

---

Basuni Hamzah  
Agus Wijaya  
Tri Wardani Widowati

---

# **TEKNOLOGI FERMENTASI PADA INDUSTRI PENGOLAHAN KEJU**

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
JURUSAN TEKNOLOGI PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA

PENERBIT:



# BUKU AJAR

## Teknologi Fermentasi pada Industri Pengolahan Keju

Basuni Hamzah, Agus Wijaya, Tri Wardani Widowati

Tim Editor

Ruth Samantha Hamzah

Diaz Almalik

UPT. Penerbit dan Percetakan

Universitas Sriwijaya 2022

Kampus Unsri Palembang

Jalan Srijaya Negara, Bukit Besar Palembang 30139 Telp. 0711-360969

email : unsri.press@yahoo.com, penerbitunsri@gmail.com website : www.unsri.unsripress.ac.id

Anggota APPTI No. 026/KTA/APPTI/X/2015 Anggota IKAPI No. 001/SMS/2009

Cetakan Pertama, 2022 200 halaman : 21x27 cm

### **Hak cipta dilindungi undang-undang.**

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penerbit.

<b>Sanksi pelanggaran Pasal 72 Undang-undang Nomor 19 Tahun 2002 Tentang Perubahan atas Undang-undang Nomor 12 Tahun 1997 Pasal 44 Tentang Hak Cipta</b>
1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah)
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta atau hak terkait, sebagaimana dimaksud ayar (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.500.000.00,00 (lima ratus juta rupiah)

Hak Terbit Pada Unsri Press

**ISBN: 978-623-399-068-4**

## PRAKATA

Segala puji dan syukur saya persembahkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan penulisan buku ajar berjudul Teknologi Fermentasi pada Industri Pengolahan Susu. Buku ajar ini diperuntukkan utamanya untuk para pengajar dan mahasiswa dalam mata kuliah Teknologi Fermentasi dan mata kuliah Mikrobiologi Pangan dan Pengolahan. Buku ini juga dapat dimanfaatkan oleh mahasiswa S1, S2, dan S3. Bahan kajian dalam buku ajar ini bersumber dari artikel-artikel jurnal nasional dan Internasional.

Buku ajar ini sangatlah belum sempurna. Kesalahan-kesalahan konsep materi dan penyusunan, serta kesalahan-kesalahan lainnya masih sangat mungkin ditemukan pada buku ini. Karena itu, penulis sangat terbuka atas adanya kritik yang membangun untuk perbaikan buku ajar ini agar dapat menjadi lebih berkualitas.

Terima kasih penulis kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam pengumpulan bahan-bahan sehingga dapat terbentuk manuskrip awal. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Saudari Ruth Samantha Hamzah yang telah melakukan *proofreading* secara intens.

Semoga buku ini dapat menjadi sumbangan yang berarti bagi perkembangan khasanah ilmu pengetahuan, khususnya yang menekuni bidang teknologi fermentasi khususnya pada industri pengolahan keju.

Palembang, April 2022



Penulis

**KATA SAMBUTAN SINGKAT**  
**PIMPINAN FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

Pimpinan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya memberikan apresiasi yang tinggi kepada penulis buku ajar berjudul Teknologi Fermentasi pada Industri Pengolahan Keju. Tentu saja buku ini sangat bermanfaat bagi para akademisi dan mahasiswa dalam bidang teknologi fermentasi, khususnya pada pengolahan keju.

Buku ini tentu akan menambah koleksi perpustakaan baik Universitas Sriwijaya, Fakultas-fakultas yang berada di bawah Universitas Sriwijaya, maupun perpustakaan lainnya.

Indralaya, April 2022

Dr. Ir. Muslim, M.Agr.  
Dekan Fakultas Pertanian  
Universitas Sriwijaya

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Contoh keju segar.....	5
Gambar 2 Contoh keju lunak.....	7
Gambar 3 Contoh keju semi lunak, Havarti dengan dill (kiri) dan Muenster (kanan) .....	8
Gambar 4 Contoh keju semi-keras.....	9
Gambar 5 Contoh keju keras.....	11
Gambar 6 Skema pembentukan jaringan misel kasein pada model Horne (2006).....	26
Gambar 7 Kelarutan kasein utuh dalam air sebagai fungsi pH.....	27
Gambar 8 Grafik profil potensial Zeta misel kasein.....	28
Gambar 9 Perubahan reologi selama pembentukan gel krim keju awal.....	31
Gambar 10 Perubahan reologi selama pembentukan awal (a) kuarsa dan (b) gel keju cottage .....	32
Gambar 11 Mekanisme katalitik yang diusulkan untuk proteinase aspartate.....	40
Gambar 12 Diagram langkah-langkah produksi starter laktat .....	53
Gambar 13 Koefisien difusi NaCl dalam air dalam keju ( $D^*$ ) sebagai fungsi dari kadar air awal keju. ....	88
Gambar 14 Scanning electron micrograph (SEM) keju Ragusano yang diasinkan pada (a) 2% NaCl, 0,1% Ca, dan 20°C; (B) 10% NaCl, 0,1% Ca, dan 20°C.....	89
Gambar 15 Pemindaian mikrograf elektron (500x) dari matriks keju whey kontrol.....	92
Gambar 16 Kurva creep-relaksasi untuk keju cheddar matang .....	94
Gambar 17 Contoh deformasi relatif sepotong keju setelah membawanya di bawah tekanan konstan pada waktu $t = 0$ .....	95
Gambar 18 Prosedur umum untuk pembuatan keju.....	108
Gambar 19 Representasi agregasi misel para-kasein, pembentukan gel, dan awal sineresis (mikro).....	111
Gambar 20 Skema representasi untaian misel paracasein membentuk persimpangan baru .....	112
Gambar 21 Contoh jalannya kadar air dadih selama pembuatan dadih.....	115
Gambar 22 Ikhtisar mekanisme umpan balik negatif PA-plasminogen-plasmin yang menurunkan regulasi sekresi susu.....	140
Gambar 23 Mekanisme adhesi awal antara sel dan membran selama proses filtrasi NF/RO..	154

## DAFTAR ISI

PRAKATA.....	i
KATA SAMBUTAN.....	ii
DAFTAR GAMBAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II RAGAM KEJU.....	3
Kelembaban.....	4
Keju segar.....	5
Keju lembut.....	7
Keju setengah lunak.....	8
Keju setengah keras.....	10
Keju keras.....	11
Keju ekstra keras.....	13
Sumber susu.....	13
BAB III ASPEK GIZI KEJU.....	20
Protein.....	21
Lemak.....	22
Karbohidrat.....	23
Vitamin.....	23
Mineral.....	24
BAB IV ASPEK BIOKIMIA DAN FISIK KEJU.....	27
Pembentukan, Sifat Struktural dan Reologi Gel Susu Koagulasi Asam.....	27
Mekanisme Koagulasi.....	29
Sifat Fisik Gel yang Diinduksi Asam.....	32
Pengaruh Parameter Komposisi dan Pengolahan Terhadap Sifat Tekstur Gel Susu Asam.....	37
Rennets - Aspek Umum dan Molekuler.....	40
Proteinase aspartat.....	40
Sifat Fisik Proteinase Aspartat.....	41
Struktur Proteinase Aspartat.....	43
Aktivasi Zymogen dari Proteinase Aspartat.....	44
Aspartat Proteinase Inhibitor.....	45
Mekanisme Pembekuan Susu.....	45
Chymosin Betis Rekombinan.....	46
Biang ragi Pemula-Aspek Umum.....	47
Jenis Biang ragi.....	48
Biang ragi Pemula Alami.....	49
Starter Strain Campuran (MSS).....	50
Metabolisme Kultur Pemula.....	52
Metabolisme Gula.....	52
Metabolisme Sitrat.....	52
Metabolisme Nitrogen.....	53
Metabolisme lainnya.....	55

Persiapan Pemula.....	55
Perbanyakkan Biang Ragi Pemula .....	56
Pelestarian Distribusi Biang Ragi Pemula.....	58
Bakteriofag dalam Biang Ragi Pemula .....	60
Sumber Kontaminasi .....	60
Pengendalian Bakteriofag di Pabrik Susu .....	62
Sistem Resistensi Bakteriofag Alami di LAB.....	62
Mikrobiologi Pematangan Keju .....	64
Bakteri Pemula .....	65
Bakteri non-starter .....	66
Lactobacilli non-starter.....	66
Pediococcus .....	68
Leuconostoc spp. ....	69
Enterococcus .....	69
Bakteri Asam Propionat (PAB).....	70
Micrococcus dan Staphylococcus.....	71
Cetakan .....	71
Ragi .....	72
Garam dalam Keju - Dampak Fisik dan Biokimia .....	73
Pengaruh Garam pada Pengendalian Mikroba .....	74
Efek Garam pada Aktivitas Enzim .....	77
Koagulan .....	77
Proteinase susu .....	78
Enzim Mikroba.....	79
Keju biru.....	80
Keju lainnya.....	81
Efek Garam pada Hidrasi Kasein .....	82
Efek pada Struktur Mikro Keju .....	83
Efek pada Reologi Keju.....	83
Keju Rendah Natrium.....	84
Keju cheddar.....	84
Keju lainnya.....	86
Adopsi-Difusi Garam dalam Keju.....	87
Adsorpsi Garam dalam Keju .....	87
Difusi Garam dalam Keju.....	90
Pengasinan air garam.....	92
Pencampuran Langsung dengan Dadih .....	94
Penggaraman Permukaan Kering .....	95
Reologi dan Tekstur Keju.....	95
Reologi Keju.....	95
Merayap dan merelaksasi stres dalam keju .....	96
Model mekanis reologi keju .....	99
Tekstur Keju .....	100
Konsistensi Keju.....	100
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Konsistensi Keju .....	102
Patogen dan Cacat Mikroba pada Keju .....	103

Bakteri Coliform.....	104
Bakteri asam butirat.....	105
Lactobacillus.....	108
Streptokokus tahan panas .....	109
Bakteri asam propionate .....	109
Mikroba lainnya.....	110
<b>BAB V PEMBUATAN KEJU.....</b>	<b>111</b>
Perawatan awal.....	111
Pembekuan yang diinduksi oleh enzim .....	114
Reaksi yang dikatalisis oleh enzim.....	116
Pengumpulan .....	117
Pembentukan Gel.....	117
Pembekuan Susu yang Diperlakukan Panas.....	118
Pembuatan dadih .....	118
Akumulasi Komponen.....	119
Sineresis.....	120
Produksi Asam dan Pencucian Dadih.....	122
Pemisahan Dadih dan Whey.....	123
Membentuk dan Menekan .....	124
Pengasinan.....	125
Perawatan, Penyimpanan, dan Penanganan.....	125
Suhu.....	126
Kondisi Udara.....	126
Perawatan Kulit .....	127
Keju dengan flora tertentu .....	127
Keju tanpa flora tertentu.....	128
Kemasan .....	129
Hasil Keju.....	129
<b>BAB VI FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KUALITAS KEJU.....</b>	<b>131</b>
Kualitas Keju Secara Umum .....	131
Kualitas Pasokan Susu.....	133
Koagulan .....	136
Starter .....	138
Perawatan Pasca-koagulasi.....	141
Pengasinan.....	142
Pematangan.....	143
Suhu Pematangan .....	144
Kehadiran Enzim Asli .....	145
Biang ragi Tambahan .....	148
<b>BAB VII TREN SELANJUTNYA.....</b>	<b>150</b>
Tren Utama.....	150
Protektif Biang Ragidalam Keju .....	150
Strain Bakteriosinogenik .....	150
Kultur pelindung yang menghasilkan senyawa antimikroba non-protein dengan berat molekul rendah .....	153
Sistem Resistensi Fag yang Direkayasa dalam Keju.....	154



Resistensi yang dikodekan fag (Per) .....	154
mRNA antisense.....	155
Penggantian gen/mutagenesis penyisipan .....	155
Keju sebagai Pembawa Probiotik.....	156
Teknologi Berbasis Membran Canggih dalam Pembuatan Keju .....	156
Mendapatkan Kembali Nilai Tambah Whey Keju .....	157
Menghindari Fouling dalam Membran Standarisasi Susu.....	158
Promotor turbulensi.....	158
Sumber Biang Ragi Pemula Baru.....	159
DAFTAR PUSTAKA .....	160

---

## ***BAB I PENDAHULUAN***

---

Pembuatan keju mungkin telah dimulai secara mandiri dengan menekan dan mengasinkan susu kental agar lebih baik dalam mengawetkannya. Pengamatan bahwa efek pembuatan susu dalam perut hewan memberikan dadih yang lebih padat dan bertekstur lebih baik mungkin menyebabkan penambahan rennet yang disengaja. Bukti keju adalah teks Sumeria dari Dinasti Ketiga Ur, tertanggal pada awal milenimum kedua SM (Ridgwell dan Ridgway, 1968). Bukti visual pembuatan keju Mesir telah ditemukan di mural makam Mesir, berasal dari sekitar 2000 SM (Carmona dan Ezzamel, 2007). Keju yang paling awal dibuat cenderung asam dan asin, teksturnya mirip dengan keju cottage pedesaan atau feta masa kini. Di Kreta Minoan-Mycenaean Zaman Perunggu Akhir, tablet Linear B mencatat inventarisasi keju serta ternak dan gembala (Ventris dan Chadwick, 1973).

Keju yang diproduksi di Eropa, di mana iklimnya lebih dingin daripada di Timur Tengah, membutuhkan lebih sedikit garam untuk pengawetan. Dengan sedikit garam dan keasaman, keju menjadi lingkungan yang cocok untuk mikroba dan jamur yang berguna, memberikan keju tua rasa yang menonjol dan menarik. Bagi orang-orang hidup di zaman kuno, dan yang hidup di abad-abad berikutnya, insentif paling penting untuk produksi keju adalah bahwa keju merupakan makanan bernutrisi tinggi dan berenergi tinggi dengan masa simpan yang jauh lebih lama daripada susu cair (Ridgwell dan Ridgway, 1968). Dengan meningkatnya pengetahuan tentang produksi keju dan pengaruh pengasaman, dehidrasi garam, rempah-rempah, dan pematangan pada umur simpan dan rasa, varietas keju yang sangat berbeda dikembangkan. Sementara beberapa keju saat ini dengan pengakuan internasional pertama kali diperoleh lebih dari 1000 tahun yang lalu, dimana lainnya adalah perkembangan yang agak baru dari tiga hingga empat abad terakhir.

Saat ini keju diakui memiliki nilai gizi yang sangat tinggi karena kandungan protein, kalsium, riboflavin, dan vitamin A dan D yang umumnya tinggi (Ricke *et al.*, 2001 dan Lucke, 1998). Namun, reputasinya tidak selalu positif. Saat ini, efek samping akibat konsumsi keju tidak lagi diamati, dan laporan dari negara maju tentang masalah higienis pada keju sangat jarang.

Namun, konsumsi beberapa jenis keju dengan kandungan lemak dan garam yang tinggi mungkin tidak dianjurkan bagi orang yang berisiko seperti tekanan darah tinggi, merokok, obesitas, diabetes, dan keturunan dari berbagai penyakit modern.

Keju adalah salah satu produk terpenting dalam produk olahan susu. Produksi keju dunia meningkat sekitar ca. 20% dari 1997 hingga 2011 untuk mencapai ca.  $20,8 \times 10^6$  ton. Eropa sejauh ini merupakan blok produksi terbesar, diikuti oleh Amerika Utara. Total konsumsi keju per kapita juga mengikuti pola yang sama. Di Uni Eropa, diperkirakan bahwa 50% dari keju yang dihasilkan adalah keju keras/semihard, diikuti oleh keju segar, yang menyumbang sekitar ca. 30% (Heller *et al.*, 2003). Khususnya di Eropa, perusahaan susu sangat heterogen dalam hal jumlah susu yang diproses; perusahaan multinasional terbesar memproses beberapa juta liter dan perusahaan rumahan terkecil hanya beberapa ratus liter per hari. Banyaknya jumlah perusahaan kecil merupakan salah satu alasan utama banyaknya variasi keju yang dihasilkan.

---

## ***BAB II RAGAM KEJU***

---

Untuk produksi keju dari susu, dua langkah kunci penting: pemekatan kasein susu dan lemak melalui koagulasi kasein oleh enzim proteolitik atau asam laktat; dan drainase whey setelah gangguan mekanis kasein yang terkoagulasi dimulai dengan teknik dasar yang sederhana ini, lebih dari seribu varietas keju diproduksi saat ini (Heller *et al.*, 2003). Variasi dihasilkan dengan mengubah berbagai aspek pembuatan keju: jenis kultur starter, kultur tambahan, kondisi fermentasi, *renneting*, pemotongan dadih, *scalding*, drainase whey, pembentukan keju hijau, penggaraman, penambahan bumbu, dan pematangan. Variasi keju yang sangat banyak membuat produksi keju menguntungkan sebagai industri kecil rumahan serta bagi produsen makanan nasional dan multinasional, karena pasar makanan dan komoditas dapat dilayani. Variasi pasar dan pertumbuhan produksi keju yang stabil memberikan peluang untuk mengadopsi tren makanan baru. Salah satu tren makanan penting di negara maju adalah pengenalan makanan sehat dan fungsional selama beberapa tahun terakhir. Khususnya di sektor susu, pengenalan konsep probiotik telah berhasil dilakukan. Meskipun sebagian besar produk probiotik yang dikembangkan didasarkan pada susu fermentasi, beberapa contoh terlihat di sektor keju

Ada beberapa jenis keju, yang dikelompokkan atau diklasifikasikan menurut kriteria seperti lama penuaan, tekstur, metode pembuatan, kadar lemak, susu hewan, negara atau daerah asal. Metode yang paling umum dan tradisional digunakan adalah keju berbasis pada kadar air, yang kemudian dipersempit oleh kadar lemak dan metode pengawetan atau pematangan (Fox, 2000). Kriteria dapat digunakan secara tunggal atau kombinasi, tetapi tidak ada metode tunggal yang digunakan secara universal. Kombinasi jenis menghasilkan sekitar 500 varietas berbeda yang diakui oleh International Dairy Federation, lebih dari 400 diidentifikasi oleh Walter dan Hargrove (seperti pada tahun 1972), lebih dari 500 oleh Burkhalter, dan lebih dari 1.000 oleh Sandine dan Elliker (Fox, 1999). Beberapa upaya telah dilakukan untuk merasionalisasi klasifikasi keju; skema diusulkan oleh Walstra (2010) yang menggunakan starter primer dan sekunder yang dikombinasikan dengan kadar air, dan Walter dan Hargrove (1972) menyarankan

pengklasifikasian dengan metode produksi. Skema terakhir ini menghasilkan 18 jenis, yang kemudian dikelompokkan lebih lanjut berdasarkan kadar air.

### *Kelembaban*

Mengkategorikan keju berdasarkan kadar air atau kekencangannya adalah praktik yang umum tetapi tidak tepat. Klasifikasi antara "lunak", "semi-lunak", "semi-keras", dan "keras" sulit dibedakan, dan banyak jenis keju dibuat dalam varian yang lebih lembut atau lebih keras. Faktor yang mengontrol kekerasan keju adalah kadar air, yang bergantung pada tekanan saat dikemas ke dalam cetakan, dan waktu penuaan.

Signifikansi khusus untuk pembuatan keju adalah variasi kadar lemak dan kasein dalam susu. Proporsi relatif kasein dan lemak dalam susu untuk pembuatan keju distandarisasi untuk meminimalkan variasi musiman dalam komposisi susu untuk memfasilitasi produksi keju yang sesuai dengan peraturan khusus yang memastikan aroma dan tekstur yang seragam diperlukan untuk satu varietas keju (Heller *et al.*, 2003). Homogenisasi tidak rutin digunakan dalam pembuatan keju, tetapi dapat digunakan untuk memperbaiki tekstur keju. Homogenisasi digunakan terutama dalam pembuatan keju segar yang belum matang (Banks, 1998). Secara umum, penyimpanan dingin susu diperlukan sebelum pembuatan keju. Masalah utama dengan langkah ini adalah pertumbuhan dan aktivitas enzim mikroorganisme psychrotrophic, termasuk bakteri Gram-negatif misalnya, *Pseudomonas*, *Enterobacter* (Law *et al.*, 1976) dan basil pembentuk spora Gram-positif (Peretten *et al.*, 1997). Mikroorganisme psikotrofik telah terbukti menghasilkan proteinase tahan panas yang mungkin bertanggung jawab untuk menurunkan hasil keju, dan lipase yang dapat menyebabkan rasa tengik pada keju yang sudah tua (Johnson dan Law, 1999).

Kebanyakan keju dibuat dari susu pasteurisasi (72°C selama 15 detik). Pasteurisasi tidak mempengaruhi parameter fisikokimia susu secara signifikan, tetapi menghancurkan sebagian besar bakteri patogen dan pembusuk yang mencemari susu. Beberapa bakteri asam laktat nonstarter (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.) dan, jika ada, bakteri pembentuk spora (*Clostridium*, *Bacillus*) dapat bertahan dari pasteurisasi dan mempengaruhi pematangan keju. Pemanasan susu sebelum penyimpanan dingin (63°C hingga 65°C selama 15 hingga 20 detik) dapat digunakan untuk penyimpanan yang lama; namun, susu masih dipasteurisasi sebelum pembuatan keju (Banks, 1998). Kelembaban berdasarkan basis bebas lemak (*Moisture on fat-free basis* - MFFB) sama dengan persentase kelembaban dalam keju berdasarkan basis bebas lemak.

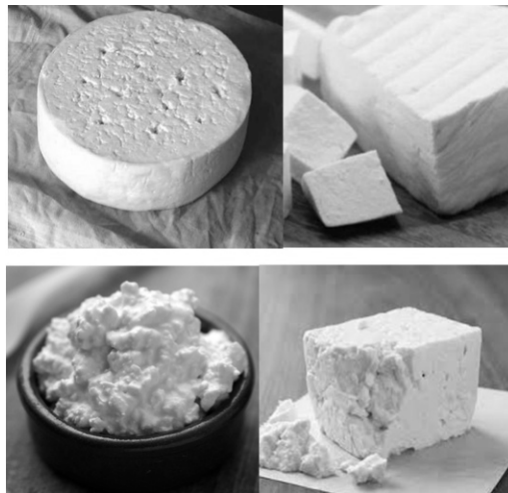
$$MFFB = \frac{\text{weight of moisture in cheese}}{\text{total weight of cheese} - \text{fat weight in cheese}} \times 100\%$$

$$FDB = \frac{\text{fat content in the cheese}}{\text{total weight of cheese} - \text{fat weight in cheese}} \times 100\%$$

*Fat on dry basis* (FDB) adalah persentase lemak dalam keju pada basis kering.

### *Keju segar*

Dibandingkan dengan keju yang lebih keras dan tua seperti cheddar, keju segar memiliki kadar air yang tinggi dan pH yang relatif tinggi, yang menyediakan lingkungan yang sangat baik untuk pertumbuhan bakteri. Keju segar mengandung kelembaban 80% dan lebih tinggi. Keju ini harus dikonsumsi sesegera mungkin. Penyimpanan untuk jenis keju ini terbatas. Beberapa keju segar dikentalkan dengan rennet dan beberapa dikentalkan hanya dengan membudidayakan, atau mengasamkan, susu dengan keasaman (asam sitrat, jus lemon, cuka atau buttermilk). Either way, banyak keju segar sangat mirip dalam rasa dan tekstur. Sebagian besar keju segar dijual dalam wadah atau kemasan plastik dan dapat ditemukan di toko kelontong atau toko makanan khusus, bukan hanya di toko keju.



**Gambar 1 Contoh keju segar**

searah jarum jam dari kiri atas: Raejuusto Finlandia, Paneer, Feta, dan Keju Cottage

(sumber: berbagai sumber)

Keju segar diproduksi melalui koagulasi yang didominasi asam (16-48 jam) dan perlakuan panas awal yang tinggi (82°C-88°C, Kabuki *et al.*, 2004). Proses ini diikuti oleh pengeringan spontan dengan mengiris opsional cetakan kami. Pengasaman dan renneting dilakukan pada

mesofilik 18°C-28°C (Kabuki *et al.*, 2004; Destro *et al.*, 1991). Untuk beberapa varietas lebih banyak rennet dan suhu yang lebih tinggi digunakan (28°C–32°C) menghasilkan keju dengan tingkat kelembapan 25%–33%. Penggaraman biasanya dilakukan dengan mencampurnya dengan garam dan tidak diperlukan pematangan, karena keju dikonsumsi setelah pengemasan.

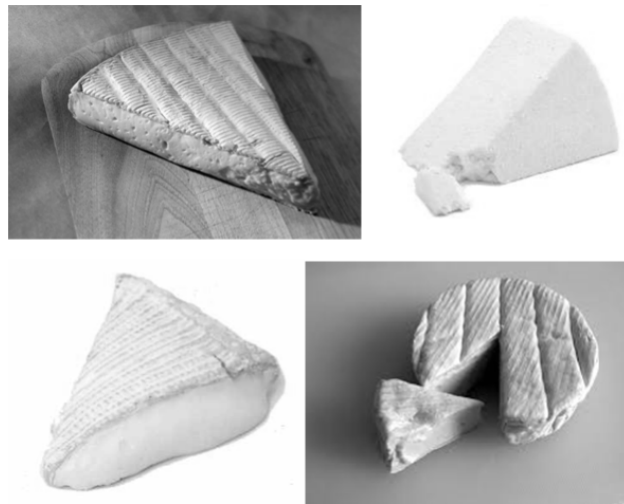
Contoh utama keju segar adalah feta, mozzarella, paneer India, dan keju petani (Gambar 1). Feta tajam dan asin, terkadang lembut dan terkadang cukup kering, tetapi selalu cukup kuat untuk hancur. Feta disimpan dalam air garam, yang memberikan rasa asin. Biasanya dibuat dengan susu domba atau kambing, tetapi bisa juga dibuat dengan susu sapi. Mozzarella, yang juga dikenal sebagai keju "pasta filata", adalah jenis keju segar yang sangat ulet. Dadih untuk mozzarella dipanaskan dan diregangkan. Mozzarella segar disimpan dalam air dan dapat diiris tetapi memiliki tekstur yang sangat lembut. Bentuk yang lebih kering dijual terbungkus plastik. Paneer adalah susu budidaya (asam) yang ditekan menjadi keju yang dapat diiris dengan tekstur lembut dan lembut yang tidak sepenuhnya meleleh, sementara keju petani hampir identik dengan paneer, meskipun pengasinan diperlukan di sebagian besar pemrosesannya. Keju segar ala Latin” mewakili kelompok heterogen dari keju lunak putih yang belum matang, biasanya mengandung antara 1,0 hingga 3,0% garam (Torres dan Chandan, 1981). Keju segar unggulan lainnya adalah Queso Fresco, Halloumi, Ricotta, Keju Cottage, Mascarpone, dan Keju Pot rendah lemak.

Sebagai akibat dari karakteristiknya yang rapuh dan beberapa kecenderungan untuk tidak mengasinkan keju, keju segar menimbulkan risiko tertinggi dari semua jenis keju susu mentah (Bell *et al.*, 1999). Menanggapi wabah, intervensi multi-lembaga dimulai yang menampilkan lokakarya memperkenalkan resep keju segar susu pasteurisasi, kampanye media massa tentang risiko keju susu mentah, dan artikel buletin yang memperingatkan peternak sapi perah tentang risiko menjual atau memberikan mentah. susu (Bell *et al.*, 1999; Sandra *et al.*, 2004). Tujuan intervensi adalah untuk mengurangi kejadian infeksi *Salmonella typhimurium* akibat konsumsi keju susu mentah sambil mempertahankan makanan tradisional bergizi dalam diet berbasis keju segar.

### *Keju lembut*

Keju ini ditandai dengan kadar air yang lebih rendah dibandingkan dengan keju segar (antara 67 dan 80%). Ini dihasilkan dari susu yang disterilisasi atau dipasteurisasi dan proses pengasaman dan koagulasi memakan waktu 30-90 menit, sementara aksi rennet dan starter laktat

yang seimbang diperlukan. Temperatur inkubasi 32°C–35°C juga diperlukan dan mendukung aksi rennet . Pengerinan spontan dipromosikan dengan pengirisan, pencetakan, atau pengepresan opsional. Penggaraman atau pengasinan kering (NaCl 1,6% -2%) dan periode pematangan yang singkat (14 hari) juga merupakan karakteristik penting dari pemrosesan keju lunak. Keju segar adalah keju yang sangat heterogen, penampilan dan rasanya sangat tergantung pada flora permukaan (molds or red smear), terutama dibandingkan dengan keju segar, yang setiap varietasnya tidak jauh berbeda satu sama lain.



**Gambar 2 Contoh keju lunak**

**searah jarum jam dari kiri atas: Brie, Ricotta Salata, Camembert, Pont-l'Évêque**

*(Courtesy: [www.foodsubs.com](http://www.foodsubs.com))*

Keju yang lembut, kulit yang mekar memiliki tekstur yang kaya dan lembut dengan sedikit elastisitas pada keju. Proses penuaan tergantung pada ketebalannya. Keju ini memiliki koagulasi campuran dengan pengeringan lambat, diinokulasi dengan cetakan tertentu. Di sisi lain, keju kulit yang lembut dan dicuci memiliki tekstur yang kaya dan lembut dengan sedikit elastisitas pada keju. Selama proses penuaan, keju dibalik secara teratur dan disikat atau dicuci dengan air garam dengan bir, madu, anggur atau minuman beralkohol.

Contoh keju lunak yang populer adalah keju Brie dan Camembert. Keju brie adalah keju lunak serupa, juga terbuat dari susu sapi. Brie berasal dari le de France sedangkan camembert berasal dari Normandia. Perubahan rasio antara kulit dan pasta ini membuat camembert sedikit lebih kuat jika dibandingkan dengan brie yang dimatangkan dalam jumlah waktu yang sama. Setelah kulit dipotong pada camembert biasanya memiliki aroma yang lebih tajam daripada brie.



Dari segi rasa, camembert memiliki rasa yang lebih kuat, sedikit asam, dan terkadang berkapur. Tekstur camembert lebih lembut daripada brie, dan jika dihangatkan camembert akan menjadi lebih creamy, sedangkan brie menjadi hangat tanpa banyak kehilangan strukturnya (Kubícková dan Groscha, 1998).

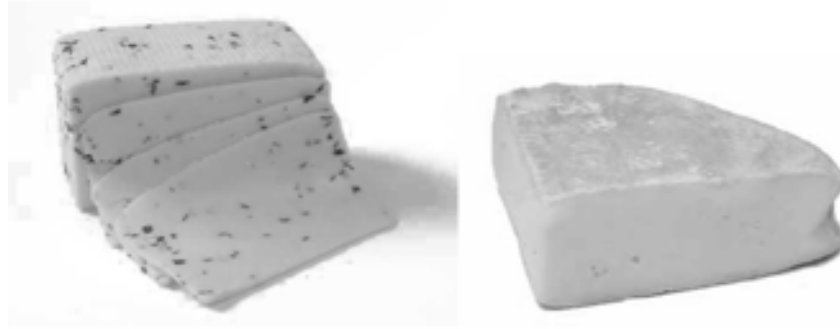
Keju lunak juga rentan terhadap pembusukan dan racun karena kondisi pengawetannya yang ramping, meskipun tidak rentan seperti keju segar. Telah ditunjukkan bahwa inkubasi pada suhu yang lebih tinggi (43°C), dan penggunaan pengemulsi lemak seperti tergitol, meningkatkan kemungkinan isolasi salmonella (Maguire *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1990)

### *Keju setengah lunak*

Keju semi-lunak dan sub-kelompok, keju Biara memiliki kadar air yang tinggi dan cenderung terasa ringan. Beberapa varietas terkenal termasuk Havarti, Munster dan Port Salut. Keju semi-lunak mengandung antara 62% dan 67% kelembaban. Teksturnya bisa lembut dan creamy. Saat menua, keju dapat dicuci (dicuci kulit) dalam air garam dengan noda merah (dengan atau tanpa alkohol). Keju juga bisa disikat dan/atau menghasilkan kulit alami.

Pengasaman dan koagulasi rennet dominan biasanya dilakukan pada 32°C–37°C, 30–60 menit. Pengeringan air dadih biasanya dilakukan dengan perlakuan mekanis, terutama pada produksi massal: pengirisan, pencampuran, prepressing, pengepresan, sedangkan penggaraman menggunakan 1,5%–2% NaCl dengan pematangan: 12–60 hari (atau lebih lama: 6 –12 bulan).. Ciri-ciri keju semi-lunak adalah adonan homogen dengan sedikit bukaan kecil atau “mata”

Keju Havarti dinamai Havarthigaard di Verød, utara Kopenhagen, di mana pemiliknya Hanne Nielsen telah mengembangkan pembuatan keju modern di pertanian Denmark selama paruh terakhir abad ke-19 (Bastian *et al.*, 1991). Havarti, bagaimanapun, tidak diperkenalkan di Denmark sampai sekitar tahun 1920. Havarti dibuat seperti kebanyakan keju, dengan memasukkan rennet ke susu untuk menyebabkan pengentalan. Dadih ditekan ke dalam cetakan keju yang dikeringkan, dan kemudian keju dituangkan. Havarti adalah keju dadih yang dicuci, yang berkontribusi pada rasa keju yang halus. Havarti adalah keju bagian dalam yang matang tanpa kulit, halus dan permukaannya agak cerah dengan warna krem hingga kuning tergantung jenisnya. Ini memiliki "mata" yang sangat kecil dan tidak beraturan yang didistribusikan dalam massa (Bastian *et al.*, 1991).



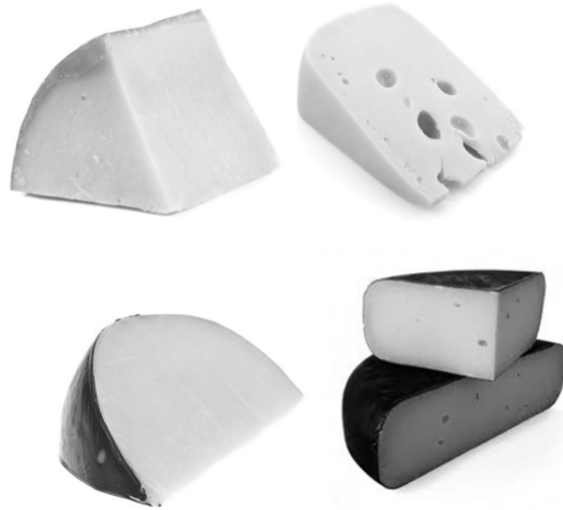
**Gambar 3 Contoh keju semi lunak, Havarti dengan dill (A) dan Muenster (B)**

(Courtesy: <http://www.foodsubs.com>)

Keju Munster, yang berasal dari Perancis, dibuat dari susu sapi yang tidak dipasteurisasi yang disebut susu mentah, dari zone d'appellation contrôlée (Pastorino *et al.*, 2003). Keju putih lembut ini dibentuk menjadi silinder datar, dengan dua dimensi umum: munster gérômé kecil memiliki diameter 7–12 cm; big munster gérômé (biasa disebut munster) memiliki diameter 13–19 cm.

#### *Keju setengah keras*

Seperti namanya, keju ini berada di antara lembut dan keras. Seringkali mereka memiliki tekstur kenyal seperti Edam dan akan dijual pada usia yang relatif muda beberapa bulan. Contoh lain termasuk Gouda dan Edam dan keju tertentu lainnya di mana kulitnya akan dicuci dengan air garam, bir, anggur atau jus buah untuk menambah karakter keju selama proses pematangan. Keju ini mengandung kadar air 50% dan 62%. Tekstur keju ini keras dan elastis. Di antara keju keras, orang akan menemukan beberapa keju yang tidak berumur dan lebih ringan. Penuaan untuk keju jenis ini bisa berlangsung berbulan-bulan atau bertahun-tahun. Urutan pemrosesan dan kondisi operasi untuk membuat keju semi-keras kurang lebih identik dengan keju semi-lunak (Walter dan Hargrove, 1972).



**Gambar 4 Contoh keju semi-keras**

searah jarum jam dari kiri atas: Provolone, Emmental, Gouda, dan Edam

(Sumber: [www.foodsubs.com](http://www.foodsubs.com); [susufoods.wisc.edu](http://susufoods.wisc.edu))

Keju dengan tekstur bervariasi dari semi-lunak hingga keras termasuk keju gaya Swiss seperti Emmental dan Gruyère. Bakteri yang sama yang memberi keju seperti itu mata mereka juga berkontribusi pada rasa aromatik dan tajamnya. Keju semi-lunak hingga keras lainnya termasuk Gouda, Edam, Jarlsberg, Cantal, dan Caçcaval (Walter dan Hargrove, 1972). Keju Cheddar yang terkenal juga sering diklasifikasikan sebagai keju semi-keras, karena Cheddar yang diawetkan sepenuhnya adalah keju alami yang keras. Namun, dalam buku ini, cheddar tergolong keju yang lebih keras, karena pengolahannya sangat mirip dengan keju semi-keras biasa (Walter dan Hargrove, 1972). Keju jenis ini ideal untuk dicairkan dan sering disajikan dengan roti panggang untuk camilan cepat atau makanan sederhana.

Keju edam dibedakan dari rasa khasnya yang tajam, dan menjadi lebih kencang (Anonim, 2005). Ini memiliki kandungan lemak yang jauh lebih rendah daripada banyak keju tradisional lainnya; lemak hanya terdiri dari 28 persen keju. Edam modern lebih lembut daripada keju lainnya, seperti Cheddar, karena kandungan lemaknya yang rendah. Keju Gouda, yang berasal dari wilayah selatan Belanda, paling tepat digambarkan sebagai gaya pembuatan keju daripada sejenis keju, karena rasanya hampir sepenuhnya bergantung pada waktu umurnya. Setelah susu kultur mengental, sebagian whey kemudian dikeringkan dan ditambahkan air. Seiring bertambahnya

usia, ia mengembangkan rasa manis karamel dan memiliki sedikit kerenyahan dari kristal keju, terutama pada keju yang lebih tua.

Emmental buatan Swiss memiliki rasa yang gurih, namun tidak terlalu tajam. Tiga jenis bakteri yang digunakan dalam produksi Emmentaler: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, dan *Propionibacterium freudenreichii* (Chamba dan Perreard, 2002). Pada tahap akhir produksi keju, *P. freudenreichii* mengkonsumsi asam laktat yang dikeluarkan oleh bakteri lain, dan melepaskan gas karbon dioksida, yang perlahan-lahan membentuk gelembung yang membuat lubang (Gagnaire *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2007). Kegagalan menghilangkan gelembung CO<sub>2</sub> selama produksi, karena pengepresan yang tidak konsisten, menghasilkan karakteristik "mata" yang besar dari keju ini.

#### *Keju keras*

Keju yang lebih keras memiliki kadar air yang lebih rendah daripada keju yang lebih lunak. Keju ini memiliki kadar air kurang dari 50%. Lebih sulit untuk memarut. Keju dapat berumur dan disimpan selama beberapa tahun. Mereka umumnya dikemas ke dalam cetakan di bawah tekanan lebih dan disimpan untuk waktu yang lebih lama daripada keju lunak.

Keju yang diklasifikasikan ke dalam kategori ini adalah keju yang dibuat dengan kadar air 58%–64% dan kadar lemak rendah 30–55%. Keju keras dapat dibuat dengan atau tanpa fermentasi asam propionat, sedangkan pengasaman dan koagulasi rennet dominan harus dilakukan pada 33°C–38°C, 12–30 menit. Proses pemanasan selama pencampuran vat diatur pada 52°C–55°C dan fermentasi adalah starter propionik mesofilik dan termofilik (Walter dan Hargrove, 1972). Proses pembuatan keju keras modern menggunakan susu termis intensif, namun, pembuat keju tradisional masih memilih untuk membuatnya dari susu mentah. Permukaan keju dapat dengan atau tanpa mikroflora, sedangkan pematangan dapat lebih lama: 6 minggu, hingga 12 bulan dan bahkan lebih. Karena tekanan yang lebih besar, keju keras sering kali tidak mengembangkan "mata" yang terlihat, meskipun beberapa tidak (Walter dan Hargrove, 1972).



**Gambar 5 Contoh keju keras,**

searah jarum jam dari kiri atas: Colby, Parmesan, Cheddar, dan Pecorino

Sumber: [www.foodsubs.com](http://www.foodsubs.com); [www.sargento.com](http://www.sargento.com); [www.bradleysmoker.co.nz](http://www.bradleysmoker.co.nz)

Keju yang diklasifikasikan sebagai semi-keras hingga keras termasuk Cheddar yang dikenal, berasal dari desa Cheddar di Inggris tetapi sekarang digunakan sebagai istilah umum untuk gaya keju ini, yang varietasnya ditiru di seluruh dunia dan dipasarkan berdasarkan kekuatan atau panjangnya. waktu mereka telah berumur. Cheddar adalah salah satu keluarga keju semi-keras atau keras (termasuk Cheshire dan Gloucester), yang dadihnya dipotong, dipanaskan dengan lembut, ditumpuk, dan diaduk sebelum ditekan menjadi bentuk (Walter dan Hargrove, 1972). Colby dan Monterey Jack adalah keju yang serupa tetapi lebih ringan; dadih mereka dibilas sebelum ditekan, menghilangkan beberapa keasaman dan kalsium. Keju keras — "keju parut" seperti Parmesan dan Pecorino Romano — cukup padat dikemas ke dalam bentuk besar dan berumur berbulan-bulan atau bertahun-tahun (Walter dan Hargrove, 1972).

#### *Keju ekstra keras*

*Extra-Hard* adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan sekelompok berbagai keju yang keras dan rapuh. Keju ini menjadi sangat keras karena rendah lemak dan rendah kelembapan. Selain grating dengan baik, mereka biasanya berusia hingga 3 tahun untuk mengembangkan rasa yang tajam. Beberapa versi Keju Ekstra Keras dapat dijual saat masih muda sebagai Keju Semi-Kerasan. Keju ekstra keras biasanya dibuat dengan starter termofilik menggunakan suhu tinggi untuk merangsang pengeluaran whey. Dalam karya ini, mikroflora,

proteolisis dan volatil diselidiki dalam keju ekstra keras yang dibuat dengan starter DL mesofilik, diproduksi menggunakan suhu memasak yang menantang untuk bakteri starter selama beberapa jam. Keju dari enam tong yang diproduksi secara komersial diselidiki selama 56 minggu (Rehn *et al.*, 2010). Kandungan volatil tergantung pada waktu pematangan dan starter yang digunakan.

### *Sumber susu*

Beberapa keju dikategorikan berdasarkan sumber susu yang digunakan untuk memproduksinya atau berdasarkan kandungan lemak tambahan dari susu yang digunakan untuk memproduksinya. Sementara sebagian besar keju yang tersedia secara komersial di dunia dibuat dari susu sapi, banyak bagian dunia juga memproduksi keju dari kambing dan domba. Contoh terkenal termasuk Pecorino Romano dari susu domba. Terkadang keju yang dipasarkan dengan nama yang sama dibuat dari susu hewan yang berbeda—keju gaya Feta, misalnya, dibuat dari susu domba di Yunani dan dari susu sapi di tempat lain. Beberapa sumber keju lainnya adalah rusa, kerbau, kuda, dan yak (Fox, 2000).

Susu domba mengandung total padatan dan nutrisi utama yang lebih tinggi dibandingkan susu kambing dan susu sapi. Lipid pada susu domba dan susu kambing memiliki karakteristik fisik yang lebih tinggi daripada susu sapi, tetapi indeks fisiko-kimia (yaitu, saponifikasi, nilai Reichert Meissl dan Polenske) bervariasi antara laporan yang berbeda (Park *et al.*, 2007; Hui, 1993; Fox, 2000). Struktur misel dalam susu kambing dan domba berbeda dalam diameter rata-rata, hidrasi, dan mineralisasi dari susu sapi. Misel kaprin kasein mengandung lebih banyak kalsium dan fosfor anorganik, kurang larut, kurang stabil terhadap panas, dan lebih mudah kehilangan alfa-kasein daripada misel kasein sapi (Park *et al.*, 2007). Parameter renneting dalam pembuatan keju susu domba dipengaruhi oleh sifat fisiko-kimiawi, antara lain pH, misel kasein yang lebih besar, lebih banyak kalsium per berat kasein, dan kandungan mineral lain dalam susu, yang menyebabkan perbedaan waktu koagulasi, laju koagulasi, kekentalan dadih, dan jumlah rennet yang dibutuhkan. Waktu renneting untuk susu kambing lebih pendek daripada susu sapi, dan konsistensi gel yang lemah bermanfaat untuk pencernaan manusia tetapi menurunkan hasil keju. Triasilgliserol (TAG) merupakan bagian terbesar dari lipid susu (hampir 98%), termasuk sejumlah besar asam lemak teresterifikasi. Susu domba dan kambing juga memiliki lipid sederhana (diasilgliserol, monoasilgliserol, kolesterol ester), lipid kompleks (fosfolipid), dan senyawa liposoluble (Park *et al.*, 2007).

Kandungan nitrogen non protein (NPN) pada susu kambing dan manusia lebih tinggi dibandingkan dengan susu sapi. Taurin dalam susu kambing dan domba yang berasal dari asam amino yang mengandung belerang memiliki fungsi metabolisme yang penting seperti halnya karnitin, yang merupakan nutrisi berharga bagi neonatus manusia. Kandungan mineral dan vitamin susu kambing dan domba sebagian besar lebih tinggi daripada susu sapi (Park *et al.*, 2007).

Pembuatan keju, yaitu sifat *renneting*, susu domba dipengaruhi oleh sifat fisiko-kimiawinya, termasuk pH, misel kasein yang lebih besar, lebih banyak kalsium per berat kasein, dan konsentrasi mineral lain dalam susu, yang menyebabkan perbedaan waktu koagulasi, laju koagulasi, dadih, kekencangan, dan jumlah rennet yang dibutuhkan (Ramos dan Juarez, 2003). Waktu *renneting* untuk susu kambing lebih pendek daripada susu sapi, dan konsistensi gel yang lemah menjelaskan kesesuaian keju yang biasa-biasa saja dari susu kambing (Parkash dan Jenness, 1968; Remeuf dan Lenoir, 1986). Waktu *renneting* dan kekencangan maksimum gel dinyatakan dalam skala 1 sampai 4, kecepatan pengaturan pada skala 1 sampai 9 (Remeuf dan Lenoir, 1986). Berat serum yang tertahan dalam dadih yang disentrifugasi memiliki variasi yang lebih kecil antara skor 1 dan 2. Cerita *et al.* (1983) menemukan, bahwa kekencangan maksimum dari gel susu kambing biasanya jauh lebih sedikit, dan bahkan gel dari susu kambing dengan kandungan kasein yang sama tidak sekecang dari susu sapi. Kandungan kasein susu memiliki pengaruh yang signifikan terhadap sifat reologi gel rennet, kecepatan pengaturan dan kekencangan maksimumnya. Kubarsepp *et al.* (2005) mengamati korelasi yang signifikan antara kandungan kasein dan proporsi alfa s1-kasein, antara kandungan kasein dan kadar Ca koloid dan fosfor anorganik, antara kadar Ca koloid dan fosfor anorganik dan kekencangan gel atau kecepatan pengaturannya, dan antara tingkat hidrasi misel dan mineralisasinya. Ini menegaskan korelasi terbalik serupa yang dilaporkan oleh Story *et al.* (1983) untuk kandungan kasein dengan jumlah serum yang tertahan dalam dadih yang disentrifugasi dari susu kambing, sapi dan domba. Juga waktu *renneting* terutama dipengaruhi oleh nilai pH susu.

Van Hooydonk *et al.* (1987) melaporkan bahwa peningkatan waktu pembekuan rennet yang diinduksi oleh panas dan tekanan dapat dijelaskan oleh denaturasi protein whey dan pengikatan dengan kappa-kasein, yang menunda aksi enzim rennet melalui tolakan atau hambatan sterik yang memperlambat fase enzimatis koagulasi. Pemanasan (65–85 C selama 5–35 menit) memiliki efek yang kurang jelas pada waktu pembekuan rennet dan tingkat pengerasan dadih pada susu kambing dan domba dibandingkan pada susu sapi (Raynal dan Remeuf, 1998), menunjukkan

bahwa susu kambing yang dipanaskan memiliki kapasitas ikatan silang yang sama dengan susu yang tidak dipanaskan (Trujillo, 2005) .

Dapat disimpulkan bahwa sifat kandungan lemak susu domba dan kambing dibandingkan dengan susu sapi memberikan keuntungan bagi kesehatan konsumen. Komposisi ini menjadikan mereka secara langsung atau dalam bentuk produk susu, makanan pilihan untuk segmen populasi manusia dengan persyaratan khusus (Cabiddu *et al.*, 2005). Variasi komposisi lemak susu sangat besar, dengan interaksi penting antara hijauan, konsentrat dan minyak, di hampir semua asam lemak mayor dan minor. Suplementasi silase jagung atau diet konsentrat tinggi dengan minyak nabati meningkatkan asam lemak trans secara tajam selain asam rumenat dan vaccenic (Cabiddu *et al.*, 2005; Sanz Sampelayo *et al.*, 2007).

Menurut Sanz Sampelayo *et al.* (2007), sapi merumput terutama di rumput penutup tanah dan saat sapi makan sering mengambil sebagian dari tanah dalam gigitan. Ini membuat keju mereka memiliki rasa yang spesifik dan sangat bervariasi dari satu tempat ke tempat lain. Keju susu sapi yang dibuat dari hewan yang digembalakan dan bukan dari hewan yang diberi makan jagung akan memiliki rona kuning daripada warna putih pucat. Ini berasal dari karoten yang ditemukan di rumput padang rumput (Cartoni *et al.*, 1999). Domba terutama hanya akan memakan rumput bilah atas yang lembut dan manis. Jika kawanan domba yang merumput dibiarkan di padang rumput untuk waktu yang lama, ladang akan terlihat seolah-olah telah dipangkas oleh kru lapangan. Keju susu domba adalah yang paling tinggi lemaknya (Cabiddu *et al.*, 2005) dan itu, ditambah dengan preferensi penggembalaannya, membuat keju susu domba kaya, bermentega dan biasanya kurang tegas dalam rasa (Sanz Sampelayo *et al.*, 2007),

Lemak susu sapi mengandung asam 4-metiloktanoat dalam konsentrasi rendah, tetapi lemak susu domba dan kambing mengandung asam 4-metiloktanoat dan 4-etiloktanoat dalam jumlah yang signifikan, yang masing-masing memberikan rasa seperti daging kambing dan rasa kambing. Keju susu domba Pyrenees mengandung sejumlah besar metil dan fenol tersubstitusi etil, yang berkontribusi mencirikan catatan rasa seperti domba pada varietas keju ini. (Kim dan Lindsay, 1991). Beberapa orang mungkin menunjukkan reaksi alergi setelah makan keju kambing dan setelah menyentuh keju kambing dan domba, tetapi tidak setelah mengonsumsi produk susu sapi. Terungkap tingkat reaktivitas silang yang tinggi antara kasein kambing dan kasein domba. kasein kambing sebagai alergen utama yang menyebabkan sensitisasi pada pasien ini seperti yang ditunjukkan oleh uji *in vivo* dan *in vitro* (Umpierrez *et al.*, 1999).



Sementara setiap sumber susu dapat secara signifikan mempengaruhi fisikokimia dan palpabilitas keju, pemalsuan keju dalam hal ini telah terjadi di industri. Untuk mencegah hal tersebut, digunakan asam lemak gas-liquid chromatographic (GLC) untuk menentukan sumber dan jumlah susu sapi, kambing, dan keju domba yang dipalsukan. Rasio GLC menjadi lebih besar secara proporsional dengan peningkatan substitusi susu sapi sebagai pengganti susu kambing atau domba dalam pembuatan keju (Iverson dan Sheppard, 1989; Maudet dan Taberlet, 2001). Ada tiga kategori utama keju di mana kehadiran jamur merupakan fitur penting: keju lembut matang, keju kulit dicuci dan keju biru.

#### 1. Keju lunak matang

Keju yang matang lembut mulai keras dan teksturnya agak berkapur, tetapi menjadi tua dari bagian luar ke dalam dengan memaparkannya ke cetakan. Cetakan tersebut mungkin merupakan *penicillium candida* atau *P. camemberti* yang mekar seperti beludru yang membentuk kerak putih yang fleksibel dan berkontribusi pada tekstur yang halus, berair, atau lengket dan rasa yang lebih kuat dari keju tua ini (Edelstein, 2014). Brie dan Camembert, keju yang paling terkenal, dibuat dengan membiarkan jamur putih tumbuh di bagian luar keju lunak selama beberapa hari atau minggu. Keju susu kambing sering diperlakukan dengan cara yang sama, terkadang dengan cetakan putih (Chèvre-Boîte) dan terkadang dengan biru.

#### 2. Keju kulit dicuci

Keju yang sudah dicuci memiliki karakter yang lembut dan matang di bagian dalam seperti yang memiliki cetakan putih; Namun, mereka diperlakukan berbeda. Keju kulit yang dicuci secara berkala diawetkan dalam larutan air garam air asin dan/atau bahan pembentuk jamur yang mungkin termasuk bir, anggur, brendi, dan rempah-rempah, membuat permukaannya cocok untuk kelas bakteri *Brevibacterium linens* (olesan "oranye kemerahan" bakteri) yang memberikan bau menyengat dan rasa khas, dan menghasilkan kulit yang kuat dan beraroma di sekitar keju (Fox, 2000). Keju yang sudah dicuci bisa lunak (Limburger), semi-keras, atau keras (Appenzeller). Bakteri yang sama juga dapat berdampak pada keju yang hanya matang dalam kondisi lembab, seperti Camembert. Proses ini membutuhkan pencucian secara teratur, terutama pada tahap awal produksi, membuatnya cukup padat karya dibandingkan dengan metode produksi keju lainnya (Fox, 2000).

### 3. Keju smear-matang

Beberapa keju yang sudah dicuci juga dimatangkan dengan larutan bakteri atau jamur, paling sering *Brevibacterium linens*, *Debaryomyces hansenii*, dan/atau *Geotrichum candidum* yang biasanya memberi rasa lebih kuat saat keju matang (Maher *et al.*, 2001; Mounier *et al.*, 2006). Dalam beberapa kasus, keju tua dioleskan pada keju muda untuk mentransfer mikroorganismenya. Banyak, tetapi tidak semua, dari keju ini memiliki warna merah muda atau oranye yang khas pada bagian luarnya. Tidak seperti keju yang telah dicuci kulitnya, pencucian dilakukan untuk memastikan pertumbuhan yang seragam dari bakteri atau jamur yang diinginkan dan untuk mencegah pertumbuhan jamur yang tidak diinginkan (Mounier *et al.*, 2006; Fox, 2000). Contoh terkenal dari keju yang diolesi dengan olesan termasuk Munster dan Port Salut.

### 4. Keju biru

Keju biru adalah keju yang dibuat dengan menginokulasi keju dengan *Penicillium roqueforti* atau *Penicillium glaucum* (Scott dan Kennedy, 1976). Hal ini dilakukan saat keju masih dalam bentuk dadih yang ditekan dengan longgar, dan dapat ditingkatkan lebih lanjut dengan menusuk blok keju yang matang dengan tusuk sate dalam suasana di mana jamur lazim. Jamur tumbuh di dalam keju seiring bertambahnya usia. Keju ini memiliki urat biru yang berbeda, yang memberi mereka nama dan, seringkali, rasa yang tegas. Jamur berkisar dari hijau pucat sampai biru tua, dan dapat disertai dengan jamur putih dan coklat berkerak (Fox, 2000). Teksturnya bisa lembut atau keras. Beberapa keju yang paling terkenal adalah dari jenis ini, masing-masing dengan warna, rasa, tekstur dan aroma yang khas. Mereka termasuk Roquefort, Gorgonzola, dan Stilton.

### 5. Keju air asin

Keju yang diasinkan atau diasamkan dimatangkan dalam larutan air garam dalam wadah kedap udara atau semi-permeabel. Proses ini memberikan keju stabilitas yang baik, menghambat pertumbuhan bakteri bahkan di negara panas (Tamime, 2008). Keju yang diasinkan bisa lunak atau keras, kadar airnya bervariasi, dan warnanya serta rasanya, sesuai dengan jenis susu yang digunakan; meskipun semua akan menjadi tanpa kulit, dan umumnya terasa bersih, asin dan asam saat segar, mengembangkan beberapa kepedasan saat tua, dan sebagian besar akan menjadi putih (Robinson dan Tamime, 1996). Varietas keju brined termasuk feta, halloumi, sirene dan teleme, varian brinza (Tamime, 2008). Keju brined adalah jenis keju utama yang diproduksi dan dimakan di kawasan Timur Tengah dan Mediterania.

Peran utama kultur starter adalah pengasaman awal dadih, dan kultur yoghurt mati di awal tahap pematangan keju feta (Vafopoulou-Mastrojiannaki *et al.*, 1990). Dalam keju teleme, lactococci ditemukan hanya dalam dadih dan keju berumur 5 hari (Tzanetakis dan Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Penurunan ini mungkin karena efek penghambatan dari pH rendah dan nilai salt-in-moisture (S/M) keju yang tinggi selama pematangan.

Demikian pula *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* menghilang setelah 30 hari selama pematangan keju domiati (Shehata *et al.*, 1975). Namun, pH rendah dan kandungan garam tinggi tampaknya mendukung pertumbuhan lactobacilli, dan 90% dan 95% isolat bakteri asam laktat (BAL) dari keju feta berumur 30 dan 90 hari berasal dari kelompok ini (Tzanetakis dan Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Pada feta berumur 90 hari, *Lactobacillus* yang termasuk dalam kelompok heterofermentatif fakultatif membentuk 81% isolat, sedangkan jenis heterofermentatif obligat menyumbang 13,5%. Lebih khusus lagi, *Lactobacillus plantarum* adalah spesies yang dominan, diikuti oleh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus brevis* dan *Lactobacillus hilgardii*. Dalam keju domiati, sebaliknya, *Lactobacillus casei*, *Lb. Plantarum*, *Lb. brevis*, *Lactobacillus fermenti* dan *Lactobacillus lactis* adalah spesies yang paling sering ditemukan (Shehata *et al.*, 1975; Lawson *et al.*, 2001). Genus *Lactobacillus* juga mendominasi mikroflora keju halloumi matang, dengan *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* dan *Lactobacillus pentosus* menjadi yang paling sering diisolasi, bersama dengan spesies baru, *Lactobacillus cypriacasei*.

Telah diketahui bahwa mikrokokus menghasilkan enzim proteolitik, esterolitik dan lipolitik yang dapat memiliki peran yang bermanfaat dalam pengembangan rasa dan aroma keju (Bhowmik dan Marth, 1990). Namun, pada keju yang diasinkan, hanya sedikit mikrokokus yang terdeteksi (Yanai *et al.*, 1977) karena pH rendah keju dan air garam menghambat pertumbuhannya. Meskipun mikroflora sekunder mungkin memberikan kontribusi yang bermanfaat untuk pengembangan rasa keju, komponen dari mikroflora yang sama terkadang dapat menyebabkan cacat. Cacat feta dan keju sejenis yang paling umum adalah 'early blowing', cacat yang ditandai dengan adanya lubang gas besar pada keju, yang, selain itu, memiliki tekstur kenyal; Cacat ini disebabkan oleh pertumbuhan koliform dan/atau khamir dalam jumlah yang berlebihan (Bintis dan Papademas, 2002). Namun, masalahnya jarang terjadi di perusahaan susu modern, asalkan pasteurisasi yang efisien dan praktik manufaktur yang baik diterapkan. Selanjutnya, aktivitas starter sangat penting dalam pengendalian koliform dengan menurunkan pH dan jumlah laktosa dalam dadih.

---

## ***BAB III ASPEK GIZI KEJU***

---

Keju adalah makanan bergizi dan serbaguna, yang dapat dengan mudah dimasukkan ke dalam sebagian besar hidangan. Keju mengandung konsentrasi nutrisi penting yang tinggi dibandingkan dengan tingkat energinya. Kandungan nutrisi yang tepat dipengaruhi oleh jenis susu yang digunakan (spesies, tahap laktasi, penuh lemak, rendah lemak, skim), cara pembuatan dan, pada tingkat lebih rendah, tingkat pematangan. Sebagaimana diuraikan secara rinci di tempat lain dalam buku ini, nutrisi susu yang tidak larut dalam air (kasein terkoagulasi, mineral koloid, lemak, vitamin yang larut dalam lemak) dipertahankan dalam dadih keju sedangkan konstituen susu yang larut dalam air (protein whey, laktosa, air -vitamin dan mineral larut) partisi ke dalam whey. Namun, hilangnya vitamin B yang larut dalam air dalam whey dapat dikompensasi sampai batas tertentu oleh sintesis mikroba selama pematangan.

Susu dan produk susu, termasuk keju, mengandung komponen yang dapat meningkatkan risiko penyakit kronis tertentu tetapi mengurangi risiko penyakit kronis lainnya (Norat dan Riboli, 2003). Kolesterol dan lemak jenuh merupakan faktor risiko potensial untuk aterosklerosis. Moss dan Freed (2003) telah menyarankan bahwa konstituen susu tanpa lemak, khususnya rasio kalsium-magnesium, laktosa dan antigen membran globul lemak susu, memiliki efek aterogenik koroner yang spesifik. Namun, komponen lain dapat mengurangi risiko, misalnya asam linoleat terkonjugasi (CLA) yang mungkin memiliki sifat antioksidan dan antikanker, kalsium yang dapat melindungi terhadap hipertensi dan osteoporosis, dan asam folat, vitamin B6 dan vitamin B12 yang dapat memberikan efek menguntungkan pada homosistein plasma. (faktor risiko independen untuk aterosklerosis). Bukti epidemiologi untuk hubungan antara produk susu, termasuk keju, dan kanker kolorektal telah ditinjau oleh Norat dan Riboli (2003); tidak ada hubungan yang signifikan antara konsumsi keju dan kanker kolorektal tercatat. Studi epidemiologis yang mencoba untuk menyelidiki efek dari makanan tertentu (misalnya, keju) pada risiko penyakit yang penuh dengan kesulitan dalam interpretasi karena lebih mungkin bahwa itu adalah profil makanan secara keseluruhan, terdiri dari keseimbangan berbagai macam makanan. makanan yang berbeda, yang dapat mempengaruhi risiko penyakit kronis.

### *Protein*

Keju mengandung protein biologis yang bernilai tinggi. Kandungan protein keju berkisar sekitar 4-40%, tergantung pada varietasnya (Holland *et al.*, 1989). Kandungan protein dari berbagai jenis keju cenderung berbanding terbalik dengan kandungan lemaknya. Selama pembuatan keju tradisional, sebagian besar protein whey masuk ke dalam whey. Protein whey hanya mewakili 2-3% dari total protein dalam keju, sisanya adalah kasein, yang sedikit kekurangan asam amino belerang. Dengan demikian, nilai biologis protein keju sedikit lebih rendah dari total protein susu. Jika indeks asam amino esensial dari total protein susu diberi nilai 100, maka nilai yang sesuai dari protein dalam varietas keju berkisar antara 91 hingga 97 (Renner, 1987).

Protein keju hampir 100% dapat dicerna, karena fase pematangan pembuatan keju melibatkan pemecahan kasein secara progresif menjadi peptida yang larut dalam air dan asam amino bebas. Oleh karena itu, tingkat pemecahan protein keju yang signifikan telah terjadi sebelum dikonsumsi dan mengalami efek aktivitas proteolitik gastrointestinal. Protein susu adalah sumber kunci dari berbagai peptida bioaktif (BP) yang dapat memberikan efek pengaturan seperti hormon dalam tubuh manusia (Gobbetti *et al.*, 2002; Pihlanto-Leppala, 2002; Fitzgerald dan Meisel, 2003). Peptida ini dapat dilepaskan dari protein induknya melalui proteolisis dalam produk seperti keju. Produksi BP dipengaruhi oleh kultur starter dan kondisi pematangan. Kelas penting dari BP adalah peptida yang menghambat aktivitas angiotensin I- converting enzyme (ACE), penghambatan yang terutama menimbulkan efek antihipertensi tetapi juga dapat memodulasi kekebalan dan aktivitas sistem saraf (Meisel, 1993). Peptida penghambat enzim pengubah angiotensin I telah dilaporkan dalam beberapa keju matang (Stepaniak *et al.*, 1995; Meisel *et al.*, 1997; Smacchi dan Gobbetti, 1998). Tampaknya BP yang dibebaskan oleh enzim proteolitik starter selama pematangan keju dapat terdegradasi lebih lanjut menjadi fragmen yang tidak aktif, saat pematangan berlangsung. Misalnya, peptida antihipertensi yang berasal dari Ots1-casein diamati pada keju Parmesan berusia 6 bulan tetapi tidak terdeteksi pada keju berusia 15 bulan (Meisel *et al.*, 1997). Efek antikanker telah dilaporkan untuk peptida yang berasal dari bubur keju yang dibuat menggunakan *Lc. lactis* subsp. *lactis* sebagai kultur starter (Kim *et al.*, 1995). Peptida bioaktif berpotensi sebagai bahan pangan fungsional dan obat-obatan.

