

VLADIMIR B. PAVLOVIĆ  
 PREDRAG D. PUĐA  
 GORAN A. TRPKOVIĆ  
 JELENA B. MIOČINOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,  
 Poljoprivredni fakultet

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.3:637.07:543.456

## PRIMENA TEHNIKA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U PROUČAVANJU SIREVA

U radu se analiziraju načini rada, kao i konstrukcija četiri tipa elektronskih mikroskopa: skenirajućeg elektronskog mikroskopa; krio-skenirajućeg elektronskog mikroskopa; transmisionog elektronskog mikroskopa i envajronmental skenirajućeg elektronskog mikroskopa, kao i konfokalno lasersko skenirajućeg mikroskopa, predstavnika svetlosne mikroskopije, koji se trenutno najviše koriste za analizu namirnica mlečnog porekla. Prikazane su razlike između pojedinih kategorija mikroskopije, ukazano je na prednosti i mane u pogledu analiziranja namirnica različitog porekla. Prikazane su opšte metode pripreme bioloških uzoraka za sve vidove elektronske mikroskopije, metode pripreme uzoraka sireva, kao i prikazi mikrografija. Primena elektronske mikroskopije ima značajnu ulogu u pručavanju namirnica, posebno njihove mikrostrukture. Istraživanje strukture će verovatno postati važna komponenta budućih biotehnoških istraživanja i koristiće se za posmatranje strukturalnih promena namirnica.

**Ključne reči:** skenirajući elektronski mikroskop • transmisioni elektronski mikroskop • envajronmental skenirajući elektronski mikroskop • konfokalno lasersko skenirajući mikroskop • sir • mikrostruktura

### UVOD

Mikroskopija i ostale tehnike slikanjem su, kao jedinstveni analitički metodi iz kojih proizilaze rezultati u formi slike, najpodesnije tehnike za ocenu strukture namirnica. Mikroskopija se koristi kao važan alat za razumevanje veza koje doprinose uspostavljanju odgovarajućih fizičko-hemijskih stanja, kao i teksturalnih svojstava namirnica, kao što su: procesi koagulacije, praćenje efekata pojedinih procesa koji se primenjuju u preradi hrane (npr. toplotna denaturacija proteina), posmatranje uljne faze posle zagrevanja i rastezanja sireva parenog testa i sl. U pojedinim slučajevima, tehnike mikroskopije mogu biti korišćene i za praćenje procesa koji dovode do pojave posebnih struktura (pene, emulzije, disperzije, ekskrudata i vlakana) (Kalab, Allan-Wojtas, Miller 1995).

Mikroskopija je našla široku primenu u pručavanju i analiziranju strukture sireva, čime se dobija jasnija slika u pogledu elemenata koji sačinjavaju njihovu strukturu, dobijaju se informacije o stvarnom izgledu tih elemenata i njihovoj međusobnoj povezanosti, kao i mogućnost da se posmatraju promene mikrostrukture sirnog testa tokom zrenja (Claverie, Casanove 1998, Everett, Auty 2008, Kalab et al. 1995, Guinee et al. 1995, Pudja 1992). U tom smislu, mikroskopija ima jako veliku važnost pri kreiranju tehnoloških postupaka, u cilju dobijanja kvalitetnijih i u tehnološkom i senzornom smislu prihvatljivijih proizvoda.

U ovom radu izložene su najosnovnije informacije o konstrukciji i načinu rada četiri tipa elektronskih mikroskopa (skenirajućeg, krio-skenirajućeg, transmisionog i envajronmental

skenirajućeg elektronskog mikroskopa), kao i konfokalno lasersko skenirajućeg mikroskopa (predstavnika svetlosne mikroskopije), zatim pet tipova mikroskopa koji se trenutno najviše koriste za analizu namirnica mlečnog porekla. Prikazane su razlike između pojedinih tipova mikroskopije, ukazano je na prednosti i nedostatke u pogledu ispitivanja namirnica različitog porekla. Prikazane su metode pripreme bioloških uzoraka, uopšteno za sve vidove elektronske mikroskopije, kao i metode pripreme uzoraka sireva za pojedine tipove mikroskopije.

### TIPOVI ELEKTRONSKIH MIKROSKOPA

Podela elektronske mikroskopije (EM) izvršena je na dva glavna tipa - transmisioni elektronski mikroskop (TEM) i skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Međutim, kombinovanjem ove dve tehnike međusobno, kao i kombinovanjem sa nekim drugim tehnikama, realizovano je više tipova EM, tako da je klasifikacija tehnika na određene kategorije EM prilično teška. Pored ova dva glavna tipa EM, opisani su još neki tipovi mikroskopa koji imaju veći značaj u ispitivanju namirnica:

#### Skenirajući elektronski mikroskop

SEM je tip elektronskog mikroskopa koji ispituje, odnosno slika površinu uzorka skenirajući je sa visokoenergetskim snopom elektrona ([www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope)). Elektroni intereaguju sa atomima koji sačinjavaju uzorak, proizvodeći signal koji sadrži informaciju o topografiji površine uzorka, kompoziciji i drugim osobinama, kao što je električna provodnost.

Adresa autora:  
 Prof. dr Vladimir B. Pavlović, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun  
 tel.: 011/2615-315/lok 445; 062/82-57-102  
 e-mail: vpavlovic@sbb.rs

Proučavanje evolucije mikrostrukture primenom skenirajuće elektronske mikroskopije vrši se domenskom analizom, kao i analizom mikrostrukturnih konstituenata poput oblika i srednje veličine zrna, pora, kao i njihovog međusobnog rasporeda (Živković i sar. 1999, Ivetić i sar. 2008, Pavlović i sar. 2007a). Kvantitativna analiza raspodele veličina zrna uzorka može se obaviti korišćenjem linearne metode merenja odsečaka koje pravi testna linija sa granicama zrna, kao i primenom specijalnih metoda za automatsku mikrostrukturnu analizu (Pavlović i sar. 2006, Mitić i sar. 2004). Kod ove vrste analiza, da bi se izbeglo nagomilavanje negativnog naelektrisanja na površini uzorka, a koje skretanjem primarnih i emitovanih elektrona može dovesti do gubljenja slike, površina uzorka se prekriva tankim slojem zlata debljine 30-40 nm (Pavlović i sar. 2001).

Uporedo sa mikrostrukturnom analizom, primenom energijske disperzione spektrometrije (EDS analiza), može se vršiti i kvalitativna analiza pojedinih faza, prisutnih u mikrostrukтури (Mitić i sar. 2008, Pavlović i sar. 2007b). Za ovu vrstu ispitivanja koristi se EDS sistem koji je povezan sa elektronskim mikroskopom i kompjuterizovanim multikanalnim analizatorom (MCA). Ovakav tip analizatora omogućava analizu u oblasti x zračenja od 0,5 do 20 keV sa 10 V po kanalu.

SEM funkcioniše tako što elektronski top stvara elektronski snop koji prolazi kroz tri sistema sočiva pre nego što pogodi uzorak. Prvo prolazi kroz kondenzore (sočiva za kondenzovanje), koji fokusiraju elektrone u uzak snop, pa kroz skenirajući navoj koji omogućava da snop skreće, odnosno da šeta po površini uzorka, i objektiv (sočiva objektivna) koja pomaže u fokusiranju slike. Usmereni snop pogađa uzorak što dovodi do stvaranja nekoliko tipova naknadnih emisija. Emisije se prihvataju detektorom koji ima za cilj da pojača signale i da ih oblikuje u odgovarajuće slike na kompjuteru. Slika sa SEM-a se zasniva na elektronskim interakcijama na površini uzorka. SEM pruža mogućnost dobre 3D prezentacije strukture uzorka. Slike su crno-bele.

