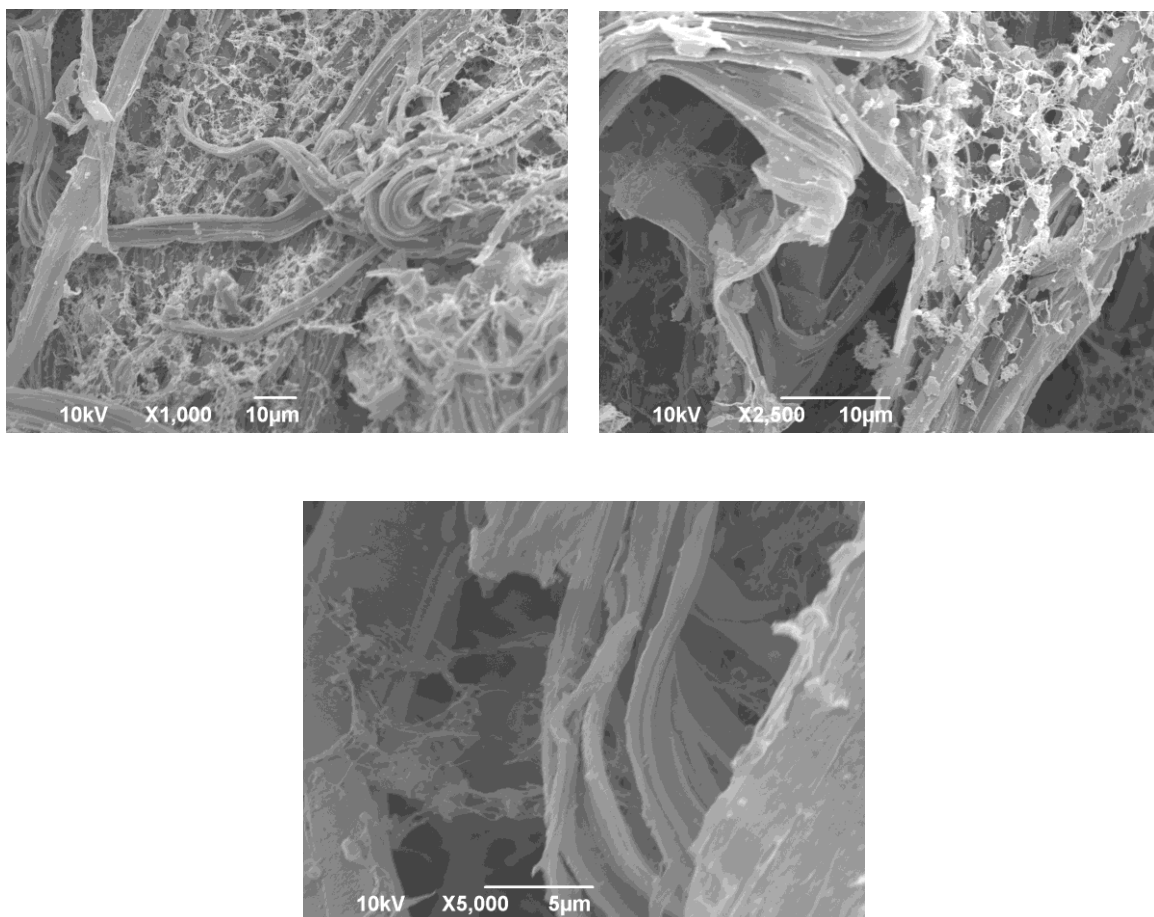
Slike 25. i 26. Prikaz mikrostrukture sirne grude kontrolnog kačkavalja pre fermentacije pri uvećanju od 1000x (levo) i 5000x (desno)



Slika 27. Prikaz mikrostrukture baskije (nakon fermentacije) pri uvećanju od 2500x



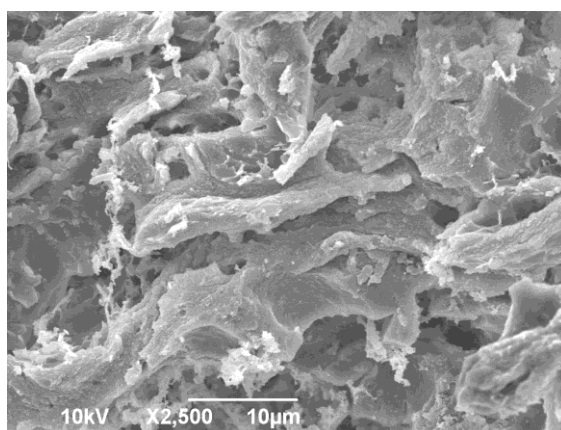
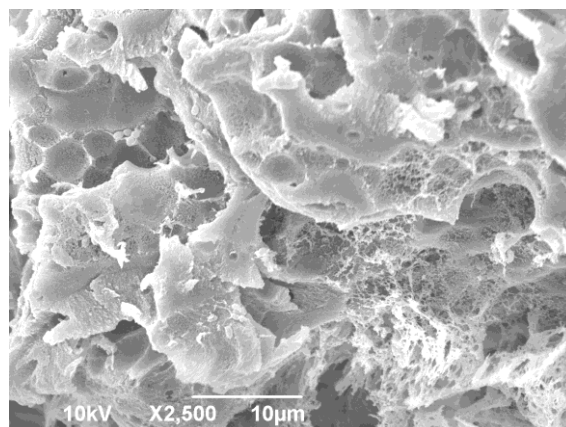
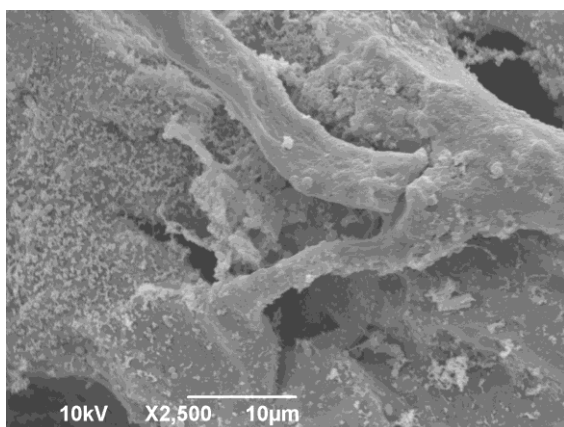
Slike 28. i 29. Prikaz mikrostrukture baskije (nakon fermentacije) pri uvećanju od 1000x (levo) i 5000x (desno)



Slike 30., 31. i 32. Prikaz mikrostrukture đubeka (nakon obrade – parenja, ručnog mešanja i soljenja) pri uvećanju od 1000x (gore levo), 2500x (gore desno) i 5000x (dole)

Možemo primetiti da se sirna gruda pre fermentacije sastoji od gustih i kompaktnih proteinskih lanaca, a nakon fermentacije, sirna gruda je predstavljena sa više rupa u proteinskom matriksu koje se pojavljuju kada je postignuta određena pH vrednost od 5,2. U tradicionalnoj proizvodnji se ta vrednost postiže kao rezultat aktivnosti autohtone mikrobiote. Specifičan proces termičke obrade i mešanja je glavna karakteristika proizvodnje sira kačkavalj (Satric i sar., 2023). Takođe, jedinstvena karakteristika sireva parenog testa je njihova mikrostruktura čije formiranje počinje tokom koagulacije, međutim proces parenja obezbeđuje specifičnu mikrostrukturu sireva parenog testa (Colin-Cruz i sar., 2012; Yu i Gunasekaran, 2005). Mikrostruktura grude nakon obrade, (đubek) koja podrazumeva sečenje, parenje u vrućoj vodi temperature 75 °C, ručno rastezanje i mešanje sa solju, je pokazala izdužena proteinska vlakna u rastegnutom siru sa dodatkom čestica soli.

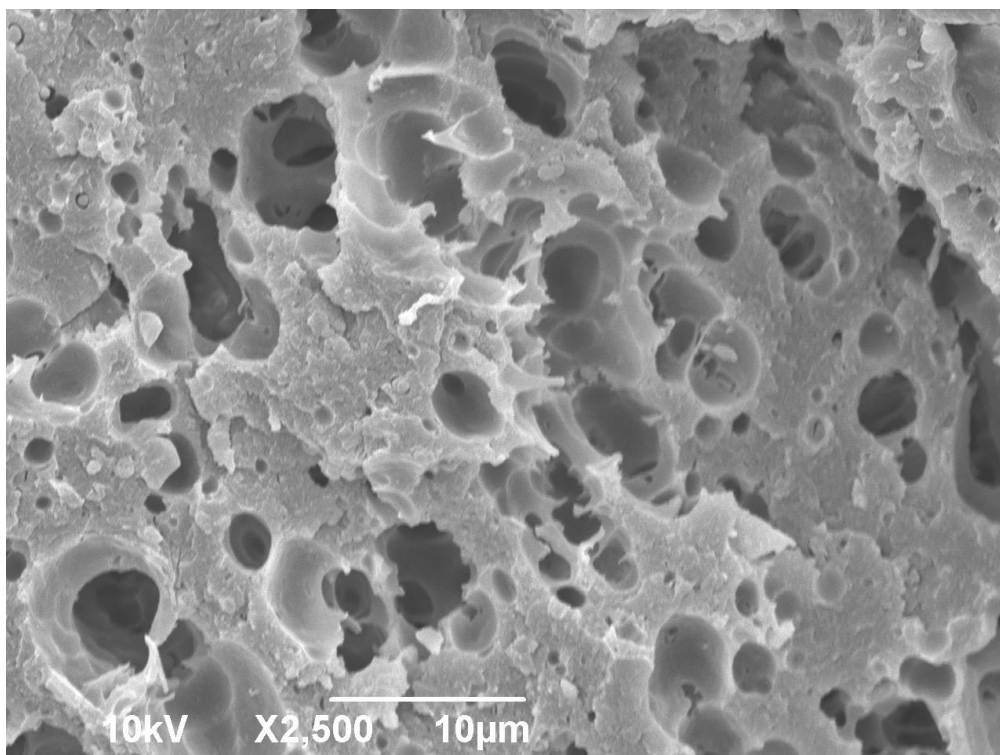
Formirani sirevi: kontrolni sir – K (gore levo), sir sa 30% NaCl zamenjenim KCl - M (gore desno) i sir sa 30% smanjenim NaCl - S (dole) pri uvećanju od 2500x tokom prvog dana zrenja prikazani su na slikama 33., 34. i 35. Mreža proteina je definisana ujednačenim agregatima (Miočinović i sar., 2012) i nije vidljiva značajna razlika između sireva napravljenih sa različitim sadržajem NaCl, što ukazuje da smanjenje i zamena soli nisu uticali na mikrostrukturu ispitivanu pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Slično dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji, meksički sir parenog testa pokazao je mikrostrukturu koju karakterišu relativno dugačke i tanke kazeinske niti koje su se prostirale duž pravca istezanja (Morales-Celaiaa i sar. 2012).



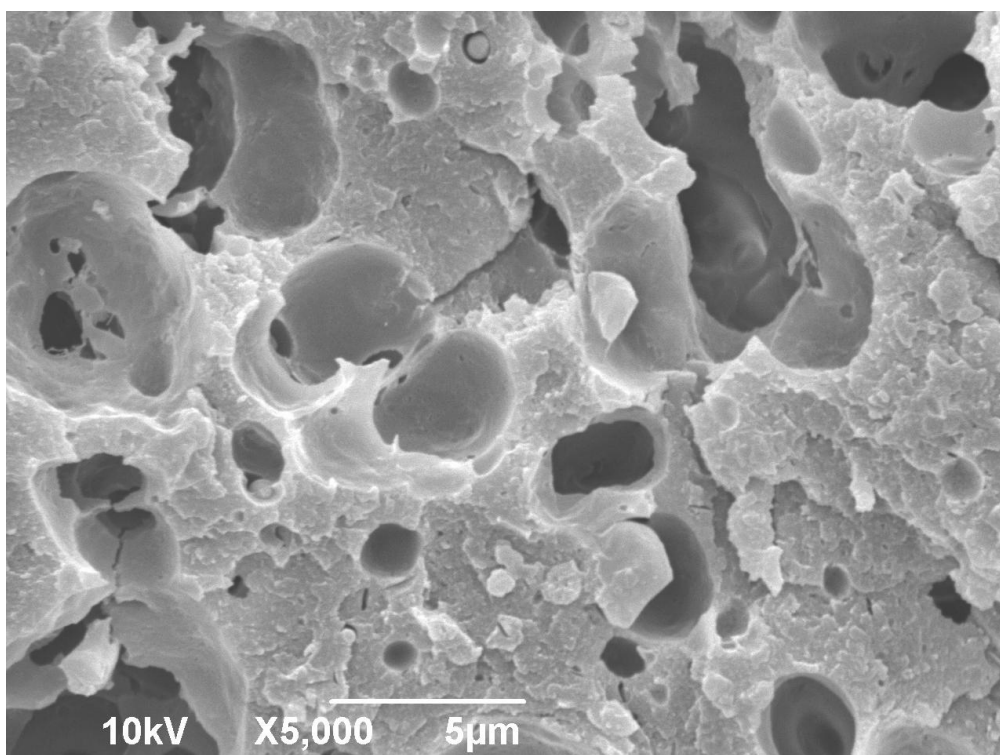
Slike 33., 34. i 35. Prikaz mikrostrukture tri varijante kačkavalja prvog dana zrenja: kontrolni sir – K (gore levo), sir sa 30 % NaCl zamenjenim KCl - M (gore desno) i sir sa 30% smanjenim NaCl - S (dole) pri uvećanju od 2500x

Mikrostruktura tokom zrenja je bila podložna promenama. Naime, tokom zrenja gustina proteinskog materijala se povećavala, kao i veličina i broj šupljina, što se moglo sagledati pri uvećanju od 2500x (Slika 36.) i uvećanju od 5000x (Slika 37.). Prikazane velike šupljine nastaju na mestima čvrstih masnih globula koje su uklopljene u proteinski matriks nakon hlađenja kačkavalja, dok neke šupljine u manjoj meri nastaju i zbog proizvodnje gasa usled zrenja od strane autohtonih mikroorganizama ili predstavljaju mesta vodene faze (Hannon i sar, 2006; Karimi i sar. 2009). Povećanje gustine proteinskog materijala tokom zrenja, kao i pojave šupljina su takođe uočene i u studijama Hasanzadeh i sar. (2018) i Madadlou i sar. (2007).

Mikrostruktura uzoraka sira parenog testa mocarele se sastojala od kontinuiranih lanaca proteinske faze sa zarobljenom masnom fazom (Pax i sar., 2021). Razvlačenje grude u vrućoj vodi daje posebne strukturne komponente siru mocarela, pri čemu se stvara mreža paralelno orijentisanih proteinska vlakna, dok su otvoreni kanali između proteinskih vlakana bili ispunjeni kapljicama vode i masti, a koji su eliminisani tokom pripreme uzorka (Joshi i sar., 2004; Ribero i sar., 2009). Tokom zrenja, promene u mikrostrukturi i funkcionalnosti sira mocarela mogu se pripisati ne samo razgradnji α S₁-kazeina i β -kazeina rezidualnim koagulantom i plazminom, već i povećanju hidratacije proteina (McMahon et al., 1999). Mikrostruktura kašar sira u studiji Dinkçi i sar. (2011) je pokazala otvoreni proteinski matriks koji je sadržao šupljine masnih globula različitih veličina i forme. Stoga, šupljine u proteinskom matriksu u najvećem delu označavaju prostore koje zauzimaju masne globule pre ekstrakcije prilikom pripreme uzoraka za analizu.



Slika 36. Prikaz mikrostrukture kontrolnog kačkavalja 30. dana zrenja – K pri uvećanju od 2500x



Slika 37. Prikaz mikrostrukture kontrolnog kačkavalja 30. dana zrenja – K pri uvećanju od 5000x

5.2.5. Mikrobiološka analiza sireva

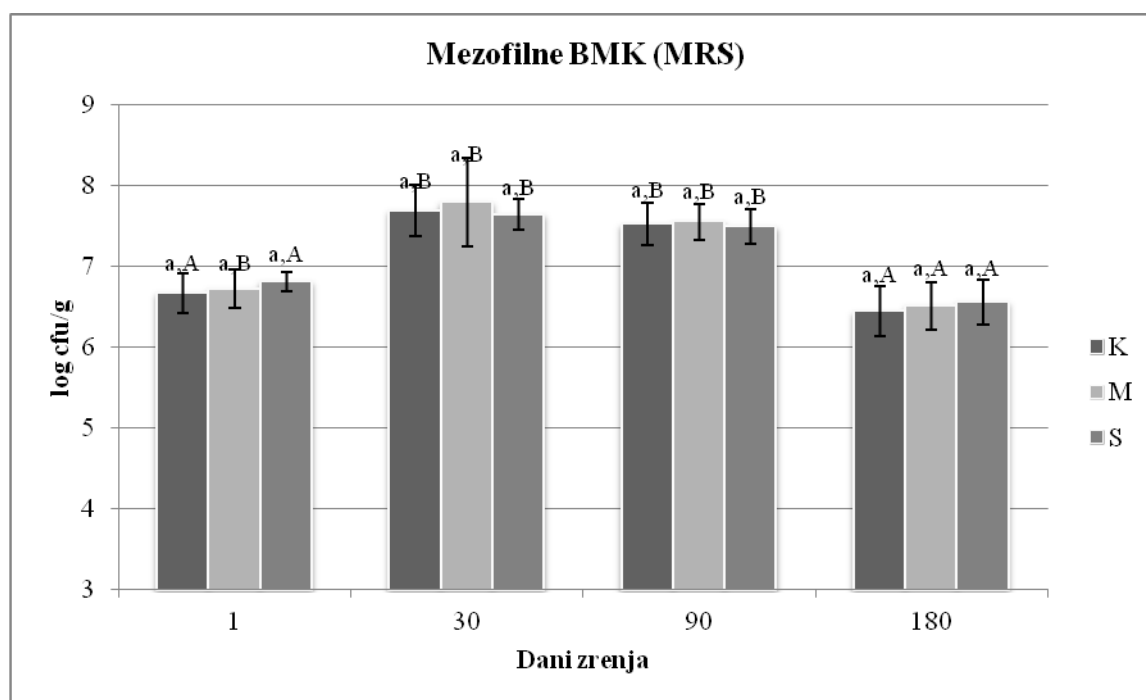
Promene broja mezofilnih i termofilnih bakterija mlečne kiseline u svim ispitivanim varijantama kačkavalja su prikazane u tabeli 14., a logaritam broja bakterija je prikazan na graficima 2., 3., 4. i 5.

Tabela 14. Promene broja mezofilnih i termofilnih BMK (log cfu/g) kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
Mezofilni BMK (laktobacili)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	6,67±0,25	6,72±0,24	6,81±0,12
30	b	7,69±0,31	7,79±0,55	7,64±0,19
90	b	7,52±0,26	7,55±0,22	7,49±0,22
180	a	6,44±0,31	6,51±0,29	6,56±0,28
Termofilne BMK (laktobacili)				
Značajnost*		a	b	ab
1	a	7,22±0,10	7,30±0,35	7,37±0,23
30	a	7,26±0,29	7,68±0,35	7,44±0,17
90	a	7,30±0,20	7,51±0,11	7,43±0,31
180	b	5,57±0,43	6,29±0,59	5,90±0,39
Mezofilne BMK (koke)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	6,85±0,12	7,07±0,19	7,22±0,23
30	b	7,84±0,80	7,85±0,26	7,86±0,14
90	b	7,73±0,27	7,57±0,34	7,55±0,51
180	c	6,54±0,23	6,62±0,26	6,71±0,24
Termofilne BMK (koke)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	7,28±0,17	7,41±0,14	7,66±0,22
30	a	7,86±0,30	7,47±0,58	7,81±0,31
90	a	7,98±0,40	7,53±0,48	7,57±0,48
180	b	5,99±0,48	6,01±0,31	6,21±0,42

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

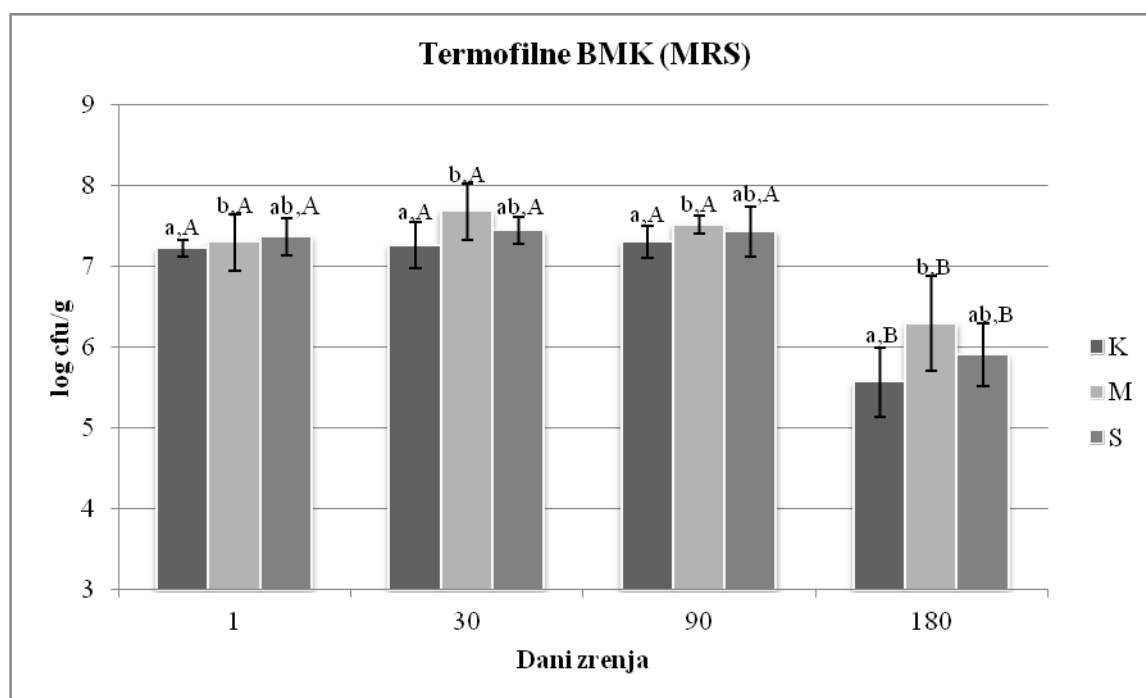
Različita slova (^{a-c}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05).



Različita mala slova (a-b) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

Različita velika slova (A-B) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stepena perioda zrenja.

