

Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira

Nataša Mikulec^{1*}, Ivan Habuš², Neven Antunac¹,
Ljubinka Vitale², Jasmina Havranek¹

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za mljekarstvo,
Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska

²Institut "Ruđer Bošković", Zavod za fizičku kemiju,
Bijenička cesta 59, Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 15.07.2010.
Prihvaćeno - Accepted: 22.11.2010.

Sažetak

U sirevima se tijekom zrenja odvijaju kompleksne mikrobiološke i biokemijske promjene koje imaju značajan utjecaj na formiranje organoleptičkih karakteristika gotovog proizvoda. Proteolitički enzimi razgrađuju kazein do većih i manjih peptida te slobodnih aminokiselina. Količina i omjeri pojedinih aminokiselina i topljivih peptida znatno utječu na teksturu i organoleptička svojstva sira. Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi koji formiraju specifične arome raznih vrsta sireva. U siru je identificirano više od 200 različitih hlapljivih komponenti. Okus sira je koncentriran u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline i amini), dok je aroma uglavnom koncentrirana u hlapljivoj frakciji (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri). Mnogi sirevi sadrže iste ili slične komponente, ali u različitim koncentracijama i odnosima. Posebnosti arome sira ne zasnivaju se samo na jednom specifičnom spoju već na kombinaciji različitih spojeva nastalih tijekom zrenja. Djelovanjem na proteolitičke procese može se ubrzati i modificirati tehnološki proces proizvodnje sira, te ih se stoga intenzivno proučava.

Ključne riječi: aroma sira, peptidi, aminokiseline

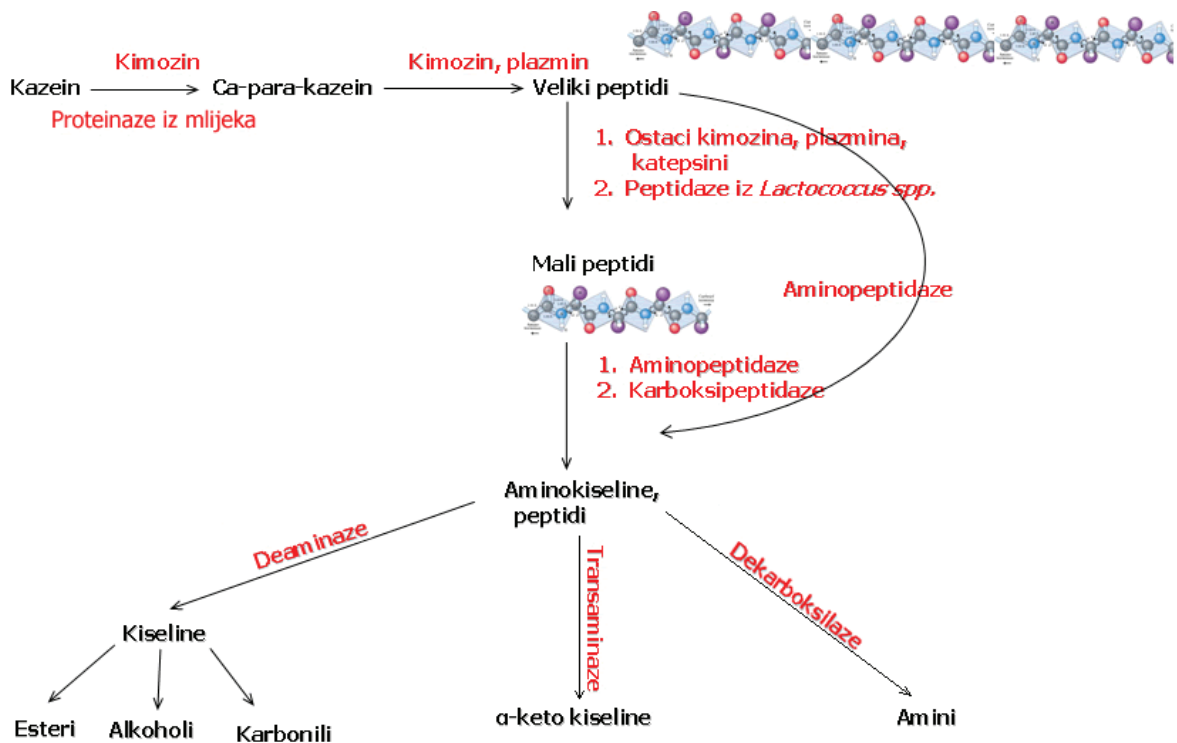
Uvod

Ključna faza proizvodnog procesa polutvrđih i tvrdih sireva je zrenje, čiji tijek izravno utječe na kvalitetu gotovog proizvoda, bez obzira da li se radi o tradicionalnoj ili industrijskoj proizvodnji. Djelovanjem enzima u sirevima odvija se niz sintetskih i kataboličkih procesa. Sintetskim procesima nastaju novi spojevi, dok u kataboličke ubrajamo glikolitičke, proteolitičke i lipolitičke procese. Tijekom zrenja sira značajnu ulogu imaju proteolitički procesi, a pripadajući enzimi potječu iz pet različitih izvora: mlijeka, sirila, sojeva bakterija jedne ili više vrsta (startera definiranog sastava), naknadnog ili sekundarnog startera, te nestarterskih bakterija (Slika 1) (McSweeney i Fox, 1999.). Proteolitički enzimi razgrađuju kazein do većih i manjih peptida te slo-

bodnih aminokiselina. Količina i omjeri pojedinih aminokiselina i topljivih peptida znatno utječu na teksturu i organoleptička svojstva sira.