Kod SEM-a koristimo niske napone ubrzanja da sprečimo penetraciju snopa u uzorak, pošto se zahteva stvaranje sekundarnih elektrona sa površine uzorka. Stoga je za biološke uzorke uobičajeno da se koristi napon

od oko 1-5 kV i, ako je SEM sposoban, da koristi napone i do 30 kV.

U zavisnosti od vrste skenirajućeg elektronskog mikroskopa moguće je detektovati dve vrste signala na osnovu kojih se formira slika površine ispitivanog uzorka. Ovi signali potiču od sekundarnih i rasejanih elektrona: Sekundarni elektroni (eng. secondary electrons) - (SE) – elektroni koji su izbačeni iz K-orbitale uzorka neelastičnom interakcijom sa elektronskim zrakom. Oni imaju veoma malu energiju, manju od 50 eV, i mogu da prikažu detalje veličine od 1-5 nm. Ovi zraci, zbog svoje male energije, mogu veoma malo da se udalje od površine uzorka, pa kao rezultat toga daju najbolju rezoluciju slike. Zbog načina na koji je slika formirana, SEM mikrografi imaju veliku dubinu posmatranja, tako da može da se dobije 3D slika, korisna za razumevanje površinske strukture uzorka. Moguć je širok opseg uveličanja, od 25 do 250.000x, što je za oko 250x više nego kod najboljih svetlosnih mikroskopa.

Rasejani elektroni (eng. backscattered electrons) - (BSE) su elektroni iz elektronskog snopa koji su rasejani sa uzorka elastičnim sudarom sa atomima uzorka. Oni imaju veliku energiju, koja u zavisnosti od napona ubrzanja, može varirati od 50 eV pa na više. Rasejani elektroni, koji potiču od teških elemenata (elemenata sa velikim atomskim brojem), imaju veću jačinu od elektrona koji potiču od lakih elemenata (elemenata sa malim atomskim brojem). Na ovaj način dolazi do jasne slike sa kontrastom, koji može da prikaže različite hemijske kompozicije. Njihova visoka energija rezultuje u većem specifičnom intenzitetu interakcije i time smanjuje rezoluciju slike nastale na ovaj način.

SEM i TEM su se pokazali korisnim u ispitivanju malih strukturalnih elemenata u siru, kao što su mikroorganizmi i kazeinski matriksi, kao i za posmatranje delimičnih promena koje se dešavaju na matriksu tokom proizvodnje i zrenja.

SEM se koristi za površinsku analizu uzorka, poseduje mogućnost visoke rezolucije, naročito pri posmatranju kazeinskog matriksa i masnih kapi, ali se u pojedinim slučajevima, zbog opsežne pripreme uzorka, proteini i masne kapi ne mogu videti sa sigurnošću (Noronha et al. 2008).

Transmisioni elektronski mikroskop TEM je tip elektronskog mikroskopa kod koga se slika formira na drugačiji način u odnosu na SEM.

Elektronski snop prolazi kroz kondenzor koji ga fokusira, a zatim pogađa ultra tanak, za elektrone poluprovodan uzorak intereagujući sa njim, dok prolazi kroz njega. Ideja za TEM nastala je od pretpostavke da elektronski snop, pored čestične, poseduje i talasnu prirodu, a da se uzorak ponaša kao difrakciona rešetka. Signal koji se detektuje i koji nosi informaciju o strukturi uzorka potiče od propuštenih (transmitovanih) elektrona (za razliku od SEM-a, kod koga potiče od SE i BSE). Signal se pojačava serijom magnetnih sočiva i fokusira na odgovarajući uređaj za stvaranje slike, kao što su fluorescentni ekran, sloj fotografskog filma ili senzor osetljiv na svetlo - CCD kamera (eng. charged-cupled device) ([www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission\\_electron-microscopy](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron-microscopy)). Za razliku od SEM-a, koji se koristi za ispitivanje površine, TEM se koristi za ispitivanje unutrašnje strukture uzorka.

Elastična interakcija je veoma jaka, tako da debljina uzorka mora da bude veoma mala. Debljina povećava elektronsku energiju. Stoga, ukoliko želimo da umanjimo neelastične interakcije, uzorak ne sme biti deblji od 1  $\mu$ m. Za konvencionalni TEM debljina uzorka od oko 100 - 300 nm je dobra, dok veoma velika rezolucija, tzv. 'atomska rezolucija slike' zahteva debljinu ispod 10 nm (Claverie, Casanova 1998). Sposobnost da odredi poziciju atoma u materijalu, čini TEM nezamenljivim instrumentom u nanotehnološkim istraživanjima, uključujući heterogenu katalizu, kao i razvoj tehnološkog postupka proizvodnje poluprovodnika za elektroindustriju.

Rezolucija TEM-a je za red veličine bolja od rezolucije SEM-a, mada je u biološkim naukama priprema uzorka ta koja i dalje ograničava rezoluciju mikroskopa više od njega samog. Slike TEM-a su 2D, ali ako slikamo pod različitim uglovima i obradimo tu seriju pod određenim kontrastnim uslovima, možemo dobiti i 3D prezentaciju uzorka. Slike su crno-bele.

TEM se koristi za posmatranje unutrašnje strukture uzorka i najčešće poseduje mogućnost bolje rezolucije u odnosu na SEM. Međutim, u pojedinim slučajevima visoka rezolucija može biti i neadekvatna, jer su upravo mikrografije sa finom rezolucijom nepodesne za makroskopsku identifikaciju nekih materijala kao što je mast.

### Envajromental skenirajući elektronski mikroskop (ESEM)

ESEM je tip skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Njegova glavna prednost leži u tome što analitičar može da menja okolinu (okruženje) uzorka putem različitih vrednosti pritiska, temperature i sastava atmosfere. ESEM zadržava sve prednosti konvencionalnog SEM-a, ali uklanja ograničenje visokog vakuuma u okruženju uzorka. U tom smislu, mokri, masni, prljavi, neprovodni uzorci mogu da se ispituju u njihovom prirodnom stanju, bez modifikacija ili pripreme.

Kroz celu kolonu (deo mikroskopa kroz koji prolazi snop, pre nego što pogodi uzorak) gde molekuli gasa mogu da raseju elektrone i unište snop, prisutan je visoki vakuum. Međutim, umesto korišćenja jednog otvora za kontrolu pritiska, kao kod konvencionalnog SEM-a, ESEM, da bi razdvojio komoru uzorka od kolone, koristi višestruke otvore za kontrolu pritiska.

ESEM koristi odgovarajući sekundarni detektor (eng. environmental secondary detector - ESD), koji funkcioniše u nevakuumskoj sredini, za razliku od Evrhart-Tonli (eng. Everhart-Thornley (ET) detektora korišćenog kod SEM-a.