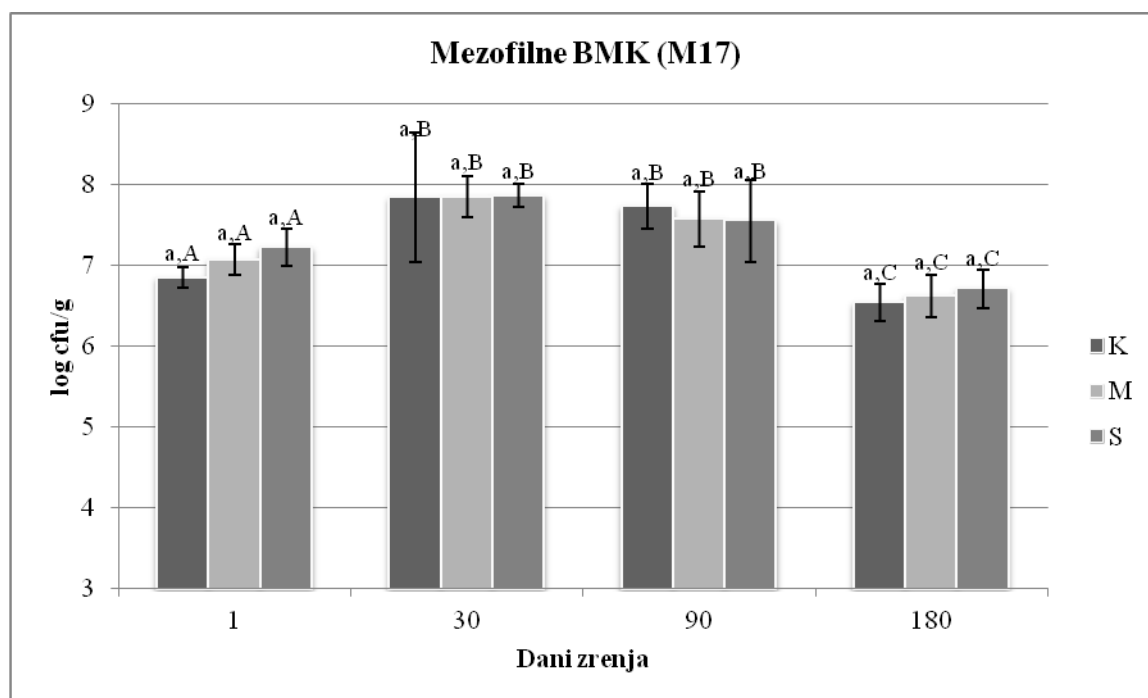
Grafik 2. Promene broja mezofilnih laktobacila kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja



Različita mala slova (a-b) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

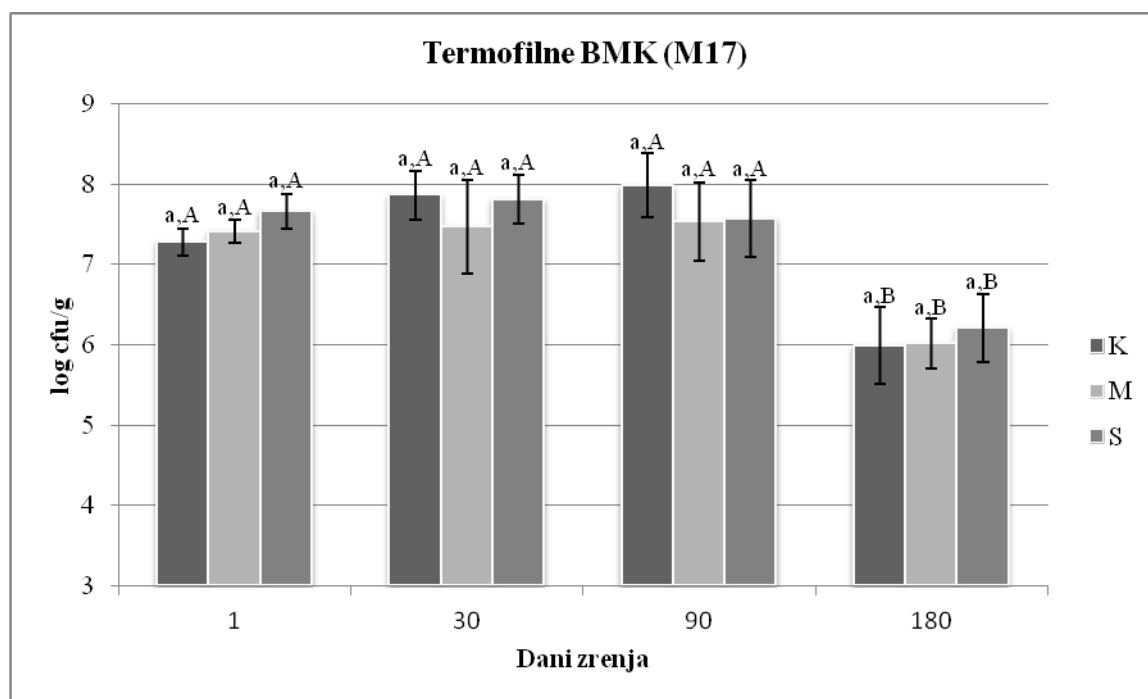
Različita velika slova (A-B) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stepena perioda zrenja.

Grafik 3. Promene broja termofilnih laktobacila kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja



Različita mala slova (a-b) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.
 Različita velika slova (A-C) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stepena perioda zrenja.

Grafik 4. Promene broja mezofilnih koka kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja



Različita mala slova (a-b) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.
 Različita velika slova (A-B) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stepena perioda zrenja.

Grafik 5. Promene broja termofilnih koka kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Promene broja BMK su pokazale povećanje broja bakterija kod svih sireva od 1. do 30. dana zrenja. Dalji trend promene broja BMK pokazuje da se od 30. do 90. dana broj održava na visokom nivou između 7 i 8 log jedinica. Tek u 180. danu u svim sirevima je utvrđen značajan pad broja BMK i kretao se oko 6 log jedinica. Statistički gledano, broj termofilnih vrsta se nije značajno razlikovao u prvih 90 dana, značajne razlike su utvrđene tek u 180. danu. Što se tiče mezofilnih bakterija, utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike, jer je broj prisutnih mezofilnih laktobacila i koka bio značajno veći u 30. i 90. danu, u odnosu na prvi i poslednji dan zrenja.

U 1. danu dominantnije su termofilne vrste i broj im je veći od 7 log jedinica, dok je kod mezofilnih zapaženo da je broj kod koka najniži i on je niži od 7 log, dok je kod mezofilnih laktobacila broj nešto veći i kreće se oko 7 log, zavisno od varijante sira. U 30. danu se broj termofilnih i mezofilnih vrsta izjednačava i takav ostaje i u 90. danu (7-8 log). U 180. danu odnos termofilnih i mezofilnih bakterija se menja i dominantnije su mezofilne bakterije (preko 6 log), dok kod termofilnih bakterija broj pada na 6 log jedinica za koke i na vrednosti 5-6 log za laktobacile, čije je prisustvo na kraju zrenja najniže.

Ovakva smena termofilnih i mezofilnih bakterija je i očekivana, imajući u vidu tehnološki postupak dobijanja sireva. S obzirom da su sirevi proizvedeni bez dodavanja starter kultura i da je parenje testa termički tretman od 72 – 75 °C, sama dominantnost termofilnih vrsta je bila očekivana. U kasnijim fazama zrenja, koje se odvijalo na nižim temperaturama 15 – 18 °C, jasno je da će dominantnost preuzeti mezofilne BMK.

Analizom statističke značajnosti između varijanti naših sireva, utvrđeno je da među proizvedenim varijantama sireva nema značajnih razlika u broju BMK, osim u broju termofilnih laktobacila, gde su uočene značajne razlike broja u sirevima sa delimično zamenjenim i smanjenim (M i S) sadržajem NaCl u odnosu na kontrolni sir, u 180. danu. Ovi podaci su potpuno razumljivi kada se ima u vidu da autohtonu mikrobiotu sačinjavaju uglavnom BMK, koje mogu podnositi mnogo ekstremnije uslove rasta kao što je sposobnost rasta pri 4%, pa čak i 6,5% soli (Radulović, 2010; Milosavljević, 2015). Milosavljević (2015) je pokazao porast termofilnih i mezofilnih koka kačkavalja do 30. dana i na nivou 7,2-7,3 log se održavao do kraja zrenja od 60 dana. U pogledu laktobacila detektovan je u početku blagi pad broja, ali svoj maksimum takođe dostižu u 30. danu i visok broj 7,0-7,4 log se održavao do kraja zrenja. Slično našim rezultatima, autor je takođe uočio period stagnacije broja BMK do kraja procesa zrenja do 60 dana, dok je u našim rezultatima utvrđeno da ta stagnacija može trajati i 90 dana. Slične podatke o promeni broja BMK u kačkavalju pokazali su Mijačević i sar (2005a), gde se ukupan broj BMK kretao u rasponu 5,6-8,3 log cfu/g.

Danilović i sar. (2020) su ispitivali mikrobiotu Pirotskog kačkavalja i detektovali smanjenje broja BMK u prvih 5 dana, a kasnije se broj povećavao i održavao na nivou oko 7 log jedinica. Takođe je utvrđeno da je broj termofilnih bakterija bio niži u odnosu na mezofilne naročito u kasnijim fazama zrenja, što je u skladu sa našim rezultatima. Broj laktobacila se smanjivao u prvih 20 dana postižući vrednost od 6 log jedinica, dok je maksimalan broj termofilnih i mezofilnih laktobacila utvrđen u 30. danu (7,7 log), posle čega se broj termofilnih laktobacila smanjivao.

Niro i sar. (2014) su ispitivali mikrobiotu kačkavalja dobijenog od različitih vrsta mleka (kravljeg, mešavine kravljeg i kozijeg i mešavine kravljeg i ovčijeg). Zapazili su da je broj mezofilnih i termofilnih BMK bio visok u samom startu, sa inicijalnim brojem 5-6 log cfu/g, sa tendencijom povećanja tokom zrenja. Naročito je primećeno povećanje broja mezofilnih bakterija, koji je dostigao nivo od 7 log cfu/g, dok su termofilne imale trend opadanja. Slično kao i u našim rezultatima, autori su ovu pojavu objasnili nižim temperaturama zrenja, koje su povoljnije za rast mezofilnih BMK. Samelis i sar. (2009) su pokazali da čak i niži termički

tretmani kao što je termizacija mleka na 60-67 °C za 30 sekundi izazivaju značajno smanjenje broja native mikrobiote BMK, kod tradicionalnog grčkog tvrdog sira.

Takođe, autori su pokazali da dominantnu mikrobiotu sačinjavaju termofilne koke i laktobacili. Simov i sar., (2006) su utvrdili da tokom proizvodnje kačkavalja, pri parenju testa na 72 °C tokom 2 minuta se može uništiti 91% starter kulture. Autori su pokazali da i pored primene visokih temperatura, u sirevima je započet proces zrenja sa visokim brojem starter bakterija, preko 8 cfu/g. U ovom istraživanju, iako nije korišćena starter kultura, dobijeni su slični podaci, da je pored visokog termičkog tretmana tokom parenja testa 72 – 75 °C, na početku detektovan visok broj prisutnih BMK (preko 7 log cfu/g). Pappa i sar. (2019) su ispitivali mikrobiotu kačkavalja dobijenog od sirovog i pasterezovanog mleka i pokazali da je porast bakterija mnogo izraženiji kod sireva dobijenih od sirovog mleka. Slično našim rezultatima, ovi autori su primetili da je broj i termofilnih i mezofilnih BMK prelazi nivo od 8 log u 30. danu zrenja, a da do 180. dana broj značajno opada.

Za razliku od ovih autora, Balabanov i sar. (2023) su pokazali da startni broj BMK kod proizvodnje kačkavalja sa različitim sadržajem NaCl (0,7%, 1,5% i 3,1%) se kretao oko 4 log cfu/g. Broj BMK se naglo povećavao do 30. dana zrenja i do kraja (45. dana) je padao. Takođe, autori su pokazali da je porast BMK bio delimično inhibiran u uzorcima sireva sa većim sadržajem NaCl. Maksimalne vrednosti su postignute u 30. danu i iznosile 3,4 cfu/g u siru sa 3,1% NaCl, 4,6 log cfu/g u siru sa 1,5% NaCl i 5,0 log cfu/g u siru sa 0,7% NaCl. Veći broj BMK u sirevima sa manjim sadržajem soli je objašnjen postepenijom promenom pH vrednosti. Autori su zaključili da koncentracija soli ima važan uticaj na broj prisutnih BMK, a samim tim i na biohemijske procese tokom zrenja sireva. Slične podatke su pokazali i Felicio i sar. (2016) u proizvodnji Minas sira gde je natrijumova so bila delimično zamenjena kalijumovom (25% i 50%). Ivanova i sar. (2021a) su pokazali da rast autohtonih bakterija u kačkavalju zavisi i od različitih temperatura zrenja, što se objašnjava postepenom fermentacijom i nešto višim pH vrednostima.

Silva i sar. (2019) su ispitivali mikrobiološki profil kod Beyaz, Kasar i Tulum sireva. Iako su utvrdili da je dominantna mikrobiota pripadala bakterijama mlečne kiseline, autori su ukazali na značajne razlike u broju bakterija pojedinih varijanti. Naime, broj BMK koje su detektovali na MRS i M17 agaru je bio viši kod Tulum sira, zatim kod Beyaz i Kasar sira. Autori su ove razlike objasnili time što je Tulum sir dobijen iz sirovog mleka, dok je Kasar sir, iako dobijen takođe iz sirovog mleka, tokom procesa proizvodnje podvrgnut tretmanu parenja na 72 °C tokom 1-2 minuta, koji je doprineo smanjenju broja preživelih bakterija.

Slične rezultate su pokazali i Samelis i sar. (2019) koji su utvrdili da je broj termofilnih koka kačkavalj sira neposredno nakon proizvodnje bio 7,17 log cfu/g, a broj mezofilnih koka 7,19 log cfu/g. U skladu sa dobijenim rezultatima, Dugat-Bony i sar. (2019) su definisali da ne postoje statistički značajne razlike između kontrolnog uzorka polutvrdog sira i uzoraka sira sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida (20%), kao i zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom (20%) tokom perioda zrenja od 21 dan. Takođe, Porcellato i sar. (2014) su utvrdili da sadržaj soli nije značajno uticao na bakterijski profil sira čedar kada su u pitanju nestarter BMK. Drugim rečima, dobijeni rezultati koji su u skladu sa literaturom su pokazali da smanjenje i supstitucija sadržaja soli nisu uticali na mikrobiotu tokom perioda zrenja.

5.2.6. Teksturalna svojstva sireva

Tekstura je atribut kvaliteta koji je usko povezan sa strukturnim i mehaničkim svojstvima prehrambenog proizvoda, koja determinišu percepciju potrošača (Lu i Abbott 2004). Proteoliza tokom zrenja igra vitalnu ulogu u formiranju teksture, kao i ostalim senzornim atributima sira. Biohemijski procesi koji se dešavaju tokom zrenja sira u velikoj meri utiču na parametre teksture, što se utvrdilo instrumentalnom i senzornom analizom (Andronoiu i sar., 2015). Primarna svojstva teksture su tvrdoća, elastičnost i kohezivnost, dok žvkljivost pripada sekundarnim svojstvima. Rezultati ove disertacije su takođe pokazali da zrenje sira značajno utiče na parametre teksture (Tabela 15.).

Statistički značajna razlika na nivou značajnosti $p=0,05$ nije postojala između kontrolne varijante i varijati sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i sa zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom između parametara teksture: tvrdoća, elastičnost, kohezivnost i žvkljivost. Dakle, rezultati su pokazali da smanjenje natrijum-hlorida (30%) i zamena natrijum-hlorida kalijum-hloridom (30%) nisu imali značajnog efekta u pogledu parametara teksture tokom 180 dana zrenja sira kačkavalj. Takođe, u literaturi se navodi da je zamena natrijum-hlorida kalijum-hloridom u odnosu 50:50% ne utiče na promenu teksture sira (Cruz i sar., 2011; Farkye i Guinee, 2017; Miocinovic i sar., 2022). Takođe, TPA analiza je pokazala da nije bilo značajnih razlika u tvrdoći, kohezivnosti i žvkljivosti kod mocarela sira sa zamenjenim sadržajem NaCl KCl-om (Ayyash i sar., 2013). U studiji Chevanan i sar. (2006) su rezultati tvrdoće čedar sira, praćeni tokom zrenja, pokazali da je u periodu od 4 do 6 meseci tvrdoća rasla, nakon čega je nastupio period omekšavanja, odnosno smanjenja tvrdoće. Takođe, različite studije su pokazale trend smanjenja tvrdoće sira mocarela (Ozsunar, 2010; Smith, 2013). Yun i sar. (1993) su utvrdili smanjenje tvrdoće u siru mocarela nakon 50 dana. Rezultati disertacije su pokazali sličan trend, s tim što je smanjenje vrednosti tvrdoće ispitanih varijanti kačkavalja primećeno u 90. danu zrenja. Takođe, rezultati su pokazali da je tokom zrenja primećeno značajno smanjenje elastičnosti svih ispitivanih varijanti kačkavalja. Slično ovim rezultatima, u studiji Zhao i sar. (2019) je utvrđeno smanjenje elastičnosti čedar sira tokom 90 dana zrenja.

U skladu sa dobijenim rezultatima, ispitivanje kašar sira u studiji Yalcin i sar. (2021) je pokazalo da su se vrednosti tvrdoće kašar sira kretale od 1423,85 g do 2128,15 g tokom 60 dana zrenja sira. Takođe, rezultati u studijama su pokazali da elastičnost sira kašar generalno opada tokom odmicanja zrenja sira (Yalcin i sar., 2021; Topcu i sar., 2020), što se takođe može uočiti i u prikazanim rezultatima ove disertacije (Tabela 15.).

Kada je žvkljivost u pitanju, kod sve tri ispitane varijante sira kačkavalj možemo primetiti pad vrednosti tokom zrenja, naročito od 90. dana zrenja sira. Razlog ovom padu vrednosti jesu proteolitičke promene koje su značajno uticale na razgradnju α_{s1} -kazeina, što se može sagledati na elektroforegramima (Slika 21., 22. i 23.) i udela kazeinskih frakcija (Tabela 13). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Miocinovic i sar. (2022). Takođe, ovakve rezultate uzrokuje proteolitička aktivnost bakterija mlečne kiseline koja razgrađuje proteine do peptida, a zatim i peptida malih molekulskih masa i aminokiselina. Međutim, između 1. i 30. dana nema statistički značajnih razlika ($p>0.05$), kao i između 90. i 180. dana, što je u skladu sa rezultatima dobijenih u studiji Yalcin i sar. (2021) u kojoj nema značajnih promena tokom 60 dana zrenja sira kašar.

Tabela 15. Profil teksture kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
Tvrdoća (g)				
Značajnost*		a	a	a
1	a	2369,18±179,21	2110,27±182,24	2054,81±169,42
30	b	2554,55±245,24	2565,50±351,68	2385,84±182,58
90	c	1410,79±136,62	1207,45±153,91	1414,33±149,23
180	d	2232,97±289,93	2392,78±333,74	2468,12±222,81
Elastičnost				
Značajnost*		a	a	a
1	a	0,59±0,09	0,59±0,07	0,60±0,05
30	ab	0,47±0,08	0,42±0,06	0,63±0,50
90	b	0,50±0,13	0,47±0,07	0,42±0,11
180	c	0,36±0,12	0,36±0,10	0,32±0,03
Kohezivnost				
Značajnost*		a	a	a
1	ab	0,23±0,05	0,23±0,04	0,22±0,04
30	a	0,22±0,03	0,24±0,04	0,26±0,05
90	ab	0,23±0,02	0,26±0,04	0,22±0,02
180	b	0,21±0,03	0,22±0,07	0,22±0,02
Žvkljivost				
Značajnost*		a	a	a
1	a	321,38±108,66	281,02±67,40	267,21±64,74
30	a	263,16±64,36	257,51±66,23	304,80±77,60
90	b	164,94±54,73	151,02±56,82	132,17±40,86
180	b	177,64±90,88	202,67±122,48	173,68±25,69

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-d}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

5.2.7. Trodimenzionalno skeniranje sireva

Tokom optimizacije uslova za izvođenje 3D skeniranja, moglo se zapaziti da je efikasnije i bolje sprovesti skeniranje kada su svetla isključena i kada je pozadina tamna, tako da postoji jasniji kontrast između uzorka i pozadine (Cozier i sar., 2019). Osim toga, bilo je potrebno obratiti posebnu pažnju da uzorak koji je skeniran nije imao hrapavost površine ili materiju koja bi potencijalno mogla da utiče i dobijene rezultate. Neophodno je očistiti i pregledati uzorak pre 3D skeniranja kako bi se dobili precizniji podaci.

Tabela 16. 3D skeniranje smanjenja zapremine kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Smanjenje zapremine (%)				
Dani zrenja	Značajnost*	K	S	M
Značajnost*		a	b	b
30	a	9,36±0,24	8,44±0,07	8,81±0,08
90	b	10,05±0,06	9,51±0,05	9,56±0,30
180	c	10,98±0,26	10,48±0,14	10,54±0,16

Smanjenje zapremine sira je prikazano kao procenat (%) u odnosu na zapreminu sira 1. dana zrenja.

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-c}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 38. 3D skenirani model sira kačkavalj tokom 90 dana zrenja

Poznato je da je zrenje sira jedan od najvažnijih procesa tokom proizvodnje sira, jer značajno utiče na ukus i teksturu (Corrigan i sar., 2021; Licitra i sar, 2017). Međutim, do gubitka zapremine i mase sira najčešće dolazi tokom zrenja usled fizičko-hemijskih i bioloških promena. Faktori koji su često odgovorni za ove gubitke su: temperatura, relativna vlažnost, evaporacija, proizvodnja ugljen-dioksida, mikrobiota i sastav gasa (Helias i Bernard, 2007; Liu i Puri, 2008). Kada je reč o smanjenju zapremine tokom zrenja sira kod svih ispitanih uzoraka kačkavalja, rezultati su pokazali značajnu razliku ($p < 0,05$) između kontrolne i druge dve varijante (M i S) kao što je prikazano u tabeli 16. Štaviše, procenat smanjenja zapremine se povećavao tokom 30, 90 i 180 dana zrenja. Obe varijante sira kačkavalj (M i S) su tokom zrenja pokazale manje smanjenje zapremine u odnosu na kontrolnu varijantu sira kačkavalj. Ovo treba naglasiti, jer ne samo da M i S imaju veće zdravstvene benefite u odnosu na kontrolnu varijantu zbog smanjenja sadržaja NaCl, već su pokazali i manji gubitak zapremine sira u poređenju sa kontrolom.