U sirevima se tijekom zrenja odvijaju kompleksne mikrobiološke i biokemijske promjene koje imaju značajan utjecaj na formiranje organoleptičkih karakteristika gotovog proizvoda. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje i lizu bakterija startera, rast nestarterskih bakterija (eng. Non-Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB) i to najčešće heterofermentativnih bakterija kao i rast dodane sekundarne mikroflore specifične za neke vrste sira (plijesni *Penicillium* sp. u sirevima s plijesnima, *Propionibacterium* sp. u siru Emmentaleru i dr.). Poznato je da bakterije primarnog startera dominiraju na početku tehnološkog procesa proizvodnje sira i od početnih

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel/Phone: +385 1 2393 848; E-mail: nmikulec@agr.hr



Slika 1. Enzimaska razgradnja kazeina (Fox, 2002.)
Fig. 1. Enzymatic degradation of casein (Fox, 2002)

10^5 - 10^7 cfu mL⁻¹ dodanih u mlijeko (eng. colony forming units - cfu) brzo postižu 10^9 cfu g⁻¹ (Cogan, 2002.), ali najveći broj bakterija mliječne kiseline (LAB) odumire u procesu soljenja sira, dok se broj NSLAB povećava tijekom zrenja i dominira na kraju tehnološkog procesa proizvodnje sira (Hickey i sur., 2007.). Autolizom bakterijskih stanica dolazi do oslobađanja unutarstaničnih enzima koji imaju važnu ulogu u stvaranju teksturalnih i organoleptičkih svojstava sira (Williams i sur., 2002.; Kenny i sur., 2006.; Hickey i sur., 2007.). Pojedini sojevi bakterija mliječne kiseline (eng. Lactic Acid Bacteria - LAB) razlikuju se po autolitičkim svojstvima, pa tako utječu na brzinu zrenja te formiranje okusa i mirisa (Cogan, 2002.). Biokemijske promjene tijekom zrenja sira mogu se podijeliti u dvije skupine: primarne (proteoliza, lipoliza i metabolizam rezidualne laktoze) te sekundarne (metabolizam masnih kiselina i aminokiselina). Primarne biokemijske promjene u sirevima odgovorne su za osnovne promjene teksture, dok sekundarne formiraju konačni miris i okus sira.

NSLAB imaju posebnu važnost u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka, jer svojom proteolitičkom aktivnošću zamjenjuju aktivnost startera, proizvodeći aminokiseline i peptide molekularnih masa sličnih onima koji nastaju djelovanjem startera. Jedna od posljedica lize stanica je oslobađanje aminopeptidaza, koje odcjepljuju aminokiseline s N-terminalnog dijela peptida različitih duljina. Udjel aminokiselina često se koristi kao indeks zrelosti sira (McSweeney i Fox, 1999.). Nastale aminokiseline služe kao prekursori za sekundarne metaboličke reakcije u kojima nastaju spojevi koji doprinose stvaranju specifičnog mirisa i okusa sira. Kenny i sur. (2006.) navode da se udjel slobodnih aminokiselina u siru može povećati većim udjelom laktobacila u komercijalnoj starter kulturi, a Hickey i sur., (2007.) istražujući sir Cheddar, utvrdili su da sirevi proizvedeni s različitim sojevima LAB-a imaju značajne razlike u okusu, koji može varirati od slatkog i okusa po karamelu do sapunastog i pokvarenog okusa.

Proteolitički enzimi u sirevima

Promjene u sirevima koje nastaju proteolitičkom razgradnjom proteina intenzivno su proučavane u posljednjih dvadesetak godina (Grappin i sur., 1985.; Rank i sur., 1985.; McSweeney i Fox, 1999.; Sousa i sur., 2001.; Fox, 2002.; McSweeney, 2004.; Stepianiak, 2004.; O'Mahony i sur., 2005.; Madrau i sur., 2006.; Voigt i sur., 2009.; Pino i sur., 2009.; Sihufe i sur., 2010.; Azarnia i sur., 2010.) na različitim vrstama sira kao što su Cheddar (Fox i sur., 1999.; Sousa i sur., 2001.; McSweeney, 2004.), Grana Padano (Fox i McSweeney, 1996.; Gaiaschi i sur., 2001.), Emmentaler (Lawrence i sur., 1987.), Mozzarella (Feeney i sur., 2002.), Tunjski sir (Kalit i sur., 2005.), Fetta (Michaelidou i sur., 1998.), Ragusano (Fallico i sur., 2005.), Pecorino Sardo (Madrau i sur., 2006.), Reggianito Argentino (Sihufe i sur., 2010.) i dr.

Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi koji formiraju specifične arome raznih vrsta sireva. U siru je identificirano više od 200 različitih hlapljivih komponenti. Okus sira je koncentriran u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline i amini), dok je aroma uglavnom koncentrirana u hlapljivoj frakciji (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri). Istraživanja obuhvaćaju mikroorganizme, mikrobne i indogene enzime mlijeka koji kataliziraju proteolitičke reakcije u siru, preko sastava sira u različitim fazama zrenja do organoleptičkih svojstava i razvoja metoda za potrebne analize (Fox i sur., 1999.).

Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome

Formiranje mirisa i okusa sira rezultat je složenih mikrobioloških, biokemijskih i kemijskih procesa koji se odvijaju tijekom zrenja (Fox i Wallace, 1997.; Fox i sur., 1999.; McSweeney i Sousa, 2000.; Ur - Rehman i Fox, 2002.; McSweeney, 2004.; Nieto - Arribas i sur., 2009.; Sihufe i sur., 2010.). Poznato je da su različite vrste sira na početku zrenja blagih i neutralnih odnosno sličnih organoleptičkih svojstava, dok se karakterističan miris i okus pojedinih sireva formira tijekom zrenja.

Praćenjem proteolitičkih promjena i razgradnje peptida dobiva se uvid u formiranje gorkog okusa sira (Urbach, 1995.; Fox i sur., 1999.; Smit i sur.,

2000.; Sihufe i sur., 2010.). Enzimskom hidrolizom proteina formiraju se peptidi manjih molekulskih masa, od kojih neki, pretežno hidrofobni, imaju gorak okus. U slučaju nepotpune hidrolize peptida dolazi do njihovog nakupljanja i sir dobiva gorak okus. U stvaranju gorkih peptida važnu ulogu imaju bakterije NSLAB, enzimi startera i sirila (Agboola i sur., 2004.). Razgradnjom α_{s1} -kazeina (α_{s1} -CN) i β -CN sa sirirom ili mikrobnim peptidazama, nastaje izvjesna količina gorkih peptida koja u zrelih sirevima može biti i poželjna. Povećanjem koncentracije gorkih peptida iznad dozvoljene granice, sir postaje gorak. U sirevima s unutrašnjim bakterijskim zrenjem, poput Goude (Visser, 1993.), Cheddara (Edwards i Kosikowski, 1983.; Fox, 2002.), Pecorina (Agboola i sur., 2004.) i Ragusana (Fallico i sur., 2005.), česta pogreška je gorak okus koji nastaje pogreškom u tehnološkom procesu proizvodnje tih vrsta sireva. Ardö (1997.) navodi da se dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus* u nemasne sireve, mogu spriječiti pogreške okusa i mirisa, jer bakterije navedene vrste potiču formiranje veće količine slobodnih aminokiselina. Isti autori navode da se udjel i omjer pojedinih aminokiselina u punomasnim polutvrđim sirevima također može promijeniti dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus*.

Odabirom startera definiranog sastava može se spriječiti formiranje gorkog okusa sira. Soeryapranata i sur. (2002.) proučavali su utjecaj dodatka bakterija *Lactobacillus helveticus* WSU 19 na smanjenje gorkog okusa sira. Tehnikom masene spektrometrije pratili su brzinu razgradnje β -CN fragment 193-209, za kojeg se zna da je izrazito gorkog okusa, te zaključili da su sirevi proizvedeni s dodatkom *Lactobacillus helveticus* WSU 19 bili manje gorki od istih proizvedenih bez dodatka navedenog soja bakterija vrste *Lactobacillus helveticus*.

Karakterističan sadržaj aminokiselina u siru rezultat je aktivnosti bakterija startera i NSLAB-a. Sadržaju glutaminske kiseline (Glu) pripisuje se ugodan okus; izoleucinu (Ile), lizinu (Lys) i tirozinu (Tyr) gorak; prolinu (Pro) i lizinu (Lys) slatko-gorak okus; alaninu (Ala), glicinu (Gly), serinu (Ser) i treoninu (Thr) sladak, dok histidinu (His) i asparaginskoj kiselini (Asp) gorak-kiseli okus (Sousa i sur., 2001.). Visoku korelaciju između intenziteta mirisa i okusa sira Cheddar i koncentracije slobodnih aminokiselina utvrdili su Fox i sur. (1999.). Međutim, omjer između pojedinih aminokiselina vrlo je sličan

u mnogim vrstama sira. Fox i Wallace (1997.) uspoređujući Cheddar, Gouda i Emmentaler, utvrdili su različite arome, iako su omjeri između pojedinih aminokiselina bili vrlo slični.