Primenjujući pozitivan potencijal od nekoliko hiljada volti na detektor, SE ubrzavaju u polju detektora i sudaraju se sa molekulima gasa. Rezultujuća jonizacija stvara dodatne elektrone, pojačavajući originalan signal SE i pozitivnih jona. Detektor sakuplja signale SE i propušta ih direktno do elektronskog pojačavača. Kod neprovodnih uzoraka pozitivni joni, nastali u procesu jonizacije gasa, privučeni su ka površini uzorka i dobro sprečavaju naelektrisanje.

Prednosti ESEM-a nad konvencionalnim SEM-om zaista su velike ([www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf](http://www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf)):

1. Gasna jonizacija u komori za uzorak eliminiše naelektrisanje, koje je uobičajeno prisutno kod neprovodnih uzoraka, tako da nije potrebno da se uzorci naporavaju provodnim slojem, čime se ujedno sprečava i moguće oštećenje uzorka u toku pripreme.

2. ESEM može da slika mokre, prljave i masne uzorke. Kontaminacija neće oštetiti ili umanjiti kvalitet slike.

3. ESEM eliminiše potrebu pripreme uzorka i omogućava posmatranje

uzorka u procesima obrade, kao što su istezanje, sabijanje, deformacija, adhezija, zagrevanje, hlađenje, smrzavanje, topljenje, hidratacija, dehidratacija i sublimacija.

4. ESEM može da oformi sliku od uzorka zagrejanog i na 1500°C, zato što je ESD neosetljiv na toplotu.

5. ESD je takođe neosetljiv na svetlo, svetlost od toplotom usijanih uzoraka, katodoluminiscenciju i fluorescenciju, tako da ovakvi efekti ne ometaju kvalitet slike.

6. ESEM na većem naponu ubrzanja može da koristi i signal od x-zraka izolovanih uzoraka.

### Mikroskopija pri niskoj temperaturi

Prethodno opisani tipovi mikroskopa (SEM, TEM i ESEM), u slučajevima kada je potrebno da se uzorak stabilise na temperaturi tečnog azota, imaju svoje modifikacije. Naime, modifikacija se ogleda u tome što se mikroskopima dodaje još jedan segment - tzv. krio komora, koja služi da se uzorak posle kriofiksacije održi na niskoj temperaturi. Ovako modifikovani SEM, TEM, odnosno ESEM nazivaju se LT-SEM (eng. low temperature SEM), LT-TEM, odnosno LT-ESEM, mada se često koriste i nazivi Krio-SEM, Krio-TEM i Krio-ESEM, koji označavaju da je uzorak stabilisan tehnikom kriofiksacije.

### Konfokalni lasersko-skenirajući mikroskop (CLSM)

CLSM, koji se ponekad u literaturi označava i skraćenicom CSLM, ne pripada EM, već svetlosnoj mikroskopiji, ali je obrađen u radu zbog njegove česte upotrebe kod ispitivanja bioloških uzoraka i namirnica.

CLSM je jedan od tri komercijalno dostupna tipa konfokalne mikroskopije. To je tehnika za dobijanje slike visoke rezolucije sa dubokom selektivnošću. Za neprozirne uzorke korisna je za pripremanje površinskih profila, dok se kod prozirnih koristi za slikanje unutrašnjosti strukture. CLSM, za razliku od standardne konfokalne mikroskopije, kao izvor svetlosti koristi laserski zrak koji skenira tačku po tačku trodimenzionalne površine. Za biološke uzorke najčešće se koristi fluorescentno obeležavanje uzoraka. Zbog očuvanja intenziteta svetlosti koja se transportuje, svi delovi uzorka na optičkom putu su eksitovani, a fluorescencija se detektuje fotodetektorom ili kamerom ([www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal\\_laser\\_scanning-microscopy](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning-microscopy)).

wiki/Confocal\_laser\_scanning-microscopy).

CLSM nudi nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalni svetlosni mikroskop, uključujući i poboljšanu rezoluciju (oko 0.2 nm), sposobnost da se optička sekcija spusti u uzorak, pribor da se 2D mikrofografije prevedu u 3D slike, kao i fluorescentno obeležavanje, kako bi se ispitala interakcija i relativna lokacija različitih komponenti u namirnicama (Everett, Auty 2008).

Proučavanja CLSM-om omogućila su ispitivanje strukture masnih kapi, geliranje mleka, topljenje sira, propustljivost gela mleka, efekat čedarizacije i parenja na stapanje masnih kapi u čedru, odnosno mocareli, lokalizaciju ćelija startera, odnosno probiotskih bakterija u siru, lokalizaciju EPS-a u siru itd. Područje analize hrane u kome CLSM pokazuje najviše prednosti, je ispitivanje visokomasnih namirnica koje je teško pripremiti za konvencionalnu mikroskopiju, a da se pri tome zadrži faza masti. Naime, u pripremi ovakvih uzoraka fiksacija i dehidratacija su često nepotrebni. CLSM je korisna tehnika za ispitivanje strukture namirnica, zato što nije ograničena na tanke uzorke. Omogućava procenu prostornog rasporeda strukturalnih komponenata, kao i praćenje dinamičnih procesa kao što su povezivanje, agregacija i separacija faza i njihovo upoređivanje sa rezultatima reoloških merenja. Pored navedenih prednosti, značajno je napomenuti i mogućnost rekonstrukcije neporemećene 3D mikrostrukture i njenog konstantnog praćenja, kao i fluorescentnog obeležavanja i identifikacije specifičnih komponenata unutar sistema.

### TEHNIKE PRIPREME UZORAKA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Materijal koji bi trebalo da se analizira EM, generalno zahteva odgovarajući postupak pripreme uzorka. Specifičan pristup tokom pripreme uzorka je neophodan zbog toga što je celokupna unutrašnjost mikroskopa pod visokim vakuumom, pa neodgovarajuće pripremljen materijal može da onemogući elektronski snop da putuje pravolinijski. Takođe, za sliku na SEM-u, da bi se sprečila akumulacija električnog naboja na površini, uzorci moraju biti bar na površini elektroprovodni i električno uzemljeni. Neprovodni uzorci imaju težnju da se naelektrisu pri skeniranju elektronskim snopom, naročito u fazi detekcije SE, što izaziva greške u skeniranju, koje se odražavaju na kvalitet slike.

Tehnike koje se koriste u metodama za pripremu uzoraka za elektronsku mikroskopiju su ([www.jic.ac.uk/microscopy/intro/EM.html](http://www.jic.ac.uk/microscopy/intro/EM.html)):

Seciranje – priprema tankih slojeva uzorka. Za svetlosnu mikroskopiju seciranjem se može obezbediti uzorak debljine od nekoliko  $\mu\text{m}$ , ali za elektronsku mikroskopiju uzorci moraju biti veoma tanki, tako da su poluprovodni za elektrone, tipično oko 90 nm debljine. Ovi ultratanki preseki za elektronsku mikroskopiju se vrše na uređaju zvanom - ultramikrotom (engl. ultramicrotome).

Fiksacija – uopšteni termin korišćen da opiše proces očuvanja uzorka, a ukoliko se radi o biološkom uzorku da ga i stabilise i zaštiti od daljeg kvarenja. Na ovaj način je omogućeno da se posmatranje uzorka vrši što bliže njegovom prirodnom stanju. U hemijskoj fiksaciji za EM, najčešće se koristi glutaraldehyd - da poveže proteinsku strukturu, odnosno osmium tetroksid - da očuva lipide.