### *Lemak*

Kandungan lemak keju sangat bervariasi, tergantung pada susu yang digunakan dan metode pembuatannya. Lemak mempengaruhi kekencangan, kelengketan, rasa di mulut dan rasa

keju. Pada beberapa jenis keju, asam lemak bebas dan kataboliknya merupakan penyusun rasa yang penting. Dari sudut pandang nutrisi, pencernaan lemak pada berbagai jenis keju berada pada kisaran 88-94% (Renner, 1987). Sebagian besar keju berpotensi menjadi sumber lemak makanan yang signifikan. Lemak keju umumnya mengandung 66% asam lemak jenuh, 30% tak jenuh tunggal dan 4% asam lemak tak jenuh ganda. Dengan demikian, keju merupakan sumber makanan yang signifikan dari total lemak dan asam lemak jenuh. Dari sekian banyak asam lemak jenuh dalam susu, hanya C12:0, C14:0 dan C16:0 yang memiliki sifat meningkatkan kolesterol darah dan asam palmitat, C16:0, relatif tidak efektif (Hayes *et al.*, 1991).

Banyak pedoman diet yang dikeluarkan oleh panel ahli di seluruh dunia telah merekomendasikan pengurangan asupan lemak total dan lemak jenuh di masyarakat Barat. Sebagian besar, rekomendasi ini didasarkan pada bukti bahwa peningkatan asupan beberapa asam lemak jenuh meningkatkan kolesterol total dan kolesterol lipoprotein densitas rendah dalam darah, yang dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit jantung koroner. Sementara beberapa ahli gizi membantah hipotesis ini, banyak pendapat medis di seluruh dunia mendukung konsep pedoman diet. Kekuatan pasar dan konsumen telah menanggapi pedoman ini dan pasar untuk produk makanan rendah lemak, kolesterol dan natrium telah berkembang secara signifikan.

Kandungan kolesterol keju merupakan fungsi dari kandungan lemaknya dan berkisar antara sekitar 10-100 mg/100 g, tergantung pada varietasnya. Dengan demikian, kandungan kolesterol keju kurang penting daripada kandungan lemak jenuhnya. Mayoritas individu menunjukkan sedikit atau tidak ada respon kadar kolesterol darah terhadap peningkatan asupan kolesterol makanan dalam kisaran 250-800 mg/hari. Namun, sebagian kecil (sekitar 20%) orang dewasa menunjukkan peningkatan kadar kolesterol darah sebagai respons terhadap peningkatan asupan makanan (McNamara, 1987).

Dalam beberapa tahun terakhir, telah ada minat luas dalam peran potensial produk oksidasi kolesterol pada etiologi aterosklerosis (Leonarduzzi *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2010). Namun, kolesterol oksida terbentuk pada tingkat yang dapat diabaikan dalam keju di bawah kondisi normal pembuatan, pematangan dan penyimpanan (Stanton dan Devery, 2002). Asam linoleat terkonjugasi (CLA) adalah komponen produk susu yang berpotensi menguntungkan, termasuk keju (MacDonald, 2000). Asam linoleat terkonjugasi adalah campuran isomer posisi dan geometris asam linoleat (C18:2) yang mengandung ikatan rangkap tak jenuh terkonjugasi. Isomer utama adalah *cis*-9, asam *trans*-11-octadecadienoic yang menyumbang lebih dari 82% dari total

CLA dalam produk susu (Chin *et al.*, 1992). Asam linoleat terkonjugasi telah dilaporkan memiliki sifat antioksidan dan antikarsinogenik secara *in vitro* dan pada model hewan (Ip *et al.*, 1991). Namun, sifat antikarsinogenik CLA yang disarankan ini tidak dapat dikonfirmasi dalam studi epidemiologi yang baru-baru ini diterbitkan pada manusia. Para penulis mencatat bahwa keju menyumbang sekitar 21% dari total asupan CLA dalam kelompok studi yang dilakukan. Asam linoleat terkonjugasi mungkin juga antikolesterolemia dan antiaterogenik (Lee *et al.*, 1994; Mougios *et al.*, 2001). Rata-rata, konsentrasi CLA dalam susu dan produk susu berkisar antara 0,2 hingga 1,6 g/100 g lemak (Lin *et al.*, 1995; Fritsche dan Steinhart, 1998).

#### *Karbohidrat*

Sebagian besar laktosa, karbohidrat utama dalam susu, hilang dalam whey selama pembuatan keju dan karenanya sebagian besar keju hanya mengandung sejumlah kecil karbohidrat. Selanjutnya, sisa laktosa dalam dadih keju biasanya difermentasi menjadi asam laktat oleh bakteri starter. Dengan demikian, keju dapat dikonsumsi tanpa efek buruk oleh individu yang tidak toleran laktosa yang kekurangan enzim usus, beta-galaktosidase.

#### *Vitamin*

Konsentrasi vitamin yang larut dalam lemak dalam keju dipengaruhi oleh faktor yang sama yang mempengaruhi kandungan lemaknya. Sebagian besar vitamin yang larut dalam lemak dalam susu disimpan dalam lemak keju. Konsentrasi vitamin yang larut dalam air dalam keju umumnya lebih rendah daripada dalam susu karena kehilangan whey (O'Brien dan O'Connor, 2004). Hilangnya beberapa vitamin B diimbangi, sampai batas tertentu, oleh sintesis mikroba selama pematangan keju. Secara khusus, bakteri asam propionat mensintesis kadar vitamin B12 yang signifikan dalam keju keras seperti Emmental (Renner, 1987). Secara umum, sebagian besar keju merupakan sumber vitamin A, riboflavin, vitamin B12, dan folat yang baik pada tingkat yang lebih rendah. Keju mengandung kadar vitamin C yang dapat diabaikan.

#### *Mineral*

Keju merupakan sumber makanan penting dari beberapa mineral, khususnya kalsium, fosfor dan magnesium. Satu porsi 100 g keju keras menyediakan sekitar 800 mg kalsium. Namun, keju yang dikoagulasi dengan asam, misalnya, Cottage, mengandung kalsium yang jauh lebih sedikit daripada varietas yang dikoagulasi rennet (Renner, 1987). Ketersediaan hayati kalsium dari keju setara dengan kalsium dari susu. Recker *et al.* (1988) melaporkan bahwa 22,9, 26,7 dan 25,4% kalsium total masing-masing diserap dari krim keju, susu murni dan yoghurt.

Walaupun etiologi osteoporosis sangat kompleks, tampaknya asupan kalsium yang cukup selama masa kanak-kanak dan remaja penting dalam memastikan perkembangan massa tulang puncak yang tinggi. Memaksimalkan massa tulang di awal kehidupan dianggap sebagai faktor pencegahan utama terhadap perkembangan osteoporosis di tahun-tahun berikutnya (Heaney, 1991). Keju memiliki peran potensial dalam memasok kalsium ekstra yang sangat tersedia secara hayati. Produk susu, termasuk keju, berkontribusi sedikit zat besi makanan. Kekurangan zat besi umumnya diamati baik di negara berkembang maupun negara maju. Oleh karena itu, ada minat untuk memperkuat produk susu dengan zat besi untuk meningkatkan nilai gizinya. Cheddar dan keju olahan telah berhasil difortifikasi dengan besi (Zhang dan Mahoney, 1990, 1991).

NaCl memiliki beberapa fungsi penting dalam keju alami dan keju olahan. Berbagai tingkat natrium ditemukan dalam keju karena perbedaan jumlah garam yang ditambahkan selama pembuatan keju. Secara umum, kandungan garam pada keju alami cenderung lebih rendah dibandingkan dengan banyak keju olahan. Ada banyak bukti bahwa asupan natrium yang tinggi berkontribusi terhadap hipertensi pada minoritas yang rentan (20%) dari individu yang secara genetik peka terhadap garam. Sayangnya, tidak ada tes diagnostik sederhana untuk mengidentifikasi individu yang sensitif terhadap garam. Oleh karena itu, pedoman diet untuk masyarakat umum biasanya merekomendasikan agar asupan garam dibatasi. Namun, penting untuk dicatat bahwa bahkan di negara-negara dengan konsumsi tinggi, keju hanya menyumbang sekitar 5-8% dari total asupan natrium (Renner, 1987).

Sejumlah besar penelitian telah diterbitkan pada efek kariostatik keju (O'Brien dan O'Connor, 1993, 2004; Kashket dan De Paola, 2002). Jenkins dan Ferguson, 1966 menunjukkan bahwa jika email diperlakukan dengan susu *in vitro* dan kemudian dicuci, kelarutan email sangat berkurang. Efek ini dikaitkan dengan tingginya tingkat kalsium dan fosfat dalam susu (Jenkins dan Ferguson, 1966) atau adsorpsi kasein ke permukaan email (Weiss dan Bibby, 1966). Reynolds dan del Rio (1984) melaporkan bahwa kasein dan whey protein secara signifikan mengurangi tingkat karies, dengan yang pertama memberikan efek yang lebih besar. Bukti lebih lanjut untuk efek perlindungan kasein diberikan dalam penelitian pada tikus yang diberi coklat yang diperkaya kasein (Reynolds dan Black, 1987). Kalsium dan fosfat tampaknya menjadi tersedia di bawah kondisi asam dari plak dan mengurangi demineralisasi email (Reynolds, 1997; Reynolds *et al.*, 1999). Konsentrat yang mengandung berbagai tingkat protein whey, kalsium dan fosfat tetapi jumlah kasein yang dapat diabaikan, secara signifikan mengurangi kejadian karies gigi pada tikus



(Harper *et al.*, 1987). Jadi, ada bukti bahwa protein susu, kalsium dan fosfat semuanya memberikan efek antikariogenik.

Rugg-Gunn *et al.* (1975) memberikan bukti pertama bahwa konsumsi keju memiliki efek antikariogenik pada manusia. Efek serupa dilaporkan oleh Imfeld *et al.* (1978) yang menggunakan prosedur telemetri kawat kontinu yang lebih canggih untuk memantau variasi pH plak. Pengaruh pola makan pada karies gigi pada tikus diselidiki oleh Edgar *et al.* (1982). Tikus yang diberi makan keju tambahan saat menjalani diet tinggi sukrosa, mengembangkan lebih sedikit lesi karies permukaan halus dan menunjukkan peningkatan keluaran saliva (yang menyangga asam yang terbentuk dalam plak) dan pengurangan jumlah *Sc. mutans* Harper *et al.* (1983) mengemukakan bahwa efek kariostatik keju pada tikus disebabkan oleh kalsium fosfat dan/atau kaseinnya; lemak atau laktosa tampaknya memberikan sedikit pengaruh. Pekerjaan lebih lanjut oleh Rosen *et al.* (1984) tentang pengaruh keju, dengan atau tanpa sukrosa, pada karies gigi dan pemulihan *Sc. mutans* pada tikus menunjukkan efek kariostatik menguntungkan dari konsumsi keju tetapi sedikit efek pada *Sc. mutans*. Data ini menunjukkan bahwa efek kariostatik keju mungkin tidak berhubungan langsung dengan efek pada *Sc. Mutans*. Bukti lebih lanjut bahwa keju dapat menghambat karies gigi tanpa adanya air liur diberikan oleh Krobicka *et al.* (1987); tikus yang kelenjar penghasil air liurnya diangkat melalui pembedahan mengembangkan lesi yang lebih sedikit dan tidak terlalu parah ketika diberi makan keju selain diet kariogenik bila dibandingkan dengan kontrol yang sesuai.

Sementara penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan mekanisme yang tepat yang terlibat dalam efek kariostatik keju, ada banyak bukti yang mendukung konsumsi keju sebagai tindakan antikanker (Herod, 1991; Kashket dan De Paola, 2002). Mekanisme yang paling masuk akal untuk efek perlindungan keju tampaknya terkait dengan potensi mineralisasi kalsium fosfat keju, dengan stimulasi aliran air liur yang disebabkan oleh tekstur dan/atau rasanya, efek penyangga protein keju pada asam. pembentukan plak gigi dan penghambatan bakteri kariogenik.

---

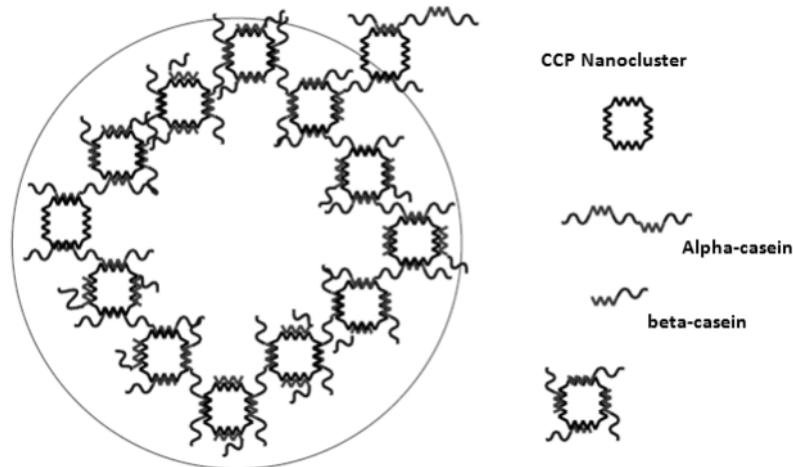
## ***BAB IV ASPEK BIOKIMIA DAN FISIK KEJU***

---

### *Pembentukan, Sifat Struktural dan Reologi Gel Susu Koagulasi Asam*

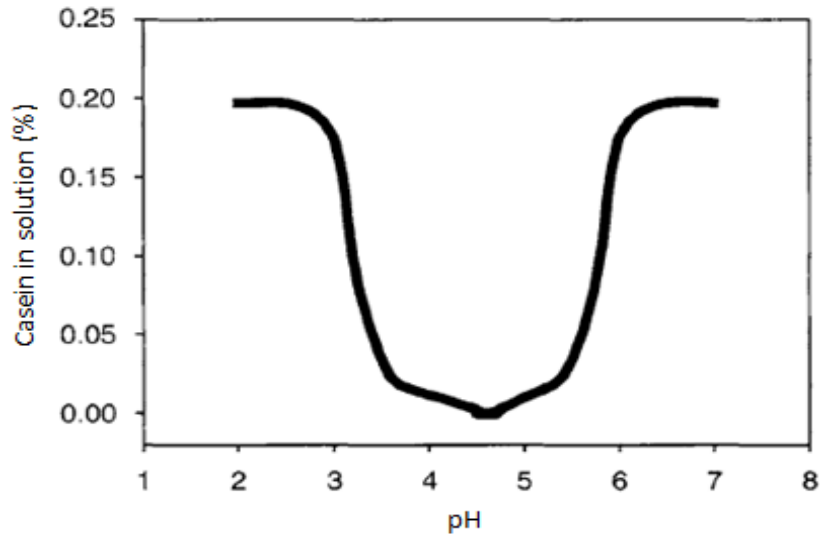
Keju asam segar berbeda dari produk susu fermentasi dalam jumlah yang signifikan dari air (whey) dihilangkan setelah koagulasi. Metode penghilangan whey, seperti pemisahan sentrifugal dan ultrafiltrasi (UF), digunakan untuk keju Quarg dan Krim sedangkan pemotongan koagulum menjadi butiran dan suhu masak yang tinggi digunakan untuk keju Cottage. Kultur bakteri asam laktat mesofilik (yaitu, biasanya *Lactococcus* spp. dan *Leuconostoc* spp.) dan terkadang spesies probiotik digunakan sebagai kultur untuk sebagian besar keju dadih asam segar (Lucey, 2004). Faktor umum dalam semua produk keju asam ini adalah bahwa langkah awal melibatkan pembentukan gel yang diinduksi asam, yang kemudian diproses lebih lanjut. Bab ini berfokus terutama pada pembentukan gel asam-susu ini dan sifat fisik, reologi dan mikrostrukturnya.

Kasein merupakan sekitar 80% dari protein dalam susu sapi, dengan empat jenis utama (alfa s1-, alfa s2-, beta- dan kappa-kasein) dalam kombinasi dengan jumlah yang cukup dari misel atau koloid kalsium fosfat (CCP) dalam bentuk agregat yang disebut misel kasein. Stabilitas misel kasein susu dikaitkan dengan muatan negatif bersih dan tolakan steriknya oleh daerah makropeptida fleksibel kappa-kasein (yang disebut 'rambut'). Berbagai jenis interaksi bertanggung jawab atas integritas misel, termasuk interaksi yang diinduksi Ca antara molekul protein, ikatan elektrostatik, hidrofobik, dan hidrogen. Interaksi ini mungkin juga terlibat dalam pembentukan dan sifat struktural gel kasein asam.



**Gambar 6 Skema pembentukan jaringan misel kasein pada model Horne (2006)**  
*Sumber: Horne (2006)*

Berbagai model untuk struktur misel kasein telah diusulkan, dan telah menjadi sumber kontroversi selama bertahun-tahun. Model terbaru oleh Horne (2006) membayangkan skema polimerisasi model ikatan ganda) untuk perakitan misel kasein (Gambar 6). Penautan silang molekul berlangsung melalui dua rute, interaksi hidrofobik antara kelompok pada molekul yang berbeda membentuk satu jalur, dengan lebih dari dua molekul mungkin bergabung di persimpangan tersebut, dan jalur kedua di mana perpanjangan rantai melalui nanocluster CCP bertindak sebagai jembatan penetralisir antara dua gugus fosfoseril pada molekul terpisah alfa s1-, alfa s2- atau beta-kasein. Kedua rute mengizinkan percabangan dan karenanya mengarah ke jaringan tiga dimensi. Namun, kappa-kasein hanya dapat berikatan dengan residu hidrofobik pada molekul kasein lain. Keseimbangan dan karena itu ukuran misel, atau setidaknya ukuran jaringan, karenanya harus menjadi fungsi dari jumlah atau proporsi molekul kasein multi-fungsi dalam sistem. Pembentukan loop adalah peristiwa acak, dan oleh karena itu ukuran misel juga harus acak dan terjadi dalam berbagai ukuran. Karena tidak memiliki gugus fosfoseril untuk memungkinkan perpanjangan lebih lanjut, rantai polimer berakhir di sana. Akibatnya, kappa-kasein memperoleh posisi permukaan eksternal di mana ia bertindak sebagai penstabil sterik.



**Gambar 7 Kelarutan kasein utuh dalam air sebagai fungsi pH**

*Sumber: Strange et al. (1994)*

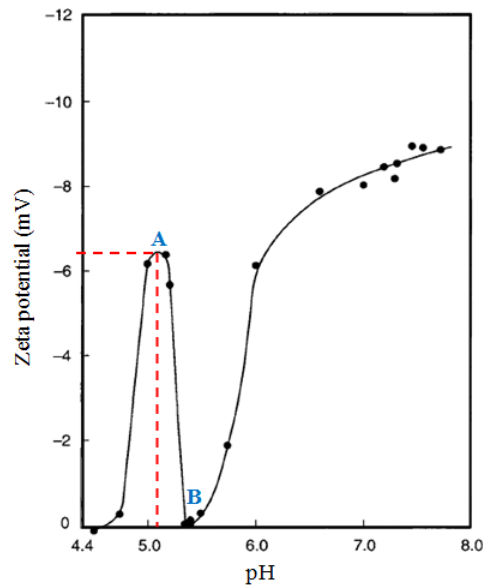
Saat pH susu berkurang, CCP larut dan kasein dibebaskan ke dalam fase serum (Dalglish and Law, 1988). Tingkat pembebasan kasein tergantung pada suhu pada pengasaman (Dalglish dan Law, 1988), yang memiliki sedikit efek pada solubilisasi CCP. Rupanya, sedikit perubahan dalam diameter hidrodinamik rata-rata misel kasein terjadi selama pengasaman susu (tidak dipanaskan) hingga pH  $\sim 5,0$  (Roefs *et al.*, 1985; de Kruif, 1997), meskipun struktur internal misel kasein diubah karena hilangnya PKC (Walstra, 1993). Agregasi kasein terjadi ketika titik isoelektrik (pH  $\sim 4,6$ ) didekati (Gambar 7); dalam kondisi pengasaman dan/atau pengadukan yang cepat, agregat kasein mengendap dari larutan dan ini merupakan dasar pembuatan kasein asam.

#### *Mekanisme Koagulasi*

Gel susu asam adalah contoh gel partikel dan setidaknya tiga model teoretis, yaitu fraktal, perekat bola keras dan model perkolasi, telah digunakan untuk memodelkan pembentukan gel susu yang diasamkan (Horne, 1998; Lucey dan Singh, 2003). Teori agregasi fraktal telah diterapkan pada pembentukan berbagai gel kasein (Bremer *et al.*, 1993). Dari pendekatan fraktal, sejumlah hukum skala telah digunakan untuk menurunkan hubungan antara sifat fisik gel dan dimensi fraktal (Bremer, 1992). Pendekatan fraktal telah berhasil menggambarkan fitur semikuantitatif gel kasein (misalnya, sifat reologi), tetapi tampaknya memiliki beberapa kekurangan, termasuk kurangnya penyisihan untuk penataan ulang agregat atau interpenetrasi, dan asumsi bahwa semua agregat memiliki ukuran yang sama pada gel. titik (Dickinson, 1997). Jika hanya ada penataan ulang

terbatas, dimensi fraktal mungkin meningkat, tetapi setelah penataan ulang yang parah, deskripsi fraktal dari kluster tidak akan lagi berlaku (van Vliet, 1999).

Agregasi kasein selama pengasaman susu juga telah dimodelkan menggunakan teori bola keras perekat (de Kruif, 1997, 1999). Dalam model ini, diusulkan bahwa bagian kaseinomakropeptida (CMP) dari n-kasein secara sterik menstabilkan misel kasein dan dianggap sebagai sikat polielektrolit, yang runtuh pada permukaan misel saat pH sistem mendekati pKa muatan. gugus asam karboksilat) pada sikat. Horne (2006) menunjukkan bahwa model ini mengasumsikan bahwa hanya fitur permukaan partikel kasein yang mempengaruhi sifat struktural gel susu asam. Namun, baru-baru ini telah ditunjukkan bahwa hilangnya CCP dari misel kasein secara dramatis mempengaruhi sifat gel kasein (Lucey, 2004; Horne, 2006). Horne (2006) meninjau kesesuaian model perkolasi untuk gel susu asam dan menyarankan bahwa model tersebut mungkin hanya cocok pada titik gel dan sulit untuk menggunakan teori ini untuk memodelkan sifat mekanik gel susu asam.



**Gambar 8 Grafik profil potensial Zeta misel kasein.**

Perhatikan potensi zeta maksimum (A) dan minimum (B) seperti yang diusulkan oleh Schmidt dan Poll (1986)

*Sumber: Schmidt dan Poll (1986)*

Muatan permukaan misel kasein dapat diperkirakan dari potensi zeta dan plot perubahan potensi zeta sebagai fungsi pH ditunjukkan pada Gambar 8. Misel kasein menunjukkan beberapa perilaku potensial zeta yang tidak biasa. Ada minimum pada pH 5,4 (negatif) dan maksimum pada

pH 5,1 (Schmidt dan Poll, 1986). Telah dikemukakan bahwa bentuk profil zeta potensial-pH disebabkan oleh fenomena disosiasi dan asosiasi kasein yang halus di wilayah pH ini (Heertje *et al.*, 1985; Lucey, 2004). Mereka mengusulkan bahwa pada pH ~5,5, ada disosiasi preferensial beta-kasein dan pada pH ~5,2 ia berasosiasi kembali dengan misel dan ini bertepatan dengan 'tahap kontraksi dan penataan ulang'.

Namun, Singh *et al.*, (1996) telah menunjukkan bahwa pada suhu > 20°C yang biasa digunakan untuk pembentukan gel susu asam, tidak ada disosiasi preferensial beta-kasein dari misel yang terjadi selama pengasaman susu. Lebih mungkin bahwa perilaku potensial zeta yang tidak biasa ini disebabkan oleh pelarutan CCP, yang memodifikasi lingkungan ionik di sekitar misel kasein. Tiga daerah pH dalam pengasaman susu dari pH 6,7 hingga 4,6 (yang merupakan kisaran pH yang diinginkan untuk berbagai jenis keju tipe asam) dapat dibedakan (Lucey, 2004):

1. wilayah pH 6,7 hingga 6,0. Penurunan pH menyebabkan penurunan muatan negatif bersih pada misel kasein, sehingga mengurangi tolakan elektrostatis. Hanya sejumlah kecil CCP yang terlarut di atas pH 6,0, sehingga fitur struktural misel relatif tidak berubah (misalnya, ukuran). Sebagai konsekuensi dari tolakan yang berkurang ini (karena pH diturunkan) terjadi penurunan waktu gelasi dan peningkatan kekencangan gel (Zoon *et al.*, 1989)
2. pH 6,0 hingga 5,0. Penurunan pH menyebabkan penurunan muatan negatif bersih pada misel kasein, sehingga mengurangi tolakan elektrostatis. 'Rambut' kappa-kasein pada permukaan misel bermuatan, sehingga 'rambut' bermuatannya dapat menyusut saat pH menurun. Hasil akhirnya adalah penurunan tolakan elektrostatis dan stabilisasi sterik, dua faktor yang terutama bertanggung jawab untuk stabilitas misel. CCP dalam misel kasein dilarutkan sepenuhnya oleh pH 5,0 dalam kasus susu, tetapi sebagian besar CCP tetap utuh dalam pembuatan alami, keju terkoagulasi rennet (Lucey dan Fox, 1993), mungkin karena efek perlindungan dari padatan yang lebih tinggi. Disosiasi kasein dari misel sangat tergantung pada suhu dan pH. PH disosiasi maksimum (pada suhu <20°C adalah 5,2-5,4 (Dalglish and Law, 1988), mungkin karena melonggarnya interaksi molekuler antara kasein karena hilangnya CCP, yang menyebabkan peningkatan tolakan elektrostatis antara fosfoserin yang baru terpapar. Pada suhu rendah, misalnya 5°C terjadi disosiasi yang cukup besar, terutama pada pH 5,4-5,2; beberapa disosiasi terjadi pada 20°C tetapi disosiasi menurun dengan cepat >20°C dan pada 30°C hampir tidak ada pelepasan kasein (Dalglish dan Hukum, 1988).

3. pH 5.0. Muatan negatif bersih pada misel kasein menurun dengan pendekatan titik isoelektrik dan ada peningkatan interaksi elektrostatis dan tolakan elektrostatis berkurang, yang memungkinkan peningkatan interaksi hidrofobik (Horne, 1998). Dalam gel susu yang tidak dipanaskan, di mana pengasaman adalah satu-satunya metode koagulasi, gelasi terjadi sekitar pH 4,9 kecuali pengasaman dilakukan pada suhu yang sangat tinggi ketika pH gelasi yang lebih tinggi diamati.

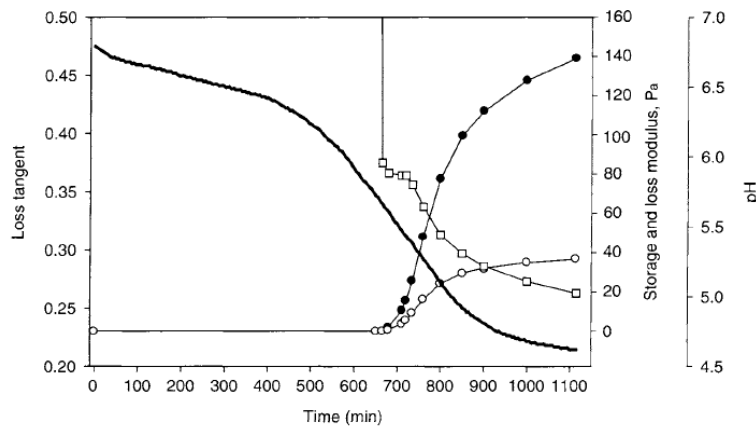
Pada pengasaman, partikel kasein beragregasi sebagai akibat (terutama) netralisasi muatan. Pengasaman akhirnya mengarah pada pembentukan rantai dan gugus yang dihubungkan bersama untuk membentuk jaringan tiga dimensi (Mulvihill dan Grufferty, 1995). Gel kasein asam dapat dibentuk dari natrium kaseinat dan gelasi juga terjadi pada pH ~5,0 (Lucey dan Singh, 2003). Pengasaman langsung susu pada suhu rendah memungkinkan pelarutan CCP sebelum gelasi dan oleh karena itu gel ini dapat mengalami sedikit perubahan dalam sifat mekaniknya (misalnya, sineresis) daripada produk budidaya tradisional. Glucono- $\delta$ -lactone (GDL) juga digunakan untuk mengasamkan susu tetapi gel yang diinduksi asam ini mungkin memiliki sifat reologi dan struktural yang berbeda dari gel yang diproduksi oleh produksi asam in situ oleh kultur bakteri (Lucey, 2004).

#### *Sifat Fisik Gel yang Diinduksi Asam*

Sifat reologi gel susu asam telah dipelajari secara ekstensif selama 20 tahun terakhir atau lebih (Lucey dan Singh, 1997; Lucey, 2004). Secara umum, susu skim yang tidak dipanaskan membentuk gel yang lemah ( $G' < 50$  Pa), dan pH pada gelasi umumnya 4,8-5,0. Contoh dari beberapa sifat reologi gel susu asam lemak tinggi (mirip dengan krim keju) ditunjukkan pada Gambar 10. Setelah gelasi,  $G'$  meningkat dengan cepat dan hanya mulai mendatar selama penuaan gel (di wilayah pH ~ 4.6),  $\tan \delta$  menurun menjadi  $< 0,4$  segera setelah gelasi dan menurun menjadi ~0,2-0,3 selama penuaan gel susu asam. Roef *et al.* (1985) menunjukkan bahwa untuk gel asam,  $G'$  dapat terus meningkat hingga beberapa hari, mungkin karena memperlambat fusi/pengaturan ulang partikel kasein yang sedang berlangsung.

Fenomena reologi yang tidak biasa diamati segera setelah pembentukan gel yang diinduksi asam dari susu yang dipanaskan;  $\tan \delta$  menurun pada awalnya tetapi kemudian meningkat ke nilai maksimum sebelum menurun lagi (Biliaderis *et al.*, 1992).  $\tan \delta$  yang tinggi menunjukkan peningkatan kerentanan ikatan dan untaian dalam gel untuk putus atau rileks, sehingga

memfasilitasi lebih banyak penataan ulang gel (van Vliet *et al.*, 1991). Maksimum dalam tan mungkin merupakan konsekuensi dari melonggarnya sebagian dari jaringan gel awal yang lemah karena pelarutan CCP, sementara pada nilai pH yang lebih rendah ada peningkatan daya tarik protein-protein antara partikel kasein karena muatan bersih menurun dengan pendekatan titik isoelektrik (Lucey, 2004). Contoh dari beberapa sifat reologi dari gel susu skim asam yang dibuat dari susu yang sangat dipanaskan dan gel susu skim asam yang dibuat dari susu yang tidak dipanaskan dengan sedikit rennet ditambahkan masing-masing disajikan pada Gambar 9.



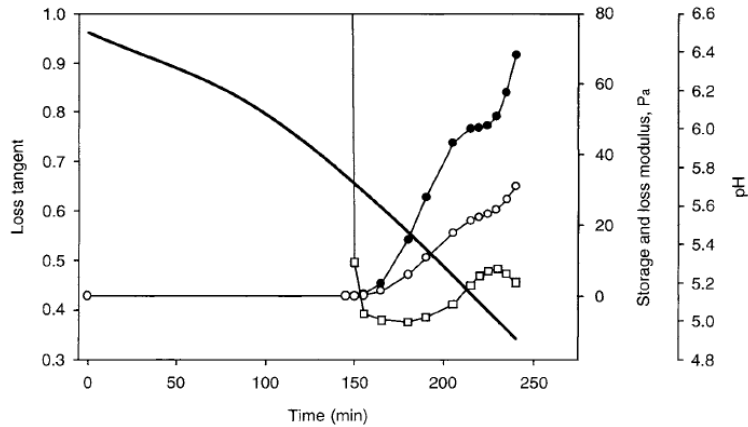
**Gambar 9 Perubahan reologi selama pembentukan gel krim keju awal.**

Modulus penyimpanan (titik hitam), modulus kehilangan (titik kosong), kehilangan tangen (kotak kosong) dan perubahan pH (garis padat) sebagai fungsi waktu selama inkubasi 12% lemak susu dengan 2% kultur starter mesofilik pada suhu 23° C

*Sumber: Lucey (2004)*

Gel kasein asam sangat rapuh dan rapuh dibandingkan dengan gel susu yang dikoagulasi rennet. Sulit untuk membentuk gel yang cocok untuk pemotongan dan pendekatan ini hanya digunakan untuk beberapa keju (Lucey, 2004). Kebanyakan gel asam ketika diaduk atau dicampur memiliki tekstur yang halus dan tidak menggumpal. Desain peralatan yang tidak tepat dan pemompaan yang berlebihan dapat merusak atau menghancurkan gel yang rapuh ini dan mengakibatkan kehilangan hasil. Seperti pada tahun 2014, ada sedikit informasi yang dipublikasikan tentang sifat deformasi besar yang mendasar dari gel susu asam meskipun ini akan memberikan informasi yang berguna tentang sifat-sifat yang mungkin terkait dengan konsistensi gel selama konsumsi, pemotongan atau pemotongan.





**Gambar 10 Perubahan reologi selama pembentukan awal (a) kuarsa dan (b) gel keju cottage.**

Modulus penyimpanan (titik hitam), modulus kehilangan (titik kosong), kehilangan tangen (kotak kosong) dan perubahan pH (garis padat) sebagai fungsi waktu selama inkubasi 12% lemak susu dengan 2% kultur starter mesofilik pada suhu 23°C

*Sumber: Lucey (2004)*

Pencampuran dan pengadukan gel susu asam sebelum pengujian reologi berarti bahwa banyak sifat 'patah' (hasil) yang dilaporkan tidak seperti gel 'pengaturan' asli (Lucey dan Singh, 1997). Masalah lain yang dapat mempengaruhi pengukuran viskometri gel susu asam adalah slip saat menggunakan kurva aliran (Suwonsichon dan Peleg, 1999). Nilai rendah yang tidak realistis ( $<0,5$ ) yang telah dilaporkan untuk indeks aliran ( $n$ ) dari gel susu asam yang diaduk dapat disebabkan oleh masalah ini (Suwonsichon dan Peleg, 1999). Gel susu asam menunjukkan perilaku aliran yang bergantung pada waktu (Benezech dan Maingonnat, 1994; Velez-Ruiz dan Barbosa Canovas, 1997).

Struktur mikro gel susu asam memiliki efek yang nyata pada tekstur dan atribut sensoriknya (Langton *et al.*, 1996). Tekstur yang terlalu keras dapat disebabkan oleh faktor-faktor seperti kandungan padatan total yang sangat tinggi dari campuran (baik lemak dan kasein) atau jumlah penstabil tambahan yang berlebihan. Tubuh yang lemah dapat disebabkan oleh faktor-faktor seperti kandungan padatan (lemak) yang rendah dari campuran, perlakuan panas yang tidak memadai pada susu, keasaman rendah (pH tinggi) dan suhu gelasi yang terlalu rendah. Untuk keju krim dianggap bahwa jika pH keju terlalu tinggi (yaitu  $>4,7$ ) teksturnya akan lunak dan keju akan kurang berasa (Lucey, 2004). Pada pH yang sangat rendah ( $<4,6$ ), keju krim mungkin menjadi terlalu kasar dan rasanya terlalu asam. Cacat dalam keju krim termasuk pemisahan whey dari produk selama penyimpanan, kurangnya daya sebar dan tekstur berkapur kasar, terutama pada

jenis lemak yang lebih rendah (Bodyfelt *et al.*, 1988). Cacat tekstur yang digambarkan sebagai 'kapur' atau 'berbutir' tidak dapat diterima, karena konsumen biasanya mengharapkan produk yang halus dan bertubuh halus (Bodyfelt *et al.*, 1988).

Studi mikroskop elektron (EM) dan mikroskop laser pemindaian confocal (CSLM) pada gel susu asam telah menunjukkan bahwa gel ini terdiri dari jaringan partikel kasar partikel kasein yang dihubungkan bersama dalam kelompok, rantai, dan untaian (Kalab *et al.*, 1983; Lucey dan Singh, 1997). Jaringan memiliki pori-pori atau ruang kosong di mana fase air dibatasi; dalam produk yang mengandung lemak, adanya butiran lemak (besar) mengaburkan detail pori-pori dan untaian yang lebih halus. Diameter pori-pori ini sangat bervariasi, dengan pori-pori yang lebih besar dalam gel yang dibuat pada suhu gelasi tinggi (biasanya <30 m) atau dari susu dengan kandungan protein rendah. Harwalkar dan Kalab (1980) mengusulkan, berdasarkan pemeriksaan mikrograf elektron, bahwa gel susu asam yang terbuat dari susu yang tidak dipanaskan memiliki kelompok protein yang lebih besar (struktur kasar) daripada gel yang terbuat dari susu yang dipanaskan, yang mereka gambarkan sebagai sangat bercabang (struktur halus).

Permeabilitas gel yang diinduksi rennet berada dalam kisaran yang sama dengan gel yang diinduksi asam tetapi untuk gel susu yang diinduksi rennet, koefisien permeabilitas ( $B$ , m<sup>2</sup>) meningkat seiring waktu, yang telah dianggap sebagai bukti 'mikrosineresis' atau kerusakan untaian di jaringan, menghasilkan pembentukan pori-pori yang lebih besar (Walstra, 1993). Studi tentang permeabilitas gel yang diinduksi asam telah menunjukkan bahwa nilai  $B$  tidak berubah seiring waktu (Roefs *et al.*, 1990a; Lucey *et al.*, 1997). Gel dengan pori-pori yang lebih besar (permeabilitas lebih tinggi) umumnya kurang stabil dan lebih rentan terhadap sineresis whey (Lucey *et al.*, 1997).

Sebagian besar gel susu asam harus memiliki konsistensi semipadat yang halus, tanpa permukaan whey meskipun diproses lebih lanjut seperti penambahan bahan penstabil (Lucey, 2004). Penampilan gel set harus mulus tanpa retakan atau 'noda'. Cacat yang terlihat pada tahap gelasi awal mungkin memerlukan penambahan lebih banyak stabilisator untuk mencegah pemisahan whey selama penyimpanan. Gel asam yang dibuat dari susu yang dipanaskan dengan GDL memiliki permukaan 'kasar', dengan retakan yang terlihat dan beberapa pemisahan whey (Lucey *et al.*, 1997; Lucey, 2004). Disarankan bahwa penataan ulang jaringan selama setelah pembentukan gel mungkin bertanggung jawab atas cacat ini (Lucey, 2004). Gel yang dibuat dari susu yang dipanaskan dengan suhu tinggi memiliki regangan yang lebih rendah pada saat patah

daripada gel yang dibuat dari susu yang tidak dipanaskan dan ini dapat membuat gel yang dipanaskan lebih rentan terhadap lokalisasi.

Pemisahan whey (*whey*-off) mengacu pada munculnya cairan (whey) pada permukaan gel susu dan merupakan cacat umum pada yogurt (Lee *et al.*, 1994). Hal ini berguna untuk mendefinisikan sineresis spontan sebagai kontraksi gel tanpa penerapan kekuatan eksternal (misalnya, sentrifugasi), dan ini terkait dengan ketidakstabilan jaringan gel (yaitu, karena penataan ulang skala besar) (Walstra, 1993; Lucey, 2004). Jumlah pemisahan whey spontan dalam gel susu asam dapat diukur dengan menggunakan pendekatan sederhana seperti menentukan jumlah permukaan whey yang dikeluarkan selama gelas (Lucey *et al.*, 1997). Jumlah whey yang dikeluarkan dari gel susu asam sebagai hasil dari sentrifugasi kecepatan tinggi dapat menjadi indikator yang berguna dari jumlah whey yang dapat dihilangkan selama proses pemisahan mekanis (Lucey *et al.*, 1998). Dalam gel susu, faktor kunci dalam mengontrol sineresis adalah derajat penataan ulang yang terjadi pada jaringan kasein (van Vliet dan Walstra, 1994).

Pada gel yang baru dibuat, jumlah ikatan antara setiap sambungan belum terlalu tinggi, seperti yang ditunjukkan oleh modulus dinamik yang rendah, dan tan lebih tinggi daripada gel yang sudah tua; faktor-faktor ini mungkin menjelaskan mengapa whey-off kadang-kadang terjadi pada gel yang masih muda tetapi lebih jarang pada gel yang sudah tua. Sineresis gel susu asam yang dibuat dengan GDL meningkat pada suhu gelas yang tinggi, nilai pH yang tinggi dan bahkan pada tingkat rennet yang rendah (van Vliet *et al.*, 1991; Lucey, 2004). Telah ditunjukkan baru-baru ini bahwa tekanan sineresis endogen umumnya kecil dalam gel asam yang terbuat dari natrium kaseinat dan ini menghasilkan kecenderungan yang lebih rendah dari gel ini untuk menyusut dibandingkan dengan gel yang diinduksi rennet (Lucey *et al.*, 1997). Gel susu yang diinduksi asam yang dibentuk oleh pengasaman susu yang lambat pada suhu rendah dan di bawah pemanasan diam menunjukkan sedikit whey-off atau sineresis spontan (Roefs, 1986). Perlu dicatat bahwa gel susu asam mengalami sineresis jauh lebih sedikit daripada gel yang diinduksi rennet bahkan ketika mengalami sentrifugasi (Lucey, 2004). Untuk alasan ini, keju yang dikoagulasi asam memiliki kadar air yang sangat tinggi (misalnya, >50%).

### *Pengaruh Parameter Komposisi dan Pengolahan Terhadap Sifat Tekstur Gel Susu Asam*

Efek dari setiap langkah pemrosesan pada sifat tekstur gel susu asam akan dibahas pada bagian berikut. Pengasaman produk asam daging dengan kultur umumnya dilakukan dengan salah

satu dari dua metode: lambat, 12-16 jam pada 20-23°C (set panjang) atau 4-6 jam pada 30-32°C (set pendek). Kultur bakteri asam laktat mesofilik (yaitu, terutama *Lactococcus* spp. dan *Leuconostoc* spp.) dan terkadang spesies probiotik digunakan sebagai kultur untuk sebagian besar keju yang dikoagulasi asam (Walstra *et al.*, 2010). Terkadang, keju segar dibuat dengan penambahan asam, misalnya asam fosfat atau asam laktat (pengaturan asam langsung atau pengasaman langsung) dan/atau GDL (Orla-Jensen *et al.*, 1947; Corbin *et al.*, 1982; Lucey *et al.*, 2001; Okpala *et al.*, 2010;).

Dibandingkan dengan gel yang dibuat pada 20°C asam kasein gel yang dibuat pada 40°C lebih kasar, menunjukkan lebih banyak penataan ulang, lebih lemah dan kurang stabil (Lucey *et al.*, 1997). Dalam praktiknya, variabel proses lainnya (misalnya, kandungan lemak, stabilisator, perlakuan panas) dapat membantu menstabilkan jenis gel ini. Secara umum, laju pembentukan asam yang berlebihan (misalnya, penggunaan GDL) pada suhu inkubasi yang tinggi (misalnya, 45°C berkontribusi terhadap cacat 'wheying-off' dan pembentukan gel yang buruk. Dalam berbagai jenis gel susu asam yang dibentuk dengan GDL, suhu gelasi yang lebih rendah (misalnya, 30°C menghasilkan waktu gelasi yang lebih lama tetapi gel ini dapat memiliki nilai G' lebih tinggi daripada gel yang dibuat pada suhu gelasi yang jauh lebih tinggi misalnya, 40°C (Cobos *et al.*, 1995; Lucey *et al.*, 1998). Hal ini disebabkan struktur gel yang lebih kasar (pengaturan ulang yang lebih besar) dalam gel GDL yang terbentuk pada suhu tinggi (Lucey *et al.*, 1997). Dalam produk yang dikultur, tren terkait suhu gelasi ini mungkin kurang jelas karena perbedaan besar dalam laju penurunan pH antara gel yang dikultur dan diinduksi GDL. Dalam produk yang dikultur, gel yang dibuat pada suhu yang sangat rendah (misalnya, 21°C lebih lemah daripada gel yang dibuat pada suhu yang sedikit lebih tinggi (misalnya, 26°C).) Modulus dinamis gel asam meningkat dengan menurunnya suhu pengukuran (Lucey *et al.*, 1997; Lucy, 2004). Pemisahan whey juga menurunkan gel GDL yang dibuat pada suhu gelasi yang lebih rendah (Lucey *et al.*, 1997, 1998).

Metode pengasaman dan pembentukan gel (misalnya, GDL, pengasaman dingin atau fermentasi bakteri) memiliki dampak besar pada struktur dan sifat fisik gel susu asam (Roefs, 1986; Lucey *et al.*, 1998d). Pemanasan cepat gel diasamkan dingin ke suhu tinggi (misalnya, 50°C menghasilkan gel yang keras tetapi sineresis yang cukup besar (Walstra *et al.*, 2010). Perlakuan panas susu merupakan salah satu parameter proses yang paling penting yang mempengaruhi tekstur gel susu asam (Mulvihill dan Grufferty, 1995). Ketika susu dipanaskan terlebih dahulu, protein whey yang terdenaturasi bergabung dengan misel kasein dan mereka menghubungkan

jaringan gel ketika terjadi agregasi selama pengasaman susu berikutnya. Ketegasan dan viskositas gel asam telah dikaitkan dengan tingkat denaturasi protein whey selama perlakuan panas. Perlakuan panas juga menghasilkan pengurangan waktu gelasi. Dalam gel yang terbentuk dari susu yang dipanaskan sebelumnya, gelasi terjadi pada pH yang lebih tinggi (misalnya, 5,2-5,4) daripada dari susu yang tidak dipanaskan (pH ~ 5,0); nilai pH ini tergantung pada suhu gelasi. pH gelasi yang lebih tinggi dapat dikaitkan dengan pH isoelektrik yang lebih tinggi (~5,2) dari protein whey utama, beta-lactoglobulin, yang memulai pengendapan/agregasi isoelektrik pada pH yang lebih tinggi daripada kasein yang memiliki titik isoelektrik ~4,6 (Lucey *et al.*, 1998).

Perlakuan panas tinggi juga meningkatkan modulus dinamis gel susu asam (van Vliet dan Keetels, 1995; Lucey *et al.*, 1997, 1998; Lucey, 2004) meskipun regangan patah menurun dengan meningkatnya perlakuan panas, membuat gel ini lebih rapuh (Lucey *et al.*, 1997; Fox, 2000). Perlakuan panas dapat meningkatkan kerentanan gel GDL terhadap wheying karena gel dapat mengalami penataan ulang yang lebih besar (Lucey *et al.*, 1998). Ada sejumlah laporan tentang efek perlakuan panas pada sifat reologi gel susu asam yang ditentukan oleh osilasi amplitudo rendah (regangan) dinamis (van Vliet dan Keetels, 1995; Lucey *et al.*, 1997a, 1998b, c). Peningkatan cross-linking atau bridging, oleh protein whey yang didenaturasi, dalam gel yang terbuat dari susu yang dipanaskan mungkin bertanggung jawab atas peningkatan kekakuan jaringan (Lucey *et al.*, 1997, 1998; Lucey, 2004).

Telah diketahui dengan baik bahwa peningkatan kandungan padatan non-lemak (SNF) susu meningkatkan kekencangan dan viskositas gel susu asam. Kandungan protein atau SNF susu dapat ditingkatkan dengan mengkonsentrasikan susu, misalnya dengan reverse osmosis (De Boer *et al.*, 1980), ultrafiltrasi (Cheryan, 1998), atau penguapan termal atau dengan pengayaan bahan kering (Fox *et al.*, 2000). Sumber bahan kering biasanya SMP dan WPC. Pada tingkat protein yang sama, gel susu asam yang diperkaya dengan Na kaseinat memiliki viskositas atau kekencangan yang lebih tinggi daripada gel yang diperkaya dengan SMP atau WPC. Penambahan 1% WPC ke dalam susu diikuti dengan perlakuan panas, menghasilkan peningkatan G' dan pengurangan waktu gelasi untuk gel susu asam (Lucey *et al.*, 1999). Substitusi hingga 10-15% kasein oleh WPC memiliki sedikit efek pada viskositas akhir atau atribut sensorik gel susu asam tetapi pada tingkat substitusi yang lebih tinggi, flokulasi dan rasa tidak enak dapat terjadi pada produk. Kekencangan gel asam yang dibuat dari susu dengan berbagai rasio kasein terhadap protein whey adalah serupa (Jelen *et al.*, 1987).

Sifat membran globul lemak menentukan jenis interaksi yang dapat terjadi antara globul lemak dan matriks protein. Gumpalan lemak bertindak sebagai pengisi inert jika membran globul lemak asli utuh karena membran ini tidak berinteraksi dengan partikel kasein (van Vliet, 1988). Nilai G' gel susu asam menurun dengan meningkatnya fraksi volume lemak, yang memiliki membran globul lemak asli yang utuh (van Vliet, 1988). Dalam susu homogen atau rekombinasi, membran asli sebagian besar digantikan oleh kasein dan beberapa protein whey sehingga permukaan partikel lemak dapat berinteraksi dengan matriks protein (sebagian besar kasein tetapi beberapa protein whey terdenaturasi ketika gel dibuat dari susu yang dipanaskan) asam gel susu (van Vliet dan Dentener-Kikkert, 1982; van Vliet, 1988).

Sebuah pH 4,6 - 4,75 pada pemotongan sering direkomendasikan untuk keju Cottage; pH yang lebih tinggi menghasilkan koagulum yang lebih kencang sedangkan pH yang lebih rendah menghasilkan dadih yang lebih lembut (Emmons dan Tuckey, 1967; Emmons dan Beckett, 1984). PH yang lebih tinggi pada pemotongan mungkin menghasilkan retensi Ca yang lebih besar sebagai CCP dalam partikel kasein. Tolakan elektrostatis antara molekul kasein ditingkatkan dengan melarutkan CCP (Horne, 1998). Gel kasein asam dengan nilai pH yang sangat tinggi (misalnya, 4,8) memiliki kecenderungan yang jauh lebih besar untuk bersinergi daripada gel dengan nilai pH rendah ( $\leq 4,6$ ) (van Vliet *et al.*, 1997). Agaknya, sebagian besar  $\text{CaCl}_2$  yang ditambahkan larut pada pH rendah gel susu asam. Pengasaman susu hingga pH 4,9 melarutkan semua CCP (Pyne dan McGann, 1960). Dalam pembuatan kasein asam, Jablonka dan Munro (1986) menganggap bahwa residu  $\text{Ca}^{2+}$  pada partikel kasein membentuk jembatan antara kelompok kasein yang bermuatan negatif (misalnya, fosfoserin), menghasilkan dadih yang lebih rapat, lebih padat dan partikel dadih yang lebih besar.

### *Rennets - Aspek Umum dan Molekuler*

Enzim proteolitik dapat diklasifikasikan berdasarkan aktivitas katalitiknya menjadi salah satu dari empat kelompok - serin, sistein, metalo dan proteinase aspartat (Kay, 1985). Chymosin (rennin; EC 3.4.23.4) adalah proteinase aspartat neonatalgastrik dan penting secara komersial dalam pembuatan keju. Itu milik keluarga proteinase aspartat yang didistribusikan secara luas di banyak organisme dan jaringan dengan sifat fisiologis dan fungsional yang berbeda (Chitpinyol dan Crabbe, 1998). Urutan nukleotida dan asam amino dan struktur tiga dimensi dari beberapa proteinase aspartat tersedia dan memberikan informasi untuk desain rekayasa protein dari keluarga

protein ini. Enzim sekarang dapat diproduksi secara rekombinan dalam berbagai sistem ekspresi dalam jumlah yang cukup untuk studi struktural dan fungsional

### *Proteinase aspartat*

Proteinase aspartat mengandung dua residu aspartil (Asp32 dan Asp215, penomoran pepsin) di situs aktif (Tang *et al.*, 1973). Mereka rentan terhadap penghambatan oleh pepstatin, pentapeptida yang diproduksi secara alami oleh strain *Streptomyces* (Umezawa *et al.*, 1970), dan pelabelan afinitas pada aspartat katalitik menggunakan diazoacetyl norleucinemethyl ester (DAN) dengan adanya ion tembaga (Rajagopalan *et al.*, 1966) atau 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propana (EPNP). Proteinase aspartat dapat ditemukan di seluruh alam mulai dari virus hingga tumbuhan tingkat tinggi dan mamalia. Mereka umumnya dibagi menjadi dua kelompok besar - enzim mirip pepsin dan retroviral. Enzim-enzim ini telah diisolasi dari lima sumber utama:

1. Perut. Beberapa jenis enzim lambung, pepsin (EC 3.4.23.1), pepsin B (EC 3.4.23.2), gastricsin (EC 3.4.23.3) dan chymosin (EC 3.4.23.4), diproduksi di mukosa abomasal sebagai prekursor tidak aktif, zimogen. Pepsin adalah proteinase yang dominan pada mamalia dewasa (Tang *et al.*, 1973). Gastricsins ditemukan di semua bagian perut mamalia, atau sel pulau pankreas, kelenjar prostat dan vesikula seminalis. Chymosin diproduksi sejak awal selama kehamilan (dalam rahim) di mukosa abomasal mamalia yang baru lahir, termasuk anak sapi (Foltmann, 1970). Produksi ini enzim bervariasi, tergantung pada usia hewan dan cara makan (Andren dan Bjorck, 1986).
2. Lisosom dari banyak jenis sel mengandung cathepsin D (Hurley *et al.*, 2000) dan cathepsin E. Cathepsin E ditemukan di mukosa lambung, timus, limpa dan sel darah (Kageyama, 1995). Cathepsin D manusia mungkin terlibat dalam degradasi protein intraseluler dan endositosis, dan merupakan indikator prognostik invasi tumor payudara. Tampaknya ada peran enzim ini selama proteolisis dalam pematangan keju, paling jelas pada keju di mana aktivitas rennetnya rendah, seperti keju Swiss, Quarg dan Feta.
3. Jaringan seperti ginjal dan kelenjar submaksilaris menghasilkan renin (Kay, 1985).
4. Tanaman, termasuk labu siam, mentimun, tomat, barley, beras, gandum, sorgum dan teratai (Doi *et al.*, 1980; Morris *et al.*, 1985; Polanowski *et al.*, 1985; Belozersky *et al.*, 1989).
5. Mikroorganisme. Beberapa proteinase aspartil disekresikan oleh jamur, termasuk *Cryphonectria parasitica* (Sardinas, 1968), *Penicillium janthinellum* (Hofmann dan Shaw,

1964), *Rhizomucor pusillus* (Arima *et al.*, 1970), *Rhizomucor miehei* (Sternberg, 1971), *Rhizopus chinensis* (Fumamoto *et al.*, 1967), *Aspergillus awamori* (Ostoslavskaya *et al.*, 1986), *Aspergillus niger* (Koaze, *et al.*, 1964) dan *Trichoderma reesei* (Pitts, 1992). Proteinase telah ditemukan dalam ragi, *Saccharomyces cerevisiae* (MacKay *et al.*, 1988), *Candida tropicalis* (Togni *et al.*, 1991) dan *Yarrowia lipolitika* (Yamada dan Ogrydziak, 1983). Thermopsin disekresikan oleh *Sulfolobus acidocaldarius*, *Archaeobacterium* termofilik (Lin dan Tang, 1990).

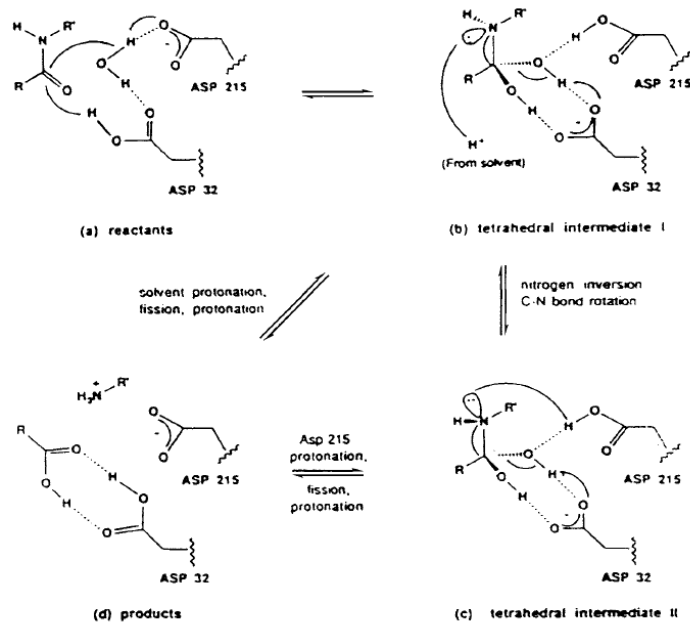
#### *Sifat Fisik Proteinase Aspartat*

Kimosin dan proteinase aspartat memiliki berat molekul dalam kisaran 32-39 kDa, dengan banyak titik isoelektrik yang sesuai dengan sejumlah isozim, degradasi otomatis, dan produk pasca-translasi (Crabbe, 2004). Glikosilasi terkait-N telah ditemukan pada beberapa proteinase seperti cathepsin D (N67 dan N183) 5. *cerevisiae* proteinase A (N67 dan N263), *rhizomucor* protease (N173) dan renin manusia (N07). Kimosin paling stabil pada nilai pH antara 5,3 dan 6,3. Namun, bahkan pada pH 2, chymosin relatif stabil (Foltmann, 1959). Di bawah kondisi asam (pH 3-4), enzim kehilangan aktivitasnya dengan cepat, mungkin disebabkan oleh autodegradasi, sedangkan pada nilai pH basa (di atas 9,8), kehilangan disebabkan oleh perubahan konformasi ireversibel (Cheeseman, 1965). Kehilangan aktivitas chymosin A lebih tinggi daripada chymosin B (Foltmann, 1966). Chymosin lebih stabil pada suhu 2°C dibandingkan pada suhu kamar (Foltmann, 1959). Kawaguchi *et al.* (1987) melaporkan hilangnya aktivitas chymosin dengan cepat ketika suhu dinaikkan dari 45 menjadi 55°C. Prochymosin lebih stabil daripada chymosin pada pH netral (Foltmann, 1966). Pada nilai pH di bawah 5,0, prokimosin diubah menjadi chymosin sedangkan pada pH di atas 11,0 stabilitas prokimosin hilang karena perubahan konformasi. Pseudochymosin stabil pada pH asam selama berhari-hari tetapi dengan cepat diubah menjadi chymosin jika pH meningkat di atas 4,5 (Barkholt *et al.*, 1979). *Rhizomucor protease*, *Cryphonectria protease* dan *S. cerevisiae* proteinase A stabil pada pH 3,5-7,0 (Sardinas, 1968; Bailey dan Siika-aho, 1988). Pepsin menunjukkan stabilitas umum yang lebih besar daripada chymosin; misalnya, setelah inkubasi dalam 6 mol/l urea pada 37°C selama 30 menit, hanya 10% dari aktivitas awal yang hilang (Cheeseman, 1965).

Proteinase aspartat yang mengandung karbohidrat lebih stabil terhadap suhu tinggi, denaturasi dan degradasi dibandingkan protein tanpa karbohidrat (Aikawa *et al.*, 1990; Berka *et al.*, 1991; Brown dan Yada, 1991). Glikosilasi protease *rhizomucor* baik dengan modifikasi kimia



atau genetik mengakibatkan hilangnya stabilitas dan peningkatan rasio aktivitas pembekuan susu terhadap aktivitas proteolytic (C/P rasio) (Brown dan Yada, 1991; Aikawa *et al.*, 1990). Kelarutan chymosin dipengaruhi oleh pH, suhu dan kekuatan ionik larutan (Foltmann, 1959). Kimosin yang tidak mengkristal larut dalam larutan yang mengandung 1 mol/l NaCl dan pada pH 5,5. Dalam larutan >2 mol/l NaCl, chymosin tampaknya tidak larut. Kimosin yang mengkristal menunjukkan kelarutan yang lebih tinggi pada 25°C daripada pada 2°C (Foltmann, 1970); namun, endapan amorf chymosin lebih stabil pada 2°C daripada pada 25°C. Pada nilai pH yang mendekati titik isoelektrik, chymosin sangat tidak larut pada kekuatan ion 0,005; kelarutannya meningkat dengan meningkatkan kekuatan ioniknya (Crabbe, 2004).



**Gambar 11 Mekanisme katalitik yang diusulkan untuk proteinase aspartate**

*Sumber: Veerapandian, et al (1990)*

### Struktur Proteinase Aspartat

DNA genom dari proteinase aspartat unggas dan mamalia, pepsinogen embrionik ayam (Hayashi *et al.*, 1988), renin manusia (Miyazaki *et al.*, 1984), kimosin sapi (Hidaka *et al.*, 1986) dan pepsinogen manusia (Sogawa *et al.*, 1983), terdiri dari sembilan ekson yang dipisahkan oleh delapan intron, dan semua titik persimpangan ekson-intron sangat kekal. Hasil ini mendukung keyakinan bahwa gen untuk enzim ini telah berevolusi dari gen nenek moyang yang sama. Sebaliknya, pada beberapa proteinase aspartat mikroba, termasuk *S. cerevisiae* (Ammerer *et al.*,

1986), *C. tropicalis* (Togni *et al.*, 1991), *R. pusillus* (Tonouchi *et al.*, 1986) dan *R. miehei* (Gray *et al.*, 1986), tidak ada intron yang ditemukan dalam gen untuk enzim ini. Namun, dalam gen untuk proteinase aspartat *R. niveus* (Horiuchi *et al.*, 1988) dan *A. awamori* (Berka *et al.*, 1991), masing-masing ditemukan satu dan tiga intron pendek, tetapi ekson-intronnya junction berada pada posisi yang berbeda dari yang ada pada gen untuk proteinase aspartat mamalia dan unggas.

Kimosin anak sapi ditemukan dalam dua bentuk utama, A dan B, chymosin B lebih melimpah. Kimosin A dan B berbeda hanya pada satu posisi asam amino: kimosin A memiliki residu aspartat pada posisi 243 (penomoran pepsin), sedangkan ini adalah residu glisin dalam kimosin B. Bentuk ketiga, kimosin C, tampaknya merupakan produk degradasi dari chymosin A yang tidak memiliki tiga residu, D244-F246 (Danley dan Geoghegan, 1988). Sangat mungkin bahwa kimosin A dan B disintesis dari alel berbeda dari gen polimorfik yang sama, bukan dari beberapa keluarga gen, karena hanya satu lokus gen kimosin yang ditemukan dari hibridisasi genom anak sapi dengan gen kimosin (Donnelly *et al.*, 1986). Urutan sekresi cenderung kaya akan asam amino hidrofobik. Ada sejumlah variabel residu sistein dalam urutannya tetapi posisinya, jika ada, dipertahankan. Oleh karena itu, ada potensi untuk dua jembatan disulfida dalam enzim *Rhizomucor* dan *Rhizopus*, jembatan disulfida tunggal dalam enzim *Cryphonectria*, *Penicillium* dan *Aspergillus*, dan tidak ada jembatan disulfida dalam proteinase aspartat Irpex (Crabbe, 2004).

Mekanisme katalitik proteinase aspartat telah dimodelkan berdasarkan analisis struktural dari beberapa kompleks penghambat proteinase aspartat. Veerapandian *et al.* (1990) telah mengusulkan model mekanistik katalitik yang diuraikan dalam Gambar 12. Hidroksil pro-R (seperti statin) dari karbonil hidrat tetrahedral terikat hidrogen pada oksigen luar D32 dan D215. Oksigen hidroksil kedua dari hidrat adalah ikatan hidrogen hanya dengan oksigen karboksil D32. Karbonil ikatan scissile diproton oleh D32 dan secara simultan diserang oleh molekul air yang terpolarisasi menjadi keadaan nukleofilik oleh D215. Gerakan kaku dalam kompleks enzim-substrat dapat mendorong distorsi ikatan amida dan memfasilitasi serangan air nukleofilik pada karbonil terpolarisasi. Jadi, dalam intermediet tetrahedral I, D31 yang bermuatan negatif distabilkan oleh ikatan hidrogen yang ekstensif (Veerapandian *et al.*, 1990).