Razgradnja aminokiselina kao prekursora za formiranje arome

Aminokiseline značajnije doprinose aromi sira time što služe kao prekursori za stvaranje drugih spojeva koji imaju izražen okus i miris. Tako van Kranenburg i sur., (2002.) navode da su glavne aminokiseline koje služe kao prekursori u stvaranju arome sira, aminokiseline s razgranatim lancem: valin (Val), izoleucin (Ile), leucin (Leu), aromatske aminokiseline: triptofan (Trp), tirozin (Tyr), fenilalanin (Phe) te aminokiseline koje sadrže sumpor: cistin (Cys), metionin (Met). S tog aspekta važna je njihova količina i vrsta u siru te enzimi koji ih razgrađuju (Smit i sur., 2000.; McSweeney i Sousa, 2000.; Ur - Rehman i Fox, 2002.; van Kranenburg i sur., 2002.; Stepaniak, 2004.; Thage i sur., 2005.; Ardö, 2006.; Hannon i sur., 2007.; Phelan i sur., 2009.; Nieto - Arribas i sur., 2009.).

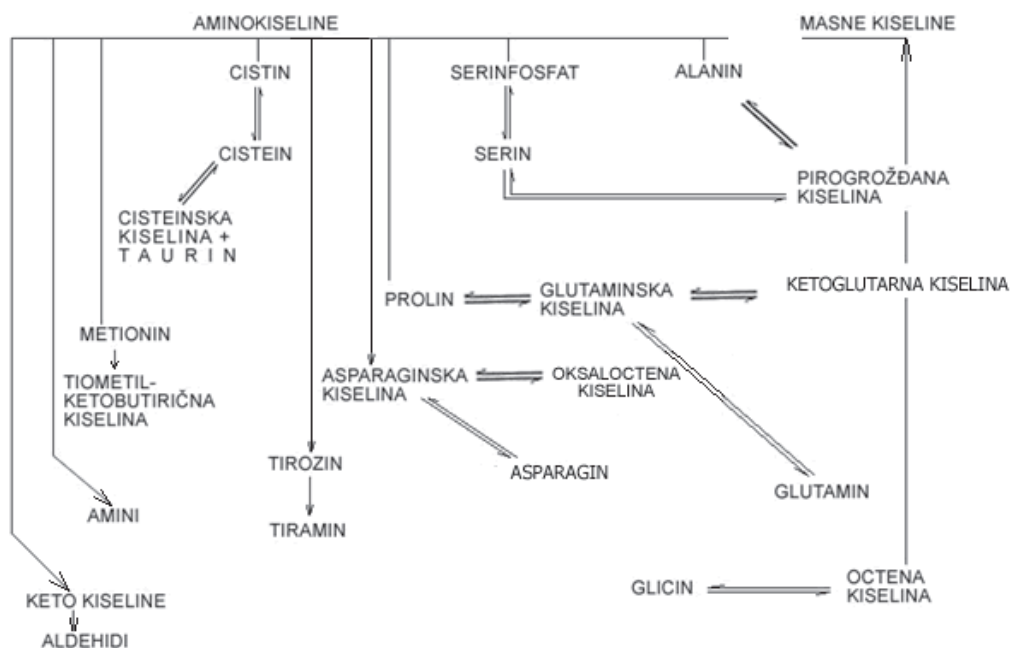
Za razliku od dobro istraženih proteolitičkih enzima koji cijepaju kazeinske frakcije (Grappin

i sur., 1985.; Fox, 1989.; McSweeney, 2004.; O`Mahony i sur., 2005.), manje su istraženi enzimi vezani uz razgradnju aminokiselina (Smit i sur., 2000.).

Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi, koji formiraju specifične arome raznih vrsta sireva (Slika 2). U proces razgradnje aminokiselina uključeni su enzimi koji potječu iz mlijeka, sirila i bakterija mliječno-kisele fermentacije (Tablica 1). Poznata su dva glavna puta razgradnje aminokiselina, i to pomoću aminotransferaza i liaza, te rjeđe deaminaza ili dekarboksilaza.

Razgradnja aminokiselina najčešće započinje djelovanjem aminotransferaza koje odvajaju amino skupine pojedinih aminokiselina i prenose ih na ketokiseline (Thage i sur., 2005.; Ardö, 2006.). Aminotransferaze bakterija mliječno-kisele fermentacije (*Lactococcus* i *Lactobacillus*) i NSLAB, posebice *Lactobacillus paracasei*, koji je dominantna vrsta u polutvrđim sirevima, kao akceptor najčešće koriste α -ketoglutarat koji se prevodi u glutaminsku kiselinu.