Dehidratacija – uklanjanje vode iz uzoraka. Voda se generalno zamenjuje organskim rastvaračima, kao što je etanol, ili aceton, kao oslonac za totalno isušivanje za uzorke SEM-a, ili za učvršćivanje uranjanjem u smolu za uzorke TEM-a.

Učvršćivanje – uranjanje uzorka u vosak (za svetlosnu mikroskopiju), odnosno u smolu, kao što je araldit ili LR belo (za TEM), koje onda polimerizuju u tvrdi blok, čime se praktično omogućava ponovno seciranje, kao naredna faza pripreme uzorka.

Bojenje – bojenjem uzoraka teškim metalima (najčešće se koriste olovo ili uranijum), povećava se elektronska gustina, koja rezultira u povećanju broja interakcija između elektrona u elektronskom snopu i onih u uzorku, čiji naknadni signal uzrokuje kontrast na rezultujućoj slici.

Sušenje – predstavlja dodatno isušivanje uzorka u posebnoj sušnici (engl. critical point drier) do njegove kritične tačke.

Naparavanje – ultratanak premaz elektro-provodnog materijala nanosi se naparavanjem u uređaju za naparavanje (engl. sputter coater). Ovo se radi u cilju zaštite naboja uzorka, koji se javlja zbog akumulacije statičkog električnog polja, izazvanog zračenjem elektrona tokom slikanja. Takođe, povećava se iznos SE koji mogu biti detektovani sa površine uzorka na SEM-u, a time dolazi i do pojačavanja signala. Naparavanje se vrši

zlatom, kombinacijom zlato/paladijum, platinom, odnosno hromom.

Kriofiksacija – brzo smrzavanje uzorka potapanjem u tečni azot, najčešće na temperaturama od  $-197^{\circ}\text{C}$  do  $-210^{\circ}\text{C}$ . Posle kriofiksacije uzorak se stavlja u krio komoru mikroskopa, koja je pod vakuumom, da bi mu se održala niska temperatura i da bi se sprečilo odmrzavanje. Polje EM pod niskom temperaturom, zasniva se na primeni ove tehnike koja ujedno omogućava da se izbliza virtuelno posmatra bilo koji biološki uzorak, što bliže njegovom prirodnom stanju.

Hladno-prelamanje i hladno-nagrizanje (graviranje) – tehnika pripreme, posebno korisna za ispitivanje lipidnih membrana i proteina inkorporiranih u njih. Sveže tkivo, ili suspenzija ćelija brzo se zamrzava kriofiksacijom i prelama, dok se održava na temperaturi tečnog azota. Hladno prelomljena površina se nagriža (gravira) povišenjem temperature na oko  $-95^{\circ}\text{C}$  u toku nekoliko minuta, da se dopusti površini leda da sublimira i 'otkrije' mikroskopske detalje. Za SEM, uzorak je na ovaj način pripremljen za posmatranje. Za TEM on može biti naparen platinom u visokovakuumsom isparivaču pod niskim uglom (tipično oko  $6^{\circ}$ ), a zatim se dodatno naparava ugljenikom, normalno na površinu, čime se omogućava dobijanje kopije uzorka. Uzorak se potom vraća na sobnu temperaturu i pritisak, a ekstremno krhka metalna kopija izlomljene površine odvaja se od osnovnog biološkog materijala pažljivom hemijskom digestijom sa kiselinama, hipohloritnim rastvorom ili SDS detergentom. Kopija se zatim pere od zaostalih hemikalija, suši i posmatra pod TEM-om.

Inkapsulacija – tečni uzorci, kao i uzorci koji podležu dezintegraciji tokom pripreme za EM, zapečaćuju se u agar gel kapsule, da bi sa njima moglo da se rukuje kao sa čvrstim materijalom. Staklena Pasterova pipeta, spoljnog prečnika 1 mm, sterilise se plamenom. Agar (25g/l) se drži na  $40^{\circ}\text{C}$  i nekoliko kapi se stavlja na staklenu površinu da bi očvrstlo. Uzorak (npr. mleko ili pavlaka) uvlači se u pipetu (5 – 10 mm) i donji deo se zatvara malom količinom agra. Kapilara sa uzorkom se onda stavlja u vruć agar, da bi se oko nje napravio zid 0.5 mm debljine. Uzorak se potom premešta u rukavac od agra i gornji kraj se zatvara kapljicom agra. Inkapsulirani uzorci se fiksiraju glutaraldehydom i postfiksiraju osmijum tetroksidom, a potom dehidrišu u seriji etanola 20,

40, 60, 80 i 96 ml/100 ml (Kalab, Larocque 1996).

Korišćenje odgovarajućih tehnika je uslovljeno izborom tipa mikroskopa koji će se koristiti pri ispitivanju namirnica.

## METODE PRIPREME UZORAKA SIRA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Metode pripreme uzoraka za SEM i TEM izložene su u tabeli 1, dok su postupci za ostala tri tipa EM prikazani u narednom tekstu.

Seciranje kao početna tehnika u pripremi uzoraka, malo se razlikuje u zavisnosti od tipa mikroskopa. Uzorci se iz centra sirnog bloka seku na kockice koje bi za TEM trebalo da budu do 1 mm po stranici, dok su za ostale metode uzorci nešto veći, uobičajeno 1 – 2 mm po stranici.

Krio-SEM:

Secirani uzorci se postavljaju na bakarni držač i zajedno sa njim kriofiksiraju na  $-210^{\circ}\text{C}$ . Potom se premeštaju u krio komoru na  $-180^{\circ}\text{C}$ , gde se unutrašnjost uzorka razotkriva koristeći skalpel. Polomljena površina se nagriža (gravira) povišenjem temperature na  $-88^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 5 do 40 min (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Kada je sublimirano dovoljno vode, uzorak se hladi na  $-180^{\circ}\text{C}$  (Noronha et al. 2008), odnosno na  $-95^{\circ}\text{C}$  (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Potom se u krio komori naparava zlatom (3 mA, 2 min) i ispituje koristeći napon od 10 kV (Montesinos-Herrero et al. 2006, Noronha et al. 2008), odnosno 3 kV (Hassan, Frank, Elsoda, 2003).

ESEM:

Za ovaj tip mikroskopa gotovo da nije potrebna nikakva priprema uzoraka. Oni se posle seciranja odmah postavljaju u mikroskop i posmatraju pod naponom od 20 kV (Noronha et al. 2008).

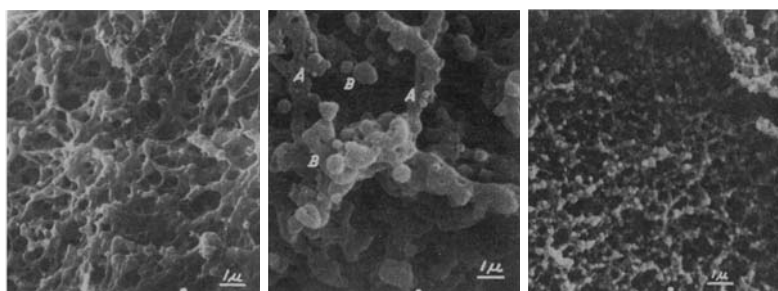
CLSM:

Uzorci kod kojih se prevashodno posmatra masna faza boje se 0,2 % rastvorom Nil plavog (engl. Nile Blue), koji sadrži tragove fluorescentne boje Nil crveno (engl. Nile Red), za bojenje masne faze (Ye, Hewitt 2009), dok se uzorci kod kojih se posmatra proteinska faza boje 0.2% rastvorom Nil plavog u toku 5 min. i 0,2 % brze zelene (engl. Fast Green FCF), koja boji proteinsku fazu.