#### *Aktivasi Zymogen dari Proteinase Aspartat*

Struktur pepsinogen babi telah disempurnakan pada resolusi tinggi (James dan Sielecki, 1986; Sielecki *et al.*, 1991; Hartsuck *et al.*, 1992). Perbandingan struktural antara pepsin dan

pepsinogen menunjukkan bahwa struktur enzim dan proenzim sangat mirip. Sebagian besar perbedaan terjadi pada kedekatan celah yang, pada pepsinogen, ditutupi dan diisi oleh pro-part (1P-44P) dan 13 residu pepsin pertama. Perpanjangan 13 residu mengadopsi konformasi yang sama sekali berbeda dalam bentuk aktif dan zymogen (James dan Sielecki, 1986). Struktur sekunder zymogen terutama terdiri dari beta-sheet, dengan perkiraan sumbu simetri 2 kali lipat (James dan Sielecki, 1986). Peptida aktivasi dikemas ke dalam celah situs aktif, dan N-terminus (2P-9P) menempati posisi N-terminus matang (2-9) sejak sepuluh asam amino pertama dari bentuk pro-part [3-untai aN pepsinogen. Oleh karena itu, perubahan setelah aktivasi termasuk eksisi peptida aktivasi dan relokasi yang tepat dari N-terminus yang matang. Pada pH netral atau basa, pro-segmen pepsin mengikat dan distabilkan di situs aktif antara dua lobus dengan interaksi elektrostatik, hidrogenbonding dan hidrofobik yang berkontribusi pada pengikatan antara pro-segmen dan sisa protein (Sielecki *et al.*, 1991). Penurunan pH memprotonasi residu asam pada bagian enzim matang dari molekul, sehingga mengganggu interaksi elektrostatik yang menguntungkan dengan residu asam amino bermuatan positif pada segmen pro. Perubahan konformasi berikutnya dari zymogen menyebabkan pembelahan proteolitik intramolekul yang membebaskan pro-segmen dari zymogen (Nielsen dan Foltmann, 1993).

Konsentrasi tinggi NaCl atau  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  meningkatkan aktivitas hidrolitik pepsin dan proteinase retroviral, selain memperluas spesifisitasnya (Kotler *et al.*, 1989; Tropea *et al.*, 1992). Proteinase aspartat memiliki kantong pengikat substrat yang diperpanjang yang dapat menampung setidaknya tujuh residu asam amino. Studi struktural rinci kompleks proteinase-inhibitor aspartat telah digunakan untuk mengidentifikasi residu asam amino di setiap subsitus (Cooper *et al.*, 1987; Foundling *et al.*, 1987; James dan Sielecki, 1987; Suguna *et al.*, 1987).

### *Aspartat Proteinase Inhibitor*

Semua proteinase aspartat dihambat oleh pepstatin, dengan mengikat gugus hidroksil statin ke dua aspartat katalitik (Marciniszyn *et al.*, 1976). Konstanta penghambatan ( $K_i$ ) pepstatin untuk chymosin yang ditentukan pada pH 6,0 dan 3,2 masing-masing adalah  $2,2 \times 10^{-7}$  mol/l dan  $3,2 \times 10^{-8}$  mol/l (Powell *et al.*, 1985). Pepsin dan cathepsin juga menunjukkan ketergantungan pH dari efek penghambatan (Baxter *et al.*, 1990), dan psuedochymosin lebih sensitif terhadap pepstatin daripada chymosin (McCaman *et al.*, 1985). Karena pepstatin relatif tidak efektif terhadap chymosin anak sapi, inhibitor analog telah dikembangkan (Powell *et al.*, 1985; Chitpinityol dan

Crabbe, 1998; De Simone, 2010). Kimosin dihambat oleh pro-bagian pepsinogen ayam (nilai  $K_i$   $8 \times 10^{-8}$  mol/l pada pH 5,6) tetapi tidak oleh pro-segmennya sendiri (Strop *et al.*, 1990).

### *Mekanisme Pembekuan Susu*

Dalam susu, protein larut utama adalah protein whey, alfa-laktalbumin dan beta-laktoglobulin. Dengan adanya chymosin, pembekuan susu terjadi dalam dua langkah terpisah. Beberapa faktor yang mempengaruhi proses pembekuan susu, termasuk pH, suhu, kekuatan ionik, konsentrasi enzim dan garam (Okigbo *et al.*, 1985; Bringe dan Kinsella, 1986). Reaksi bergantung pada pH; pada pH tinggi (6,6-6,7), waktu pembekuan dan kekentalan dadih berkurang (Okigbo *et al.*, 1985), sedangkan pada pH rendah (3-4), aktivitas hidrolitiknya tinggi dan terjadi penurunan hasil dadih. Umumnya, pembekuan susu dilakukan pada pH 6,3-6,6; hanya ketika pengasaman langsung digunakan, koagulasi rennet terjadi pada nilai pH hingga 5,6. Meningkatkan suhu di atas 30-32°C atau mengurangi pH dari 6,6 memungkinkan flokulasi pada persentase yang lebih rendah dari hidrolisis kappa-kasein (Dalglish, 1982). Namun, induksi pembentukan gel pada 35°C membutuhkan hidrolisis sekitar 65% kappa-kasein (Carlson *et al.*, 1986).

Perbedaan konstituen susu (baik protein maupun bahan kimia lainnya) serta proses pra-perlakuan dapat mempengaruhi laju tahap enzimatik primer. Waktu yang dibutuhkan untuk mengentalkan susu berkurang dengan meningkatnya konsentrasi enzim, tetapi pembentukan dan kekencangan gel tidak berubah (Bringe dan Kinsella, 1986). Aktivitas pembekuan susu juga bergantung pada sumber chymosin; misalnya, chymosin babi delapan kali lebih aktif pada susu babi daripada pada susu sapi; chymosin anak sapi hanya setengah aktif pada susu babi seperti pada susu sapi dan aktivitas chymosin domba sekitar 20% lebih tinggi pada susu sapi daripada pada susu sapi (Foltmann, 1992). Konsentrasi ion kalsium mempengaruhi pembekuan susu dengan membentuk jembatan antara misel untuk membentuk koagulum dan meminimalkan variabilitas yang timbul dari inkonsistensi dalam komposisi susu (Bringe dan Kinsella, 1986). Namun, Pyne (1955) melaporkan bahwa ion lain, seperti strontium, magnesium dan barium, dapat mempengaruhi kebutuhan  $Ca^{2+}$  untuk koagulasi. Pembekuan susu dihambat oleh anion (Bringe dan Kinsella, 1986).

### *Chymosin Betis Rekombinan*

Chymosin telah digunakan sebagai enzim pembekuan susu untuk produksi industri keju. Beberapa pengganti rennet telah digunakan, termasuk pepsin sapi (dari sapi dewasa), proteinase jamur dan enzim proteolitik lainnya. Namun, mereka memiliki tingkat aktivitas proteolitik non-spesifik yang jauh lebih besar, dan dalam beberapa kasus termostabilitas yang lebih tinggi yang menyebabkan lebih banyak degradasi protein susu menjadi peptida, yang mengarah pada penurunan hasil dan pengembangan rasa yang buruk pada beberapa jenis keju (Crabbe, 2004). Akibatnya, ada banyak upaya untuk menghasilkan chymosin dalam mikroorganisme.

Laporan pertama dari upaya untuk memproduksi chymosin di *E. coli* adalah dari Uchiyama *et al.* (1980). Upaya untuk mengekspresikan prochymosin cDNA dalam *E. coli* menyebabkan akumulasi intraseluler dari chymosin tidak aktif dalam bentuk badan inklusi (McCaman *et al.*, 1985; Kawaguchi *et al.*, 1987). Perbaikan dalam produksi chymosin rekombinan di *E. coli* telah dilakukan berturut-turut dikembangkan dengan seleksi strain inang, modifikasi plasmid dan optimalisasi kondisi budidaya (Kawaguchi *et al.*, 1987; Crabbe, 2004). Sistem ekspresi bakteri lain yang digunakan untuk memproduksi prokimosin termasuk *Lc. lactis*, *Bacillus subtilis* dan bentuk L dari *Proteus mirabilis* (Kapralek *et al.*, 1991; Parente *et al.*, 1991; Simons *et al.*, 1991).

### *Biang ragi Pemula-Aspek Umum*

Fungsi utamanya adalah untuk menghasilkan asam laktat dari laktosa selama pembuatan dan menyebabkan perubahan biokimia selama pematangan, yang membantu mengembangkan rasa khas keju yang dibuat. LAB yang terlibat disebut Kultur Primer. Organisme ini juga disebut bakteri starter karena mereka 'memulai' (memulai) produksi asam laktat. Umumnya, bakteri starter dipilih secara hati-hati dan sengaja ditambahkan ke dalam susu sebelum pembuatan keju tetapi, untuk beberapa keju di Mediterania, tidak ada starter yang ditambahkan (Parente dan Cogan, 2004). Sebaliknya, pembuat keju mengandalkan kontaminan tambahan yang ada dalam susu yang digunakan untuk membuat keju. Spesies utama yang terlibat termasuk *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Lb. helveticus* tetapi tidak semuanya digunakan di setiap jenis keju. Dua organisme pertama digunakan di sebagian besar varietas keju sedangkan yang kedua digunakan dalam keju seperti Emmental dan Parmigiano Reggiano dan keju Mozzarella, yang dipanaskan hingga suhu tinggi selama pembuatan (Parente dan Cogan, 2004). Dalam banyak keju

artisanal, terutama yang diproduksi di negara-negara Mediterania, BAL lainnya, termasuk *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Ec. faecalis*, *Ec. faecium*, *Lb. salivarius*, dan spesies *Staphylococcus* juga ditemukan. organisme tidak memiliki fungsi dalam produksi asam dan disebut Kultur Sekunder. Peran utama mereka adalah untuk menghasilkan perubahan organoleptik dan biokimia dalam atau pada keju.

Sampai saat ini, sulit untuk membedakan antara strain dari spesies yang sama tetapi munculnya teknik molekuler modern, khususnya elektroforesis gel natrium dodesil sulfat poliakrilamida (SDS-PAGE), DNA polimorfik yang diamplifikasi secara acak (RAPD) dan elektroforesis gel bidang pulsa (PFGE) telah mengubah ini secara signifikan. Banyak isolat dari kultur keju alami menunjukkan heterogenitas yang cukup besar dan teknik ini telah terbukti sangat berguna dalam menentukan berapa banyak strain yang ada (Giraffa *et al.*, 1998).

Divergensi dalam urutan DNA *Lc. lactis* subsp. *lactis* dan *Lc. lactis* subsp. *cremoris* diperkirakan antara 25 dan 30% (Godon *et al.*, 1992). *Lc. lactis* subsp. *lactis* berbeda dari *Lc. lactis* subsp. *cremoris* di 9-10 bp di urutan wilayah V1 dari gen 16S rRNA dan ini telah memungkinkan probe DNA spesifik untuk spesies yang berbeda dari lactococci dan leuconostocs untuk dirancang (Klijn *et al.*, 1991). Sebuah metode baru untuk membedakan antara *Lc. lactis* subsp. *lactis* dan *Lc. lactis* subsp. *cremoris* diusulkan oleh Nomura *et al.* (1999), yang menunjukkan bahwa *Lc. lactis* subsp. *lactis* menghasilkan asam gamma-aminobutirat dengan dekarboksilasi glutamat sementara *Lc. lactis* subsp. *cremoris* tidak. Kelly dan Ward (2002) telah melaporkan bahwa strain *Lc. lactis* subsp. *cremoris* yang memiliki fenotip *lactis* dapat diisolasi dalam jumlah rendah dari lingkungan susu dan tanaman; sebaliknya, yaitu *Lc. lactis* subsp. *lactis* dengan fenotip *cremoris* juga dapat ditemukan tetapi jarang (Parente dan Cogan, 2004).

### *Jenis Biang ragi*

Kultur starter dapat diklasifikasikan berdasarkan fungsi, suhu pertumbuhan atau komposisinya. Starter primer terlibat terutama dalam produksi asam laktat dari laktosa, yang terjadi pada awal produksi keju. Oleh karena itu, sejumlah besar sel aktif ditambahkan ke dalam susu keju. Namun, banyak dari mereka juga menghasilkan senyawa volatil, misalnya diacetyl dari sitrat, yang merupakan komponen rasa penting dari keju segar, dan CO<sub>2</sub> dari laktosa (spesies heterofermentatif) dan sitrat (spesies homofermentatif dan heterofermentatif) yang berkontribusi pada tekstur terbuka beberapa keju. keju (Parente dan Cogan, 2004). Sistem proteolitik mereka

juga terlibat dalam pengembangan rasa dan aroma dalam pematangan keju. Selain itu, dengan menurunkan pH, dengan bersaing dengan pembusuk dan mikroorganisme patogen dan dengan memproduksi senyawa antimikroba, mereka juga berkontribusi pada keamanan mikroba keju (Parente dan Cogan, 2004).

Starter primer biasanya diklasifikasikan sebagai mesofilik atau termofilik. Yang terakhir adalah karakteristik varietas keju Italia (Grana, Pecorino, Mozzarella) dan Swiss (Emmentaler, Sbrinz, Gruyere), di mana suhu tinggi ( $>37^{\circ}\text{C}$  tetapi umumnya  $48-52^{\circ}\text{C}$  berlaku selama fase awal pembuatan keju. digunakan pada semua varietas keju di mana suhu dadih selama tahap awal produksi asam tidak melebihi  $40^{\circ}\text{C}$  (Cheddar, Gouda, Edam, Camembert, dll.). Namun, perbedaan ini kehilangan maknanya, karena spesies mesofilik dan termofilik sering ditemukan (atau digunakan) bersama-sama dalam starter campuran dan tertentu untuk pembuatan keju seperti Mozzarella (Limsowtin *et al.*, 1996; Parente *et al.*, 1997) dan Cheddar (Beresford *et al.*, 2001) .

#### *Biang ragi Pemula Alami*

Kultur starter alami direproduksi setiap hari di pabrik keju dengan beberapa bentuk backslopping (yaitu, penggunaan batch lama produk fermentasi untuk menginokulasi yang baru) dan/atau dengan penerapan tekanan selektif (perlakuan panas, suhu inkubasi, suhu rendah). pH). Tidak ada tindakan pencegahan khusus yang digunakan untuk mencegah kontaminasi dari susu mentah atau dari lingkungan pembuatan keju dan kontrol media dan kondisi kultur selama reproduksi starter sangat terbatas (Parente dan Cogan, 2004). Akibatnya, bahkan di pabrik keju mana pun, starter alami terus berkembang, campuran tak terdefinisi yang terdiri dari beberapa galur dan/atau spesies BAL. Komposisi dan teknik untuk produksi starter artisanal telah ditinjau oleh Limsowtin *et al.* (1996). Kultur whey alami disiapkan dengan menginkubasi beberapa whey yang dikeringkan dari tong keju semalaman di bawah kondisi yang kurang lebih selektif. Komposisi dan keanekaragaman hayati kultur sangat bergantung pada selektivitas kondisi inkubasi (Parente dan Cogan, 2004). Dalam pembuatan keju Parmigiano Reggiano dan Grana Padano, whey dikeluarkan untuk tong keju pada akhir pembuatan keju pada  $48-52^{\circ}\text{C}$  dan diinkubasi semalaman pada suhu yang terkendali ( $45^{\circ}\text{C}$  atau dalam wadah besar di mana suhunya turun hingga  $37-40^{\circ}\text{C}$  hingga pH akhir serendah 3,3 (Limsowtin *et al.*, 1996) Kultur whey yang dihasilkan (siero-fermento, siero-innesto) didominasi oleh strain acidurik dan/atau thermophilik; *Lb. helveticus* biasanya mendominasi ( $>85\%$ ), tetapi spesies lain (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*,

*Sc. thermophilus*) mungkin ada. Variasi musiman dan geografis dalam komposisi dan kinerja kultur telah diamati. Penggunaan kultur starter alami memiliki kelebihan dan kekurangan. Mereka adalah sumber galur yang sangat berharga dengan sifat teknologi yang diinginkan (ketahanan fag, produksi antimikroba, produksi aroma), meskipun banyak galur menunjukkan kemampuan produksi asam yang terbatas ketika dibudidayakan sebagai kultur murni (Cogan *et al.*, 1997).

#### *Starter Strain Campuran (MSS)*

Ketika kultur yang tidak ditentukan diperbanyak dalam kondisi terkontrol dengan subkultur minimum, stabilitas komposisi dan kinerjanya sangat meningkat, tanpa kehilangan keunggulan toleransi terhadap infeksi fag (Stadhouders dan Leenders, 1984). Starter regangan campuran, yang diperoleh dengan pemilihan starter alami yang cermat, dipelihara, disebarkan dan didistribusikan oleh perusahaan starter dan lembaga penelitian, dan digunakan secara luas untuk produksi keju di Eropa. Strain campuran starter biasanya diklasifikasikan sebagai mesofilik atau termofilik, dengan suhu pertumbuhan optimum masing-masing 28-30°C dan 42°C (Limsowtin *et al.*, 1996). MSS mesofilik dapat diklasifikasikan lebih lanjut berdasarkan fermentasi dan komposisi sitrat, sebagai starter 'O' sitrat-negatif (yang mengandung *Cit-Lc. lactis* subsp. *lactis* dan *cremoris* penghasil asam) atau starter L, D dan DL sitrat-positif (mengandung *Leuc.mesenteroides* subsp, *cremoris*, *Cit + Lc. lactis* subsp. *lactis*, atau keduanya, selain strain penghasil asam). MSS termofilik digunakan untuk produksi varietas keju Italia dan Swiss, dan biasanya mengandung *Sc. thermophilus* sendiri atau dalam campuran dengan *lactobacilli* termofilik (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*) (Glattli, 1990).

Karena mereka berasal dari biakan yang direproduksi dalam tanaman keju tanpa perlindungan dari fag yang mengganggu, MSS mengandung banyak galur yang resisten terhadap fag tetapi juga menyimpan fag mereka sendiri (Stadhouders dan Leenders, 1984; Limsowtin *et al.*, 1996; Josephsen *et al.*, 1999; Bissonnette *et al.*, 2000). Pengembangan MSS untuk produksi keju Belanda di NIZO (Stadhouders and Leenders, 1984) dan MSS termofilik (Rohmischkulturen) untuk pembuatan varietas keju Swiss oleh Swiss Federal Dairy Research Station (Glattli, 1990) adalah dua contoh keberhasilan pengembangan dan penggunaan MSS jangka panjang (Limsowtin *et al.*, 1996).

Bahkan jika MSS memiliki sejarah panjang keberhasilan penggunaan tanpa penghambatan parah oleh fag, seseorang tidak boleh terlalu yakin bahwa infeksi fag tidak akan pernah dialami.



Studi yang dipublikasikan tentang pemantauan jangka panjang interaksi fag/starter di pabrik keju menggunakan MSS jarang terjadi. Josephsen *et al.* (1999) telah mendokumentasikan perkembangan fag virulen di sebuah pabrik yang telah menggunakan MSS yang sama hampir terus menerus sebelum masalah pengasaman lambat sesekali dialami. Isolat dari MSS yang fag homolognya terdeteksi dalam whey keju meningkat dari 16 menjadi 97% selama 11 tahun, dan virulensinya meningkat pesat (Josephsen *et al.*, 1999). Faktanya, sementara fag yang diisolasi ketika tidak ada masalah pengasaman memiliki jangkauan inang yang terbatas, waktu laten yang lama (38-52 menit) dan ukuran ledakan yang relatif rendah (35-84), fag yang diisolasi pada tahun terakhir memiliki jangkauan inang yang lebih luas (dan mampu untuk berkembang biak pada galur yang sangat resisten terhadap fag), mengurangi waktu laten (35 menit) dan sangat meningkatkan ukuran ledakan (120-200) (Parente dan Cogan, 2004).

DSS mesofilik berasal dari Selandia Baru pada tahun 1930-an, sebagai respon terhadap terjadinya cacat tekstur terbuka pada keju Cheddar yang diproduksi dengan MSS yang mengandung strain Cit+. Sejarah sistem DSS mesofilik di Selandia Baru, Australia, Amerika Serikat dan Irlandia telah ditinjau oleh Limsowtin *et al.* (1996). Karena rasio regangan dan/atau spesies dalam DSS ditentukan, kinerja teknologinya sangat dapat direproduksi. Ini jelas merupakan properti yang sangat diinginkan di pabrik keju modern dengan produksi susu yang besar dan jadwal produksi yang ketat. Karena hanya sejumlah strain yang digunakan (umumnya 2-6), infeksi fag mungkin memiliki konsekuensi yang merusak pada aktivitas starter (Parente dan Cogan, 2004).

DSS termofilik juga tersedia secara komersial untuk produksi berbagai jenis keju Italia dan Swiss. Starter terdiri dari strain tunggal atau ganda *Sc. thermophilus* masih lebih disukai di Italia untuk produksi keju Mozzarella dengan kelembapan tinggi, tetapi asosiasi *Sc. thermophilus* dan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (batang: kultur starter kokus) digunakan untuk pembuatan keju Mozzarella dengan kelembapan rendah (Kinstedt, 1993; Oberg dan Broadbent, 1993). Penggunaan *Lb. helveticus* menggantikan *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* telah diklaim memiliki beberapa keuntungan (Oberg *et al.*, 1991) seperti pengurangan waktu pembuatan dan peningkatan sifat fungsional. Mekanisme resistensi fag tampaknya kurang tersebar luas di antara kultur starter termofilik daripada di lactococci (Coffey dan Ross, 2002). Menurut Moineau, (1999), karena kisaran inang *Sc* yang relatif sempit. *thermophilus* phage, penggunaan rotasi dan BIMs masih diandalkan untuk mengendalikan infeksi phage pada kultur starter thermophilic.

## *Metabolisme Kultur Pemula*

### *Metabolisme Gula*

Laktosa adalah gula utama dalam susu dan pengangkutannya, metabolisme dan regulasinya dalam beberapa kultur starter yang berbeda telah ditinjau (Poolman, 1993, 2002) dan tidak akan ditinjau lebih lanjut di sini. Penerapan NMR sangat berguna dalam memahami fluks melalui jalur yang berbeda selama pertumbuhan dan dalam memahami regulasi berbagai aspek metabolisme di BAL dan literatur telah ditinjau oleh Ramos *et al.* (2002). NMR juga berguna dalam memahami produksi eksopolisakarida (EPS). Dalam kasus metabolisme glukosa, hasil telah menunjukkan bahwa tingkat konsumsi fruktosa-1,6-bisfosfat dan besarnya potensi PEP ( $\sim$ PGA + PEP) jauh lebih tinggi ketika *Lc. lactis* tumbuh di bawah aerobik daripada di bawah kondisi anaerobik, menyiratkan bahwa aktivitas NADH oksidase adalah penting (Parente dan Cogan, 2004).

### *Metabolisme Sitrat*

Sitrat hadir pada konsentrasi rendah dalam susu dan dimetabolisme oleh *Leuconostoc* subsp, dan beberapa strain *Lc. lactis* subsp. *lactis* ke CO<sub>2</sub>, yang bertanggung jawab untuk pembentukan mata di beberapa keju, dan diacetyl dan asetat, yang merupakan komponen rasa penting dalam susu fermentasi. Organisme yang terakhir disebut *Sc. diacetylactis* dalam literatur lama dan baru-baru ini *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Fox, 2000). Nama ini tidak memiliki status taksonomi dan cara yang benar untuk merujuknya adalah pemanfaatan sitrat (Cit +) *Lc. lactis* subsp, *lactis*. Cit + strain *Lc. lactis* berbeda dari strain noncitrate-utilizing (Cit-) yang lebih normal dalam mengandung plasmid yang mengkode transport sitrat (Parente dan Cogan, 2004). Metabolisme sitrat di BAL telah ditinjau oleh Hugenholtz (1993). Dalam beberapa tahun terakhir, banyak upaya telah dicurahkan untuk memahami energetika transportasi sitrat di *Leuc. mesenteroides* dan *Lc. lactis* (Garcia-Quintans *et al.*, 1989; Marty-Teyssset *et al.*, 1996; Magni *et al.*, 1999). Dengan tidak adanya sumber karbon lain, *Lc. mesenteroides* dan *Lc. lactis* mengangkut sitrat dalam persamaan dengan proton, yang mengarah pada pembangkitan ApH atau gaya gerak proton. Dengan adanya D-laktat dan glukosa, sitrat diangkut oleh sistem antiport dengan laktat yang diekstrusi; dalam hal ini, metabolisme sitrat juga lebih cepat. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa pertukaran antara sitrat dan laktat jauh lebih cepat daripada sistem symport sitrat/H<sup>+</sup>. Karena D-laktat adalah produk metabolisme gula, pengangkut yang beroperasi di bawah kondisi fisiologis mungkin adalah untuk sitrat/laktat. Pertukaran sitrat/D-laktat elektrogenik terjadi,

menghasilkan gradien elektrokimia proton melintasi membran (Parente dan Cogan, 2004). Ini dapat berkontribusi secara signifikan terhadap peningkatan pertumbuhan *Leuc. mesenterica* selama co-metabolisme glukosa dan sitrat.

Co-metabolisme glukosa dan sitrat oleh *Leuconostoc* subsp, menghasilkan tingkat pertumbuhan yang lebih cepat. Ini telah dikaitkan dengan pergeseran metabolisme dalam jalur glukosa, yang mengarah ke peningkatan produksi ATP (Cogan, 1987). Hasil dari Marty-Teyssset *et al.* (1996) menyatakan bahwa pertukaran sitrat/D-laktat juga terlibat dalam produksi energi. Di *Lc. lactis*, co-metabolisme sitrat dan gula tidak menghasilkan efek besar pada laju pertumbuhan pada pH netral. Namun, pada nilai pH asam (4,5), sistem transportasi sitrat diinduksi. Metabolisme sitrat menghasilkan peningkatan pH ke nilai di mana konsumsi glukosa dimulai (Garcia-Quintans *et al.*, 1989). Baru-baru ini, telah disarankan (Magni *et al.*, 1999) bahwa induksi jalur metabolisme sitrat dalam kondisi asam membuat sel lebih tahan terhadap efek penghambatan laktat.

### *Metabolisme Nitrogen*

Metabolisme nitrogen oleh starter memiliki dampak besar pada aktivitas mereka dan kualitas keju. Untuk menjalankan fungsi utama produksi asam dalam susu dan dadih, BAL harus tumbuh hingga jumlah yang tinggi, dari  $\sim 1 \times 10^6$  cfu/ml dalam susu yang diinokulasi hingga  $\sim 1 \times 10^9$  cfu/g dalam dadih keju; sineresis dadih karena pengusiran whey juga berkontribusi pada peningkatan jumlah sel. Bakteri asam laktat adalah mikroorganisme rewel dan tidak mampu mensintesis banyak asam amino, vitamin dan basa asam nukleat. Tergantung pada spesies dan strainnya, BAL membutuhkan 6 sampai 14 asam amino yang berbeda (Chopin 1993; Kunji *et al.*, 1996). Meskipun susu kaya akan nitrogen, ia hadir terutama sebagai protein. Telah dihitung bahwa jumlah asam amino bebas dan peptida dengan berat molekul rendah yang ada dalam susu hanya dapat mendukung pertumbuhan terbatas (10-20% dari biomassa akhir kultur lactococci yang tumbuh penuh; Thomas dan Pritchard, 1987).

Oleh karena itu, pertumbuhan lebih lanjut memerlukan hidrolisis protein susu. Faktanya, pertumbuhan banyak BAL bersifat diauxic dalam susu; tingkat pertumbuhan cepat awal, di mana asam amino bebas dan peptida digunakan, diikuti oleh tingkat yang sedikit lebih lambat di mana peptida dan asam amino lebih lanjut diperoleh dengan hidrolisis kasein. Proteolisis adalah peristiwa besar dalam pematangan keju; sistem proteolitik starter primer dan mikroflora sekunder menyumbang produksi ratusan senyawa rasa melalui produksi peptida dan asam amino dengan

berat molekul rendah dan katabolisme selanjutnya. Peran proteolisis dan katabolisme asam amino dalam keju telah dibahas oleh beberapa ulasan baru-baru ini (Yvon dan Rijnen, 2001; Mansour *et al.*, 2008)

Starter laktat mendegradasi kasein dan peptida besar yang diturunkan dari kasein yang diproduksi oleh susu dan enzim koagulan oleh proteinase selubung (CEE lactocepin, EC 3.4.21.96, juga disebut proteinase yang terikat pada dinding sel; Kunji *et al.*, 1996; Siezen, 1999 ). Semua CEP dari LAB yang dijelaskan hingga saat ini adalah serin-proteinase yang terkait dengan subtilisin. CEP dari *Lc. lactis* (Prtp) adalah yang paling luas dicirikan. Gen proteinase (prtP), yang mungkin terletak pada plasmid atau pada kromosom, mengkode protein asam amino 1902 (*Lc. lactis* WG2 dan NCDO763) atau 1962 (*Lc. lactis* SK11); ukuran yang lebih besar adalah karena duplikasi dekat C-terminus (Parente dan Cogan, 2004).

CEP lebih lanjut telah dikarakterisasi dalam termofilik (*Lb. helveticus*, PrtH; *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, PrtB) dan *Lactobacillus* mesofilik (*Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*). Mereka semua milik keluarga subtilase dan berbagi banyak properti dengan Prtp lactococcal, meskipun kekhususan dan struktur domain mungkin berbeda (Parente dan Cogan, 2004). Domain katalitik Prtp, PrtB dan PrtH menunjukkan derajat homologi yang lebih tinggi dibandingkan domain lainnya. Pelepasan CEP laktobasilus termofilik ke dalam media membutuhkan perawatan drastis (lisozim, syok osmotik, pelarutan membran); meskipun mereka tidak memiliki domain AN, domain W sangat mendasar dan dapat berikatan dengan dinding sel melalui interaksi elektrostatik (Rodriguez *et al.*, 2009).

Degradasi asam amino memiliki implikasi penting untuk metabolisme kultur starter (misalnya, dengan menyediakan energi di lingkungan keju yang kekurangan gula), untuk keamanan keju (misalnya, dengan produksi amina biogenik melalui dekarboksilasi Tyr, His, Trp ), dan untuk produksi senyawa rasa dan aroma (Pierro *et al.*, 2010). Pemecahan para-kasein menjadi asam amino dan peptida oleh kombinasi chymosin dan proteinase dan/atau peptidase dari bakteri starter umumnya dianggap sebagai aspek terpenting dari pematangan keju (Parente dan Cogan, 2004).

#### *Metabolisme lainnya*

Kecuali untuk Parmigiano Reggiano, Pecorino dan keju Italia terkait, dan keju Biru, lipolisis terbatas terjadi pada keju selama pematangan (Hickey *et al.*, 2007; Voigt *et al.*, 2010).

Namun demikian, tingkat terbatas, yang memang terjadi, dianggap penting untuk rasa dan persepsi rasa. Esterase telah dimurnikan dari beberapa starter dan BAL, termasuk *Lc. lactis* (Holland dan Coolbear, 1996; Chich *et al.*, 1997), *Sc. thermophilus* (Liu *et al.*, 2001) dan *Lb. plantarum* (Gobbetti *et al.*, 1997). Semuanya adalah enzim serin yang secara istimewa menghidrolisis ester butirat dan aktif secara optimal pada pH 7. Beberapa dari mereka tidak memiliki aktivitas pada pH 5.0; namun, sejumlah kecil aktivitas dalam waktu lama dapat mengakibatkan hidrolisis lemak yang signifikan selama pematangan keju. Tributirin esterase utama dari *Lc. lactis* telah dikloning, diekspresikan secara berlebihan dan dikarakterisasi (Fernandez *et al.*, 2000). Enzim yang dimurnikan menunjukkan preferensi untuk ester asil rantai pendek dan juga fosfolipid, menunjukkan bahwa itu mungkin terlibat dalam metabolisme fosfolipid *in vivo* (Dherbécourt *et al.*, 2008).

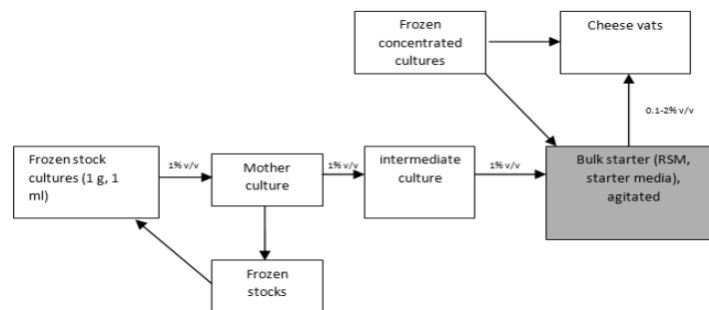
### *Persiapan Pemula*

Starter laktat harus melakukan salah satu fungsi teknologinya (produksi asam) di awal pembuatan keju dan kultur aktif metabolik dalam jumlah yang cukup harus digunakan untuk menginokulasi susu keju. Biasanya, populasi awal starter dalam susu keju adalah sekitar  $1-5 \times 10^6$  cfu/ml pada inokulasi dan mencapai  $1-10 \times 10^8$  cfu/ml ketika dadih dipindahkan ke cetakan, biasanya 5-6 jam kemudian dalam kasus ini. dari keju Cheddar. Pada kebanyakan keju, selama waktu ini, pH harus turun dari ~6,6 menjadi <5,5; sel-sel yang tidak sepenuhnya aktif atau stres sub-mematikan pada inokulasi akan menunjukkan pertumbuhan yang lebih lambat dan akibatnya produksi asam lebih lambat, sehingga meningkatkan waktu pembuatan keju. Kecuali starter alami, sebagian besar pabrik keju menggunakan kultur yang disediakan dalam salah satu dari beberapa bentuk (cair, beku, kering beku) oleh industri khusus. Pendekatan tradisional untuk pembuatan kultur starter untuk inokulasi susu keju, yang memerlukan sejumlah langkah dari volume kecil (1 ml atau g) kultur stok hingga volume besar (100-1000 l) starter massal, masih digunakan (Parente dan Cogan, 2004). Namun, hal itu digantikan oleh penggunaan kultur beku atau beku-kering untuk inokulasi langsung susu starter curah atau susu keju secara langsung, terutama di pabrik pembuat keju kecil. Contoh produksi kultur starter laktat di pabrik keju dapat dilihat pada Gambar 12.

### *Perbanyakkan Biang Ragi Pemula*

Produksi biang ragi starter memerlukan pemilihan media dan kondisi operasi yang cermat untuk mendapatkan hasil optimal dalam hal jumlah sel akhir, aktivitas (pertumbuhan cepat, fase lag berkurang, produksi asam yang sesuai, produksi aroma, kemampuan proteolitik), stabilitas pada penyimpanan dan, dalam kultur campuran, komposisi starter. Ini, pada gilirannya, dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk adanya fag yang mengganggu, komposisi media dan kondisi fermentasi (antara lain perlakuan panas, kontrol suhu dan pH selama fermentasi, durasi inkubasi, suhu penyimpanan).

Meskipun susu keju adalah media tradisional untuk pertumbuhan starter di pabrik keju, telah digantikan oleh susu skim (RSM) bebas antibiotik yang telah diuji sebelumnya dan dengan media starter yang dirancang khusus, tersedia dari perusahaan kultur starter (Parente dan Cogan, 2004). Ketersediaan RSM yang telah diuji sebelumnya memungkinkan kontrol pertumbuhan yang lebih baik sebelum inokulasi susu dalam tong keju. Ini dapat dilarutkan ke tingkat padat yang lebih tinggi daripada susu segar, sehingga meningkatkan kapasitas buffer dan oleh karena itu pertumbuhan dan aktivitas kultur. Menggandakan konsentrasi padatan dalam RSM dari 8 menjadi 16% biasanya menghasilkan penggandaan jumlah sel yang layak (dari  $5-7 \times 10^8$  menjadi  $10-14 \times 10^8$  cfu/ml) dengan pH akhir yang lebih tinggi (dari 4,5 menjadi 4,7). Hasil serupa dapat diperoleh dengan meningkatkan padatan susu dengan ultrafiltrasi (Karlsson *et al.*, 2007).



**Gambar 12 Diagram langkah-langkah produksi starter laktat**

*Sumber: Parente dan Cogan (2004)*

Kontrol pH penting untuk membangun biomassa starter, mencegah stres asam dan hilangnya aktivitas, dan mengendalikan rasio spesies dan strain dalam biang ragi campuran (Oberg dan Broadbent, 1993; Whitehead *et al.*, 1993; Sandine, 1996). Sementara lactobacilli dan leuconostocs relatif tahan asam, kokus mesofilik dan termofilik dengan cepat dihambat ketika pH turun di bawah 5,5. Oleh karena itu, rasio batang:kokus starter termofilik dapat dipengaruhi secara

signifikan oleh pH dan pH selama inkubasi, kontrol pH juga memungkinkan konsumsi lengkap sumber karbohidrat dan retensi viabilitas selama penyimpanan dingin yang berkepanjangan dari kultur dewasa (Sandine, 1996). ).

Namun, kontrol pH internal tidak cocok jika pH kultur harus dipertahankan pada nilai yang tetap, tangki starter curah terkontrol pH, dilengkapi dengan elektroda yang dapat disterilkan untuk pengukuran pH dan kontrol komputer dengan penambahan alkali otomatis untuk mengontrol pH pada suhu yang diinginkan. set point sekarang sudah tersedia. Penetral yang paling umum digunakan dalam kontrol pH eksternal adalah KOH, NH<sub>4</sub>OH dan gas amonia. NaOH dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lebih murah tetapi beberapa starter dapat dihambat oleh konsentrasi Na<sup>+</sup> yang tinggi (Parente dan Cogan, 2004). Faktor proses lain yang mempengaruhi pertumbuhan dan kinerja starter adalah perlakuan panas media pertumbuhan, dan suhu serta lama inkubasi (Sandine, 1996). Kombinasi waktu/suhu yang digunakan selama perlakuan panas jauh lebih tinggi (biasanya 80-90°C selama 10-30 menit; suhu yang lebih tinggi dapat digunakan dalam produksi komersial starter termofilik) Dibandingkan pasteurisasi komersial (72°C pada 16 detik). Kondisi seperti itu secara drastis mengurangi mikroflora dalam medium, memastikan penghancuran fag, yang tahan terhadap pasteurisasi, dan mengurangi potensi redoks, mengusir oksigen dan mendenaturasi protein, sehingga meningkatkan pertumbuhan starter (Oberg dan Broadbent, 1993). Suhu inkubasi dapat sangat mempengaruhi komposisi starter dalam kultur campuran. Inkubasi pada 18--21°C biasanya lebih disukai untuk kultur laktokokus dan leukonostok, karena kedua organisme memiliki laju pertumbuhan yang kira-kira sama dalam kisaran suhu ini, sementara laktokokus tumbuh lebih cepat pada 30°C Untuk kultur batang termofilik:kokus, kompromi (42°C harus ditemukan antara suhu optimum *Sc. thermophilus* yang cukup termofilik (37-39°C dan suhu termofilik *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Lb. helveticus* (45°C meskipun simbiosis antara komponen kultur dapat mengatasi masalah yang ditimbulkan). dengan pertumbuhan pada suhu sub-optimal (Oberg dan Broadbent, 1993) Kultur mesofilik aktif mencapai fase diam dalam media susu dalam 6-8 jam pada 30°C dan dalam 16-18 jam pada 18-2°C kombinasi terakhir jelas lebih cocok untuk inkubasi semalaman Kultur termofilik dapat mencapai fase diam dalam 6-8 jam pada 37°C (Parente dan Cogan, 2004).

### *Pelestarian Distribusi Biang Ragi Pemula*

Sementara kultur stok biasanya disimpan di pabrik keju hanya untuk waktu yang terbatas, produksi dan distribusi kultur starter secara komersial memerlukan sarana yang sesuai untuk pengawetan dan distribusi kultur dalam keadaan sangat aktif. Kultur dapat diawetkan dengan berbagai cara (pendinginan kultur cair, pengeringan, pembekuan, pengeringan beku) yang memaparkan kultur ke berbagai tekanan sub-letal dan mematikan (van de Guchte *et al.*, 2002) yang secara negatif mempengaruhi vitalitas dan aktivitas (dengan merusak sel secara sub-mematikan, dengan membunuh secara selektif beberapa komponen kultur sehingga mengubah komposisi kultur). Sel-sel yang stres sub-mematikan membutuhkan fase jeda yang lebih lama untuk pulih, yang diterjemahkan menjadi kebutuhan akan resusitasi yang lebih lama (Parente dan Cogan, 2004). Secara historis, kultur telah diproduksi dan didistribusikan dalam bentuk cair, dalam bentuk kering udara (spray dry), sebagai kultur beku dan kultur beku-kering. Dua cara pengawetan yang terakhir digunakan paling luas di industri pemula saat ini. Pendinginan kultur cair adalah metode pengawetan dan distribusi kultur tertua.  $\text{CaCO}_3$  biasanya ditambahkan ke dalam susu untuk mempertahankan pH tinggi dan biakan disimpan pada suhu rendah 2-5°C Stabilitas tidak melebihi 1 atau 2 minggu dan diperlukan beberapa kali pemindahan untuk mendapatkan biakan aktif (Sandine, 1996; Parente dan Cogan, 2004).

Pembekuan pada suhu yang sangat rendah (-80°C sampai -196°C) dengan adanya agen cryoprotective adalah cara terbaik untuk melestarikan vitalitas dan aktivitas bakteri, dan pembekuan merupakan langkah awal dalam produksi kultur beku-kering. Beberapa faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup BAL selama pembekuan dan aktivitasnya setelah pencairan, misalnya spesies, strain, komposisi media pertumbuhan, kondisi kultur, fase pertumbuhan, komposisi media yang digunakan untuk menanggulangi sel selama pembekuan, jenis dan konsentrasi agen krioprotektif, suhu dan laju pembekuan, suhu penyimpanan, suhu dan laju pencairan (Sandine, 1996). Kokus mesofilik dan termofilik lebih tahan daripada laktobasilus termofilik dan leuconostocs; oleh karena itu, perawatan harus dilakukan dalam pembekuan kultur campuran untuk menjaga keseimbangan regangan yang benar (Parente dan Cogan, 2004). Sementara menghilangkan air pada suhu sekitar merugikan kelangsungan hidup dan aktivitas kultur starter, pengeringan beku, yaitu, menghilangkan air dari kultur beku dengan sublimasi di bawah vakum tinggi, menghasilkan tingkat kelangsungan hidup yang tinggi. Pengeringan beku telah digunakan untuk persiapan starter susu selama sekitar satu abad (Sandine, 1996). Stok beku-



kering yang mengandung  $10^8$ - $10^9$  cfu/g dikirim ke pabrik keju dalam vial, botol serum atau kantong yang berisi beberapa gram bubuk dan memerlukan beberapa transfer untuk reaktivasi penuh.

Kultur beku dan beku-kering konvensional tidak mengandung sel yang cukup untuk inokulasi tangki starter massal atau susu keju dan oleh karena itu beberapa transfer diperlukan untuk membangun inokulum yang cukup untuk starter massal. Starter pekat beku dan kering beku, biasanya mengandung  $10^{10}$  -  $10^{11}$  cfu/g dan  $10^{11}$ - $10^{12}$  cfu/g, masing-masing, untuk inokulasi starter curah (juga dikenal sebagai set curah) atau susu keju (kultur langsung ke tong). Biang ragi set tong langsung) sekarang tersedia dari perusahaan pemula (Miao *et al.*, 2008).

Konsentrat beku sebagian dicairkan dengan memasukkan wadah ke dalam air terklorinasi (25-50 mg/kg) pada suhu kamar selama 20 menit sebelum menambahkannya ke susu, di mana pencairan selesai dalam 15-30 menit. Starter beku-kering dapat ditambahkan langsung ke tangki starter massal atau tong keju, meskipun rehidrasi dalam volume kecil susu disarankan untuk meningkatkan distribusi. Karena aktivitasnya yang tinggi, kultur konsentrat beku untuk inokulasi tong langsung tidak secara signifikan meningkatkan waktu pembuatan keju, dan digunakan secara luas di AS dan Australia. Di sisi lain, kerusakan sub-letal yang disebabkan oleh pengeringan beku dapat meningkatkan waktu pembuatan keju 0,5-1 jam (Sandine, 1996); namun, kerugian ini mungkin diimbangi oleh fakta bahwa pengiriman dan penanganan starter beku-kering sangat disederhanakan, dan konsentrat beku-kering lebih banyak digunakan di Eropa.

Pengawetan kultur asam laktat dengan pengeringan semprot telah dipelajari secara luas sebagai proses industri alternatif untuk pengawetan kultur starter asam laktat karena biaya tinggi dan konsumsi energi pembekuan dan pengeringan beku. Seperti pada tahun 2004, perhatian khusus telah diberikan pada faktor-faktor yang mempengaruhi viabilitas sel termasuk toleransi intrinsik kultur, media dan kondisi pertumbuhan, induksi stres, kondisi pemanenan sel, agen pelindung, kondisi rehidrasi, kondisi pengemasan dan penyimpanan (Peighambardoust *et al.*, 2011).

### *Bakteriofag dalam Biang Ragi Pemula*

Bakteriofag berhubungan dengan sebagian besar spesies bakteri dan oleh karena itu ada di mana-mana di lingkungan di mana inang bakteri mereka ditemui. Bakteriofag yang menginfeksi *Lactococcus* pertama kali diidentifikasi oleh Whitehead dan Cox (1935) dan sejak itu dikenal sebagai penyebab utama gangguan pada fermentasi susu. Dalam industri susu modern, gangguan

fermentasi asam laktat oleh bakteriofag dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang serius. Meskipun kemajuan teknologi dalam proses fermentasi dalam hubungannya dengan rezim sanitasi yang ketat mungkin telah mengurangi kejadian infeksi bakteriofag, hal itu tentu tidak menghilangkannya. Masalah infeksi bakteriofag yang persisten telah memfokuskan penelitian pada pengembangan strain starter yang resisten terhadap fag (Parente dan Cogan, 2004). Penelitian awalnya terkonsentrasi pada fag yang menginfeksi *Lactococcus* spp., tetapi baru-baru ini minat telah meluas ke fag BAL lainnya, seperti yang menginfeksi *Lactobacillus* spp. dan *Sc. thermophilus* (McGrath *et al.*, 2004). Munculnya alat penelitian biologi molekuler, seperti pengurutan DNA otomatis dan bioinformatika, telah memungkinkan penentuan urutan lengkap dari jumlah genom bakteriofag LAB yang masih terus bertambah.

Klasifikasi fag BAL berdasarkan homologi DNA akan mengevaluasi seluruh genom fag yang bertentangan dengan bagian tertentu, yang dapat mengkodekan, misalnya, gen struktural. Berdasarkan studi hibridisasi DNA:DNA, dua belas spesies fag laktokokus yang berbeda secara genetik telah ditentukan (Jarvis *et al.*, 1991).

### *Sumber Kontaminasi*

Fag dapat berasal dari berbagai sumber. Sangat penting untuk mengetahui sumber potensial fag untuk membatasi masuknya fag ke dalam fasilitas manufaktur, yang dapat merusak proses fermentasi. Setiap bahan alami mentah yang masuk ke fasilitas fermentasi mungkin mengandung fag, meskipun pada tingkat yang rendah. Misalnya, susu mentah, yang merupakan ceruk ekologis untuk beberapa BAL, diketahui mengandung fag (Moineau dan Levesque, 2005). Karena susu dikumpulkan dari peternakan yang berbeda, keanekaragaman hayati fag diperkuat dalam silo susu. Karena fag dapat dengan mudah menyebar dalam media cair seperti susu dan karena fag juga dapat berdifusi dalam media seperti gel, hanya beberapa sel sensitif yang diperlukan untuk meningkatkan kadar fag secara cepat dalam lingkungan tertentu (Muller-Merbach *et al.*, 2007). Menggunakan metode PCR multipleks, fag laktokokus dan streptokokus telah terdeteksi pada 37% sampel susu yang digunakan untuk produksi yogurt di Spanyol (del Rio *et al.*, 2007), sedangkan pendekatan mikrobiologis menunjukkan bahwa 9% sampel susu dari berbagai wilayah geografis di Spanyol mengandung fag *L. lactis* (Madera *et al.*, 2004). Angka-angka ini bisa lebih tinggi dalam sampel whey atau produk akhir karena fag dapat menyebar selama sebagian besar proses fermentasi

(Madera *et al.*, 2004). Titer setinggi  $10^9$  CFU per ml whey keju telah dilaporkan (Atamer *et al.*, 2009).

Industri fermentasi susu dapat menggunakan kembali protein whey untuk meningkatkan rasa atau tekstur produk akhir, untuk meningkatkan nilai gizinya (Fox, 2000), untuk menstandarisasi susu sebelum proses fermentasi atau untuk meningkatkan hasil (Hinrich, 2004). Pada konsentrasi whey atau protein susu, fag dapat tetap berada dalam konsentrat protein whey (cair atau kering) dan mencemari produk yang ditamhkannya (Chopin, 1980).

Salah satu sumber fag yang dirasakan adalah kultur starter itu sendiri. Ketika fag sedang memasuki suatu strain, ia dapat memulai siklus litik atau genomnya dapat berintegrasi ke dalam kromosom bakteri dan mengikuti multiplikasi bakteri. Ketika bakteri membawa profag seperti itu, selnya disebut lisogen. Stres bakteri yang berbeda seperti panas, garam, antimikroba, kelaparan atau UV dapat menginduksi profag dan memicu siklus litik (Lunde *et al.*, 2005; Madera *et al.*, 2009). Dengan demikian, penggunaan strain lisogenik dalam kultur starter dapat menyebabkan lisis sel selama fermentasi. Induksi juga dapat terjadi secara alami dan dapat mencapai frekuensi hingga 9% (Madera *et al.*, 2009). Prophages dibawa oleh banyak strain BAL (Durmaz *et al.*, 2008) dan seringkali lebih dari satu profage ditemukan dalam genom. Analisis terbaru mengungkapkan bahwa 25 dari 30 komersial, koleksi atau susu yang diisolasi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* dan *Lactobacillus rhamnosus* ditemukan membawa profag yang dapat diinduksi (Mercanti *et al.*, 2011).

Baru-baru ini, keberadaan fag lactococcal di udara di pabrik keju diselidiki karena jarang didokumentasikan (Neve *et al.*, 2003). Tingkat fag udara yang tinggi di lingkungan dapat berarti bahwa perbanyakan fag telah terjadi sebelumnya atau kemungkinan masalah fag akan terjadi. Jumlah besar susu yang diproses setiap hari di tong keju terbuka, serta pemrosesan whey, pasti menyebabkan percikan cairan dan aerosolisasi fag (Moineau dan Levesque, 2005). Virus bakteri ini juga dapat menjadi aerosol oleh perpindahan udara di sekitar permukaan cairan yang terkontaminasi dan diangkut ke tempat lain di pabrik (Garneau dan Moineau, 2011).

### *Pengendalian Bakteriofag di Pabrik Susu*

Sejak fag laktokokus pertama kali diidentifikasi, sejumlah strategi untuk mengurangi dampaknya dalam fermentasi susu telah dikembangkan. Pabrik susu modern dirancang khusus untuk mengurangi kejadian infeksi fag. Area persiapan kultur starter umumnya terpisah secara

fisik dari area produksi, dengan akses terbatas untuk menghindari kontaminasi silang oleh personel. Pemeliharaan sedikit tekanan positif di ruang starter juga mengurangi risiko kontaminasi dengan fag dari lingkungan pabrik. Tindakan lebih lanjut meliputi pemanasan media starter curah ( $\geq 90^{\circ}\text{C}$  selama minimal 20 menit) dan penyaringan udara pendingin menggunakan filter udara partikulat efisiensi tinggi (HEPA). Tong fermentasi tertutup telah diperkenalkan dan peralatan yang bersentuhan dengan susu disanitasi baik dengan mengukus atau dengan desinfeksi dingin dengan klorin dan asam perasetat (Cogan dan Hill, 1994; Limsowtin *et al.*, 1996; Stanley, 1998). Secara tradisional, persiapan starter massal melibatkan beberapa langkah peningkatan dari kultur induk melalui kultur perantara hingga starter massal akhir. Proses ini bisa memakan waktu dan mungkin memberi kesempatan bagi fag yang bermasalah untuk berkembang biak. Temuan bahwa sebagian besar fag *Lactococcus* memiliki ketergantungan mutlak pada ion kalsium untuk keberhasilan infeksi (Reiter, 1956) telah memfasilitasi pengembangan media penghambat fag, yang menggabungkan agen pengkelat  $\text{Ca}^{2+}$ , seperti fosfat atau sitrat. Berbagai langkah lain dapat diambil untuk meminimalkan risiko infeksi fag dan telah ditinjau di tempat lain (Cogan dan Hill, 1994; Limsowtin *et al.*, 1996; Stanley, 1998). Proses persiapan starter massal dapat dielakkan melalui penggunaan kultur pekat beku atau beku-kering yang tersedia secara komersial. Berbagai jenis tersedia dan dapat digunakan baik untuk menginokulasi starter curah atau susu dalam tong keju secara langsung (pengaturan langsung) (Limsowtin *et al.*, 1996).

#### *Sistem Resistensi Bakteriofag Alami di LAB*

Sejak bakteriofag pertama kali diidentifikasi sebagai penyebab utama kegagalan fermentasi susu, banyak upaya penelitian telah diarahkan pada pengembangan sistem fageresistensi untuk digunakan dalam industri susu. Sebagian besar penelitian ini hingga saat ini berfokus pada galur laktokokus, meskipun baru-baru ini, upaya juga telah dilakukan dengan *Sc. thermophilus* (Moineau, 1999; Coffey dan Ross, 2002). Sistem fageresistensi yang terjadi secara alami telah diidentifikasi pada galur *Lactococcus* tipe liar. Sistem ini sering dikodekan pada plasmid konjugatif asli, yang telah memfasilitasi generasi strain starter resisten baru melalui teknik transfer gen food grade. Sistem resistensi ini telah dibagi menjadi empat kelompok utama berdasarkan cara kerjanya: (1) penghambatan adsorpsi fag, (2) penyumbatan injeksi DNA fag, (3) restriksi/modifikasi dan (4) infeksi yang gagal. (Coffey dan Ross, 2002; Deveau *et al.*, 2008; Garneau dan Moineau, 2011).

Sistem penghambatan adsorpsi berkode plasmid asli telah diidentifikasi dalam lactococci dan telah ditemukan bahwa sistem ini dapat dipisahkan berdasarkan mekanisme molekuler yang digunakan. Plasmid ini umumnya mengarahkan sintesis antigen permukaan sel atau memediasi produksi polisakarida ekstraseluler yang melindungi reseptor fag inang terhadap perlekatan fag (Valyasevi *et al.*, 1990, 1994; Schafer *et al.*, 1991; Forde *et al.*, 1999).

Garvey *et al.* (1996) adalah yang pertama melaporkan identifikasi mekanisme pemblokiran injeksi yang disandikan plasmid. Mereka menunjukkan bahwa plasmid pNP40 *Lactococcus* yang terjadi secara alami memberikan mekanisme resistensi kerja awal terhadap bc2. Setelah infeksi dengan bc2, tidak ada perbedaan dalam adsorpsi fag yang dicatat; namun, 90% sel yang menyimpan pNP40 tetap hidup sedangkan galur kontrol tanpa pNP40 pada dasarnya tidak menunjukkan kelangsungan hidup. Lebih lanjut, mekanisme resistensi ini dapat dielakkan dengan elektroporasi DNA fag ke dalam sel inang yang resisten, di mana sel yang ditransfeksi tersebut melepaskan fag keturunan.

Sistem restriksi/Modifikasi harus menunjukkan dua aktivitas enzimatik, yaitu restriksi endonuklease dan metilase, dan juga harus mampu menemukan urutan pengenalan DNA-nya (McGrath *et al.*, 2004). Metilase memodifikasi situs pengenalan pada DNA inang, sehingga melindunginya dari pembatasan oleh endonuklease, sedangkan urutan pengenalan yang tidak dimodifikasi pada molekul DNA asing atau penyerang secara khusus dicerna (Wilson dan Murray, 1991).

Infeksi abortif adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan secara luas mekanisme resistensi fag yang mengganggu perkembangan fag intraseluler setelah DNA fag memasuki sel (McGrath *et al.*, 2004). Oleh karena itu, menurut definisi, sistem infeksi yang gagal dapat mengganggu proses seperti replikasi genom, transkripsi/translasi, pengemasan dan perakitan DNA fag, dan lisis sel. Infeksi abortif umumnya ditandai dengan infeksi yang dilemahkan karena jumlah infeksi produktif yang lebih rendah dan penurunan jumlah progeni fag yang dihasilkan (Allison dan Klaenhammer, 1998). Resistensi yang dimediasi infeksi yang gagal biasanya memuncak pada kematian sel yang terinfeksi karena kerusakan fungsi inang, sebagai akibat dari aktivitas pertahanan.

### *Mikrobiologi Pematangan Keju*

Mikroorganisme, termasuk bakteri, ragi dan kapang, hadir dalam keju selama pematangan dan berkontribusi secara positif pada proses pematangan baik secara langsung melalui aktivitas metabolismenya atau secara tidak langsung melalui pelepasan enzim ke dalam matriks keju melalui autolisis. Pembuat keju mendorong pertumbuhan organisme tersebut; namun, mikroorganisme lain, seperti patogen bawaan makanan, memiliki dampak negatif pada kualitas keju, dan dengan demikian diperlukan teknologi untuk menghilangkan atau mencegah masuknya mereka ke dalam keju.

Mikroflora yang terkait dengan pematangan keju sangat beragam; namun, dapat dengan mudah dibagi menjadi dua kelompok- bakteri asam laktat starter (BAL) dan mikroflora sekunder. Bakteri starter terutama bertanggung jawab untuk produksi asam selama pembuatan dan, dengan demikian, harus mampu menghasilkan asam yang cukup untuk mengurangi pH susu dengan cepat; aturan praktis yang berguna adalah  $\text{pH} < 5,3$  dalam susu dalam 6 jam pada suhu  $30-37^{\circ}\text{C}$  tergantung pada varietas keju (Beresford dan Williams, 2004). Mikroflora sekunder tidak berperan aktif selama pembuatan keju tetapi terlibat dengan bakteri starter dalam proses pematangan.

Saat mempelajari mikroorganisme dalam keju, penting bahwa flora lengkap dipantau dan komponen individu diidentifikasi dan dikarakterisasi secara akurat. Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan tersebut meliputi metode yang: (1) bergantung pada budidaya diikuti dengan karakterisasi fenotipik, (2) bergantung pada budidaya diikuti dengan karakterisasi molekuler dan (3) secara kultur-metode independen (Cogan dan Beresford, 2002; Beresford dan Williams, 2004)

Mikroorganisme masuk ke dalam keju baik dengan penambahan yang disengaja sebagai bagian dari kultur starter atau secara alami terkait dengan bahan yang digunakan dalam produksi keju. Dengan demikian, teknologi manufaktur sangat penting untuk mendefinisikan keanekaragaman hayati flora keju. Susu dalam ambing hewan yang sehat pada dasarnya steril; namun, selama pemerahan dan penyimpanan, peluang terjadinya kontaminasi. Susu yang diekstraksi dari ambing di tingkat peternakan di bawah kondisi pemerahan yang higienis secara rutin dapat mengandung  $< 5 \times 10^3$  cfu/ml (Fox *et al.*, 2000). Kecepatan dan derajat pendinginan susu setelah pemerahan memiliki dampak yang signifikan terhadap flora mikroba. Susu yang didinginkan pada suhu  $15-21^{\circ}\text{C}$  didominasi oleh mikroorganisme mesofilik, terutama spesies *Lactococcus* dan *Enterobacter* (Bramley dan McKinnon, 1990). Mendinginkan susu hingga  $4^{\circ}\text{C}$

akan sangat menghambat pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme, tetapi bakteri psikrotrofik, seperti *Pseudomonas*, *Flavobacterium* dan *Acinetobacter* akan terus tumbuh perlahan dan mendominasi flora. Pasteurisasi, yang merupakan bagian dari proses pembuatan untuk sebagian besar keju komersial membunuh ~99,9% bakteri yang ditemukan dalam susu mentah. Namun, spora *Bacillus* dan *Clostridium* dan organisme termodurik, misalnya *Micrococcus*, *Microbacterium* dan *Enterococcus*, akan bertahan dari pasteurisasi dan masuk ke dalam keju.

#### *Bakteri Pemula*

Fungsi utama bakteri starter adalah untuk menghasilkan asam yang cukup selama pembuatan keju untuk mengurangi pH susu ke tingkat yang diinginkan. Bakteri starter sudah dibahas di bagian “Bidang Pemula-Aspek Umum”. Starter memberikan kontribusi paling signifikan terhadap biomassa mikroba dalam dadih muda, biasanya mencapai kepadatan  $10^8$  cfu/g dalam satu hari pembuatan. Biomassa ini mewakili potensi biokatalitik yang cukup besar untuk reaksi pematangan keju. Namun, sebagian besar enzim starter bersifat intraseluler dan tidak memiliki akses langsung ke matriks keju. Selama pematangan keju, banyak starter kehilangan viabilitas dan melepaskan enzim intraselulernya karena autolisis.

Autolisis juga telah dilaporkan untuk *Lb. helveticus* di Grana (Botazzi *et al.*, 1992), dalam tipe Swiss (Gagnaire *et al.*, 1998; Valence *et al.*, 1998) dan keju Cheddar (Kiernan *et al.*, 2000). Tingkat autolisis bervariasi antara strain (5-7 kali lipat) dan memiliki dampak langsung pada tingkat proteolisis dalam keju (Valence *et al.*, 2000). Mekanisme autolisis pada *Lb. helveticus* belum sepenuhnya dijelaskan; namun, banyak strain bersifat lisogenik (Carminati *et al.*, 1997). Enam dari delapan strain lisogenik tumbuh selama pembuatan keju Swiss, menghabiskan galaktosa dan dilisiskan secara ekstensif di awal pematangan (Deutsch *et al.*, 2002). Fag terdeteksi di empat keju pada hari 1, yang secara kuat mengimplikasikan peran induksi fag dalam autolisis. Penyelidikan kecil telah terjadi mengenai autolisis di *Lb. delbrueckii* (Kang *et al.*, 1998). Di sisi lain, autolisis *Sc. thermophilus* dalam keju telah menerima sedikit perhatian. Autolisis dilaporkan pada sejumlah galur pada akhir pertumbuhan di media laboratorium (Husson-Kao *et al.*, 2000; Quiberoni *et al.*, 2010).

#### *Bakteri non-starter*

Bakteri asam laktat non-starter adalah proporsi yang signifikan dari populasi mikroba, mungkin, semua varietas keju matang. Kecuali untuk leuconostocs, NSLAB tidak sengaja

ditambahkan sebagai bagian dari kultur starter atau sebagai kultur tambahan sekunder tetapi merupakan kontaminan adventif, yang tumbuh selama pematangan. Mereka tidak berkontribusi pada produksi asam selama pembuatan keju, tetapi berdampak pada pengembangan rasa pada keju yang matang. Kelompok bakteri utama yang terlibat adalah non-starter lactobacilli, leuconostocs, pedicocci dan enterococci.

### *Lactobacilli non-starter*

Lactobacilli non-starter merupakan mayoritas populasi NSLAB di sebagian besar varietas keju selama pematangan (Beresford dan Williams, 2004). Mereka tumbuh pada 2-53°C dan tahan asam dengan pH optimal untuk pertumbuhan 5,5-6,2. Mereka telah dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu, homofermenter obligat, heterofermenter fakultatif atau heterofermenter obligat (Kandler dan Weiss, 1986). Homofermenter obligat termasuk bakteri starter *Lb. delbrueckii* dan *Lb. helveticus*. Lactobacilli non-starter yang sering diperoleh dari keju adalah heterofermenter fakultatif dan sering disebut sebagai lactobacilli heterofermentatif fakultatif (FHL). Heterofermenter obligat lebih jarang terdeteksi dalam keju. Faktor-faktor yang diperlukan untuk memfasilitasi proliferasi dalam keju belum ditentukan, meskipun kemampuan untuk memanfaatkan substrat pertumbuhan yang tersedia dan ketahanan yang melekat pada pH dan salinitas yang merugikan sangat penting (Beresford dan Williams, 2004).

Bakteri ini bergantung pada berbagai faktor untuk kelangsungan hidupnya, yaitu kondisi lingkungan, ketersediaan nutrisi, interaksi flora mikroba, dan dinamika populasi (Beresford dan Williams, 2004). Bakteri asam laktat non-starter, khususnya lactobacilli dan enterococci non-starter, tidak terpengaruh oleh kondisi lingkungan dalam keju. Lactobacilli non-starter memiliki waktu generasi sekitar 8,5 hari pada keju yang dimatangkan pada suhu 6°C (Jordan dan Cogan, 1993) dan sel-sel yang hidup dapat diperoleh kembali dari keju yang disimpan pada suhu 10°C selama 3 tahun. Laju pertumbuhan dan kepadatan populasi akhir lactobacilli dan enterococci non-starter tidak terpengaruh secara signifikan selama rentang pH, kadar garam dan kelembaban yang biasanya terjadi pada dadih selama pembuatan keju Cheddar (Lane *et al.*, 1997). Bakteri asam laktat non starter membutuhkan sumber energi untuk pertumbuhannya. Tingkat residu laktosa dalam dadih segar biasanya rendah tetapi beberapa mungkin ada ketika populasi *Lactobacillus* non-starter menjadi mapan dalam keju. Namun, peningkatan berikutnya dalam populasi *Lactobacillus* non-starter mungkin terjadi setelah laktosa telah digunakan, menunjukkan bahwa itu



bukan satu-satunya sumber energi (Turner dan Thomas, 1980). Waldron (1997) menunjukkan bahwa pertumbuhan mesophilic lactobacilli tidak tergantung pada kandungan laktosa keju. Sitrat terdapat dalam jumlah kecil (~8 mmol/kg) dalam keju Cheddar yang belum matang tetapi tidak digunakan sebagai sumber energi oleh lactobacilli non-starter (Palles *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000); jumlah tinggi lactobacilli juga berkembang dalam keju di mana belum ada pemanfaatan sitrat yang signifikan (Jordan dan Cogan, 1993).