Aminotransferaze LAB-a su specifične prema određenim skupinama aminokiselina, a sudjeluju u



Slika 2. Metabolički putevi razgradnje aminokiselina u siru (Harper i Kristoffersen, 1984.)

Fig. 2. Metabolic pathways of amino acids degradation in cheese (Harper and Kristoffersen, 1984)

Tablica 1. Enzimi u siru povezani s razgradnjom aminokiselina (Ardö, 2006.)
 Table 1. Enzymes in cheese connected with amino acids degradation (Ardö, 2006)

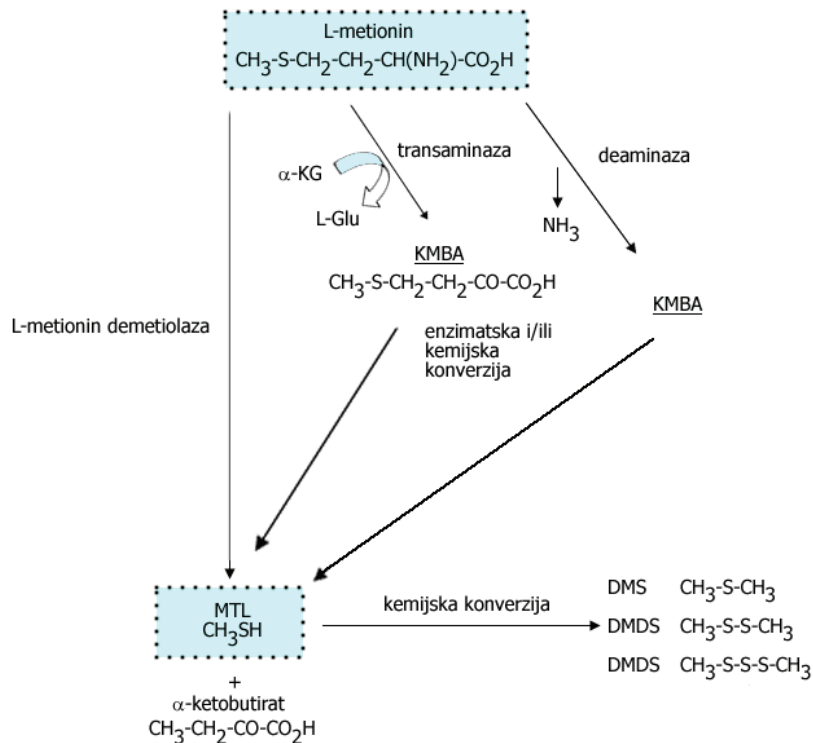
Dekarboksilaze Decarboxylases		Aminotransferaze specifične za: Aminotransferases specific for:	Deaminaze Deaminases	Liaze Lyases	Dehidrataze Dehydratases
Supstrat Substrate	Produkt Product				
Glu	GABA*, AABA**	Leu, Ile, Val	Glu dehidrogenaza Glu dehydrogenase	Treonin-aldolaza Threonine-aldolase	Ser
Asp	Ala	Phe, Tyr, Trp	Arg deiminaza Arg deiminase	Cistation- β -liaza Cistation- β -lyase	Thr
Tyr	Tiramin/Tyramine	Asp	-	Cistation- γ -liaza Cistation- γ -lyase	Cys
His	Histamin/Histamine	Met, Cys	-	Metionin- γ -liaza Methionine- γ -lyase	-
Orn	Putrescin/Putrescine	-	-	-	-
Lys	Kadaverin/Cadaverine				
Trp	Triptamin/Tryptamine				
Phe	Feniletilamin/ Phenylethylamine				

*GABA - γ -aminomaslačna kiselina/ γ -aminobutyric acid; **AABA - α -aminomaslačna kiselina/ α -aminobutyric acid

razgradnji aminokiselina s razgranatim lancem (Ile, Leu i Val), aromatskih aminokiselina (Phe, Tyr i Trp), zatim Asp te aminokiselina koje sadrže sumpor (Met i Cys). Modifikacijom aromatskih aminokiselina nastaju feniloctena kiselina, fenilacetaldehid, benzaldehid, krezol, fenol i indol, koji imaju cvjetni ili miris po fenolu i ključni su sastojci mirisa u tvrdim i polutvrdim sirevima (Thage i sur., 2005.). Razgradnjom Ile, Leu i Val, nastaju izovalerijanska i izomaslačna kiselina (slatkog, kiselog, gorkog, trulog ili maslačnog okusa i mirisa), 2-metilbutan i 3-metilbutan te 2-etilpropan s karakterističnom voćnom ili alkoholnom aromom (Ardö, 2006.). Pojedini sojevi *Lactobacillus paracasei* razgrađuju Asp do diacetila, acetoina i 1,3-butandiola, koji doprinose stvaranju mirisa po maslacu (Thage i sur., 2005.). Aminotransferaznom aktivnošću LAB-a nastaje paleta aromatičnih razgradnih produkata u siru, zbog čega su LAB važne u formiranju arome zrelog sira.