Tabela 1. METODE PRIPREME UZORAKA ZA SEM I TEM  
Table 1. METHODS OF SAMPLES PREPARATION FOR SEM AND TEM

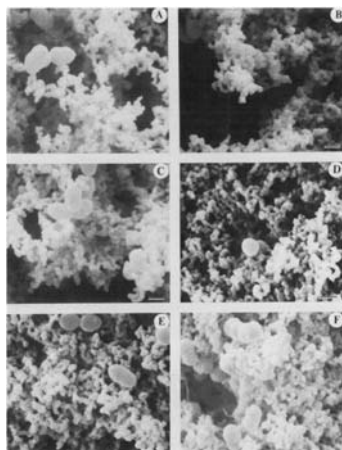
Tip mikroskopa, metode i referencije	Tehnike pripreme uzoraka										Napom ubrzanja
	Fiksacija	Postfiksacija	Dehidratacija	Učvršćivanje	Bojenje	Obzmatšćivanje	Smrzavanje	Sušenje	Naparavanje	Napom ubrzanja	
SEM	Metod 1 (Meng, Sundaram 2009)	2,8g/100g Glutaraldehida u 0,05 mol/l Na-fosfatnog pufera pH 6,00, 48h, 7°C	-	Graduisana serija etanola (2,5, 50, 70, 80, 95, 100, 100 i 100 ml/100ml), 15 min	-	-	Hloroform, 3x po 15 min; apsolutni etanol, 10 min	Tečni azot -196°C; prelamanje; otapanje u apsolutnom etanolu	Sušenje do kritične tačke	Naparavanje zlatom	10 kV
	Metod 2 (Kanani et al. 2009)	2,5% (w/v) Glutaraldehida 3h, <10°C	-	-	-	-	-	Tečni azot -196°C; prelamanje	-	-	20 kV
	Metod 3 (Tavaria et al. 2006)	Formyl saline solution	-	Graduisana serija etanola (10 - 100%), 10 min	-	-	-	-	-	-	20 kV
TEM	Metod 1 (Kheudir et al. 2002)	0,05 % (w/v) Glutaraldehida u 0,1M Na-kakodilnatom puferu pH 7,2, 2h, 4°C; 2,5 % paraformaldehida, u 0,1M Na-kakodilnatom puferu pH 7,2, preko noći, 4°C; ispiranje Na-kakodilnatim puferom, 4x po 10 min	1% (w/v) Osmijum tetroksida u teroksid, 2h, 4°C; ispiranje Na-kakodilnatim puferom, 4x po 10 min	-	-	Uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	-	80 kV
	Metod 2 (Wium et al. 2003)	30g/l Glutaraldehida u 0,1M acetatnom puferu pH 4,6, 1h; ispiranje acetatnim puferom, 2x	(10g/l) Osmijum tetroksida u acetatnom puferu, 90 min u mraku; ispiranje acetatnim puferom, 2x	Graduisana serija etanola (30, 50, 70, 80, 95 i 100%)	Epon 812, (polimerizacija 48h, 65°C)	20g/l Uranyl acetat i 26,4g/l olovo citrat	-	-	-	60 kV	
	Metod 3 (Dabour et al. 2005)	Fiksativna mešavina*, 4°C; preko noći; ispiranje kakodilnatim puferom sa 0,15% rutenijum crvenim	1% (w/v) Osmijum tetroksid u kakodilnatim puferu sa 0,15% rutenijum crvenim, preko noći, 4°C; ispiranje u istom puferu	-	-	1% Toluidin plavo, uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	-	80 kV
	Metod 4 (Iamime et al. 1999)	28g/kg Glutaraldehida; ispiranje sa 0,05 mol/l veronal-acetatnim puferom pH 6,75	20g/l Osmijum tetroksida u 0,05 mol/l veronal-acetatnom puferu pH 6,75, 2h; ispiranje u istom puferu	Sparovano nisko viskozno učvršćujuće sredstvo	-	Uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	-	60 kV

Fiksativna mešavina\*: 0,05% (v/v) Glutaraldehida; 2,5% (w/v) paraformaldehida; 2mM kalcijum hlorida; 1% (w/v) saharoze; 0,15% (w/v) rutenijum crvenog u 0,1 M natrijum kakodilnatom puferu, pH 7,2



Slika 1. SEM MIKROGRAFIJE STRUKTURE (SA LEVA NA DESNO) SIRIŠNO, KISELO-TOPLOTNO, ODNOSNO TOPLOTNOKOAGULISANOG GELA, FIKSIRANOG GLUTARALDEHIDOM, A – ČESTICE VELIČINE KAZEINSKIH MICELA, B – KRUPNE ČESTICE (VEĆE OD 1  $\mu\text{m}$ ). UVEĆANJE 6.000X.

Figure 1. SEM MICROGRAPHS OF THE STRUCTURE (FROM LEFT TO RIGHT) RENNED, ACID-HEAT AND HEAT-INDUCED GELS, RESPECTIVELY FIXED WITH GLUTARALDEHYDE, A - PARTICLES OF THE SIZE OF CASEIN MICELLES; B - LARGE PARTICLES (UP TO 1  $\mu\text{m}$ ). MAGNIFICATION 6.000X



Slika 2. SEM MIKROGRAFIJE: FAZE PROIZVODNJE SIRIŠNOKOAGULISANOG KOTIDŽ SIRA: A – RANI GEL; B – GEL NEPOSREDNO POSLE SEČENJA; C – GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 40°C; E – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 50°C; F – GEL NA KRAJU DOGREVANJA (55°C). UVEĆANJE 6.500X, LINIJA PREDSTAVLJA 1  $\mu\text{m}$ .

Figure 2. SEM MICROGRAPHS: STAGES OF MANUFACTURE OF CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: A - EARLY GEL; B - AFTER CUTTING; C - END OF HEALING; D - DURING COOKING AT 40°C; E - DURING COOKING AT 50°C; F - END OF COOKING 55°C. MAGNIFICATION 650X, BAR REPRESENTS 1  $\mu\text{m}$ .

Posle bojenja, uzorci se ispiraju destilovanom vodom i stavljaju na držače koji ne sadrže nikakvo fluorescentno sredstvo. Ar/Kr laser se koristi da pobudi Nil crvenu boju na 488 nm, odnosno Nil plavu boju na 568 nm (Buffa et al. 2001).

## PRIMENA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U PROUČAVANJU SIREVA

### Proučavanje koagulacije mleka i karaktera gela

Koagulacija mleka predstavlja prvu fazu u postupku proizvodnje sireva (Puđa, 2009). Način koagulacije mleka veoma bitno utiče na strukturu formiranog gela. Na slici 1 prikazane su SEM mikrografije gelova dobijenih

sirišnom (a) kiselotoplotnom (b), odnosno toplotnom (c) koagulacijom mleka (Kalab, Harwalker).