Flora mikroba keju sangat kompleks dan tidak dapat dihindari bahwa interaksi antara anggota populasi akan terjadi. Sifat kompleks ekosistem keju memperumit interpretasi interaksi ini; namun, Martley dan Crow (1993) mampu menunjukkan interaksi antara NSLAB selama pematangan. Juga telah dilaporkan bahwa *Lb. kasei*, *Lb. rhamnosus* dan *Lb. plantarum* menghambat PAB dan enterococci dalam keju sebagai akibat kompetisi untuk membatasi nutrisi (Jimeno *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1996). Bakteri asam laktat non-starter dapat mengalami autolisis selama pematangan. Kemampuan *Leuconostoc* spp. autolisis bergantung pada regangan (Cibik dan Chapot-Chartier, 2000).

*Lactobacillus* non-starter dapat berdampak pada kualitas keju baik dalam cara yang menguntungkan maupun merugikan; namun, semakin banyak penelitian telah menunjukkan bahwa strain tambahan terpilih dari *Lactobacillus* spp. positif mempengaruhi kualitas keju (Beresford dan Williams, 2004). Keju cheddar yang diproduksi di bawah kondisi bakteriologis terkontrol dalam tong aseptik dapat mengembangkan rasa matang penuh tanpa adanya lactobacilli non-starter, meskipun lactobacilli non-starter diyakini menambahkan catatan rasa yang diinginkan dan mengurangi kekerasan dan kepahitan yang terkait dengan beberapa kultur starter (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000). Kehadiran lactobacilli non-starter dalam keju komersial dikaitkan dengan pengembangan rasa Cheddar yang lebih intens dalam waktu yang lebih singkat (Reiter *et al.*, 1967).

Biasanya, dimasukkannya strain tambahan lactobacilli nonstarter menghasilkan peningkatan intensitas rasa, peningkatan aroma dan percepatan pematangan. Meskipun proteolisis primer tidak terpengaruh oleh kultur tambahan, tingkat peptida kecil dan asam amino bebas lebih tinggi daripada keju kontrol (Fox, 2000). Volatil yang sama cenderung ada pada keju kontrol dan keju yang mengandung tambahan tetapi konsentrasinya berbeda secara signifikan (Dasen *et al.*, 2003). Strategi alternatif untuk mempercepat pematangan keju adalah penggunaan kultur yang dilemahkan (El Soda *et al.*, 2000). Keju cheddar dibuat dengan strain tambahan yang dilemahkan

dari *Lb. casei* telah meningkatkan karakteristik sensorik dan tekstur (Madkor *et al.*, 2000; Gomes da Cruz *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007).

Kehadiran NSLAB adventif memperkenalkan variabilitas ke dalam proses pematangan yang tidak dapat dengan mudah dikendalikan oleh pembuat keju. Spesies dan komposisi strain populasi *Lactobacillus* non-starter menunjukkan tidak hanya perbedaan antar-pabrik (Williams and Banks, 1997; Fitzsimons *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2001; Gaglio *et al.*, 2014), tetapi juga perbedaan keju yang diproduksi di pabrik yang sama pada hari yang berbeda dan keju dari tong yang berbeda pada hari yang sama (Fitzsimons *et al.*, 2001). Hubungan perbedaan populasi ini dengan variasi antar batch dalam kualitas keju belum ditetapkan.

### *Pediococcus*

Meskipun *pediococci* telah digunakan sebagai kultur tambahan untuk meningkatkan rasa keju Cheddar dan Feta, mereka juga muncul bersamaan dengan, dan terkadang dapat mendominasi, populasi non-starter (Law *et al.*, 1976; Bhowmik *et al.*, 1990; Vafopoulou-Mastrojiannaki *et al.*, 1994; Bhowmik dan Marth, 1990a). *Pediococcus acidilactici* dan *Pd. pentosaceus* diisolasi paling sering dari keju. Kehadiran *pediococci* dalam keju Cheddar pertama kali dilaporkan oleh Dacre (1958) yang menemukan bahwa mereka terdiri ~ 25% dari populasi bakteri setelah 6 bulan pematangan. *Pediococci* selanjutnya telah dilaporkan dalam flora non-starter keju Cheddar yang diproduksi di Inggris, Kanada dan Amerika Serikat (Fryer dan Sharpe, 1966; Elliott dan Mulligan, 1968; Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 1989), di Manchego dan Serra keju da Estrela (Nunez, 1976; Tavarria dan Malcata, 1998), Parmigiano Reggiano dan keju artisanal Sisilia (Randazzo *et al.*, 2002), Comte (Bouton *et al.*, 1998) dan Feta dan keju putih-brined lainnya (Tzanetakis dan Litopoulou-Tzanetaki, 1989, 1992; Bintsis dan Papademas, 2002; Hayaloglu *et al.*, 2002).

### *Leuconostoc spp.*

Banyak *leuconostocs* menghasilkan diacetyl dan aceton dari sitrat dan banyak digunakan dalam kultur L dan DL regangan campuran (Dellaglio *et al.*, 1995). CO<sub>2</sub> yang dihasilkan bertanggung jawab untuk pembentukan mata pada keju tipe Belanda. Identitas galur dalam starter tidak selalu ditetapkan, meskipun penerapan teknik molekuler telah menunjukkan bahwa starter susu pada dasarnya adalah *Leuc. lactis* dan tiga subspecies *Leuc. mesenteroides* (Morea *et al.*,

1999; Server-Busson *et al.*, 1999). Sementara isolasi leuconostocs tidak terbatas pada keju yang diproduksi dengan starter yang mengandung leuconstoc, kemunculannya yang jarang mungkin, sebagian, disebabkan oleh pertumbuhannya yang buruk pada media selektif yang digunakan (Mathot *et al.*, 1994). *Leuconostoc* spp. telah diisolasi dari keju artisanal yang dihasilkan dari susu mentah dan varietas keju brined putih (Aran, 1998; Bintsis dan Papademas, 2002; Hayaloglu *et al.*, 2002) dan dari Prancis (Cibik *et al.*, 2000), Yunani (Tzanezakis dan Litopoulou -Tzanetaki, 1989, 1992) dan keju Italia (Coppola *et al.*, 1988, 2001; Morea *et al.*, 1999; Randazzo *et al.*, 2002, 2009; Carraro *et al.*, 2011). Beberapa keju yang dihasilkan dari susu ovine dan/atau caprine di semenanjung Iberia mengandung *Leuconostoc* spp. (Pouillet *et al.*, 1993; Menendez *et al.*, 2000; Garabal *et al.*, 2008; Nieto-Arribas *et al.*, 2010).

### *Enterococcus*

Enterococci terjadi secara luas di lingkungan tetapi terutama terkait dengan saluran pencernaan dan, karena itu, kehadirannya dalam produk makanan sering dianggap sebagai indikator kebersihan yang buruk. Namun, enterococci memiliki sejarah penggunaan yang aman dalam produk susu dan tambahan mungkin menunjukkan karakteristik probiotik atau menghasilkan bakteriosin (Franz *et al.*, 1999). Enterococci adalah komponen utama dari populasi bakteri keju yang diproduksi di Italia (Suzzi *et al.*, 2000; Andrighetto *et al.*, 2001; Giannino *et al.*, 2009; Randazzo *et al.*, 2009), Prancis (Bouton *et al.*, 1998; Jamet *et al.*, 2012), Spanyol, Portugal (Alegria *et al.*, 2009; Florez *et al.*, 2008), Yunani (Samelis *et al.*, 2009), Turki, Balkan (Bintsis dan Papademas, 2002 ; Hayaloglu *et al.*, 2002), Brasil (Todorov, 2014) dan Mesir (El-Ghaish *et al.*, 2011). Jumlahnya pada akhir pematangan berkisar antara  $10^5$  hingga  $10^7$  cfu/g, meskipun jumlahnya bervariasi menurut jenis keju (Beresford dan Williams, 2004). Spesies yang paling sering diisolasi adalah *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* dan *Ec. durian*.

### *Bakteri Asam Propionat (PAB)*

Bakteri asam propionat biasanya ditemukan dalam keju jenis Swiss di mana mereka tumbuh selama pematangan dan berkontribusi pada rasa khas dan penampilan keju ini. Ini terbentuk dari reaksi katalitik dari 3 molekul asam laktat, yang menghasilkan dua molekul asam propionat, satu asetat dan CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> yang dihasilkan bertanggung jawab untuk pembentukan "mata" besar yang merupakan ciri keju ini dan asam asetat dan propionat berkontribusi pada

pengembangan rasa. Bakteri asam propionat dalam susu keju bertahan pada suhu pemasakan yang relatif tinggi, 54°C digunakan dalam pembuatan keju ini dan pertumbuhannya dirangsang dengan meningkatkan suhu pematangan hingga 18-22°C. Bakteri asam propionat biasanya akan mencapai tingkat  $10^8$ - $10^9$  cfu/g keju setelah beberapa minggu, pada saat itu keju didinginkan untuk membatasi pertumbuhan lebih lanjut (Steffen *et al.*, 1993).

Studi tentang autolisis PAB terbatas dan sementara autolisis spontan *P. freudenreichii* terjadi pada media sintesis (Lemee *et al.*, 1995). Bakteri asam propionat telah terlibat dalam penghambatan keju Grana yang terlambat. Pemindaian mikroskop elektron menunjukkan adanya sel-sel *P. freudenreichii* yang rusak, menunjukkan bahwa autolisis memang terjadi pada keju Grana (Cappa *et al.*, 1997). Infeksi bakteriofag *P. freudenreichii* terjadi pada keju tipe Swiss dan dapat menyebabkan lisis PAB selama pematangan keju (Gautier *et al.*, 1995; Sheehan *et al.*, 2008). Interaksi antara PAB dan bakteri lain penting selama pematangan keju. Bakteri asam propionat tidak tumbuh dengan baik pada media berbasah dasar susu; namun, proteolisis kasein oleh rennet dan bakteri starter merangsang pertumbuhan (Baer, 1995; Dolci *et al.*, 2008; Porcellato *et al.*, 2013). Penghambatan pertumbuhan tampaknya disebabkan oleh inhibitor stabil-panas yang ada dalam whey. Pra-pertumbuhan beberapa BAL, yang digunakan sebagai kultur starter dalam pembuatan keju tipe Swiss, dalam susu menghilangkan penghambatan. Interaksi antagonis antara PAB dan berbagai LAB dilaporkan oleh Alekseeva *et al.* (1983).

### *Micrococcus dan Staphylococcus*

Micrococci dan staphylococci secara tradisional ditempatkan di keluarga Micrococcaceae; Namun, secara filogenetik mereka tidak terkait erat. *Micrococcus* memiliki kandungan GC yang tinggi dan terkait dengan actinomycetes sedangkan *Staphylococcus* memiliki kandungan GC yang rendah dan ditemukan di cabang clostridal dari eubacteria. Kebanyakan *Micrococcus* dan *Staphylococcus* tumbuh dalam 5% NaCl dan dianggap oleh beberapa penulis untuk berkontribusi pada proses pematangan.

*Micrococcus* memiliki berbagai enzim hidrolitik yang dapat berkontribusi pada pematangan keju (Bhowmik dan Marth, 1990). Populasi keju Tenerife selama pematangan berkisar antara  $10^6$  hingga  $10^8$  cfu/g dan diusulkan bahwa aktivitas lipolitiknya dapat berkontribusi pada pengembangan rasa (Zarate *et al.*, 1997). *Micrococcus* juga diyakini berkontribusi positif terhadap pematangan keju Taleggio yang matang permukaannya (Feligini *et al.*, 2012).

*Staphylococcus* adalah anaerob fakultatif, tetapi pertumbuhannya lebih cepat dan berlimpah dalam kondisi aerobik. Kebanyakan strain tumbuh dengan adanya 15% NaCl dan antara 18 dan 40oC (Beresford dan Williams, 2004). Mereka telah diisolasi dari sejumlah varietas keju dan membentuk sebagian besar flora permukaan beberapa keju (Coccelli *et al.*, 2013; Sala *et al.*, 2013; Visciano *et al.*, 2014)

### *Cetakan*

Jamur berkontribusi pada pematangan banyak keju, terutama keju yang matang dengan cetakan permukaan seperti Camembert dan Brie, yang bergantung pada pertumbuhan *Penicilium camemberti* pada permukaan keju, dan keju berurat biru, seperti Roquefort, Gorgonzola, Stilton dan Danish Blue yang bergantung pada pertumbuhan *P. roqueforti* dalam matriks keju (Baudrit *et al.*, 2010). Di Camembert dan Brie, *P. camemberti* berkembang pada permukaan keju 6-7 hari setelah pembuatan. Setelah dewasa, permukaannya ditutupi dengan 'tikar' putih dari hifa jamur. *P. camemberti* memetabolisme laktat menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dan berkontribusi pada proteolisis, menghasilkan produksi NH<sub>3</sub> (Beresford dan Williams, 2004). Hal ini menyebabkan deacidifikasi permukaan keju dalam waktu 3 minggu dan pembentukan gradien pH dari permukaan (dasar) ke bagian dalam (asam). Peningkatan pH dan pemecahan alfa s1-kasein oleh rennet bertanggung jawab atas pelunakan dadih yang secara bertahap meluas ke tengah, dan terlihat pada penampang keju.

Cetakan diasosiasikan dengan berbagai jenis keju lainnya; namun, jamur yang terlibat dan dampaknya terhadap pematangan kurang dipahami dengan baik. Flora jamur kompleks yang terdiri dari *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Epicoccum* dan *Sporotrichum* berkembang pada permukaan keju Prancis, St. Nectaire dan Tome de Savoie, sementara *Penicillium* dan *Rhizomucor*, telah dilaporkan pada permukaan keju Italia, Taleggio (Fontana *et al.*, 2010) dan *Geotrichum* pada Robiola (Gripon, 1993). Permukaan keju Norwegia, Gammelost, disemprot dengan *Rhizomucor* (Oterholm, 1984), sedangkan cetakan yang sama terkadang dimasukkan ke bagian dalam keju setelah ditindik, mis. Roquefort dan Kashan (Gripon, 1993; Ghorai *et al.*, 2009; Yasar dan Guzeler, 2011).

## Ragi

Ragi terjadi → terdapat? secara alami di banyak keju, tetapi terutama yang terbuat dari susu mentah. Nilai pH rendah, kadar air, suhu dan salinitas tinggi, mendukung pertumbuhan ragi, dan jumlah di permukaan bisa mencapai  $10^5$ - $10^8$  cfu/g (Fleet, 1990). Peran mereka dalam deacidification dan pembentukan metabolit seperti etanol, asetaldehida dan  $\text{CO}_2$  bermanfaat. Namun, mereka juga dapat menyebabkan pembusukan. Rasa buah dan pahit, tekstur bergas dan terbuka telah dikaitkan dengan aktivitas ragi. Ada keragaman yang cukup besar dalam flora ragi meskipun *Debaromyces hansenii* adalah yang dominan pada keju yang diolesi dan dimatangkan permukaan seperti Limburger, Tilsit, St Nectaire, Roquefort, Camembert dan Cabrales (Fox *et al.*, 2000; Beresford dan Williams, 2004 ; Walstra *et al.*, 2010), Danish Blue (van den Tempel dan Jakobsen, 1998), keju brined putih (Bintsis dan Papademas, 2002) dan berbagai keju AOP Spanyol dan Portugis (Freitas dan Malcata, 2000).

Banyak preparat apusan komersial termasuk *Candida utilis*, *Geotrichum candidum* dan *Kluyveromyces lactis* bersama dengan *D. hansenii*. Meskipun ada banyak informasi tentang ukuran populasi dan komposisi spesies, hanya ada sedikit informasi tentang perubahan spesies dan profil strain selama pematangan, van den Tempel dan Jakobsen (1998) melaporkan bahwa *D. hansenii*, *C. rugosa*, *Y. lipolyca* dan *Zygosaccharomyces* spp. merupakan spesies dominan pada keju Danish Blue yang dimatangkan selama 1 atau 14 hari, tetapi setelah 28 hari hanya ditemukan *D. hansenii* dan *C. rugosa*. *D. hansenii* adalah spesies yang dominan selama pematangan Danbo, sedangkan *Trichosporon*, *Rhodotorula* dan *Candida* spp. terdeteksi pada tahap awal (Petersen *et al.*, 2002).

Ragi terletak tidak hanya di permukaan keju tetapi juga ditemukan di dalam dadih. Tingkat ragi dalam dadih Camembert adalah 1 log lebih rendah dibandingkan dengan permukaan (Schmidt dan Lenoir, 1980). Sebagian besar penelitian tentang mikroflora keju Cheddar mengabaikan pemantauan keberadaan ragi meskipun sebagian besar sampel keju Australia, Brazillian, dan Afrika Selatan mengandung ragi (Welthagen dan Vijoen, 1999; Beukes *et al.*, 2001; Daryaei *et al.*, 2008; Spanamberg *et al.*, 2009). Dalam studi ini, populasi di sebagian besar keju melebihi  $10^5$  cfu/g pada beberapa tahap selama pematangan, tingkat di mana populasi dapat berdampak pada pengembangan rasa. Populasi ragi menurun dari  $10^5$  cfu/g menjadi  $10^3$  cfu/g selama periode pematangan 3 bulan dalam satu percobaan pada keju yang diproduksi di tong terbuka, sementara dalam produksi keju yang berbeda (Welthagen dan Vijoen, 1999) jumlahnya meningkat sementara dari  $10^2$  sampai  $10^6$  cfu/g selama 40 hari pertama pematangan sebelum menurun. Keterlibatan ragi

dalam proses pematangan keju Cheddar tidak pasti. Ragi memiliki enzim proteolitik dan lipolitik (van den Tempel dan Jakobsen, 2000; Klein *et al.*, 2002), membentuk senyawa belerang yang mudah menguap (Bonnarme *et al.*, 2001) dan mampu mengembangkan rasa dan aroma yang sesuai pada dadih keju (Martin *et al.*, 1999; Wyder dan Puhan, 1999).

#### *Garam dalam Keju - Dampak Fisik dan Biokimia*

Penggunaan garam (NaCl) sebagai pengawet makanan sudah ada sejak zaman prasejarah dan, bersama dengan fermentasi dan dehidrasi (udara/matahari), merupakan salah satu metode pengawetan makanan klasik. Tingkat (% b/b) garam dalam keju berkisar dari ~0,7 di Swiss hingga ~6 untuk Domiati. Garam, bersama dengan pH, aktivitas air, dan potensi redoks yang diinginkan, berkontribusi pada minimalisasi pembusukan dan pencegahan pertumbuhan patogen dalam keju. Selain efek pengawetnya, NaCl memainkan dua peran penting lainnya dalam makanan. Manusia membutuhkan ~2,4 g Na, yaitu, 6 g NaCl, per hari (Kaplan, 2000) dan meskipun kebutuhan ini dapat dipenuhi melalui kandungan Na asli dari makanan, NaCl tambahan merupakan sumber utama dalam makanan orang modern.

Keju, bahkan ketika dikonsumsi dalam jumlah besar, seperti di Prancis dan Swiss, memberikan kontribusi yang relatif kecil terhadap asupan Na makanan (Guinee dan Fox, 2004), meskipun mungkin menjadi kontributor utama dalam kasus-kasus individu di mana sejumlah besar keju tinggi garam, misalnya, Biru, Feta atau Domiati, dikonsumsi. Namun demikian, ada minat di banyak negara barat dalam produksi keju rendah Na. Pendekatan yang paling umum saat ini adalah mengganti sebagian atau seluruh NaCl dengan KCl, tetapi selain biaya, praktik ini berdampak buruk pada rasa keju karena rasa KCl sangat berbeda dari NaCl dan rasa pahit (bukan karena untuk proteolisis abnormal) dapat dideteksi pada keju yang mengandung >1% b/b, KCl.

Fitur utama ketiga dari penggunaan NaCl dalam makanan adalah kontribusinya langsung terhadap rasa. Rasa asin sangat dihargai oleh banyak orang dan rasa asin dianggap sebagai salah satu dari empat rasa dasar. Agaknya, rasa khas NaCl berada di Na karena KCl memiliki sensasi rasa yang berbeda. Namun, dalam sub-bab ini, penekanannya adalah efek garam pada pematangan keju daripada dampaknya pada rasa dan efek diet. Mengenai topik ini, garam mempengaruhi flora mikroba, aktivitas enzim, aktivitas air, proses pematangan keju, hidrasi kasein, dan penampilan fisik keju, yang akan dibahas secara mendalam.

### *Pengaruh Garam pada Pengendalian Mikroba*

Untuk semua varietas utama lainnya, NaCl ditambahkan setelah pembentukan dadih tetapi tetap memainkan peran utama dalam mengatur dan mengendalikan mikroflora keju. Contoh paling sederhana dari ini adalah kontribusi NaCl pada pengaturan pH keju, yang pada gilirannya mempengaruhi pematangan keju dan tekstur. Penggunaan garam, bersama dengan kapasitas buffer, untuk mengatur pH akhir tampaknya terbatas hampir secara eksklusif pada keju jenis Inggris, yaitu, varietas asin kering seperti Cheddar, Cheshire dan Stilton. Karena kadar NaCl > 1,5%, b/b, menghambat aktivitas starter, keju tersebut diasinkan dengan perendaman dalam air garam atau dengan aplikasi permukaan garam kering (Guinee dan Fox, 2004). Namun, di daerah di mana garam dibuat dengan penguapan air laut, akan lebih mudah untuk mengasinkan keju dengan merendam dalam air garam pekat daripada menunggu kristalisasi.

Dadiah untuk Cheddar dan varietas serupa mengandung ~0,6-1,0%, b/b, laktosa pada putaran (Turner dan Thomas, 1980); ini difermentasi selama tahap awal pematangan dengan melanjutkan aktivitas starter tetapi ini sangat bergantung pada tingkat garam dalam air (S/M) dalam dadih dan toleransi garam dari starter. Irvine dan Price (1961) menunjukkan bahwa pengembangan asam oleh enam kultur asam laktat komersial dalam 10%, b/v, susu bubuk skim (RSM) dirangsang atau tidak dipengaruhi oleh kadar rendah (1%, b/b) dari NaCl tetapi sangat dihambat oleh 2,5%, b/b, NaCl. Namun, bahkan pada 5%, b/b, NaCl, asam diproduksi oleh semua starter hingga tingkat maksimum 45-55%. Kesimpulan ini didukung oleh hasil Schroeder *et al.* (1988) yang menemukan bahwa tingkat SAVI yang bervariasi dari 0,18 hingga 4,1%, b/b, memiliki sedikit pengaruh pada populasi starter dalam keju Cheddar berumur 1 hari yang dibuat dengan kultur enam galur *Lactococcus lactis* supsp, cremoris.

Pentingnya S/M dalam mengontrol pH dadih Cheddar juga terlihat dari data O'Connor (1974). Dadih (mungkin pada ---pH 5,3) diasinkan pada tingkat yang bervariasi dalam kisaran 0,5-6%, b/b pH menurun setelah penggaraman, mungkin karena aksi starter, pada tingkat S/M <5%, b/b, tetapi aktivitas starter menurun tiba-tiba pada nilai S/M yang lebih tinggi, dan pH tetap tinggi atau meningkat. Penghambatan starter ini terjadi dalam rentang S/M yang cukup sempit yang menekankan pentingnya kontrol tingkat S/M yang tepat ( O'Connor, 1974). Namun, karena sensitivitas kultur starter terhadap garam bervariasi, pengaruh konsentrasi NaCl pada produksi asam pasca-penggaraman dalam keju jelas tergantung pada starter yang digunakan dan nilai umum untuk S/M tidak dapat dinyatakan secara pasti (Guinee dan Fox, 2004). Pada pH 5,3, *Lactococcus*



*lactis* subsp. galur *lactis* umumnya lebih toleran terhadap garam daripada galur *Lc. lactis* subsp. *cremoris* tetapi ada juga variasi yang cukup besar dalam sensitivitas garam antara strain *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Møller *et al.*, 2013; Ardo *et al.*, 2014). Jika aktivitas starter terhambat setelah pembuatan, sisa laktosa akan dimetabolisme oleh bakteri asam laktat non-starter (NSLAB).

Namun, jumlah NSLAB yang ada, yang dipengaruhi oleh tingkat kontaminasi pada penggaraman, tingkat S/M, strain NSLAB, kecepatan pendinginan dadih yang ditekan dan suhu pematangan (Bechaz *et al.*, 1998; Ardo *et al.*, 2014), biasanya tidak cukup (misalnya, 1000 cfu/g) untuk menyebabkan metabolisme laktosa yang signifikan selama beberapa hari dan, akibatnya, pH turun perlahan. Toleransi garam yang lebih besar dari NSLAB jelas terlihat dari penelitian Thomas dan Pearce (1981), yang menunjukkan bahwa fermentasi laktosa menjadi D-laktat dan rasemisasi L-laktat dalam keju dengan 6%, b/b, S/ M terjadi relatif terlambat (90-180 hari) selama pematangan. Resistensi garam lactococci dan spesies bakteri lainnya diisolasi dari keju Afrika dipelajari secara rinci oleh Gurira dan Buys (2005).

Meskipun produksi asam dapat dipisahkan dari pertumbuhan sel, kemungkinan produksi asam pada kadar garam yang rendah akan disertai dengan jumlah sel yang tinggi yang cenderung menyebabkan rasa pahit (Lowrie dan Lawrence, 1972). Tidak mengherankan, kepahitan dalam keju Cheddar sangat dipengaruhi oleh tingkat S/M pada kisaran yang sangat sempit; *Lc. lactis* subsp. *cremoris* HP umumnya menghasilkan keju pahit pada tingkat S/M <4,3%, b/b, tetapi jarang pada >4,9%, b/b (Lawrence dan Gilles, 1969). Dalam pembahasan sebelumnya tentang pengaruh NaCl pada fermentasi residu laktosa dalam dadih keju oleh mikroorganisme starter, diasumsikan bahwa NaCl didistribusikan ke seluruh keju dalam waktu yang sangat singkat setelah penggaraman (Guinee dan Fox, 2004). Namun, tidak demikian. Dadih keju cheddar biasanya digiling menjadi partikel (keripik) yang cukup besar dengan penampang 2 cm x 2 cm atau lebih besar. Jelas, garam kering yang diterapkan pada permukaan keripik tersebut membutuhkan periode waktu yang cukup lama untuk berdifusi ke pusat keripik dan untuk mencapai tingkat penghambatan secara keseluruhan. Akibatnya, bakteri starter akan terus tumbuh dan menghasilkan asam di tengah chip untuk waktu yang cukup lama setelah pertumbuhan di permukaan berhenti (Hoecker and Hammer, 1944).

Pavia *et al.* (1999) menunjukkan bahwa penurunan gradien S/M dari permukaan (-9%, b/b) ke pusat (-0,2%, b/b) keju Manchego asin segar disejajarkan dengan gradien pH di arah yang sama dan gradien laktat dalam arah yang berlawanan, menunjukkan penghambatan kultur starter.

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* kurang toleran terhadap garam dibandingkan *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Ruegg dan Blanc, 1981). Data sensitivitas propionibacteria terhadap NaCl tampaknya bervariasi: Orla-Jensen (1931) melaporkan bahwa konsentrasi NaCl serendah 0,5%, b/b, cukup untuk mengurangi pertumbuhan *Propionibacterium* dalam media yang mengandung kalsium laktat. Perbedaan pengaruh garam terhadap laju pertumbuhan pada ketiga media tersebut disebabkan oleh adanya jenis dan kadar senyawa osmoprotektif yang berbeda, seperti kolin dan glisin-betain pada YEL dan berbagai turunan kolin dan karnitin dalam susu (Guinee dan Fox, 2004).). Sementara beberapa penghambatan *P. shermanii* diharapkan dalam keju Emmental, fase berair yang memiliki osmolaritas -0,7 M NaCl (Salvat-Brunaud *et al.*, 1997), adanya senyawa osmoprotektif dalam susu membantu pertumbuhan (Boyaval *et al.*, 1999). Menariknya, keju Emmental, yang mengandung -0,7%, b/b, adalah yang paling sedikit diasinkan di antara varietas keju utama.

Keju biru adalah salah satu varietas yang paling banyak diasinkan, dengan 3-5%, b/b, NaCl (Stilton <3%, b/b). Pematangan pada varietas ini didominasi oleh *Penicillium roqueforti* dan akibatnya pertumbuhan yang baik dari kapang ini sangat penting (Rosshaug *et al.*, 2012). Perkecambahan spora *P. roqueforti* dirangsang oleh 1%, b/b, NaCl tetapi dihambat oleh >3-6%, b/b, NaCl, tergantung pada strain (Diezhandino *et al.*, 2014). Namun, pertumbuhan spora berkecambah pada agar ekstrak malt atau dadih keju kurang bergantung pada konsentrasi NaCl dibandingkan perkecambahan (Godinho dan Fox, 1981a,b). Pertumbuhan *P. camemberti* juga dirangsang oleh kadar NaCl yang rendah; <0,8%, b/b, NaCl, pertumbuhan kapang pada keju Camembert buruk dan tidak merata (Lessard *et al.*, 2014).

### *Efek Garam pada Aktivitas Enzim*

#### *Koagulan*

Dengan pengecualian keju Emmental dan keju matang serupa, proteolisis awal dalam keju dikatalisis oleh koagulan residu. Elektroforesis gel poliakrilamida keju selama pematangan telah menunjukkan bahwa dalam keju keras dan semi-keras, yang matang secara bakterial, alfa s1-kasein mengalami proteolisis yang cukup besar tetapi beta-kasein tetap tidak berubah sampai tahap pematangan lanjut (Fenelon dan Guinee, 2000; Feeney *et al.*, 2001; Guinee dan Fox, 2004). Pola serupa terlihat selama fase awal keju yang dimatangkan jamur, ketika koagulan adalah zat

pematangan utama (Godinho dan Fox, 1981a; Hewedi dan Fox, 1984) tetapi proteinase jamur mendominasi keju ini selama fase pematangan selanjutnya.

Hidrolisis alfa s1-kasein oleh enzim pembekuan susu sangat dipengaruhi oleh konsentrasi NaCl. Aktivitas proteolitik chymosin, pepsins, *Rhizomucor miehei* dan *Cryphonectria parasitica* rennets pada fraksi kasein encer dirangsang dengan meningkatkan konsentrasi NaCl hingga optimum pada ~6%, b/b (Gouda, 1987). Aktivitas dihambat pada tingkat NaCl yang lebih tinggi, tetapi proteolisis terbatas dari alfa s1-kasein terjadi hingga 20%, b/b, NaCl (Fox dan Walley, 1971; Gouda, 1987). Namun, degradasi alfa s1-kasein terhambat oleh kadar garam yang sangat rendah di Cheddar (Thomas dan Pearce, 1981; Kelly *et al.*, 1996) dan pada penggaraman pada 1,36%, b/b (S/M = 2,55%, b/b) dalam Mozzarella (Faccia *et al.*, 2012). Hubungan terbalik antara degradasi kasein dan konsentrasi garam dalam keju dicerminkan oleh penurunan tingkat pH 4,6 N yang larut dan/atau N yang larut dalam air (sebagai %, b/b, N total), dan/atau NPN dalam warna Biru (Godinho dan Fox, 1981a,b; Diezhandino *et al.*, 2014), Camembert (O'Nulain, 1986); Cheddar (Kelly *et al.*, 1996; Møller *et al.*, 2013). Romano (Mangia *et al.*, 2011), Feta (Karami *et al.*, 2009) dan keju lainnya (Karagul Yuceer *et al.*, 2009; Aminifar dan Emam-Djomeh, 2014). Namun, N yang larut dalam air yang lebih tinggi pada yang pertama disebabkan oleh peningkatan hidrasi kasein sebagai akibat dari efek penggaraman pada tingkat S/M ~2,6%, b/b daripada proteolisis yang sangat Mozzarella dengan kelembapan rendah. Berbeda dengan tren yang dicatat untuk alfa s1-kasein, proteolisis beta-kasein dalam larutan encer oleh chymosin atau pepsins sangat dihambat oleh 5%, b/b, dan sepenuhnya dihambat oleh 10%, b/b, NaCl (Fox dan Walley, 1971; Lane dan Fox, 1999). beta-casein mengalami kerusakan secara signifikan lebih sedikit daripada alpha s1-casein di sebagian besar varietas keju. Ketahanan beta-kasein dalam keju terhadap proteolisis tidak hanya bergantung pada konsentrasi garam karena juga cukup tahan terhadap proteolisis pada keju bebas garam, dan S/M yang rendah (misalnya, 2,7%, b/b) (Kelly *et al.*, 1996; Van Hekken *et al.*, 2013), menunjukkan bahwa konsentrasi protein yang tinggi cukup untuk menginduksi perubahan konformasi yang diperlukan.

### *Proteinase susu*

Susu mengandung beberapa proteinase asli, yang paling signifikan, proteinase susu alkali (plasmin), hampir secara eksklusif terkait dengan misel kasein pada pH normal susu, tetapi terdisosiasi dari misel saat pH berkurang (Nielsen, 2002; Visser dan van den Berg, 2002). semua

plasmin dalam susu harus ada dalam dadih untuk sebagian besar varietas keju yang dikoagulasi rennet. Namun, konsentrasi plasmin dalam keju jenis Swiss adalah dua hingga tiga kali lipat dari pada keju Cheddar (Richardson dan Pearce, 1981; Lawrence *et al.*, 1983)

Peran plasmin dalam pematangan keju belum dipelajari secara ekstensif tetapi keberadaan kasein gamma di sebagian besar keju menunjukkan setidaknya beberapa aktivitas (Farkye dan Fox, 1992). Plasmin tampaknya memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pematangan Gouda (Visser dan de Groot-Mostert, 1977), mungkin karena penghilangan inhibitor proteinase dengan mencuci selama pembuatan dadih, dan pada keju tipe Romano (Hukum, 2009). Swiss (Ollikainen dan Kivela, 1989; Aaltonen dan Ollikainen, 2011; Chandan *et al.*, 2011; Araujo Miño, 2012) di mana koagulan didenaturasi secara ekstensif oleh suhu pemasakan yang tinggi (Matheson, 1981). Namun, ia hanya memiliki peran terbatas dalam pematangan Cheddar (Fenelon dan Guinee, 2000; Kubis *et al.*, 2001) dan keju lunak jenis Meshanger (Noomen, 1978). Koagulan juga terdenaturasi secara ekstensif dalam Mozzarella dengan kelembapan rendah karena plastisisasi dadih pada 58-60o C (Feeney *et al.*, 2001) Penambahan plasmin ke dalam susu, pada tingkat yang meningkatkan aktivitas 3 hingga 4 kali lipat. tingkat asli yang biasanya ditemukan dalam keju, mengakibatkan peningkatan degradasi beta-kasein dan tingkat pH 4,6 N yang larut (Farkye dan Fox, 1992); kualitas organoleptik dari keju yang diperkaya plasmin lebih unggul daripada kontrol dan tingkat pematangan dipercepat secara signifikan.

### *Enzim Mikroba*

Terdapat pengaruh NaCl pada enzim mikroba dalam keju. Bukti tidak langsung, misalnya, dalam kaitannya dengan kepahitan dalam keju (Lawrence dan Gilles, 1969; Thomas dan Pearce, 1981; Toelstede dan Hoffmann, 2008) menunjukkan bahwa aktivitas proteinase starter dihambat oleh kadar NaCl yang cukup tinggi. Lipase *P. roqueforti* (Fernández-Bodega *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2011) dan proteinase (Seratlic *et al.*, 2011) dihambat oleh konsentrasi NaCl >6%, b/b. Vafopoulou-Matrojiannaki (1999) menemukan bahwa peningkatan S/M dari 3 menjadi 6%, b/b, mengurangi aktivitas aminopeptidase intraseluler, dipeptidylaminopeptidase dan carboxypeptidase, tetapi memiliki sedikit efek pada aktivitas esterase intraseluler dari *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* tekanan. Interaksi antara ketiga variabel ini terutama bertanggung jawab atas perubahan aktivitas enzim dalam kondisi yang mensimulasikan pembuatan keju. Efek gabungan NaCl dan pH tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas lipase/esterase *Lb. plantarum* 2739 dan

disarankan bahwa galur seperti 2739 mungkin bertanggung jawab atas tingkat lipolisis sedang selama pematangan keju jangka panjang (Guinee dan Fox, 2004).

Proteolisis jauh lebih ekstensif pada keju cheddar yang tidak diasinkan dibandingkan dengan keju Cheddar yang diasinkan dan akibatnya bagian yang pertama menjadi kurang keras (Schroeder *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 1996). Berbeda dengan proteolisis primer, kadar proteolisis sekunder, yang diukur dengan kadar 5% (b/v) N larut asam fosfat, cenderung lebih tinggi pada garam (2,7-5,7%, b/b, S/M) daripada di Cheddar tawar pada 12 dan 24 minggu.

Fox (1975) menilai pengaruh kelembaban, garam dan pH pada kadar 123, keju Cheddar Irlandia berumur 10 minggu (70 kualitas tinggi dan 53 'reject') dari enam pabrik dan 27 keju Cheddar ekstra-matang berkualitas tinggi. Komposisi keju sangat bervariasi dan sementara korelasi antara kadar dan salah satu faktor komposisinya buruk, persentase keju yang tinggi dengan komposisi ekstrem diturunkan, terutama keju dengan kadar garam rendah (<1,4%, b/b), kelembapan tinggi (>39%, b/b) atau pH tinggi (>pH 5,4). Dalam sampel yang diteliti, konsentrasi garam tampaknya memberikan pengaruh paling kuat pada kualitas keju dan persentase terendah dari keju yang diturunkan kadarnya dapat diperkirakan pada kisaran garam 1,6-1,8%, b/b (kisaran S/M, 4,0-4,9%, b/w).

Terlepas dari rasa asam yang terkait dengan keju tertentu, kepahitan telah dilaporkan secara konsisten sebagai cacat rasa pada keju tersebut. Ada korelasi kompleks antara kecenderungan keju untuk mengembangkan kepahitan dan kultur starter, pH, laju pengembangan asam dan%, b/b, S/M (Kirin, 2001; Morales *et al.*, 2001; Broadbent *et al.*, 2002). Dari sudut pandang komposisi, S/M, %, b/b, tampaknya menjadi faktor terpenting yang mempengaruhi kepahitan (Lawrence dan Gilles, 1969). Kemungkinan berkembangnya rasa pahit sangat meningkat pada S/M <4,9%, b/b; pH, dalam kisaran normal yang ditemui untuk Cheddar, yaitu, 4,9-5,3, di mana para-kasein paling mudah larut (Creamer, 1985) dan karena itu paling rentan terhadap proteolisis, memiliki sedikit efek kecuali pada nilai S/M yang rendah, yaitu <4,9 %, b/b.

Matriks protein dalam keju muda tampaknya terdiri dari molekul alfa s1-kasein yang dihubungkan melalui interaksi hidrofobik antara daerah terminal amino; situs utama untuk aksi rennet pada alpha s1-casein adalah Phe23-Phe24 (Hill *et al.*, 1974) atau Phe24-Val125 (Creamer dan Richardson, 1974), hidrolisis yang melemahkan matriks. Pembelahan khusus ini dianggap sebagai penyebab utama hilangnya kekencangan selama tahap awal pematangan (de Jong, 1976; Creamer dan Olson, 1982; Fenelon dan Guinee, 2000).

### *Keju biru*

Pengaruh konsentrasi NaCl pada peristiwa pematangan utama dalam keju Biru dipelajari oleh Godinho dan Fox (1981a,b). Proteolisis, yang diukur dengan elektroforesis gel poliakrilamida dan pembentukan 12% N yang larut dalam TCA, selalu lebih rendah di wilayah luar (garam tinggi) daripada di zona tengah atau tengah (garam rendah); perbedaan terlihat baik sebelum pertumbuhan jamur terlihat (selama dua minggu pertama ketika koagulan adalah agen proteolitik utama) dan selama fase jamur (setelah dua minggu) (Godinho dan Fox, 1981a,b; Hewedi dan Fox, 1984). Ada korelasi negatif yang kuat antara konsentrasi garam dan N yang larut dalam TCA. Sayangnya, pembentukan asam amino N (misalnya, N yang larut dalam PTA) atau karakterisasi proteolisis lainnya yang lebih rinci tidak diselidiki. Dengan beberapa pengecualian, pH meningkat lebih cepat di bagian tengah daripada di bagian luar keju, menunjukkan bahwa katabolisme asam amino atau asam laktat juga dipengaruhi oleh konsentrasi NaCl. Lipolisis pada keju biru juga dipengaruhi oleh konsentrasi garam, dengan aktivitas maksimum terjadi pada 4-6%, b/b, NaCl (Godinho dan Fox, 1981b). Namun, konsentrasi metil keton relatif tidak tergantung pada konsentrasi garam (Guinee dan Fox, 2004).

### *Keju lainnya*

Pematangan permukaan keju yang dimatangkan cetakan, Camembert dan Brie, dicirikan oleh pelunakan yang sangat nyata, hampir likuifaksi, dari permukaan ke tengah. Pola pematangan ini terutama disebabkan oleh kombinasi hidrolisis alfa s1-kasein dan penurunan gradien pH dari permukaan ke pusat, karena produksi amonia oleh jamur permukaan, *P. camemberti*, dan difusi ke dalam, serta katabolisme asam laktat, dan difusi keluar kalsium (Noomen, 1983; Karahadian dan Lindsay, 1987). Feta dan Domiati istimewa dalam arti bahwa mereka disimpan dalam air garam, biasanya mengandung 6-8%, b/b, NaCl, setelah pembuatan. Tingginya kadar garam sangat mempengaruhi mikroflora, enzimologi dan pematangan keju ini. Selain migrasi garam ke dalam, difusi keluar senyawa larut air bermassa molekul rendah (misalnya, peptida kecil, asam amino, laktat, asam larut air yang mudah menguap, dan mineral) terjadi dan ini terakumulasi dalam air garam. Studi tentang difusi molekul-molekul ini masih kurang. Pappas *et al.* (1996) mempelajari pengaruh kadar S/M (4,3-5,8%, b/b, S/M) pada keju Feta, dengan mengubah lama penggaraman kering sebelum disimpan pada 7-8%, b/b, air asin. Peningkatan kadar S/M menurunkan kadar air

dan kadar N yang larut pada pH 4,6 dan lipolisis (diukur dengan nilai derajat asam), atau karakteristik organoleptik.

Hernandez *et al.* (2009) melaporkan bahwa konsentrasi individu (C4-C18 dan C18:1) dan total FFA dalam keju Idiazabal meningkat dengan meningkatnya waktu pengasinan dari 12 menjadi 24 atau 36 jam; namun, tidak ada rincian tentang komposisi keju yang diberikan. Selain Domiati, semua keju diasinkan setelah koagulasi rennet dan pembentukan dadih, pada tingkat mulai dari ~2,0%, b/b, di Emmental hingga ~12%, b/b, di Feta. Praktek menambahkan garam ke dadih, bukan ke susu, telah disengaja sebagai pembuat keju awal akan segera menemukan bahwa penambahannya sebelum renneting sangat mengganggu atau mencegah koagulasi susu dan sineresis dadih (Pearse dan Mackinlay, 1989; Abou-El-Nour, 1998).

### *Efek Garam pada Hidrasi Kasein*

Tingkat hidrasi dan agregasi kasein memiliki dampak besar pada pembentukan dan karakteristik tekstur/fungsional produk susu, termasuk keju (Fox dan McSweeney, 2003). Memang, pembuatan banyak produk dan bahan berbasis protein, seperti keju, yoghurt dan kasein, didasarkan pada destabilisasi terbatas dan agregasi misel kasein. Tingkat agregasi kasein, atau hidrasi, mempengaruhi struktur mikro dan sifat tarik-menarik antara molekul protein dalam fase protein produk susu yang mengandung protein.

Efek merugikan dari garam pada konsentrasi yang digunakan dalam keju pada pembentukan dadih mungkin merupakan konsekuensi dari pelarutan kalsium fosfat koloid sebagai akibat dari pertukaran natrium-kalsium, dan efek positif garam pada hidrasi kasein, yang merusak agregasi kasein. Dalam keju Domiati, di mana 5-15%, b/b, NaCl ditambahkan ke dalam susu (Abou-El-Nour, 1998), efek NaCl dalam pembentukan dadih diimbangi dengan penggunaan susu kerbau, yang memiliki kandungan kasein yang lebih tinggi daripada susu sapi (Kosikowski dan Mistry, 1997), atau dengan fortifikasi susu dengan susu bubuk skim, dan/atau penambahan CaCl<sub>2</sub> (Guinee dan Fox, 2004)

Pentingnya hidrasi kasein, seperti yang dipengaruhi oleh NaCl, pada sifat fisik keju telah ditunjukkan dengan menggunakan sistem model encer. Creamer (1985) mempelajari pengaruh NaCl pada hidrasi kasein dalam susu skim yang diolah dengan rennet pada nilai pH dalam kisaran 4,6-6,6, dengan mengukur kadar air dan protein dalam pelet para-kasein yang diperoleh pada ultrasentrifugasi pada 81.000 g untuk 2 jam. Penambahan 5%, b/b, NaCl ke dalam susu

meningkatkan kadar Ca serum dan hidrasi kasein pada semua nilai pH, dengan maksimum pada kisaran pH 5,2-5,3 (Creamer, 1985). Hidrasi kasein dengan NaCl dapat dikaitkan dengan pengikatan  $\text{Na}^+$  oleh kasein (Hardy dan Steinberg, 1984). Akibatnya, penambahan NaCl tampaknya menciptakan efek pertukaran ion natrium-kalsium dengan para-kasein, agak mirip dengan yang diamati antara garam pengemulsi (natrium fosfat dan natrium sitrat) dan matriks kasein selama pembuatan produk keju olahan (Guinea dan Fox, 2004). Ruegg dan Moor (1986) dan Pastorino *et al.* (2003) menunjukkan bahwa penambahan kalsium meningkatkan interaksi kasein dan dengan demikian mengurangi hidrasi kasein. Sebaliknya, tingkat kelembapan dan serum yang tidak dapat diekspresikan, yang merupakan indeks hidrasi protein, dalam keju Mozzarella meningkat seiring dengan berkurangnya kandungan kalsium.

Pengasinan kering keju (dengan mencampur potongan dadih yang digiling dan garam sebelum dicetak atau perawatan dadih lebih lanjut) menawarkan beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggaraman air garam, termasuk penghematan dalam ruang pabrik (diisi oleh tangki air asin) dan tenaga kerja, garam-dalam-kelembaban yang lebih seragam distribusi (setidaknya pada awalnya), lebih sedikit variasi zona dalam tekstur, sifat leleh dan kualitas (Guinea dan Fox, 2004). Akibatnya, efek pengasinan keju Mozzarella kering sebelum plastisisasi dalam air panas sebagai alternatif untuk brining dadih plasticized dalam air garam dingin telah diselidiki (Hayaloglu *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2011). Temuan di atas untuk Mozzarella konsisten dengan sistem model yang dijelaskan di bagian ini yang menunjukkan bahwa konsentrasi rendah NaCl (5-6%, b/b, S/M) meningkatkan solubilisasi kasein atau para-kasein (Hardy dan Steinberg, 1984; Creamer, 1985). Tren seperti itu diharapkan sebagai matriks protein Mozzarella, dan semua keju rennet-curd, dapat dianggap sebagai para-casein terhidrasi yang sangat terkonsentrasi (Guinea dan Fox, 2004).

### *Efek pada Struktur Mikro Keju*

Karena efeknya pada hidrasi protein, garam memiliki pengaruh besar pada struktur mikro keju. Pemindaian mikroskop elektron menunjukkan bahwa matriks protein keju Mozzarella tanpa lemak asin (0,25 atau 3,5%, b/b, S/M) atau Muenster (1,2, 3,6, atau 6,7%, b/b, S/M) adalah lebih bengkak, homogen dan kontinu, dan memiliki luas permukaan spesifik yang lebih tinggi daripada rekan-rekan mereka yang tidak asin (Pastorino *et al.*, 2003). Selain itu, keju unsalted memiliki saluran terbuka yang besar dengan serum bebas (kantong whey) yang didistribusikan ke seluruh



matriks, yang bertindak sebagai permukaan hamburan cahaya dan memberi keju warna putih buram, dibandingkan dengan penampilan seperti lilin dan tembus cahaya pada keju asin di mana keju asin seperti itu. celah lebih sedikit dan lebih kecil.

### *Efek pada Reologi Keju*

Pengaruh NaCl pada tekstur keju paling jelas terlihat pada perbandingan keju bebas garam dengan keju asin; yang pertama umumnya lemah, lunak, pucat dan/atau berperekat tergantung pada usia. Sebaliknya, konsentrasi garam yang tinggi menyebabkan rasa pendek, rapuh, kering dan keras, seperti yang diamati untuk dadih yang disimpan dalam air garam untuk waktu yang terlalu lama (Guinee dan Fox, 2004). Hubungan antara reologi/tekstur keju dan kadar garam juga terlihat pada pemeriksaan visual keju asin air garam pada penyelesaian penggaraman; daerah kulit luarnya keras, rapuh, kering dan putih sedangkan bagian dalamnya lebih lentur, berlilin, lebih lembut dan lebih tembus cahaya. Pengaruh NaCl pada tekstur keju mungkin karena efeknya pada komposisi (kadar air, MNFS), hidrasi/kelarutan para-kasein dan konformasi, efek terkait usia pada pH (Espinosa Pesqueira dan Maricela, 2012) dan proteolisis (Ozturk *et al.* , 2013).

Pagana dan Hardy (1986) melaporkan hubungan linier terbalik antara kerapuhan keju Camembert, yang diukur dengan regangan patah, dan tingkat S/M dalam kisaran 3-21%, b/b. Visser (1991) mencatat bahwa regangan rekahan model keju Gouda meningkat secara monoton dengan S/M dalam kisaran 0 hingga 4,5%, b/b, kemudian menurun tajam ke nilai sekitar setengah maksimum pada 5,5%, b/b , S/M dan tetap relatif konstan setelahnya karena S/M ditingkatkan menjadi 11,3%, b/b. Peningkatan hidrasi kasein akan memberikan karakter yang lebih kental (dan kurang elastis) pada keju dan transisi dari perilaku patah elastis ke perilaku patah plastis, yang akan memerlukan regangan yang lebih tinggi untuk patah (Visser, 1991). Sebaliknya, tingkat hidrasi kasein yang lebih rendah pada S/M yang lebih tinggi (>5%, b/b) akan mendukung matriks kasein yang lebih elastis dan perilaku fraktur elastis, yaitu keju yang lebih pendek, lebih kencang, dan lebih rapuh (Guinee dan Fox , 2004).

### *Keju Rendah Natrium*

#### *Keju cheddar*

Produsen keju cheddar berada di bawah tekanan yang meningkat untuk mengurangi kadar garam (NaCl), karena efek kesehatan yang merugikan dari asupan natrium diet saat ini (WHO,

2007). Tingkat khas NaCl dalam keju Cheddar berkisar antara 1,8 hingga 2,1% (b/b). NaCl diketahui mempengaruhi, komposisi, pertumbuhan mikroba, aktivitas enzim, aktivitas air, sineresis dadih, kelarutan protein, hidrasi jaringan kasein dan interaksi kalsium dan kompleks para-kaseinat kehilangan NaCl dalam air dadih meningkat dengan meningkatnya penambahan NaCl; Kerugian 5,0% pada keju penambahan NaCl 0,5%, dibandingkan dengan kehilangan 40% pada keju penambahan NaCl 3,0%. Peningkatan serapan NaCl yang tidak proporsional disebabkan oleh perbedaan tingkat whey yang diekspresikan dari dadih setelah pengasinan. Sesuai dengan penelitian sebelumnya, perbedaan tingkat penambahan NaCl memiliki dampak yang signifikan pada komposisi keju (Schroeder *et al.*, 1988; Thakur *et al.*, 1975).

Pengurangan NaCl memiliki dampak signifikan pada komposisi keju, dengan parameter kualitas utama seperti penurunan S/M, dan peningkatan kadar air dalam zat non-lemak (MNFS) dan lemak dalam bahan kering (FDM). Pengurangan NaCl menghasilkan peningkatan yang signifikan pada proteolisis primer dan sekunder. Degradasi baik alpha s1- dan beta-casein meningkat dengan pengurangan NaCl, dengan yang terakhir berkontribusi terhadap kepahitan. Pengurangan NaCl tidak berdampak pada tingkat lipolisis terlepas dari konsentrasi NSLAB, lebih lanjut menyoroti bahwa NSLAB memiliki sedikit atau tidak berdampak pada lipolisis pada keju Cheddar (Rulikowska *et al.*, 2013).

Penurunan NaCl secara keseluruhan mengakibatkan penurunan pH secara bersamaan, dan penurunan kecil dalam kapasitas buffer peningkatan aw dan pertumbuhan mikroflora (starter dan NSLAB) selama tahap awal pematangan, yang semuanya menghasilkan peningkatan proteolisis. Keju dengan penambahan NaCl terendah (0,5% atau 1,25%) ditemukan memiliki kadar NSLAB tertinggi dan persentase sel mati terendah pada awal pematangan, tetapi memiliki kadar tertinggi pada hari ke 56 (Rulikowska *et al.*, 2013). Atribut tekstur "kekerasan", "ketangguhan" dan "kehancuran" menurun dengan menurunnya kandungan NaCl dan selama pematangan.

Keju dengan NaCl yang lebih tinggi (2,25%, 2,5% atau 3,0%) lebih erat hubungannya dengan senyawa volatil Cheddar yang positif. Atribut rasa "asin", "manis" menurun, sedangkan atribut negatif "pahit" dan "sulfur" meningkat dengan menurunnya kandungan NaCl. Keju dengan penambahan NaCl terendah (0,5% dan 1,25%) juga dicirikan memiliki rasa "bawang" yang tidak khas. Penghilang rasa yang merugikan dalam keju ini mungkin karena NSLAB memanfaatkan bakteri mati sebagai substrat pertumbuhan (Thomas, 1987) yang mengakibatkan metabolisme asam amino aromatik dan metionin yang berlebihan.

Secara keseluruhan, penelitian ini telah menyoroti pentingnya NaCl dalam produksi keju Cheddar dan mengidentifikasi masalah utama yang harus diatasi jika ingin berhasil mengurangi keju NaCl. Kesadaran harus diambil tentang bagaimana mengendalikan pertumbuhan mikroflora yang menguntungkan dan proteolisis berlebihan berikutnya dalam lingkungan keju NaCl yang tereduksi (Rulikowska *et al.*, 2013). Aspek lain yang harus dipertimbangkan termasuk masalah peraturan kadar Na yang diizinkan untuk keju Cheddar NaCl yang dikurangi di berbagai negara dan persyaratan hukum terkait lainnya, seperti keju Cheddar yang dijual di Inggris harus memiliki kadar air di bawah 39% dan FDM minimal 50% (Lawrence & Gilles, 1969).

Mencapai kualitas keju Cheddar dalam batasan ini akan sulit dan melibatkan manipulasi signifikan dari prosedur pembuatan keju untuk mengurangi aw, mempertahankan pH pada tingkat yang terkait dengan keju Cheddar standar, mengontrol kapasitas buffer, kelarutan protein dan hidrasi kasein pada tingkat S/M yang rendah. Jelas pemilihan starter spesifik dan kultur tambahan akan diperlukan untuk menghasilkan rasa dan tekstur Cheddar yang dapat diterima dalam lingkungan keju yang berbeda ini (Rulikowska *et al.*, 2013).

#### *Keju lainnya*

Karena ukuran penyajiannya yang relatif besar (-112 g dibandingkan dengan -66 g untuk keju lainnya), keju cottage telah dipandang sebagai sumber natrium makanan yang berpotensi tinggi (Marsh *et al.*, 1980). Oleh karena itu, banyak minat telah difokuskan pada berbagai cara untuk mengurangi kadar garam dari keju Cottage. Mengurangi tingkat natrium lebih dari 50% menghasilkan penurunan skor yang signifikan (Demott *et al.*, 1984, 1986). Lindsay *et al.* (1985) juga menemukan bahwa pengurangan 50% tidak menyebabkan perubahan signifikan dalam penerimaan konsumen. Namun, penggunaan pengganti, yaitu KCl atau KCl/NaCl, untuk menurunkan kadar natrium hingga 50% memberikan penurunan kualitas yang signifikan.

Martens *et al.* (1976) melaporkan keberhasilan pembuatan keju Gouda rendah natrium menggunakan campuran NaCl dan KCl dalam pembuatan dadih dan pengasinan. Namun, pengurangan garam dalam bahan kering (SDM) dalam keju Gouda sebesar -20% diklaim meningkatkan kerentanan terhadap fermentasi asam butirat secara signifikan (van den Berg *et al.*, 1986). Untuk mencegah fermentasi yang tidak diinginkan dalam keju pada tingkat garam <3,8%, b/b, SDM memerlukan modifikasi proses seperti laktofugasi susu dan pengurangan tingkat kelembaban keju. Lefier *et al.* (1987) melaporkan produksi Gruyere rendah sodium (~45 mg

Na/100 g dibandingkan dengan 272 mg/100 g pada kontrol) dengan mengganti NaCl dengan MgCl<sub>2</sub>. Sementara tingkat proteolisis dan konsentrasi asam lemak bebas serupa pada kedua keju, keju yang mengandung MgCl<sub>2</sub> memiliki rasa yang lebih pahit dan tubuh yang lebih lembut daripada kontrol, tetapi secara organoleptik dapat diterima. Katsiari *et al.* (1997) melaporkan bahwa kandungan natrium keju Feta berhasil dikurangi hingga 50%, dengan penggantian sebagian NaCl dengan KCl, tanpa mempengaruhi komposisi kotor, aktivitas air, lipolisis (Katsiari *et al.*, 2000), proteolisis (Katsiari *et al.*, 2000), atau sifat sensorik atau tekstur.

#### *Adopsi-Difusi Garam dalam Keju*

Ada tiga metode utama pengasinan dadih keju: (1) penambahan dan pencampuran langsung kristal garam kering ke potongan dadih yang dipecah atau digiling pada akhir pembuatan, misalnya, Cheddar dan Cottage; (2) menggosokkan garam kering atau bubuk garam ke permukaan dadih yang dicetak, misalnya keju berurat biru; (3) perendaman keju cetakan dalam larutan air garam, misalnya Edam, Gouda, Saint Paulin, Provolone, dan lainnya.

Terkadang, kombinasi metode di atas digunakan, misalnya Emmental, Parmesan, Romano, dan Brick. Metode lain yang lebih jarang digunakan, terutama dalam studi eksperimental, meliputi: injeksi air garam di bawah tekanan (Pastorino *et al.*, 2003), brining tekanan tinggi, misalnya, pada tekanan isostatik hingga 500 MPa (Messens *et al.*, 1999), pengasinan akustik dalam skala eksperimental (28 l) tong air asin dengan sistem akustik yang menghasilkan gelombang ultrasonik (30 kHz) intensitas tinggi (300 W) (Sanchez *et al.*, 2000); impregnasi vakum brining pada vakum 3,7 kPa, absolut (Pavia *et al.*, 1999).

#### *Adsorpsi Garam dalam Keju*

Satu-satunya prasyarat untuk penyerapan garam oleh keju adalah adanya gradien garam-dalam-kelembaban antara keju dan media penggaraman. Namun, jumlah garam yang diserap tergantung pada sifat intrinsik keju, kondisi penggaraman dan durasi penggaraman. Karena prosedur pengasinan yang berbeda semuanya melibatkan penyerapan garam melalui proses difusi yang terhambat, faktor umum yang mempengaruhi penyerapan garam oleh keju berlaku sama untuk butiran atau potongan dadih yang digiling pada pencampuran dengan garam kering dan pada keju cetakan yang diasinkan dan/atau diasinkan kering (Guinea dan Fox, 2004).

Secara umum diterima bahwa peningkatan konsentrasi air garam menghasilkan penyerapan garam yang lebih besar dan peningkatan kadar garam-dalam-kelembaban dalam keju (Breene *et al.*, 1965; Geurts *et al.*, 1980; Godinho dan Fox, 1981b; Pappas *et al.*, 1996). Sementara laju difusi NaCl hampir tidak dipengaruhi oleh konsentrasi air garam dalam kisaran 5-20% (Guinee, 1985; Geurts *et al.*, 1974), laju penyerapan meningkat pada tingkat yang semakin berkurang dengan meningkatnya konsentrasi air garam dalam kisaran 5- 25%, b/b (Breene *et al.*, 1965; Guinee, 1985; Guinee dan Fox, 2004). Hal ini disebabkan pengurangan gradien konsentrasi S/M antara kelembaban keju dan air garam (Guinee dan Fox, 2004). Oleh karena itu, dalam percobaan model pengasinan, di mana irisan keju dengan ketebalan berbeda terendam seluruhnya dalam air garam, terjadi penurunan tajam dalam laju penyerapan garam (per satuan berat) sebagai perbedaan antara konsentrasi NaCl dalam keju.

Tingkat dehidrasi yang tinggi pada lapisan permukaan akan menghambat penyerapan garam karena seiring dengan peningkatan kandungan protein dan pengurangan lebar pori matriks protein (Guinee dan Fox, 2004). Tingkat penyerapan garam meningkat dengan meningkatnya luas permukaan terhadap rasio volume keju (Breene *et al.*, 1965; Guinee dan Fox, 1986). Hal ini paling mudah diamati dengan membandingkan tingkat penyerapan garam oleh dadih giling (misalnya, Cheddar) dan keju cetakan utuh (keju tipe Bata, Emmental, Romano atau Biru) dalam air garam; pada yang pertama, penyerapan garam terjadi dari banyak permukaan secara bersamaan, dan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai tingkat garam yang tetap sangat jauh lebih sedikit daripada keju cetakan yang diasinkan dengan air garam. Meskipun pada pandangan pertama mungkin tampak bahwa keju yang lebih kecil akan memiliki kandungan garam rata-rata yang lebih tinggi daripada yang lebih besar setelah brining untuk interval yang sama, ini hanya berlaku untuk keju dengan bentuk dan dimensi relatif yang sama karena penyerapan garam berhubungan linier dengan luas permukaan hingga volume. rasio keju (Geurts *et al.*, 1980; Guinee dan Fox, 1986).

Jumlah garam yang diserap meningkat dengan waktu penggaraman (Geurts *et al.*, 1980; Godinho dan Fox, 1981; Messens *et al.*, 1999), namun, laju penyerapan garam menurun seiring waktu karena penurunan gradien konsentrasi NaCl antara kelembaban keju dan air garam (Geurts *et al.*, 1980; Guinee dan Fox, 1986; Melilli *et al.*, 2003). Memang, jumlah garam yang diambil oleh keju sebanding dengan akar kuadrat dari waktu pengasinan (Geurts *et al.*, 1980; Guinee dan Fox, 1986; Messens *et al.*, 1999). Namun, ketika kelengkungan permukaan keju meningkat, proporsionalitas penyerapan garam dengan waktu pengasinan hilang dan pengurangan relatif

penyerapan garam per satuan luas permukaan keju meningkat dengan meningkatnya derajat kelengkungan, dan dengan waktu (Geurts *et al.*, 1980). Ini menyiratkan bahwa untuk keju dengan volume dan komposisi yang sama, diasinkan di bawah kondisi yang sama, laju penyerapan garam per satuan luas permukaan (dan karenanya keju secara keseluruhan) adalah dalam urutan: persegi panjang > silinder > bulat (Guinee dan Rubach, 1986)

Dalam percobaan *brining* model, Breene *et al.* (1965) mempelajari pengaruh suhu dadih (27, 32, 38, 43o C) pada penyerapan garam oleh kubus dadih Cheddar (1 cm x 3 cm) dalam air asin (20 atau 25%, b/b, NaCl) pada suhu yang sama sebagai dadih. Penyerapan garam terendah pada 32°C serupa pada 27 dan 38°C dan tertinggi pada 43°C. Penurunan kadar garam pada perubahan suhu brining dari 27 atau 38°C menjadi 32°C adalah -6,5%. Penyerapan garam yang rendah pada 32°C dikaitkan dengan lapisan lemak yang dikeluarkan pada permukaan partikel dadih yang menghambat penyerapan garam; lebih sedikit lemak yang dikeluarkan pada suhu yang lebih rendah sedangkan pada suhu > 32°C lemak yang dikeluarkan berbentuk cair dan tersebar di air garam. Peningkatan suhu air garam meningkatkan mobilitas NaCl dan penyerapan garam.