Deaminacijom aminokiselina nastaju amonijak i α -ketokiseline. U stvaranju amonijaka koji je važan spoj u sirevima Camembert, Gruyère i Comté, sudjeluju *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* i *Brevibacterium linens*. U sirevima Cheddar, Emmentaler, Manchego, Parmesan, Gouda, Camembert, utvrđeno je prisustvo α -ketokiselina koje odgovaraju gotovo svim aminokiselinama, a dokazano je da α -keto-3-metilmaslačna kiselina i α -keto-3-pentanoična kiselina pojačavaju miris sira (McSweeney i Sousa, 2000.).

Hlapljivi sumporni spojevi važni su u mnogim tradicionalnim fermentiranim proizvodima kao spojevi koji doprinose stvaranju karakterističnih aroma. Bonnarme i sur. (2001.) navode njihovu važnost, jer se mogu osjetiti pri vrlo niskoj koncentraciji. Sumporni spojevi koji doprinose stvaranju okusa i mirisa sira po kelju, jajima, bijelom luku i krumpiru, nastaju razgradnjom aminokiselina Met i Cys. McSweeney



α -KG: α -ketoglutarat/ α -ketoglutarate; L-Glu: L-glutamat/L-glutamate; MTL: metantioi/metanetioi; DMS: dimetilsulfid/dimetylsulfide, DMDS: dimetildisulfid/dimetyldisulfide; DMTS: dimetiltrisulfid/dimetyltrisulfide; KMBA - 4-metiltio-2-oksobutanoična kiselina/4-methylthio-2-oxobutyric acid

Slika 3. Putevi razgradnje metionina tijekom zrenja sira (Bonnarme i sur., 2001.)

Fig. 3. Putative L-methionine degradation pathways during cheese ripening (Bonnarme et al., 2001)

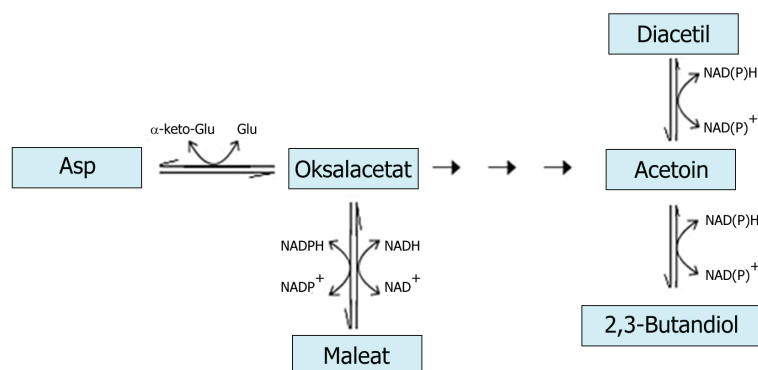
i Sousa (2000.) navode važnost razgradnih produkata Met i Cys u stvaranju organoleptičkih svojstava Cheddar i drugih vrsta sira. Bakterije LAB-a razgrađuju Met na isti način kao i aminokiseline s razgranatim lancem i aromatske aminokiseline (Slika 3). Prema Bonnarme i sur. (2001.) razgradnjom metionina pomoću L-metionin demetilolaze (metionin- γ -liaze) nastaju metantioi (CH_3SH), dimetilsulfid (DMS), dimetildisulfid (DMDS) i dimetiltrisulfid (DMTS), dok McSweeney (2004.) kao razgradne produkte navodi i metional (β -metil merkaptopropionaldehid) te karbonilsulfid. DMS, DMDS i DMTS značajno doprinose karakterističnim organoleptičkim svojstvima sira.

Sumporni spojevi mogu reagirati međusobno ili stupati u interakciju s ostalim spojevima u siru, stvarajući sastojke mirisa i okusa. Tako je metantioi, utvrđen u Camembertu, zajedno s drugim sumpornim komponentama, kao što su npr. 2,4-ditiopentan i 3,4-ditioheksan, odgovoran za karakterističan miris

po bijelom luku u zrelom siru (McSweeney i Sousa, 2000.). Dimetilsulfid nastaje razgradnjom Met s propionsko-kiselim bakterijama, te doprinosi organoleptičkim svojstvima švicarskog sira (Adda i sur., 1982.). Dimetiltrisulfid stvara miris i aromu po kuhanom kelju, brokuli i nađen je u Parmesanu (Barbeiri i sur., 1994.) i Cheddaru (Urbach, 1995.). Na razgradnju metionina utječe niz čimbenika kao što su liza stanica, redoks potencijal, transport prekursora, unutarstanični smještaj kataboličkih enzima, što sve utječe na formiranje specifičnih mirisnih i okusnih sastojaka gotovog proizvoda (Bonnarme i sur., 2001.).