Sirišnokoagulišući gelovi sastoje se od velikog broja dugačkih lanaca. Ovi gelovi pokazuju strukturu neujednačene kompaktnosti, što je verovatno rezultat niskog sadržaja čvrstog materijala u gelu.

Kiselotoplotnokoagulišući gelovi se odlikuju grubljom strukturom. Gradivne jedinice gela su nekoliko puta veće u odnosu na dimenzije kazeinskih micela (slika 1, prikaz u sredini). Međutim, na mikrografiji se uočavaju i pozicije sa nepromenjenim dimenzijama kazeinskih micela (slika 1, prikaz u sredini). Porast volumena kazeinskih micela, otprilike od 100–300  $\mu\text{m}$ , verovatno nastaje kao rezultat toplot-

nog tretmana mleka. Bitan momenat u nastanku gela je način na koji se čestice povezuju. Čestice formiraju deblje lance, zajedno sa sveričnim fragmentima različitih veličina vezanih za ove lance, što sve zajedno doprinosi nastanku udebljanih lanaca matriksa.

Toplotnokoagulišući gelovi sastoje se od kazeinskih micela povezanih kratkim i tankim lancima - mostovima (slika 1, desno).

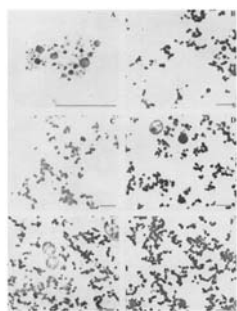
### Proučavanje formiranja sireva

SEM mikrografije na slici 2 prikazuju razlike u strukturi uzoraka kotidž sira tokom pojedinih faza postupka izrade. Primećuje se mali obim promena u poroznosti sve do početka faze dogrevanja, gde se klastiranje i umrežavanje klastera primetno povećava. Zbog afiniteta micela jednih prema drugima, lanci i veze se prekidaju na najslabijim mestima. Remecenje grušta tokom sečenja, takođe favorizuje prekidanje lanaca i veza i povećava klastiranje, tako da umrežene veze više nisu toliko evidentne (B i C). Tokom dogrevanja susedne micelle se sve više agregiraju i često menjaju oblik iz sveričnog u eliptični izgled (D). Promene u poroznosti su mnogo očiglednije ako se posmatraju slike sa TEM-a (slika 3).

SEM mikrografija na slici 4 prikazuje da su strukture gelova pri proizvodnji kotidž sira kod kisele koagulacije (leva kolona) slične gelovima kod sirišne koagulacije (desna kolona). Razlike su očigledne samo u ranim fazama koagulacije, što se na mikrografijama uočava kao intenzivnije stvaranje lanaca kiselokoagulisano gela (Gel A) u odnosu na sirišnokoagulisano gel (Gel B). U ostalim fazama ne uočavaju se značajne razlike u strukturi posmatranih gelova. Posmatranjem dimenzija na pojedinim mikrografijama uočava se da se kazeinske micelle, kao i nagrađeni agregati uvećavaju tokom izrade u tri značajno različite faze. Dimenzije micela, odnosno lanaca matriksa su: 87,6 nm (u mleku), 181,6 nm (tokom rane faze koagulacije), 184,9 nm (pre početka dogrevanja), 206,1 nm (tokom dogrevanja), odnosno, 207,6 nm (na kraju dogrevanja) (Glaser et al. 1979).

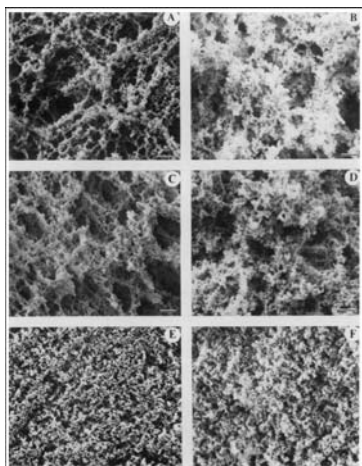
### Proučavanje strukture sireva mocarele tokom zrenja i lagerovanja

Slika 5 prikazuje mikrostrukturu defrostirane mocarele 2, 7, odnosno



Slika 3. TEM MIKROGRAFIJE: A – MLEKO; B-F FAZE U PROIZVODNJI SIRIŠNOKOAGULISANOG KOTIDŽ SIRA: B – GEL POSLE SEČENJA; C – GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 40°C; E – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 50°C; F – GEL NA KRAJU DOGREVANJA (55°C). UVEĆANJE: A - 37.000X; B-F 10.000X. LINIJA PREDSTAVLJA 1 µm.

Figure 3. TEM MICROGRAPHS: A – MILK; B-F STAGES OF MANUFACTURE OF CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: B - AFTER CUTTING; C - END OF HEALING; D - DURING COOKING AT 40°C; E - DURING COOKING AT 50°C; F - END OF COOKING 55°C. MAGNIFICATION: A -37.000X; B-F 10.000X. BAR REPRESENTS 1 µm.



Slika 4. SEM MIKROGRAFIJE FAZA U PROIZVODNJI KOTIDŽ SIRA DOBIJENIH KISELOM, ODNOSNO SIRIŠNOM KOAGULACIJOM: A – RANI KISELOKOAAGULISANI GEL; B – RANI SIRIŠNOKOAGULISANI GEL; C – KISELOKOAAGULISANI GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – SIRIŠNOKOAGULISANI GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; E – KISELOKOAAGULISANI GEL TOKOM DOGREVANJA; F – SIRIŠNOKOAGULISANI GEL TOKOM DOGREVANJA. UVEĆANJE 1.300X, LINIJA PREDSTAVLJA 5 µm.

Figure 4. SEM MICROGRAPHS STAGES IN MANUFACTURE OF ACID SET AND CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: A - ACID SET EARLY GEL; B - CULTURE SET EARLY GEL; C - ACID SET GEL AFTER HEALING; D - CULTURE SET CURD AFTER HEALING; E – ACID SET CURD DURING COOKING; F - CULTURE SET CURD DURING COOKING. MAGNIFICATION 1.300X, BAR REPRESENTS 5 µm.

14 dana posle proizvodnje (Meng, Sundaram 2009).

Dva dana posle proizvodnje na slici 5 A se uočava veliki broj nepravilnih šupljika, raspoređenih nasumično kroz proteinski matriks. Unutar šupljika uočavaju se lanci bakterija, a zidovi šupljika su teksturirani velikim brojem nazubčenja, što je verovatno rezultat prisustva masnih kapi ili ćelija starter kulture. Filamentozni materijal

asociran oko okruglastih bakterija može biti poreklom od EPS-a, ili ostataka membrana masnih kapi.

Struktura šupljika i proteinskog matriksa posle 7 dana zrenja ukazuje na veću povezanost proteinskog materijala, koji povezuje zidove šupljika, tako da je sveričan oblik masnih kapi jasno definisan (slika 5 C i D).

Posle 14 dana zrenja šupljike, tipične za mlade sireve, nestaju. Umes-

to tih šupljika uočava se retikularna struktura (slika 5 E i F). Takođe se uočava da su masne kapi obložene proteinskim matriksom. Promene u strukturi rezultirale su i u promeni poroznosti. Promene u mikrostrukturi mocarela sira tokom skladištenja, verovatno su rezultat redistribucije proteina i vode. Pozicija masnih kapi se ne menja tokom zrenja. Akumulacije seruma, koje su vidljive kod 2 dana starog mocarela sira bivaju apsorbovane od strane proteinskog matriksa tokom rane faze zrenja. Ovo je praćeno bubrenjem proteinskog matriksa koje se nastavlja sve dok se prostor između masnih kapi kompletno ne popuni proteinskim matriksom, što je evidentno prilikom posmatranja retikularne strukture.