Kvalitet finalnog proizvoda određuju faktori koji utiču na sinerezis koji se odnosi na proces izdvajanja surutke tokom proizvodnje sireva. Tokom proizvodnje sira, soljenje grude je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na sinerezis i koji dovodi do smanjenja sadržaja vlage. Međutim, u poređenju sa sirevima proizvedenim sa uobičajenim dodatkom soli, sirevi sa smanjenim sadržajem soli (33%) ispoljavaju manji sinerezis i imaju veći sadržaj vode (Lu i McMahon 2015). Soljenje u visokoj koncentraciji utiče na smanjenje rastvorljivosti proteina, što inicira kontrakciju i dehidraciju proteinskog matriksa sirne grude, što potencijalno dovodi do manje zapremine sira. Nasuprot tome, soljenje pri niskoj koncentraciji povećava rastvorljivost proteina i dovodi do ekspanzije proteinskog matriksa. Pored toga, tokom zrenja dolazi do gubitka zapremine usled evaporacije vode. Varijante sira M i S su izgubile znatno manje vode od kontrolne varijante, što se može pripisati njihovoj sposobnosti da efikasno zadržavaju vodu. Čini

se da ove varijante zadržavaju inkorporiranu vodu u dovoljnoj meri što doprinosi nižem gubitku zapremine sira tokom zrenja.

Jedan od glavnih deskriptora oblika uzorka je zapremina, međutim, metode koje se koriste za dobijanje direktnih merenja uzorka su često zamorne, nedosledne i destruktivne (Villordon i sar., 2020). 3D skeniranje je nedestruktivna, brza i precizna metoda koja se koristi za dobijanje deskripcije oblika (Slika 38.) i samim tim predstavlja odličnu alternativu drugim metodama. Nedavne studije su istraživale korišćenje 3D skeniranja kao novog alata koji se može primeniti u oblasti prerade hrane (Simunović i sar., 2022; Tomašević i sar., 2021; Vang, 2021; Zang, 2020;). Posebna mogućnost primene 3D skenera mogla bi biti u svrsi istraživanja analize gubitka zapremine sira koji nastaje usled uticaja različitih faktora. To može dovesti do sticanja novih znanja o optimalnim uslovima proizvodnje sira, kao i do dobijanja preciznijih podataka. Takođe, može imati značajan doprinos u rešavanju jednog od najvećih izazova proizvođača, a to je održavanje visokog i konstantnog kvaliteta proizvoda i smanjenje gubitaka (Djekić i sar., 2023). Broj studija o modelovanju sira i proceni gubitaka u periodu zrenja je ograničen. Ovo može biti zbog fizičko-hemijske i biološke složenosti koja se javlja tokom zrenja sira i velikog broja faktora koje treba uzeti u obzir. Ova doktorska disertacija ističe da primena 3D skenera u proizvodnji hrane može dovesti do razvoja neinvazivnih metoda za poboljšani i održivi kvalitet proizvoda.

5.2.8. Boja sireva

Instrumentalni analizatori boje koji se često koriste su Minolta chroma meter i kolorimetar Hunter Lab. Međutim, poteškoće u vezi sa ovim kolorimetrima je u tome što površina mora biti ujednačena i prilično mala (otprilike 2–5 cm²) kako bi merenje moglo da bude izvršeno (Tomašević i sar. 2019a). Takođe, utvrđeno je da korišćenjem istog kolorimetra na istoj lokaciji nehomogenog medijuma dovodi do malih devijacija pri očitavanju boja (L*, a* i b*) tokom ponavljanja (Tomašević i sar. 2019b). Nasuprot ovome, Tomašević i sar. (2019a, 2019b) su pokazali da je CVS analiza preciznija i pouzdanija metoda za merenje boje u poređenju sa tradicionalnim kolorimetrom, ne samo za uniformne površine, ali posebno za nehomogene i višebojne površine. Štaviše, CVS je nova metoda koja služi za procenu i merenje boje hrane brzo i neinvazivno (Tomašević i sar. 2019a).

L* parametar je indikator luminiscencije - stepena svetlosti od crne (0) do bele (100) ispitanih sireva kačkavalj. Parametar a* predstavlja opseg boja sireva od crvene (+) do zelene (-), a b* parametar predstavlja opseg boja od žute (+) do plave (-). Analiza varijanse nije pokazala značajnu razliku ($p > 0,05$) među analiziranim varijantama sireva kačkavalj (kontrola, M i S) u odnosu na L*, a* i b* vrednosti u svim vremenskim presecima kada su proizvodi uzorkovani tokom zrenja (Tabela 17.). Ovi rezultati su u skladu sa Lucan i sar. (2020) koji su utvrdili da smanjenje soli, kao i zamena soli, ne utiču značajno na boju. Pored toga, Chavhan i sar. (2015) utvrdili su da nema značajne razlike u boji kod ispitivanog mocarela sira sa niskim sadržajem natrijuma, kao i studiji Khetra i sar. (2019) koji su ukazali da nema značajne razlike u boji čedar sira sa niskim sadržajem natrijuma. Ovo dalje implicira da smanjenje sadržaja soli (za 30%) i zamena NaCl KCl-om (za 30%) u siru kačkavalj ne utiče značajno na boju u finalnim proizvodima.

Tabela 17. Parametri boje (L^* , a^* , b^*) kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Dani zrenja	Značajnost*	K	M	S
L^* vrednost				
Značajnost*		a	a	a
1	a	92,33±0.49	92,87±0,64	92,67±0,49
30	b	91,93±0.59	92,20±0,56	91,40±0,51
90	b	91,73±0.70	91,87±0,74	91,87±0,74
180	c	90,87±0.64	90,40±0,74	90,73±0,46
a^* vrednost				
Značajnost*		a	a	a
1	a	0,20±0.41	0,07±0,46	0,20±0,41
30	a	0,20±0.41	0,07±0,46	0,07±0,46
90	a	0,27±0.46	0,13±0,52	0,07±0,46
180	b	0,47±0.52	0,53±0,52	0,60±0,51
b^* vrednost				
Značajnost*		a	a	a
1	a	11,40±0.99	11,47±0,99	12,13±0,64
30	b	13,60±0.91	13,53±0,83	14,13±0,74
90	c	16,33±1.05	16,33±0,90	16,67±0,90
180	d	18,53±1.06	18,53±1,06	18,40±0,99

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija.

Različita slova (^{a-d}) u istoj koloni ili redu ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

Međutim, postojale su značajne razlike u parametru L^* , a^* i b^* kod varijanti sira kačkavalj tokom 180 dana zrenja ($p < 0,05$). Prema rezultatima iz tabele 17. možemo da primetimo smanjenje vrednosti L^* i povećanje vrednosti a^* i b^* tokom perioda zrenja, što je u skladu sa studijom Rohma i Jarosa (1996). Takođe, značajne razlike u vrednostima b^* mogu se primetiti kako zrenje sira odmiče tokom svih ispitivanih perioda: 1, 30, 90 i 180 dana zrenja. Ove razlike i povećanje vrednosti b^* tokom zrenja mogu se objasniti smanjenjem sadržaja vode tokom zrenja (Olson i sar., 2007). U skladu sa dobijenim rezultatima, Eroglu i sar. (2015) utvrdili su a^* i b^* parametre kašar sira koji su bili u rasponu od -1,19 do 1,18 i od 7,04 do 21,44, respektivno.

5.2.9. Bioaktivnost sireva

U ovom delu ispitan je efekat smanjenja natrijum-hlorida i zamene natrijum-hlorida kalijum-hloridom kačkavalja na bioaktivnost sireva, odnosno ispitana je antimikrobna, antioksidativna i angiotenzin-konvertujući enzim inhibitorna aktivnost tokom zrenja.

5.2.9.1. Antimikrobna aktivnost sireva

Rezultati antimikrobne aktivnosti vodenog proteinskog ekstrakta ispitivanih varijanti sireva je prikazan u tabeli 18.

Tabela 18. Antimikrobna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Bakterijski soj	MIC mg/ml	K 30	M 30	S 30	K 180	M 180	S 180
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	-	+	-	+	+
	25	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella sonneri</i> ATCC 29950	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	25	-	-	+	-	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729	100	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+
	25	-	-	+	-	+	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	100	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	25	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+
	25	-	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	25	-	-	+	-	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29219	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	-	+	+
	25	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	100	+	+	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	+	+
	25	-	-	-	-	-	-

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

U 30. danu zrenja, najbolja antimikrobnost je utvrđena u varijanti sireva sa smanjenim sadržajem soli (S), zatim kod sireva sa zamenom dela natrijumove soli kalijumovom (M), dok je u kontrolnoj varijanti K, zapažena najmanja antimikrobna aktivnost. Najbolja antimikrobnost je postignuta kod S sireva, u odnosu na 4 bakterije: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kao i kvasca *Candida albicans* ATCC 10231, što je postignuto sa najnižim koncentracijama od 25 mg/ml proteinskog ekstrakta. Za inhibitornu aktivnost prema *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* ATCC 29950, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, bila je neophodna minimalna koncentracija od 50 mg/ml, jedino je za inhibiciju *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 bila neophodna najveća koncentracija od 100 mg/ml.

Rezultati ispitanih M sireva su pokazali da je najmanja koncentracija bila dovoljna da se inhibira samo *Bacillus spizizenii*, za inhibiciju *E. coli* i *S. enteritidis* bila je potrebna najviša koncentracija, a za sve ostale bakterije, minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 50 mg/ml. Što se tiče kontrolnog sira, utvrđeno je da koncentracija od 25 mg/ml nije bila dovoljna za inhibiciju nijedne bakterije, a da je koncentracija od 50 mg/ml inhibirala 3 vrste bakterija i jedan kvasac (*P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus* i *C. albicans*), a za ostalih 6 vrsta je bila neophodna najveća koncentracija od 100 mg/ml.

U 180. danu, antimikrobna aktivnost se povećala kod svih varijanti sireva u odnosu na 30. dan, pri čemu su i dalje najbolji rezultati bili kod S sira, zatim kod M sira, dok je kod kontrolnog sira antimikrobnost bila najmanje izražena. Na kraju se pokazalo da je MIC od 25 mg/ml kod S sira bila dovoljna da inhibira sve bakterije i kvasac, osim *S. enteritidis*, za koju je MIC iznosila 50 mg/ml. Vrednosti MIC za sir M u 180. danu su bile skoro identične kao za sir S u 30. danu, gde je za 5 bakterijskih vrsta bila potrebna koncentracija od 25 mg/ml, a za ostalih 5, MIC je iznosila 50 mg/ml. U kontrolnom siru je antimikrobnost i dalje bila najslabije izražena, mada je bolja u odnosu na 30. dan. Minimalna inhibitorna koncentracija je bila 50 mg/ml za 7 testiranih bakterija, a za tri bakterije (*E. coli*, *E. faecalis* i *S. enteritidis*) MIC je i dalje iznosila 100 mg/ml.

Ovakvi rezultati su i očekivani, imajući u vidu da je broj prisutnih BMK već u 30. danu bio veoma visok i da se na tom nivou održao i u 30. danu. Prisutna mikrobiota je u velikoj meri doprinela nastanku bioaktivnih peptida koji su ispoljili antimikrobni efekat 30. dana zrenja. Iako je broj prisutnih BMK padao do 180. dana, njihov broj je i dalje bio na visokom nivou od 5-7 log cfu/g, što je rezultiralo još boljom antimikrobnom aktivnošću 180. dana. Pad broja prisutnih bakterija od 30. do 180. dana se objašnjava njihovim odumiranjem, pri čemu su se iz liziranih ćelija oslobađali intracelularni enzimi, koji su doprinosili daljoj razgradnji većih peptida do manjih, doprinoseći formiranju i onih bioaktivnih koji pokazuju antimikrobnost. Može se pretpostaviti da u kasnijim fazama zrenja ne postoji direktna zavisnost između broja živih ćelija BMK i antimikrobne aktivnosti, jer važnu ulogu imaju prisutni enzimi. Za povećanje antimikrobne aktivnosti je potrebno vreme, u našem slučaju od 30 do 180 dana, pri čemu je pad broja prisutnih živih ćelija logična posledica.

U istraživanjima različitih autora je utvrđeno da na formiranje antimikrobnih peptida utiče i vrsta mleka, koja se koristi za proizvodnju sira. Tako su Silva i sar., (2019), ispitivali antimikrobnost proteinskih ekstrakata svežih sireva dobijenih iz bivoljeg mleka, gde je utvrđena inhibitorna aktivnost prema: *E. faecalis* (12.5 mg/mL) i *Bacillus subtilis* (25 mg/mL). Za razliku od ovih autora, Arruda i sar. (2012) su utvrdili da peptidi iz kazeina kravljeg mleka pokazuju antimikrobnost na iste prethodno navedene bakterije, ali u koncentracijama, koje su bile 5 i 2,5 puta veće. Takođe, Silva i sar. (2012), su se bavili antimikrobnom aktivnošću proteinskih ekstrakata dobijenih iz brazilskih tradicionalnih tvrdih sireva, gde je za inhibiciju navedenih bakterija bila potrebna 4 puta i 2 puta veća koncentracija proteinskih ekstrakata u odnosu na one dobijene iz bivoljeg mleka.

Rizzello i saradnici (2005), su ispitivali antimikrobnu aktivnost 9 različitih vrsta italijanskih sireva i utvrdili prisustvo 32 peptida rastvorljiva u vodi, koji su imali antimikrobnu aktivnost protiv sojeva patogenih bakterija *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus megaterium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus* spp. i *Salmonella* spp. Pri tome su pokazali da vodeni ekstrakti iz sireva Parmigiano Reggiano, Fossa i Gorgonzola nisu imali antibakterijsko dejstvo dok su frakcije iz sireva Pecorino Romano, Canestrato Pugliese, Crescenza i Caprino del Piemonte sadržale mešavinu peptida sa visokim stepenom homologije. Takođe, kod Pasta filata sireva (Caciocavallo i Mozzarella) je dokazano prisustvo antibakterijskih peptida. Autori su pokazali da tehnikom mikrodilucije bujona, većina frakcija rastvorljivih u vodi ima veliki spektar inhibicije (minimalna inhibitorna koncentracija od 20 do 200 µg/mL) prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskim vrstama, uključujući potencijalno patogene bakterije. Takođe su istakli da sirevi proizvedeni od različitih vrsta mleka (kravlje, ovčije i kozje) imaju potencijal da formiraju slične peptide sa antimikrobnim delovanjem.

Fialho i sar., (2018) su ekstrahovali i identifikovali antimikrobne peptide izolovane iz tradicionalnog Canastra sira i identifikovali 30 rastvorljivih peptida iz Canastra zanatskog sira sa izraženom antimikrobnom aktivnošću protiv *E. coli*. Kao zaključak, autori navode da Canastra sir pokazuje antimikrobnu aktivnost sa visokom inhibitornom aktivnošću prema različitim patogenim bakterijama, uključujući i *E. coli* primenjujući inhibitorne koncentracije 25–400 µg peptida/ml rastvora.

5.2.9.2. Antioksidativna aktivnost sireva

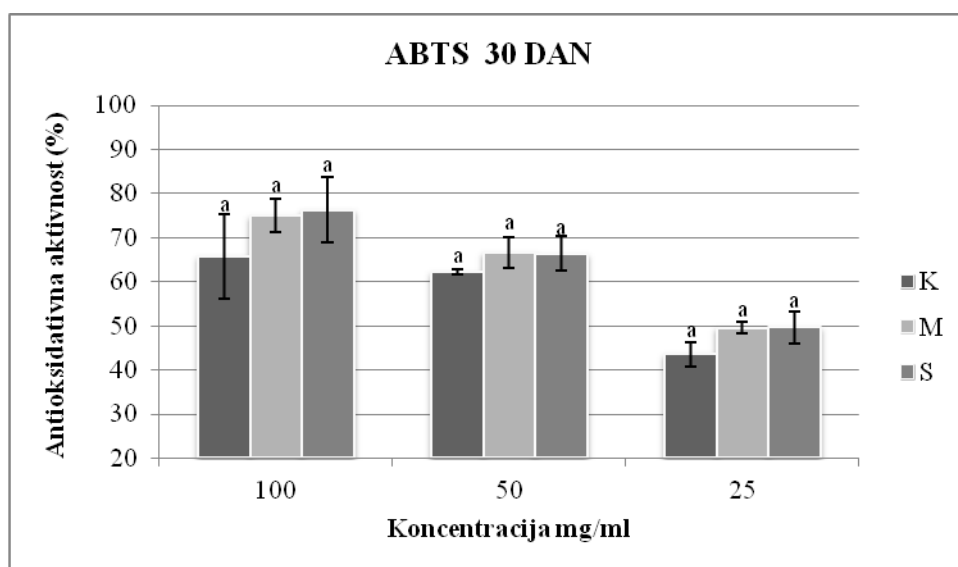
Rezultati antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka kačkavalja, primenom ABTS metode su prikazani u tabeli 19. i graphicima 6. i 7.

Tabela 19. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja, primenom ABTS metode

ABTS (%)			
30 dan	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
K	65,76±9,58 ^a	62,21±0,68 ^a	43,57±2,83 ^a
M	74,95±3,79 ^a	66,58±3,53 ^a	49,60±1,39 ^a
S	76,29±7,35 ^a	66,33±3,92 ^a	49,65±3,55 ^a
180 dan (%)			
K	85,27±3,55 ^a	72,66±3,38 ^a	51,88±0,29 ^a
M	87,13±2,76 ^a	77,07±3,32 ^{a,b}	54,92±7,25 ^{a,b}
S	90,39±0,23 ^a	81,73±1,80 ^b	64,64±1,99 ^b

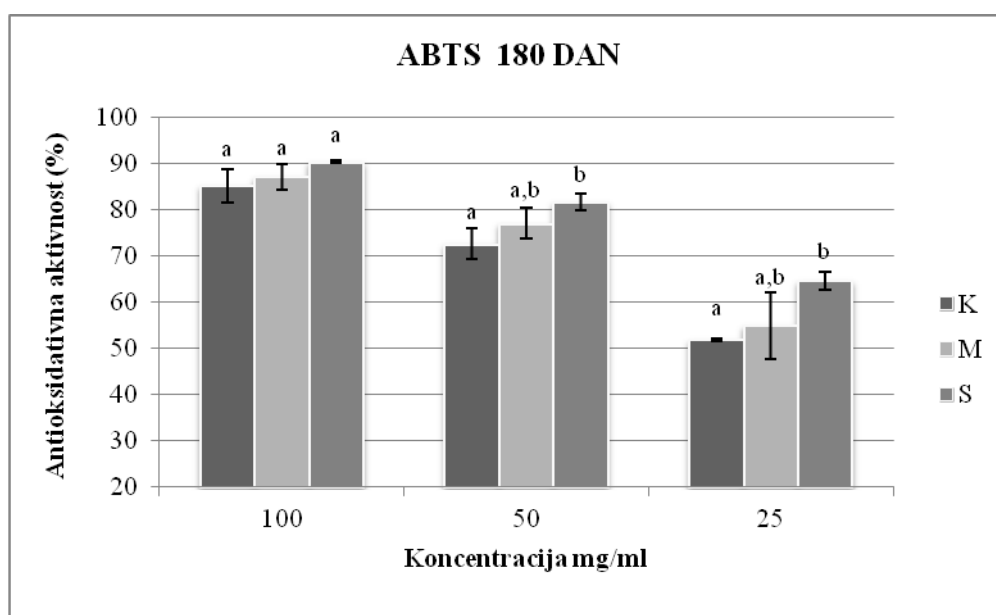
Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-b}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05).



Prikazane vrednosti su aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija.
 Različita slova (^{a-b}) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

Grafik 6. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli primenom ABTS metode nakon 30 dana zrenja



Prikazane vrednosti su aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija.
 Različita slova (^{a-b}) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

Grafik 7. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli primenom ABTS metode nakon 180 dana zrenja

Rezultati su pokazali da je antioksidativni kapacitet proteinskih ekstrakata uzoraka kačkavalja direktno proporcionalan sa koncentracijom peptida, postićući vrednosti od 43,57-49,65% za koncentraciju od 25 mg/ml; 62,21-66,58% za koncentraciju od 50 mg/ml i 65,76-76,29% za koncentraciju od 100 mg/ml u 30. danu zrenja. Kasnije, tokom zrenja, kod sve tri varijante kačkavalj sira, evidentiran je značajan porast antioksidativne aktivnosti, tako da su postignute vrednosti nakon 180 dana zrenja bile 51,88-64,64% za koncentraciju od 25 mg/ml; 72,66-81,73% za koncentraciju od 50mg/ml i 90,39-85,27% koncentraciju od 100 mg/ml. Kada se dobijeni rezultati analiziraju prema varijantama ispitivanih sireva, zapaža se da iako su vrednosti

antioksidativnosti za S varijantu sireva najviše, zatim vrednosti za M i najniže za K varijantu, ove razlike nisu bile statistički značajne u 30. danu zrenja, kada je postignuta komercijalna zrelost sireva. Međutim, nakon 180 dana zrenja je evidentirano da postoje statistički značajne razlike pri koncentracijama od 50 i 25 mg/ml proteinskih ekstrakata, što se ogledalo u tome da se S varijanta značajno razlikovala od K varijante. Ovakvi rezultati nas navode na zaključak da smanjenje sadržaja NaCl dovodi do značajno bolje antioksidativne aktivnosti u šestom mesecu zrenja kačkavalja u odnosu na kontrolni kačkavalj. Takođe, važno je napomenuti da je i pri najmanjoj ispitivanoj koncentraciji od 25 mg/ml, najveći procenat antioksidativne aktivnosti imala S varijanta (64,64%), zatim M (54,92%) i na kraju K varijanta (51,88) 180. dana zrenja.

Perna i sar., (2015) su dobili slične rezultate izučavajući antioksidativnost kačkavalj sira tokom 150 dana, gde su maksimalne vrednosti postignute u poslednjem danu. Takođe su Gupta i sar. (2009) utvrdili povećanje antioksidativnosti u čedar siru, postižući maksimum u četvrtom mesecu zrenja. Yang i sar. (2021) su pokazali da se tokom perioda zrenja povećava antioksidativnost do petog meseca zrenja čedar sira kada je iznosila 84,92%. Songisepp i sar. (2004) su takođe pokazali da antioksidativna aktivnost vodenih proteinskih ekstrakata čedar sira direktno zavise od perioda zrenja. Poznato je da zrenjem sireva nastaje veći broj antioksidativnih peptida, koji nastaju uglavnom proteolitičkim promenama kazeina tokom prvih 5 meseci zrenja i doprinose boljoj antioksidativnosti. Međutim još dužim procesima zrenja, dolazi do nastavka proteolitičkih promena, pri čemu se aktivni peptidi mogu razgarditi do aminokiselina, čime se hidroliza i formiranje peptida dovodi u stabilno stanje, pa se antioksidativna svojstva proteinskih ekstrakata stabilizuju (Ong i Shah, 2008b; Rafiq i sar., 2016).