Penggaraman keju dengan air garam bisa menjadi proses yang mahal dalam hal ruang, biaya pemeliharaan, dan korosif air garam. Akibatnya, pra-sahing keju sebagai cara untuk mengurangi waktu pengasinan keju Gouda (Guinee, 1985) dan Ragusano (Melilli *et al.*, 2003) telah diselidiki. Tingkat garam dalam kelembaban dadih dan pra penggaraman serta kadar air dadih juga mempengaruhi kemampuan keju untuk menyerap molekul garam. perbedaan gradien air garam-dalam antara kelembaban keju dan air garam adalah penentu utama dari jumlah garam yang diserap besarnya peningkatan S/M menurun dengan tingkat pra-penggaraman menunjukkan penurunan jumlah garam diserap per satuan luas permukaan keju (Guinee, 1985). Geurt *et al.* (1974) menunjukkan bahwa jumlah garam yang diserap oleh percobaan keju tipe Edam dan Gouda selama pengasinan air garam umumnya meningkat seiring dengan peningkatan kadar air awal dadih, dengan efek menjadi lebih jelas dengan durasi pengasinan. peningkatan tingkat kelembaban dalam keju sebelum pengasinan air garam diharapkan mengurangi kehilangan air bersih per berat tertentu keju dan meningkatkan penetrasi dan penyerapan garam selama pengasinan air garam berikutnya. Hipotesis ini sejalan dengan peningkatan  $D^*$  dan kecenderungan penurunan rasio fluks (Geurts *et al.*, 1980).

Dalam praktiknya, pH air asin disesuaikan menjadi 5,0-5,3, yang mendekati pH kebanyakan keju asin air asin. Pengasaman air garam memiliki efek pengawet dan juga

meminimalkan risiko cacat permukaan (misalnya, seperti beludru, kulit tidak kering) yang terkait dengan ketidakseimbangan  $[H^+]$  yang mempengaruhi tingkat hidrasi kasein (Guinee dan Fox, 2004). Sementara sedikit informasi yang tersedia tentang pengaruh pH air garam pada penyerapan garam (Geurts *et al.*, 1980), dapat dibayangkan bahwa penurunan pH yang berlebihan (misalnya, 4,6) akan menyebabkan pengendapan protein dan kehilangan air yang tinggi pada permukaan keju, yang pada gilirannya akan mengurangi penyerapan garam.

### *Difusi Garam dalam Keju*

Dalam percobaan model *brining*, Geurts *et al.* (1974) mengukur pengaruh variasi komposisi keju dan kondisi pengasinan pada koefisien pseudo-difusi ( $D^*$ ) NaCl dalam fase kelembaban keju Gouda. Faktor-faktor yang mempengaruhi pergerakan garam dalam keju selama *brining* mungkin juga berlaku untuk keju setelah *brining* dan karenanya memiliki efek yang menentukan pada tingkat pencapaian keseimbangan S/M dan kelembaban; di bawah kondisi *brining* normal (misalnya, 18-20%, b/b, NaCl; 0,2% Ca; 10-20°C kelembaban dan garam bergerak dalam arah yang berlawanan sebagai akibat dari difusi (Geurts *et al.*, 1974; Guinee dan Fox, 1983, 1986) Meskipun perubahan fisiko-kimia dan struktural yang berkelanjutan selama pematangan dapat mengubah situasi, perlu dicatat bahwa koefisien difusi untuk NaCl dalam fase kelembaban dari Cheddar berumur 12 minggu asin kering (50% FDM, 37,9% H<sub>2</sub>O) Sutherland, 1974) sesuai dengan yang ditemukan oleh Geurts *et al.* (1974) untuk keju Gouda asin dengan komposisi serupa.

Gradien konsentrasi antara keju dan air garam ditentukan oleh perbedaan tingkat garam dalam air garam dan S/M keju, sedangkan gradien konsentrasi antara daerah tetangga dalam roti keju ditentukan oleh perbedaan tingkat S/M antara kedua wilayah. Gradien berubah dengan waktu baik untuk keju yang matang setelah dikeluarkan dari air garam (seperti untuk kebanyakan keju) atau matang dalam air garam (misalnya, Feta, Gaziantep) sampai keseimbangan S/M tercapai (Godinho dan Fox, 1981; Guinee dan Fox, 1986; Pappas *et al.*, 1996; Messens *et al.*, 1999; Pavia *et al.*, 1999; Melilli *et al.*, 2003). Namun, karena S/M jarang mencapai >20%, b/b, dalam keju, kecuali pada lapisan kulit, variasi antar-zona yang besar pada tingkat S/M pada akhir *brining* seharusnya tidak secara signifikan mengubah tingkat pencapaian Keseimbangan S/M dalam roti keju yang diberikan atau antara roti dari varietas yang sama (Guinee dan Fox, 2004).

Karena pengaruh suhu yang besar pada  $D^*$ , semakin tinggi suhu penyimpanan, semakin pendek waktu yang diperlukan untuk keseimbangan kadar garam dan kelembaban dalam massa

keju setelah pengasinan. Meningkatkan konsentrasi Ca dalam air garam yang baru disiapkan (19%, b/b, NaCl; 15°C dari 0 menjadi 1,8%, b/b, mengurangi tingkat kelembaban (~3%, b/b) dan meningkatkan kadar garam (~1,5%, b/b) dari 0,5 cm lapisan luar keju Gouda (Guinee, 1985). Namun, peningkatan kalsium tidak banyak berpengaruh pada komposisi keju atau pada  $D^*$  (~4% pengurangan). Akibatnya, kadar kalsium total dan kalsium serum mungkin memiliki sedikit pengaruh pada tingkat di mana keseimbangan S/M dicapai pasca-brining (Guinee dan Fox, 2004).

Secara umum diterima bahwa kadar air keju mempengaruhi tingkat penyerapan garam dan/atau difusi (McDowall dan Whelan, 1933; Georgakis, 1973). Namun, dari perhitungan koefisien difusi telah ditunjukkan (Geurts *et al.*, 1974; Guinee, 1985) bahwa untuk dua keju dari varietas yang sama, laju difusi tidak selalu lebih tinggi pada keju dengan kadar air yang lebih tinggi; koefisien difusi tergantung pada rasio lemak terhadap padatan-bukan-lemak (SNF) dan kelembaban terhadap SNE. Faktor-faktor ini mempengaruhi fraksi volume fase lemak dan protein, yang pada gilirannya menentukan impedansi terhadap molekul difusi. Sementara  $D^*$  sangat bergantung pada komposisi dan struktur keju tawar, khususnya kadar air, secara mengejutkan, hampir tidak dipengaruhi oleh variasi komposisi di sepanjang bidang berbeda dari keju yang dihasilkan dari penyerapan garam dan hilangnya kelembaban selama penggaraman air garam. Jadi, sementara mengasinkan dadih ke tingkat S/M yang berbeda sebelum pengasinan air garam (seperti yang dijelaskan dalam 'tingkat garam-dalam-kelembaban awal dadih dan pra-penggaraman') mengurangi tingkat garam yang diserap, itu memiliki sedikit efek pada  $D^*$ , yang meningkat dari 0,18 menjadi 0,19  $\text{cm}^2/\text{hari}$  pada peningkatan tingkat S/M dari 0,3 menjadi 4,7%, b/b, atau kedalaman penetrasi garam selama pengasinan air garam berikutnya (Guinee, 1985).

Difusi garam dalam keju terjadi dalam kelembaban yang ditahan dalam matriks yang terdiri dari agregat protein dan menutup butiran lemak, keduanya menghalangi pergerakan molekul yang menyebar dan meningkatkan jarak nyata yang ditempuh oleh molekul garam saat bergerak dari satu bidang paralel ke bidang lainnya. Oleh karena itu, kehadiran fisik lemak itu sendiri mengurangi nilai-D yang tampak karena kebalikan dari tortuositasnya (Guinee dan Fox, 2004).

Geometri keju mempengaruhi tingkat pencapaian keseimbangan garam-dalam-kelembaban melalui efeknya pada dimensi relatif keju. Guinee dan Fox (1986) bekerja dengan keju jenis Romano komersial dengan bentuk yang berbeda, menunjukkan bahwa setiap saat selama penyimpanan, perbedaan bersih dalam konsentrasi S/M di sepanjang lapisan keju meningkat dengan panjang lapisan. Pengamatan ini konsisten dengan fakta bahwa kedalaman penetrasi garam



selama brining sebanding dengan akar kuadrat dari waktu brining (Geurts *et al.*, 1974; Guinee dan Fox, 1986).

### *Pengasinan air garam*

Ketika keju ditempatkan dalam air garam ada pergerakan bersih molekul NaCl, seperti Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup>, dari air garam ke dalam keju sebagai akibat dari perbedaan tekanan osmotik antara kelembaban keju dan air garam. Akibatnya, air dalam keju berdifusi keluar melalui matriks keju untuk mengembalikan keseimbangan tekanan osmotik. Gel, termasuk keju, terdiri dari jaringan tiga dimensi untaian misel para-kasein yang menyatu dalam kelompok, yang memberikan massa strukturnya dan tingkat kekakuan dan elastisitas tertentu; sifat-sifat fluida antar-penetrasi umumnya tidak jauh berbeda dari larutan-larutan yang bersesuaian. Oleh karena itu, akan tampak bahwa molekul NaCl yang berdifusi dalam kelembaban keju, sementara memiliki jarak yang lebih jauh untuk melakukan perjalanan daripada dalam larutan (ion yang berdifusi harus menempuh rute memutar untuk memotong untaian protein yang menghalangi dan gumpalan lemak yang tidak dapat ditembus oleh mereka), akan sebaliknya tidak terlalu terpengaruh. Namun, berdasarkan mobilitas NaCl dan H<sub>2</sub>O dalam keju asin tipe Gouda di bawah kondisi model untuk mematuhi hukum Fick untuk aliran air garam unidimensional (Walstra *et al.*, 2005).

$$\frac{C_b - C_x}{C_b - C_o} = \text{erf}(y) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y \exp(-\omega^2) d\omega$$

Dimana,

$$y = \frac{x}{(4Dt)^{0.5}}$$

Dimana C adalah kandungan garam relatif terhadap air dalam air garam (C<sub>b</sub>), dalam keju tawar (C<sub>0</sub>) dan dalam keju pada jarak x dari antarmuka air garam-keju (C<sub>x</sub>); t adalah waktu brining dan w adalah variabel integrasi. Geurt *et al.* (1974) menyimpulkan bahwa penetrasi garam ke dalam keju dan migrasi keluar air secara bersamaan dapat digambarkan sebagai proses difusi yang terhambat, yaitu molekul NaCl dan H<sub>2</sub>O bergerak sebagai respons terhadap gradien konsentrasi masing-masing tetapi laju difusinya jauh lebih rendah daripada yang dalam larutan murni.

Koefisien difusi (D) untuk NaCl dalam kelembaban keju biasanya ~0,2 cm<sup>2</sup>/hari, meskipun bervariasi dari -0,1 hingga 0,45 cm<sup>2</sup>/hari dengan komposisi keju dan kondisi pengasinan (Geurts *et al.*, 1974; Guinee dan Fox, 1983; Guinee, 1985; Turhan dan Kaletung, 1992; Turhan dan Gunasekaran, 1999; Simal *et al.*, 2001), dibandingkan dengan 1,0 cm<sup>2</sup>/hari untuk NaCl dalam

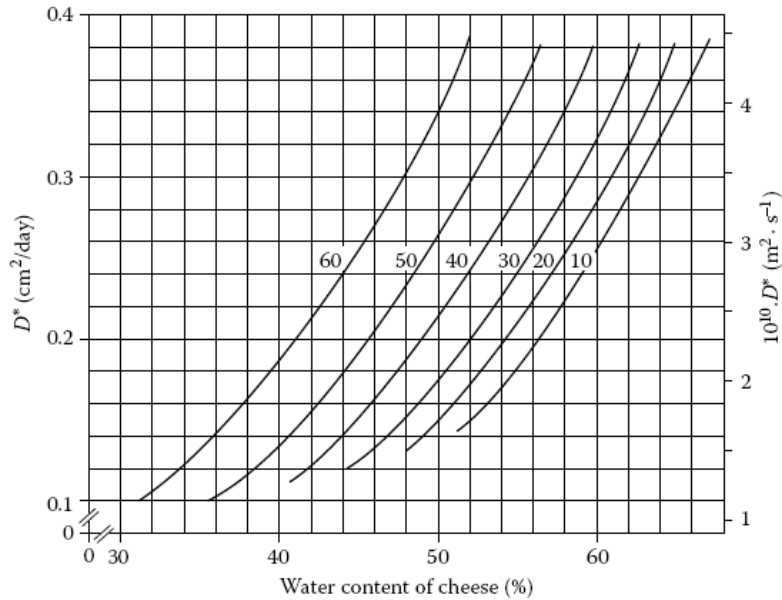
H<sub>2</sub>O murni pada 12,5°C. Koefisien difusi NaCl dalam air dalam keju ( $D^*$ ) sebagai fungsi dari kadar air awal keju dapat dilihat pada Gambar 13.

Dimulai dari model struktur keju yang disederhanakan dan mempertimbangkan efek relatif dari faktor-faktor yang mengganggu yang dibahas, Geurts *et al.* (1974) mendalilkan koefisien 'pseudo-difusi' teoritis,

$$D^* = \frac{0.8 \times DS}{\lambda_T \lambda_\rho \eta_{rel}}$$

Sedangkan model struktur keju diadopsi oleh Geurts *et al.* (1974) disederhanakan mengingat hasil pemeriksaan mikroskop elektron pada keju, impedansi yang dihitung berasal darinya cukup untuk menjelaskan koefisien difusi yang sangat rendah dari NaCl dalam kelembaban keju dan variasi  $D^*$  dengan variasi komposisi keju dan kondisi pengasinan. Menggunakan model prediksi yang dikembangkan, studi ini menemukan korelasi yang erat antara data eksperimen dari studi sebelumnya (Geurts *et al.*, 1974; Guinee dan Fox, 1983) dan tingkat garam dan kelembaban yang diprediksi dalam keju.

Struktur mikro keju Ragusano bertepatan dengan perubahan komposisi kimia dan volume keju yang diamati. Pada 20°C, pengasinan dengan kadar garam terendah NaCl 2% hanya menghasilkan peningkatan volume sebesar 4%, dan matriks protein keju ini (Gambar 15a) tampak lebih mengembang daripada keju yang direndam pada NaCl 10% (Gambar 15b) yang mengalami penurunan volume 3% (Fuca *et al.*, 2012). Ketika porositas keju dalam gambar ini dihitung sebagai porositas rata-rata dari 5 bidang yang diamati, keju yang diasinkan dalam 10% NaCl memiliki nilai rata-rata porositas 12,6% (Gambar 15b), sedangkan porositas keju dari 2 % air garam adalah 14,4%. Keju dengan kadar garam yang lebih tinggi memiliki area yang lebih kecil dan pori-pori yang lebih banyak, yang menegaskan bahwa susut terjadi pada keju yang diasinkan pada 10% NaCl air garam (Fuca *et al.*, 2012).



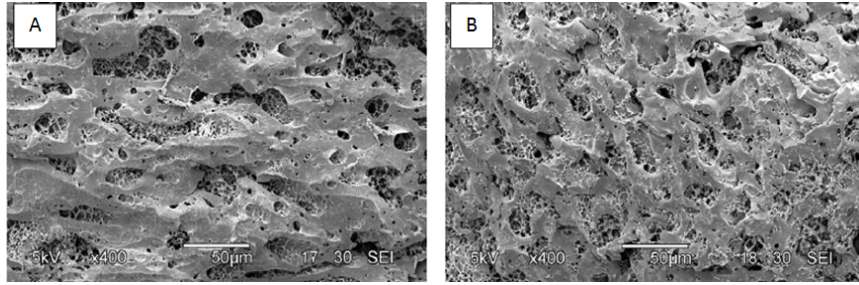
**Gambar 13 Koefisien difusi NaCl dalam air dalam keju ( $D^*$ ) sebagai fungsi dari kadar air awal keju.**

Parameternya adalah g lemak/100 g bahan kering pada *unsalted cheese*.

Sumber: Walstra *et al.* (2005).

#### *Pencampuran Langsung dengan Dadih*

Ketika garam kering didistribusikan di atas permukaan dadih giling atau butiran dadih, beberapa NaCl larut dalam kelembaban permukaan dan berdifusi perlahan ke dalam jarak pendek (Breene *et al.*, 1965; Sutherland, 1974). Hal ini menyebabkan aliran balik whey dari dadih ke permukaan yang melarutkan kristal garam yang tersisa dan, pada dasarnya, menciptakan larutan garam lewat jenuh di sekitar setiap partikel, asalkan pencampuran dadih dan garam cukup. Namun, karena rasio luas permukaan terhadap volume dadih yang relatif besar secara keseluruhan, penyerapan garam terjadi dari banyak permukaan secara bersamaan dan lebih sedikit waktu yang dibutuhkan untuk penyerapan garam dalam jumlah yang cukup dalam dadih giling penggaraman kering (10-20 menit) dibandingkan dengan keju utuh yang *brining* (0,5-5 hari tergantung pada partikel yang terkuras melalui massa dadih (Sutherland, 1974), sementara lebih banyak yang dikeluarkan secara fisik dari partikel dadih selama pengepresan dan hilang dalam 'tekan whey'. rasio garam/luas permukaan biasanya rendah, dan periode kontak permukaan dadih dengan lapisan air garam pekat relatif singkat (yaitu periode 20 menit), sedikit kontraksi protein permukaan lokal yang terjadi dibandingkan dengan dadih asin kering yang dicetak (Sutherland, 1974).



**Gambar 14 Scanning electron micrograph (SEM) keju Ragusano yang diasinkan pada (a) 2% NaCl, 0,1% Ca, dan 20°C; (B) 10% NaCl, 0,1% Ca, dan 20°C**  
*Sumber: Fuca et al. (2012)*

### *Penggaraman Permukaan Kering*

Balok dadih dapat dianggap sebagai partikel yang sangat besar dan larutan garam kering di lapisan kelembaban permukaan merupakan prasyarat untuk penyerapan garam dalam metode ini juga. Aliran balik kelembaban dari keju menciptakan lapisan air garam jenuh pada permukaan keju dan penyerapan garam kemudian terjadi oleh proses difusi yang terhambat. Karena permukaan kontak dengan air garam pekat untuk waktu yang lama (beberapa hari), ada kontraksi yang cukup besar dari permukaan dadih (penggaraman protein) dan ini mungkin menyebabkan hilangnya kelembaban yang relatif tinggi dari daerah permukaan dan karenanya pengurangan dalam mobilitas ke dalam NaCl yang menyumbang tingkat penyerapan garam yang lebih rendah dalam metode ini daripada dalam pengasinan (Godinho dan Fox, 1981; Melilli *et al.*, 2003).

### *Reologi dan Tekstur Keju*

#### *Reologi Keju*

Reologi bahan, misalnya keju, dapat didefinisikan secara sederhana sebagai studi tentang deformasi dan alirannya ketika mengalami tegangan atau regangan. Sifat reologi keju adalah yang menentukan responnya terhadap tegangan atau regangan, seperti yang diterapkan, misalnya, selama kompresi, geser atau pemotongan. Dalam praktiknya, tegangan dan regangan tersebut diterapkan pada keju selama pemrosesan (misalnya, pembagian, pengirisan, pengirisan dan pamarutan) dan konsumsi (pengirisan, penyebaran, pengunyahan dan pengunyahan). Menurut O'Callaghan dan Guinee (2004), sifat reologi keju sangat penting karena mempengaruhi karakteristik penanganan, porsi dan pengemasannya;

1. Tekstur dan kualitas makannya, karena menentukan upaya yang diperlukan untuk mengunyah keju atau sebagai alternatif, tingkat pengunyahan yang dicapai untuk tingkat pengunyahan tertentu.
2. Tingkat pengunyahan yang diperlukan, pada gilirannya, dapat mempengaruhi sifat rasa/aroma dan kesesuaian keju untuk kelompok konsumen yang berbeda (misalnya, anak-anak, usia);
3. penggunaan keju sebagai bahan, karena mempengaruhi perilakunya saat mengalami metode pengurangan ukuran yang berbeda (seperti merobek-robek, memarut, atau memotong) dan bagaimana keju berinteraksi dan bercampur dengan bahan lain dalam makanan yang mengandung keju.
4. kemampuannya untuk mempertahankan bentuk tertentu pada suhu tertentu atau saat ditumpuk;
5. kemampuannya untuk menahan gas dan karenanya membentuk mata atau retakan atau membengkak.

Reologi keju adalah fungsi dari komposisinya, struktur mikro (yaitu, susunan struktural komponennya), keadaan fisiko-kimiawi komponennya, dan struktur makronya, yang mencerminkan adanya heterogenitas seperti sambungan butiran dadih, retakan dan celah. Sifat fisikokimia meliputi parameter seperti tingkat koalesensi lemak, rasio lemak padat-cair, derajat hidrolisis dan hidrasi matriks parakasein, dan tingkat gaya tarik antar molekul antara molekul parakasein. Oleh karena itu, karakteristik reologi sangat berbeda dengan varietas dan umur keju.

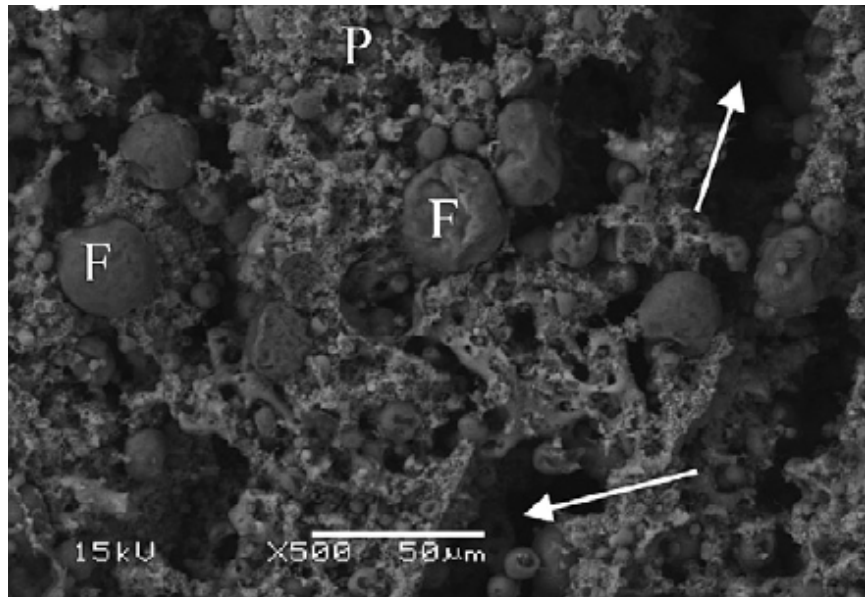
### *Struktur keju*

Keju pada dasarnya adalah gel protein pekat, yang menutupi lemak dan kelembapan. Gelasi disebabkan oleh salah satu dari mekanisme berikut (lihat sub-bab Formasi, Sifat Struktural dan Rheologi Gel Susu Koagulasi Asam):

1. pengasaman diam lambat (misalnya, menggunakan kultur starter atau asam food grade dan/atau acidogen), pada suhu 20-40°C hingga pH isoelektrik kasein, yaitu ~ 4,6;
2. sensitisasi kasein menjadi kalsium melalui hidrolisis kasein penstabil misel utama, kappa-kasein, dengan menambahkan proteinase asam (yaitu, rennet); kombinasi asam dan panas, misalnya memanaskan susu hingga 90°C pada pH 5,6.

Sifat fisiko-kimia matriks para-kasein dan komponen tertutup dapat disimpulkan dari pengamatan mikrostruktur, analisis komposisi dan pertimbangan teoritis kimia konversi susu menjadi keju dan partisi komponen (misalnya, garam susu) antara whey dan dadih keju (Walstra *et al.*, 2005). Keju rennet-dadiah alami pada dasarnya adalah matriks kalsium fosfat-para-kasein partikulat, terdiri dari untaian yang saling berhubungan dan tumpang tindih dari agregat para-kasein yang sebagian menyatu (pada gilirannya terbentuk dari misel para-kasein yang menyatu). Integritas matriks dipertahankan oleh berbagai atraksi hidrofobik dan elektrostatik intra dan inter-agregat. Pada keju muda, matriks memiliki struktur 'internal' yang terdiri dari jaringan yang relatif longgar dari partikel yang dapat dikenali dengan jelas (misel para-kasein dan agregat misel para-kasein) yang bersentuhan dengan partikel tetangga di sebagian permukaannya (O' Callaghan dan Guinea, 2004). Fusi berkelanjutan partikel para-kasein selama pematangan menyebabkan pengurangan bertahap dalam tingkat struktur matriks internal, seperti yang tercermin oleh hilangnya batas antar partikel dan pembentukan massa yang lebih homogen (Kimber *et al.*, 1974; de Jong, 1978). ). Jaringan para-kasein pada dasarnya kontinu, meluas ke segala arah, meskipun beberapa diskontinuitas ada dalam matriks pada tingkat mikro dan makro-struktural. Ruang kosong yang ditunjukkan sebagai bagian dari profil mikrostruktur kadang-kadang dirasionalisasikan oleh teori hidrasi e yang menyatakan bahwa ekspresi whey adalah hasil dari pembengkakan serat para-kasein selama penyimpanan berpendingin (Auty *et al.*, 2001). Contoh matriks dalam keju ditunjukkan pada Gambar 15.

Perubahan fisiko-kimia utama terjadi pada fase protein dan lemak keju selama pematangan. Ini termasuk hidrolisis parsial matriks yang terdiri dari para-kasein, peningkatan hidrasi para-kasein, dan koalesensi butiran lemak, menghasilkan pembentukan kumpulan lemak (Fox *et al.*, 2000; O'Callaghan dan Guinee, 2004) . Perubahan ini dimediasi oleh sisa rennet, mikroorganisme dan enzimnya, dan perubahan keseimbangan mineral antara serum dan matriks para-kasein. Jenis dan tingkat perubahan fisiko-kimiawi tergantung pada variasi dan komposisi keju dan kondisi pematangan. Perubahan ini membantu dalam konversi dadiah 'hijau' segar menjadi keju matang dan sangat mempengaruhi karakteristik reologi, tekstur, fungsional dan rasa (O'Callaghan dan Guinee, 2004).



**Gambar 15** Pemindaian mikrograf elektron (500x) dari matriks keju whey kontrol. Panah menunjuk pada rongga gelap (→), F menunjukkan butiran lemak, dan P menunjukkan jaringan protein.  
*Sumber: Madureira et al. (2011)*

#### *Merayap dan merelaksasi stres dalam keju*

Perilaku reologi keju yang bergantung waktu telah dipelajari (Visser, 1991; Muliawan dan Hatzikiriakos, 2014; Vandenberghe *et al.*, 2014). Creep adalah perubahan regangan terkait waktu pada penerapan tegangan konstan pada bahan seperti keju. Contoh praktis creep terjadi ketika dadih atau keju dikompresi secara bertahap di bawah beratnya sendiri, ditekan atau ditumpuk, misalnya, selama penjualan eceran. Creep ( $J$ ) dapat dinyatakan dalam bentuk regangan atau compliance, yang merupakan rasio regangan terhadap tegangan yang diberikan (Fennema, 1976). Ketika tegangan konstan, diterapkan untuk waktu,  $t$ , menghasilkan regangan,  $\gamma(t)$  maka perumusannya adalah:

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau}$$

Kurva creep untuk keju Cheddar ditunjukkan pada Gambar 16. Tiga daerah karakteristik dapat diidentifikasi. Di daerah elastis (A-B), adalah sesaat dan sepenuhnya reversibel; di wilayah ini, kepatuhan mulur adalah elastis ( $t$ ). Deformasi viskoelastik terjadi di daerah B-C, di mana bahan sebagian elastis dan sebagian kental, kepatuhan mulur adalah elastis terbelakang (JR) dan pemulihan komponen elastis pada penghilangan tertunda. Di wilayah kental (C-D), meningkat

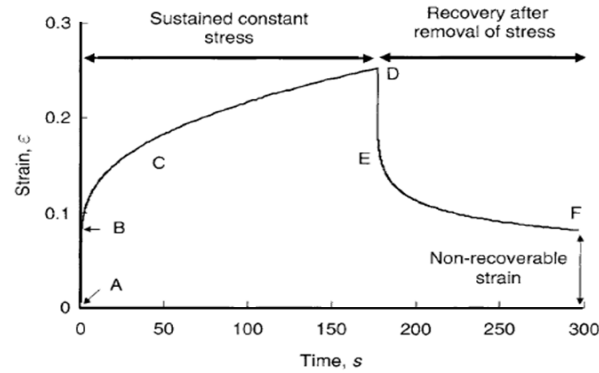
secara linier dengan waktu dan terjadi deformasi permanen; kepatuhan creep disebut sebagai Newtonian (JN).

Ketika matriks kasein struktural menahan tegangan telah retak, keju dikatakan mengalir. Pada skala waktu yang singkat dan  $r$  rendah, sebagian besar varietas keju keras pada dasarnya elastis, sedangkan setelah waktu yang lama, keju tersebut mengalir, meskipun sangat lambat, dan tidak kembali ke bentuk aslinya pada penghilangan tekanan (O'Callaghan dan Guinee, 2004). Kegagalan untuk memahami karakteristik ini sering dapat menyebabkan hilangnya bentuk (misalnya, dimanifestasikan oleh permukaan yang mengembung dan miring) selama penyimpanan, distribusi dan penjualan eceran, terutama jika keju dengan konsistensi yang berbeda diletakkan sembarangan satu sama lain

#### *Model mekanis reologi keju*

Dari kurva creep (Gambar 16), dapat disimpulkan bahwa keju adalah bahan viskoelastik. Ini menunjukkan karakteristik elastis dan kental, tetapi tidak seperti bahan elastis atau kental sejati, hubungan antara tegangan dan regangan tergantung pada besarnya dan durasi tegangan atau regangan yang diterapkan. Pada penerapan tegangan rendah, yaitu cukup kecil sehingga tidak menyebabkan kerusakan permanen atau patah (putusnya ikatan antar elemen struktural) dari struktur mikro, untuk waktu yang singkat, keju berperilaku sebagai padatan elastis (O'Callaghan dan Guinee, 2004). Namun, tegangan rendah yang diterapkan pada skala waktu yang relatif lama menghasilkan regangan yang meningkat, kegagalan struktur secara bertahap dan akhirnya aliran. Oleh karena itu, hubungan antara (atau  $\sigma$ ) dan (atau  $\epsilon$ ) adalah linier hanya pada skala  $r$  dan waktu yang sangat rendah. Di mana linearitas antara  $r$  dan  $\epsilon$  hilang disebut sebagai regangan kritis (yaitu, pada akhir rentang viskoelastik linier), yang untuk sebagian besar makanan padat, termasuk keju, relatif kecil, misalnya 0,02-0,05 (Walstra *et al.*, 2005). Pemodelan reologi keju dimulai dengan hubungan sederhana seperti Hukum Hooke untuk perpindahan kecil di daerah elastis. Di wilayah di luar batas elastis, kadang-kadang disebut sebagai wilayah elastoplastik (yaitu, di mana pemulihan setelah deformasi parsial pada penghilangan tegangan), pemodelan reologi keju membutuhkan model yang lebih kompleks.





**Gambar 16 Kurva creep-relaksasi untuk keju Cheddar matang**

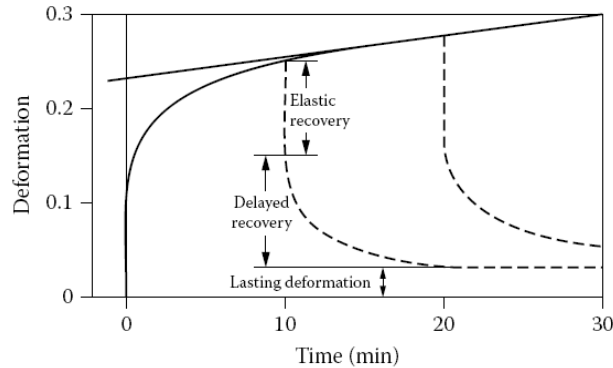
*Sumber: O'Callaghan dan Guinee (2004)*

Beberapa model telah didasarkan pada beberapa badan Kelvin secara seri, atau tubuh Maxwell secara paralel, untuk mensimulasikan creep dan relaksasi tegangan, masing-masing, dalam padatan viskoelastik (Whorlow, 1992); elemen dengan spektrum konstanta waktu digunakan dalam model ini untuk memperkirakan perilaku viskoelastik Representasi mekanis model ini memberikan panduan intuitif tentang sifat viskoelastisitas dan simulasi perilaku reologi berdasarkan persamaan gaya-perpindahan model ini (Whorlow, 1992; Considine *et al.*, 2011)

#### *Tekstur Keju*

#### *Konsistensi Keju*

Ahli rheologi mendefinisikan konsistensi material sebagai ketahanannya terhadap deformasi permanen. Dengan kata lain, ini adalah hubungan antara gaya yang diberikan pada material dan aliran yang dihasilkannya. Dalam praktik sebenarnya, deformasi reversibel (dan karenanya elastis) juga dapat berperan. Biasanya, ketika berbicara tentang konsistensi keju, seseorang mengacu pada semua sifat reologi dan rekahan. Konsistensi keju sangat bervariasi, dari kaku, hampir berbatu (seperti Edam tua) hingga hampir dapat dituang (seperti Camembert yang terlalu matang), atau dari seperti karet (seperti Emmentaler) hingga rapuh dan mudah dioleskan (Gunasekaran dan Ak, 2010). Selain itu, konsistensi dapat bervariasi dalam keju: membandingkan kulit dan pusat, adanya lubang, bintik asam, butiran kristal, dan sebagainya. Ketidakhomogenan seperti itu membuat penentuan konsistensi yang tepat menjadi sulit.



**Gambar 17 Contoh deformasi relatif sepotong keju setelah membawanya di bawah tekanan konstan pada waktu  $t = 0$**   
*Sumber: Walstra et al. (2005)*

Sifat reologi keju dapat ditentukan dengan berbagai cara, yang menyebabkan hasil yang agak berbeda. Seringkali, sepotong keju berbentuk silinder dikompresi di antara pelat paralel. Hal ini dapat dilakukan dengan dua cara. Yang pertama, gaya dijaga konstan, misalnya, dengan meletakkan beban di atas benda uji, dan deformasi diukur sebagai fungsi waktu; contoh diberikan pada Gambar 17.

Perilaku keju di bawah tekanan selalu viskoelastik, seperti yang digambarkan pada Gambar 17. Pada awalnya ada deformasi elastis murni, yang instan dan reversibel. Setelah beberapa waktu terjadi deformasi viskos murni, yang permanen dan sebanding dengan waktu di mana tegangan diterapkan. Di antaranya, perilaku deformasi lebih rumit (Walstra *et al.*, 2005). Namun, besaran parameter reologi (modulus elastik dan viskositas semu) dan skala waktu perubahan dari elastik murni ke viskos murni sangat bervariasi. Selama rentang waktu yang lama, deformasi kental selalu dominan. Berdasarkan jenis pengukuran reologi lainnya, baik elastisitas sejati atau modulus penyimpanan, dan modulus viskos atau kehilangan sejati, dapat ditentukan sebagai fungsi laju deformasi. Dalam praktiknya, seseorang dapat menghitung modulus elastisitas nyata  $E$  (tegangan dibagi dengan deformasi sesaat) dan viskositas nyata  $a$  (tegangan dibagi dengan laju deformasi abadi) dari data seperti yang diilustrasikan pada Gambar 17. Jenis deformasi ini terjadi selama kendurnya keju dan selama pembentukan mata (Gunasekaran dan Ak, 2010).

Kekerasan keju dapat didefinisikan sebagai modulus atau tegangan patah. Yang terakhir tampaknya lebih tepat karena orang biasanya tertarik pada deformasi yang menyebabkan keju pecah berkeping-keping. Metode yang diterapkan dalam praktik untuk mengkarakterisasi kekencangan keju sering menentukan besaran yang berhubungan dengan tegangan patah,

misalnya, gaya yang dibutuhkan untuk menekan plunger dengan diameter tertentu pada kecepatan tertentu ke dalam keju (Walstra *et al.*, 2005). Selain spesifikasi 'keras' dan 'lunak', karakteristik penting dari konsistensi keju adalah apakah keju itu pendek atau panjang. Pasir basah dan karet gelang adalah contoh untuk menggambarkan ekstrem pada skala pendek ke panjang. Keju yang panjang kenyal tetapi tidak keras; sepotong itu dapat ditekuk jauh sebelum patah (Walstra *et al.*, 2005). Keju pendek benar-benar mengisi penggerek karena deformabilitas elastisnya lebih kecil. Selain itu, jika keju yang terakhir lunak, itu plastis dan dapat dioleskan, sedangkan keju yang keras dan pendek akan kaku dan hampir rapuh. Sifat, pendek dan panjang, jelas terkait dengan gaya kohesi antara 'partikel' keju. Kependekan paling baik didefinisikan dalam hal deformasi yang dibutuhkan untuk patah (Walstra *et al.*, 2005).

#### *Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Konsistensi Keju*

Beberapa faktor mempengaruhi konsistensi keju, tetapi tidak mudah untuk membangun hubungan kuantitatif: Seseorang tidak dapat memvariasikan satu faktor tanpa mengubah faktor lainnya. Selain itu, variabel yang sama dapat mempengaruhi keju muda dan keju tua dengan cara yang berbeda.

1. Suhu: Jika keju mengandung banyak lemak, suhu sangat mempengaruhi E dan fr. Faktor kunci dengan demikian adalah pencairan lemak. Dalam keju rendah lemak, E menurun sekitar 30% ketika suhu dinaikkan dari 15 menjadi 25°C, dan sekitar 80% dari 15 menjadi 60°C (Gunasekaran dan Ak, 2010; Rodriguez-Aguilera *et al.*, 2011 ).
2. Kadar lemak: Dari apa yang disebutkan, jelas bahwa pengaruh kadar lemak sangat tergantung pada suhu (Floury *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2009). Kebetulan, keju dari jenis yang sama tetapi dengan kandungan lemak yang lebih tinggi dalam bahan kering umumnya memiliki kadar air yang lebih tinggi dalam keju bebas lemak, dan dengan demikian E dan fr yang lebih rendah (Walstra *et al.*, 2005).
3. Kadar air: Kadar air dalam keju bebas lemak memiliki pengaruh yang sangat besar pada E. Perhatikan skala logaritmik pada gambar. Jaringan parakasein merupakan penyebab utama dari kekakuan keju dan oleh karena itu, konsentrasi parakasein akan memiliki pengaruh yang cukup besar. Penurunan kadar air lebih lanjut (misalnya satu unit persentase) memiliki efek yang lebih kuat jika kadar air sudah rendah (Mateo *et al.*, 2009). Kadar air hampir tidak

mempengaruhi fr (setidaknya jika laju deformasi tidak terlalu lambat), tetapi dapat mempengaruhi mode rekahan (Walstra *et al.*, 2005).

4. Keasaman: pH memiliki pengaruh yang cukup besar pada setiap parameter konsistensi dan juga pada mode rekahan. Sesak pasti terpengaruh. Keju 'terpanjang' pada pH sekitar 5,3. Hubungan antara pH dan konsistensi mungkin, bagaimanapun, tergantung pada faktor-faktor lain (Gunasekaran dan Ak, 2010) dan karena itu agak tidak pasti.
5. Kalsium fosfat: Pengaruh kandungan kalsium fosfat tidak cukup diketahui karena tidak dapat divariasikan secara independen. Diduga, kalsium fosfat meningkatkan E dan fr, tetapi pengaruhnya tidak besar kecuali perbedaannya besar (Walstra *et al.*, 2005).
6. Kandungan garam: Seringkali, kandungan garam yang lebih tinggi dikaitkan dengan modulus yang jauh lebih tinggi, tetapi penyebab utamanya mungkin karena, dalam praktiknya, kandungan garam yang lebih tinggi sebagian besar melibatkan kandungan air yang lebih rendah. Ada penurunan fr yang tiba-tiba dan kuat pada sekitar 2,5% garam, yaitu 5% NaCl di dalam air (Walstra *et al.*, 2005; Bachmann *et al.*, 2009). Keju dengan kandungan garam tinggi dan pH rendah terlalu pendek.
7. Degradasi protein: Proteolisis memiliki efek yang cukup besar. Namun, efek tepatnya kurang diketahui karena begitu banyak faktor lain yang juga berubah ketika keju matang (Buňka *et al.*, 2008; Gunasekaran dan Ak, 2010). Penguraian kasein dapat dipastikan menyebabkan penurunan fr dan fr.

#### *Patogen dan Cacat Mikroba pada Keju*

Beberapa mikroorganisme yang ada dalam keju atau pada permukaannya dapat menyebabkan cacat rasa dan atau tekstur. Mikroorganisme dalam susu hampir seluruhnya terperangkap dalam dadih, dan ini meningkatkan jumlah mereka per gram keju dengan faktor 7 hingga 11 (Walstra *et al.*, 2005), dibandingkan dengan jumlah per mililiter susu beku. Namun demikian, pertumbuhan mikroorganisme hampir selalu diperlukan untuk menghasilkan cacat. Pertumbuhan ditentukan oleh faktor-faktor berikut (Walstra *et al.*, 2005):

1. Komposisi mikroba susu: Aspek penting adalah tindakan higienis selama pemerahan dan penanganan susu; ini sangat penting untuk keju yang terbuat dari susu mentah; pasteurisasi susu yang rendah membunuh sebagian besar organisme pembusuk (kecuali spora *Clostridium*); bacto-fugation secara substansial dapat mengurangi jumlah mikroba, termasuk jumlah spora *Clostridium*; kontaminasi ulang susu setelah pasteurisasi atau bacto-fugation.

2. Langkah-langkah untuk mencegah kontaminasi selama pembuatan dan pengawetan keju: Pembersihan peralatan secara teratur, pengolahan air garam (misalnya dengan mikrofiltrasi) dan kebersihan secara keseluruhan adalah penting.
3. Tindakan untuk membatasi pertumbuhan mikroorganisme selama pembuatan dan pematangan keju: Ini mungkin melibatkan penambahan inhibitor pada susu atau dadih, meningkatkan kecepatan dan kelengkapan fermentasi laktosa, dan pencegahan pertumbuhan organisme pada kulit .
4. Sifat fisikokimia keju: Secara khusus, kandungan asam laktat dan pH, kandungan NaCl, keberadaan gula, suhu, waktu pematangan, dan kelembaban relatif udara, menentukan apakah mikroorganisme dapat tumbuh di dalam atau di atas keju, seperti serta metabolit yang tidak diinginkan yang dapat mereka hasilkan.

Pertumbuhan bakteri dapat menyebabkan berbagai macam rasa tidak enak. Cacat tekstur umumnya karena produksi gas yang berlebihan, yang menyebabkan lubang besar atau banyak pada keju. Ini bisa menjadi 'peniupan awal,' yang terjadi dalam beberapa hari setelah pembuatan, atau 'peniupan terlambat,' yang terjadi setelah beberapa minggu.

### *Bakteri Coliform*

Bakteri Coliform jarang menyebabkan cacat pada keju yang dibuat dari susu pasteurisasi, karena mereka terbunuh oleh perlakuan panas ini. Namun, dalam praktiknya, sedikit kontaminasi ulang pada susu hampir tidak dapat dihindari; ini umumnya menyangkut bakteri asal nonfecal (Ledenbach dan Marshall, 2010), misalnya, *Enterobacter aerogenes*. Untuk membatasi kontaminasi, tindakan higienis selama pembuatan dadih harus dipertahankan. Coliform hanya dapat tumbuh selama gula tersedia, karena mereka tidak dapat memfermentasi asam laktat. Bergantung pada tingkat kontaminasi, mereka dapat dengan cepat tumbuh hingga jumlah yang cukup besar selama pembuatan keju, jika suhu dan pH menguntungkan (O'Sullivan *et al.*, 2013).

Metabolit penting yang terbentuk adalah CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>, serta asam laktat, asetat, suksinat dan format, etanol dan 2,3-butanediol (Walstra *et al.*, 2005). Selain itu, rasa tidak enak yang beragi, busuk, dan mengandung gas, sebagian disebabkan oleh beberapa galur yang dapat menyerang produk degradasi protein. Pertumbuhan coliform dapat menyebabkan blowing awal, tetapi tidak dalam semua kasus. Jika semua gula telah dikonsumsi, pembentukan gas tergantung pada keberadaan strain yang dapat memfermentasi asam sitrat. Strain *Escherichia coli* umumnya tidak

dapat melakukan hal ini, sedangkan sebagian besar strain *Enterobacter aerogenes* dapat melakukannya. Namun, pertumbuhan koliform yang tidak menyebabkan blowing, justru menyebabkan terjadinya off-flavors.

Pertumbuhan koliform dapat dicegah dengan menggunakan starter cepat asam yang dengan cepat mengubah laktosa, sehingga menurunkan pH dalam waktu singkat ke tingkat yang menghambat pertumbuhan koliform. Selain itu, setelah pengasaman yang cukup, suhu keju harus diturunkan, dan keju harus diasinkan sesegera mungkin. Perkembangan cacat tekstur akibat bakteri coliform dapat dilawan dengan menambahkan garam pengoksidasi dalam jumlah yang cukup ke dalam susu keju, yaitu natrium atau kalium nitrat (Bintsis, 2008). Pertumbuhan bakteri coliform tidak dihambat oleh nitrat, produksi CO<sub>2</sub> tidak terpengaruh, dan pengembangan rasa tidak enak tidak dicegah.

#### *Bakteri asam butirat*

Fermentasi asam butirat dapat menyebabkan cacat tekstur dan rasa. Dalam kasus yang serius, retakan atau lubang bulat besar terbentuk di dalam keju, begitu juga dengan rasa yang tidak enak. Karena itu, pertumbuhan bakteri asam butirat dalam keju dianggap sebagai cacat serius. Peniupan asam butirat memanifestasikan dirinya setelah beberapa minggu, atau bahkan berbulan-bulan, dan dengan demikian merupakan contoh peniupan yang terlambat. *Clostridium tyrobutyricum* adalah agen utama penyebab cacat; tidak seperti clostridia fermentasi laktat lainnya, ia tidak menguraikan laktosa (Walstra *et al.*, 2005). *C. butyricum* juga dapat menyebabkan cacat. Fermentasi asam butirat dalam keju tergantung pada:

1. Jumlah spora bakteri asam butirat yang ada dalam susu keju dan virulensinya setelah perkecambahan: Silase berkualitas buruk merupakan sumber utama kontaminasi karena mengandung sejumlah besar spora, yang bertahan melalui saluran pencernaan sapi dan terakumulasi dalam kotoran (Ledenbach *et al.*, 2010). Jumlahnya selanjutnya ditentukan oleh standar higienis selama pemerahan. Jika silase diumpankan ke sapi, bahkan metode pemerahan modern tidak dapat sepenuhnya mencegah kontaminasi susu oleh spora melalui jejak kotoran di permukaan ambing. Spora bertahan dari pasteurisasi susu keju. Jumlah mereka dapat dikurangi menjadi sebagian kecil dengan bacterofugation susu. Standar higienis yang ketat selama pengumpulan susu, bagaimanapun, sangat penting untuk jenis keju di mana

jumlah spora yang sangat rendah dalam susu (sekitar 5 sampai 10 per liter) dapat menyebabkan kerusakan asam butirat (Garde *et al.*, 2011). ).

2. Kandungan asam laktat pada keju: Asam laktat tak terdisosiasi tingkat tinggi memiliki efek penghambatan pertumbuhan; pada pH yang lebih rendah, sebagian kecil asam laktat terdisosiasi. Tidak pasti sejauh mana pH, dengan demikian, adalah penting. Pada pH yang sangat rendah (misalnya, 4,6), fermentasi asam butirat belum diamati (Smit *et al.*, 2005; Bogovič Matijašić *et al.*, 2007; Ledenbach *et al.*, 2010).
3. Kandungan NaCl dari kelembapan keju: Efek penghambatan pertumbuhannya sangat bergantung pada kandungan asam laktat. Semakin tinggi pH, semakin tinggi kandungan garamnya untuk menghindari pertumbuhan *C. tyrobutyricum* (Delves-Broughton, 2005). Tingkat di mana tingkat garam penghambat pertumbuhan dicapai dalam keju juga penting (Upreti *et al.*, 2006), dengan keju di mana garam menjadi perlahan didistribusikan ke seluruh roti, yaitu, keju besar yang diasinkan.
4. Penambahan nitrat: Sejak sekitar tahun 1830, nitrat telah ditambahkan ke dalam susu keju untuk mengontrol fermentasi asam butirat dalam keju, terutama pada varietas yang memiliki pH awal yang baik untuk fermentasi dan mengalami proses penyerapan garam yang lambat seperti yang terjadi di Gouda -jenis keju (Walstra *et al.*, 2005). Nitrat seperti itu tidak efektif; mekanisme penghambatan memerlukan adanya enzim xanthine oxidase (Silankove *et al.*, 2005), yang mereduksi nitrat menjadi nitrit. Nitrit, atau salah satu produk degradasinya, mencegah perkecambahan spora bakteri, meskipun hanya untuk jangka waktu terbatas. Setelah itu, tindakan penghambatan perlu diambil alih oleh kandungan garam dalam air yang cukup tinggi (Bogovič Matijašić *et al.*, 2007).

Penambahan lebih banyak nitrat menyebabkan tingkat nitrat yang lebih tinggi dalam keju pematangan. Selama pematangan, konsentrasi terus menurun, turun lebih cepat jika konsentrasi awal lebih tinggi, tetapi sejumlah residu tertentu yang tersisa. Tingkat nitrat yang lebih tinggi hanya sementara meningkatkan konsentrasi nitrit. Yang terakhir, bagaimanapun, tetap rendah; dalam keju Gouda jumlah nitrit maksimum sudah tercapai ketika hanya sebagian kecil dari jumlah nitrat yang hilang (Walstra *et al.*, 2005). Penyebab hilangnya nitrat dan nitrit tidak diketahui secara pasti.

Hembusan asam butirat dalam keju ditentukan oleh interaksi berbagai faktor yang disebutkan. Setelah fermentasi dimulai, fermentasi berlanjut pada tingkat yang terus meningkat

karena menyebabkan pH naik, yang pada gilirannya mendukung kondisi untuk pertumbuhan bakteri. Sejumlah besar coliform dapat meningkatkan fermentasi asam butirat karena mereka dengan cepat mengkonsumsi nitrat. Pertumbuhan lactobacilli pereduksi nitrat mesofilik mungkin memiliki efek yang sama. Keju yang dibuat dari susu yang dipanaskan sedemikian rupa sehingga xanthine oxidase menjadi tidak aktif (Kelly dan Fox, 2006) sangat rentan terhadap fermentasi asam butirat.

Akibatnya, metode alternatif untuk mencegah fermentasi asam butirat telah dikembangkan. Bactofugation susu keju: Sejumlah nitrat masih diperlukan, tetapi bisa jauh lebih kecil, misalnya, 2,5 g daripada 15 g nitrat per 100 kg susu. Biasanya, 2,5 g lisozim ditambahkan per 100 L susu keju, yang sesuai dengan 500 unit enzim per ml susu (250 hingga 300 mg per kg keju); itu tidak berbahaya bagi manusia. Karena hubungannya dengan misel kasein, lisozim hampir seluruhnya dipertahankan dalam keju. Kerja enzim didasarkan pada pecahnya ikatan peptidoglikan di dinding sel bakteri, menyebabkan lisis. Dalam kasus *C. tyrobutyricum*, lisis dimulai pada spora yang berkecambah (Schneider *et al.*, 2010). Lisozim tidak aktif ketika kandungan NaCl tinggi (misalnya, 5% NaCl dalam air). Bakteri Gram- positif cenderung jauh lebih rentan terhadap lisozim daripada bakteri gram negatif. Pada konsentrasi enzim yang sedang, bakteri asam laktat sedikit terpengaruh atau tidak terpengaruh sama sekali (Amiri *et al.*, 2010). Bakteri asam propionat juga tidak terlalu sensitif terhadap lisozim sehingga dapat digunakan dalam pembuatan keju Emmentaler. Dosis lisozim yang biasa untuk mencegah fermentasi asam butirat, tidak cukup untuk setiap keju karena beberapa jenis bakteri asam butirat (mungkin *C. butyricum*) tidak terlalu sensitif terhadap lisozim. Oleh karena itu, penambahan beberapa nitrat secara simultan mungkin diperlukan.

Dalam beberapa kasus, formaldehida ditambahkan, yang merupakan penghambat kuat fermentasi asam butirat. Namun, penggunaannya ilegal di sebagian besar negara. Beberapa strain starter *Lactococcus lactis* menghasilkan bakteriosin, misalnya nisin (Ghraiiri *et al.*, 2005; Delves-Broughton, 2005), yang aktif dalam mengendalikan pertumbuhan clostridia. Namun, banyak bakteri starter lainnya juga sensitif terhadapnya. Oleh karena itu, strain starter penghasil nisin hanya dapat digunakan dalam kombinasi dengan bakteri starter lain yang tidak sensitif terhadap nisin.



## *Lactobacillus*

Pembentukan retakan pada keju keras dan semikeras sering dikaitkan dengan adanya laktobasilus heterofermentatif. Retakan ini sebagian besar disebabkan oleh pembentukan CO<sub>2</sub> yang berlebihan dari karbohidrat, sitrat, atau, kemungkinan besar, dari asam amino. Selama reaksi dekarboksilasi terakhir, amina dapat terbentuk (Fernandez *et al.*, 2007). Selain pembentukan gas, terjadinya cacat rasa juga berhubungan dengan produk metabolisme asam amino yang dibentuk oleh lactobacilli. Cacat rasa ini telah ditandai sebagai belerang, fenolik, busuk, dan bertepung. Heterofermentatif obligat *Lb. singkat*, *Lb. buchneri* dan *Lb. fermentum* diakui sebagai spesies yang paling umum menyebabkan cacat pada keju (Ledenbach *et al.*, 2010). Spesies yang dipilih dengan cermat dari lactobacilli heterofermentatif fakultatif, diisolasi dari keju Cheddar, digunakan sebagai starter sekunder untuk memberikan kontribusi positif pada pembentukan rasa dan untuk mempercepat pematangan. Pentingnya bakteri asam laktat nonstarter ini dalam pengembangan rasa keju tidak sepenuhnya jelas (Walstra *et al.*, 2005).

Susu mentah dan lingkungan pabrik adalah sumber utama lactobacilli dalam keju. Meskipun bakteri dibunuh dengan pasteurisasi rendah, mereka dapat mencemari peralatan drainase dadih yang terus beroperasi dan setelah multiplikasi, masukkan keju dalam jumlah yang cukup untuk berkembang biak selama pematangan. Sumber penting lain dari lactobacilli adalah air garam. Beberapa spesies, terutama *lactobacilli heterofermentatif obligat*, sangat tahan garam dan dapat bertahan bahkan dengan adanya lebih dari 15% NaCl (Gala *et al.*, 2008). Lactobacilli biasanya tidak tumbuh di air asin, tetapi mereka dapat tumbuh di endapan di dinding cekungan dan kandang tepat di atas permukaan air asin. Kondisi pertumbuhan untuk laktobasilus lebih menguntungkan dalam endapan ini karena peningkatan pH sebagai akibat dari pertumbuhan ragi yang toleran garam, kandungan NaCl yang lebih rendah karena penyerapan uap air dari udara, dan suhu yang sedikit lebih tinggi daripada suhu lingkungan. air asin. Langkah-langkah untuk menjaga jumlah lactobacilli rendah termasuk langkah-langkah higienis yang memuaskan di ruang brining (misalnya, menghilangkan endapan), mempertahankan kandungan NaCl dari air garam setidaknya 16%, dan pH <4,5 (Walstra *et al.*, 2005) . Jelas, kontaminasi susu keju dan peralatan oleh bakteri ini harus dihindari.

### *Streptococcus tahan panas*

Meskipun *S. thermophilus* digunakan sebagai starter dalam kasus keju yang dibuat dengan kultur termofilik, beberapa strain dapat menyebabkan cacat pada keju yang dibuat dengan starter mesofilik. Tidak seperti *lactococci mesophilic*, mereka tumbuh pada suhu 45°C dan bertahan dari termalisasi dan pasteurisasi susu yang rendah (Walstra *et al.*, 2005; Atamer dan Hinrichs, 2010). Selama perlakuan panas ini, mereka mungkin menempel pada dinding bagian pendingin di penukar panas dan berkembang biak dengan sangat cepat (waktu pembangkitan minimum sekitar 15 menit). Penggunaan penukar panas secara terus menerus untuk waktu yang lama tanpa campur tangan pembersihan dapat menyebabkan kontaminasi berat pada susu keju, dengan jumlah mencapai 10<sup>6</sup> bakteri per ml. Konsentrasi dalam dadih dan pertumbuhan selama tahap awal pembuatan keju dapat meningkatkan jumlah bakteri hingga lebih dari 10<sup>8</sup> per g keju (Atamer dan Hinrichs, 2010).

### *Bakteri asam propionat*

Pada kebanyakan keju, pertumbuhan berlebihan dari bakteri ini menyebabkan cacat. Bakteri dibunuh dengan pasteurisasi susu yang rendah. Jelas, mereka sebagian besar tertarik pada pembuatan keju susu mentah. Spesies yang paling penting adalah *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* (Thierry *et al.*, 2011). Sebagian besar spesies memfermentasi laktosa, dan semua memfermentasi asam laktat. Dalam keju, fermentasi laktosa tidak diperhatikan karena bakteri berkembang biak dengan lambat dan tidak dapat bersaing dengan bakteri starter. Asam laktat diubah menjadi asam propionat, asam asetat, CO<sub>2</sub>, dan air, menurut rumus umum (Jay *et al.*, 2005):  $3 \text{CH}_3\text{-CHOH-CO}_2\text{H} \rightarrow 3 \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H} + 3 \text{CH}_3\text{-CO}_2\text{H} + 3 \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$ .

pH keju sedikit meningkat karena fermentasi. Fermentasi asam propionat yang berbeda menghasilkan pembentukan gas yang berlebihan dan pengembangan rasa manis. Dalam keju jenis Gouda, fermentasi seperti itu dianggap sebagai cacat (Walstra *et al.*, 2005). Karena bakteri tumbuh sangat lambat dalam keju, cacat serius apa pun hanya muncul setelah waktu pematangan yang lama dan merupakan bentuk peniupan yang terlambat.

### *Mikroba lainnya*

Pertumbuhan khamir dan bakteri coryneform yang melimpah pada permukaan keju dapat menyebabkan kulit berlendir dan penampilan berwarna sebagian atau merah muda. Pertumbuhan

organisme ini ditingkatkan oleh pengeringan kulit yang tidak memadai setelah pengasinan, dan juga oleh kandungan laktosa yang signifikan dalam kulit karena pengasaman keju yang tidak mencukupi, dengan pengasinan keju dalam air garam yang lemah dengan pH tinggi, dan karena penggunaan rak yang tidak dibersihkan dengan baik di ruang pengawetan (Walstra et al., 2005).

Beberapa mikroorganisme dapat menyebabkan cacat rasa, terutama pada keju susu mentah. Diantaranya adalah khamir (ragi, rasa buah; Das *et al.*, 2005), *Lactococcus lactis* var. *maltigenes* (rasa terbakar; Centeno *et al.*, 2002) dan *Enterococcus malodoratus* (rasa seperti H<sub>2</sub>S, mengandung gas, tidak bersih; Foulquié Moreno *et al.*, 2006); jika ada dalam jumlah yang meningkat enterococci ini juga dapat menyebabkan cacat tekstur karena produksi CO<sub>2</sub> dari asam amino. Banyak organisme dapat menyebabkan rasa pahit pada keju (Stadhouders *et al.*, 1983; Lemieux dan Simard, 1991).

Peningkatan kadar psikrotrof atau lipase termostabilnya dalam susu keju dapat menyebabkan keju menjadi tengik. Jika pembentukan gas berlebihan, bau dan rasa keju dapat menunjukkan jenis fermentasi yang terlibat. Untuk menentukan jenis fermentasi pada keju dengan cacat yang kurang serius, penentuan potensial redoks (Eh) sangat penting (Caldeo dan McSweeney, 2012). Dalam keju dengan pH ~5,2, di mana tidak ada gas yang terbentuk selain beberapa CO<sub>2</sub>, Eh berkisar antara -140 hingga -150 mV, yang diukur dengan elektroda hidrogen normal. Pada keju dengan pembentukan H<sub>2</sub> dan pH yang sama, Eh turun menjadi -250 hingga -300 mV (Caldeo dan McSweeney, 2012).

---

## ***BAB V PEMBUATAN KEJU***

---

Produksi keju yang dikoagulasi rennet dapat dibagi menjadi dua fase: konversi susu menjadi dadih dan konversi dadih menjadi keju. Operasi kunci dirangkum dalam Gambar 19. Produksi keju berkualitas baik tergantung pada pasokan susu yang baik dari sudut pandang kimia dan mikrobiologi. Susu mentah adalah komoditas yang agak bervariasi dan mengalami berbagai proses yang bertujuan untuk memodifikasi, menstandarisasi dan mengoptimalkan sifat pembuatan keju dari susu (Walstra *et al.*, 2005). Dengan suplai susu yang baik, tujuan pertama adalah menghasilkan dadih dengan komposisi kimia yang diinginkan dengan mikroflora yang diinginkan. Kecuali kriteria ini terpenuhi, dadih tidak akan berkembang menjadi keju dengan karakteristik rasa, tekstur dan fungsi selama pematangan.

Menghasilkan keju berkualitas premium secara konsisten dengan mengendalikan agen-agen tersebut; namun, terlepas dari penelitian yang cukup besar dan upaya pengendalian kualitas, hal itu belum memungkinkan untuk dilakukan. Berbagai faktor yang sangat luas dan beragam berinteraksi untuk mempengaruhi komposisi dadih keju dan karenanya kualitas keju akhir (Walstra *et al.*, 2005). Beberapa faktor/agen ini dapat dimanipulasi dengan mudah dan tepat sementara yang lain lebih sulit, atau mungkin tidak mungkin, untuk dikendalikan. Memang, pengaruh yang tepat dari banyak faktor pada pematangan dan kualitas keju tidak diketahui secara tepat dan banyak dari faktor tersebut bersifat interaktif. Prinsip-prinsip analisis Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) dapat diterapkan pada produksi keju dan diharapkan artikel ini dapat mendorong upaya penerapan prinsip-prinsip HACCP pada pembuatan keju (Pierson dan Corlett, 1992).