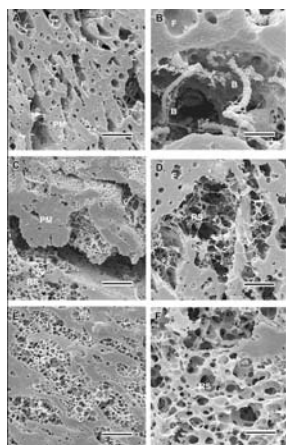
### Detekcija prisustva EPS-a

Za proučavanje EPS-a pogodno je da se tokom pripreme uzoraka za TEM koristi boja rutenijum crveno. Na taj način moguće je vizuelizovati EPS koji je asociran za bakterijsku ćeliju ili je oslobođen u spoljašnju vodenu fazu. EPS se može zadržati u okruženju same bakterije, ili može formirati tegljive formacije, u zavisnosti koja ga vrsta bakterija proizvodi (slika 6). U odsustvu rutenijum crvenog, nemoguće je da se vizualizuje EPS u okviru sirmog matriksa posmatranog TEM-om (Dabour et al. 2005).

Korišćenje metode krio-skeniranja elektronske mikroskopije pruža veoma dobre mogućnosti za proučavanje EPS-a, koji se primećuje u vidu velikih masa gustih filamenata odvojenih od proteinske mreže (slika 7 A i B), dok se kod konvencionalnog SEM-a prisustvo EPS-a zapaža u vidu tankih filamenata nasumično izmešanih sa proteinskom mrežom (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Dobar prikaz EPS-a dat je na primeru fermentisanog mleka (slika 7 C i D).

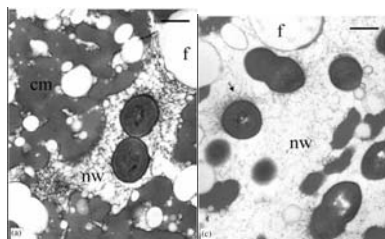
### ZAKLJUČAK

Metode elektronske mikroskopije imaju veliku ulogu u proučavanju namirnica i sve više postaju nezaobilazni instrument u analizi prehrambenih proizvoda, posebno u razumevanju stanja, strukture i veza koje nastaju u procesima obrade i prerade hrane.



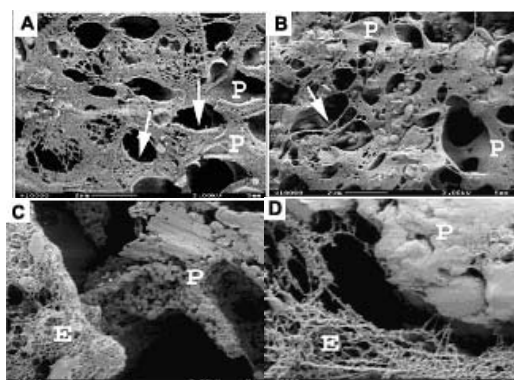
Slika 5. SEM MIKROGRAFIJE DEFROSTRIRANE MOCARELE POSMATRANE TOKOM ZRENJA; A I B, C I D, ODNOSNO E I F SU REPREZENTATIVI STRUKTURE POSLE 2, 7, ODNOSNO 14 DANA ZRENJA; PM - PROTEINSKI MATRIKS; F - MASNA KAP; RS - RETIKULARNA STRUKTURA; B - BAKTERIJA; SKALE PREDSTAVLJAJU A: 20  $\mu$ m, B: 5  $\mu$ m, C: 20  $\mu$ m, D: 10  $\mu$ m, E: 20  $\mu$ m, F: 8  $\mu$ m

Figure 5. SEM MICROGRAPHS OF DEFROSTED MOZZARELLA VIEW DURING RIPENING: A AND B, C AND D, AND E AND F ARE REPRESENTATIVES OF SAMPLE STRUCTURE AFTER 2, 7, AND 14 DAYS OF RIPENING, RESPECTIVELY; PM - PROTEIN MATRIX; F - FAT GLOBULE; RS - RETICULAR STRUCTURE, B - BACTERIA; SCALE BARS REPRESENT: A: 20  $\mu$ m, B: 5  $\mu$ m, C: 20  $\mu$ m, D: 10  $\mu$ m, E: 20  $\mu$ m, F: 8  $\mu$ m.



Slika 6. TEM MIKROGRAFIJE TEGLJIVE KULTURE SOJA *L. LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* JFR-1 PRISUTNE U SURUTKI ZAOSTALOJ U SURUTKINIM DŽEPOVIMA UNUTAR PROTEINSKOG MATRIKSA. UZORCI SU PRIPREMLJENI PO PROTOKOLU SA RUTENIJUM CRVENIM: CM - PROTEINSKI MATRIKS; F - MASNA KAP; NW - EPS UMREŽENA STRUKTURA. STRELIKA POKAZUJE NA EPS ASOCIRAN OKO ČELIJE; LINIJA JE PROMERA 500 nm.

Figure 6. TEM MICROGRAPHS OF ROPY STRAIN *L. LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* JRF-1 PRESENT IN RESIDUAL WHEY POCKETS IN THE PROTEIN MATRIX. SAMPLES WERE PREPARED BY THE RUTHENIUM RED PROTOCOL: CM - CASEIN MATRIX; F - FAT GLOBULE; NW - EPS NETWORK-LIKE STRUCTURE. ARROWS POINT TO CELL-ASSOCIATED EPS. BARS INDICATE 500 nm.



Slika 7. KRIO-SEM MIKROGRAFIJE FETA SIRA – SLIKE A I B I FERMENTISANOG MLEKA – SLIKE C I D: A – SIR IZRADEN SA BAKTERIJAMA KOJE NE PRODUKUJU EPS; B- SIR IZRADEN SA BAKTERIJAMA KOJE PRODUKUJU EPS; STRELIKA NA SLICI A POKAZUJE MASNU KAPLJICU; STRELIKA NA SLICI B PRIKAZUJE LED, VEROVATNO ASOCIRAN SA EPS-OM, P- PROTEINSKI MATRIKS, E – EPS.

Figure 7. CRYO-SEM MICROGRAPHS OF FETA CHEESE – PICTURES A AND B; AND FERMENTED MILK – PICTURES C AND D: CHEESE MADE FROM EPS NON-PRODUCING BACTERIA; B - CHEESE MADE FROM EPS PRODUCING BACTERIA; ARROW ON PICTURE A SHOWS A FAT GLOBULE; ARROW ON PICTURE B SHOWS ICE, POSSIBLY ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF EPS, P – PROTEIN MATRIX, E – EPS.

Posebno je značajno kombinovanje metoda mikroskopije sa reološkim merenjima, čime se ostvaruje suštinsko razumevanje fenomena teksture i konzistencije namirnica.