Razgradnjom Asp djelovanjem aminotransferaze nastaje oksaloacetat koji se daljnjim reakcijama može katabolizirati do diacetila, karakterističnog mirisa po maslacu, acetoina i 2,3-butandiola (Slika 4).

Na površini sira djelovanjem glutamat dekarboksilaze dolazi do razgradnje Glu do γ -aminomaslačne kiseline (GABA), a dekarboksilaznu aktivnost imaju



Slika 4. Putevi razgradnje asparaginske kiseline u siru tijekom zrenja (Ardö, 2006.)
Fig. 4. Catabolism of aspartic acid during cheese ripening (Ardö, 2006)

neki sojevi *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus brevis*. Dekarboksilacijom lizina može nastati kadaverin, a razgradnjom ornitina nastaje putrescin, a oba amina imaju fekalni ili miris po truleži. Tiramin i histamin su dominantni amini u većini sireva, a nastaju dekarboksilacijom Tyr i His. Sadržaj amina doprinosi specifično oštrom okusu zrelih sireva. McSweeney i Sousa (2000.) navode da se količina spomenutih amina u siru Cheddar povećava s dodatkom laktobacila, te da visoka koncentracija tiramina i histamina može uzrokovati trovanje hranom.

U sirevima Gouda (Visser, 1993.), Mahón (García - Palmer i sur., 1997.), Cheddar (Fox, 2002.; Ur - Rehman i Fox, 2002.; Hannon i sur., 2007.), Pecorino (Agboola i sur., 2004.) i Ragusano (Fallico i sur., 2005.), utvrđeno je da formiranju okusa uvelike doprinose slobodne aminokiseline. Proteolitički enzimi koji cijepaju kazeinske frakcije dobro su istraženi (Grappin i sur., 1985.; Fox, 1989.; McSweeney, 2004.; O`Mahony i sur., 2005.) za razliku od enzima vezanih uz razgradnju aminokiselina (Smit i sur., 2000.). Kako se neki dijelovi proteina lakše hidroliziraju, mikroorganizmi ovisno o metaboličkim potrebama koriste pojedinačne aminokiseline. Djelovanjem kimosina, peptidaze koje potječu iz starterskih odnosno bakterija sekundarnih bakterijskih vrsta te indogenih peptidaza iz mlijeka, oslobađaju se peptidi i slobodne aminokiseline. Sama razgradnja kazeina i nastajanje peptida različitih duljina, kao i količina slobodnih aminokiselina, ovisi o vrstama enzima koje izlučuju bakterije te stupnju njihove autolize u siru (Broome i sur., 2002.).

Zaključak

Djelovanjem na proteolitičke procese može se ubrzati i modificirati tehnološki proces proizvodnje sira, te ih se stoga intenzivno proučava. Dok su uvjeti u industrijskoj proizvodnji sira pažljivo kontrolirani, zbog čega nema velikih odstupanja u kvaliteti od jedne do druge šarže, razlike u kvaliteti javljaju se kod tradicionalnih sireva proizvedenih na obiteljskim gospodarstvima, koje je potrebno svesti na minimum, kako bi sirevi mogli dobiti zaštitu prema europskim kriterijima. Iz tog je razloga potrebno izolirati matičnu kulturu dominantnih bakterija iz tradicionalnih sireva, kako bi se tehnološki uvjeti proizvodnje ujednačili a sirevi zadovoljili postavljene kriterije.

Influence of peptide and amino acids on the formation of cheese flavour

Summary

Complex microbiological and biochemical changes take place during cheese ripening process, having a significant impact on the formation of organoleptic characteristics of the final product. Proteolytic enzymes degraded casein to larger and smaller peptides and free amino acids. The quantity and the ratios of particular amino acids and soluble peptides significantly influence the texture and organoleptic properties of cheese. The products of amino acid degradation in cheese are alcohols, aldehydes, esters, acids and sulphur compounds, which form specific aromas of various cheese types. More than 200 different volatile components have been identified in

cheese. Cheese flavour is concentrated in the water-soluble fraction (peptides, amino acids, organic acids and amines), while aroma is mainly concentrated in the volatile fraction (organic acids, aldehydes, amines, esters). Many cheeses contain the same or similar components, but in different concentrations and ratios. Specific characteristics of cheese aroma are not based only on one specific compound, but on combination of different compounds produced in the maturing process. The technological process of cheese production can be accelerated and modified by influencing proteolytic processes, which are therefore the subject of intense research.