### *Perawatan awal*

Perlakuan yang akan diterapkan pada susu sebelum pembuatan dadih tergantung pada komposisi susu dan sifat-sifat yang seharusnya dimiliki susu. Yang terakhir bervariasi sesuai dengan jenis keju yang akan diproduksi. Berikut ini adalah beberapa aspek penting dari pretreatment:

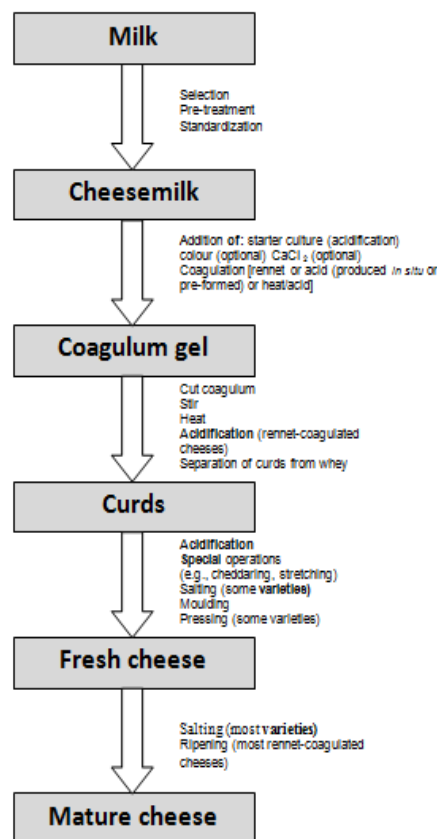
1. Termalisasi, misalnya pemanasan selama 20 detik pada 65°C, jika susu akan tetap dingin selama beberapa waktu: Hal ini bertujuan untuk mencegah pembentukan lipase dan proteinase tahan panas dalam jumlah besar, dan juga dapat mengurangi jumlah dari beberapa bakteri merugikan yang baru saja disebutkan.
2. Penghapusan partikel kotoran: Hal ini dilakukan dengan penyaringan atau sentrifugasi.
3. Standarisasi kandungan lemak susu. Untuk beberapa keju yang terbuat dari sebagian susu mentah yang disaring, misalnya, keju Parmesan, susu dingin secara tradisional dibiarkan menjadi krim, dan lapisan krim dihilangkan. Prosesnya termasuk creaming, kemudian, cepat karena aglutinasi dingin. Krim yang diperoleh mengandung sebagian besar sel somatik dan banyak bakteri yang awalnya ada dalam susu (Govindasamy-Lucey *et al.*, 2011). Proses ini dapat sangat meningkatkan kualitas bakteri dari susu keju. Namun, standarisasi kandungan lemak tidak terlalu akurat. Dalam beberapa kasus, susu didinginkan dalam penukar panas sampai sekitar 5°C untuk mendapatkan pemisahan yang lebih efisien antara krim dan susu skim dan krim yang diperoleh dipasteurisasi; sebagian kemudian ditambahkan ke dalam susu skim mentah untuk mendapatkan kadar lemak yang diinginkan. Prosedur ini memungkinkan standarisasi yang akurat dan meningkatkan kualitas bakteri bahkan lebih. Juga, kandungan lemaknya harus distandarisasi untuk mendapatkan FDM yang diinginkan, yaitu kandungan lemak dalam bahan kering keju (Walstra *et al.*, 2005). Ketika kontrol hasil biasa diterapkan, dan jika untuk varietas keju tertentu proses pembuatannya dijaga konstan, rasio F/C dalam susu dapat dikorelasikan dengan FDM dalam keju, dan korelasinya bisa sangat baik (Nilai C dapat ditentukan dari analisis inframerah susu mentah dan whey yang diperoleh darinya). Hal ini memungkinkan standarisasi kandungan lemak. Jika minimum legal diperlukan, margin keamanan kecil harus diperhatikan, katakanlah 1% FDM. Margin juga diperlukan karena bahan kering tanpa lemak pada keju meningkat akibat proteolisis (Govindasamy-Lucey *et al.*, 2011).
4. Menyesuaikan kandungan protein susu: Hal ini dilakukan oleh beberapa produsen, dan hampir selalu berarti meningkatkan konsentrasi protein (Fox, 2000). Hal ini umumnya dicapai dengan penambahan retentat ultrafiltrasi dari susu (skim); kadang-kadang, susu bubuk skim panas rendah atau susu pekat biasa ditambahkan. Tujuan utama meningkatkan kandungan protein adalah penggunaan mesin yang lebih efisien, karena jumlah keju yang lebih besar dapat dibuat

- dengan peralatan yang sama dalam waktu yang sama (faktor konsentrasi dapat paling banyak 1,4 atau 1,5 saat menggunakan pembuatan dadih tradisional). mesin; Walstra *et al.*, 2005).
5. Pasteurisasi, cukup untuk menonaktifkan alkaline phosphatase: Berfungsi untuk membunuh organisme patogen dan berbahaya. Pasteurisasi yang lebih intens menyebabkan bagian dari protein serum menjadi tidak larut, menyebabkan peningkatan hasil keju; itu menurunkan rennetabilitas dan sineresis (Skeie, 2007; Janhøj dan Qvist, 2010); itu menonaktifkan xanthine oxidase, sehingga meningkatkan risiko pembusukan bakteri. Jika penukar panas beroperasi untuk waktu yang lama tanpa gangguan (Zamora *et al.*, 2012), pertumbuhan *Streptococcus thermophilus* dapat terjadi di dalamnya; akhirnya, sejumlah besar berkembang, menyebabkan cacat rasa (misalnya, rasa busuk dan ragi).
  6. Bactofugation: Ini kadang-kadang diterapkan untuk mengurangi jumlah spora *Clostridium tyrobutyricum* (menjadi sekitar 3%). Penghapusan sedimen yang diperoleh, yang mengandung spora, menyebabkan pengurangan sekitar 6% dalam hasil keju. Oleh karena itu, endapan dipanaskan dengan UHT dan ditambahkan lagi ke dalam susu keju.
  7. Pencegahan kontaminasi ulang (Carrasco *et al.*, 2012)
  8. Pencegahan kerusakan gumpalan lemak: Ini harus dipertimbangkan sehubungan dengan potensi aksi lipase dan dengan 'pengocok', yaitu pembentukan gumpalan lemak yang terlihat; ini melibatkan penggabungan parsial (Fredrick *et al.*, 2010). Kerusakan seperti itu dapat terjadi ketika udara dipompa, terutama jika susu terciprat dari ketinggian ke dalam tong keju.
  9. Membawa susu ke suhu renneting: Dalam banyak kasus, susu dipasteurisasi sesaat sebelum pembuatan keju dan langsung didinginkan hingga suhu renneting, katakanlah, 30°C. Dalam kasus lain, susu (yang dipasteurisasi) tetap dingin (misalnya, 5°C) sebelum pembuatan keju. Kemudian harus dipanaskan sampai 30°C (Walstra *et al.*, 2005). Namun, pemanasan saja mungkin tidak cukup. Ini dapat menyebabkan pengadukan yang baru saja disebutkan. Lebih penting lagi, itu akan menyebabkan renneting dan terutama sineresis berlangsung lebih lambat dari biasanya. Obatnya adalah memanaskan susu hingga, katakanlah, 50°C dan kemudian dinginkan hingga 30°C.
  10. Homogenisasi susu: Hal ini menyebabkan tekstur yang berbeda, pada beberapa keju, tekstur yang tidak diinginkan dan lengket serta lipolisis tambahan (Calligaris *et al.*, 2013). Yang terakhir mungkin diinginkan untuk keju berurat biru.

11. Penambahan zat, antara lain: kalsium klorida, kalium nitrat, zat pewarna (annatto atau karoten).

*Pembekuan yang diinduksi oleh enzim*

Enzim renneting menyebabkan pemecahan kappa-kasein sedemikian rupa sehingga 'rambut' yang menonjol dari misel kasein (lihat sub-bagian "Pembentukan, Sifat Struktural dan Rheologi Gel Susu Koagulasi Asam") menghilang atau, lebih tepatnya, menjadi sangat lebih pendek. Kaseino-makropeptida yang dilepaskan larut, sedangkan para-kasein tetap berada dalam misel. Kasein yang diubah disebut sebagai para-kasein; itu tidak dapat dilarutkan, atau didispersikan, dalam serum susu. Karena itu, misel parakasein dalam agregat susu, asalkan aktivitas  $\text{Ca}^{2+}$  cukup tinggi.



**Gambar 18** Prosedur umum untuk pembuatan keju  
Sumber: Fox *et al.* (2000)

Enzim utama yang digunakan dalam pembuatan keju adalah chymosin (EC 3.4.23.4, MW 35.600, pH isoelektrik 4.65). Ini adalah aspartat-proteinase, karenanya merupakan endopeptidase, yang berarti dapat memecah protein menjadi fragmen yang relatif besar (Barbano dan Rasmussen, 1992). Kimosin terkait dengan enzim lambung umum pepsin (EC 3.4.23.1). Tidak seperti pepsin, chymosin tidak dapat menghidrolisis imunoglobulin kolostrum (yang menjelaskan mengapa anak sapi yang baru lahir menghasilkan chymosin dan tidak ada pepsin). Di perut anak sapi, pro-kimosin yang tidak aktif diekskresikan, yang diubah menjadi bentuk aktif melalui auto-proteolisis terarah (Barbano dan Rasmussen, 1992). Pada pH 6,7 terutama ikatan Phe-Met antara residu 10<sup>5</sup> dan 10<sup>6</sup> kapa-kasein terpecah. Ini adalah reaksi cepat. Agaknya, muatan positif dari wilayah rantai peptida tersebut (Mercier *et al.*, 1971) dan aksesibilitas yang mudah dari wilayah tersebut menjelaskan afinitas yang kuat terhadap situs aktif enzim yang bermuatan negatif. Pada nilai pH yang lebih rendah, chymosin juga dapat memecah ikatan lain di berbagai kasein.

Peptida sintetik yang terdiri dari beberapa residu asam amino di sekitar ikatan Phe-Met kapa-kasein juga mudah dihidrolisis oleh chymosin. Hidrolisis terakhir dapat diterapkan dalam tes untuk memperkirakan kekuatan persiapan rennet. Beberapa chymosin menjadi teradsorpsi ke paracasein, dimana sebagian termasuk dalam keju, jumlah meningkat dengan penurunan pH. Pada pH 6,7 adsorpsi sangat lemah.

Chymosin mudah dinonaktifkan dalam kondisi tertentu (Huppertz *et al.*, 2004). Pada pH rendah ini harus dikaitkan dengan auto-proteolisis (enzim terurai sendiri), pada pH tinggi menjadi (panas) denaturasi. Pada susu segar, inaktivasi yang signifikan sudah terjadi pada suhu serendah 45oC (Huppertz *et al.*, 2004). Garam menghambat inaktivasi; maka rennet komersial dibuat dengan kandungan garam yang tinggi (Guinee dan Fox, 2004; lihat bagian “Pengaruh Garam pada Aktivitas Enzim”).

Beberapa enzim lain dapat digunakan, misalnya pepsin babi (Eino *et al.*, 1976). Ini bertindak seperti chymosin sapi, tetapi pH susu harus sedikit diturunkan untuk mencapai pembekuan yang cepat. Beberapa rennet sayuran ada, baik dari berbagai tanaman atau dari jamur. Yang terakhir termasuk proteinase asam yang diperoleh, misalnya, dari *Rhizomucor miehei* (Preetha dan Boopathy, 1997) atau *Cryphonectria* (sebelumnya disebut *Endothia*) *parasitica* (Kim *et al.*, 2004). Ini dikembangkan sebagai alternatif untuk rennet anak sapi (yang mahal), tetapi cenderung digantikan oleh chymosin rekombinan. Agen pembekuan dari tanaman secara tradisional digunakan untuk varietas keju lokal. Hampir semua rennet alternatif ini memiliki



kesamaan bahwa mereka secara khusus memisahkan ikatan Phe-Met kappa-kasein pada pH fisiologis, tetapi sifat lainnya dapat sangat bervariasi. Ini mungkin melibatkan faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitasnya; ketergantungan aktivitas pembekuan pada suhu, pH, dan kekuatan ion; asosiasi enzim dengan paracasein; dan aktivitas proteolitik selama pematangan keju.

#### *Reaksi yang dikatalisis oleh enzim*

Laju reaksi enzim tidak dapat dijelaskan berdasarkan persamaan Michaelis-Menten: reaksi adalah orde satu (Carlson et al., 1997; Gomes *et al.*, 2011), baik terhadap konsentrasi dan waktu, pada setidaknya pada pH fisiologis (Walstra *et al.*, 2005). Ini harus dianggap berasal dari perbedaan besar dalam ukuran, oleh karena itu, dalam koefisien difusi — antara molekul enzim dan misel kasein. Yang terakhir tidak bergerak, seolah-olah, dan enzim harus mendekati mereka melalui difusi. Selama renneting, ada sekitar satu molekul enzim per 30 misel kasein (Ruetimann dan Ladisch, 1987). Selain itu, bagian dari jalur difusi berada di lapisan berbulu pada misel, karena ikatan Phe-Met yang akan dipecah cukup dekat dengan permukaan misel; ini meningkatkan waktu difusi. Kecepatan reaksi dengan demikian adalah difusi terbatas. Rambut dihilangkan secara acak, setidaknya pada pH fisiologis (Walstra *et al.*, 2005).

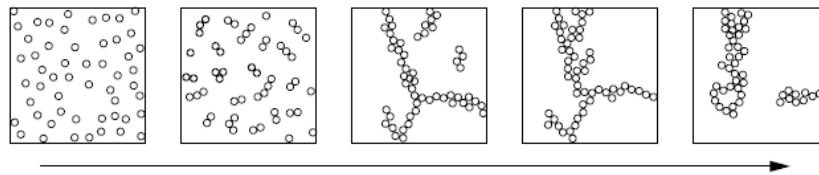
Pengaruh suhu relatif kecil dan sesuai dengan ketergantungan koefisien difusi (melalui viskositas) pada suhu (Aly *et al.*, 2011). Protein serum agak mengurangi aktivitas chymosin. Aktivitas ion kalsium memiliki sedikit efek. Diperlukan kekuatan ionik tertentu, dan kekuatan ionik susu adalah tepat. pH memiliki efek yang cukup besar. Pada penurunan pH, afinitas enzim untuk misel meningkat dan mengarah pada peningkatan kecepatan reaksi (Van Wey *et al.*, 2014). Pada pH yang masih lebih rendah kecepataannya, bagaimanapun, lebih kecil, mungkin karena enzim sekarang teradsorpsi begitu kuat ke misel kasein (sebagian terkelupas) sehingga dibutuhkan waktu yang cukup lama sebelum molekul yang teradsorpsi dilepaskan kembali dan dapat berdifusi lebih jauh. Ini menyiratkan bahwa reaksi tidak lagi terbatas difusi. Efek tambahan dari peningkatan adsorpsi pada pH rendah adalah bahwa rambut tidak dihilangkan secara acak, tetapi enzim cenderung membentuk 'tambalan telanjang' pada misel, sebelum terdesorpsi dan menyebar (Floury *et al.*, 2011).

#### *Pengumpulan*

Misel hanya beragregasi (menggumpal) jika sebagian besar rambut telah dihilangkan, sehingga tolakan sterik dari misel telah cukup berkurang. Juga, tolakan elektrostatik berkurang,

seperti yang diilustrasikan pada Gambar 19, yang memberikan potensi zeta misel kasein dan para-kasein. Saat agregasi dimulai ketika sekitar 70% kappa- kasein telah dipecah. Agaknya, misel harus mendekati satu sama lain dalam orientasi sedemikian rupa sehingga masing-masing menyajikan tambalan telanjang, yaitu, tidak berbulu, ke yang lain. Semakin banyak rambut yang dicabut, semakin besar jumlah dan ukuran tambalan kosong pada misel, dan semakin cepat proses agregasi (Walstra *et al.*, 2005).

pH memiliki efek ganda pada laju agregasi. Pertama, penurunan pH meningkatkan aktivitas ion Ca, seperti yang disebutkan. Kedua, bahkan pada aktivitas  $Ca^{2+}$  yang konstan, agregasi bisa lebih cepat. Hal ini karena pada pH rendah enzim tidak menghilangkan rambut secara acak, tetapi cenderung membelah rambut di dekatnya (Guinee dan Fox, 2004). Akibatnya tambalan kosong pada permukaan misel terbentuk pada tingkat pemecahan kappa-kasein yang lebih rendah (lihat sub-bab “Pembentukan, Sifat Struktural, dan Reologi Gel Susu Koagulasi Asam”). Telah diamati, misalnya, bahwa agregasi dimulai pada tingkat pemisahan 70%, 60%, dan 40%, pada nilai pH masing-masing 6,6, 6,2, dan 5,6 (pada 30°C).



**Gambar 19 Representasi agregasi misel para-kasein, pembentukan gel, dan awal sineresis (mikro)**

Sumber: Walstra *et al.* (2005)

### *Pembentukan Gel*

Pembentukan gel akibat agregasi fraktal misel (para)kasein dibahas pada Sub bab “Pembentukan, Sifat Struktur dan Reologi Gel Susu Koagulasi Asam”. Gel yang terbentuk adalah gel partikel; beberapa properti juga diberikan. Modulus elastisitas dapat dideteksi, sehingga gel terbentuk ketika viskositas mendekati tak terhingga (Lucey *et al.*, 2003). Pada saat itu, agregasi telah maju sedemikian rupa sehingga agregat menempati seluruh volume. Modulus gel meningkat, pada awalnya karena lebih banyak misel (atau agregat kecil) yang bergabung dalam jaringan gel, dan agak kemudian karena sambungan antara dua misel menjadi lebih kuat karena fusi misel para-kasein. Gel terdiri dari untaian partikel kasein, seringkali dengan ketebalan 3 hingga 4 partikel dan panjang 10 hingga 20 partikel (Bremer *et al.*, 1989; Van Vliet, 1999), diselingi oleh beberapa simpul partikel yang lebih tebal. Karena misel hanya berdiameter 0,1 hingga 0,3  $\mu m$ , ini berarti telah

terjadi penataan ulang partikel dalam jangka pendek. Pori-pori yang lebih besar dalam gel adalah beberapa mikrometer (sampai 10) lebarnya (Van Vliet, 1999).

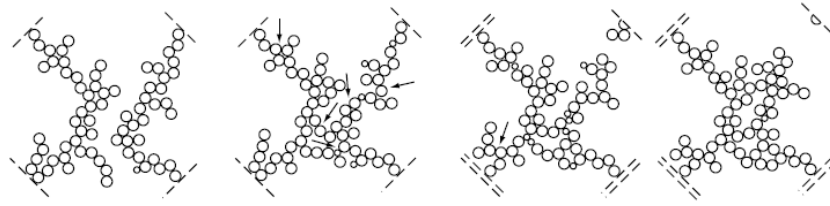
#### *Pembekuan Susu yang Diperlakukan Panas*

Pembekuan susu yang diberi perlakuan panas bergantung pada waktu, dadih yang lebih lemah, dan sineresis yang terganggu. Waktu renneting meningkat tajam dengan intensitas pemanasan (Walstra *et al.*, 2005). Laju reaksi enzim sedikit terpengaruh (paling banyak 20%), tetapi agregasi menjadi jauh lebih lambat. Penambahan sedikit  $\text{CaCl}_2$ , atau penurunan pH mengembalikan waktu pembekuan jika pemanasan tidak terlalu kuat. Namun demikian, efek pemanasan tidak dapat dijelaskan terutama oleh penurunan aktivitas  $\text{Ca}^{2+}$ . Ini karena pemanasan tidak mengubah waktu pembekuan jika tidak ada laktoglobulin. Rennetabilitas yang berkurang dan reaksi protein ini dengan misel kasein (Singh dan Waungana, 2001) berjalan sangat paralel. Rupanya, stabilitas misel paracasein sangat meningkat oleh lapisan protein serum yang terkait. Efek merugikan dari perlakuan panas dapat dihilangkan sebagian dengan menurunkan pH hingga di bawah 6 dan kemudian meningkatkannya lagi, misalnya menjadi 6,4 (Walstra *et al.*, 2005).

#### *Pembuatan dadih*

Secara tradisional, pembuatan dadih adalah proses batch, yang melibatkan pembekuan susu; memotong gel menjadi beberapa bagian; pengusiran whey karena sineresis dan ekspresi dari potongan dadih yang terbentuk; dan pemisahan dadih dari air dadih; sementara itu, laktosa diubah menjadi asam laktat (Walstra *et al.*, 2005). Proses ini pada dasarnya menentukan komposisi keju yang akan dibuat: para-kasein dan sebagian besar lemak dikumpulkan, termasuk sedikit whey. Juga kadar air akhir dan keasaman keju sangat ditentukan pada tahap ini. Tujuan tambahan dan penting adalah bahwa prosesnya sesingkat mungkin, efektif dan ekonomis; itu harus dikontrol dengan baik dan menyebabkan sedikit kehilangan dadih dan lemak. Demi efisiensi, pemrosesan berkelanjutan akan lebih disukai (Modler, 1988; Castillo *et al.*, 2011; Shidara *et al.*, 2013). Beberapa proses akan disebutkan, tetapi untuk sebagian besar keju semi-keras dan keras, pemrosesan batch tampaknya lebih ekonomis, sebagian karena kondisi proses seringkali masih dapat diubah jika terjadi kesalahan pada batch (Hou *et al.*, 2014).

#### *Akumulasi Komponen*



**Gambar 20 Skema representasi untaian misel paracasein membentuk persimpangan baru**  
 Sumber: Walstra *et al.* (2005)

Karena penggumpalan bentuk jaringan kontinu yang terdiri dari partikel protein, biasanya misel para-kasein, komponen dalam dadih keju menjadi mudah terakumulasi. Pori-pori jaringan memiliki lebar beberapa mikrometer. Awalnya, jaringan membungkus semua susu, tetapi segera mulai berkontraksi, yaitu menunjukkan sineresis (Walstra *et al.*, 2005). Hal ini diilustrasikan pada Gambar 20. Dengan demikian kelembaban (yaitu, air ditambah zat terlarut) diperas. Sehubungan dengan zat terlarut, ini tampaknya menyiratkan bahwa pada saat pengeringan, komposisi uap air dalam dadih mirip dengan yang ada dalam air dadih. Pada pemeriksaan lebih dekat, rasio air terhadap zat terlarut dalam dadih akan lebih tinggi. Jumlah tertentu air nonsolvent dapat ditentukan, yang lebih besar untuk molekul zat terlarut dengan ukuran lebih besar (Walstra *et al.*, 2005).

Untuk protein serum dalam susu, jumlah air nonsolvent adalah sekitar 2 sampai 3 g per gram paracasein. Kebanyakan keju mengandung kira-kira jumlah air ini atau kurang. Memang diamati bahwa keju semikeras dan keras hampir tidak memiliki protein serum dan juga kaseinomakropeptida yang dipisahkan kappa-kasein oleh rennet. Ini menyiratkan bahwa enzim yang terjadi terlarut dalam serum susu tidak akan mencapai keju. Varietas keju dengan kandungan air yang tinggi mungkin mengandung beberapa protein serum dan enzim serum.

Di sisi lain, beberapa protein, terutama enzim, cenderung teradsorpsi ke misel para-kasein, dan ini akan terakumulasi dalam keju. Ini menyangkut enzim proteolitik asli plasmin dan cathepsin D (McSweeney dan Sousa, 2000). Ini juga terjadi dengan chymosin dan pepsin, dan ini sangat penting untuk pematangan keju (Beresford dan Williams, 2004). Adsorpsi chymosin hampir nol pada pH 6,7, tetapi sangat meningkat dengan penurunan pH (Roos, 1999). Jumlah chymosin (dan pepsin) yang tertahan dalam dadih, dan dengan demikian mencapai keju, oleh karena itu tergantung pada kondisi selama pembuatan dadih, terutama pH pada keadaan drainase. Jumlah yang tertahan dalam keju bervariasi dari 1% sampai 20% dari jumlah yang ditambahkan ke dalam

susu (Roos, 1999). Ini adalah salah satu variabel terpenting yang menentukan laju proteolisis dalam keju.

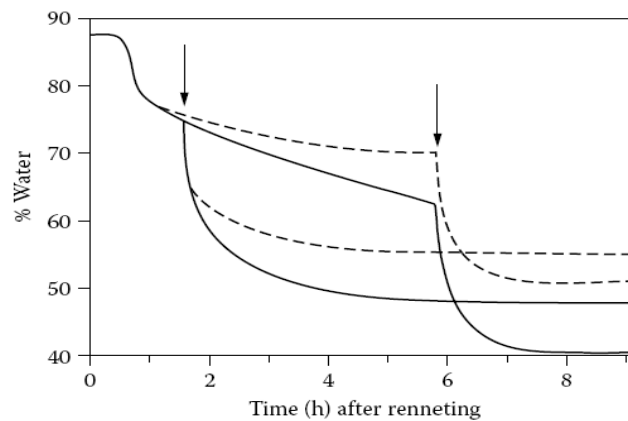
Enzim yang ditambahkan ke susu keju juga dapat menyerap ke misel para-kasein. Contohnya adalah lisozim, yang mengadsorpsi kuat, dan terkadang ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri asam butirat (lihat sub-bab “Patogen dan Cacat Mikroba pada Keju”). Enzim-enzim yang ada di dalam membran globul lemak juga dimasukkan ke dalam keju; ini terutama berlaku untuk xantin oksidase dan berbagai aminotransferase dan fosfatase (Wiking *et al.*, 2004). Ini karena semua partikel dalam susu, yaitu, butiran lemak, mikroorganisme, sel somatik, dan partikel kotoran, sebagian besar terperangkap secara mekanis dalam jaringan misel parakasein yang terkumpul. Jumlah bakteri starter per gram bahan, misalnya, hampir 10 kali lebih tinggi pada keju daripada susu keju, tidak mempertimbangkan pertumbuhan apapun (Walstra *et al.*, 2005).

### *Sineresis*

Banyak gel cenderung menyusut secara spontan, sehingga mengeluarkan cairan. Agregasi misel paracasein menyebabkan terbentuknya partikel gel dengan pori-pori yang relatif besar yang mengandung butiran whey dan lemak. Sebuah misel membuat sambungan dengan, rata-rata, sekitar tiga misel lain, tetapi luas permukaan totalnya reaktif, yaitu, dapat membentuk sambungan dengan misel tambahan. Hal ini akan menyebabkan keuntungan energi ikatan, yang memberikan kekuatan pendorong (Walstra *et al.*, 2005). Namun, membuat persimpangan baru sebagian besar terhalang secara sterik, karena misel tidak bergerak dalam jaringan (Dejmek dan Walstra, 2004). Di sisi lain, immobilisasi tidak lengkap, karena untaian misel dapat menunjukkan beberapa gerakan Brown. Ini mengarah pada pembentukan sambungan baru, yang dapat memberikan tegangan tarik pada untaian yang terlibat. Ini dapat, pada gilirannya, menyebabkan putusannya untaian semacam itu. Pecahnya untaian memungkinkan terjadinya penyusutan dan, terlebih lagi, ini memungkinkan pembentukan sambungan baru tambahan, dll. Gel rennet sering tidak menunjukkan pengeluaran whey secara spontan. Hal ini karena gel dapat menempel pada dinding bejana, sehingga gel tersebut terkekang (Dejmek dan Walstra, 2004). Namun demikian, prosesnya akan terus berlanjut, tetapi sekarang hanya akan menyebabkan pembentukan lokal pori-pori yang lebih besar dan daerah-daerah yang lebih padat di tempat lain. Proses pengkasaran struktur gel ini disebut mikrosineresis (Pastorino *et al.*, 2003). Kebetulan, lapisan atas susu renneted di kapal tidak

menunjukkan pengusiran whey spontan, mungkin karena permukaan susu hidrofobik; menempatkan setetes air atau whey di permukaan akan segera menyebabkan sineresis terjadi. Tekanan yang bekerja pada whey dan menyebabkan alirannya, menurut Fennema (1976) diberikan oleh:  $p = pS - pE$

Dimana  $pS$  adalah tekanan sineresis endogen (Fennema, 1976). Ini memiliki nilai yang cukup kecil, pada urutan 1 Pa (ini sesuai dengan tekanan gravitasi yang diberikan oleh 'kolom' air setinggi 0,1 mm). Oleh karena itu, sineresis akan sangat lambat, tetapi lajunya selalu didorong oleh tekanan eksternal  $pE$ . Ini umumnya terdiri dari dua istilah: tekanan gravitasi yang diberikan oleh jaringan gel (kepadatan misel lebih tinggi daripada whey) dan tekanan mekanis yang diterapkan pada gel atau lapisan dadih (Walstra *et al.*, 2005).



**Gambar 21 Contoh jalannya kadar air dadih selama pembuatan dadih**

Pemotongan setelah 0,5 jam. Pada dua saat (ditunjukkan dengan panah) dadih dikeluarkan dari whey dan dimasukkan ke dalam cetakan keju. Garis putus-putus mengacu pada eksperimen tanpa tambahan starter.

*Sumber: Walstra et al. (2005)*

Namun, kinetika sineresis itu rumit. Selain titik-titik tersebut, pH umumnya akan menurun selama proses, selanjutnya mengubah parameter, dan suhu juga dapat berubah (Walstra *et al.*, 2005). Dalam kebanyakan kasus, bagaimanapun, tingkat sineresis akan menjadi semakin lambat selama proses. Ketika cukup kadar air yang rendah telah tercapai, katakanlah 55%, dadih telah menjadi sangat padat sehingga jaringan gel tidak dapat dengan mudah memenuhi deformasi yang akan menyebabkan sineresis lebih lanjut (Castillo *et al.*, 2006). Dengan kata lain, bukan permeabilitas, tetapi konsistensi gel (tepatnya, viskositas elongasi pada tegangan rendah) menjadi faktor pembatas.

Akhirnya, perbedaan harus dibuat antara laju sineresis, yang menentukan waktu yang dibutuhkan untuk proses, dan tingkat sineresis, yaitu kadar air akhirnya, yang menentukan sifat keju (Walstra *et al.*, 2010). Untungnya, pada awal sineresis, ketika cepat, banyak whey yang dikeluarkan tanpa kadar air dadih sangat berkurang, sementara sebaliknya di dekat akhir, ketika sineresis lambat. Hal ini memungkinkan fine tuning dari titik akhir proses. Sineresis sebenarnya dapat dihentikan dengan menurunkan suhu secara substansial (Walstra, 1993).

#### *Produksi Asam dan Pencucian Dadih*

pH dadih menurun karena aksi bakteri starter. Penurunan ini sangat meningkatkan sineresis. Laju penurunan pH ditentukan oleh faktor-faktor termasuk starter (jumlah yang ditambahkan, jenis, regangan), komposisi dan perlakuan awal susu, dan suhu selama perawatan dadih (Hynes *et al.*, 2001). Hampir semua bakteri starter terperangkap dalam dadih, menyiratkan bahwa asam terutama diproduksi dalam butir dadih. Selama biji-bijian berada di dalam whey, asam laktat dapat berdifusi dari mereka ke dalam whey dan laktosa dalam arah yang berlawanan. Dengan cara ini, asam diproduksi di seluruh campuran. Setelah pengeringan whey, akumulasi asam dalam dadih berlangsung lebih cepat, dan kandungan laktosa dalam dadih menurun lebih cepat (Walstra *et al.*, 2005; Walstra *et al.*, 2010).

Dalam kebanyakan kasus, laju produksi asam, dan pH pada pencetakan, memiliki sedikit pengaruh pada pH akhir keju. Pada sebagian besar jenis keju, semua laktosa diubah, terutama menjadi asam laktat. Ini menyiratkan bahwa rasio antara asam laktat dan senyawa penyangga menentukan pH (Walstra *et al.*, 2010). Kadar air dadih sangat penting. Semakin tinggi, semakin banyak laktosa, atau asam laktat produknya, yang tertahan dalam dadih, dan keju yang dihasilkan akan semakin asam. Zat penyangga utama adalah para-kasein dan kalsium fosfat (Upreti dan Metzger, 2006).

#### *Pemisahan Dadih dan Whey*

Gambar 21 mengilustrasikan bahwa kadar air dadih menurun tajam ketika dadih dikeluarkan dari whey. Efek ini sebagian besar harus dianggap berasal dari tekanan gravitasi yang lebih besar pada dadih; peningkatan rata-rata akan menjadi sekitar 500 Pa atau lebih (Walstra, 1993). Terlihat bahwa pengadukan yang diperpanjang menyebabkan kadar air akhir yang lebih kecil. Jika suhu massa dadih dapat dipertahankan konstan setelah pengeringan whey, maka waktu

pemisahan akan mempengaruhi kadar air akhir hanya sedikit. Ini mengilustrasikan bahwa dalam praktek keju membuat penurunan suhu setelah drainase whey dengan cepat menahan sineresis. Semakin besar blok dadih, yaitu semakin besar roti keju, semakin lambat dingin dan semakin rendah kadar air akhir, meskipun jarak pengangkutan uap air lebih lama dalam roti yang lebih besar (Walstra *et al.*, 2005).

Jika dadih dibuat sangat kering sebelum whey dikeringkan, misalnya dengan pengadukan yang lama atau suhu panas yang tinggi, suhu yang lebih tinggi selama pengeringan menyebabkan kadar air yang lebih tinggi. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh penutupan pori-pori yang lebih cepat di antara butiran dadih yang pada gilirannya disebabkan oleh deformasi yang lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi. Sejalan dengan itu, dalam hal ini, sepotong kecil keju mencapai kadar air yang lebih rendah (Walstra, 1993).

Untuk membuat dadih sangat kering, dadih yang sudah ditiriskan bisa diaduk kembali. Hal ini menyebabkan hilangnya banyak lemak dan butiran halus dadih dalam whey dan ditandai dengan keterbukaan mekanis dalam keju. sebagai sineresis berlangsung di dalam tangki. Ini akan menyebabkan variasi yang signifikan dalam kadar air keju. Untuk mengatasi masalah ini, campuran dadih dan whey dapat diaduk perlahan dalam tangki penyangga sambil diturunkan suhunya secara bertahap (Walstra *et al.*, 2005). Akan menjadi jelas bahwa berbagai langkah proses harus dicocokkan satu sama lain. Gambar 21 menunjukkan hal ini menjadi sulit jika dadih, setelah dibuat batchwise dalam tangki, kemudian dikeringkan, dicetak, dan ditekan dalam proses yang berkesinambungan.

### *Membentuk dan Menekan*

Proses pembentukan dan pengepresan diinginkan untuk membuat dadih menjadi massa yang koheren yang mudah ditangani, memiliki ukuran yang sesuai, dan memiliki kekencangan tertentu dan permukaan tertutup yang cukup halus. Untuk mencapai ini, dadih dibentuk dengan memasukkannya ke dalam cetakan atau lingkaran; dalam keju keras dan sebagian besar keju semikeras, operasinya termasuk pengepresan dadih. Pembentukan dadih hanya dapat dilakukan jika butirannya berubah bentuk dan menyatu (Walstra, 1993; Gunasekaran dan Ak, 2010). Deformasi diperlukan karena seluruh massa dadih harus mengikuti bentuk cetakan dan karena butiran idealnya harus bersentuhan satu sama lain di atas luas permukaan totalnya. Deformasi kental diperlukan, yaitu, massa dadih harus mempertahankan bentuknya yang diperoleh ketika



gaya eksternal dilepaskan (Walstra *et al.*, 2005). Semakin besar gaya, semakin cepat deformasi; menekan sehingga dapat membantu. Deformasi sangat dipengaruhi oleh komposisi dadih. Dengan penurunan pH, deformabilitas meningkat hingga pH 5,2 hingga 5,3 tercapai; pada pH yang lebih rendah, dadih menjadi jauh lebih tidak mudah berubah bentuk (Gunasekaran dan Ak, 2010). Selanjutnya, deformabilitas meningkat dengan kadar air dan terutama dengan suhu. Pada suhu yang sangat tinggi (misalnya, 60o C) dadih dapat diremas menjadi hampir semua bentuk dan pada pH yang sesuai bahkan dapat diregangkan (Gunasekaran dan Ak, 2010).

Penggabungan butir-butir dadih menjadi massa terus menerus ditingkatkan dengan meningkatkan area di mana butir-butir itu bersentuhan satu sama lain. Dalam sehari setelah pembuatan dadih, peleburan biasanya selesai, yang berarti tidak ada pori-pori yang terlihat di antara butir-butir dadih yang tersisa dalam massa dadih (Dejmek dan Walstra, 2004). Koefisien permeabilitas telah berkurang. Beberapa hari mungkin diperlukan untuk menyelesaikan peleburan ke titik di mana sifat mekanik keju menjadi lebih atau kurang homogen. Jadi, jika sepotong keju berumur satu hari mengalami deformasi yang kuat, ia akan retak di antara butir dadih asli, sedangkan keju yang berumur 4 hari umumnya akan patah melalui butir (Walstra *et al.*, 2005). Pengamatan ini tidak berlaku untuk keju yang diasinkan pada tahap dadih.

Seperti disebutkan di atas, penekanan lebih lanjut membentuk; dibutuhkan (kecuali untuk keju lunak) untuk mencapai permukaan tertutup, yaitu untuk membentuk kulit (Dejmek dan Walstra, 2004). Ini tidak begitu banyak dimaksudkan untuk mengurangi kadar air. Kelembaban dapat dilepaskan dari massa dadih yang sudah kurang lebih koheren karena whey bebas atau whey yang bergerak menjauh dari butir dadih dapat mengalir melalui pori-pori di antara butir. Namun, jika kulit telah terbentuk, aliran keluar whey sangat terhambat dan, oleh karena itu, salah satu efek pengepresan adalah penurunan kadar air lebih lanjut menjadi kecil (Gunasekaran dan Ak, 2010). Semakin awal pengepresan dimulai, dan semakin tinggi tekanan yang diberikan, semakin tinggi kandungan air yang tersisa dari keju. Semua ini berlaku untuk dadih yang tidak terlalu kering dan tidak terlalu asam. Dalam kasus seperti itu, tekanan biasanya berkisar antara 5 dan 50 kPa (Walstra *et al.*, 2005; Walstra *et al.*, 2010).

Pembentukan kulit juga dipengaruhi oleh kadar air dadih, suhu dan tekanan yang diberikan selama pengepresan, dan durasi pengepresan. Faktor utama adalah drainase lokal whey. Jika tidak terjadi drainase, seperti pada cetakan baja halus tanpa lubang, permukaannya tidak akan tertutup (Walstra *et al.*, 2010). Permukaan tertutup terbentuk jika uap air dapat dihilangkan melalui

perforasi dalam cetakan. Menempatkan kain atau kain kasa di antara keju dan jamur menyebabkan drainase yang lebih baik dan menghasilkan kulit yang benar, yaitu lapisan tipis keju setebal 1 mm, dengan kadar air berkurang, membentuk semacam kulit (Walstra *et al.*, 2005). Penguapan air selanjutnya secara nyata meningkatkan ketebalan dan ketangguhan kulit. Penguapan yang sangat cepat dapat menyebabkan keretakan (Walstra, 1993).

### *Pengasinan*

Penggaraman merupakan langkah penting dalam pembuatan keju. Fungsi utama garam termasuk pengawetan dan pengaruhnya terhadap rasa keju, konsistensi, dan pematangan. Selain itu, pertumbuhan bakteri asam laktat terhambat pada kadar garam yang tinggi. Kebanyakan varietas keju mengandung sekitar 2% garam, atau 4 hingga 5% garam dalam air. Metode dan teori pengasinan keju telah dibahas pada sub bab "Pengaruh Garam dalam Keju- Dampak Fisik dan Biokimia"

### *Perawatan, Penyimpanan, dan Penanganan*

Penyimpanan keju dimulai setelah pembuatannya. Seringkali, ini setelah pengasinan. Dalam pembuatan keju Cheddar garam dicampur dengan dadih sebelum ditekan. Keju jenis feta pertama-tama diasinkan, setelah itu dikemas dan diawetkan dalam air garam atau whey asam dengan tambahan garam. Hal ini juga berlaku untuk jenis keju Domiati; dalam pembuatannya, susu dilengkapi dengan kandungan garam yang tinggi (8% sampai 15% NaCl), dan asam diproduksi dalam keju oleh bakteri asam laktat yang toleran terhadap garam (Shehata *et al.*, 1975). Penyimpanan keju pematangan bertujuan untuk membuat dan menjaganya tetap layak untuk dikonsumsi. Produk harus mengembangkan sifat karakteristiknya: rasa, konsistensi, tubuh (penampilan penampang), dan kulit. Kehilangan apapun, terutama yang disebabkan oleh penguapan air yang berlebihan, serta kerusakan kulit dan/atau tekstur karena mikroba dan tungau keju yang tidak diinginkan, harus dicegah (Walstra *et al.*, 2005). Untuk beberapa keju, penanganan selama proses curing mungkin memerlukan lebih banyak tenaga daripada proses pembuatannya.

### *Suhu*

Suhu mempengaruhi laju pertumbuhan mikroba dari flora spesifik yang diinginkan dan aktivitas enzimnya serta enzim asal asing, terutama rennet dan starter; sehingga mempengaruhi tingkat pematangan. Umumnya, suhu yang lebih tinggi menyebabkan pematangan lebih cepat,

tetapi pada saat yang sama, meningkatkan risiko pembusukan oleh pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (Walstra *et al.*, 2010).

### *Kondisi Udara*

Kelembaban, suhu, dan kecepatan udara mempengaruhi penguapan air. Kelembaban udara sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme pada kulit keju. Untuk memungkinkan keju mempertahankan bentuk yang memuaskan, roti keju yang matang harus dibalik, awalnya sering. Pembubutan semacam itu juga harus meningkatkan pertumbuhan flora aerob pada seluruh permukaan keju dan mencegah, pada keju tanpa flora permukaan spesifik, pertumbuhan mikroorganisme mikroaerofilik antara roti dan rak. Kelembaban udara di sekitar permukaan keju ('iklim mikro') dapat cukup berbeda dari tempat lain di ruang penyimpanan (Bonaïti *et al.*, 2004; Mortensen *et al.*, 2004).

Laju dan tingkat penguapan dapat menjadi bagian yang bertanggung jawab untuk mengembangkan cacat mikroba karena keju tidak menjadi cukup kering (Walstra *et al.*, 2005). Sebaliknya, keju tidak boleh terlalu cepat kering, terutama setelah diasinkan, karena dapat menyebabkan keretakan pada kulitnya. (Kadang-kadang roti keju dibilas dengan air setelah pengasinan, menyebabkan kulit menjadi lebih kenyal.) Awalnya, kelembaban relatif dapat diambil agak lebih rendah dan kecepatan udara lebih tinggi, jika keju belum ditekan atau ditekan sedemikian rupa cara untuk membentuk kulit yang lemah. Penguapan menyebabkan kulit menjadi lebih kencang. Jika banyak air menguapkan kulit keju berubah menjadi lapisan tanduk tertutup yang sedikit menghambat pengangkutan air dan gas. Keju lunak yang dimatangkan permukaannya sering kali membentuk kerak tipis yang mengandung banyak kalsium fosfat, terutama bila pH kulitnya menjadi tinggi.

### *Perawatan Kulit*

#### *Keju dengan flora tertentu*

Keju dengan apusan permukaan: Apusan mengandung beberapa mikroorganisme yang tidak tumbuh jika pH di permukaan keju terlalu rendah. Asam laktat pertama-tama harus didekomposisi, yang terutama dipengaruhi oleh ragi. Suplai oksigen (udara segar) merangsang pertumbuhan beberapa bakteri (Carminati *et al.*, 1999). Mengolesi permukaan secara teratur atau mencuci keju dengan air atau dengan air garam yang lemah membantu mengembangkan lapisan

berlendir yang seragam. Bakteri yang diperlukan akan hilang jika keju dicuci terlalu sering atau terlalu intens. Lapisan berlendir menghambat pertumbuhan jamur. Ada banyak jenis keju lunak dengan noda permukaan, misalnya, Munster, Limburger, dan Pont l'Évêque, yang semuanya berukuran kecil (Walstra *et al.*, 2005). Contoh keju semihard dengan olesan pada kulitnya adalah Tilsiter dan Port Salut. Contoh keju keras adalah Gruyre. Seiring berjalannya waktu, lapisan berlendir umumnya dibiarkan mengering. Setelah itu, keju jenis tertentu dilapisi dengan lateks.

Keju cetakan putih: Keju dapat ditaburi dengan kultur jamur setelah diasinkan dan sebagian dikeringkan, atau spora jamur dapat ditambahkan ke susu keju dan/atau air garam (Guenther dan Loessner, 2011). Kondisi pertumbuhan dapat ditingkatkan dengan mengatur suhu di ruang pematangan, dengan membiarkan kontak dengan udara (termasuk sering membalik roti), dan dengan kelembaban relatif yang tinggi (yang seharusnya, bagaimanapun, lebih rendah daripada kelompok sebelumnya. keju). Selama pematangan, kontaminasi permukaan keju oleh jamur yang tidak diinginkan harus dicegah (Walstra *et al.*, 2010).

Keju biru: Sebelum pematangan dimulai, keju dilubangi dengan jarum. Roti silindris dapat diletakkan di sisi bundar untuk merangsang pasokan udara ke dalam pori-pori yang terbentuk, yang meningkatkan pertumbuhan kapang biru (Walstra *et al.*, 2005). Keju diawetkan pada suhu yang relatif rendah dan pada kelembaban relatif tinggi. Sebagian besar keju berurat biru seharusnya tidak mengembangkan flora permukaan yang signifikan dan karenanya harus tetap bersih. Jenis lain seperti Gorgonzola memang memiliki flora seperti itu.

#### *Keju tanpa flora tertentu*

Keju asin keras dan setengah keras: Pertumbuhan mikroba pada kulit keju dapat mempengaruhi kualitas keju, terutama rasa dan penampilan. Yang paling penting adalah pertumbuhan kapang (beberapa di antaranya dapat menghasilkan mikotoksin), coryneforms, dan ragi. Untuk menghindari pertumbuhan seperti itu, kulit keju dilengkapi dengan lapisan permukaan. Saat ini, lateks - sering disebut emulsi plastik - umumnya diterapkan, yaitu, lateks polimer vinil asetat, vinil propionat, atau dibutil maleinat (Kirwan dan Strawbridge, 2003; Van der Berg *et al.*, 2004). Pada pengeringan, film plastik koheren terbentuk yang memperlambat penguapan air dan menawarkan perlindungan yang lebih baik terhadap kerusakan mekanis daripada yang digunakan sebelumnya seperti minyak biji rami dan minyak parafin. Lapisan lateks memungkinkan kulit keju menjadi jauh lebih lemah. Mekanisasi dan mempercepat pembuatan berbagai jenis keju tidak akan

mungkin terjadi tanpa pengenalan emulsi lateks ini. Film secara mekanis menghambat pertumbuhan jamur, baik itu tidak lengkap. Mungkin juga mengandung fungisida, misalnya, natamycin (pimaricin), antibiotik yang diproduksi oleh *Streptomyces natalensis*, atau kalsium atau natrium sorbat (Reps *et al.*, 2002; Van der Berg *et al.*, 2004). Dalam praktiknya, perawatan berturut-turut dengan lateks diterapkan ke semua sisi keju segera setelah pengasinan. Selama penyembuhan yang lama, perawatan dapat diulang. Permukaan harus cukup kering sebelum setiap perawatan. Kondisi di ruang pematangan harus memungkinkan lateks cepat kering (tidak terlalu cepat karena retakan dapat terbentuk pada film, yang menyebabkan pertumbuhan jamur pada keju). Secara tradisional, Cheddar dan keju terkait sering disimpan dalam kain keju dan hanya sementara tetap bersih (O'Reilly *et al.*, 2001). Saat ini, keju biasanya dibentuk menjadi roti berbentuk persegi panjang, misalnya seberat 20 kg. Tak lama setelah ditekan, roti dikemas di bawah vakum dalam foil plastik (misalnya, Saran), membutuhkan sedikit perhatian lebih lanjut (O'Reilly *et al.*, 2001). Pada awalnya, roti harus ditumpuk tidak terlalu rapat agar bisa mendingin. Jika keju masih menunjukkan beberapa sineresis (kadar air tinggi atau suhu tinggi), lapisan berair terbentuk antara kulit keju dan foil, di mana mikroorganisme yang memburuk dapat berkembang biak.

### *Kemasan*

Pengemasan merupakan aspek penting dalam pengawetan keju. Menurut Walstra *et al.* (2005), beberapa faktor terlibat dalam pemilihan kemasan: (1) jenis keju dan ketahanannya terhadap kerusakan mekanis, (2) keberadaan flora tertentu, (3) kemasan grosir atau eceran, (4) permeabilitas terhadap uap air, oksigen, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, dan cahaya, (5) fasilitas pelabelan, (6) perpindahan rasa dari kemasan ke produk, dan (7) sistem penyimpanan, distribusi, dan penjualan (supermarket, toko spesialis, dan tingkat omset di pasar).

Beberapa keju diawetkan saat dikemas dalam film menyusut kedap udara dan air, misalnya, Saran foil. Keju dapat dibuat dalam balok persegi panjang dengan berat hingga 300 kg, yang biasanya dimaksudkan untuk dijual dalam porsi atau irisan yang telah dikemas sebelumnya, atau untuk industri keju olahan (Walstra *et al.*, 2005).

### *Hasil Keju*

Hasil dapat diekspresikan dengan berbagai cara. Definisi yang paling umum adalah: massa keju dalam kg yang diperoleh per 100 kg susu. Susu harus menyertakan starter tambahan. Kesulitan dengan kuantitas ini adalah bahwa kadar air keju cukup bervariasi. Oleh karena itu, hasil dapat didefinisikan sebagai massa bahan kering dalam keju yang diperoleh dari 100 kg susu, atau seseorang dapat menghitung ulang hasil tersebut dengan keju dengan kadar air standar (Walstra, 1993). Jika diinginkan untuk menguji efisiensi proses pembuatan keju, mungkin berguna untuk memperkirakan massa protein keju yang diperoleh per satuan massa susu (para)kasein. Sulit untuk menentukan massa keju yang diperoleh. Pertama, mungkin menjadi masalah untuk mengumpulkan dan menimbang dengan tepat semua keju yang berasal dari batch susu keju tertentu. Kedua, keju cenderung menurun beratnya setelah ditekan dan diasinkan; tingkat di mana ini terjadi sangat bervariasi antara varietas keju dan dengan kondisi penyimpanan (Gunasekaran dan Ak, 2010). Oleh karena itu, diinginkan untuk menimbang keju pada waktu yang tetap, segera setelah pengepresan atau pengasinan. Ketiga, kerugian fisik dapat terjadi (dadih hilang dalam mesin, potongan-potongan yang pecah dari roti keju), dan bahan nondairy mungkin telah ditambahkan (bumbu selama pembuatan keju, bahan pelapis sesudahnya). Hal ini sering dianggap berguna untuk memiliki formula prediksi untuk hasil keju. Beberapa persamaan telah diturunkan, misalnya yang diusulkan oleh Walstra *et al.* (2005):  $Y=(aF+bC)/(1-W)+R$

Di sini Y = hasil (kg per 100 kg susu); F = kadar lemak, dan C = kadar kasein susu (% b/b); a = fraksi lemak susu yang dimasukkan ke dalam keju, dan b sama untuk kasein. W = kadar air keju (fraksi massa), dan R adalah jumlah bahan kering lain dalam keju (kg per kg keju). F dan C dapat ditentukan dalam susu terlebih dahulu; Y dan W harus didapat dari keju yang sudah jadi.

---

## ***BAB VI FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KUALITAS KEJU***

---

### *Kualitas Keju Secara Umum*

Melalui peningkatan pengetahuan tentang kimia, biokimia dan mikrobiologi keju, seharusnya memungkinkan untuk menghasilkan keju dengan kualitas yang sangat tinggi secara konsisten, meskipun hal ini tidak selalu tercapai karena kegagalan untuk mengontrol satu atau lebih parameter utama yang mempengaruhi komposisi keju dan pematangan (Fox dan Cogan, 2004). Susu adalah bahan baku yang bervariasi dan meskipun dimungkinkan untuk menghilangkan variasi utama dalam konstituen susu utama, beberapa variasi tetap ada. Variabilitas dalam komposisi susu juga dapat dikompensasikan dengan memanipulasi beberapa parameter proses dalam proses pembuatan keju. Sebagian besar pabrik besar beroperasi pada jadwal waktu yang ketat dan karenanya manipulasi proses secara halus berdasarkan tong individu mungkin tidak mungkin dilakukan. Oleh karena itu, kontrol ketat terhadap komposisi susu dan aktivitas starter sangat penting.

Dari sudut pandang mikrobiologi, pasokan susu ke pabrik keju modern memiliki kualitas yang sangat tinggi dan setelah pasteurisasi hanya mengandung beberapa ratus bakteri per ml. Mengungguli BAL asli dengan kultur *Lactobacillus* tambahan (Tobin, 1999), yang tidak harus berkontribusi pada pematangan, adalah suatu kemungkinan tetapi pendekatan ini belum diselidiki (seperti pada 2014). Meskipun sekarang mungkin untuk menghindari cacat besar pada keju yang diproduksi dengan menggunakan teknologi modern, penelitian lebih lanjut tentang biokimia pematangan keju diperlukan untuk memungkinkan proses pembuatan dan pematangan keju disempurnakan sampai tingkat yang memungkinkan produksi yang konsisten dengan kualitas premium keju (Fox dan Cogan, 2004).

Kunci keberhasilan pembuatan keju adalah starter andal yang baik, baik dari sudut pandang produksi asam yang dapat direproduksi dan pematangan berikutnya. Jika dikelola dengan baik, starter modern umumnya memuaskan dan kinerjanya ditingkatkan secara progresif. Pada dasarnya, pembuatan keju adalah proses yang relatif sederhana, terdiri dari dua fase. Langkah-langkah kunci

dalam pembuatan dadih adalah: pengasaman, koagulasi, sineresis/dehidrasi dan penggaraman. Dengan pengetahuan yang tersedia saat ini tentang mekanisme proses ini dan skala serta kualitas peralatan pembuatan keju, dadih keju harus dapat diproduksi dengan kualitas premium secara konsisten dari sudut pandang kimia dan mikrobiologi. Sayangnya, dalam praktiknya tidak demikian. Tidak diragukan lagi, variabilitas dalam komposisi dan mikroflora susu berkontribusi pada variabilitas dadih keju tetapi ada variabilitas dalam dadih yang diproduksi selama satu hari dari satu batch besar susu curah menggunakan rennet dan starter yang sama (Fox dan Cogan, 2004). Salah satu faktor yang mungkin bertanggung jawab atas variabilitas ini adalah jeda waktu dalam melakukan operasi pembuatan keju tertentu, misalnya, diperlukan lebih dari 30 menit untuk memisahkan dadih dan whey dalam tong yang sangat besar (sekitar 30000 l) yang sekarang digunakan untuk Cheddar, Gouda atau Mozzarella (Fox, 2000). Jeda waktu ini berlanjut selama operasi selanjutnya, misalnya, cheddaring, penggilingan, penggaraman dan pengepresan. Solusi untuk masalah ini adalah pengembangan sistem produksi dadih yang berkelanjutan, seperti sistem ALPMA, tetapi ini tidak digunakan untuk keju keras (Fox dan Cogan, 2004).

Seperti yang dibahas pada bagian sebelumnya, pembuatan keju memanfaatkan salah satu dari dua sifat sistem kasein: pengendapan/koagulasi pada pH isoelektrik (4,6), yang dimanfaatkan dalam produksi keju segar yang dikoagulasi asam (25% dari total produksi keju), atau dengan proteolisis terbatas menggunakan rennet yang secara spesifik menghidrolisis protein penstabil misel, kappa-kasein, yang diikuti dengan koagulasi dengan adanya  $Ca^{2+}$  pada suhu  $>20^{\circ}C$  biasanya  $30-35^{\circ}C$  (75% dari produksi keju). Kebanyakan keju yang dikoagulasi asam dikonsumsi segar (belum matang) sedangkan sebagian besar keju yang dikoagulasi rennet dimatangkan untuk jangka waktu mulai dari -3 minggu hingga  $>2$  tahun. Meskipun ada perbedaan yang dapat dikenali antara dadih yang belum matang untuk keju yang berbeda, terutama berkenaan dengan kadar air dan tekstur, perbedaan karakteristik antara 1000 atau lebih varietas keju berkembang selama pematangan. Kualitas keju yang dikoagulasi dengan asam tunduk pada beberapa variasi tetapi fakta bahwa keju tersebut dikonsumsi segar dan tidak ada modifikasi yang diperlukan setelah pembuatan, membuatnya relatif mudah untuk diproduksi dengan kualitas yang konsisten (Fox dan Cogan, 2004).

Sebaliknya, kualitas karakteristik keju yang dikoagulasi rennet berkembang terutama selama pematangan dan seringkali bergantung pada pertumbuhan mikroflora sekunder, yang tidak mudah direproduksi. Selama pematangan, rangkaian kompleks reaksi mikrobiologi, biokimia dan



kimia terjadi dan oleh karena itu ada banyak peluang untuk berkembangnya masalah. Dalam bab ini, aspek kualitas keju yang dikoagulasi rennet akan dipertimbangkan. Beberapa bidang utama ilmu keju di mana kualitas keju dapat ditingkatkan melalui penelitian akan dibahas di sini.

Ada beberapa aspek kualitas keju; beberapa berlaku untuk semua produk dan aplikasi keju, yang lain penting untuk keju tertentu. Aspek yang paling penting dari keju adalah: keamanan dari sudut pandang kesehatan masyarakat, nutrisi, rasa, tekstur, penampilan fungsionalitas (kesesuaian setiap varietas, keandalan, dan reproduktifitas).

### *Kualitas Pasokan Susu*

Mungkin susu itu sendiri yang memberikan dampak paling besar pada kualitas dan keandalan keju. Komposisi kimia susu, terutama konsentrasi kasein, lemak, kalsium dan pH, memiliki pengaruh besar pada beberapa aspek pembuatan keju, terutama koagulabilitas rennet, kekuatan gel, sineresis dadih, dan karenanya komposisi keju dan hasil keju (Fox dan Cogan, 2004). Kandungan susu dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain spesies, breed, individualitas, status nutrisi, kesehatan dan tahap laktasi dari hewan penghasil. Karena kelainan komposisi utama, susu dari sapi pada tahap awal atau akhir laktasi dan mereka yang menderita mastitis tidak boleh digunakan untuk pembuatan keju. Jumlah sel somatik (leukosit) adalah indeks kualitas yang berguna. Beberapa polimorf genetik dari protein susu meningkatkan hasil dan kualitas keju dan ada peningkatan minat dalam pemuliaan untuk ini. Susu harus bebas dari noda kimia dan asam lemak bebas, yang menyebabkan rasa tidak enak pada keju, dan antibiotik yang menghambat kultur bakteri (Fox dan Cogan, 2004).

Ada banyak informasi tentang efek kandungan protein, [Ca] dan pH pada berbagai parameter renneting susu dalam sistem model dan cukup banyak informasi tentang efeknya dalam eksperimen pembuatan keju. Namun, ada sedikit informasi tentang efek pada perubahan simultan dalam dua atau lebih faktor ini, terutama dalam eksperimen pembuatan keju yang sebenarnya. Studi tentang efek interaktif dari faktor ini dan faktor komposisi lainnya pada sifat pembuatan keju susu dan kualitas keju yang dihasilkan diperlukan. Dimungkinkan untuk mengurangi, tetapi tidak menghilangkan, variabilitas dalam konstituen utama susu dengan menstandarisasi konsentrasi lemak dan kasein, bukan hanya rasio (kandungan protein dapat distandarisi dengan menambahkan UF retentate), pH (menggunakan asam glukonat- $\delta$ -laktone) dan kandungan kalsium (dengan menambahkan  $\text{CaCl}_2$ ).

Varietas keju yang berbeda memiliki kandungan lemak dalam bahan kering (FDM), pada dasarnya, rasio lemak terhadap protein tertentu, dan situasi ini memiliki status hukum dalam 'Standar Identitas' untuk banyak varietas. Sementara kadar air keju, dan karenanya kadar lemak dan protein, ditentukan terutama oleh protokol pembuatan (termasuk ukuran partikel dadih, pH, suhu pemasakan, agitasi, pengepresan), rasio lemak terhadap protein ditentukan terutama oleh lemak untuk rasio kasein dalam susu keju (Fox dan Cogan, 2004). Menurut Butcher et al. (2010) dan Jamrozik dan Schaeffer (2012), tergantung pada rasio yang dibutuhkan, dapat dimodifikasi dengan: (1) menghilangkan beberapa lemak dengan krim gravitasi, seperti yang dilakukan dalam pembuatan Parmigiano Reggiano, atau dengan sentrifugasi; (2) menambahkan susu skim; (3) menambahkan krim; (4) menambahkan susu bubuk atau retentat ultrafiltrasi.

Mengontrol [Ca] dalam susu dapat diterapkan dengan menambahkan  $\text{CaCl}_2$  (misalnya, 0,01%) ke dalam susu keju, yaitu, 40 mg Ca/l susu, yang telah menjadi praktik umum. Ini kecil dibandingkan dengan konsentrasi asli Ca dalam susu, 1200 mg/l. Penambahan 40 mg/l Ca ke dalam susu meningkatkan konsentrasi Ca terlarut, koloid dan terionisasi serta menurunkan pH susu, yang semuanya memiliki efek positif pada berbagai parameter renneting (Everard et al., 2011). Berbeda dengan penyesuaian kalsium, protein, dan lemak, standarisasi pH susu dalam pembuatan keju sedikit lebih teliti dan rumit. Penambahan kultur starter 1-2% ke dalam susu langsung menurunkan pH susu sekitar 0,1 unit. Konsentrat starter (starter langsung ke tong; DVS), yang sekarang digunakan secara luas, terutama untuk pabrik kecil dan menengah, tidak memiliki efek pengasaman langsung yang langsung (Guinee et al., 2006). Sebelumnya, merupakan praktik standar untuk menambahkan starter ke dalam susu keju 30-60 menit sebelum penambahan rennet (Fox et al., 2003; Fox dan Cogan, 2004). Namun, praktik tersebut meningkatkan risiko infeksi bakteriofag pada starter; fag didistribusikan ke seluruh susu cair tetapi setelah dikoagulasi, fag tidak dapat bergerak melalui koagulum dan karenanya hanya dapat menginfeksi sel-sel di sekitar sel yang terinfeksi. Praktik ini telah dihentikan untuk sebagian besar varietas keju.

Untuk mengimbangi variasi pH ini dan untuk menguranginya sebagai alternatif pematangan, pra-pengasaman susu dengan 0,1-0,2 unit pH direkomendasikan, baik melalui penggunaan acidogen, asam glukonat-8-lakton, atau dengan pertumbuhan terbatas starter asam laktat, diikuti oleh pasteurisasi (disebut sebagai pra-maturasi). Pra-pengasaman meningkatkan keseragaman gel susu yang dikoagulasi rennet, yang tercermin dalam produksi keju dengan kualitas yang lebih seragam.

Sebagai produk yang berasal dari hewan, susu dapat terkontaminasi mikroorganisme patogen, dan hal ini jelas menjadi perhatian terbesar. Sebelumnya, patogen utama yang menjadi perhatian dalam susu adalah *Mycobacterium bovis* dan *Brucella abortus*, tetapi di negara-negara penghasil susu maju saat ini, patogen ini sebagian besar atau seluruhnya telah dihilangkan dari peternakan sapi perah. Saat ini, berbagai patogen menjadi perhatian, terutama *Listeria monocytogenes*, strain enterotoksigenik *E. coli*, misalnya, *E. coli* O157 H7, *Shigella*, *Erwinia*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Salmonella* spp.

Banyak dari mikroorganisme ini tidak tumbuh dalam susu yang hanya bertindak sebagai vektor. Dalam keju, patogen ini mati di bawah kondisi yang agak tidak bersahabat pada keju yang dibuat dengan baik yang memiliki pH relatif rendah (5,3), kandungan garam yang relatif tinggi (5-10% garam dalam kelembaban; S/M) dan mungkin bakteriosin. (Fox dan Cogan, 2004). Di banyak negara, keju yang dibuat dari susu mentah diharuskan berumur 60 hari, meskipun praktik ini mungkin tidak sepenuhnya efektif (Fox, 2000). Sebagai alternatif, keju harus dibuat dari susu pasteurisasi atau keju itu sendiri harus dipasteurisasi, seperti pada keju olahan. Keju, yang pH-nya tidak menurun pada tingkat yang diinginkan atau tingkat yang diinginkan selama pembuatan (misalnya, karena infeksi bakteriofag atau kontaminasi dengan antibiotik) atau jika pH meningkat secara substansial selama pemasakan, misalnya, keju yang matang berjamur atau keju yang matang noda, adalah yang paling berisiko. Keju dengan kadar air tinggi dan cepat matang memiliki risiko lebih besar untuk menyimpan patogen daripada keju dengan kadar air rendah. , varietas pematangan lambat (Fox dan Cogan, 2004). Tidak mungkin menghasilkan susu mentah yang dijamin bebas dari bakteri patogen. Namun, susu dengan jumlah patogen yang sangat rendah dapat diproduksi dari hewan yang sehat dan setiap patogen yang masuk ke dalam susu dapat berupa: (1) Dibunuh menggunakan pasteurisasi atau alternatif baru; (2) Dihapus (baktofugasi atau mikro/ultrafisasi); (3) Dicegah agar tidak tumbuh atau mati, misalnya dengan menggunakan starter penghasil bakteriosin terpilih dengan pH rendah.

Sampai saat ini, upaya untuk menghilangkan patogen dari susu keju telah terkonsentrasi pada pasteurisasi yang memadai. Ada penelitian yang sedang berlangsung tentang metode alternatif dan kemungkinan pekerjaan di bidang ini akan berlanjut dan mungkin berkembang. Efek menguntungkan kedua dari pasteurisasi adalah membunuh mikroorganisme pembusuk, misalnya, coliform, pseudomonad, dan ragi. Di negara-negara dengan industri susu yang maju, kualitas pasokan susu telah meningkat tajam selama 30 tahun terakhir-jumlah bakteri total (TBC) sekarang

biasanya <20.000 cfu/ml ex-farm (Fox dan Cogan, 2004). TBC mungkin meningkat selama transportasi ke dan penyimpanan di pabrik, tetapi pertumbuhan dapat diminimalkan dengan termisasi (65°C x 15 detik) susu yang diterima di pabrik, yang merupakan praktik standar di beberapa negara. Kehadiran *Clostridium tyrobutyricum* menimbulkan masalah khusus. Meskipun banyak keju dibuat dari susu mentah, secara kuantitatif, sebagian besar keju dibuat dari susu yang dipasteurisasi pada atau mendekati suhu 72°C x 15 detik (Fox dan Cogan, 2004). Jika diproduksi dari susu mentah berkualitas baik dan jika selanjutnya ditangani dalam kondisi higienis, susu pasteurisasi harus memiliki TBC yang sangat rendah (beberapa ratus cfu/ml) dan oleh karena itu, mewakili bahan baku yang sangat seragam dari sudut pandang mikrobiologi. Beberapa alternatif untuk pasteurisasi kemungkinan akan menjadi signifikan secara industri.

Beberapa mikroorganisme tambahan dalam susu mentah, terutama bakteri asam laktat non-starter (NSLAB), mungkin berkontribusi positif terhadap rasa keju - secara umum diterima bahwa rasa keju susu mentah lebih kuat, meskipun lebih bervariasi, daripada keju susu pasteurisasi (Fox dan Cogan, 2004; Fox, 2000). Meskipun alasan perbedaan rasa antara keju susu mentah dan keju susu yang dipasteurisasi belum dijelaskan untuk kepuasan semua orang dan masih dalam penyelidikan, ada dukungan luas untuk pandangan bahwa NSLAB tambahan adalah penyebab utamanya. BAL asli ini dibunuh dengan pasteurisasi; upaya sedang dilakukan untuk menggantikannya melalui penggunaan biang ragi tambahan (Fox dan Cogan, 2004).