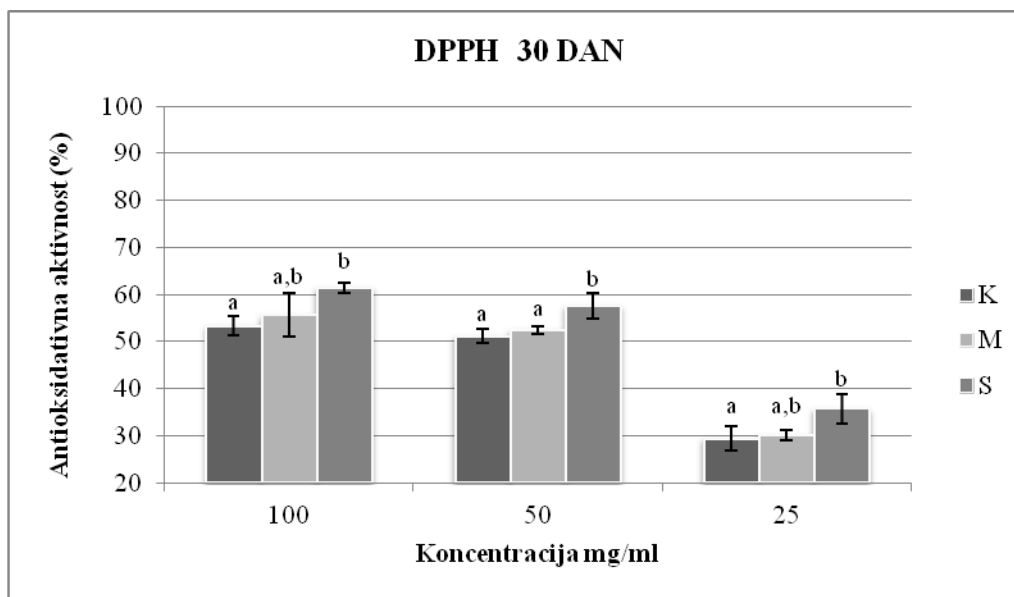
Slični rezultati su dobijeni i primenom DPPH metode, što je prikazano u tabeli 20. i graphicima 8. i 9.

Tabela 20. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja primenom DPPH metode

DPPH (%)			
30 dan	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
K	53,35±2,13 ^a	51,12±1,52 ^a	29,41±2,56 ^a
M	55,61±4,66 ^{a,b}	52,48±0,77 ^a	30,11±1,15 ^{a,b}
S	61,48±1,09 ^b	57,54±2,77 ^b	35,72±3,17 ^b
180 dan (%)			
K	68,03±0,99 ^a	60,50±2,59 ^a	39,98±2,50 ^a
M	70,26±2,05 ^a	63,82±2,27 ^{a,b}	42,10±3,23 ^{a,b}
S	74,78±1,77 ^b	67,13±2,21 ^b	48,33±1,99 ^b

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

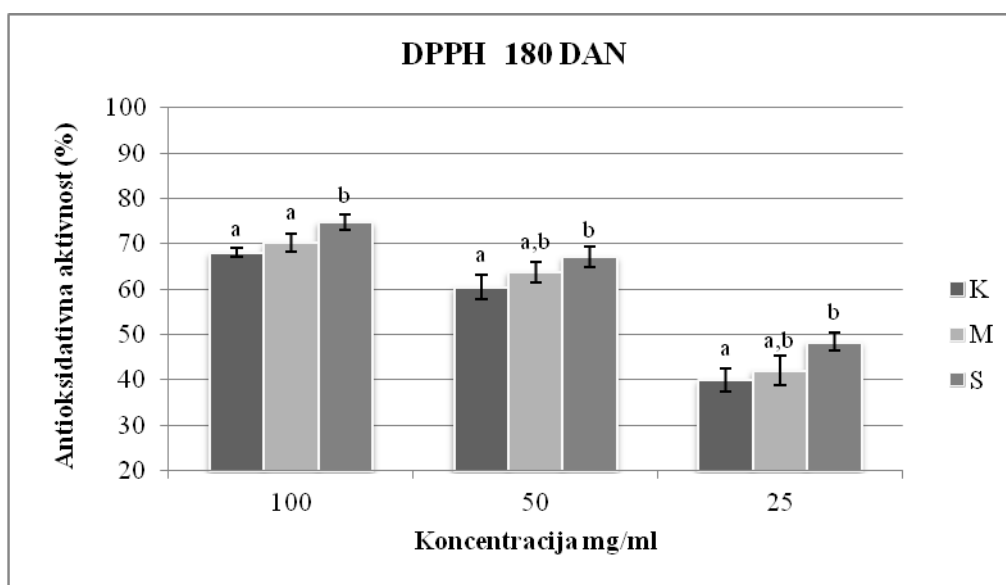
Različita slova (^{a-b}) u istoj koloni ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05).



Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-b}) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

Grafik 8. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli primenom DPPH metode nakon 30 dana zrenja



Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Različita slova (^{a-b}) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između varijanti sira.

Grafik 9. Antioksidativna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli primenom DPPH metode nakon 180 dana zrenja

Rezultati antioksidativnosti primenom DPPH metode su pokazali isti trend kao i primena ABTS metode, gde je utvrđeno povećanje antioksidativne aktivnosti tokom zrenja. U 30. danu, antioksidativna aktivnost se kretala u granicama 29,41-35,72% za koncentraciju od 25 mg/ml; od 51,12-57,54% za koncentraciju od 50mg/ml i 53,35-61,48% za koncentraciji od 100 mg/ml. Tokom zrenja se antioksidativnost povećavala, pa su u 180. danu vrednosti bile u granicama 39,98-48,33% za koncentraciju 25mg/ml; 60,50-67,13% za koncentraciju 50 mg/ml i 68,03-74,78% za koncentraciju od 100mg/ml. Slične rezultate su dobili i Yang i sar. (2021), gde su primenom DPPH metode utvrdili maksimalne vrednosti u petom mesecu zrenja čedar sira u granicama 55,90% i 60,32%.

Analizom ispitivanih varijanti kačkavalj sireva je utvrđeno da S varijanta sa smanjenim sadržajem NaCl pokazuje najviše vrednosti pri svim koncentracijama proteinskog ekstrakta i nakon 30. dana i 180. dana zrenja. Kod varijante M su postignute vrednosti između K i S, a kontrolna K varijanta je pokazala najmanja antioksidativna svojstva. Statističkom analizom je utvrđeno da se varijanta S, sa smanjenim sadržajem NaCl, značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu varijantu. Kod varijante M sa delimično zamenjenim NaCl se nije pokazalo statistički značajno odstupanje od ostale dve varijante. Pri tome je utvrđeno da je i pri najmanjoj ispitivanoj koncentraciji od 25 mg/ml, najveći procenat antioksidativne aktivnosti imala S varijanta, zatim M i na kraju K varijanta i 30. i 180. dana zrenja.

Poređenjem rezultata dobijenih primenom ABTS i DPPH metoda, evidentno je da su dobijeni slični rezultati, pri čemu je utvrđeno da su vrednosti dobijene za DPPH metodu nešto niže, što nije neuobičajeno. I drugi autori su primetili da su vrednosti dobijene ABTS metodom veće od vrednosti dobijenih DPPH metodom (Floegel i sar., 2011). Abadia-Garcia i sar. (2013) su ispitivali antioksidativnost u mladom siru i utvrdili da su vrednosti antioksidativne aktivnosti utvrđene ABTS metodom bile veće u odnosu na vrednosti detektovane DPPH metodom. Razlike između ove dve metode mogu biti posledica nejednakosti između strukture radikala koje mogu različito reagovati u zavisnosti od peptida prisutnih u vodenom ekstraktu (Ramirez-Rivas i sar., 2022).

Primena obe metode za ispitivanje antioksidativnosti je opravdana time što je utvrđeno da se bioaktivni peptidi ponašaju različito prema različitim radikalima u zavisnosti od njihovog medijuma rastvorljivosti. Za ABTS radikal se zna da je rastvorljiv u vodi i lako se uklanja pomoću peptida koji su u stanju da doniraju vodonik, dok DPPH prihvata vodonik u uljanim sredinama (Phanturat i sar., 2010).

U našem radu se zapaža da su obe metode za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti i ABTS i DPPH pokazale rezultate sa sličnim trendom promena, pri čemu je pokazano da S varijanta kačkavalja sa smanjenim sadržajem NaCl pokazuje najbolju antioksidativnu aktivnost tokom zrenja kačkavalja.

Kao što je već ranije pomenuto, tokom procesa zrenja sireva, formiranje u vodi rastvorljivih peptida nastaje kao posledica dejstva koagulanta, plazmina kao i bakterijskih proteaza i peptidaza, pri čemu mali peptidi nastaju pod uticajem bakterijskih proteinaza i peptidaza u procesima razgradnje produkata primarne razgradnje α_{S1} -CN i β -CN, koji su nastali prethodnom aktivnošću himozina i plazmina. Na rastvorljivost kazeina kod kačkavalja značajno utiče i postupak njegovog dobijanja, odnosno, postupak razvlačenja i mešenja sirnog testa. Tako su Gagnaire i sar. (2011) pokazali da se razgradnja kazeina kod raguzano sira povećava pod uticajem plazmina, što su autori doveli u vezu sa razvačenjem sirnog testa u vreloj vodi na temperaturi oko 85 °C i prisustvom rezidualnog himozina, za koji je poznato da ostaje aktivan u dužem period zrenja i kod drugih vrsta tvrdih sireva.

Kada naše dobijene rezultate antioksidativnosti dovedemo u vezu sa rezultatima proteolitičke razgradnje, zapaža se da su kod svih uzoraka sireva promene antioksidativne aktivnosti u saglasnosti sa formiranjem u vodi rastvorljivih peptida. Slične rezultate su dobili i Gupta i sar. (2009), gde je antioksidativna aktivnost bila veća u sirevima sa većim stepenom rane hidrolize. Međutim, autori su zapazili da posle pet meseci zrenja postoje značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti, dok su vrednosti sadržaja rastvorljivih peptida bile približne. Ovakve promene su uočene i u našim rezultatima, gde su značajne razlike u antioksidativnosti uočene na kraju zrenja kod varijante S, sira sa smanjenim sadržajem NaCl, pri čemu kod sadržaja rastvorljivog azota nije bilo značajnih razlika između ispitivanih varijanti sireva. Gupta i sar. (2009) su ovu pojavu objasnili time da antioksidativna aktivnost sireva zavisi od stepena proteolize, ali samo u određenoj meri, jer se ova zavisnost povezuje sa sastavom starter kulture, odnosno prisutne

mikrobiote, tako da je antioksidativnost samo do određene mere u korelaciji sa sadržajem rastvorljivih peptida, naročito u kasnijim fazama zrenja.

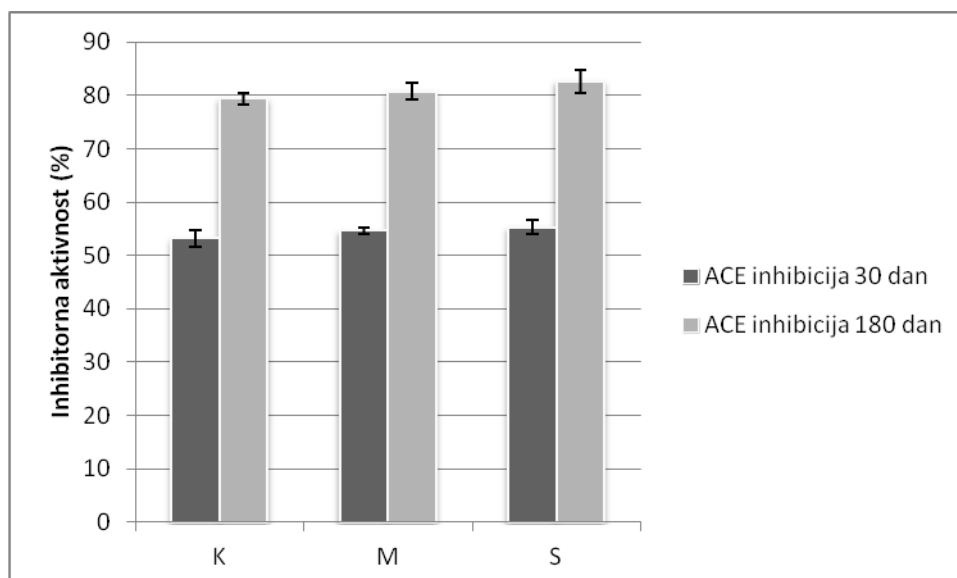
5.2.9.3. ACE inhibitorna aktivnost sireva

Rezultati ACE inhibitorne sposobnosti vodenih proteinskih ekstrakata svih ispitivanih varijanti kačkavalja su prikazane u tabeli 21. i grafiku 10.

Tabela 21. ACE inhibitorna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

ACE inhibicija (%)		
Uzorak	30 dan	180 dan
K	53,15±1,65	79,38±1,10
M	54,59±0,64	80,74±1,60
S	55,28±1,35	82,57±2,26

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.
Nije bilo statistički značajne razlike u istoj koloni ($p < 0,05$).



Grafik 10. ACE inhibitorna aktivnost kačkavalja sa različitim sadržajem soli tokom zrenja

Rezultati su pokazali da sva tri uzorka kačkavalja pokazuju ACE inhibitornu aktivnost nakon 30 dana zrenja i kretala se od 53,15% za kontrolni sir, 54,59% za uzorak sa delimično zamenjenim NaCl (M) do 55,28% za uzorak sira sa smanjenim sadržajem NaCl (S). Među navedenim varijantama nije bilo statistički značajnih razlika nakon 30 dana zrenja. Tokom zrenja, ACE inhibitorna aktivnost se povećavala i na kraju zrenja, u 180. danu je iznosila 79,38% za kontrolni sir, 80,74% za M varijantu sa delimično zamenjenim NaCl i 82,57% za S varijantu sa smanjenim sadržajem NaCl. Iako je detektovano povećanje ACE inhibitorne aktivnosti kod M varijante, a najveće povećanje kod S varijante sira, nije bilo statistički značajnih razlika među ispitivanim varijantama tokom zrenja. Kod svih varijanti sireva je uočeno povećanje ACE inhibicije tokom zrenja, što je i očekivano, imajući u vidu da se tokom zrenja povećava proteoliza i nastaju manja peptidna jedinjenja koja mogu pokazati antihipertenzivnu aktivnost.

Utvrđeno je da tokom zrenja postoje razlike u detektovanoj ACE inhibitornoj aktivnosti, gde se i nakon 30 i 180 dana zrenja pokazalo da je najbolja aktivnost kod uzoraka sa smanjenim sadržajem NaCl (S), a najslabija u kontrolnom siru (K). Ovi rezultati su u saglasnosti sa

rezultatima proteolitičkih promena u ispitivanim uzorcima sireva, a takođe, ove rezultate potvrđuje i detektovane promene prisutne mikrobiote BMK.

Slične rezultate su dobijali i drugi autori gde su Lopez-Fandino i sar. (2006) pokazali da se koncentracija peptida povećava pet puta tokom 4 meseca zrenja, ali da se kvalitativni profil peptida razlikuje. ACE inhibicija u prvim fazama zrenja nastaje kao rezultat formiranja bioaktivnih peptida, koji u kasnijim fazama zrenja ostaju rezistentni u toku dalje degradacije peptida, a takođe nastaju i novi, što sveukupno rezultira većom bioaktivnošću u kasnijim fazama zrenja (Meyer i sar., 2009). Butikofer i sar. (2007) su izolovali različite peptide iz vodenog ekstrakta ementaler sira, a Gomez-Ruiz i sar. (2004) su pokazali da je ACE inhibicija je veća u Manchego siru starosti 2 i 8 meseci, nego u siru starom 4 i 12 meseci, pri čemu su identifikovali prisustvo različitih peptida.

Meisel i sar. (2005) su pokazali da je ACE inhibitorna aktivnost u gauda siru srednje starosti bolja u odnosu na mladi i zreo gauda sir, dok je u Festivo siru primećena najbolja ACE inhibicija kod uzoraka starosti 13 nedelja, posle čega se ova aktivnost smanjivala tokom zrenja (Ryhanen i sar., 2001). Hernández-Galán i sar. (2016) su ispitivali ACE inhibitornu aktivnost u meksičkom tvrdom tradicionalnom Cotija siru i utvrdili da se ova aktivnost povećava do 100% na kraju procesa zrenja od 6 meseci. Nasuprot ovim podacima, Saito i sar. (2000) su pokazali nešto veću ACE inhibiciju kod gauda sira od dve godine starosti (78,2%), u odnosu na starost sira od 8 meseci (75,5%).

Istraživanja Ong i Sahah (2008a) ACE inhibicije kod čedar sira proizvedenog sa različitim kulturama i na različitim temperaturama zrenja su pokazala veliki uticaj dodate kulture, a sa povećanjem temperature do 12 °C je pokazalo bolju ACE inhibiciju u odnosu na uzorke koji su imali zrenje na 8 °C i 4 °C tokom 24 nedelje, što je objašnjeno intenzivnijom proteolizom tokom zrenja. Veliku raznolikost u ACE inhibitornoj aktivnosti su pokazali i Meyer i sar. (2009), koji su poredili ACE inhibiciju kod različitih švajcarskih sireva. Utvrđeno je da ementaler pokazuje kontinualno povećanje ACE inhibicije tokom 400 dana zrenja, a nasuprot tome, grijer je pokazao najveću ACE inhibiciju u prvoj fazi komercijalne zrelosti i nadalje smanjenje ove aktivnosti posle 9 meseci zrenja. Kod polutvrdih sireva se pokazalo da većina uzoraka pokazuje trend povećanja ACE inhibicije tokom zrenja. Autori su zaključili da na formiranje ACE inhibitorne aktivnosti veliki uticaj imaju individualni uslovi proizvodnje, kao i sam varijetet sira (Seiber i sar., 2010).

Što se tiče uticaja sadržaja NaCl na ACE inhibitornu aktivnost sireva, nema puno podataka. Gandhi i Shah (2016) su ispitivali uticaj smanjenja soli u Akawi siru, pri čemu su utvrdili da se oslobađanje esencijalnih aminokiselina fenilalanin, triptofan, valin i leucin poboljšava u uzorcima sa smanjenim sadržajem NaCl. Međutim, nisu utvrdili postojanje značajnih razlika u ACE inhibitornoj aktivnosti bioaktivnih peptida prilikom smanjenja sadržaja NaCl. Slično tome i Ayyash i sar. (2012) su ispitivali uticaj delimične zamene NaCl sa KCl u Akawi siru i takođe nisu utvrdili postojanje značajnih razlika u ACE inhibitornoj aktivnosti tokom zrenja. Međutim, Ayyash i Shah (2011a), su pokazali statistički značajne razlike kod mocarela sira, ako se deo NaCl zameni sa KCl. Takođe, Silva i sar. (2018) su pokazali statistički veću ACE inhibitornu aktivnost kod probiotskog Prato sira, ako se izvrši delimična supstitucija NaCl KCl-om. Iako mnogi autori proučavaju uticaj smanjenja ili delimične zamene NaCl na sastav različitih vrsta sireva, podaci o terapeutskom uticaju sireva, koji nastaje kao posledica smanjenja soli, su još uvek ograničena. Neophodna su dalja istraživanja o terapeutskim svojstvima sireva sa samnjenim sadržajem soli.

Imajući u vidu da tradicionalna proizvodnja kačkavalja često varira i u samom kvalitetu sirovine i prisutne mikrobiote, verovatno je da i ACE inhibitorna aktivnost tradicionalnog kačkavalja varira od slučaja do slučaja. Međutim, dobijeni rezultati su pokazali da smanjenje ili zamena dela

NaCl nema značajnog uticaja na formiranje ACE inhibitorne aktivnosti vodenih proteinskih ekstrakata dobijenih iz ispitivanih uzoraka kačkavalja.

5.2.10. Senzorna analiza sireva

5.2.10.1. Senzorni kvaliteta sireva

Senzorna analiza sireva je sprovedena primenom korigovanog petobalnog bod sistema. Prilikom ocenjivanja korišten je bodovni raspon od 1 do 5 uz mogućnost davanja polubodova (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5). Parametri kvaliteta koji su ispitani ovom analizom su sledeći: spoljni izgled, miris, tekstura i ukus.

Rezultati korigovanog petobalnog bod sistema ispitivanih varijanti kačkavalja: kontrolnog sira (K), sira sa 30% smanjenim NaCl (S) i sira sa 30% NaCl zamenjenim KCl (M) su prikazani u tabeli 22. Prikazani su rezultati senzornog ispitivanja koje je vršeno 30. i 180. dana zrenja kačkavalja.

Tabela 22. Rezultati ispitivanja senzornog kvaliteta kačkavalja primenom metode bodovanja

Dani zrenja	Uzorak sira	Spoljni izgled	Miris	Tekstura	Ukus	% od maks. kvaliteta	Pond. ocena
30. dan	K	4,9 ± 0,03	4,6 ± 0,03	4,4 ± 0,22	4,1 ± 0,33	87,9 ± 4,11	4,4 ± 0,20
	M	5,0 ± 0,00	4,9 ± 0,06	4,7 ± 0,22	4,5 ± 0,25	93,5 ± 3,53	4,7 ± 0,18
	S	5,0 ± 0,00	4,9 ± 0,03	4,5 ± 0,03	4,3 ± 0,36	90,9 ± 3,47	4,5 ± 0,17
180. dan	K	4,9 ± 0,00	4,7 ± 0,11	4,6 ± 0,05	4,4 ± 0,03	91,6 ± 0,19	4,6 ± 0,01
	M	4,9 ± 0,05	4,9 ± 0,03	4,7 ± 0,17	4,7 ± 0,22	95,2 ± 2,75	4,8 ± 0,14
	S	5,0 ± 0,03	4,8 ± 0,08	4,8 ± 0,11	4,6 ± 0,19	94,7 ± 2,47	4,7 ± 0,12

Prikazane vrednosti su aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Dvofaktorska ANOVA je pokazala da ni period zrenja niti sastav soli ne utiču značajno na srednje vrednosti ocena senzornog kvaliteta ($p > 0,05$).