Procedura pripreme uzoraka za mikroskopsku analizu obuhvata više faza, koje su u pojedinim slučajevima kompleksne i veoma zahtevne. Savremenije metode elektronske mikroskopije su usmerene na pojednostavljene procedure pripreme, čime se ujedno omogućava da se uzorci, zahvaljujući pojednostavljenoj pripremi posmatraju u stanju koje je minimalno izmenjeno protokolom pripreme, čime se dobija realnija slika stvarnih stanja nastalih kao rezultat pojedinih procesa.

## LITERATURA

- Buffa, M.N., Trujillo, A.J., Pavia, M. and Guamis, B.: Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *International Dairy Journal*, 11 (2001) 927-934.
- Claverie, A. and Casanove, M.J.: Transmission electron microscopy and related techniques for silicon based materials characterization. *Microelectronic Engineering*, 40 (1998) 239-250.
- Cogan, T.M.: Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5 (1995) 543-568.
- Dabour, N., LaPointe, G., Benhamou, N., Fliiss, I. and Kheadr, E.E.: Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal*, 15 (2005) 1044-1055.
- Everett, D.W. and Auty, M.: Cheese structure and current methods of analyses. *International Dairy Journal*, 18 (2008) 759-773.
- Glaser, J., Carroad, P.A. and Dunkley, W.L.: Electron microscopic studies of casein micelles and curd microstructure in Cottage cheese. *J Dairy Sci*, 63 (1980) 37-48.
- Guinee, T.P., Pudja, P.D., Rewille, W.J., Harrington, D., Mulholland, E., Cotter, M. and Cogan, T.M.: Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5 (1995) 543-568.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. and Elsoda, M.: Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 13 (2003) 755-762.
- Ivetić, T., Vuković, Z., Nikolić, M.V., Pavlović, V.P., Nikolić, J.R., Minić, D. and Ristić M.M.: Morphology Investigation of Mechanically Activated ZnO-SnO<sub>2</sub> System. *Ceramics International*, 34 (2008) 639-643.
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P. and Miller, S.S.: Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis *Trends in Food Science & Technology*, 6 (1995) 177-186.
- Kalab, M. and Harwalker, V.R.: Milk gel structure. I. application of scanning electron microscopy



- to milk and other food gels. *Journal of Dairy Science*, 56 (1973) 835-842.
- Kalab, M. and Larocque, G.: Suitability of agar gel encapsulation of milk and cream for electron microscopy. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29 (1996) 368-371.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K. and Safari, M.: Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of ultrafiltered-Feta cheese. *Food Chemistry*, 113 (2009) 424-434.
- Kheadr, E.E., Vachon, J.F., Paquin, P. and Fliss, I.: Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12 (2002) 435-446.
- Meng, K.I. and Sundaram, G.: Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. *Food Science and Technology*, 42 (2009) 9-16.
- Mitić, V., Pavlović, V.B., Stojanović, B.D. and Nikolić, Z.: The influence of CaCO<sub>3</sub> on Microstructure and Dielectric Properties of BaTiO<sub>3</sub>. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*. 29 (2004) 1167-1169.
- Mitić, V.V., Pavlović, V.B., Miljković, M., Paunović, V.V., Jordović, B. and Živković, Lj.M.: SEM and EDS analysis of BaTiO<sub>3</sub> doped with Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ho<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. 14th Europran Microscopy Congress, EMC 2008, Germany, (2008) 555-556.
- Montesinos-Herrero, C., Cottell, C.D., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M.: Partial replacement of fat by functional fibre in imitation cheese: Effects on rheology and microstructure. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 910-919.
- Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G.R., Stapleton, J.J., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M.: Comparison of microscopy techniques for the examination of the microstructure of starch-containing imitation cheeses. *Food Research International*, 41 (2008) 472-479.
- Pavlović, V.B., Stojanović, B.D., Pavlović, V.P., Živković, Lj., Pejović, V.Z., Varela, J.A. and Ristić, M.M.: Microstructure of low temperature sintered BaTiO<sub>3</sub>. *Materials Engineering*, 12 (2001) 341-346.
- Pavlović, V.P., Petrović, D., Nikolić, Z. and Pavlović, V.B.: Automatic Microstructure Analysis of Sintered Materials. *FME Transactions*, 34 (2006) 159-163.
- Pavlović, V.B., Nikolić, M.V., Nikolić, Z., Branković, G., Živković, Lj., Pavlović, V.B. and Ristić, M.M.: Microstructural Evolution and Electric Properties of Mechanically Activated BaTiO<sub>3</sub> Ceramics. *J.Eur.Ceram.Soc.*, 27 (2007a) 575-579.
- Pavlović, V.B., Mitić, V.V., Nikolić, A. and Ristić, M.M.: Microstructure Analysis of BaTiO<sub>3</sub> Sintered with Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and LiF, VII Scientific Meeting "Physics and Technology of Materials", FITEM '07, Eds. G. Stanišić, V.B. Pavlović and A.M. Maričić, Čačak/Serbia, (2007b), p. 32
- Puđa, P.: Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. *Disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd*, (1992).
- Puđa, P.: *Tehnologija mleka 1, Sirarstvo, Poljoprivredni fakultet, Beograd*, (2009).
- Tamime, A.Y., Muir, D.D., Shenana, M.E., Kalab, M. and Dawood, A.H.: Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes 2. rheology, sensory perception of texture and microstructure. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32 (1999) 50-59.
- Tavaria, F.K., Reis, P.J.M., Malcata, F.X.: Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 895-902.
- Wium, H., Pedersen, P.S. and Qvist, K.B.: Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties of fat-free Feta cheese made from ultrafiltered milk. *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 287-296.
- [www.jic.ac.uk/microscopy/intro\\_EM.html](http://www.jic.ac.uk/microscopy/intro_EM.html)
- [www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope)
- [www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission\\_electron\\_microscopy](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy)
- [www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal\\_laser\\_scanning\\_microscopy](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning_microscopy)
- [www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf](http://www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf)
- Ye, A. and Hewitt, S.: Phase structures impact the rheological properties of rennet-casein-based imitation cheese containing starch. *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 867-873.
- Živković, Lj., Stojanović, B.D., Pavlović, V.P., Nikolić, Z.S., Marinković, B.A. and Srećković, T.V.: SEM Investigation of Domain Structure in (Ba,Ca,Pb)TiO<sub>3</sub>. *J.Europ.Ceram.Soc.*, 19 (1999) 1085-1087

## SUMMARY

### APPLICATION OF ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUES IN CHEESE RESEARCH

Vladimir B. Pavlović, Predrag D. Pudja, Goran A. Trpković, Jelena B. Miočinović  
University of Belgrade, Faculty of Agriculture

Four types of electron microscopes, i.e. scanning electron microscope, cryo-scanning electron microscope, transmission electron microscope and environmental scanning electron microscope, as well as confocal laser scanning microscope, as a representative of light microscopy that is nowadays frequently being used in analyzing milk origin nutrition, are discussed. The differences between these categories of microscopes are presented here. The advantages in analyzing milk products are discussed. General methods of preparation of biological samples for all types of electron microscopes are introduced, as well as specific methods for preparation of cheese samples. Representative micrographs of different cheese samples are discussed. Use of the electron microscopy plays an important role in nutrition research, especially concerning microstructure. Electron microscopy will probably become a significant tool in future research of food.

**Key words:** scanning electron microscope • transmission electron microscope • environmental scanning electron microscope • confocal laser scanning microscope • cheese • microstructure