Sementara pasteurisasi bagus dalam banyak sudut pandang, fakta bahwa itu tidak dapat mencegah NSLAB dihancurkan selama proses termal mendorong produsen untuk mengembangkan metode baru untuk membersihkan keju dari kontaminan. Ada sejumlah alternatif untuk pasteurisasi untuk dekontaminasi susu keju:

1. Termisasi- perlakuan panas pada suhu sub-pasteurisasi, misalnya, 65°C x 15 detik; termisasi dimaksudkan untuk mengurangi mikroflora susu mentah dan memperpanjang jangka waktu penyimpanannya di pabrik tanpa risiko pembusukan. Meskipun termisasi tidak memenuhi persyaratan untuk pasteurisasi dari sudut pandang kesehatan masyarakat, termisasi cukup banyak digunakan untuk susu keju dan dalam kombinasi dengan rintangan lain, misalnya, pemasakan dadih keju, pH rendah, S/M tinggi, mungkin cukup untuk membuat susu berkualitas baik bebas dari patogen dan bakteri keracunan makanan;
2. Mikrofiltrasi;
3. Bactofugation, yang dapat digunakan sebagai metode umum yang cukup efisien untuk menghilangkan bakteri dan spora dari susu tetapi tidak digunakan secara luas

4. Susu pra-pematangan dengan kultur penghasil bakteriosin.

### *Koagulan*

Langkah kunci dan karakteristik dalam pembuatan keju koagulasi rennet adalah koagulasi susu melalui aksi proteolitik terbatas dari proteinase tertentu, yang disebut rennet. Beberapa proteinase dapat mengentalkan susu tetapi hanya sedikit yang cocok untuk produksi keju. Secara tradisional, rennet adalah ekstrak dari jaringan lambung anak sapi, anak-anak atau domba, di mana enzim utamanya adalah chymosin (Fox, 2000). Karena peningkatan produksi keju, bersamaan dengan berkurangnya pasokan perut anak sapi, pasokan rennet anak sapi tidak mencukupi selama bertahun-tahun. Hal ini menyebabkan pencarian 'pengganti rennet', empat di antaranya sukses secara komersial: pepsin sapi dan proteinase dari jamur, *R. meiheii*, *R. pusillus* dan *C. parasitica* (Fox, 1975). Semua pengganti rennet yang berhasil adalah proteinase aspartil (asam). Gen untuk chymosin anak sapi telah dikloning di beberapa mikro-organisme dan produk (disebut sebagai chymosin yang dihasilkan fermentasi; FPC) sekarang banyak digunakan untuk pembuatan keju di banyak, tetapi tidak semua, negara. Ekstrak thistle, *Cynara cardunculus* digunakan dalam pembuatan keju tertentu di Portugal dan Spanyol (Fox dan Cogan, 2004). Enzim aktifnya adalah cardosin, yang merupakan proteinase asam (yang jarang ditemukan pada tumbuhan).

Telah diusulkan (Andreeva *et al.*, 1992; Gustchina *et al.*, 1996) bahwa chymosin biasanya ada dalam konformasi tidak aktif tetapi diaktifkan ketika substrat mengikat di celah sisi aktif enzim. Penggunaan komersial rennet anak sapi dalam pembuatan keju dari susu domba, kambing atau kerbau menunjukkan bahwa chymosin anak sapi dapat menghidrolisis kappa-kasein dalam susu ini, seperti yang diharapkan dari hipotesis di atas. Chymosin anak sapi juga dapat mengentalkan susu babi (Fox, 1975); pada kenyataannya, susu babi dikoagulasi oleh calf rennet pada suhu 4 o C sedangkan susu sapi tidak, karena sifat fase sekunder non-enzimatik. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa susu unta tidak dikoagulasi oleh calf rennet tetapi Farah (1993) melaporkan bahwa susu unta dikoagulasi secara perlahan menjadi gel yang lemah. Status susu kuda sehubungan dengan kappa-kasein tetap tidak jelas sampai saat ini. Ochirkhuyag *et al.* (2000) melaporkan bahwa susu kuda tidak mengandung kappa-kasein dan bahwa fungsi penstabil misel dimainkan oleh [3-kasein; Namun, Malacarne *et al.* (2002) melaporkan bahwa ia mengandung kappa-kasein tingkat rendah (<7%) yang telah diisolasi dan diurutkan (Egito *et al.*, 2001, 2002; Iametti *et al.*, 2001). Agar proteinase berhasil sebagai pengganti rennet, dua karakteristik sangat penting:

1. Hidrolisis spesifik kappa-kasein pada atau dekat dengan Phe105Met106; jika ikatan lain dalam kasein mana pun dihidrolisis, peptida yang dihasilkan dapat hilang dalam whey, menyebabkan penurunan hasil keju.
2. Spesifisitas proteolitik umumnya selama pematangan keju harus rendah dan mirip dengan chymosin.

Secara umum diterima bahwa chymosin anak sapi menghasilkan keju dengan kualitas terbaik. Pasokan chymosin yang memadai dari mikro-organisme rekayasa genetika sekarang tersedia (walaupun penggunaannya tidak diizinkan di semua negara) dan oleh karena itu kualitas rennet tidak boleh menjadi penyebab variabilitas kualitas keju. Dengan adanya  $\text{Ca}^{2+}$ , misel yang diubah rennet dalam susu sapi menggumpal membentuk gel pada suhu  $> 20^\circ\text{C}$  ini disebut sebagai fase sekunder koagulasi rennet. Susu sapi renneted tidak menggumpal  $< -18^\circ\text{C}$  di atas yang koagulasi memiliki  $Q_{10}$  dari 16. Ketergantungan suhu yang sangat tinggi dari fase sekunder koagulasi belum dijelaskan sepenuhnya. Agaknya, interaksi hidrofobik terlibat; mungkin disosiasi beta-kasein yang bergantung pada suhu dari misel kasein merupakan faktor yang berkontribusi. Ketergantungan suhu dari koagulasi misel yang diubah rennet dikurangi dengan mengurangi pH dan meningkatkan  $[\text{Ca}^{2+}]$  atau konsentrasi kasein, misalnya oleh UE Seperti disebutkan di atas, susu babi dikoagulasi oleh rennet pada 40 C Alasan ) untuk perbedaan antara susu sapi dan susu babi dalam hal ini belum dijelaskan.

Terlepas dari banyak penelitian tentang mekanisme koagulasi misel kasein yang diubah rennet dan kinetiknya, model fenomena yang berlaku secara umum telah dikembangkan hanya dalam 10 tahun terakhir. Gaygadhiev *et al.* (2009) melaporkan bahwa peningkatan fraksi volume butiran lemak menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam elastisitas gel, yang disebabkan oleh flokulasi dari tetesan minyak. Kehadiran gumpalan minyak terflokulasi dalam struktur gel dikonfirmasi oleh pengamatan mikroskop confocal. Selain itu, tingkat hidrolisis -kasein yang lebih rendah diperlukan untuk memulai agregasi misel kasein dalam susu yang mengandung tetesan minyak yang distabilkan protein whey dibandingkan dengan susu skim. Sementara itu, Kethireddipalli *et al.* (2011) melaporkan bahwa tidak peduli berapa pun beban awal kompleks WP yang terikat misel, semua jenis misel mampu mengikat kompleks protein serum tambahan selama renneting. Namun, tidak jelas bahwa pengikatan kompleks WP/kappa-kasein ke permukaan misel ini merupakan penyebab langsung dari gangguan pembekuan rennet RSMP.

Beberapa rennet yang ditambahkan disimpan dalam dadih keju. Jumlah yang tertahan bervariasi menurut jenis rennet, suhu masak, dan pH saat penirisan; variabel-variabel ini harus

distandarisasi jika keju dengan kualitas yang konsisten ingin diproduksi. Proporsi rennet yang tertahan dalam dadih sebanding dengan kadar airnya, mencerminkan keberadaan rennet terutama dalam fase air keju. Anehnya, pH tidak berpengaruh pada retensi rennet jamur, proporsi yang lebih rendah dipertahankan dalam dadih daripada chymosin (Fox dan McSweeney, 1997). Jelas, suhu pemasakan memiliki pengaruh besar pada tingkat sisa rennet dalam curdchymosin dan pepsin sapi didenaturasi secara ekstensif atau total dalam keju yang dimasak dengan tinggi, misalnya, Parmigiano Reggiano atau Emmental; pepsin babi didenaturasi secara ekstensif bahkan pada keju yang dimasak rendah karena sensitivitasnya terhadap  $\text{pH} > 6,5$ . Keju yang dimasak rendah, pH rendah, kelembaban tinggi, misalnya Camembert, mempertahankan ~30% aktivitas chymosin yang ditambahkan; Cheddar mempertahankan ~6% dan Emmental ~0%. Mempertimbangkan pentingnya proteolisis dalam pematangan dan kualitas keju dan pentingnya koagulan, studi tentang berbagai faktor yang mempengaruhi retensi koagulan dalam dadih keju tampaknya diperlukan, misalnya, adsorpsi chymosin pada misel kasein dan kurangnya adsorpsi proteinase jamur; dan stabilitas berbagai rennet di bawah berbagai kondisi suhu, pH dan faktor lainnya.

### *Starter*

Menurut Fox dan Cogan (2004), reaksi kunci kedua dalam pembuatan keju adalah pengasaman- pH semua keju yang dikoagulasi rennet harus turun ke nilai dalam kisaran 4,6-5,2 dalam beberapa hari pembuatan, atau dalam beberapa varietas, pada akhir pembuatan dadih (5-6 jam). Di antara konsekuensi penting dari pengasaman adalah:

1. aktivitas koagulan;
2. kelangsungan hidup dan retensi koagulan dalam dadih;
3. kekencangan koagulum, yang mempengaruhi hilangnya lemak dan protein dalam whey pada pemotongan dan karenanya mengurangi hasil keju;
4. sineresis dadih dan karenanya komposisi keju;
5. kelarutan kalsium fosfat koloid (CCP), yang memiliki pengaruh besar pada tekstur, daya leleh dan daya regangan keju;
6. penghambatan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan, terutama bakteri patogen dan keracunan makanan;
7. aktivitas berbagai enzim dalam keju selama pematangan dan akibatnya tingkat pematangan dan kualitas keju.

Awalnya, pengasaman disebabkan oleh produksi asam laktat dari laktosa oleh BAL adventif. Pengasaman beberapa varietas keju masih tergantung pada aktivitas mikroflora adventif tetapi kebanyakan keju sekarang diasamkan menggunakan BAL terpilih yang ditambahkan ke susu keju sebagai kultur (starter). Kultur yang digunakan saat ini dalam pembuatan keju dapat dibagi menjadi dua kelompok: (1) Mesofilik - dengan suhu pertumbuhan optimum  $\sim 28^{\circ}\text{C}$ ; (2) Termofilik - yang tumbuh optimal pada  $\sim 42^{\circ}\text{C}$ .

Kultur mesofilik digunakan untuk dadih keju yang dimasak pada suhu  $< 40^{\circ}\text{C}$  sedangkan keju yang menggunakan kultur termofilik yang dimasak pada  $50-55^{\circ}\text{C}$ . Kultur mesofilik mengandung strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan/atau *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Pemula yang digunakan untuk beberapa keju, misalnya, Gouda, Edam, Danbo, juga termasuk strain *Lc* yang memanfaatkan sitrat. *lactis* subsp. *lactis* dan/atau *Leuconostoc* subsp...?? yang fungsi utamanya adalah produksi  $\text{CO}_2$  dan senyawa flavor tertentu. Kultur termofilik mengandung spesies *Lactobacillus* termofilik, misalnya, *Lb. helveticus* dan *Lb. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* atau *Lb. delbreuckii* subsp. *lactis*, sendiri atau dengan *Streptococcus thermophilus*. Dimungkinkan untuk mensimulasikan fungsi penghasil asam dari LAB starter dengan menggunakan asam atau acidogen (biasanya GDL). Keju dadih asam segar (misalnya, Cottage, Quarg, Cream) dengan kualitas yang memuaskan dapat diproduksi dengan pengasaman langsung dan beberapa diproduksi secara komersial. Beberapa keju yang dikoagulasi dengan rennet juga diproduksi dengan pengasaman langsung, biasanya bila rasa sangat ringan atau tertutup oleh komponen lain atau kurang penting dibandingkan sifat fungsional fisiko-kimia; contohnya termasuk keju jenis Feta dan keju jenis Mozzarella. Mozzarella yang diasamkan secara kimiawi memiliki fungsionalitas yang lebih baik, lebih konsisten, dan stabil daripada produk yang diasamkan secara biologis. Namun, sebagian besar keju yang diasamkan dengan rennet yang diasamkan secara kimiawi tidak mengembangkan rasa yang khas dari varietas tersebut. Penjelasan yang mungkin untuk situasi ini adalah potensi redoks yang tinggi dari keju yang diasamkan secara kimia (c. 150 mV dibandingkan dengan c. -450 mV untuk keju yang diasamkan secara biologis); konsentrasi tinggi laktosa yang dapat mengakibatkan jumlah NSLAB yang tinggi.

Baik kultur mesofilik dan termofilik dapat dilakukan dengan regangan campuran atau regangan tertentu. Kultur galur campuran mengandung jumlah galur yang tidak diketahui dari spesies yang sama atau berbeda. Beberapa sistem seperti itu digunakan 20-50 tahun yang lalu - kultur dipilih berdasarkan karakteristik pembuatan keju dan berbagai prosedur perbanyakan



digunakan. Kultur ini mampu menghasilkan keju berkualitas sangat baik tetapi rentan terhadap infeksi fag karena banyak strain dalam kultur sensitif terhadap fag yang sama (Cogan dan Hill, 1993). Pemeliharaan dan perbanyakan kultur campuran sangat sulit dan tidak dapat direproduksi.

Kriteria utama untuk memilih galur untuk kultur ini adalah ketidakterkaitan fag, yaitu, fag yang menginfeksi satu galur tidak mempengaruhi galur lain dalam kultur; sementara infeksi fag dapat membunuh satu galur, galur lain tumbuh secara normal. Kriteria penting lainnya adalah kemampuan memproduksi asam dan kompatibilitas regangan; kemampuan untuk menghasilkan keju berkualitas baik dinilai dari pengalaman dan strain yang tidak diinginkan dikeluarkan dari kultur (Cogan dan Accolas, 1996). Awalnya, campuran 5-6 galur biasanya digunakan tetapi campuran 2-3 galur lebih umum saat ini. Pendekatan regangan yang ditentukan awalnya diperkenalkan untuk keju Cheddar dan sekarang sangat banyak digunakan di Selandia Baru, Australia, Irlandia dan Amerika Serikat. Meskipun pendekatan yang berbeda digunakan di Belanda untuk memilih kultur strain yang ditentukan untuk keju Gouda, hasil dasarnya serupa. Kultur termofilik regangan pasti sekarang digunakan juga tetapi kurang luas dibandingkan kultur mesofilik.

Ada kemajuan yang sangat besar dalam genetika lactococci selama 20 tahun terakhir dan urutan lengkap genom diketahui. Gen untuk banyak karakteristik pembuatan keju penting dari lactococci, misalnya, metabolisme laktosa, proteolisis dan resistensi fag, dibawa pada plasmid dan karenanya mudah dimanipulasi. Banyak strain *Lactococcus* yang direkayasa secara genetik telah dibuat tetapi tidak digunakan dalam praktik. Namun, lactococci dapat dimodifikasi secara genetik dengan perkawinan alami (konjugasi) dan strain yang dimodifikasi secara genetik tersebut digunakan secara komersial. Keterbatasan utama dengan rekayasa starter unggul adalah kurangnya pengetahuan tentang enzim kunci dalam pematangan keju (Delgado dan Mayo, 2004).

Tersedianya sekuens kromosom lengkap *Lc. lactis* membuka jalan baru untuk penelitian tentang kultur starter keju. Sejak 1999, kromosom 20 BAL lainnya dan bakteri terkait keju lainnya telah atau sedang diurutkan. Ini termasuk strain lain dari *Lactococcus*, *Lb. delbruckii*, *Lb. helveticus*, *Sc. thermophilus* dan *B. linen*. Genom komparatif dari bakteri yang berbeda ini harus berguna dalam menggambarkan perbedaan yang terjadi di antara mereka. Namun, sekuens gen bernilai kecil kecuali produk protein (enzim) diproduksi. Mengidentifikasi bagaimana mengaktifkan gen-gen yang mengkodekan enzim dengan potensi sifat pematangan keju, tetapi

yang biasanya tidak diekspresikan, dapat bermanfaat dalam studi tentang pengembangan rasa dalam keju.

Kultur regangan pasti memberikan hasil yang sangat dapat direproduksi dalam hal produksi asam dan kualitas keju secara keseluruhan. Namun, rasa keju dianggap agak hambar, mungkin karena kurangnya keragaman mikroba, baik dalam starter maupun dalam pasokan susu modern, yang jika dipasteurisasi, pada dasarnya steril (Fox dan Cogan, 2004). Secara tradisional, starter keju diproduksi di pabrik keju dari kultur induk yang diperoleh dari pemasok kultur; ini masih merupakan praktik biasa di pabrik-pabrik besar. Namun, perawatan starter yang tepat secara teknis menuntut dan mahal. Akibatnya, konsentrat starter, disebut sebagai starter langsung ke tong (DVS) atau inokulum tong langsung (DVI), yang diproduksi oleh pemasok kultur telah menjadi cukup luas di antara pabrik keju kecil hingga menengah atau sebagai sistem starter cadangan untuk produsen besar (Fox dan Cogan, 2004). Sistem starter lain menjamin penyebutan, yaitu, biang ragi artisanal atau alami. Kultur ini diproduksi sendiri oleh pembuat keju, yang menginkubasi beberapa whey hangat di bawah kondisi yang memilih bakteri dengan karakteristik pembuatan keju yang diinginkan. Saat ini, kultur seperti itu biasanya digunakan untuk keju masak tinggi - whey panas, mungkin pada  $\sim 55^{\circ}\text{C}$  dipindahkan ke wadah berinsulasi di mana ia mendingin secara perlahan; kondisi ini selektif untuk bakteri termofilik dan pada saat whey cukup dingin untuk memungkinkan bakteri mesofilik tumbuh, pH telah menjadi penghambatan (Fox dan Cogan, 2004). Kultur ini sangat kompleks dan komposisinya tidak diketahui, tentu saja pada tingkat strain, dan mungkin tidak pada tingkat spesies.

Meskipun fungsi utama dari kultur starter adalah untuk menghasilkan asam pada tingkat dan waktu yang tepat, bakteri starter atau enzimnya juga memainkan peran penting selama pematangan keju - rasa yang khas dan diinginkan tidak berkembang dalam keju tanpa starter dan banyak rasa cacat, misalnya, kepahitan dan buah, terkait dengan karakteristik starter.

### *Perawatan Pasca-koagulasi*

Gel susu yang dikoagulasi rennet cukup stabil jika dibiarkan tidak terganggu tetapi jika dipotong atau pecah, gel ini bersinergi dengan kuat, sehingga menciptakan kemungkinan menghilangkan air dan mengkonsentrasikan lemak dan protein. Ketika koagulum telah mencapai tingkat kekencangan yang diinginkan, biasanya 30-60 menit setelah penambahan rennet, gel siap untuk diproses lebih lanjut. Kekencangan gel pada pemotongan harus dioptimalkan sehingga dapat

mengurangi hilangnya lemak dan protein dari partikel dadih ke dalam whey (Fox, 2000). Jika koagulum terlalu lunak, kerusakan yang luas akan terjadi dengan kehilangan lemak dan protein yang tinggi dalam whey. Jika koagulum terlalu keras, koagulum mungkin sulit dipotong menggunakan peralatan biasa; itu mungkin berjalan sebelum pisau pemotong dan pecah dapat terjadi. Dadih yang terlalu keras sangat bermasalah saat menggunakan UF retentate. Kekencangan gel yang seragam pada pemotongan juga menghasilkan partikel dadih dengan ukuran yang lebih seragam, menghasilkan dadih keju dengan komposisi yang lebih seragam dan akhirnya menghasilkan keju dengan kualitas yang lebih seragam (Cogan dan Hill, 1993). Secara tradisional, titik di mana gel dianggap siap untuk dipotong ditentukan secara subyektif oleh pembuat keju tetapi beberapa perangkat sekarang tersedia yang memungkinkan penilaian obyektif dari kekencangan gel.

Ukuran partikel dadih mempengaruhi tingkat sineresis - koagulum untuk keju dengan kadar air rendah dipotong kecil-kecil sedangkan gel untuk keju dengan kadar air tinggi dipotong menjadi bagian besar atau tidak dipotong sama sekali tetapi disendok langsung ke dalam cetakan. Gumpalan lemak hilang dari permukaan yang dipotong; karenanya, pemotongan halus koagulum meningkatkan kehilangan lemak.

### *Pengasinan*

Sebagian besar, mungkin semua, keju diasinkan dengan salah satu dari empat metode (Guinee dan Fox, 1993); (1) mencampurkan garam kering dengan dadih yang digiling atau dipotong-potong, misalnya untuk keju jenis Cheddar; (2) penggaraman air garam dari keju yang dicetak/tekan; NaCl berdifusi ke dalam keju sebagai respons terhadap perbedaan tekanan osmotik antara air garam dan fase berair keju; (3) aplikasi permukaan garam kering ke permukaan keju tekan, misalnya, keju Biru; (4) penggaraman susu keju- untuk beberapa varietas, misalnya, Domiati, sejumlah besar garam ditambahkan ke dalam susu sebelum renneting, secara tradisional, untuk mengontrol mikroflora susu. Menurut Fox dan Cogan (2004), efek utama garam dalam keju adalah:

1. Efek penghambatan dan selektif utama pada mikroflora.
2. Sebuah efek yang signifikan pada aktivitas banyak enzim.
3. Melalui efeknya pada mikroflora dan enzim, garam memiliki efek tidak langsung yang besar pada pematangan, rasa dan kualitas keju.
4. Sebuah efek langsung pada rasa.

5. Asupan makanan yang berlebihan dari NaCl memiliki beberapa efek yang tidak diinginkan, misalnya, hipertensi dan osteoporosis. Meskipun keju memberikan kontribusi yang relatif kecil untuk asupan NaCl makanan, ada insentif ekonomi untuk mengurangi kandungan NaCl keju, yang dapat mempengaruhi kualitasnya, atau sebagian menggantikannya dengan KCl.

Pentingnya garam, dan terutama keseragaman konsentrasi garam, pada kualitas keju telah diketahui dengan baik. Fisika difusi garam dalam keju, pengaruhnya terhadap berbagai mikroorganisme dan teknologi pengasinan telah diketahui dengan baik. Dengan demikian, seharusnya dimungkinkan untuk mencapai tingkat garam yang sangat dapat direproduksi dalam keju. Namun, hal ini tidak selalu tercapai dalam praktik dan variasi dalam konsentrasi garam mungkin merupakan penyebab yang signifikan tetapi dapat dihindari dari variasi kualitas keju.

### *Pematangan*

Dadiah keju segar yang dikoagulasi rennet cocok untuk dikonsumsi dan sedikit dikonsumsi, misalnya keju Burgos, tetapi sebagian besar dimatangkan (matang) untuk jangka waktu mulai dari ~3 minggu (misalnya, Mozzarella) hingga 2 tahun atau lebih (misalnya, Parmigiano -Reggiano, Cheddar ekstramatur). Selama pematangan, karakteristik rasa, tekstur, penampilan dan fungsionalitas berkembang sesuai dengan garis yang telah ditentukan sebelumnya oleh mikrobiologi dan komposisi dadiah, seperti yang ditetapkan selama tahap pembuatan. Namun, pembuat keju dapat mempengaruhi kecepatan dan, sampai batas tertentu, pola pematangan dengan mengontrol suhu dan, untuk beberapa varietas, kelembaban lingkungan. Banyak keju mengembangkan mikroflora karakteristik (bakteri, ragi, jamur) selama pematangan dan mikroflora ini memiliki pengaruh besar pada kualitas sensorik keju.

Secara tradisional, mikroflora sekunder ini bersifat adventif, diperoleh dari susu dan/atau lingkungan, dan pertumbuhan mikroorganisme kontaminan tertentu yang diinginkan didorong dengan memilih kondisi lingkungan tertentu seperti pH, suhu, kelembaban, konsentrasi oksigen, konsentrasi garam dan tingkat kelembaban. Namun, mikroflora adventif cenderung bervariasi, yang menyebabkan inkonsistensi dalam kualitas keju. Dalam teknologi keju modern, mikroflora adventif digantikan oleh kultur sekunder terpilih, meskipun mikroorganisme adventif masih dapat tumbuh, dan bahkan mendominasi dalam beberapa kasus.

Beberapa spesies ragi, misalnya, *Debaryomyces hansenii* dan *Yarrowia lipolytica*, telah diisolasi dari keju (Petersen *et al.*, 2002; Van Der Tempel dan Jacobsen, 2000). Ragi ini adalah

kontaminan adventif pada banyak varietas; karena mereka aerobik dan tahan asam, mereka tumbuh terutama di permukaan semua keju tetapi pertumbuhannya pada banyak varietas dicegah melalui pengemasan atau pembentukan kulit. Pertumbuhan khamir sangat penting pada keju yang telah diolesi permukaannya karena mereka mengkatabolisme asam laktat, meningkatkan pH dadih dan memungkinkan corynebacteria, yang tidak dapat tumbuh pada  $\text{pH} < 5,8$ , untuk tumbuh (Fox dan Cogan, 2004). Terlepas dari signifikansi mereka dalam deacidification keju yang matang, kontribusi yang tepat mereka untuk pematangan belum diukur. Namun, karena ragi aktif secara metabolik, kemungkinan kontribusinya cukup besar. Dengan tujuan untuk meningkatkan konsistensi keju di mana keju merupakan bagian penting dari mikroflora, inokulasi keju tersebut dengan strain ragi yang dipilih menjadi semakin umum. *Geotrichum candidum* adalah bagian dari mikroflora permukaan adventif dari banyak keju (Ismail *et al.*, 2012). Variabel lebih lanjut di mana pembuat keju dapat mempengaruhi pola pematangan dan kualitas keju akhir adalah dengan mencegah hilangnya kelembaban dari permukaan keju dengan pengemasan yang sesuai (keju tanpa kulit) atau dengan mengendalikan kehilangannya untuk membentuk kulit.

Karya ilmiah tentang pentingnya pengemasan keju terhadap kualitas keju masih kurang. Fokus utama telah pada pencegahan pertumbuhan jamur di permukaan dan hilangnya hasil keju. Tidak diragukan lagi, perubahan komposisi keju (melalui penguapan kelembaban) dan hilangnya gas dan mungkin senyawa volatil lainnya mempengaruhi mikroflora keju dan aktivitas enzim dan akibatnya kualitas keju (Fox dan Cogan, 2004). Meskipun keunggulan teknologi yang diperoleh dari pengemasan keju sangat besar dan mungkin tidak dapat diseimbangkan oleh faktor lain, perbandingan ilmiah dari berbagai aspek keju tanpa kulit dan keju dengan kulit, misalnya, Cheddar, mungkin menarik.

### *Suhu Pematangan*

Suhu pematangan memiliki pengaruh besar pada tingkat pematangan dan kualitas keju. Secara tradisional, keju dimatangkan di gua atau ruang bawah tanah pada suhu yang relatif konstan. Praktik ini masih tersebar luas untuk beberapa varietas tetapi ruangan berpendingin artifisial sekarang digunakan oleh manufaktur skala besar. Suhu pematangan cukup khas dari varietas, misalnya, Cheddar, 6-8 ~ Gouda, 12-14 ~ Parmigiano-Reggiano, 18-20°C Emmental, 6°C selama ~2 minggu, kemudian pada 22°C selama 4- 6 minggu untuk memungkinkan bakteri asam propionat tumbuh dengan cepat dan menghasilkan CO<sub>2</sub> yang cukup untuk perkembangan

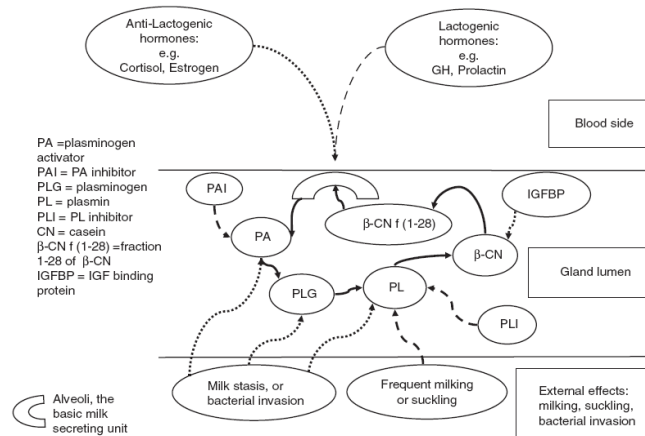
mata yang baik, kemudian pada  $\sim 4^{\circ}\text{C}$  selama beberapa bulan untuk menyelesaikan pematangan; Camembert,  $14^{\circ}\text{C}$  selama 2 minggu untuk menginduksi pertumbuhan *P. camemberti*, kemudian pada  $4^{\circ}\text{C}$  selama 2-4 minggu.

Pematangan dapat dipercepat dengan meningkatkan suhu pematangan tetapi semua reaksi, diinginkan dan tidak diinginkan, dipercepat dan rasa atau off-flavour yang tidak seimbang dapat berkembang. Pematangan pada suhu tinggi biasanya dipertimbangkan dengan tujuan mempercepat pematangan (Fox *et al.*, 2003). Rasa keju mungkin dapat dimodifikasi dengan memanipulasi suhu; namun, ini jarang dilakukan kecuali untuk keju jenis Swiss. Tingkat di mana dadih didinginkan setelah pencetakan memiliki pengaruh besar pada pertumbuhan starter LAB dan NSLAB. Dadih untuk sebagian besar keju dicetak segera setelah dimasak dan pengasaman terjadi terutama di dalam cetakan. Oleh karena itu, laju pendinginan dadih dalam cetakan memiliki pengaruh besar pada pertumbuhan starter dan laju perkembangan asam, dan sangat dipengaruhi oleh ukuran keju dan suhu lingkungan (Fox dan Cogan, 2004). Pengaruh pendinginan pada pertumbuhan starter terutama terlihat untuk keju dengan tingkat kematangan tinggi, misalnya keju jenis Swiss dan Grana. Pemula termofilik yang digunakan untuk keju ini tidak tumbuh pada suhu masak tetapi mulai tumbuh saat dadih mendingin dalam cetakan. Untuk konsistensi, penting untuk mengontrol suhu sekitar.

Untuk keju jenis Cheddar, pengasaman hampir selesai pada pencetakan. Secara tradisional, keju yang dicetak ditekan semalaman pada suhu lingkungan dan keju didinginkan mendekati suhu lingkungan selama periode ini, meskipun suhu lingkungan mungkin bervariasi secara signifikan dengan musim (Azarnia *et al.*, 2006). Dalam praktik modern, keju keluar dari menara Wincanton pada  $\sim 36^{\circ}\text{C}$  dan dikemas dan ditumpuk di atas palet (5 x 10 keju  $\sim 1$  ton) dan dipindahkan ke ruang pematangan (Fox *et al.*, 2003). Kelembaban lingkungan harus dikontrol, pada 85-90% RH, untuk pematangan banyak varietas, terutama yang memiliki mikroflora permukaan, yang tidak akan tumbuh jika keju mengembangkan kulit. Secara tradisional, pengembangan kulit didorong pada keju yang matang secara bakterial internal dengan mengurangi RH secara perlahan (Riahi *et al.*, 2007). Kulit berfungsi untuk melindungi keju terhadap pertumbuhan permukaan yang tidak diinginkan dan hilangnya kelembaban (berat). Saat ini, banyak varietas, misalnya, Cheddar dan Gouda, dilapisi atau dibungkus dengan plastik, yaitu keju tanpa kulit, untuk mencegah penurunan berat badan dan untuk melindungi permukaan keju dari pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan.

### Kehadiran Enzim Asli

Susu mengandung sekitar 60 enzim asli (Fox *et al.*, 2003; Fox dan Cogan, 2004), yang signifikansinya untuk kualitas keju belum diteliti secara memadai. Beberapa enzim asli memiliki potensi untuk mempengaruhi kualitas keju, terutama lipoprotein lipase (LPL), proteinase(s), asam dan alkaline phosphatase, xanthine oxidase (XO) dan mungkin sulphhydryl oxidase (SO), lactoperoxidase dan  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (Silanikove *et al.*, 2006). Beberapa dari enzim ini aktif dalam susu sebelum pembuatan keju dan mempengaruhi hasil dan/atau kualitas keju. Banyak dari enzim susu asli bertahan dari pasteurisasi HTST (72°C x15 detik) dan setidaknya beberapa, misalnya, plasmin, asam fosfatase dan XO, aktif selama pematangan keju.



**Gambar 22 Ikhtisar mekanisme umpan balik negatif PA-plasminogen-plasmin yang menurunkan regulasi sekresi susu**

Kontribusi sebagian besar elemen dijelaskan dalam teks. Panah tebal menunjukkan sinyal aliran di sepanjang loop umpan balik, panah putus-putus, efek positif, dan efek penekanan panah putus-putus.

Sumber: Silanikove *et al.* (2006)

Lipoprotein lipase berpotensi menyebabkan lipolisis yang signifikan dalam susu dan asam lemak yang dihasilkan terkonsentrasi di dadih keju di mana mereka dapat menyebabkan ketengikan hidrolitik, terutama pada keju beraroma ringan. Biasanya, LPL memiliki aktivitas rendah dalam susu di mana ia dipisahkan dari substrat trigliseridanya oleh membran globul lemak susu (MFGM). Namun, MFGM cukup rentan terhadap kerusakan karena penanganan susu yang kasar, yang menyebabkan aktivasi LPL, dan ketengikan.

Plasmin, proteinase asli utama dalam susu, mengurangi hasil keju karena PP tidak dimasukkan ke dalam dadih keju dan dilaporkan merusak kualitas koagulum yang diinduksi

rennet. Aktivitas plasmin meningkat dengan laktasi lanjut, usia sapi dan mastitis dan tindakannya dapat mengakibatkan koagulum lemah dengan sifat sineresis yang buruk konsekuensinya adalah berkurangnya hasil keju dan kadar air yang tinggi. Pembentukan gamma-kasein dalam keju selama pematangan dengan jelas menunjukkan bahwa plasmin aktif dalam keju - terutama bertanggung jawab untuk hidrolisis beta-kasein dalam keju yang dimasak rendah dan untuk total proteolisis primer pada varietas yang dimasak dengan rennet secara ekstensif atau tidak aktif sama sekali.

Dalam beberapa tahun terakhir, studi tentang efek inhibitor plasmin pada pematangan keju matang tinggi telah dilakukan dan dilaporkan. Tekanan tinggi secara signifikan mempengaruhi aktivitas enzim proteolitik asli dan denaturasi protein whey dalam susu sapi. Pengurangan aktivitas enzim asli (aktivitas turunan plasminogen - PL, aktivator plasminogen - PA dan cathepsin D) dan transfer PL dan PA dari kasein ke serum susu yang diinduksi oleh HP diharapkan memiliki efek mendalam pada hasil keju, proteolisis selama pematangan keju dan kualitas susu selama penyimpanan (Moatsou *et al.*, 2008). Voigt *et al.* (2011) melaporkan bahwa kadar air keju meningkat dan kadar protein dan aktivitas plasmin menurun karena perlakuan HP susu. Setelah 15 hari pematangan, lebih banyak kasein dipecah dalam keju yang dibuat dari susu yang diolah dengan HP. Evaluasi sensorik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara penerimaan keseluruhan keju Camembert dari susu mentah dan susu yang diolah dengan HP pada 500 Mpa (Voigt *et al.*, 2011).

Susu mengandung setidaknya empat kali lebih banyak plasminogen daripada plasmin. Plasminogen asli dapat diaktifkan dengan menambahkan aktivator plasminogen (ada beberapa aktivator plasminogen asli dalam susu), yang mempercepat proteolisis dalam keju (Barrett *et al.*, 1999). Defosforilasi oleh asam fosfatase mungkin bertanggung jawab atas beberapa variabilitas dalam tingkat fosforilasi yang ditunjukkan oleh kasein tetapi fosforilasi tidak lengkap mungkin juga bertanggung jawab. Signifikansi dari variabilitas tingkat fosforilasi dalam kualitas keju tidak diketahui tetapi defosforilasi peptida turunan kasein dalam keju mungkin signifikan. Protein pengikat faktor pertumbuhan seperti insulin (IGFBPs) telah terbukti berinteraksi dengan beberapa protein yang ada dalam susu termasuk alpha s2-casein, laktoferin dan transferin. Interaksi ini berimplikasi pada IGFBPs dalam regulasi aktivasi plasminogen karena plasminogen dan t-PA juga berikatan dengan alpha s2-casein (Silanikove *et al.*, 2006). Interaksi protein dan enzim ini, bersama dengan efek supresif, looping, dan positifnya, ditunjukkan pada Gambar 20.



Fosfatase asam bertahan dari pasteurisasi dan karena terkonsentrasi di MFGM, terkonsentrasi dalam dadih keju. Banyak peptida kecil yang larut dalam air yang dihasilkan oleh proteolisis primer adalah fosfopeptida dan sebagian terdefosforilasi selama pematangan, baik oleh fosfatase asam susu atau oleh fosfatase bakteri. Karena fosfopeptida resisten terhadap aksi proteinase dan peptidase, defosforilasi oleh aksi fosfatase merupakan prasyarat penting untuk proteolisis sekunder dalam keju. Namun, studi objektif tentang pentingnya aktivitas fosfatase dalam pematangan dan kualitas keju belum dilaporkan. Xantin oksidase (XO) mereduksi nitrat menjadi nitrit yang diperlukan untuk aktivitas anti-clostridial. Akhirnya, semua nitrat dan nitrit diuraikan menjadi N<sub>2</sub>, kemungkinan oleh XO. Degradasi nitrat penting karena dapat bereaksi dengan asam amino untuk membentuk nitrosamin karsinogenik.

Meskipun informasi yang tepat masih kurang, tidak mungkin bahwa enzim asli dalam susu merupakan penyebab utama variabilitas kualitas keju; beberapa dari enzim ini berkontribusi pada pematangan keju dan dapat berkontribusi pada kualitas unggul keju susu mentah, kemungkinan yang memerlukan penyelidikan.

#### *Biang ragi Tambahan*

Keju jenis Cheddar dan Cheddar tidak memiliki mikroflora sekunder yang disengaja tetapi ada minat yang cukup besar dalam beberapa tahun terakhir dalam penggunaan kultur sekunder tambahan (biasanya laktobasilus mesofilik) karena alasan berikut:

1. untuk mengintensifkan rasa keju yang dianggap terlalu ringan karena peningkatan kualitas mikroba dari susu keju, pasteurisasi susu, penggunaan tong tertutup dan peralatan lainnya (yang mengurangi kontaminasi dari lingkungan) dan penggunaan yang ditentukan -strain starter, yaitu mikroflora keju menjadi terlalu sempit;
2. untuk mempercepat pematangan keju; pematangan keju, terutama keju dengan kadar air yang rendah, dengan rasa yang tinggi, adalah proses yang lambat, dan akibatnya mahal. Berbagai pendekatan untuk mempercepat pematangan telah dinilai, termasuk penggunaan laktobasilus mesofilik (Fox *et al.*, 2003);
3. untuk memberikan karakteristik rasa yang dapat diidentifikasi pada keju yang diproduksi oleh produsen tertentu atau dijual oleh pengecer tertentu;

4. untuk meningkatkan cita rasa keju rendah lemak, yang umumnya kurang berasa; inokulasi keju dengan laktobasilus mesofilik yang menekan pertumbuhan laktobasilus adventif (NSLAB).

Karena NSLAB tidak terkontrol (mereka adalah satu-satunya komponen keju yang benar-benar tidak terkontrol), mereka mungkin berkontribusi setidaknya sampai batas tertentu terhadap variabilitas. Dalam hal ini, laktobacilli tambahan tidak perlu berkontribusi pada biokimia pematangan, hanya menekan pertumbuhan NSLAB adventif.

Sejumlah besar penelitian tentang pentingnya laktobasilus mesofilik dalam keju telah dilaporkan selama 10 tahun terakhir dan hasilnya tampak menjanjikan. Penelitian lebih lanjut di bidang ini diperlukan. *Lactobacillus* spp. termofilik. lebih efektif sebagai tambahan daripada *Lactobacillus* mesofilik (Tobin, 1999; Hannon *et al.*, 2006), mungkin karena mereka mati dengan cepat dalam keju, melisiskan dan melepaskan enzim intraseluler. Baik *Lactobacillus* mesofilik dan termofilik dan *Sc. thermophilus* sedang digunakan secara komersial sebagai kultur tambahan untuk keju Cheddar, dan mungkin untuk varietas lain. *Sc. thermophilus* digunakan terutama untuk meningkatkan ketahanan fag kultur (karena tahan terhadap fag laktokokus) dan untuk memungkinkan penggunaan suhu masak yang lebih tinggi, memfasilitasi kontrol yang lebih baik atas komposisi keju dan karenanya pematangan dan kualitas.

---

## ***BAB VII TREN SELANJUTNYA***

---

### *Tren Utama*

#### *Protektif Biang Ragi dalam Keju*

Keju dengan kualitas batas mikrobiologis juga dapat dengan cepat dianggap tidak memuaskan jika disimpan dalam kondisi yang tidak sesuai di rumah. Seperti dibahas pada bagian sebelumnya, ragi dan kapang juga umum, kadang-kadang utama, organisme pembusuk produk makanan, terutama produk susu fermentasi dan keju. Organisme ini, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang parah dan secara signifikan mengurangi umur simpan produk, dapat menimbulkan bahaya kesehatan karena produksi mikotoksin. Oleh karena itu, ada kebutuhan nyata untuk meningkatkan kontrol keamanan mikrobiologis keju dari susu ke konsumen, dan ini dapat dicapai dengan kultur mikroba dengan fitur antimikroba dan efek perlindungan dalam keju (Grattepanche *et al.*, 2008).

#### *Strain Bakteriosinogenik*

Dalam dua dekade terakhir, beberapa penelitian telah menunjukkan potensi bakteriosin untuk mengendalikan pertumbuhan mikroorganisme patogen dalam produk makanan (Cleveland *et al.*, 2001). Bakteriosin adalah peptida dengan aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh beragam bakteri. Sampai saat ini, sebagian besar bakteriosin Gram-positif yang teridentifikasi diproduksi oleh BAL, di antaranya ada organisme yang umumnya diakui sebagai aman (GRAS) yang digunakan untuk fermentasi susu (Guinane *et al.*, 2005). Selain itu, bakteriosin dapat dengan cepat didegradasi oleh protease di saluran pencernaan dan oleh karena itu bakteriosin tidak boleh mengganggu mikrobiota usus manusia (Benborn *et al.*, 2006). Akhirnya, bakteriosin yang diproduksi *in situ* oleh bakteri food grade tidak harus ditunjukkan pada label produk. Sebagian besar penelitian tentang bakteriosin dalam keju telah menargetkan kontrol *L. monocytogenes*, atau spesies *Listeria* lain yang digunakan sebagai model untuk patogen ini, dan spora clostridia bertanggung jawab atas cacat tiup lambat pada keju semi-keras dan keras (Grattepanche *et al.*, 2008).

Nisin, bakteriosin kelas I (<5kDa peptida yang mengandung asam amino lantionin yang tidak biasa) yang diproduksi oleh lactococci adalah bakteriosin terbaik yang didokumentasikan dari LAB dan tetap menjadi model untuk pengembangan bakteriosin lain. Namun, stabilitas nisin sangat tergantung pada kondisi lingkungan, khususnya pH, dan ini membatasi penggunaannya pada makanan asam (Rollerna *et al.*, 1995). Selain itu, nisin dapat didegradasi oleh enzim proteolitik dalam keju, yang menyebabkan penurunan aktivitas yang signifikan selama pematangan. enkapsulasi nisin murni ke dalam liposom memungkinkan retensi 90% dari aktivitas nisin awal dan dengan demikian, menghasilkan peningkatan kontrol populasi *Listeria innocua* dalam keju yang terkontaminasi secara artifisial selama pematangan (Benech *et al.*, 2002). Namun, sampai saat ini hanya sedikit aplikasi nisin dalam industri keju yang muncul, seperti yang dirangkum dalam ulasan terbaru (Cheigh dan Pyun, 2005; Galvez *et al.*, 2007; Alegria *et al.*, 2010)

Berbeda dengan nisin, lacticin 3147, dua komponen peptida antimikroba spektrum luas yang diproduksi oleh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147 menunjukkan stabilitas tinggi pada kisaran pH yang luas (Ross *et al.*, 2000). Pediocin AcH juga dikenal sebagai pediocin PA-1 atau SJ-1) adalah bakteriosin anti-listerial spektrum luas lainnya yang termasuk dalam kelas II (peptida stabil panas yang tidak dimodifikasi <10 kDa). Ini diproduksi terutama oleh *Pediococcus acidilactici* (Drider *et al.*, 2006), populasi kecil di banyak keju. Namun, *Lactobacillus plantarum* WHE (tersedia secara komersial sebagai ALC 01, kultur anti-listerial, Danisco, Jerman) yang diisolasi dari keju Munster juga terbukti menghasilkan pediosin (Ennahar *et al.*, 1996).

Dalam beberapa tahun terakhir, beberapa bakteriosin lain yang berpotensi digunakan dalam keju telah dilaporkan. *Streptococcus* dan *Enterococcus*, dua genera dengan relevansi khusus dalam pembuatan keju, juga menghasilkan bakteriosin yang sangat beragam (Nes *et al.*, 2007). Thermophilin, diproduksi oleh beberapa strain *Streptococcus thermophilus*, adalah bakteriosin kelas II dengan aktivitas penghambatan terhadap *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* dan *Listeria* (Fontaine *et al.*, 2008). *Streptococcus macedonicus* adalah spesies yang relatif baru yang pertama kali diisolasi dari keju Kayseri Yunani (Tsakalidou *et al.*, 1998). Macedocin, diproduksi oleh *Str. macedonicus* ACA-DC 198, termasuk dalam bakteriosin lantibiotik (Kelas I) dan menghambat beberapa BAL serta *Clostridium tyrobutyricum* (Georgalaki *et al.*, 2002). *C. tyrobutyricum* bertanggung jawab atas cacat besar pada keju semi-keras dan keras, seperti jenis Swiss atau Gouda, karena produksi tinggi butirir dan asam asetat, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> dari fermentasi laktat, yang menyebabkan cacat rasa yang signifikan dan keju terlambat bertuip

(Bachmann *et al.*, 2004). Perkecambahan spora Clostridia dapat dihambat oleh aditif seperti nitrat, lisozim atau nisin, tetapi penggunaannya dapat dibatasi oleh peraturan setempat (Bachmann *et al.*, 2004). Oleh karena itu, penggunaan galur penghasil macedocin sebagai kultur tambahan dapat menjadi alternatif yang relevan untuk mengendalikan perkembangan Clostridia. Tidak seperti lactococci nisinogenik, *Str. macedonicus* tidak dihambat oleh langkah memasak dari proses pembuatan, dan macedocin stabil pada kisaran pH yang luas dan pada fermentasi yang lama (Van den Berghe *et al.*, 2006). Anastasiou *et al.* (2007) mengevaluasi kinerja *Str. macedonicus* ACA-DC 198 yang digunakan sebagai starter tunggal atau kultur tambahan dalam produksi keju Kayseri dari susu pasteurisasi.

Konsorsium mikroba keju 'Tolminc' diperbanyak dalam susu dan diperiksa pada akhir propagasi aktivitas antimikrobanya dan adanya determinan gen untuk bakteriosin. Kehadiran determinan gen untuk bakteriosin yang berbeda telah ditunjukkan dalam keju susu mentah jenis tradisional Slovenia Tolminc dan Kraški (Trmčić *et al.*, 2011). Perbandingan hasil yang diperoleh sebelum dan sesudah perbanyakkan mengarah pada kesimpulan bahwa sebagian besar galur yang memiliki determinan gen untuk bakteriosin tidak dapat bertahan selama perbanyakkan. Beberapa strain *Enterococcus* spp. mampu memproduksi bakteriosin dengan aktivitas antimikroba melawan bakteri patogen penting dalam produk susu. Vera Pingitore *et al.* (2012) melaporkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh dua strain *Enterococcus* (*Enterococcus mundtii* CRL35 dan *Enterococcus faecium* ST88Ch), diisolasi dari keju, dikarakterisasi dan diuji kemampuannya untuk mengontrol pertumbuhan *Listeria monocytogenes* 426 dalam keju Brazillian Minas segar yang terkontaminasi secara eksperimental selama penyimpanan berpendingin. Tim peneliti Brazillian lainnya (Tulini *et al.*, 2013) mengidentifikasi isolat *Lactobacillus* bacteriocinogenic (FT259) yang diperoleh dari jenis keju yang sama dengan Vera Pinitore *et al.* (2012) dan untuk mengevaluasi potensi probiotik dan antimikrobanya. Hasil menunjukkan *L. paraplantarum* FT259 adalah probiotik potensial dan produksi bakteriosin mungkin merupakan fitur yang menarik untuk aplikasi makanan. *Enterococcus* spp. isolat menyajikan aplikasi potensial yang menarik untuk pengawetan makanan karena produksi bakteriosin, namun mengandung beberapa faktor virulensi (Moraes *et al.*, 2012).

*Kultur pelindung yang menghasilkan senyawa antimikroba non-protein dengan berat molekul rendah*

Baru-baru ini, kultur antijamur menjadi penting untuk aplikasi keju meskipun pekerjaan terbatas telah dilakukan di bidang ini. Sifat antijamur LAB baru-baru ini ditinjau oleh Schnürer dan Magnusson (2005). Penilaian pembusukan keju oleh ragi dan kapang rumit karena aktivitas jamur selama pematangan dapat diperlukan atau merugikan kualitas produk, tergantung pada jenis keju dan mikroorganisme (Filtenborg *et al.*, 1996). Pembusukan keju karena pertumbuhan jamur disebabkan oleh produksi senyawa volatil, menyebabkan off-flavors, dan juga akumulasi mikotoksin, yang dapat meningkatkan alergi (Filtenborg *et al.*, 1996; Smits dan Brul, 2005). *Penicilium* spp. dan *Aspergillus* spp. adalah jamur pembusuk penting dalam keju keras, semi-keras dan semi-lunak bebas pengawet, sedangkan *Candida* spp., *Kluyveromyces marxianus* dan *Pichia* spp. adalah kontaminan utama dalam keju lunak yang belum matang (Fleet, 1990; Filtenborg *et al.*, 1996).

Berbeda dengan peptida antibakteri, hanya sedikit yang diketahui tentang mekanisme antijamur. Sejauh ini, penelitian terutama diarahkan untuk mengidentifikasi metabolit antijamur yang berbeda yang diproduksi dalam fermentasi *in vitro* sederhana, tetapi metabolit antijamur yang terdeteksi tidak hanya bertanggung jawab atas fitur antijamur dari galur atau kultur tertentu. Karena interaksi yang kompleks dan sinergis antara senyawa berbobot molekul rendah yang berbeda dan kemungkinan interaksi sel-ke-sel, mekanisme keseluruhan sulit untuk dijelaskan (Schnürer dan Magnusson, 2005). Grattepanche *et al.* (2008) mengidentifikasi produksi beberapa antimikroba, termasuk asam 2-pirolidon-5-karboksilat, asam 3-fenillaktat, asam hidrosifenilaktat, dan asam suksinat selain asam propionat dan asetat, selama fermentasi *Lb. paracasei* SM20 dan *Propionibacterium jensenii* SM11 dalam media berbasis whey (Grattepanche *et al.*, 2008). Demikian pula, *Lb. rhamnosus* LC705 terbukti menghasilkan asam 2-pirolidon-5-karboksilat (Yang *et al.*, 1997). Selanjutnya, campuran termasuk asam asetat, kaproat, format, propionat, butirrat, n-valerat, dan asam benzoat, serta asam lemak 3-hidroksi, senyawa protein dan dipeptida siklik digambarkan sebagai senyawa antijamur BAL (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Sjögren *et al.*, 2003; Ström *et al.*, 2002).

Salah satu karakteristik umum adalah bahwa semua senyawa ini harus hadir pada konsentrasi rendah berbeda dengan konsentrasi penghambatan minimal yang tinggi untuk jamur, mengkonfirmasi kompleksitas mekanisme antijamur (Ström *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1997). Penerapan kultur pelindung antijamur sangat menjanjikan, terutama untuk industri keju. Beberapa strain baru-baru ini dikembangkan untuk aplikasi keju tetapi penelitian lebih lanjut diperlukan

untuk menjelaskan mekanismenya, mengurangi biaya dan untuk implementasi oleh industri. Efektivitas kultur pelindung yang tinggi sering dikaitkan dengan tingkat inokulasi yang tinggi, yang dapat mempengaruhi kualitas makanan dan meningkatkan biaya dibandingkan dengan pengawetan kimia tradisional (Miescher Schwenninger dan Meile, 2004). Jelas, optimasi hati-hati dari sistem antijamur dan aplikasinya diperlukan.

#### *Sistem Resistensi Fag yang Direkayasa dalam Keju*

Kekayaan pengetahuan yang luas yang telah terakumulasi mengenai biologi fag LAB telah memungkinkan para peneliti untuk mengembangkan sejumlah sistem ketahanan fag buatan atau yang disebut 'cerdas'. Ini memanfaatkan gen tertentu dan/atau fag atau sekuens DNA inang yang dimasukkan ke dalam sel baik pada vektor plasmid atau dengan integrasi kromosom. Kehadiran sekuens DNA heterolog ini atau ekspresi gen tertentu dapat mengganggu siklus hidup fag, sehingga memberikan tingkat perlindungan pada galur inang. Topik ini telah ditinjau secara ekstensif oleh McGrath *et al.* (2002, 2004) dan hanya akan dibahas secara singkat di sini.

#### *Resistensi yang dikodekan fag (Per)*

Hill *et al.* (1990) mencatat bahwa memasok fragmen DNA genomik b50 spesifik pada vektor plasmid di trans memberikan fenotipe resistensi fag dan bahwa replikasi DNA fag intraseluler terhambat pada galur yang menyimpan plasmid ini. Analisis urutan DNA mengungkapkan bahwa apa yang disebut fragmen DNA per-pemberian ini mengandung sejumlah urutan berulang langsung dan terbalik, karakteristik asal replikasi DNA. McGrath *et al.* (2004) mengusulkan bahwa fragmen perSO sebenarnya adalah asal dari replikasi bS0 dan bahwa fenotipe resistensi yang diberikan adalah karena titrasi faktor replikasi DNA fag esensial oleh plasmidborne. Baru-baru ini, analisis rinci dari delapan plasmid *L. lactis* UC509.9 dianalisis oleh Ainsworth *et al.*, (2014). Fenotipe industri utama dipetakan dan gen yang biasanya terkait dengan plasmid laktokokus diidentifikasi. Empat sistem resistensi bakteriofag bawaan plasmid yang berbeda diidentifikasi, termasuk dua sistem infeksi yang gagal, AbiB dan AbiD1, sehingga mendukung resistensi fag yang diamati dari *L. lactis* UC509.9 (Ainsworth *et al.*, 2014).

#### *mRNA antisense*

Pemanfaatan strategi mRNA antisense melibatkan kloning gen target dalam orientasi terbalik relatif terhadap promotor aktif. MRNA antisense yang dihasilkan diasumsikan membentuk hibrida yang stabil dengan mRNA target, sehingga menghambat translasi melalui pemuatan ribosom yang tidak efektif, dan/atau meningkatkan sensitivitas terhadap enzim pendegradasi RNA (Inoue, 1988; Casey *et al.*, 2014). Sturino dan Klaenhammer (2002) mengembangkan sistem antisense untuk digunakan di *Sc. termofilus*. Sistem ini menargetkan gen helikase diduga yang ditemukan pada modul replikasi banyak fag tipe Sfi21 dan terbukti efektif melawan sejumlah fag yang menginfeksi *Sc. termophilus*.

#### *Penggantian gen/mutagenesis penyisipan*

Peran gen inang yang dikodekan secara kromosom, pip (protein infeksi fag), ekspresi yang diperlukan untuk infeksi *Lc. lactis* subsp. *lactis* oleh sejumlah fag, telah dibahas sebelumnya. Strain *Laktococcus* yang tidak sensitif terhadap serangan fag tipe c2 telah direkayasa dengan mengganti gen pip kromosom dengan alel yang telah bermutasi *in vitro* (Garbutt *et al.*, 1997). Hal ini menghasilkan produksi galur laktokokus tingkat makanan yang tidak mengandung sekuens DNA rekombinan. Jenis resistensi fag yang direkayasa ini menguntungkan karena lokasi kromosomnya yang stabil, yang meniadakan tekanan selektif yang diperlukan untuk banyak sistem yang dibawa oleh plasmid. Pengembangan galur LAB yang tahan fag melalui rekayasa kromosom dapat mewakili salah satu strategi yang paling menjanjikan untuk menghasilkan galur yang stabil, food grade, untuk keperluan industri. Pendekatan ini memiliki keunggulan dibandingkan sistem yang dibawa oleh plasmid yang secara intrinsik tidak stabil dan/atau dapat mewakili beban metabolisme yang tinggi ke sel, yang menyebabkan penghapusan di dalam plasmid atau bahkan kehilangan plasmid selama pertumbuhan non-selektif. Baru-baru ini, gen antiporter proton-klorida (eriC) yang sangat terkonservasi, sebuah gen yang banyak terdapat dalam mikrobioma usus ditemukan oleh Himar1 transposon (Tn)-mutagenesis dianalisis oleh Hemarajata *et al.* (2014). Ditemukan bahwa inaktivasi genetik eriC dengan penyisipan transposon dan rekombinasi genetik mengakibatkan penurunan kemampuan *L. reuteri* untuk menghambat produksi TNF oleh sel myeloid manusia yang diaktifkan, penurunan produksi histamin oleh bakteri dan penurunan regulasi ekspresi gen cluster histidin dekarboksilase dibandingkan dengan gen klaster histidin dekarboksilase. WT 6475. Eric milik keluarga besar pengangkut ion yang mencakup saluran



klorida dan antiporter proton-klorida dan dapat memfasilitasi ketersediaan proton untuk reaksi dekarboksilasi, menghasilkan produksi histamin oleh *L. reuteri* (Hemarajata *et al.*, 2014).

### *Keju sebagai Pembawa Probiotik*

Probiotik didefinisikan oleh FAO/WHO (2002) sebagai “mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang memadai akan memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya”. Efek menguntungkan dalam pengobatan dan pencegahan berbagai penyakit atau gangguan usus seperti penyakit radang usus atau intoleransi laktosa sangat diperdebatkan dalam literatur (Ouweland, 2004). Mikroorganisme probiotik mencakup beberapa genera bakteri dan ragi (Holzapfel *et al.*, 2001), dan di antaranya, strain enterococci, lactobacilli dan propionibacteria penting untuk pembuatan beberapa keju (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Meile *et al.*, 2008), dan beradaptasi dengan baik dengan lingkungan keju. Di sisi lain, bifidobacteria dan *Lactobacillus acidophilus* paling banyak digunakan dalam produk susu fungsional yang mengandung probiotik, terutama susu, yoghurt, es krim, dan makanan penutup (Champagne *et al.*, 2008). Namun, kondisi yang dihadapi dalam produk ini sangat berbeda dari habitat aslinya, saluran pencernaan manusia dan hewan. Dengan demikian, komposisi produk dapat memiliki efek merusak pada kelangsungan hidup mereka, yang merupakan salah satu prasyarat yang paling penting untuk efek kesehatan yang menguntungkan (Ouweland, 2004). Karena keasamannya yang terbatas, tingkat oksigen yang rendah, kandungan lipid yang tinggi dan suhu penyimpanan yang rendah, keju adalah pembawa yang cocok untuk membawa bakteri probiotik hidup (Grattepanche *et al.*, 2008). Komposisi kimia kasar keju (yaitu garam, protein, lemak dan kelembaban) dan pH umumnya tidak dipengaruhi oleh bakteri probiotik tambahan (Dinakar dan Mistry, 1994; Daingle *et al.*, 1999; Ong *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2011; Oberg *et al.*, 2011). Namun, pada keju Cheddar yang mengandung *Bifidobacterium lactis* Bb-12, McBrearty *et al.* (2001) mengukur tingkat kelembaban yang lebih tinggi 40%, melebihi batas legal, dibandingkan dengan keju kontrol yang mengandung sekitar 38% kelembaban. Efek ini, menyebabkan skor tubuh/tekstur yang rendah dalam analisis sensorik, dijelaskan oleh pengasaman yang cepat selama pembuatan keju dengan starter ditambahkan bersama dengan *B. lactis* Bb-12 (McBrearty *et al.*, 2001). Penggabungan kultur probiotik dalam keju umumnya tidak mempengaruhi proteolisis primer yang pada banyak keju dihasilkan dari aktivitas agen koagulan (kecuali untuk keju masak tinggi) dan, pada tingkat lebih rendah, dari plasmin dan selanjutnya, sisa koagulan dan enzim dari mikroflora starter. (Sousa *et al.*, 2001).

Namun, perubahan proteolisis sekunder dan peningkatan kandungan asam amino bebas sering dilaporkan ketika probiotik ditambahkan ke keju (McBrearty *et al.*, 2001; Bergamini *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2006; de Oliviera *et al.*, 2014). Peptida dan asam amino secara langsung berkontribusi pada rasa keju (seperti manis, pahit atau malty) dan dapat menjadi prekursor untuk sintesis rasa lain atau aroma yang mudah menguap, menghasilkan off-flavors (Jerónimo dan Malcata, 2013). Selama pematangan, lipolisis juga memainkan peran penting dalam pengembangan karakteristik keju. Penambahan kultur probiotik tampaknya tidak mempengaruhi profil asam lemak bebas keju, kemungkinan karena aktivitas lipolitik starter yang lebih tinggi dan beberapa NSLAB dibandingkan dengan kultur probiotik (Ong *et al.*, 2006; Jedidi *et al.*, 2014).

Strain komersial *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, atau *Bifidobacterium lactis* ditambahkan sebagai tambahan probiotik dan digunakan untuk mempelajari kelangsungan hidup bakteri probiotik dalam keju Cheddar penuh lemak dan rendah lemak (Oberg *et al.*, 2011). Ketika tambahan kultur *Lb. casei* atau *Lb. paracasei* ditambahkan selama pembuatan keju, mereka tampak tetap dalam jumlah tinggi untuk waktu yang lama (9 bulan) ketika dihitung pada media MRS + vankomisin, tetapi ada kemungkinan yang masuk akal bahwa mereka telah diambil alih oleh NSLAB, yang juga tumbuh dengan mudah pada media ini (Oberg *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2011). Pencacahan menggunakan beberapa media selektif dapat memberikan wawasan tentang apakah itu kultur tambahan yang sebenarnya atau galur NSLAB yang sedang dicacah. Meningkatkan dan memperpanjang daya tahan bakteri probiotik juga menjadi prioritas dalam aspek ini, namun enkapsulasi mikro dan nano tingkat lanjut akan dianggap cukup untuk mengatasi masalah ini, meskipun seperti pada tahun 2014, masih dalam tahap pengembangan (Burgain *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2012; Darukaradhya *et al.*, 2013; de Oliveira *et al.*, 2014)

### *Teknologi Berbasis Membran Canggih dalam Pembuatan Keju*

Pemrosesan membran telah merevolusi industri susu dalam banyak cara yang menarik dan telah menghasilkan proses dan pengembangan produk baru yang signifikan. Revolusi ini telah terjadi selama 44 tahun terakhir dan tidak hanya mencakup ultrafiltrasi dan nanofiltrasi, tetapi juga mikrofiltrasi. Sejarah pembuatan keju menggunakan membran dimulai pada akhir 1960-an dengan penemuan proses MMV (Maubois *et al.*, 1969). Proses ini, dinamai menurut penemunya (Maubois, Mocquot dan Vassal), membuka jalan baru untuk kemajuan signifikan dalam pembuatan keju,

termasuk peningkatan efisiensi pabrik, peningkatan hasil keju, pengembangan proses berkelanjutan dan kemungkinan untuk menciptakan varietas keju baru. Akibatnya, banyak pabrik di seluruh dunia, terutama Eropa, sekarang menggunakan proses ini untuk memproduksi berbagai macam keju (Korolczuk *et al.*, 1986; Maubois, 2002). Sejak tahun 1969, aplikasi membran yang berhubungan dengan keju telah berkembang ke berbagai bidang, termasuk pembuatan keju segar, lunak, semi-keras dan keras dari susu sapi, kambing, domba betina atau kerbau air, produksi susu bubuk dengan sifat pembuatan keju yang baik. (Maubois *et al.*, 1973), pemulihan sifat koagulasi rennet dari susu yang diberi perlakuan suhu ultrahigh (UHT) (Maubois *et al.*, 1972; Ferron-Baumy *et al.*, 1991), konsentrasi susu di peternakan (Maubois *et al.*, 1979), penghilangan sel somatik (Le Squeren dan Canteri, 1995; Maubois, 2002) dan bakteri dari susu keju dengan mikrofiltrasi (Trouve *et al.*, 1991; Saboya dan Maubois, 2000) dan pengayaan kasein susu keju dengan mikrofiltrasi (Fauquant *et al.*, 1988; Maubois *et al.*, 2001).