Rezultati su pokazali da se senzorni parametri ispitivanih varijanti kačkavalja ne razlikuju značajno. Ispitivane varijante kačkavalja po pitanju opšteg izgleda su se odlikovale adekvatnim spoljašnjim izgledom, tačnije karakterističnom žutom bojom, glatkom teksturom pri preseku sa mogućom pojavom malog broja šupljika nepravilnog oblika i malih dimenzija (1-2 mm) nastalih tokom obrade. Takođe, ispitivane varijante kačkavalja su se odlikovale prijatnim mlečnim mirisom. Rezultati ispitivanja ostalih senzornih parametara su pokazali da uticaj dodavanja 30% smanjene količine NaCl, kao i mešavine NaCl i KCl nije bio statistički značajan. Takođe, ispitivane varijante kačkavalja su imale čvrstu i povezanu teksturu. Testo je bilo odlikovano monolitnom delimično lisnatom strukturom koja je karakteristična za ovaj tip sira. Takođe, ispitivane varijante kačkavalja su bile okarakterisane prijatnim, mlečno-kiselim i slanim ukusom koji je specifičan za kravlje mleko. Cruz i sar. (2011) su utvrdili da zamena NaCl pomoću drugih soli od 10–25% se senzorno ne može detektovati i ne narušava tehnološka svojstva sireva. Smanjenje ili zamena soli ima brojne negativne efekte na kvalitet sira i prihvatljivost od strane potrošača, pre svega iz razloga što je povećana količina gorkih peptida i nepoželjno omekšana tekstura (Farkye i Guinee., 2017). Pokazalo se da zamena NaCl pomoću $MgCl_2$ ili $CaCl_2$ rezultira proizvodom koji najčešće poseduje gorak, metalni i kiseo ukus, osim kod sireva gde je izvršena zamena NaCl pomoću KCl (Grummer et al., 2012). Rezultati studija su pokazali da delimična

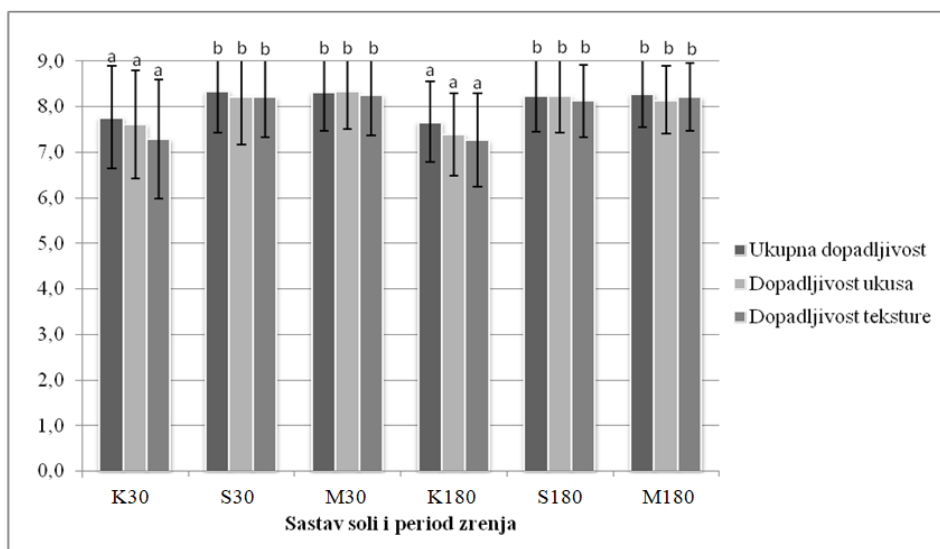
zamena NaCl KCl-om od 25% do 50% nije uticala značajno na senzorne attribute sireva (Grummer i sar, 2012.; Soares i sar., 2016 Thibaudeau i sar., 2015). Međutim, u pogledu senzornih svojstava, zamena NaCl pomoću KCl ne bi trebalo da pređe odnos od 50%, jer sirevi mogu da imaju neprijatan gorak ili metalni ukus (Thibaudeau i sar., 2015). Pored toga, KCl se može posmatrati kao so koja je pogodna u cilju zamene sadržaja NaCl zbog pozitivnog efekta koje može imati na zdravlje potrošača, kao što je smanjenje krvnog pritiska, a samim tim i kardiovaskularnih bolesti, a sa druge strane se ne narušava senzorni kvalitet proizvoda (Chavhan i sar., 2015).

Sagledavajući rezultate ispitivanja moglo se zaključiti da svi ispitivani sirevi pripadaju grupi sireva odličnog kvaliteta sa izraženim pozitivnim svojstvima. Najbolje ocenjenim se pokazao ispitivani uzorak sa zamenjenim sadržajem NaCl pomoću KCl koji se odlikovao sa 93,53% od maksimalnog kvaliteta u 30. danu zrenja, kao i sa 95,19% u 180. danu zrenja. Takođe, rezultati senzornog ispitivanja primenom korigovanog petobalnog bod sistema su pokazali da smanjenje sadržaja NaCl 30%, kao i zamena NaCl pomoću KCl nije negativno uticalo na senzorni kvalitet kačkavalja. S tim u vezi, senzorni kvalitet varijanti kačkavalja sa smanjenim sadržajem NaCl i zamenjenim pomoću KCl, proizvedenih u okviru ove doktorske disertacije, jasno pokazuje da bi našli svoje mesto na tržištu naročito kao tradicionalni proizvod sa poboljšanim zdravstvenim efektima.

5.2.10.2. Ispitivanje prihvatljivosti sireva

Rezultati ocena hedonske skale su grafički prikazani na grafiku 11. Ocene prihvatljivosti za sva tri ispitivana atributa (ukupna dopadljivost, dopadljivost ukusa i dopadljivost teksture) su bile na sličnom nivou unutar opsega prihvatljivosti. Dvofaktorska ANOVA je pokazala da je samo „sastav soli“ kao faktor značajno uticao na ocene prihvatljivosti kod sva tri atributa. Naime, prihvatljivost je za kontrolni uzorak statistički značajno manja ($p < 0,05$) u odnosu na preostale uzorke, pri čemu period zrenja nije uticao na promene kod srednjih vrednosti ocena prihvatljivosti. Naime, rezultati su pokazali da je ukupna dopadljivost, dopadljivost ukusa i teksture bila veća kod uzoraka sa smanjenim sadržajem NaCl, kao i zamenjenim sadržajem NaCl u odnosu na kontrolu. Shodno tome, možemo zaključiti da je smanjenje i zamena sadržaja soli u ovom ogledu kod kačkavalja rezultiralo višim stepenom prihvatljivosti proizvoda što bi moglo da bude od značaja za potencijalno plasiranje proizvoda na tržište.

Prethodno spomenuto tumačenje rezultata je sa aspekta sagledavanja statistički značajne razlike, međutim, kada se sagledaju srednje vrednosti ocena prikazane na grafiku (Grafik 11.), sve se nalaze u zoni dopadanja, tačnije nema ocene manje od 7, a razlike između minimuma i maksimuma nisu veće od jednog podeoka na skali od 9 podeoka. Guinee i O’Kennedi (2007) su pokazali da ukoliko se NaCl zameni pomoću KCl manje od 50% NaCl neće imati negativnog uticaja na senzornu prihvatljivost sireva (Guinee i O’Kennedi, 2007).



Grafik 11. Prikaz rezultata dopadljivosti odnosno hedonske skale ispitivanih varijanti kačkavalja različitog sastava soli i perioda zrenja

Rezultati ispitivanja stepena prihvatljivosti u pogledu intenziteta pojedinačnih svojstava sireva sa različitim sadržajem i vrstom soli su prikazani u tabelama 23. i 24., kao i na graficima na slici 39. Tabelama su obuhvaćeni rezultati ispitivanja prihvatljivosti ispitivanih sireva u pogledu slanosti, intenziteta ukusa i tvrdoće. Frekvencije (%) odgovora dobijenih primenom skale „upravo onako kako odgovara” u pogledu prihvatljivosti slanosti, intenziteta ukusa i tvrdoće za sve ispitivane varijante kačkavalja 30. i 180. dana zrenja su prikazane u obliku grafika na slici 39. Sagledavajući rezultate primenjene skale „upravo onako kako odgovara” (engl. *Just about right scale - JAR*), većina frekvencija ocene "kako odgovara" su preko 80%, što ukazuje na to da ispitivanoj grupi potrošača stepen izraženosti određenog ispitivanog svojstva kod datog proizvoda odgovara, odnosno da im je prihvatljiv. Upoređivanjem vrednosti učestalosti za odgovore „kako odgovara” ispitivanih varijanti kačkavalja, može se primetiti da su vrednosti kontrole bile niže od 80%, za razliku od varijanti sa smanjenim i zamenjenim sadržajem NaCl 30. i 180. dana zrenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja dopadljivosti primenom hedonske skale. Takođe, u literaturi postoje neslaganja među studijama koje su se bavile senzornim ispitivanjima potrošača za različit odnos zamene soli (Guinee i O’Kennedy, 2007). Međutim, razlike koje postoje u literaturi nastaju ili zbog vrste analiziranog sira, ili zbog početne količine NaCl (Miočinović i sar., 2022).

Analizom pada vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti kombinuju se podaci dobijeni primenom skale „upravo onako kako odgovara” sa podacima dobijenim primenom hedonske skale, u cilju dobijanja informacije u pogledu odstupanja od nekog „idealnog proizvoda” prema mišljenju potrošača (Tomić, 2021). Granična vrednost proporcije testiranih potrošača (čije se mišljenje uzima kao relevantno) je 20% od ukupnog broja osoba koje su testirane ($n = 110$), a vrednosti koje su ispod ove granične vrednosti se posmatraju kao suviše mali udeo ispitivane populacije (Tomić, 2021). Stoga, kada posmatramo rezultate uzimamo u obzir vrednosti koje su iznad ove granične vrednosti (vrednosti ≥ 20), a kod kojih je pad ocene ukupne prihvatljivosti statistički značajan. Rezultati su pokazali da je kontrolni uzorak ocenjen kao manje prihvatljiv za potrošače (Tabele 23. i 24.). Kontrolni uzorak je u oba slučaja (30. i 180. dana) ocenjen kao „previše slan”. Takvu ocenu je dao značajan broj testiranih potrošača (27,3% 30. dana i 30,9% 180. dana), a pad ocene ukupne prihvatljivosti je bio statistički značajan (na nivou 0,05). Takođe, kontrolnom uzorku je značajno veliki broj potrošača (51,8% 180. dana) dao ocenu da ima „previše izražen ukus”, a pad ocene prihvatljivosti je 180. dana bio statistički značajan, dok 30. dana nije bio značajan.

Tabela 23. Rezultati analize pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti za uzorke sira nakon 30 dana zrenja

Uzorak	Promenljiva	Nivo prihvatljivosti	Učestalost (n)	Učestalost (%)	Srednja vrednost ocene (ukupna prihvatljivost)	Pad ocene prihvatljivosti
K30	Slanost	Nedovoljno slano	1	0,9	6,00	-
		Kako odgovara	79	71,8	7,97	-
		Previše slano	30	27,3	7,27	0,708*
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	56	50,9	7,93	-
		Previše izražen	54	49,1	7,59	0,336
	Tvrdoća	Previše meko	1	0,9	4,00	-
		Kako odgovara	50	45,5	7,90	-
		Previše tvrdo	59	53,6	7,71	0,188
M30	Slanost	Nedovoljno slano	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	110	100,0	7,76	-
		Previše slano	0	0,0	-	-
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	106	96,4	7,78	-
		Previše izražen	4	3,6	7,25	-
	Tvrdoća	Previše meko	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	109	99,1	7,78	-
		Previše tvrdo	1	0,9	6,00	-
S30	Slanost	Nedovoljno slano	1	0,9	6,00	-
		Kako odgovara	109	99,1	7,78	-
		Previše slano	0	0,0	-	-
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	104	94,5	7,78	-
		Previše izražen	6	5,5	7,50	-
	Tvrdoća	Previše meko	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	108	98,2	7,79	-
		Previše tvrdo	2	1,8	6,50	-

*Pad ocene prihvatljivosti je statistički značajan.

Vrednosti učestalosti za odgovore „kako odgovara“ koje su veće/jednake 80% označavaju da kod tih svojstava nije potrebno sprovoditi statističku analizu, već se uzima da ispitivanoj grupi potrošača to svojstvo kod tog proizvoda odgovara, odnosno da im je prihvatljivo.

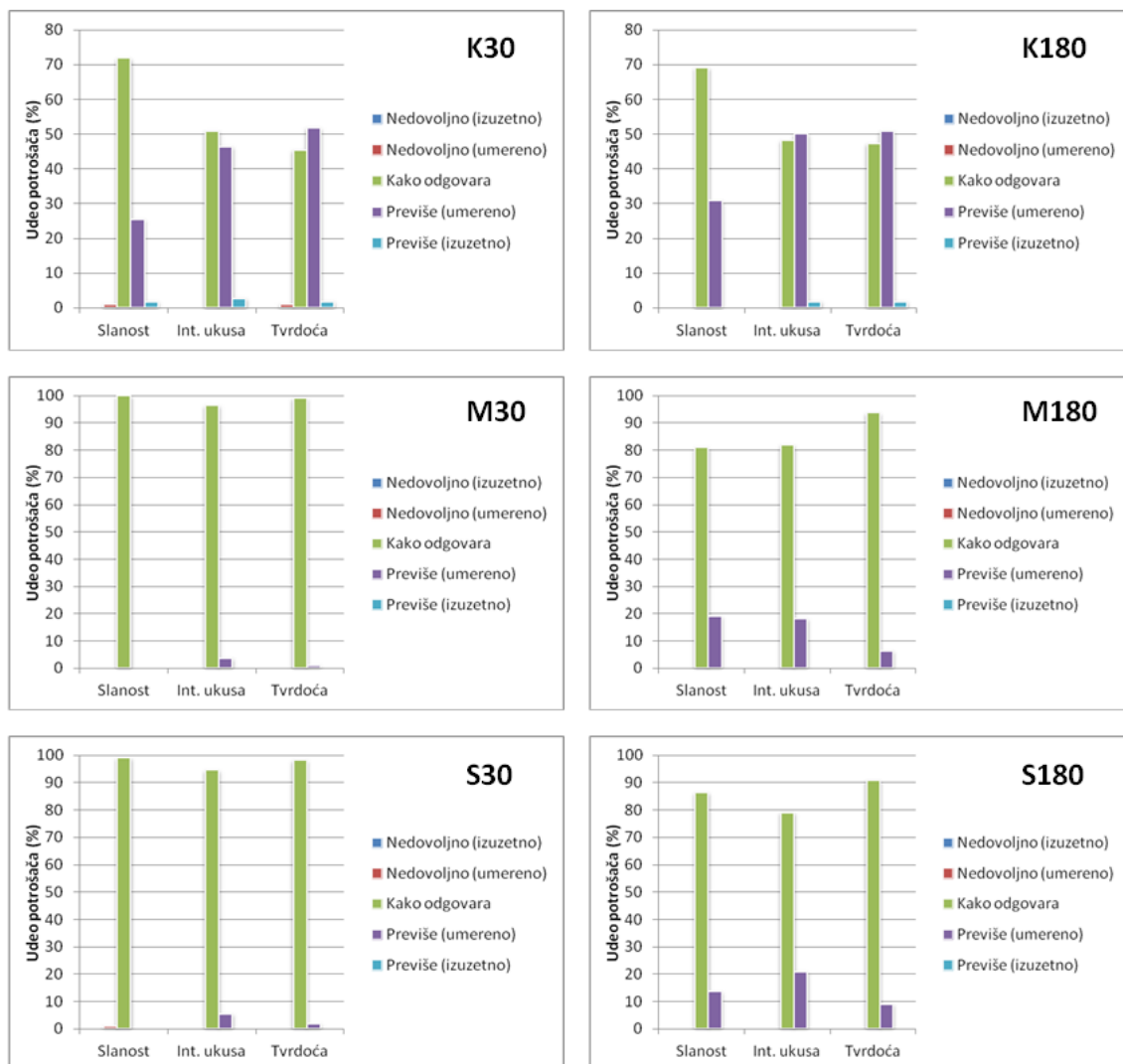
Tabela 24. Rezultati analize pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti za uzorke sira nakon 180 dana zrenja

Uzorak	Promenljiva	Nivo prihvatljivosti	Učestalost (n)	Učestalost (%)	Srednja vrednost ocene (ukupna prihvatljivost)	Pad ocene prihvatljivosti
K180	Slanost	Nedovoljno slano	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	76	69,1	7,78	-
		Previše slano	34	30,9	7,41	0,364*
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	53	48,2	7,89	-
		Previše izražen	57	51,8	7,46	0,431*
	Tvrdoća	Previše meko	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	52	47,3	7,77	-
		Previše tvrdo	58	52,7	7,57	0,200
M180	Slanost	Nedovoljno slano	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	89	80,9	7,74	-
		Previše slano	21	19,1	7,33	-
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	90	81,8	7,71	-
		Previše izražen	20	18,2	7,45	-
	Tvrdoća	Previše meko	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	103	93,6	7,67	-
		Previše tvrdo	7	6,4	7,57	-
S180	Slanost	Nedovoljno slano	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	95	86,4	7,69	-
		Previše slano	15	13,6	7,47	-
	Intenzitet ukusa	Nedovoljno izražen	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	87	79,1	7,69	-
		Previše izražen	23	20,9	7,56	-
	Tvrdoća	Previše meko	0	0,0	-	-
		Kako odgovara	100	90,9	7,73	-
		Previše tvrdo	10	9,1	7,00	-

*Pad ocene prihvatljivosti je statistički značajan.

Vrednosti učestalosti za odgovore „kako odgovara“ koje su veće/jednake 80% označavaju da kod tih svojstava nije potrebno sprovoditi statističku analizu, već se uzima da ispitivanoj grupi potrošača to svojstvo kod tog proizvoda odgovara, odnosno da im je prihvatljivo.

Slika 39. Frekvencije (%) odgovora dobijenih primenom skale “upravo onako kako odgovara” u pogledu prihvatljivosti slanosti, intenziteta ukusa i tvrdoće za sve ispitivane varijante kačkavalja 30. i 180. dana zrenja



6. ZAKLJUČCI

- Analizom kačkavalja sa domaćeg tržišta je utvrđeno da postoje velika varijabilnost i značajne razlike u pogledu ispitivanih parametra hemijskog sastava, koji su obuhvatili sadržaj suve materije, sadržaj mlečne masti, sadržaj masti u suvoj materiji sira, sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira i sadržaj soli.
- Sadržaj soli u sirevima sa tržišta je pokazao veliku varijabilnost i kretao se u intervalu od 0,93% do 3,69%, a čak oko 40% uzoraka se može okarakterisati velikim sadržajem soli (2,78 – 3,69%). Veliki sadržaj soli ovih sireva ukazuje na potrebu njegovog smanjenja, što je u skladu sa preporukama savremene ishrane, a i predmet ove disertacije.
- Sirevi kačkavalj sa tržišta su pokazali veoma veliku varijabilnost u pogledu stepena zrelosti. Naime, koeficijent zrelosti sireva sa tržišta je bio u rasponu od 6,72% do 27,31%, a analiza Urea Page elektroforegrama je ukazala na varijabilnost zastupljenosti pojedinih frakcija kazeina (α_{S1} - 19,96 – 30,52% i β - 19,28 – 27,98%), što takođe ukazuje na njihov različit stepen razgradnje tokom zrenja. Ovi rezultati ukazuju na postojanje velike razlike u trajanju perioda zrenja ispitivanih sireva koje se odražavaju na tok i obim proteolitičkih promena, a indirektno i senzorna svojstva proizvoda.
- Varijabilnost svojstava kačkavalja sa tržišta je ustanovljena i za pH vrednost, broj mezofilnih i termofilnih BMK, kao i teksturalna svojstva. pH vrednost se kretala u intervalu 5,04 do 5,57. Statistički značajna razlika je ustanovljena u broju mezofilnih i termofilnih BMK, pri čemu su svi ispitani uzorci imali broj ćelija iznad 6 log cfu/g, osim broja termofilnih BMK četiri uzorka, gde je bio ispod ove vrednosti. Različit broj mikroorganizama, kao važnog agensa zrenja, imao je uticaj i na različit tok i obim proteolitičkih promena ovih sireva.
- Analiza teksture kačkavalja sa domaćeg tržišta je ukazala na širok raspon vrednosti, od 827 do 5232 g u pogledu tvrdoće koja je jedan od glavnih parametara teksturalnih svojstava sira. Utvrđena je pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja proteina i elastičnosti, kao i žvkljivosti.
- Ispitivanja boje kačkavalja sa domaćeg tržišta su pokazala značajne razlike u vrednostima a^* i b^* , međutim u vrednostima L^* nije bilo značajnih razlika ($p > 0,05$). Razlike u parametrima boje su svakako posledica različitog sastava i stepena zrelosti sireva. Dalja ispitivanja su potrebna kako bi se utvrdile preciznije korelacije sastava, stepena zrelosti i boje kačkavalja.
- U pogledu sagledavanja ispunjenosti sa zahtevima nacionalnog standarda utvrđeno je da čak šest od dvanaest (50%) ispitivanih kačkavalja sa domaćeg tržišta nije ispunilo zahtev minimalnog sadržaja suve materije koja treba da iznosi 54%, dok četiri od dvanaest sireva (30%) nisu ispunili minimalno 45% sadržaja suve materije. Na osnovu toga može se zaključiti da se naziv kačkavalj upotrebljava iako sirevi nisu usklađeni sa zahtevima standarda.

- Pored toga, ustanovljena varijabilnost obima proteolize sagledavajući koeficijent zrelosti ukazuje za potrebom definisanja numeričke vrednosti kako bi se jednostavnije mogao utvrditi period zrenja koji je propisan nacionalnim standardom, a može služiti kao parameter kontrole kvaliteta ovih proizvoda.
- Prethodno navedena varijabilnost sastava i svojstava sireva kačkavalja sa tržišta su posledica različitosti sastava sirovina, tehnološkog postupka proizvodnje i uslova i dužine trajanja zrenja. U cilju ujednačavanja kvaliteta ove vrste sira potrebno je preciznije definisati parametre proizvodnje, kao i uslove zrenja. Pored toga, ustanovljena značajna neusaglašenost sa nacionalnim standardom nameće potrebu uvođenja strože kontrole parametara kvaliteta kao i deklarisanja proizvoda.
- Eksperimentalni sirevi kačkavalj krstaš proizvedeni sa uobičajenim i smanjenim sadržajem soli, kao i delimičnom zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom su pripadali grupi polutvrdih sireva prema sadržaju vode u bezmasnoj materiji sira (54 – 69%) i grupi punomasnih sireva prema sadržaju masti u suvoj materiji. Prema ovim parametrima, proizvedeni sirevi u potpunosti zadovoljavaju zahteve nacionalnog standarda za ovu vrstu sira.
- Između ispitivanih varijanti sireva nije bilo značajnih razlika u pogledu sadržaja suve materije, mlečne masti, mlečne masti u suvoj materiji, vode u bezmasnoj materiji sira i ukupnih proteina. Na osnovu ovih rezultata se zaključuje da smanjenje sadržaja natrijum-hlorida za 30%, kao i zamena kalijum-hloridom za 30% ne utiče na hemijski sastav sira.
- Smanjenje sadržaja soli, kao i zamena soli u proizvodnji kačkavalj sira, nije pokazalo značajan uticaj na tok primarne i sekundarne proteolize analiziranih sagledavanjem sadržaja rastvorljivih azotnih materija u vodi i fosfovolframskoj kiselini (RN, PTAN, RN/UN, PTA/RN, PTA/UN) i UREA Pag elektroforezom.
- Parametar RN/UN (koeficijent zrelosti sira) se povećavao odmicanjem perioda zrenja. Neposredno nakon proizvodnje RN/UN ispitivanih sireva je iznosio 10,82 – 12,88%, a nakon 30. i 180. dana, 20,08-22,03%, odnosno 31,79-33,42%. Koeficijent zrelosti sireva može da posluži kao jedan od parametara za kontrolu ispunjenja zahteva nacionalnog standarda koji propisuje minimalni period zrenja.
- Sadržaj PTAN, kao i PTA/RN i PTA/UN svih varijanti kačkavalja se konstantno povećavao odmicanjem perioda zrenja. Nakon 30. dana zrenja PTA/RN i PTA/UN ispitivanih sireva se kretao u intervalu od 6,49-7,25%, odnosno 1,30-1,59%. Statistički značajno povećanje je ustanovljeno u drugoj fazi zrenja odnosno nakon 90 dana. Ovo je i očekivano s obzirom da sekundarna proteoliza nastaje delovanjem enzima koji se oslobađaju u drugoj fazi zrenja, a doprinose formiranju malih peptida i slobodnih aminokiselina.
- Tok razgradnje α_{s1} -kazeina i β -kazeina analiziran Urea Pag elektroforezom se nije značajno razlikovao u odnosu na sadržaj i vrstu soli u siru, što je u skladu sa rezultatima koeficijenta zrelosti. Tokom zrenja, ustanovljena je intenzivna razgradnja α_{s1} -kazeina što je pokazano značajnim smanjenjem učešća ove frakcije od 23,39-24,59% neposredno nakon proizvodnje do 16,20-16,59% nakon 180. dana zrenja. Razgradnja β -kazeina je

bila značajno manjeg intenziteta. Ovi rezultati ukazuju na izraženiju aktivnost koagulanata, kao i enzima mikrobiološkog porekla u odnosu na nativni enzim plazmin.