Key words: cheese flavour, peptide, amino acids

Literatura

- Adda, J., Gripon, J.C., Vassal, L. (1982): The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemistry* 9, 115-129.
- Agboola, S., Chen, S., Zhao, J. (2004): Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Lait* 84, 567-578.
- Ardö, Y. (1997): Flavour and texture in low-fat cheese. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. B.A. Law (Ed.), Chapman & Hall, London, 207-218.
- Ardö, Y. (2006): Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24, 238-242.
- Azarnia, S., Lee, B.H., Yaylayan, V., Kilcawley, K.N. (2010): Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. *Food Chemistry* 120, 174-178.
- Barbeiri, G., Bolzoni, L., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S., Virgili, R. (1994): Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. *Food Chemistry* 42, 1170-1176.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., Spinnler, H.E. (2001): L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *Journal of Dairy Research* 68, 663-674.
- Broome, M.C., Powell, I.B., Limsowtin, G.K.Y. (2002): Starter culture: Specific properties. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.), Vol. 1, Academic Press, London, 269-275.
- Cogan, T.M. (2002): Microbiology of cheese. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.), Vol. 1, Academic Press, London, 306-314.
- Edwards, J., Kosikowski, F.V. (1983): Bitter compounds from Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 66, 727-734.
- Fallico, V., McSweeney, P.L.P., Horne, J., Pediliggieri, C., Hannon, J.A., Carpino, S., Licitra, G. (2005): Evaluation of bitterness in Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science* 88, 1288-1300.
- Feeney, E.P., Fox, P.F., Guinee, T.P. (2002): Effect of pH and calcium level on proteolysis in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 85, 1646-1654.
- Fox, P.F. (1989): Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 72, 1379-1400.
- Fox, P.F. (2002): Biochemistry of cheese ripening. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.), Vol. 1, Academic Press, London, 320-326.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996): Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* 12, 457-509.
- Fox, P.F., Wallace, J.M. (1997): Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* 45, 17-85.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., Wallace, J. (1999): Biochemistry of cheese ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P.F. Fox (Ed.), Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 389-438.
- Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A. (2001): Proteolysis of β -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 84, 60-65.
- García-Palmer, F.J., Serra, N., Palou, A., Gianotti, M. (1997): Free amino acids as indices of Mahón cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 80, 1908-1917.
- Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F. (1985): Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review, *Journal of Dairy Science* 68, 531-640.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P. (2007): Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* 18, 316-327.
- Harper, W.J., Kristoffersen, T. (1984): Biochemical aspects of cheese ripening. *Our Industry Today*, 1773-1775.
- Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Sheehan, E.M. (2007): Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 74, 9-17.
- Kalit, S., Havranek, J., Kaps, M., Perko, B., Cubric Curik, V. (2005): Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *International Dairy Journal* 15, 619-624.
- Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K. (2006): Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 16, 794-804.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J. (1987): Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748-1760.
- Madrau, M.A., Mangia, N.P., Murgia, M.A., Sanna, M.G., Garau, G., Leccis, L., Caredda, M., Deiana, P. (2006): Employment of autochthonous microflora on Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physico-chemical parameters during ripening. *International Dairy Journal* 16, 876-885.

28. McSweeney, P.L.H. (2004): Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57, 127-144.
29. McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1999): Methods of Chemical Analysis. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P.F. Fox (Ed.), Vol. 1: General Aspects, An Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 341-388.
30. McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J. (2000): Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293-324.
31. Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A., Zerfiridis, G.K. (1998): Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese. *Journal of Dairy Science* 81, 3109-3116.
32. Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L., Cabezas, L. (2009): Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control* 20, 1092-1098.
33. O'Mahony, J.A., Lucey, J.A., McSweeney P.L.H. (2005): Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization and texture development during the ripening of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 88, 3101-3114.
34. Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R., O'Brien, N. (2009): Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal* 19, 643-654.
35. Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H., Fernández-Salguero, J. (2009): Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International* 42, 324-330.
36. Rank, T.C., Grappin, R., Olson, N.F. (1985): Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. *Journal of Dairy Science* 68, 801-805.
37. Sihufe, G.A., Zorrilla, S.E., Rubiolo, A.C. (2010): The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggiano Argentino cheese. *Food Science and Technology* 43, 247-253.
38. Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W. (2000): Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International* 33, 153-160.
39. Soeryapranata, E., Powers, J.R., Hill, H.H., Siems, W.F., Al-Saad, K.A., Weller, K.M. (2002): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry method for the quantification of β -casein fragment (193-209). *Journal of Food Science* 67, 534-538.
40. Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. (2001): Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 327-345.
41. Stepaniak, L. (2004): Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology* 57, 153-171.
42. Thage, B.V., Broe, M.L., Petersen, M.A., Bennedsen, M., Ardö, Y. (2005): Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. *International Dairy Journal* 15, 795-805.
43. Urbach, G. (1995): Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound in dairy products. *International Dairy Journal* 5, 877-903.
44. Ur-Rehman, S., Fox, P.F. (2002): Effect of added α -ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. *Food Chemistry* 76, 21-26.
45. van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., Siezen, R.J. (2002): Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12, 111-121.
46. Visser, S. (1993): Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: An overview. *Journal of Dairy Science* 76, 329-350.
47. Voigt, D.D., Chevalier, F., Qian, M.C., Kelly, A.L. (2009): Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 68-77.
48. Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Banks, J.M. (2002): Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12, 841-852.