- BMK su veoma važna komponenta kvaliteta sireva, posebno onih proizvedenih tradicionalnim postupkom. Broj BMK se povećavao tokom zrenja svih sireva i 90. dana zrenja je bio između 7 i 8 log cfu/g. U 180. danu zrenja u svim sirevima je utvrđen značajan pad broja BMK. Smanjenje sadržaja soli i delimična zamena natrijum-hlorida kalijum-hloridom nisu pokazali značajan uticaj na broj BMK u sirevima kačkavalj. Ovi rezultati ukazuju na dobru vijabilnost BMK i pri uobičajenom sadržaju soli koji je zastupljen u ovoj vrsti sira.
- Analiza teksture sireva je pokazala da nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolne varijante i varijati sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i sa zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom posmatrajući parametre teksture: tvrdoća, elastičnost, kohezivnost i žvakljivost. Smanjenje tvrdoće ispitanih varijanti kačkavalja je ustanovljeno u 90. danu zrenja što je verovatno posledica intenziviranja proteolitičkih promena sa odmicanjem zrenja. Takođe, rezultati su pokazali da je tokom zrenja ustanovljeno značajno smanjenje elastičnosti svih ispitivanih varijanti kačkavalja.
- Mikrostruktura sirne grude i sireva tokom proizvodnje i zrenja je bila veoma podložna promenama. Sirna gruda pre fermentacije se sastojala od gustih i kompaktnih proteinskih lanaca, a nakon fermentacije, sirna gruda je predstavljena sa više rupa u proteinskom matriksu. Tokom zrenja gustina proteinskog materijala se povećavala, kao i veličina i broj šupljina u svim uzorcima sireva. Smanjenje i delimična zamena sadržaja natrijum-hlorida u sirevima nisu pokazali uticaj na mikrostrukturu koja je ispitivana skenirajućom elektronskom mikroskopijom.
- Pokazano je da nema statistički značajnih razlika u pogledu L^* , a^* i b^* parametara između kontrolne varijante i varijati sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i sa zamenom natrijum-hlorida kalijum-hloridom. Međutim, postojale su značajne razlike tokom 180 dana zrenja, gde je utvrđeno smanjenje vrednosti L^* i povećanje vrednosti a^* i b^* .
- Primenom 3D skeniranja sireva analizirano je smanjenje zapremine tokom perioda zrenja. Ova savremena metoda ispitivanja je ukazala na značajne razlike u smanjenju zapremine kontrolne varijante sireva i onih proizvedenih sa smanjenim i delimično zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida. U periodu od 30. do 180. dana zrenja smanjenje zapremine je bilo izraženo u intervalu od 8,44% do 10,98%. Primena ovih metoda su u razvoju, stoga su dalja istraživanja neophodna kako bi se one uvrstile u redovne kontrole kvaliteta proizvoda.
- Bioaktivnost je posmatrana sagledavanjem antimikrobne, antioksidativne i ACE inhibitorne aktivnosti i po prvi put je ispitivana u sirevima kačkavalj proizvedenih tradicionalnim postupkom.
- Najveća antimikrobna aktivnost je ustanovljena u varijanti sireva sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida u odnosu na druge dve varijante. Ova varijanta sira je 30. dana zrenja pokazala antimikrobnost prema svim ispitivanim bakterijama i kvascu. Antimikrobna aktivnost se povećavala tokom perioda zrenja.

- Antioksidativna aktivnost, ispitivana metodama ABTS i DPPH, je bila najveća kod varijante sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida pri svim koncentracijama proteinskog ekstrakta tokom zrenja. Kontrolna varijanta kačkavalja je imala najmanju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost u svim ispitivanim tačkama zrenja. Potrebna su detaljnija ispitivanja bioaktivnosti kako bi se utvrdio razlog ustanovljenih razlika usled smanjenja sadržaja natrijum-hlorida.
- ACE inhibitorna aktivnost se nije značajno razlikovala između ispitivanih varijanti kačkavalja sa različitim sadržajem natrijum-hlorida. Tokom zrenja, ACE inhibitorna aktivnost se značajno povećavala kod svih varijanti sireva i na kraju zrenja, u 180. danu se kretala u intervalu od 79,38% do 82,57%. Razlog ovome je što se tokom zrenja povećava proteoliza i nastaju manja peptidna jedinjenja koja mogu pokazati antihipertenzivnu aktivnost.
- Senzorna analiza primenom korigovanog petobalnog bod sistema je pokazala da uticaj smanjenja sadržaja soli, kao i zamene natrijum-hlorida kalijum-hloridom, nije bio statistički značajan. Sagledavajući rezultate ispitivanja može se zaključiti da svi ispitivani sirevi pripadaju grupi sireva odličnog kvaliteta sa izraženim pozitivnim svojstvima.
- Primenom hedonske skale za ispitivanje prihvatljivosti sireva od strane potrošača, ustanovljena je manja prihvatljivost kontrolnog uzorka u odnosu na dve eksperimentalne varijante, bez obzira na period zrenja. Naime, ukupna dopadljivost, kao i dopadljivost ukusa i teksture je bila veća kod uzoraka sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida, kao i zamenjenim sadržajem u odnosu na kontrolu. Sagledavanjem srednje vrednosti ocena zaključuje se da su sve u zoni dopadanja, odnosno da nijedna ocena nije manja od 7, a razlike između minimuma i maksimuma nisu bile veće od jednog podeoka na skali od 9 podeoka.
- Sagledavajući rezultate primenjene skale „upravo onako kako odgovara“, većina JAR frekvencija ("kako odgovara") su preko 80%, što ukazuje na to da ispitivanoj grupi potrošača određeno ispitivano svojstvo bilo prihvatljivo. Upoređivanjem vrednosti učestalosti za odgovore „kako odgovara“ ispitivanih varijanti kačkavalja, ustanovljeno je da su vrednosti kontrole bile niže od 80%, za razliku od varijanti sireva sa smanjenim i zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida, 30. i 180. dana zrenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja dopadljivosti primenom hedonske skale. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se u budućim istraživanjima mogu vršiti ispitivanja sa većim smanjenjem sadržaja soli u proizvodnji ove vrste sira.
- Analizom pada vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti pokazalo se da je kontrolni uzorak ocenjen kao manje prihvatljiv za potrošače. Kontrolni uzorak je u oba slučaja (30. i 180. dana) ocenjen kao “previše slan” od značajnog broja testiranih potrošača. Takođe, kontrolnom uzorku je značajan broj potrošača 180. dana dao ocenu da ima “previše izražen ukus”.

- Na osnovu razmatranja svih rezultata ispitivanja uticaja smanjenja sadržaja natrijum-hlorida u proizvodnji kačkavalja može se zaključiti da je varijanta sira sa smanjenim sadržajem soli od 30% preporučena za proizvodnju ove vrste sira, a u skladu je sa preporukama savremenog načina ishrane. Svojstva obe varijante sireva, proizvedenih sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida i zamenjenim sadržajem natrijum-hlorida kalijum-hloridom, nisu pokazala značajna odstupanja u kvalitetu u odnosu na tradicionalno proizveden sir sa uobičajenim sadržajem soli. Pored toga, varijanta sireva sa 30% smanjenim sadržajem natrijum-hlorida je pokazala najbolja svojstva bioaktivnosti, posebno u pogledu antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Sirevi sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida su visoko ocenjeni u pogledu senzornog kvaliteta, kako od strane ekspertskog panela, tako i od strane potrošača.

7. LITERATURA

Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S.T., Arvízu, S.M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., Amaya-Llano, S. (2013). Influence of probiotic strains added to Cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33, 191–197.

Aburto, N. J., Ziolkovska, A., Hooper, L., Elliott, P., Cappuccio, F. P., Meerpohl, J. J. (2013). Effect of lower sodium intake on health: Systematic review and meta-analyses. *British Medical (Association) Journal*, 346(3), f1326.

Adamowicz, J. L., Vélez-Bermúdez, M. E., Thomas, E. B. K., Kershaw, K. N., Kiefe, C. I., Allen, N. B., Whitaker, K. M. (2023). Psychological resources and incident hypertension in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Health Psychology*, 42(6), 368–377. <https://doi.org/10.1037/hea0001291>

Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferranti, P., Malorni, A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 59, 401–411.

Akalin, A. S. (2014). Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 79–95.

Akhtar, S. (2017). Pesticides Residue in milk and milk products: Mini review. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 18, 37–45.

Alichanidis, E., Polychroniadou, A. (2008). Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Sci. Technol.* 88, 495–510.

Anagnostopoulos, A. K., Tsangaris, G. T. (2018). Feta cheese proteins: Manifesting the identity of Greece's National Treasure. *Data in Brief*, 19, 2037–2040.

Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50, 45-55.

Andronoiu, D.G., Botez, E., Nistor, O.V., Mocanu, G.D. (2015). Ripening process of Cascaval cheese: compositional and textural aspects. *J Food Sci Technol.*, 52(8), 5278-5284.

Appel, L. J., Anderson, C. A. M. (2010). Compelling evidence for public health action to reduce salt intake. *New England Journal of Medicine*, 362(7), 650–652. <https://doi.org/10.1056/NEJMe0910352>

Appel, L. J., Moore, T. J., Obarzanek, E., Vollmer, W. M., Svetkey, L. P., Sacks, F. M., Bray, G. A., Vogt, T. M., Cutler, J. A., Windhauser, M. M., Lin, P. H., Karanja, N. (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *The New England Journal of Medicine*, 336, 1117–1124.

Aran, N. (1998). A microbiological study of Kashar cheese. *Milchwissenschaft* 53, 565-568.

- Arboatti, A. S., Olivares, M. L., Sabbag, N. G., Costa, S. C., Zorrilla, S. E., Sihufe, G. A. (2014). The influence of sodium chloride reduction on physicochemical, biochemical, rheological and sensory characteristics of Mozzarella cheese. *Dairy Science & Technology*, 94(4), 373 – 386.
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., Fox, P. F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: proteolysis, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4th edn, ed. by McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD and Everett DW. Elsevier Ltd, London, 445–482.
- Ardo, Y., Pripp, A. H., Lillevang, S. K. (2009). Impact of heat treated *Lactobacillus helveticus* on bioactive peptides in low fat, semi hard cheese. *Australain Journal of Dairy Technology*, 64, 58–62.
- Arima, H., Barzi, F., Chalmers, J. (2011). Mortality patterns in hypertension. *Journal of Hypertension*, 29, S3-S7.
- Arruda, M. S., Silva, F. O., Egito, A. S., Silva, T. M. S., Lima, J. L., Porto, A. L. F. (2012). New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *Food Science and Technology*, 49, 73–79.
- Atanasova, J., Ivanova, I. (2010). Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins. *Biotechnol. Equip.*, 24, 1799–1803.
- Aydemir O., Harth H., Weckx S., Dervisoglu M., De Vuyst L. (2015). Microbial communities involved in Kasar cheese ripening. *Food Microbiology*, 46, 587-595.
- Ayyash, M. M., Shah, N. P. (2011a). The effect of substitution of NaCl with KCl on chemical composition and functional properties of low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3761–3768.
- Ayyash, M. M., Sherkat, F., Shah, N. P. (2012). The effect of NaCl substitution with KCl on Akawi cheese: Chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4747–4759.
- Ayyash, M., Sherkat, F., Shah, N. (2013). Effect of partial NaCl substitution with KCl on the texture profile, microstructure, and sensory properties of low-moisture mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research*, 80(1), 7-13. doi:10.1017/S002202991200043X
- Ayyash, M.M., Shah, N. P. (2011b). Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3769–3777.
- Balabanov , A., Ivanov, G., Goranov, B., Ivanova, M., Balabanova, T. (2023). Influence of salt concentration on microbial growth in Kashkaval cheese 1, *BIO Web of Conferences* 58, 01004
- Bansal, V., Mishra, S. K. (2020). Reduced-sodium cheeses: Implications of reducing sodium chloride on cheese quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 19, 733– 758.
- Baptista, D. P., da Araújo F. D. S., Eberlin, M. N., Gigante, M. L. (2017). A survey of the peptide profile in prato cheese as measured by MALDI-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Food Science*, 82, 386–393.

- Baptista, D. P., Negrão, F., Eberlin, M. N., Gigante, M. L. (2020). Peptide profile and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Prato cheese with salt reduction and *Lactobacillus helveticus* as an adjunct culture. *Food Research International*, 133, 109–190.
- Baptista, D., P., Gigante, M., L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of Science Food and Agriculture*, 101, 4010–4017.
- Beaglehole, R., Bonita, R., Horton, R., Adams, C., Alleyne, G., Asaria, P., Baugh, V., Bekedam, H., Billo, N., Casswell, S. (2011). Priority actions for the non-communicable disease crisis. *LANCET -LONDON-*, 377(9775), 1438–1447.
- Benkerroum, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 320–338.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Beresford, T., Cogan, T. M. (1997). Improving cheddar cheese flavour. 5th cheese Symposium, Cork, Ireland, Ed: Cogan, T.M., Fox P.F. and Ross, R.P., 53–61.
- Beresford, T., Williams, A., (2004). The microbiology of cheese ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* Third ed., General Aspects, vol. 1. Elsevier Applied Science, London, UK, 287–317.
- Bibbins-Domingo, K., Chertow, G. M., Coxson, P. G., Moran, A., Lightwood, J. M., Pletcher, M. J., Goldman, L. (2010). *The New England Journal of Medicine*, 362(7), 590–599.
- Bibiana, J., Trujillo, A. J., Ferragut, V. (2022). The Effect of Salt Reduction and Partial Substitution of NaCl by KCl on Physicochemical, Microbiological, and Sensorial Characteristics and Consumers' Acceptability of Semi-Hard and Hard Lactose-Free Cow's Milk Cheeses. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.861383>
- Birkemo, G. A., O'Sullivan, O., Ross, R. P., Hill, C. (2009). Antimicrobial activity of two peptides caseicin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 233–240.
- Bisig, W. (2017). The importance of salt in the manufacturing and ripening of Cheese. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Bonanno, A., Tornambè, G., Bellina, V., Pasquale, C., Mazza, F., Maniaci, G., Grigoli, A. (2013). Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. *Journal of Dairy Science*, 96, 710–724.
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., Marchelli, R., Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water-soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 64, 953–958.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17, 968–975.

- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D. (2008). Occurrence of the angiotensin-converting enzyme inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29–38.
- Cagno, R., Pasquale, I., Angelis, M., Gobbetti, M. (2012). Accelerated ripening of Caciocavallo Pugliese cheese with attenuated adjuncts of selected nonstarter lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 95, 4784–4795.
- Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16(2), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.012>
- Campos, M. I. F., Barbosa, P. P. D. S., Camargo, L. J., Pinto, L. D. S., Mataribu, B., Serrão, C., Marques-Santos, L. F., Lopes, J. H., Oliveira, J. M. C. D., Gadelha, C. A. D. A., Santi-Gadelha, T. (2022). Characterization of goat whey proteins and their bioactivity and toxicity assay. *Food Bioscience*, 46, 101591.
- Cappuccio, F. P., Capewell, S., Lincoln, P., McPherson, K. (2011). Policy options to reduce population salt intake. *BMJ*, 343, d4995. <https://doi.org/10.1136/bmj.d4995>
- Caric, M. (1993). Ripened cheese varieties native to the Balkan countries. In P. F. Fox (Ed.) (2nd ed., Vol. 2. Cheese: Chemistry, physics and microbiology (pp. 263–279). London, UK: Chapman & Hall.
- CDC (2018). National Center for Health Statistics. Underlying cause of death, 1999–2017. CDC WONDER Online Database. <https://wonder.cdc.gov/>
- CDC (2012). Vital signs: Food categories contributing the most to sodium consumption - United States, 2007–2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61(5), 92–98.
- Charlton, K., Yeatman, H., Houweling, F., Guenon, S. (2010). Urinary sodium excretion, dietary sources of sodium intake and knowledge and practices around salt use in a group of healthy Australian women. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 34(4), 356–363.
- Chavhan, G. B., Kanawjia, S. K., Khetra, Y., Puri, R. (2015). Effect of potassium-based emulsifying salts on sensory, textural, and functional attributes of low-sodium processed mozzarella cheese. *Dairy Science and Technology*, 95, 265–278.
- Chen, L., Li, Y., Li, J., Xu, X., Lai, R., Zou, Q. (2007). An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Peptides*, 28, 1527–1531.
- Chen, P., Liu, L., Zhang, X., Fanny Massounga Bora, A., Li, X., Zhao, M., Hao, X., Wang Y. (2019). Antioxidant activity of Cheddar cheese during its ripening time and after simulated gastrointestinal digestion as affected by probiotic bacteria. *International Journal of Food Properties*, 22, 218–229.
- Chevanan, N., Muthukumarappan, K., Upreti, P., Metzger, L.E. (2006). Effect of calcium and phosphorus, residual lactose and salt-to-moisture ratio on textural properties of cheddar cheese during ripening. *J. Texture Stud.*, 37, 711–730.
- Choi, J. W., Park, J.S., Lee, C.H. (2020). Interactive effect of high sodium intake with increased serum triglycerides on hypertension. *PLOS ONE* 15(4), e0231707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231707>

- Christensen, T. M. J. E., Betch, A. M., Werner, H., (1991). Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. *Bull. IDF*, 261, 1–9.
- Colin-Cruz, M.D.L.A., Dublan-Garcia, O., Espinoza-Ortega, A., Dominguez-Lopez, A. (2012). The effect of varying fat content on the microstructure of Oaxaca cheese, a typical pasta filata cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00735.x>
- Coppola, R. C., Succi, M., Sorrentino, E., Iorizzo, M., Grazia, L. (2003). Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise. *Lait* 83, 211e222.
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J., Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55.
- Corrigan, B.M., Kilcawley, K.N., Sheehan, J.J. (2021), Validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantification of primary proteolysis during cheese maturation. *International Journal of Dairy Technology*, 74(4), 671-689. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12765>
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N., Gueguen, M. (1998). An ecology study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4729-4735.
- Corsetti, A., Corbo, M. R., Albenzio, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Fox, P. F. (2001). Microbiology and biochemistry of Caciocavallo Silano cheese. *Italian Journal of Food Science*, 13, 297-309.
- Costabel, L., M., Bergamini, C. V., Pozza, L., Cuffia, F., Candioti, M. C., Hynes, E. (2015). Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*, 16, 1–10.
- Cozier, Y., Allain, C., Xavier, C., Depuille, L., Caillot, A., Delattre, L., Lunginbuhl, T., Faverdin P. (2019). Volume and surface of Holstein dairy cows calculated from complete 3D shapes acquired using a high-precision scanning system: Interest for body weight estimation. *Computers and Electronics in Agriculture*, 165, 104977.
- Crow, V. L., Martely, G. F., Sally, T. C., Roundhill, J. (1995). The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 5, 451–472.
- Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Pollonio, M. A. R., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Granato, D., Shah, N. P. (2011). Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 276–291. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.003>
- Dallas, D. C., Guerrero, A., Khaldi, N., Castillo, P. A., Martin, W. F., Smilowitz, J. T., Bevins, C. L., Barile, D., German, J. B., Lebrilla, C. B. (2013). Extensive in vivo human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. *Journal Proteome Research*, 12, 2295–2304.
- Danilović, B., Milosavljević, N., Cvetković, D., Savić, D. (2020). Lactic acid bacteria microbiota of “Piroć” s Kashkaval. *Italian Journal of Food Science*, 32, 743-754.

- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. R., Gobbetti, M. (2001). Characterization of nonstarter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 2011-2020.
- De Azambuja, N. C., Moreno, I., Gallina, D. A., Spadoti, L. M., Motta, E. M. P., Pacheco, M. T. B. (2017). Effect of Adjunct Culture *Lactobacillus helveticus* (B02) on the Composition, Proteolysis, Free Amino Acids Release and Sensory Characteristics of Prato Cheese. *Food Nutre Science*, 08, 512–525.
- Dinkçi, N., Kesenkaş, H., Seçkin, A. K., Kınıka, Ö., Gönç, S. (2011). Influence of a vegetable fat blend on the texture, microstructure and sensory properties of kashar cheese. *Grasas y Aceites*, 62(3), 275-283. <https://doi.org/10.3989/gya.091810>
- Djekic, I., Dimitrijevic, B., Smigic, N. (2023). Consumer complaints associated with food quality. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 18, 57–69.
- Donkor, O. N., Henriksson, A. Singh, T. K. Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321–1331.
- Dötsch, M., Busch, J., Batenburg, M., Liem, G., Tareilus, E., Mueller, R., Meijer, G. (2009). Strategies to reduce sodium consumption: A food industry perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(10), 841–851.
- Doyle, M. E., Glass, K. A. (2010). Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 44–56.
- Dozet, N., Maćej, O., Jovanović, S. (2004). Autochthonous milk products basis for specific, original milk products development in modern conditions. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 20(3-4), 31-4.
- Du Vale, L. I., Castelli, H. (2013). Handbook on Cheese: Production, Chemistry and Sensory Properties. New York: Nova Science Publishers, Inc (Food Science and Technology). Available at: <https://ezproxy.nb.rs:2076/login.aspx?direct=true&db=e000ttww&AN=633017&site=eds-live>.
- Dugat-Bony, E., Bonnarme, P., Fraud, S., Catellote, J., Sarthou, A. S., Loux, V., Rué, O., Bel, N., Chuzeville, S., Helinck, S. (2019). Effect of sodium chloride reduction or partial substitution with potassium chloride on the microbiological, biochemical and sensory characteristics of semi-hard and soft cheeses. *Food Research International*, 125, 108643.
- EFSA (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf.
- El-Gendy, M. S., Abdel-Galil, Y., Hegazi, Z. F. (1983). Characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria, in particular lactobacilli, leuconostocs and pediococci, isolated from salted raw milk. *Journal Food Protection*, 46, 429-433.
- Eroglu, A., Dogan, M., Toker, O. S., Yilmaz, M. T. (2015). Classification of Kashar cheeses based on their chemical, color and instrumental textural characteristics using principal component and hierarchical cluster analysis. *International Journal of Food Properties*, 18, 909–921.
- Helias, A., Bernard, O. (2007). Assessing the main reactions in bioprocess: applications in cheese ripening. *IFAC Proceedings*, 40, 187–194.

EU (2006). Council Regulation. COUNCIL REGULATION (EC) No 509/2006 of 20 March 2006 on agricultural products and foodstuffs as traditional specialties guaranteed. Official Journal of the European Union 2006 p. 93/1–93/10. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/509/oj>

Fadaei, V. (2012). Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Annual Biology Research*, 3, 2520–2526.

Farkye, N.Y., Guinee, T.P. (2017). Low-Fat and Low-Sodium Cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press & Elsevier: London, UK, 1., 699–711.

Felicio, T. L., Esmerino, E. A., Vidal, V. A. S., Cappato, L. P., Garcia, R. K. A., Cavalcanti, R. N., Freitas, M. Q., Conte, C. A. Jr., Padilha, M.C., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Arellano, D. B., Bollini, H. M. A., Pollonio, M. A. R., Cruz, A. G. (2016) . Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, 196(1), 628-637.

Fialho, T., L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Hilsdorf Piccoli, R., De Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese, *Food Research International*, 107, 406–413.

FIL-IDF (1988). Determination of chloride content, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

FIL-IDF (2004). Cheese and processed cheese — Determination of the total solids content (Reference method), International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

FIL-IDF (2008). Cheese - Determination of fat content - Butyrometer for Van Gulik method, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

FIL-IDF (2014). Milk and milk products, Determination of nitrogen content (Kjeldahl principle and crude protein calculation), International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

Fischer, P. W., Vigneault, M., Huang, R., Arvaniti, K., Roach, P. (2009). Sodium food sources in the Canadian diet. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(5), 884–892.

Fitz Gerald, R. J. Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118–125.

Fitzgerald, E., Buckley. J. (1985). Effect of total and partial substitution of sodium chloride on the quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 68, 3127–3134.

Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S., I. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043–1048.

Fox, P., F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2000). Fundamentals of Cheese Science, 13-14. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc.

Gagnaire, V., Carpino, S., Pediliggieri, C., Jardin, J., Lortal, S., Licitra, G. (2011). Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of Ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 59, 12443–12452.

- Galli, B. D, Baptista, D. P, Cavaleiro, F. G., Negrão, F., Eberlin, M. N., Gigante, M.,L. (2019). Peptide profile of Camembert-type cheese: effect of heat treatment and adjunct culture. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Food Research International*, 123, 393–402.
- Gandhi A., Shah N. (2016). Salt Reduction in a Model High-Salt Akawi Cheese: Effects on Bacterial Activity, pH, Moisture, Potential Bioactive Peptides, Amino Acids, and Growth of Human Colon Cells. *Journal of Food Science*, 81(4), H991-H1000.
- Ganesan, B., Brown, K., Irish, D. A., Brotherson, C., McMahon, D. J. (2014). Manufacture and sensory analysis of reduced- and low-sodium cheddar and mozzarella cheeses. *J Dairy Sci*, 97, 1970–1982.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173–188.
- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M. R., Matarante, A., Considine, T., Di Cagno, R., Guinee, T., Fox, P. F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 12, 51-523.
- Gomez, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697–706.
- Gomez-Ruiz, J .A., Ramos, M., Recio, I. (2004). Angiotensin convertingenzyme-inhibitory activity of peptides isolate from Manchego cheese. Stability under simulated gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14, 1075–1080.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research Technology*, 223, 595–601.
- Gomez-Ruiz, J., Lopez-Exposito I., Pihlanto A, Ramos M., Recio I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research Technology*, 227, 1061–1067.
- Grimes, C. A., Campbell, K. J., Riddell, L. J., Nowson, C. A. (2011). Sources of sodium in Australian children’s diets and the effect of the application of sodium targets to food products to reduce sodium intake. *British Journal of Nutrition*, 105(3), 468–477.
- Grummer, J., Karalus, M., Zhang, K., Vickers, Z., Schoenfuss, T. C. (2012). Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2830-2839.
- Guerrero, L., Guardia, M. D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans , S., Sajdakowska , M., Sulmont-Rossé, C., Issanchou, S., Contel, M., Scalvedi, M.L., Granli, B.S., Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.11.008>
- Guinee, P., Pudja, P., Miocinovic, J., Wiley, J., Mullins, C.M. (2015). Textural and cooking properties and viscoelastic changes on heating and cooling of Balkan cheeses. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7573-7586.

- Guinee, T. P., Fox, P. F. (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: PF Fox, editor, London, UK: Elsevier Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 1, 207-259.
- Guinee, T. P., O’Kennedy, B. T. (2007). Mechanisms of taste perception and physiological controls. In *Reducing Salt in Foods: Practical Strategies*; Guinee, T.P., O’Kennedy, B.T., Eds.; Woodhead Publishing: Boca Raton LA, USA, 246–287.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 339–347.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R. B. (2013). ACE-inhibitory activity of cheddar cheeses made with adjunct cultures at different stages of ripening. *Advances in Dairy Research*, 101-102.
- Hannon, J.A., Deutsch, S.M., Madec, M.N., Gass, J.Y., Chapot-Chartier, M.P. (2006). Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli, *International Dairy Journal*, 16, 324–334.
- Haque, E., Chand, R., Kapila, S. (2009). Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Review International*, 25, 28–43.
- Hasanzadeh, A., Raftani Amiri, Z., Aminifar, M. (2018). Changes in the physicochemical, microstructural and rheological properties of traditional Kope cheese during ripening. *Int J Dairy Technol*, 71, 347-355. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12434>
- Hashem, K. M., He, F. J., Jenner, K. H., MacGregor, G. A. (2014). Cross-sectional survey of salt content in cheese: A major contributor to salt intake in the UK. *British Medical (Association) Journal (BMJ Open)*, 4(8), e005051.
- Hayaloglu A. A., Guven, M., Fox, P. F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese „Beyaz Peynir“. *International Dairy Journal*, 12, 635-648.
- Hayaloglu, A. A., Deegan. K. C., McSweeney, P. L. H. (2010). Effect of milkpasteurization and curd scalding temperature on proteolysis in Malatya Halloumi-type cheese. *Dairy Science Technology*, 90(1), 99–109.
- Hayaloglu, A., Karabulut, I. (2013). Primary and secondary proteolysis in eleven Turkish cheese varieties. *International Journal of Food Properties*, 16(8), 1663-1675. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.604890>
- He, F. J., Li, J., MacGregor, G. A. (2013). Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, CD004937. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004937.pub2>
- He, F. J., MacGregor G. A. (2007). Dietary salt, high blood pressure and other harmful effects on health. In: Kilcast D, Angus F, editores. *Reducing salt in foods: Practical strategies*. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited, CRC Press, 18-54.
- He, F. J., Tan, M., Ma, Y., MacGregor, G.A. (2020). Salt reduction to prevent hypertension and cardiovascular disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*, 75(6), 632-647.
- Hendriksen, M. A. H., Hoogenveen, R. T., Hoekstra, J., Geleijnse, J. M. Boshuizen, Hendriek C., van Raaij, J. M. A. (2014). Potential effect of salt reduction in processed foods on health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 446-453. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.062018>

- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque3, D., Spinnler, H.E., Lozano, López-del Castillo, Martín del Campo, S., T. (2016). Angiotensin converting enzyme inhibitors and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85-91.
- Hernandez-Ledesma B., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolyzates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 588–593.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Amigo, L. (2008). β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*. 35, 257–265.
- Higurashi, M., Ishida, T., Kinoshita, K. (2008). Identification of transient hub proteins and the possible structural basis for their multiple interactions, *Protein Science*, 17, 72-78.
- Hinz, K., O'Connor, P. M., O'Brien, B., Huppertz, T., Ross, R.P., Kelly, A. L. (2012). Proteomic study of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made from milk over a lactation cycle. *J. Dairy Res.*, 79, 176–184.
- Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Smolenskia, G., Prosser, C. G. (2019). Gastric digestion of cow and goat milk: Peptides derived from simulated conditions of infant digestion. *Food Chemistry*, 276, 619–625.
- Hoffmann, I. S., Cubeddu, L. X. (2009). Salt and the metabolic syndrome. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 19(2), 123–8. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.02.011>
- Hristov, S., Stanković, B., Relić, R. (2005). Clinical and subclinical mastitis in cows. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21(1-2), 29-39.
- Hsieh, C. C., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tomé, S., Weinborn, V., Barile, D., De Moura Bell, J. M. L. N. (2015). Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: Effects against the 21st century disorders. *Biomedical Research. International*, 146840.
- Hui, Y.H., Evranuz, E.Ö (2012). Handbook of animal-based fermented food and beverage technology (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12084>
- Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I., Khan, M. I. (2018). Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31, 287–292.
- Inda, A. E. (2000). Performance Optimization and Safety Assurance in the Cheese Industry; Organization of American States (OEA): Saltillo, Mexico.
- Institut za Standardizaciju Srbije (1997). Kačkavalj – Uslovi Kvaliteta, SRPS E.C2.010. Inst. Stand, Srbija, Beograd.
- ISO 8589:2007. Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization, Geneva.
- Ivanova, M., Markova, A., Ivanov, G. (2021a). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of cow's milk Kashkaval cheese ripened at different temperatures *Food Research* 5, 308.

- Ivanova, M., Dinkov, K., Ivanova, I., Uzunova, G., Menkov, N. (2021b). Impact of refrigerated curd on Kashkaval quality I. chemical characteristics. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 13(2), 54-63.
- Iwaniak, A., Mogut, D. (2020). Metabolic Syndrome-Preventive Peptides Derived from Milk Proteins and Their Presence in Cheeses: A Review. *Applied Sciences*, 10(8), 2772. <https://doi.org/10.3390/app10082772>
- Jansson, T., Waehrens, S.S., Rauh, V., Danielsen, B.P., Sørensen, J., Bredie, W.L., Petersen, M.A., Ray, C.A., Lund, M.N. (2019). Effect of green tea catechins on physical stability and sensory quality of lactose-reduced UHT milk during storage for one year. *International Dairy Journal*, 95, 25–34.
- Jao, C. L., Huang, S. H., Hsu, K. C. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. *BioMedicine*, 2, 130–136.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491–511.
- Jo, Y., Benoist, D. M, Ameerally, A., Drake, M. A. (2018). Sensory and chemical properties of Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1967-1989. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13637>
- Jordan, K. N., Cogan, T. M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Ir. Journal Agr. Food Research*, 32, 47-55.
- Jordana, J. (2000). Traditional foods: challenges facing the European food industry. *Food Research International*, 33(3–4), 147-152. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00028-4).
- Kalle, A., Lambropoulos, I., Bourazas, K., Roussis, I. G. (2024). Antioxidant Activity and Peptide Levels of Water-Soluble Extracts of Feta, Metsovone and Related Cheeses. *Applied Sciences*, 14(1), 265. <https://doi.org/10.3390/app14010265>
- Kamber, U. (2008). Traditional cheeses of Turkey: cheeses common to all regions. *Food Reviews International*, 24(1), 1-38. <https://doi.org/10.1080/87559120701761833>
- Karimi, M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., Safari, M. (2009). Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of ultrafiltered-feta cheese. *Food Chemistry*, 113 424–434.
- Katsiari, M.C, Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., Roussis, I. G. (2001). Proteolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*, 73(1) 31-43. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00275-2)
- Khetra, Y., Kanawjia, S. K., Puri Kumar, R., Meena, G. S. (2019). Using taste induced saltiness enhancement for reducing sodium in Cheddar cheese: Effect on physico-chemical and sensorial attributes. *International Dairy Journal*, 91, 165–171.
- Kindstedt, P. S., Hillier, A. J., Mayes, J. J. (2010). Technology, Biochemistry and Functionality of Pasta Filata/Pizza Cheese. In *Technology of Cheesemaking* (eds B.A. Law and A.Y. Tamime), 330-359. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch9>

- Kindstedt, P., Caric, M., Milanovic, S. (2004). Pasta-Filata cheeses. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, T. M. Cogan, T. P. Guinee (Eds.), London, UK : Elsevier Ltd. Cheese: Chemistry, physics and microbiology, 1, 251 – 277.
- Kinsella, J. E., Whitehead, D. M. (1989). Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. In Advances in Food and Nutrition Research; Academic Press, Inc.: Cambridge, MA, USA, 343–438.
- Kocak, A., Sanli, T., Anli, E. A., Hayaloglu, A. A. (2020). Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white brined goat milk cheese. *LWT - Food Science Technology*, 123, 109-127.
- Kožev, A. (2006). Kashkaval. Pareni sirena. IK “Enovche”, Sofija.
- Kuchroo, C. N., Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese. Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331-335.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Oki, T. (2001). Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO 13953. *J. Jpn. Soc. Food Science Technology*, 48, 44–50.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., Straus, S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- Kuo, M. I., Gunasekaran, S. (2009). Effect of freezing and frozen storage on microstructure of mozzarella and pizza cheeses. *LWT*, 42, 9–16.
- Kurćubić, V., Vujić, J., Ilić, M., Vranić, D., Vesković-Moračanin, S., Mašković, P. (2015). Effect of plant extracts *Kitaibelia vitifolia* on antioxidant activity, chemical characteristics, microbiological status and sensory properties of Pirotski kachkaval cheese. *Hemijska industrija*, 69(1), 85-93.
- Lavasani, A. S. (2022). The quality and composition of Iranian low-salt UF-white cheese. *Journal of Food Quality*, 2022, 1–13.
- Lawless, H. T., Heymann, H. (2010). Sensory evaluation of food: Principles and practices (2nd ed.). New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Licitra, G., Radulovic, Z., Miocinovic, J., Uzunsoy, I., Ozer, B., Bintsis, T., Alichanidis, E., Herian, K., Jelen, P. (2017). Pasta-Filata Cheeses. *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, 368-391. <https://doi.org/10.1002/9781119046165.ch8>
- Liu, S., Puri, V.M. (2008). pH spatial distribution model during ripening of Camembert cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1528–1534.
- Lopez-fandino, R., Otte, J., van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with anti-hypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277–1293.
- Lu, R., Abbott, A. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture, in texture in food. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC., Cambridge.

- Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., Lucey, J. A. (2016). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *Journal Dairy Science*, 99, 41–52.
- Lu, Y., McMahon, D. J. (2015). Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 98, 78–88.
- Lucan, M., Ranilovic, J., Slacanac, V., Cvetkovic, T., Primorac, L., Gajari, D., Tomic Obrdalj, H., Jukic, M., Lukinac Cacic, J. (2020). Physicochemical properties, Spreadability and consumer acceptance of low-sodium cream cheese. *Mljekarstvo/Dairy*, 70, 13–27.
- MacDonald-Wickset, L. K., Wood, L. G., Gang, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046–2056.
- Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, M. E. (2005). Rheology, microstructure and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88, 3052–3062.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1316–21.
- Mančić, J., Mančić, A. (2005). Tehnologija prerade mleka, Sirarstvo. Mlekarska škola “Dr Obren Pejić”, Pirot, treće izdanje.
- Marino M., Maifreni M., Rondinini G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* 229, 133–140.
- McMahon, D. J., Oberg, C. J., Drake, M. A., Farkye, N., Moyes, L. V., Arnold, M. R., Ganesan, B., Steele, J., Broadbent, J. R. (2014). Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4780–4798. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8071>
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N., Cogan, T. M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613–634.
- McSweeney, P. L. H., Lynch, C. M., Walsh, E. M., Fox, P. F., Jordan, K. N., Cogan, T. M., Drinan, F. D. (1995). Role of non-starter lactic bacteria in Cheddar cheese ripening. 4th Symposium, Cork, Ireland, Ed: Cogan, T. M., Fox, P.F., Ross, R. P., 32–44.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Correa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48, 322–329.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovinemilk proteins. *Current Medical Chemistry*, 12, 1905–1919.
- Meisel, H., Goepfert A., Günther S. (1997). ACE- inhibitory activities in milk products. *Milk Science International*, 52, 307–311.

- Mente, A., O'Donnell, M., Rangarajan, S., Dagenais, G., Lear, S., McQueen, M., Diaz, R., Avezum, A., Lopez-Jaramillo, P., Lanas, F., Li, W., Lu, Y., Yi, S., Rensheng, L., Iqbal, R., Mony, P., Yusuf, R., Yusoff, K., Szuba, A., Oguz, A., Rosengren, A., Bahonar, A., Yusufali, A., Schutte, A. E., Chifamba, J., Mann, J., F., E., Anand, S., S., Teo, K., Yusuf, S. (2016). Associations of urinary sodium excretion with cardiovascular events in individuals with and without hypertension: a pooled analysis of data from four studies. *Lancet*, 388(10043), 465–75. Epub 2016/05/25. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30467-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30467-6)
- Meyer, J., Butikofer, U., Walther, B., Wechsler, D., Sieber, R. (2009). Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tri-peptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 92, 826–836.
- Mijacevic, Z., Bulajic, S. (2004). Traditional manufacturing of hard cheese - Kachkaval on Stara planina mountain. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84(1), 11-15.
- Mijačević, Z., Bulajić, S., Božić, T., Niketić, G. (2005a). Pirotski kačkavalj. *Mljekarstvo*, 55(3) 203-213.
- Mijačević, Z., Petrović, M. P., Bulajić, S. (2005b). Specific trait of Pirot kachkaval. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21(5-6), 375-379. <https://doi.org/10.2298/BAH0506375M>
- Milanović, Z. (2006). Srpski sir i kajmak u evropskom okruženju, Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd, 176.
- Mill, J. G., Malta, D. C., Nilson, E. A. F., Machado, Í. E., Jaime, P. C., Bernal, R. T. I., de Magalhães, L. S., Szwarcwald, C. L. (2021). Factors associated with salt intake in the Brazilian adult population: national health survey. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 26(2), 555–567.
- Mills, K. T., Chen, J., Yang, W., Appel, L. J., Kusek, J. W., Alper, A., Delafontaine, P., Keane, M., G., Mohler, E., Ojo, A., Rahman, M., Ricardo, A., Soliman, E. Z., Steigerwalt, S., Townsend, R., He, J. (2016). Sodium Excretion and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *Jama*, 315(20), 2200–10. Epub 2016/ 05/25. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4447>
- Mijacevic, Z., Bulajic, S. (2004). Traditional manufacturing of hard cheese - Kachkaval on Stara planina mountain. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84(1), 11-15.
- Milosavljević, N. (2015). Bakterije mlečne kiseline pirotskog lačkavalja, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu.
- Milosavljević, N., Joković, N., Radulović, N., Blagojević, P., Savić, D. (2010). Isparljiva jedinjenja Pirotskog kačkavalja od ovčijeg mleka. *Preh. ind. – Mleko i ml. proiz.*, 1-2, 122-126.
- Milovanovic, B., Djekic, I., Miocinovic, J., Djordjevic, V., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Mörlein, D., Tomasevic, I. (2020). What is the color of milk and dairy products and how is it measured? *Foods*, 9(11), 1629.
- Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Review*, 27, 308–329.
- Ministry of Health. (2003). Nutrition and the burden of disease: New Zealand 1997–2011. Wellington, New Zealand.

- Miočinović Jelena (2020). Tehnologija mleka II posebno sirarstvo. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu. Copy Centar, Beograd, 119 – 134.
- Miocinović, J., Miloradovic, Z. (2019). Production and characteristics of different types of Serbian cheeses. *Cheeses around the world*, Nova Science Publishers, Inc. New York, ISBN: 978-1-53615-418-4.
- Miocinovic, J., Miloradovic, Z., Radovanovic, M., Sredovic Ignjatovic, I., Radulovic, A. Nastaj, M., Sołowiej, B., Tomasevic, I. (2022). Sodium reduction by partial and total replacement of NaCl with KCl in Serbian white brined cheese. *Foods*, 11(3), 374. <https://doi.org/10.3390/foods11030374>
- Miocinovic, J., Radulovic, Z., Miloradovic, Z., Trpkovic, G., Pesic Mikulec, D., Pavlovic, V. Pudja, P. (2012). Influence of autochthonous lactic acid bacteria on the proteolysis, microstructure and sensory properties of low fat UF cheeses during ripening. *Mljekarstvo*, 62(2), 126-135.
- Miocinovic, J., Radulovic, Z., Paunovic, D., Miloradovic, Z., Trpkovic, G., Radovanovic, M., Pudja, P. (2014). Properties of low-fat ultra-filtered cheeses produced with probiotic bacteria. *Archives of Biological Sciences*, 66, 65-73.
- Mirkovic, M., Mirkovic, N., Miocinovic, J., Radulovic, A., Paunovic, D., Ilic, M., Radulovic, Z. (2021). Probiotic yogurt and cheese from ultrafiltered milk: Sensory quality and viability of free-living and spray dried *Lactiplantibacillus plantarum* 564 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299v. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(9), e15713. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15713>
- Mohan, S., Campbell, N. R. C. (2009). Salt and high blood pressure. *Clinical Science*, 117(1), 1–11.
- Moradi, M., Omer, A. K., Razavi, R., Valipour, S., Guimarães, J. T. (2021). The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. *International Dairy Journal*, 113, 104884.
- Morales-Celayaa, M. F., Lobato-Callerosa, C., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. *LWT*, 45, 132–141.
- Morea M., Baruzzi F., Cocconcelli P. S. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal Applied Microbiology*, 87, 574-582.
- Morea, M., A. Matarante, R. Di Cagno, F. Baruzzi, Minervini, F. (2007). Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *International Dairy Journal*, 17, 525–534
- Morris, R. C., Jr., Schmidlin, O., Frassetto, L. A., Sebastian, A. (2006). Relationship and interaction between sodium and potassium. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(Supp 3), 262S–270S.
- Mozaffarian, D., Fahimi S., Singh G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Engell, R. E., Lim, S., Danaei, G., Ezzati, M., Powles, J. (2014). Global consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.*, 371, 624–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304127>.

- Murray, B. A., FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773–791.
- Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, 232, 673–682.
- Niro, S., Fratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfili, G., Coppola, R. (2014). Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. *Journal of Dairy Science*, 97, 1296–1304.
- Nudda, A., Battaccone, G., Boaventura Neto, O., Cannas, A., Dias Francesconi A. H., Stanislao Atzori, A., Pulina, G. (2014). Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(8), 445–456.
- Nurup, C.N., Czaran, T. L., Rattray, F. P. (2020). A chromatographic approach to understanding the plasmin-plasminogen system in acid whey. *International Dairy Journal*, 106, 104705.
- O'Sullivan, E., Condon S. (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stress in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4210–4215.
- Obligado, S. H., Goldfarb, D. S. (2008). The association of nephrolithiasis with hypertension and obesity: A review. *American Journal of Hypertension*, 21(3), 257–264.
- Ogihara, T., Asano, T., Ando, K., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., Ono, H., Onishi, Y., Fujishiro, M., Abe, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Fujita, T. (2002). High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 40(1), 83–9. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000022880.45113.c9>
- Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y., Yanagida, F. (1995). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience Biotechnology Biochem.*, 59, 1147–1149.
- Olson, D.W., Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Soryal, K.A., Zeng, S.S. (2007). Effects of aging on functional properties of caprine milk made into cheddar- and colby-like cheeses. *Small Ruminant Res.*, 70, 218–227.
- Öner, Z., Aynur, G. K., Hatice, A. (2006). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *Food Science and Technology*, 39, 449–454.
- Ong L., Henriksson A., Shah N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149–165.
- Ong L., Shah N.P., (2008a) Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis, organic acid profiles, and ACE-inhibitory activity of Cheddar cheeses ripened at 4, 8, and 12 °C. *Journal of Food Science*, 73, M111–M120.
- Ong, L., Shah, N. P. (2008b). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT -Food Science and Technology*, 41, 1555–1566.

Ong, L., Shah, N. P. (2009). Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of cheddar cheeses. *Journal of Food Science*, 74(5), S182-91.

Ostojić, M. S., Relić, R., Lazarević, V. (2011). Autochthonous Pirot kackavalj. in Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik. Institut PKB Agroekonomik, Padinska skela., 17(3-4), 79-84.

Ostojic, M., Lazarevic, V., Topisirovic, L., Relic, R. (2012). Name of Pirot cheese cow's milk origin, elaborate, Republic of Serbia: Agricultural Development Fund in the Municipality of Pirot.

Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M., Nielsen, M. S. (2007a). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from lactalbumin and b-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17, 1460–1472.

Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., El-Shabrawy, S. A. (2007b). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17, 488–503.

Panthi, R. R., Jordan, K. N., Kelly, A. L., Sheehan, J. D. (2017). Selection and treatment of milk for cheesemaking. Cheese. *Academic Press*, 23-50.

Pappa, E. C., Kondyli, E., Samelis, J. (2019). Microbiological and biochemical characteristics of Kashkaval cheese produced using pasteurised or raw milk. *International Dairy Journal*, 89, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.011>.

Pejić, O. (1956). Mlekarstvo, B Specijalni deo-sirevi. Naučna knjiga, Beograd.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. 2015. Short communication: Effect of genetic type on antioxidant activity of Caciocavallo cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 98, 3690–3694.

Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Gambacorta, E. (2014). Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 1909-1917.

Peterson, S. D., Marshall, R. T. (1990). Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: a review. *Journal Dairy Science*, 6, 1395e1410.

Petrović, M. P., Ružić-Muslić, D., Žujović, M., Skalicki, Z., & Perišić, P.. (2004). Analysis of the livestock production system present on Stara planina mountain from the aspect of production of hard cheese - kackaval. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 20(1-2), 81-88. <https://doi.org/10.2298/BAH0402081P>

Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 86–97.

Pogačić, T., Kagkli, D. M., Sikora, S., Kalit, S., Havranek, J., Samardžija, D. (2011). Experimental approaches for identification of indigenous lactococci isolated from traditional dairy products. *Mlekarstvo*, 61, 3-14.

Porcellato, D., Brighton, C., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Lefevre, M., Broadbent, J. R., Steele, J. L. (2014). Application of ARISA to assess the influence of salt content and cation type on microbiological diversity of Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2), 207–216. <https://doi.org/10.1111/lam.12263>.

Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura, Sl. glasnik RS, br. 33/2010, 69/2010, 43/2013 - dr. pravilnik i 34/2014.

Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sørhaug, T. (2004). Quantitative structure–activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 219, 579–583.

Pripp, A., H., Sorensen, R., Stepaniak, L., Sorhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses, *LWT - Food Science and Technology*, 39, 677–683.

Pritchard, S. R., Phillips, M. Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43, 1545–1548.

Puđa Predrag (2009). Tehnologija mleka 1, Sirarstvo: opšti deo. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu. Graph Style, Novi Sad, 175-202.

Radovanović, R., Popov Raljić, J. (2001). Senzorna analiza prehrambenih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Radulović Z. (2010). Autohtone bakterije mlečne kiseline kao starter kulture. Monografija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

Radulović, Z., Mirković, M., Paunović, D., Vakanjac, S., Radulović, A., Miočinović, J., Hristov, S. (2017). Effects of corrective measures of the milking hygiene on the quality of cow`s milk. International Symposium of Animal Science, 5.-10. June 2017, Herceg Novi, Montenegro, Abstarct Book, 27.

Radulović, Z., Radin, D., Obradović, D. (2007). Identification of autochthonous lactic acid bacteria from Serbian artisanal cheeses. 3. Slovenian Congress on Food and Nutrition, Radenci, Abstract book, 160.

Rafiq, S., Gulzar, N., Sameen, A., Huma, N., Hayat, I., Ijaz, R. (2021). Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 74(1) 1-16.

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Shahid, M. (2016). Compositional profiling and proteolytic activities in cow and buffalo milk cheddar cheese. *Pakistan Journal of Zoology*, 48, 1141–1146.

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Shahid, M., Xiao, H. (2017). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory and anti-thrombotic activities of solublepeptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 380–388.

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175–182.

- Ramírez-Rivas, I. K., Gutiérrez-Méndez, N., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., Tirado-Gallegos, J. M., Santellano-Estrada, E., Arevalos-Sánchez, M. M., Chávez-Martínez, A. (2022). Effect of Packaging and Salt Content and Type on Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities in Requeson Cheese. *Foods*, 1, 1264.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reddy, K. A., Marth, E.H. (1993). Proteolysis in Cheddar cheese made with sodium chloride, potassium chloride, or mixtures of sodium and potassium chloride. *Food Sci. Technol. (Campinas.)*, 26, 434-442.
- Rehman, S. U., Banks, J. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (2000). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 45-53.
- Revilla, I., González-Martín, M. I., Vivar-Quintana, A. M., Blanco-López, M. A., Lobos-Ortega, I. A., Hernández-Hierro, J. M. (2016). Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 99, 5074-5082.
- Ribeiro, N. G., Lelis, D. F., Griep, R. H., Barreto, S. M., Molina, M. D. C. B., Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Bensenor, I., Lotufo, P. A., Mill, J. G., Baldo, M. P. (2024). Salt Intake in Adults with Diabetes and Hypertension: The Longitudinal Study of Adult Health-Brasil Study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 22(5), 356-364.
- Ricci-Cabello, I., Olalla-Herrera, M., Artacho, R. (2012). Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Review*, 70, 241-255.
- Rizzello, C.G., Lositi, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D., Zambonin, P.G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 2005(7), 2348-2360.
- Robles, I., Kelton, D.F., DeVries, T.J. (2023). Associations of cow-level factors with the risk of poor hygiene in cows housed in free-stall and tie-stall barns. *Canadian Journal of Animal Science*. e-First <https://doi.org/10.1139/cjas-2023-0084>
- Rocillo-Aquino, Z., Cervantes-Escoto, F., Leos-Rodríguez, J.A., Cruz-Delgado, D., Espinoza-Ortega A. (2021). What is a traditional food? Conceptual evolution from four dimensions. *Journal of Ethnic Foods*, 8, 38. <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00113-4>
- Rohm, H., Jaros, D. (1996). Color of hard cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 241-244.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26, 147-154.
- Rowney, M. K., P. Roupas, M. W. Hickey, Everett, D. W. (2004). Salt-induced structural changes in 1-day old Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation. *International Dairy Journal*, 14, 809-816.

- Rothman, L. (2007). The use of just-about-right (JAR) scales in food product development and reformulation. *Consumer-led food product development.*, CRC Press, Boca Raton, FL, 22, 407-433.
- Ruzic-Muslic, D., Petrovic, M. M., Petrovic, M. P., Bijelic, Z., Pantelic, V., Perisic, P., Bogdanovic, V. (2011). Traditional production and characteristics of Sjenica cheese and Pirot kachkaval. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(5), 664-672.
- Ryhänen E. L., Pihlanto-Leppälä A., Pahkala E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties, *International Dairy Journal*, 11, 441–447.
- Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A. A., Karaca, O. B., Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar cheese. *Journal of Dairy Research.*, 75(1), 1-7.
- Sahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M., Hayaloglu, A. A. (2019). Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. *LWT*, 99, 525-532.
- Sahingil, D., Hayaloglu, A. A., Kirmaci, H. A., Özer, B., Simsek, O. (2014). Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. *Journal of Dairy Research*, 81(4), 394-402.
- Saito, T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T., (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434–1440.
- Salama, S. M., Musafija-Jeknić, T., Sandine, E. W., Giovannoni, J. S. (1995). An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 78, 1004-1017.
- Samelis, J., Kakouri, A., Kondyli, E. and Pappa, E.C. (2019). Effects of curd heating with or without previous milk pasteurisation on the microbiological quality and safety of craft-made ‘Pasta Filata’ Kashkaval cheese curds. *Int J Dairy Technol*, 72, 447-455. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12601>
- Samelis, J., Lianou, A., Kakouri, A., Delbes, C., Rogelj, I., Matijasic, B. B. (2009). Changes in the microbial composition of raw milk induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. *Journal of Food Protection*, 72, 783-790.
- Santa, D., Srbinovska, S. (2014). Traditional production and main characteristics of Galichki Kashkaval. *Mljekarstvo*, 64(2), 119-126.
- Santa, D., Srbinovska, S. (2017). Comparative study of sheep milk, whey and traditional kashkaval from Galichnik and Lazaropole. 3rd International Symposium for Agriculture and Food, ISAF 2017, Ohrid, Macedonia. Available online: <https://journals.ukim.mk/index.php/jafes/article/view/1115>.
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101, 3742-3757.

- Sarić, Z., Puhan, Z., Dizdarević, T. (2007). Sirarska proizvodnja na raskršću tradicije i industrije. *Savremena poljoprivreda*, 56(5), 103-113.
- Satric, A., Miloradovic, Z., Mirkovic, M., Mirkovic, N., Miocinovic, J. (2023). Quality characteristics of 'Pasta-Filata' Serbian Kačkavalj cheese and regulatory compliance assessment. *Mljekarstvo/Dairy*, 73, 38–49.
- Satric, A., Tomasevic, I., Djekic, I., Pavlovic, V., Levic, S., Miocinovic, J. (2024). Evaluation of low sodium Kačkavalj cheese properties using 3D scanning, scanning electron microscopy and computer vision system. *International Journal of Dairy Technology*, 77, 586-593.
- Schraidt, M. (2009). Appendix L: Penalty analysis or mean drop analysis. In L. Rothman & M. J. Parker (Eds.), *ASTM Manual Series: MNL 63 - Just-About-Right (JAR) scales: Design, usage, benefits and risks*, 50-53. Bridgeport, NJ, USA: ASTM International - American Society for Testing and Materials.
- Seppo, L., Kerojoki, O., Soumalinen, T., Korpela, R. (2002). The effect of *Lactobacillus helveticus* LBH-16H fermented milk on hypertension- a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 57, 124–127.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science Technology*, 112, 930–940.
- Sharma, N., Sharma, R., Rajput, Y.S., Mann, B., Singh, R., Gandhi, K. (2021). Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *International Dairy Journal*, 114, 104920.
- Sieber R., Bütikofer U., Egger C., Portmann R., Walther B., Wechsler D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science Technology*, 90, 47–73.
- Silva, D. D., Lima, M. S. F., Silva, M. F., Silva, G. R., Campos, J. F., Albuquerque, W. W. C., Cavalcanti, M. T. H., Porto, A. L. F. (2019). Bioactive water-soluble peptides from fresh buffalo cheese may be used as product markers. *LWT - Food Science and Technology*, 108, 97-105.
- Silva, H. L., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Neto, R. P., Rocha, R. S., Moraes, J., Granato, D. (2018). Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and storage time. *Food Chemistry*, 248, 192–200.
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F. (2012). Can artisanal "Coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135, 1533–1538.
- Simov, Z. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M. (2006). Impact of two starter cultures on proteolysis in Kashkaval cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 146-157.
- Simunovic, S., Djordjevic, V. Z., Raseta, M., Lukic, M., Lorenzo, J. M., Djekic, I., Tomasevic, I. (2022). Reformulation of traditional fermented tea sausage utilizing novel (digital) methods of analysis. *Foods*, 11, 1090.

- Smacchi, E., Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory 374 to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I converting enzyme. *Enzyme Microbial Technology*, 22, 687–694.
- Soares, C., Fernando, A. L., Alvarenga, N., Martins A. P. L. (2016). Substitution of sodium chloride by potassium chloride in São João cheese of Pico Island. *Dairy Science and Technology*, 96, 637–655.
- Solieri L., Baldaccini, A., Martini, S., Bianchi, A., Pizzamiglio, V., Tagliazucchi D. (2020). Peptide Profiling and Biological Activities of 12-Month Ripened Parmigiano Reggiano Cheese. *Biology*, 9(7), 170.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hutt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2017–2023.
- Stadhousers, J. (1960). The hydrolysis of protein during the ripening of Dutch cheese. The enzymes and bacteria involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 14, 83–110.
- Stevanovic, J. L., Okanovic, Đ. G., Stevanetic, S. V., Mirilovic, M. D., Karabasil, N. R., Pupavac, S. R. (2016). Traditional Products - Base for the Sustainable Development of Serbian Animal Origin Products. *Food & Feed Research*, 43(2) 127–34.
- Sulejmani, E., Hayaloglu, A.A. (2016). Influence of curd heating on proteolysis and volatiles of Kashkaval cheese. *Food Chem.*, 211, 160–70. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.054. Epub 2016 May 10. PMID: 27283619.
- Sun, C., Zhou, X., Hu, Z., Lu, W., Zhao, Y., Fang, Y. (2021). Food and salt structure design for salt reducing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 67, 102570. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102570>
- Takase, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Ohishi, T. (2023). Excessive salt intake reduces bone density in the general female population. *European Journal of Clinical Investigation*, 53(10). <https://doi.org/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.14034>
- Talevski, G., Srbinovska, S., Santa, D., Mateva, N. (2017). Influence of packaging materials on Kashkaval quality. *Mljekarstvo / Dairy*, 67(1), 25–32.
- Tarakci, Z. (2004). The influence of helis (Prangos sp.) on characteristics of vacuum-packed Van herby cheese during ripening. *Milk Science International*, 59, 619–623.
- Teneva, A. T., Balabanova, T., Boyanova, P., Beshkova, D. (2018). Traditional Balkan fermented milk products. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 807–819.
- Thibaudeau, E., Roy, D., St-Gelais, D. (2015). Production of brine-salted Mozzarella cheese with different ratios of NaCl/KCl. *International Dairy Journal*, 40, 54–61.
- Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J., Petrón, M. J. (2019). Antioxidant peptides (<3kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, 120, 643–649.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (< 3 kDa) from Burgos-type cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 57, 359–365.

Tomasevic, I., Putnik, P., Valjak, F., Pavlic, B., Sojic, B., Bebek Markovinovic, A., Bursac Kovacevic, D. (2021). 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Current Opinion in Food Science*, 41, 138–145.

Tomasevic, I., Tomovic, V., Ikonc, P., Lorenzo Rodriguez, J. M., Barba, F. J., Djekic, I., Nastasijevic, I., Stajic, S., Zivkovic, D. (2019a). Evaluation of poultry meat colour using computer vision system and colourimeter: Is there a difference? *British Food Journal*, 121, 1078–1087.

Tomasevic, I., Tomovic, V., Milovanovic, B., Lorenzo, J., Dorđević, V., Karabasil, N., Djekic, I. (2019b). Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties. *Meat Science*, 148, 5–12.

Tomasevic, I. B. (2018). Computer vision system for color measurements of meat and meat products: A review. *Theory and practice of meat processing*, 3(4), 4-15. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2018-3-4-4-15>

Tomić, N. (2021). Senzorna analiza hrane. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M., Oda, M. (2008). Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, 75, 284–290.

Topcu, A., Bulat, T., Özer, B. (2020). Process design for processed Kashar cheese (a pasta-filata cheese) by means of microbial transglutaminase: Effect on physical properties, yield and proteolysis. *Lwt - Food Science and Technology*, 125, 109226.

Torrent, M., Di Tommaso, P., Pulido, D., Nogués, M.V., Notredame, C., Boix, E., Andreu, D. (2012). AMPA: An automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. *Bioinformatics*, 28, 130–131.

Trichopoulou, A., Soukara, S., Vasilopoulou, E. (2007). Traditional foods: a science and society perspective. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.007>

Trieu, K., Neal, B., Hawkes, C., Dunford, E., Campbell, N., Rodriguez-Fernandez, R., Legetic, B., McLaren, L., Barberio, A., Webster, J. (2015). Salt reduction initiatives around the world – A systematic review of progress towards the global target. *PLoS One*, 10(7), e0130247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130247>.

Ulm, H., Wilmes, M., Shai, Y., Sahl, H. G. (2012). Antimicrobial host defensins specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Front. Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00249>

Uzun, P., Serrapica, F., Masucci, F., Assunta, B. C. M., Yildiz, H., Grasso, F. and Di Francia, A. (2020). Diversity of traditional Caciocavallo cheeses produced in Italy. *International Journal of Dairy Technology*, 73, 234-243.

Upadhyay, V., K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Fox, P. F. (2006). Proteolysis in cheese in cheese during ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 391–433.

Vanhonacker, F., Verbeke, W., Lengard, V., Hersleth, M. (2008). Consumer-based definition and general image of traditional foods in Europe, in: *Perspectives of Traditional Food Supply Chains on the European Market*, Proceedings of 12th Congress of the European Association of

Agricultural Economists 'People, Food and Environments: Global Trends and European Strategies'. Book of abstracts, Ghent, Belgium, 26–29.

Villordon, A., Gregorie, J., Don LaBonte (2020). Direct Measurement of Sweetpotato Surface Area and Volume Using a Low-cost 3D Scanner for Identification of Shape Features Related to Processing Product Recovery. *HortScience*, 55(5), 722-728. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14964-20>

Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., Liu, J., Loop, M. S., Lutsey, P., L., Ma, J., Mackey, J., Martin, S. S., Matchar, D. B., Mussolino, M. E., Navaneethan, S. D., Perak, A. M., Roth, G. A., Samad, Z., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Shay, C. M., Stokes, A., VanWagner, L. B., Wang, N. Y., Tsao, C. W. (2021). American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2021). Heart disease and stroke statistics—2021 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 143(8), e254–e743. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950>

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen. H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 106–115.

Wang, D., Ali, M., Cobau, J., Tao, Y. (2021). Designs of a customized active 3D scanning system for food processing applications. In 2021 ASABE Annual International Virtual Meeting (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Wang, S., Zeng, X., Yang, Q., Qiao, S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International Journal of Molecule Science*, 17(5), 603.

WHO (2010). Global status report on noncommunicable diseases. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf?ua=1.

WHO (2012). Guideline: sodium intake for adults and children. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/77985>.

WHO (2016). Action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases in the WHO European Region; WHO: Geneva, Switzerland.

WHO (2023). Sodium reduction. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>.

Williams, A. G., Noble, J., Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11, 203-215.

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1, 60– 69.

Yalcin, U., Andic, S., Akkol, S. (2021). The Effect of Sodium Caseinate or Chitosan Edible Coatings on Some Chemical Textural and Microbiological Characteristics of Kashar Cheese. *Journal of the Institute of Science & Technology / Fen Bilimleri Estitüsü Dergisi.*, 11(1), 290-302. doi:10.21597/jist.741326

- Yang, W., Hao, X., Zhang, X., Zhang, G., Li, X., Liu, L., Sun, Y., Pan, Y. (2021). Identification of antioxidant peptides from cheddar cheese made with *Lactobacillus helveticus*. *LWT - Food Science and Technology*, 141, 110866.
- Yu, C.H., Gunasekaran, S. (2005). A system analysis of pasta filata process during Mozzarella cheese making. *Journal of Food Engineering*, 69, 399–408.
- Zhang, R., Li, F., Tang, J., Koral, T., Jiao, Y. (2020). Improved accuracy of radio frequency (RF) heating simulations using 3D scanning techniques for irregular-shape food. *LWT - Food Science and Technology*, 121, 108951.
- Zhi, R., Zhao, L., Shi, J. (2016). Improving the sensory quality of flavored liquid milk by engaging sensory analysis and consumer preference. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5305 – 5317. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10612>

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Ana (Veselin) Šatrić rođena je 08.04.1994. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu „Lazar Savatić“ i Zemunsku gimnaziju završila je u Beogradu. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program: Prehrambena tehnologija, upisala je školske 2013/14. godine. Osnovne akademske studije, modul Tehnologija animalnih proizvoda, završila je 2017. godine, sa opštim uspehom 9,18 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master studije upisala je na Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Prehrambena tehnologija, modul Mikrobiologija hrane i životne sredine i završila ih odbranom master rada sa ocenom 10, pod nazivom „Mišljenje studenata o bezbednosti i bacanju hrane“. U okviru Erasmus+ programa mobilnosti studenata, završila je jedan semestar master studija na Uppsala University u Švedskoj, u periodu 01.08.2018. – 19.01.2019, školske 2018/19. godine. Sve ispite predviđene planom i programom master akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,83.

Tokom letnjeg semestra, u periodu 02.-30.04.2018. godine ostvarila je praktičan rad u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Doktorske akademske studije upisala je školske 2019/20. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Prehrambena tehnologija. Ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,71. Izabrana je u zvanje saradnika u nastavi, a potom 28.05.2020. u zvanje i na radno mesto asistenta za užu naučnu oblast Tehnologija animalnih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Obavila je stručno usavršavanje u periodu 25.9. - 18.10.2019. u Mlekarskoj školi „Dr Obren Pejić“ u Pirotu.

Od 2024. godine Ana Šatrić ima angažovanje u svojstvu člana projektnog tima na realizaciji Erasmus+ projekta “European Excellence in Dairy Learning” (AEDIL Dairy CoVE). Angažovana je na nacionalnim projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja od decembra 2019. godine. Kao autor ili koautor u toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada, publikovala je ukupno 25 bibliografskih jedinica, od kojih su 12 radova na SCI listi (5 rada iz kategorije M21, 4 rada iz kategorije M22 i 3 rada iz kategorije M23) sa Scopus h-indeksom 5. Ana Šatrić poseduje znanje engleskog (IELTS sertifikat), švedskog (sertifikat o položenom kursu u okviru Uppsala University) i francuskog jezika.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Ana Šatrić

Broj indeksa: TH190034

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Karakterizacija svojstava kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida tokom zrenja

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ana Šatrić

Broj indeksa: TH190034

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Karakterizacija svojstava kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida tokom zrenja

Mentor: dr Jelena Miočinović, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija svojstava kačkavalja sa smanjenim sadržajem natrijum-hlorida tokom zrenja
koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.