Perkembangan ini dikatalisis oleh perbaikan pada komponen membran seperti pengembangan mineral dan membran keramik, studi tentang kesetimbangan fisika-kimia retentat UF, karakterisasi perilaku reologi susu kaya protein, studi tentang pertumbuhan dan aktivitas bakteri starter di pra-keju cair dan keju yang dihasilkan, dan yang lebih penting oleh generasi ide-ide baru dan penerimaan konsep pembuatan keju baru di laboratorium dan di pabrik keju di seluruh dunia (Mistry dan Maubois, 2004).

Masa depan penggunaan teknologi tersebut di dunia industri susu sangat menjanjikan. Banyak varietas keju baru dapat dibuat dengan menggabungkan sifat retentat UF yang disesuaikan dengan mineral dan kemampuan enzimatik starter laktat (Saboya dan Maubois, 2000; Nelson dan Barbano, 2005; Akdemir dan Ozer, 2013). Mikrofiltrasi telah membuka banyak jalan baru dan beragam untuk penelitian dan teknologi. Beberapa telah dengan cepat merambah industri keju. Di masa depan, banyak ide untuk ilmuwan dan teknolog keju mungkin juga berasal dari aplikasi mikrofiltrasi. Misalnya, sel somatik adalah satu-satunya komponen susu yang mengandung semua genom hewan penghasil (Mistry dan Maubois, 2004). Pemisahan spesifik mereka oleh MF dan penggunaan genetika molekuler bisa menjadi titik awal untuk menentukan asal (menghasilkan sapi) dari semua produk susu kecuali yang terbuat dari susu MF. Penghapusan seluruh flora yang mencemari oleh MF juga menawarkan cara untuk mempelajari secara tepat bagaimana setiap jenis bakteri starter yang ditambahkan ke dalam susu keju akan bekerja pada pematangan varietas keju yang berbeda (Mistry dan Maubois, 2004). Namun ada dua hal yang dibahas pada bagian ini, yaitu

nilai tambah whey keju yang diperoleh kembali menggunakan MF/UF dan fouling pada proses pembuatan membran keju.

### *Mendapatkan Kembali Nilai Tambah Whey Keju*

Whey merupakan sub produk dari pengolahan susu menjadi keju atau menjadi kasein. Dalam bentuk kering, mengandung 70-80% laktosa, 9% protein, sesuai dengan 20% dari semua protein susu, dan 8-20% mineral (Daufin *et al.*, 1998). Komponen minor lainnya ada, seperti peptida hidrolisat kappa-kasein, lipid dan bakteri. Ultrafiltrasi whey keju sapi berhasil digunakan dalam produksi konsentrat protein whey (WPC) dengan tingkat kemurnian yang berbeda (kira-kira antara 35 dan 95%), tergantung pada perlakuan awal dan penggunaan diafiltrasi lebih lanjut (Saboya dan Maubois, 2000)

Proses pemisahan membran banyak digunakan untuk memperoleh protein dan konsentrat laktosa dari whey keju (CW) dan whey keju kedua (SCW). Proses membran menghadirkan beberapa keuntungan, yaitu pengurangan produksi air limbah dengan kemungkinan penggunaan kembali dan produksi limbah yang bersih (Minhalma *et al.*, 2007). Proses seperti mikrofiltrasi-MF (Rektor dan Vatai, 2004; Souza *et al.*, 2010), ultrafiltrasi-UF (Cuartas-Uribe *et al.*, 2006; Rektor dan Vatai, 2004; Souza *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2006; Yorgun *et al.*, 2008), nanofiltrasi-NF (Cuartas-Uribe *et al.*, 2006; Minhalma *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2006; Yorgun *et al.*, 2008), dan reverse osmosis-RO (Re *et al.*, 1998; Yorgun *et al.*, 2008) telah banyak dilaporkan dengan retensi protein.

Nanofiltrasi dan reverse osmosis menyebabkan nilai retensi laktosa di atas 89%. Akibatnya, efisiensi penyisihan COD mendekati 90%. Sebaliknya, proses mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi menghadirkan nilai retensi laktosa yang lebih rendah di bawah 40%; namun proses ini sangat efektif dalam retensi lemak (100%) (Rektor dan Vatai, 2004; Souza *et al.*, 2010). Mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi terutama digunakan untuk menghilangkan lemak dan protein, sedangkan pertukaran ion dan osmosis balik digunakan untuk memurnikan dan memekatkan laktosa. Setelah konsentrasi, teknik pengeringan semprot diterapkan untuk mendapatkan bubuk laktosa kemurnian tinggi. Konsentrat protein yang diperoleh bebas garam (Kotoupas *et al.*, 2007) dengan aplikasi potensial dalam industri farmasi dan makanan (Morr dan Barrantes, 1998). Namun, teknologi ini memiliki keterbatasan dari sudut pandang ekonomi. Karena kebutuhan

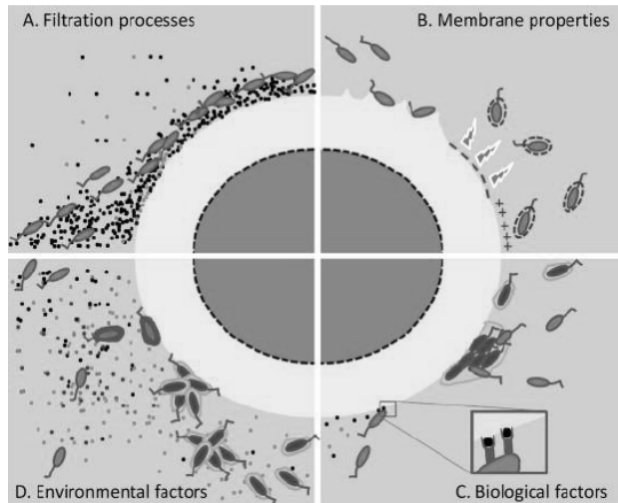
tekanan tinggi, proses membran sangat mahal. Selain itu, konsentrat protein whey mungkin menunjukkan kurangnya keseragaman dalam komposisi (Morr dan Ha, 1993).

Permeat yang berasal dari proses membran masih mempertahankan nilai indikator kontaminan utama yang tinggi. Akibatnya, permeat ini tidak dapat langsung dibuang ke lingkungan penerima. Studi tentang dampak lingkungan dari jenis permeat ini masih langka, yang meliputi karakterisasi, tingkat kontaminasi, pengolahan, pemanfaatan kembali (Prazeres *et al.*, 2012).

#### *Menghindari Fouling dalam Membran Standarisasi Susu*

Meskipun kemajuan dalam teknologi UF dan MF, pengotoran tetap menjadi momok yang harus diminimalkan agar unit membran berfungsi dengan baik. Dalam hal teknologi susu, yang termasuk dalam standarisasi susu sebelum pembuatan keju, pengotoran dapat menyebabkan kerusakan dan kerugian besar jika tidak ditangani dengan benar, karena bahan-bahannya sangat rentan terhadap infestasi bakteri dan terdiri dari polimer dan molekul panjang dan besar yang siap menyumbat saluran. dari lapisan membran.

Baru-baru ini, Habibimana *et al.* (2014) menghipotesiskan mekanisme adhesi awal antara sel dan membran selama proses filtrasi NF/RO (Gambar 23). Saat air umpan melewati membran, kation divalen, bahan organik serta mikroorganisme terkonsentrasi ke permukaan membran selama proses filtrasi NF/RO yang melibatkan fluks permeasi pada tekanan tinggi (Gambar 23a). Selama tahap awal filtrasi, konsentrasi garam pada permukaan membran meningkat dengan polarisasi konsentrasi, yang pada gilirannya meningkatkan tekanan osmotik umpan sehingga mengurangi fluks air. Saat filtrasi dipertahankan, penurunan fluks yang cepat dan bertahap muncul dari penumpukan unsur anorganik dan organik dan mikroorganisme yang berkembang, menutupi seluruh permukaan membran yang dilapisi lapisan kotor yang tebal. Sifat bahan membran relevan dengan interaksi awal antara sel bakteri dan permukaan membran. Kekasaran membran meningkatkan adhesi bakteri melalui peningkatan luas permukaannya dengan mendukung kemungkinan kontak awal tetapi yang paling penting, dengan melindungi sel yang menempel dari pelepasan (Gambar 23b).



**Gambar 23 Mekanisme adhesi awal antara sel dan membran selama proses filtrasi NF/RO**  
*Sumber: Habimana et al. (2014)*

Sifat fisikokimia membran diketahui mempengaruhi adhesi awal bakteri. Sifat seperti muatan permukaan elektronegatif yang rendah dan hidrofobisitas permukaan yang tinggi telah terbukti berkorelasi dengan adhesi bakteri yang tinggi meskipun hal ini tidak dapat digeneralisasi, karena sifat fisikokimia mikroorganisme juga dapat mempengaruhi adhesi (Gambar 23b). Sifat dinding sel bakteri dapat mempengaruhi adhesi bakteri dengan adanya kapsul polisakarida yang membungkus, yang atribut kimianya, dapat meningkatkan adhesi ireversibel (Gambar 23c). Setelah menempel, bakteri penghasil kapsul juga dapat merekrut penjajah "tahap akhir" lainnya ke permukaan membran. Adhesi spesifik antara sel bakteri dan permukaan membran melalui adhesin, komponen permukaan sel dinding sel bakteri, dapat terjadi jika terjadi pengulangan elemen organik atau anorganik yang terikat secara ireversibel pada permukaan membran (Gambar 23c). Faktor lingkungan seperti suhu, pH, konsentrasi garam, keberadaan molekul sinyal diketahui menginduksi sejumlah mekanisme berbeda pada tingkat sel yang mungkin menginduksi adhesi (Gambar 23d). Misalnya konsentrasi garam yang tinggi dikenal untuk mengurangi lapisan ganda listrik sel dan membran yang mengarah ke agregasi sel-sel dan meningkatkan adhesi dengan permukaan lembam. Kehadiran unsur-unsur seperti fosfat anorganik, juga diketahui memicu kaskade reaksi molekuler intraseluler, yang memungkinkan sel untuk melekat pada permukaan lembam (Gambar 23d).

### *Promotor turbulensi*

Promotor turbulensi pasif diperlukan dalam proses pengolahan susu di masa depan, karena dapat memicu turbulensi di saluran umpan, yang pada akhirnya mengibaskan bahan pengotor keluar dari permukaan membran. Di masa lalu, sistem getar digunakan, tetapi kebutuhan energi yang relatif tinggi dan bagian mesin yang rumit dari sistem (yang sulit dirawat) membuat mereka disukai (Bran *et al.*, 2004; Mistry dan Maubois, 2004). Intensifikasi mikrofiltrasi telah dilakukan dengan menggunakan mixer tak bergerak yang terdiri dari serangkaian pasang bilah semielips (Krstićs *et al.*, 2004; Popovic *et al.*, 2013) dan pita bengkok (Popovic dan Tekic, 2011); baik pengotoran reversibel dan ireversibel berkurang dan fluks permeat sangat meningkat.

Popovic *et al.* (2013) melaporkan bahwa pencampur pisau dari dua rasio aspek 2,5 dan 1,3 diuji dalam mikrofiltrasi susu (membran 0,1 m) dan mencapai hasil yang baik dalam hal ini. Fluks permeat secara substansial meningkat dengan penerapan pencampur pisau karena pengurangan pengotoran reversibel dan ireversibel. Peningkatan fluks tertinggi 500–650% untuk laju aliran silang yang sama (relatif terhadap operasi konvensional) diperoleh dengan penerapan mixer blade dengan rasio aspek 1,3 (Popović *et al.*, 2013). Jika dibandingkan untuk hidraulik yang sama Disipated power mixer aspek rasio 2.5 terbukti sedikit lebih efisien karena menyebabkan penurunan tekanan yang lebih rendah. Meskipun terjadi penurunan tekanan yang meningkat, penghematan energi yang diperoleh dengan penerapan blade mixer cukup besar dibandingkan dengan operasi konvensional dan operasi yang menggunakan beberapa mixer lainnya. Dalam membran yang dilengkapi dengan blade mixer, medan aliran berubah sedemikian rupa sehingga menyebabkan gangguan intensif pada lapisan batas, gerusan dan penghilangan bahan pembentuk pengotoran. Medan aliran dicirikan oleh kecepatan aliran silang yang tinggi pada dinding membran, pergantian jalur garis aliran dan gerakan berputar (Popovi *et al.*, 2013).

### *Sumber Biang Ragi Pemula Baru*

Sebagian besar, jika tidak semua, BAL yang ditemukan dalam kultur starter dapat diisolasi dari keju yang dibuat tanpa penambahan kultur starter yang disengaja. Strain tersebut adalah kontaminan alami susu yang tumbuh dan menghasilkan asam selama pembuatan keju. Sumber utama dari bakteri ini masih harus ditentukan. Namun, secara umum dianggap bahwa tumbuhan dan bahan tumbuhan merupakan habitat alami *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Habitat *Lc. lactis* subsp. *cremoris* belum ditentukan tetapi dapat diisolasi dari produk susu. Banyak kultur murni bakteri

starter yang digunakan dalam kultur tertentu berhubungan dengan fag, yang menyiratkan bahwa jumlah strain bakteri starter yang berbeda umumnya terbatas. Oleh karena itu, upaya telah dilakukan untuk mengisolasi galur 'baru' dari susu mentah, tanaman dan sumber alami lainnya (Salama *et al.*, 1995; Cogan *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2002). Setiap galur starter baru yang potensial harus menghasilkan asam dengan cepat, kekurangan pengembangan rasa dalam susu dan tahan terhadap campuran fag biasa. *Lc. lactis* subsp. *lactis* dan *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* tetapi tidak *Lc. lactis* subsp. *cremoris* telah diisolasi dari jelatang merah, thistle tabur biasa, blackberry Himalaya, kentang, mentimun, jagung, kacang manis, kacang-kacangan, melon, jagung dan brokoli dan banyak dari mereka adalah produsen asam yang baik, mengentalkan susu dalam 18 jam pada 21o C (Salama *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 2011; Villegas *et al.*, 2014). Sebaliknya, sangat sedikit strain *Lc. lactis* (sub-spesies tidak ditentukan) yang diisolasi dari produk susu artisanal adalah penghasil asam yang baik (Cogan *et al.*, 1997). Beberapa dari mereka menghasilkan rasa yang tidak biasa dalam susu. Misalnya, kombinasi starter 'liar', yang memiliki aktivitas protolitik rendah dan aktivitas dekarboksilase asam amino tinggi, dengan strain komersial, yang memiliki aktivitas proteolitik tinggi dan aktivitas dekarboksilase rendah, menghasilkan produksi rasa coklat dalam susu, karena ke beberapa aldehida dan asam rantai bercabang (Wouters *et al.*, 2002; Parente dan Cogan, 2004; Fernandez *et al.*, 2011; Kirmaci *et al.*, 2011; Bekkali *et al.*, 2013).



## DAFTAR PUSTAKA

- Aaltonen, Terhi, and Pia Ollikainen. (2011). "Effect of microfiltration of milk on plasmin activity." *International dairy journal* 21(4), 193-197.
- Abou-EI-Nour, A.M. (1998). Effect of sodium chloride, a mixture of sodium chloride and potassium chloride on the curd characteristics. *Egypt. J. Dairy Sci.* 26, 193-202. Academic/Plenum Publishers, New York. (2003) pp. 1001-1026.
- Ahmed, Nawal S., Mona AM Abd El-Gawad, M. M. El-Abd, and N. S. Abd-Rabou. (2011) "Properties of buffalo Mozzarella cheese as affected by type of coagulant." *Acta Sci. Polonorum: Technol. Alimentaria* 10, 889-857.
- Aikawa, J., Yamashita, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S. And Beppu, T. (1990). Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of mucor rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. *J. Biol.Chem.* 265, 13955-13959.
- Ainsworth, Stuart, Jennifer Mahony, and Douwe van Sinderen. (2014) "The plasmid complement of *Lactococcus lactis* UC509. 9 encodes multiple bacteriophage resistance systems." *Applied and environmental microbiology*: AEM-01070.
- Akdemir, Ezgi OKTAV, and A. Ozer. (2013). "Pretreatment of Cheese Whey Effluent Using a Microfiltration Process: A Statistical Design Approach." *Ekoloji* 22(88), 21-27.
- Alegria, Ángel, Pablo Álvarez-Martín, Noelia Sacristán, Elena Fernández, Susana Delgado, and Baltasar Mayo. (2009). "Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk." *International journal of food microbiology* 136(1), 44-51.
- Alegria, Ángel, Susana Delgado, Clara Rocas, Belén López, and Baltasar Mayo. (2010). "Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk." *International journal of food microbiology* 143(1), 61-66.
- Alekseeva, M.A., Anischenko, I.P., Schlegel, A.H., Ott, E.E and Vorobjeva, L.I. (1983). Improving criteria of selection of propionibacteria for cheesemaking, in, *Nauchno-Technichesky Progress*, Shlegel, A.H., ed., Barnaul, Altaiskii TSNTI, 117-129.
- Allison, G.E. and Klaenhammer, T.R. (1998). Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 207-226.
- Aly, Samar, Juliane Floury, Marie-Hélène Famelart, Marie-Noëlle Madec, Didier Dupont, Yann Le Gouar, Sylvie Lortal, and Sophie Jeanson. (2011). "Nisin quantification by ELISA allows the modeling of its apparent diffusion coefficient in model cheeses." *Journal of agricultural and food chemistry* 59, no. 17, 9484-9490.
- Aminifar, M., and Z. Emam-Djomeh. (2014) "Changes of Texture, Microstructure and Free Fatty Acid Contents of Lighvan Cheese during Accelerated Ripening with Lipase." *Journal of Agricultural Science and Technology* 16(1), 113-123.
- Amiri, S., R. Ramezani, and M. Aminlari. (2008). "Antibacterial activity of dextran-conjugated lysozyme against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in cheese curd." *Journal of Food Protection*® 71(2), 11-415.
- Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., L.A. and Stevens, T.H. (1986). PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2490-2499.
- Anastasiou R., Georgalaki M., Manolopoulou E., Kandarakis I., De Vuyst L., and Tsakalidou E., (2007). The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasserli cheese production, *Int. Dairy J.* 17, 208–217.

- Andreeva, N., Dill, J. and Gilliland, G.L. (1992). Can enzymes adopt a self-inhibited form? Results of X-ray crystallographic studies on chymosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1074-1081
- Andren, A. and Bjorck, L. (1986). Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.* 126, 419-427.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, E (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68, 303-316.
- Anonymous, History of Edam Cheese Edam.com. (2005) Retrieved 8th August 2014
- Anonymous, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> accessed 1st August 2014
- Aran, N. (1998). A microbiological study of Kashar cheese. *Milchwissenschaft* 53,565-568.
- Araujo Miño and María Gabriela. (2012). "Influence of standardization, rennet type, curd wash level and cook temperature on the composition, microbiology, functionality, flavour and ripening of novel Swiss-type cheeses."
- Ardö, Ylva, Siv Skeie, and Tim Guinee. (2014). "Salt in cheese ripening." *International Dairy Federation. Catalogue of IDF Publications* 1401: 21-29.
- Arima, K., Yu, J. and Lwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusiUus* var. Lindt. *Meth. Enzymol.* 19, 446-459.
- Atamer Z, Dietrich J, Müller-Merbach M, Neve H, Heller KJ, and Hinrichs J: Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J* 2009, 19:228-235.
- Atamer, Zeynep, and Jörg Hinrichs. "Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing." *International dairy journal* 20, no. 3 (2010): 163-168.
- Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P., and Mulvihill, D. M. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *Journal of Dairy Research*, 68, 417e427.
- Azarnia, Sorayya, Normand Robert, and Byong Lee. "Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening." *Critical reviews in biotechnology* 26, no. 3 (2006): 121-143.
- Bachmann H.P., Bütikofer U., and Isolini D., Swiss-type cheese, in: Roginski H. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Science*, Elsevier, Oxford, UK, 2004, pp. 363–371.
- Bachmann, H., Z. Kruijswijk, D. Molenaar, M. Kleerebezem, and J. E. T. van Hylckama Vlieg. "A high-throughput cheese manufacturing model for effective cheese starter culture screening." *Journal of dairy science* 92, no. 12 (2009): 5868-5882.
- Baer, A. (1995). Influence of casein proteolysis by starter bacteria, rennet and plasmin on the growth of propionibacteria in Swiss-type cheese. *Lait* 75,391-400.
- Bailey, M.J. and Siika-aho, M. (1988). Production of microbial rennin. *Biotechnol. Lett.* 10, 161-166.
- Banks, J.M., Cheese, in *Technology of Dairy Products*, 2nd ed., Early, R., Ed., Blackie Academic Professional Press, London, 1998, p. 81.
- Barbano, D. M., and R. R. Rasmussen. "Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants." *Journal of dairy science* 75, no. 1 (1992): 1-12.
- Barkholt, RV., Christensen, K.A. and Fohmann, B. (1979). Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur. J. Biochem.* 94, 573-580.
- Barrett, EE, Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H. and Fox, P.E (1999). Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 9, 421-427.

- Bastian, Eric D., Karlo G. Hansen, and Rodney J. Brown. "Activation of plasmin with urokinase in ultrafiltered milk for cheese manufacture." *Journal of dairy science* 74, no. 11 (1991): 3669-3676.
- Baudrit, C., M. Sicard, P. H. Wuillemin, and N. Perrot. "Towards a global modelling of the Camembert-type cheese ripening process by coupling heterogeneous knowledge with dynamic Bayesian networks." *Journal of Food Engineering* 98, no. 3 (2010): 283-293.
- Baxter, A., Campbell, C.J., Grinham, C.J., Keane, R.M., Lawton, B.C. and Pendlebury, J.E. (1990). Substrate and inhibitor studies with human gastric aspartic proteinases. *Biochem. J.* 267,665-669.
- Bechaz, S.R., Hickey, M.W., Limsowtin, G.K.Y. and Morgan, A.G. (1998). Low-sah Cheddar: a microbial investigation. *Aust. J. Dairy Technol.* 53, 128 (1 page).
- Bekkali, Najat, Amina El Amraoui, Aayah Hammoumi, V erena Poinsot, and Rajae Belkhou. "Use of Lactococci isolated from Moroccan traditional dairy product: Development of a new starter culture." *African Journal of Biotechnology* 12, no. 38 (2013): 5662-5669.
- Bell, Ryan A., Virginia N. Hillers, and Theo A. Thomas. "The Abuela Project: safe cheese workshops to reduce the incidence of Salmonella typhimurium from consumption of raw-milk fresh cheese." *American journal of public health* 89, no. 9 (1999): 1421-1424.
- Belozersky, M.A., Sarbakanova, S.T. and Dunaevsky, Y.E. (1989). Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta* 177, 321-326.
- Benech R.O., Kheadr E.E., Laridi R., Lacroix C., and Fliss I., Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3683–3690.
- Benezech, T. and Maingonnat, J.E (1994). Characterization of the rheological properties of yoghurt- a review. *J. Food Eng.* 21,447-472.
- Beresford, T. and Williams, A. (eds). "The Microbiology of Cheese Ripening", *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1. Elsevier (2004), 287-303.
- Beresford, T.P, Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11,259-274.
- Bergamini C.V., Hynes E.R., and Zalazar C.A., Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 856–866.
- Berka, RM, Bayliss, FT, Bloebaum, P, Culen, D, Dunn-Coleman, NS, Kodama, KH, Hayenga, KJ, Hitzeman, RA, Lamsa, MH, Przetak, MM, Rey, MW, Wilson, LJ, Ward M. (1991). *Aspergillus niger* var. *awamori* as host for the expression of heterologous genes. In: Kelly JW Baldwin TO (eds) *Applications of enzyme biotechnology*. Plenum New York, 273–292.
- Bernbom N., Licht T.R., Brogren C.H., Jelle B., Johansen A.H., Badiola I., Jogensen F.K., and N orrung B., (2006). Effect of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 239–244.
- Beukes, Elisabeth M., Bernie H. Bester, and Johannes F. Mostert. (2001). "The microbiology of South African traditional fermented milks." *International Journal of Food Microbiology* 63(3), 189-197.
- Bhowmik T and Marth E H (1990) Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science* 73 859–866.
- Bhowmik, T. and Marth, E.H. (1990a). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* 73,859-866.

- Bhowmik, T., Riesterer, R., van Boekel, M.A.J.S. and Marth, E.H. (1990). Characteristics of low-fat Cheddar cheese made with added *Micrococcus* or *Pediococcus* species. *Milchwissenschaft* 45,230-235.
- Biliaderis, C.G., Khan, M.M. and Blank, G. (1992). Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates. *Int. Dairy J.* 2, 311-323.
- Bintsis, T. "Quality of the Brine." *Brined Cheeses* (2008): John Wiley & Sons, 264.
- Bintsis, T. and Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 55, 113-120.
- Bintsis, T. and Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 55, 113-120.
- Bintsis, T., and P. Papademas. (2002). "Microbiological quality of white-brined cheeses: a review." *International Journal of Dairy Technology* 55(3), 113-120.
- Bissonnette, E, Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, M. and Moineau, S. (2000). Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 83,620-627.
- Bodyfelt, E.W., Tobias, J. and Trout, G.M. (1988). *The Sensory Evaluation of Dairy Products*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Bogovič Matijašić, Bojana, Mojca Koman Rajšp, Bogdan Perko, and Irena Rogelj. (2007). "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*." *International dairy journal* 17(2), 157-166.
- Bonaïti, C., M-N. Leclercq-Perlat, E. Latrille, and G. Corrieu. (2004). "Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of Smear Soft Cheeses Ripened Under Controlled Conditions: Relative Humidity and Temperature Influences." *Journal of dairy science* 87(11), 3976-3988.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M. and Spinnler, H.E. (2001). L-Methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J. Dairy Res.* 68, 663-674.
- Bouton, Y., Guyot, P. and Grappin, R. (1998). Preliminary characterization of microflora of Comte cheese. *Int. J. Food Microbio!* 85, 123-131.
- Boyaval, P., Deborde, C., Corre, C., Blanco, C. and Begue, E. (1999). Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Lait* 79, 59-69.
- Bramley, A.J. and McKinnon, C.H. (1990). The microbiology of raw milk, in, *The Microbiology of Milk, Dairy Microbiology*, Robinson, R.K., ed., Elsevier Applied Science, London. pp. 163-208.
- Brans, G. B. P. W., C. G. P. H. Schroen, R. G. M. Van der Sman, and R. M. Boom. (2004). "Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges." *Journal of Membrane Science* 243(1), 263-272.
- Breene, W.M., Olson, N.E and Price, W.V. (1965). Salt absorption by Cheddar cheese curd. *J. Dairy Sci.* 48,621-627.
- Bremer, E.G.B., Bijsterbosch, B.H., Schrijvers, R., van Vliet, T. and Walstra, P. (1990). On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Colloids Surfaces* 51,159-170.
- Bremer, E.G.B., van Vliet, T. and Walstra, P. (1989). Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 85, 3359-3372.
- Bremer, L.G.B. (1992). *Fractal Aggregation in Relation to Formation and Properties of Particle Gels* PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Bremer, L.G.B., Bijsterbosch, B.H., Walstra, P. and van Vliet, T. (1993). Formation, properties and fractal structure of particle gels. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 46, 117-128.

- Bringe, N.A. and Kinsella, J.E. (1986). Use of platelet aggrerometer to monitor the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *J. Dairy Res.* 53,359-370.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brennand, C., Srickland, M., Houck, K., Johnson, M.E. and Steele, J.L. (2002). Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1778-1785.
- Brown, E.D. and Yada, R.Y. (1991). A kinetic and equilibrium study of the denaturation of aspartic proteinases from the fungi, *Endothia parasitica* and *Mucor miehei*. *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 406-415.
- Buňka, František, Jiří Štětina, and Jan Hrabě. (2008). "The effect of storage temperature and time on the consistency and color of sterilized processed cheese." *European Food Research and Technology* 228(2), 223-229.
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder, and J. Scher. (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications." *Journal of Food Engineering* 104 (4), 467-483.
- Buttchereit, N., E. Stamer, W. Junge, and G. Thaller. (2010). "Evaluation of five lactation curve models fitted for fat: protein ratio of milk and daily energy balance." *Journal of dairy science* 93 (4), 1702-1712.
- Cabiddu, A., M. Decandia, M. Addis, G. Piredda, A. Pirisi, and G. Molle. (2005). "Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk." *Small Ruminant Research* 59 (2), 169-180.
- Caldeo, V., and P. L. H. McSweeney. "Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties." *International Dairy Journal* 25, no. 1 (2012): 16-20.
- Calligaris, Sonia, Alessandro Gulotta, Alexandra Ignat, Daniela Bermúdez-Aguirre, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, and Maria Cristina Nicoli. "Milk pre-treatment by high pressure homogenization in the manufacturing of "queso fresco" fortified with omega-3 fatty acids." *LWT-Food Science and Technology* 50, no. 2 (2013): 629-633.
- Cappa, E, Bottazzi, V., Bosi, E and Parisi, M.G. (1997). Characterization of propionibacteria in Grana cheese. *Sci. Tecn. Lattiero-Caesaria* 47,405-414.
- Carlson, A., Hill, G.C. and Olson, N.E (1986). The coagulation of milk with immobilized enzymes: a critical review. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 642-650.
- Carlson, Alfred, Charles G. Hill, and Norman F. Olson. (1987). "Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation." *Biotechnology and bioengineering* 29 (5), 582-589.
- Carminati, D., E. Neviani, G. Ottogalli, and G. Giraffa. (1999). "Use of surface-smear bacteria for inhibition of *Listeria monocytogenes* on the rind of smear cheese." *Food microbiology* 16 (1), 29-36.
- Carmona, Salvador; Ezzamel, Mahmoud (2007). "Accounting and accountability in ancient civilizations: Mesopotamia and ancient Egypt". *Accounting and Accountability* (Emeral Group Publishing) 20 (2).
- Carraro, Lisa, Michela Maifreni, Ingrid Bartolomeoli, Maria Elena Martino, Enrico Novelli, Francesca Frigo, Marilena Marino, and Barbara Cardazzo. (2011). "Comparison of culture-dependent and-independent methods for bacterial community monitoring during Montasio Cheese manufacturing." *Research in microbiology* 162 (3) ~~(2011)~~: 231-239.

- Carrasco, Elena, Andrés Morales-Rueda, and Rosa María García-Gimeno. (2012). "Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review." *Food Research International* 45 (2), 545-556.
- Cartoni, Giampaolo, Franco Coccioli, Renata Jasionowska, and Maurizio Masci. "Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions." *Journal of Chromatography A* 846, no. 1 (1999): 135-141.
- Casey, Eoghan, Jennifer Mahony, Mary O'Connell-Motherway, Francesca Bottacini, Anneleen Cornelissen, Horst Neve, Knut J. Heller, Jean-Paul Noben, Fabio Dal Bello, and Douwe van Sinderen. (2014). "Molecular characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages." *Applied and environmental microbiology*, AEM-01268.
- Castillo, M., J. A. Lucey, T. Wang, and F. A. Payne. (2006). "Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics. Cottage cheese-type gels." *International dairy journal* 16 (2), 153-163.
- Castillo, Manuel, Colette C. Fagan, Donal J. O'Callaghan, Colm P. O'Donnell, and Frederick Alan Payne. (2011). "Online, continuous sensor and method for curd moisture content control in cheese making." U.S. Patent 7,892,584, issued February 22, 2011.
- Centeno, J. A., F. J. Tomillo, E. Fernández-García, P. Gaya, and M. Nunez. (2002). "Effect of Wild Strains of *Lactococcus lactis* on the Volatile Profile and the Sensory Characteristics of Ewes' Raw Milk Cheese." *Journal of dairy science* 85(12), 3164-3172.
- Chamba, Jean-François, and Éric Perreard. (2002). "Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese." *Le Lait* 82(1), 33-44.
- Champagne C., Gardner N., Roy D., (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 61–84.
- Chandan, Ramesh C., Rohit Kapoor, and A. Kilara. (2011). "Principles of cheese technology." *Dairy ingredients for food processing, 1st edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa*, 225-265.
- Cheeseman, G.C. (1965). Denaturation of rennin: effect on activity and molecular configuration. *Nature* 205, 1011-1012.
- Cheigh C.I., and Pyun Y.R., (2005). Nisin biosynthesis and its properties, *Biotechnol. Lett.* 27, 1641–1648.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. CRC press.
- Chich, J.E, Marchesseau, K. and Gripon, J.C. (1997). Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NDCO 763: purification and characterization. *Int. Dairy J.* 7, 169-174.
- Chin, S.E, Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognised class of anticarcinogens. *J. Food Cornp. Anal.* 5,185-197.
- Chitpinityol, Supanee, and M. James C. Crabbe. "Chymosin and aspartic proteinases." *Food Chemistry* 61, no. 4 (1998): 395-418.
- Chopin MC. (1980). Resistance of 17 mesophilic lactic Streptococcus bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J Dairy Res* 47:131-139.
- Chopin, A. (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 21-38.
- Cibik, R. and Chapot-Chartier, M.-P. (2000). Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 862-869.
- Cibik, R., Lepage, E. and Tailliez, P. (2000). Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD

- fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 267-278.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., and Chikindas M.L., (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20.
- Cobos, A., Home, D.S. and Muir, D.D. (1995). Rheological properties of acid skim milk gels. 1. Effect of composition, process and acidification conditions on products from recombined milks. *Milchwissenschaft* 50, 444-448.
- Cocconcelli, P. S., C. Fontana, D. Bassi, S. Gazzola, and E. Salvatore. (2013). "25. Surface microbiota analysis of Italian cheeses." *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences* 6, 359.
- Coffey, A. and Ross, P.R. (2002). Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82,303-321.
- Coffey, A. and Ross, R.P. (2002). Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82,303-321.
- Cogan, T.M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* subsp.: effects on growth, substrate and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 551-558.
- Cogan, T.M. and Accolas, J.-P. (1996). *Dairy Starter Cultures*, VCH Publishers, Cambridge.
- Cogan, T.M. and Beresford, T.P. (2002). Microbiology of hard cheese, in, *Dairy Microbiology Handbook*, Robinson, R.K., ed., John Wiley and Sons, New York. pp. 515-560.
- Cogan, T.M. and Hill, C. (1993). Cheese starter cultures, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 2nd edn, P.
- Cogan, T.M. and Hill, C. (1994). Cheese starter cultures, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, General Aspects*, Fox, P.E, ed. Elsevier, London. pp. 193-255.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuquier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. and Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64, 409-421.
- Considine, Thérèse, Angkana Noisuwan, Yacine Hemar, Brian Wilkinson, John Bronlund, and Stefan Kasapis. "Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review." *Food hydrocolloids* 25, no. 8 (2011): 2008-2017.
- Cooper, J.B., Foundling, S.I., Hemmings, A., Blundell, T.L., Jones, D.M., Hallet, A. and Szelke, M. (1987). The structure of a synthetic pepsin inhibitor complexed with endothiapepsin. *Eur. J. Biochem.* 169, 215-221.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D. and Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 414-420.
- Coppola, T.M., Parente, J.E., Dumontet, S. and Peccrella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68, 295-310.
- Corbin, Edgar A. Jr, Marvin A. Garner, and Donald I. Pearline. (1982). "Process for preparing acid cheese curd." U.S. Patent 4,352,826, issued October 5, 1982.
- Crabbe, M.J.C. (eds). (2004). "Rennets: General and Molecular Aspects", *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1. Elsevier, 19-46
- Creamer, L.K. (1985). Water absorption by renneted casein micelles. *Milchwissenschaft* 40,589-591.

- Creamer, L.K. and Olson, N.E (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 47, 631-636.
- Creamer, L.K. and Richardson, B.C. (1974). Identification of the primary degradation product of alpha sI-casein in Cheddar cheese. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 9, 9-13.
- Cuartas-Uribe, B., Alcaina-Miranda, M.I., Soriano-Costa, E., Bes-Piá, A., (2006). Comparison of two nanofiltration membranes NF200 and Ds-5 DL to demineralize whey. *Desalination* 199 (1-3), 43-45.
- Dacre, J.C. (1958). Characteristics of a presumptive *Pediococcus* occurring in New Zealand Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 25,409-413.
- Daigle A., Roy D., Bélanger G., and Vuilleumard J.C., (1999). Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*, *J. Dairy Sci.* 82, 1081–1091.
- Dalgleish, D.G. (1982). The enzymatic coagulation of milk, in, *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 1, Fox, P.E, ed., Applied Science Publishers, London. pp. 157-187.
- Dalgleish, D.G. and Law, A.J.R. (1988). pH-induced dissociation of casein micelles. 1. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* 55,529-538.
- Danley, D.E. and Geoghegan, K.E (1988). Structure and mechanism of formation of chymosin C derived from recombinant chymosin A. *J. Biol. Chem.* 263, 9785-9789.
- Darukaradhya, Jyothsna, Michael Phillips, and Kasipathy Kailasapathy. (2013). "Effect of encapsulation on the survival of probiotic bacteria in the presence of starter and non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese over a 6-month ripening period." *International Journal of Fermented Foods* 2 (1), 63-76.
- Daryaei, H., M. J. Coventry, C. Versteeg, and F. Sherkat. (2008). "Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (2), 201-205.
- Das, S., R. Holland, V. L. Crow, R. J. Bennett, and G. J. Manderson. (2005). "Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese." *International dairy journal* 15 (6), 807-815.
- Dasen, A., Berthier, E, Grappin, R., Williams, A.G. and Banks, J. (2003). Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 595-607.
- Daufin G., F. René, P. Aimar, (1998). *Les Separations par Membrane Dans les Procédés de L'industrie Alimentaire*, Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Paris, 1998
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. and Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2011-2020.
- De Boer, R., and P. F. C. Nooy. (1980). "Concentration of raw whole milk by reverse osmosis and its influence on fat globules." *Desalination* 35, 201-211.
- de Jong, L. (1976). Protein breakdown in soft cheese and its relation to Consistency. 1. Proteolysis and consistency of 'Noordhollandse Meshanger' cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 30, 242-253.
- de Kruif, C.G. (1997). Skim milk acidification. *J. Colloid Interf. Sci.* 185, 19-27.
- de Kruif, C.G. (1997). Skim milk acidification. *J. Colloid Interf. Sci.* 185, 19-27.
- de Kruif, C.G. (1999). Casein micelle interactions. *Int. Dairy J.* 9, 183-188.



- de Oliveira, Maria Elieidy Gomes, Estefânia Fernandes Garcia, Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira, Ana Maria Pereira Gomes, Maria Manuela Esteves Pintado, Ana Raquel Mendes Ferreira Madureira, Maria Lúcia da Conceição, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, and Evandro Leite de Souza. (2014). "Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria." *Food Research International*.
- De Simone, Carmela. (2010). "Production and evolution of peptides naturally derived from milk protein hydrolysis or generated by technological processes: proteomic and bio-functional characterization." PhD diss., Università degli Studi di Napoli Federico II.
- Dejmek, P., and P. Walstra. (2004). "The syneresis of rennet-coagulated curd." *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* 1: 71-103.
- del Rio B, Binetti AG, Martín MC, Fernandez M, Magadán AH, and Alvarez MA. (2007). Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*, 24:75-81.
- Delgado, Susana, and Baltasar Mayo. (2004). "Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses." *International journal of food microbiology* 90 (3), 309-319.
- Dellaglio, E, Dicks, L.M.T. and Torriani, S. (1995). The genus *Leuconostoc*, in, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., eds, Blackie Academic and Professional, Glasgow. pp. 235-278.
- Delves-Broughton, J. (2005). "Nisin as a food preservative." *Food Australia* 57 (12), 525-532.
- Demott, B.J., Hitchcock, J.J. and Sanders, O.G. (1984). Sodium concentration of selected dairy products and acceptability of a sodium substitute in Cottage cheese. *J. Dairy Sci.* 67, 1539-1543.
- Demott, B.J., Hitchcock, J.P. and Davidson, P.M. (1986). Use of sodium substitutes in Cottage cheese and buttermilk. *J. Food Prot.* 49, 117-120.
- Destro, M. T., A. M. Serrano, and D. Y. Kabuki. (1991). Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control* 2:110–112.
- Deveau, Hélène, Rodolphe Barrangou, Josiane E. Garneau, Jessica Labonté, Christophe Fremaux, Patrick Boyaval, Dennis A. Romero, Philippe Horvath, and Sylvain Moineau. (2008). "Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*." *Journal of bacteriology* 190 (4), 1390-1400.
- Dherbécourt, Julien, Hélène Falentin, Stéphane Canaan, and Anne Thierry. (2008). "A genomic search approach to identify esterases in *Propionibacterium freudenreichii* involved in the formation of flavour in Emmental cheese." *Microbial cell factories* 7 (1), 16.
- Dickinson, E. (1997). Aggregation processes, particle interactions, and colloidal structure, in, *Food Colloids, Proteins*,
- Diezhandino, I., D. Fernández, L. González, P. L. H. McSweeney, and J. M. Fresno. (2014). "Microbiological, Physico-Chemical And Proteolytic Changes In A Spanish Blue Cheese During Ripening (Valdeón Cheese)." *Food Chemistry*.
- Dinakar P., and Mistry V.V., (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese, *J. Dairy Sci.* 77: 2854–2864.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. and Yonezawa, D. (1980). Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. *Agric. Biol. Chem.* 44, 741-747.
- Dolci, Paola, Valentina Alessandria, Kalliopi Rantsiou, Luca Rolle, Giuseppe Zeppa, and Luca Cocolin. (2008). "Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with

- a focus on lactic acid bacteria ecology." *International journal of food microbiology* 122 (3), 302-311.
- Donnelly, W.J., Carroll, D.P., O'Callaghan, D.M. and Walls, D. (1986). Genetic polymorphism of bovine chymosin. *J. Dairy Res.* 53,657-664.
- Drider J., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M., Prévost H., (2006).The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Durmaz E, Miller MJ, Azcarate-Peril MA, Toon SP, and Klaenhammer TR. (2008).Genome sequence and characteristics of Lrm1, a prophage from industrial *Lactobacillus rhamnosus* strain M1. *Appl Environ Microbiol*, 74:4601-4609.
- E1 Soda, M., Madkor, S.A. and Tong, RS. (2000). Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy Sci.* 83,609-619.
- Edelstein, Sari. (2014). *Food Science: An Ecological Approach*: 228.
- Edgar, W.M., Bowen, W.H., Amsbaugh, S., Monell-Torrens, E. and Brunelle, J. (1982). Effects of different eating patterns on dental caries in the rat. *Caries Res.* 16, 384-389.
- Egito, A.S., Giradet, J.-M., Mielo, L., Moele, D., Humbert, G. and Gaillard, J.-L. (2001). Susceptibility of equine K- and kappa-caseins to hydrolysis by chymosin. *Int. Dairy J.* 11, 885-893.
- Eino, M. F., D. A. Biggs, D. M. Irvine, and D. W. Stanley. (1976)."A comparison of microstructures of Cheddar cheese curd manufactured with calf rennet, bovine pepsin, and porcine pepsin." *Journal of Dairy Research* 43 (01), 113-115.
- El-Ghaish, S., I. Hadji-Sfaxi, A. Ahmadova, Y. Choiset, H. Rabesona, M. Sitohy, T. Haertlé, and J -M. Chobert. (2011)."Characterization of two safe *Enterococcus* strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products." *Beneficial microbes* 2 (1), 15-27.
- Elliott, J.A. and Mulligan, H.T. (1968). *Pediococci in Canadian Cheddar cheese. Can. Inst. Food Technol. J.* 1, 61.
- Emmons, D.B. and Beckett, D.C. (1984). Effect of pH at cutting and during cooking on Cottage cheese. *J. Dairy Sci.* 67, 2200-2209.
- Emmons, D.B. and Tuckey, S.L. (1967). *Cottage Cheese and Other Cultured Milk Products.* Pfizer Cheese Monographs, Vol. 3, Pfizer & Co., New York.
- Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokine O., van Dorsselaer A., Bringel F., Hubert J.C., and Hasselmann C., (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4381–4387.
- Espinosa Pesqueira, Diana Maricela. (2012). "Effect of high hydrostatic pressure processing on biogenic amines formation in artisan caprine and ovine raw milk cheeses." (2012): 165.
- Everard, C. D., D. J. O'Callaghan, M. J. Mateo, M. Castillo, F. A. Payne, and C. P. O'Donnell. (2011)."Effects of milk composition, stir-out time, and pressing duration on curd moisture and yield." *Journal of dairy science* 94 (6): 2673-2679.
- Faccia, Michele, Marianna Mastromatteo, Amalia Conte, and Matteo Alessandro Del Nobile. (2012)."Influence of the different sodium chloride concentrations on microbiological and physico-chemical characteristics of mozzarella cheese." *Journal of Dairy Research* 79 (04): 390-396.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, Working Group Report, London, Ontario, Canada.
- Farah, Z. (1993). Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy Res.* 60,603-626.

- Farkye, N.Y. and Fox, P.E (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *J. Dairy Res.* 59,209-216.
- Fauquant, J., Maubois, J.L. and Pierre, A. (1988). Microfiltration du lait sur membrane minerale. *Tech. Lait* 1028, 21-23.
- Feeney, E.P., Fox, P.E and Guinee, T.P. (2001). Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese. 1. Composition and proteolysis. *Lait* 81,463-474.
- Feligini, Maria, Simona Panelli, Joanna Natalia Buffoni, Cesare Bonacina, Christian Andrighetto, and Angiolella Lombardi. (2012)."Identification of Microbiota Present on the Surface of Taleggio Cheese Using PCR–DGGE and RAPD–PCR." *Journal of food science* 77 (11): M609-M615.
- Fenelon, M.A. and Guinee, T.R (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *Int. Dairy J.* 10, 151-158.
- Fenelon, M.A. and Guinee, T.R (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *Int. Dairy J.* 10, 151-158.
- Fennema, O.R. (1976). *Principles of food science. I. Food chemistry.* Marcel Dekker Inc.
- Fernandez, L., Beerthuyzen, M.M., Brown, J., Siezen, R.J., Coolbear, T., Holland, R. and Kuipers, O.P. (2000). Cloning, characterization, controlled overexpression and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1360-1368.
- Fernández, María, Daniel M. Linares, B. del Rio, Victor Ladero, and Miguel A. Alvarez. (2007). "HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms." *Journal of dairy research* 74 (3): 276-282.
- Fernández-Bodega, M. A., E. Mauriz, A. Gómez, and J. F. Martín. (2009). "Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses." *International journal of food microbiology* 136 (1): 18-25.
- Ferron-Baumy, C., Maubois, J.L., Garric, G. and Quiblier, J.P. (1991). Coagulation pressure du lait et des retentats d'ultrafiltration. Effets de divers traitements thermiques. *Lait* 71,423-434.
- Filttenborg O.J., Frisvad C., and Thrane U., (1996).Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.* 33: 85–102.
- Fitzgerald, R.J. and Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides, in, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, Proteins*, Fox, RE and McSweeney,
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. and Beresford, T. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 600-608.
- Fleet G.H., (1990).Yeasts in dairy products, *J. Appl. Bacteriol.* 68: 199–211.
- Flórez, Ana Belén, Mohammed Salim Ammor, and Baltasar Mayo. (2008). "Identification of tet (M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci." *International journal of food microbiology* 121 (2): 189-194.
- Floury, Juliane, Bénédicte Camier, Florence Rousseau, Christelle Lopez, Jean-Pierre Tissier, and Marie-Hélène Famelart. (2009). "Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure–texture relationships." *LWT-Food Science and Technology* 42 (10): 1611-1620.

- Floury, Juliane, Sophie Jeanson, Samar Aly, and Sylvie Lortal. (2010). "Determination of the diffusion coefficients of small solutes in cheese: A review." *Dairy Science & Technology* 90 (5): 477-508.
- Foltmann, B. (1959). Studies on rennin. II. On the crystallisation, stability and proteolytic activity of rennin. *Acta Chem. Scand.* 13, 1927-1935.
- Foltmann, B. (1966). A review on prorennin and rennin. C. R. *Travaux Lab. Carlsberg* 35, 143-231.
- Foltmann, B. (1970). Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Methods Enzymol.* 19,421-437.
- Foltmann, B. (1992). Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52 (210), 65-79.
- Fontaine L., and Hols P., (2008). The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of B1pGSt, a thiol-disulfide oxidase, *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1102– 110.
- Fontana, Cecilia, Fabrizio Cappa, Annalisa Rebecchi, and Pier Sandro Cocconcelli. (2010). "Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses." *International journal of food microbiology* 138 (3): 205-211.
- Forde, A., Daly, C. and Fitzgerald, G.E (1999). Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1540-1547.
- Foulquié Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., and De Vuyst L., (2006). The role and application of enterococci in food and health, *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Foulquié Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst. (2006). "The role and application of enterococci in food and health." *International journal of food microbiology* 106 (1): 1-24.
- Fox, P.E (1975). Influence of cheese composition on quality. *Irish J. Agric. Res.* 14, 33-42.
- Fox, P.E (1975). Influence of cheese composition on quality. *It. J. Agric. Res.* 14, 33-42.
- Fox, P.E and McSweeney, R.L.H. (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening, in, *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn, B.A. Law, ed., Blackie Academic and Professional, London. pp. 1-49.
- Fox, P.F. and Cogan, T.M. (eds). (2004). "Factors that Affect the Quality of Cheese", *“, Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1. Elsevier. Pp. 583-602
- Fox, Patrick F.. (1999). *Cheese: chemistry, physics and microbiology, Volume 1*. Springer, p. 1.
- Fox, Patrick F.. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Springer, p. 388.
- Fox, RE and McSweeney, R.L.H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, Proteins*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Fox, RE and Walley, B.E (1971). Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. *J. Dairy Res.* 38, 165-170.
- Fox, RE, Olivecrona, T., Vilaro, S., Bengtsson-Olivecrona, G., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., Shakeel-Ur-Rehman, Fleming, C.M., Stepaniak, L., Gobbetti, M., Corsetti, A., Pruitt, K.N. and Farkye, N.Y. (2003). Indigenous enzymes in milk, in, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, Proteins*, 3rd edn, P.E Fox and P.L.H. McSweeney, eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 465-601.
- Franz, C.M.A.R, Holapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1-24.

- Frazaio, C., Shearer, A., Tickle, I.J. and Blundell, T.L. (1990). Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and X-ray analysis at 2.0 angstrom resolution of Val111Phe site-mutated calf chymosin. *Biochemistry* 29, 9863-9871.
- Fredrick, Eveline, Pieter Walstra, and Koen Dewettinck. (2010). "Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions." *Advances in colloid and interface science* 153 (1): 30-42.
- Fritsche, J. and Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 206, 77-82.
- Fryer, T.E and Sharpe, M.E. (1966). Pediococci in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 33,325-331.
- Fucà, N., Donald J. McMahon, M. Caccamo, L. Tuminello, S. La Terra, M. Manenti, and G. Licitra. "Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano Cheese." *Journal of dairy science* 95, no. 1 (2012): 460-470.
- Fumamoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T. (1967). A reninlike enzyme from *Rhizopus chinensis*. *Agric. Biol. Chem.* 31,710-717.
- Gaglio, Raimondo, Nicola Francesca, Rosalia Di Gerlando, Margherita Cruciatà, Rosa Guarcello, Baldassare Portolano, Giancarlo Moschetti, and Luca Settanni. (2014). "Identification, typing and investigation of the dairy characteristics of lactic acid bacteria isolated from "Vastedda della valle del Belice" cheeses." *Dairy Science & Technology* 94 (2): 157-180.
- Gagnaire, Valérie, Daniel Mollé, Maryse Herrouin, and Joëlle Léonil. (2001). "Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved." *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (9): 4402-4413.
- Gala, Elisabetta, Sara Landi, Lisa Solieri, Marco Nocetti, Andrea Pulvirenti, and Paolo Giudici. (2008). "Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano Cheese." *International journal of food microbiology* 125 (3): 347-351.
- Gálvez A., Abriouel H., López R.L., Omar N.B., (2007). Bacteriocin-based strategies for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Garabal, J. Ignacio, Patricia Rodríguez-Alonso, and Juan A. Centeno. (2008). "Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain)." *LWT-Food science and technology* 41 (8): 1452-1458.
- Garbutt, K.C., Kraus, J. and Geller, B.L. (1997). Bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* engineered by replacement of a gene for a bacteriophage receptor. *J. Dairy Sci.* 80, 1512-1519.
- García-Quintans, N., Magni, C., de Mendoza, D. and Lopez, P. (1989). The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar, *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 850-857.
- Garde, Sonia, Marta Ávila, Ramón Arias, Pilar Gaya, and Manuel Nuñez. (2011) "Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese." *International journal of food microbiology* 150 (1): 59-65.
- Garneau, Josiane E., and Sylvain Moineau. (2011): "Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations." *Microb. Cell Fact* 10, no. Suppl 1: S20.
- Garvey, P., Hill, C. and Fitzgerald, G.E (1996). The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,676-679.
- Gautier, M., Rouault, A., Sommer, R, Briandet, R. And Cassin, D. (1995). Bacteriophage infecting dairy propionibacteria. *Lait* 75,427-434.

- Gaygadzhiev, Zafir, Milena Corredig, and Marcela Alexander. (2009). "The impact of the concentration of casein micelles and whey protein-stabilized fat globules on the rennet-induced gelation of milk." *Colloids and Surfaces B: biointerfaces* 68 (2): 154-162.
- Georgakis, S.A. (1973). Untersuchungen über die Herstellung von griechischen Salzlaken-Käse "Fetta". 1. Beziehung zwischen verwendeter Kochsalzmenge and Salzdauer. *Milchwissenschaft* 28,500-502.
- Georgalaki M.D., Van den Berghe E., Kritikos D., Devreese B., Van Beeumen J., Kalantzopoulos G., De Vuyst L., and Tsakalidou E., (2002). Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5891–5903.
- Geurts, T.J., Walstra, P. and Mulder, R (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. 1. Analysis of the processes involved. *Neth. Milk Dairy J.* 28, 102-129.
- Geurts, T.J., Walstra, R and Mulder, H. (1980). Transport of salt and water during salting of cheese. 2. Quantities of salt taken up and of moisture lost. *Neth. Milk Dairy J.* 34, 229-254.
- Ghorai, Shakuntala, Samudra Prosad Banik, Deepak Verma, Sudeshna Chowdhury, Soumya Mukherjee, and Suman Khowala. (2009). "Fungal biotechnology in food and feed processing." *Food research international* 42 (5): 577-587.
- Ghraiiri, T., J. Frère, J. M. Berjeaud, and M. Manai. (2005). "Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese." *International journal of food microbiology* 105 (3): 389-398.
- Giannino, Maria Laura, Marta Marzotto, Franco Dellaglio, and Maria Feligini. (2009). "Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods." *International journal of food microbiology* 130 (3): 188-195.
- Giraffa, G., de Vecchi, P., Rossi, P., Nicastro, G. and Fortina, M.G. (1998). Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *J. Appl. Microbiol.* 85, 411-416.
- Glattli, H. (1990). Starter and starter production for Swiss type cheeses. *Proc. 2nd Cheese Symposium*, Teagasc, Dublin. pp. 23-30.
- Gobbetti, M., Fox, RE and Stepaniak, L. (1997). Isolation and characterization of tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Dairy Sci.* 80, 3099-3106.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., DeAngelis, M., Corsetti, A. And Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42,223-239.
- Godinho, M. and Fox, RE (1981a). Effect of NaCl on the germination and growth of *Penicillium roqueforti*. *Milchwissenschaft* 36,205-208.
- Godinho, M. and Fox, RE (1981b). Ripening of Blue cheese: salt diffusion rates and mould growth. *Milchwissenschaft* 36,329-333.
- Godon, J.-J., Delorme, C., Ehrlich, D.S. and Renault, P. (1992). Divergence of genomic sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4045-4047.
- Gomes da Cruz, Adriano, Flavia Carolina Alonso Buriti, Cíntia Hoch Batista de Souza, José Assis Fonseca Faria, and Susana Marta Isay Saad. (2009). "Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects." *Trends in Food Science & Technology* 20 (8): 344-354.
- Gomes, A. P., A. G. Cruz, R. S. Cadena, R. M. S. Celeghini, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, M. A. R. Pollonio, and D. Granato. (2011). "Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride." *Journal of dairy science* 94 (6): 2701-2706.

- Gouda, A. (1987). Degradation of casein fractions by milkclotting enzymes and the effect of sodium chloride. *Egypt. J. Dairy Sci.* 15, 15-23.
- Govindasamy-Lucey, S., J. J. Jaeggi, C. Martinelli, M. E. Johnson, and J. A. Lucey. (2011). "Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of Swiss cheese: Effect of altering coagulation conditions on yield and cheese quality." *Journal of dair science* 94 (6): 2719-2730.
- Grattepanche, Franck, Susanne Miescher-Schwenninger, Leo Meile, and Christophe Lacroix. (2008). "Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities." *Dairy Science and Technology* 88 (4-5): 421-444.
- Gray, G.L., Hayenga, K., Cullen, D., Wilson, L.J. and Norton, S. (1986). Primary structure of *Mucor miehei* aspartyl protease: evidence for a zymogen intermediate. *Gene* 48, 51-53.
- Gripou, J.-C. (1993). Mould ripened cheeses, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, Fox, RE, ed., Chapman & Hall, London. pp. 111-136.
- Guenther, Susanne, and Martin J. Loessner. (2011). "Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses." *Bacteriophage* 1 (2): 94.
- Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food, *J. Appl. Microbiol.* 98: 1316–1325.
- Guinee, T. P., and P. F. Fox (eds). (2004). "Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects." *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1: 207-259.
- Guinee, T. P., and P. F. Fox. (1993). "Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects." In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, pp. 257-302. Springer US.
- Guinee, T. P., B. T. O'Kennedy, and P. M. Kelly. (2006). "Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese." *Journal of dairy science* 89 (2): 468-482.
- Guinee, T.P. (1985). *Studies on the Movements of Sodium Chloride and Water in Cheese and the Effects thereof on Cheese Ripening*. PhD Thesis, National University of Ireland, Cork.
- Guinee, T.P. and Fox, P.E (1983). Sodium chloride and moisture changes in Romano-type cheese during salting. *J. Dairy Res.* 50, 511-518.
- Guinee, T.P. and Fox, P.E (1986). Transport of sodium chloride and water in Romano-type cheese slices during brining. *Food Chem.* 19, 49-64.
- Gunasekaran, Sundaram, and M. Mehmet Ak. (2010). *Cheese rheology and texture*. CRC press.
- Gurira, Obert Z., and E. M. Buys. (2005). "Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese." *Food microbiology* 22 (2): 159-168.
- Gustchina, E., Rumsh, L., Ginodinan, L., Majer, P. and Andreeva, N. (1996). Post X-ray crystallographic studies on chymosin: the existence of two structural forms and the regulation of activity by the interaction with the histidine-proline cluster of K-casein. *FEBS Lett.* 379, 60-62.
- Habimana, O., A. J. C. Semião, and Eoin Casey. (2014). "The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes." *Journal of Membrane Science* 454: 82-96.
- Hannon, J. A., S-M. Deutsch, M-N. Madec, J-Y. Gassi, M-P. Chapot-Chartier, and S. Lortal. (2006). "Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli." *International dairy journal* 16 (4): 324-334.

- Hardy, J. and Steinberg, M.P. (1984). Interaction between sodium chloride and paracasein as determined by water sorption. *J. Food Sci.* 49, 127-131,136.
- Harper, D.S., Osborn, J.C. and Clayton, R. (1983). Cariostatic potential of four cheeses evaluated in a programmed fed rat model. *J. Dent. Res.* 62, 283
- Hartsuck, J.A., Koelsch, G. and Remington, S.J. (1992). The high-resolution crystal structure of porcine pepsinogen. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 13, 1-25.
- Harwalkar, V.R. and Kalab, M. (1980). Milk gel structure. XI. Electron microscopy of glucono-8-lactone-induced skim milk gels. *J. Texture Studies* 11, 35-49.
- Hayaloglu, A.A., Guven, M. and Fox, RE (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese Beyaz Penir. *Int. DairyJ.* 12,635-648.
- Hayaloglu, Ali A., Kevin C. Deegan, and Paul LH McSweeney. (2010). "Effect of milk pasteurization and curd scalding temperature on proteolysis in Malatya, a Halloumi-type cheese." *Dairy Science & Technology* 90 (1): 99-109.
- Hayashi, K., Yasugi, S. and Mizurlo, T. (1988). Isolation and structural analysis of embryonic chicken pepsinogen gene: avian homologue of prochymosin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152,776-782.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Lindsey, S. and Diersen-Schade, D. (1991). Dietary saturated fatty acids differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in non-human primates. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 491-498.
- Heaney, R.P. (1991). *Evaluation of Publically Available Scientific Evidence Regarding Nutrient-Disease Relationships. 3. Calcium and Osteoporosis.* Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology, Rockville Pike, MD.
- Heertje, I., Visser, J. and Smits, P. (1985). Structure formation in acid milk gels. *Food Microstruct.* 4, 267-277.
- Heller, Knut J., Wilhelm Bockelmann, J. Schrezenmeir, and M. de Vrese. (2003). "Cheese and its potential as a probiotic food." *Handbook of fermented functional foods*, pp 203-225.
- Hemarajata, P., J. K. Spinler, M. A. Balderas, and J. Versalovic. (2014). "Identification of a proton-chloride antiporter (Eric) by Himar1 transposon mutagenesis in *Lactobacillus reuteri* and its role in histamine production." *Antonie van Leeuwenhoek* 105 (3): 579-592.
- Hernández, Igor, Luis Javier R. Barrón, Mailo Virto, Francisco J. Pérez-Elortondo, Cristian Flanagan, Urko Rozas, Ana Isabel Nájera, Marta Albisu, M. Soledad Vicente, and Mertxe de Renobales. (2009). "Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition." *Food chemistry* 116 (1): 158-166.
- Herod, E.L. (1991). The effect of cheese on dental caries. *Aust. DentalJ.* 36, 120-125.
- Hewedi, M. and Fox, P.E (1984). Ripening of Blue cheese: characterization of proteolysis. *Milchwissenschaft* 39, 198-201.
- Hickey, D. K., K. N. Kilcawley, T. P. Beresford, and M. G. Wilkinson. (2007). "Lipolysis in cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks." *Journal of dairy science* 90 (1): 47-56.
- Hidaka, M., Sasaki, K., Uozumi, T. and Beppu, T. (1986). Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene* 43, 197-203.
- Hill, C., Miller, L.A. and Klaenhammer, T.R. (1990a). Cloning, expression, and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 172, 6419-6426.
- Hill, R.D., Lahav, E. and Givol, D. (1974). A rennet-sensitive bond in alpha s1 -casein. *J. Dairy Res.* 41,147-153.



- Hinrichs J: (2004). Mediterranean milk and milk products. *Eur J Nutr*, 43(Suppl 1): I/12-17.
- Hoecker, W.H. and Hammer, B.W. (1944). Salt migration in Cheddar cheese curd and its effect on moisture content, pH, and bacteria content. *Food Res.* 9, 278-288.
- Hofmann, T. and Shaw, R. (1964). Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. I. Purification and properties of a trypsinogen-activation enzyme (peptidase A). *Biochim. Biophys. Acta* 92,543-557.
- Holland, B., Unwin, I.D. and Buss, D.H. (1989). *Milk Products and Eggs: The Fourth Supplement to McCance and Widdowson's The Composition of Foods*, 4th edn, Royal Society of Chemistry/Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Cambridge, UK.
- Holland, R. and Coolbear, T. (1996). Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* E8. *J. Dairy Res.* 63, 131-140
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., and Schillinger U., (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365–373.
- Home, D.S. (1998). Casein interactions: casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8, 171-177.
- Home, D.S. (2003). Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 213,255-263.
- Horiuchi, H., Yanai, K., Okazaki, T., Takagi, M. and Yano, K. (1988) Isolation and sequencing of a genomic clone encoding aspartic protease of *Rhizopus niveus*. *J. Bacteriol.* 170, 272-278.
- Horne, David S. (2006). "Casein micelle structure: models and muddles." *Current opinion in colloid & interface science* 11 (2): 148-153.
- Hou, Jia, John A. Hannon, Paul LH McSweeney, Thomas P. Beresford, and Timothy P. Guinee. (2014). "Effect of curd washing on cheese proteolysis, texture, volatile compounds, and sensory grading in full fat Cheddar cheese." *International Dairy Journal* 34 (2): 190-198.
- Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M.N., Wouter, W., hadero, V., Burgess, K., Vansinderen, D., Piarol, J.C., Eggink, G., Smid, E., Savoy, G., Sesma, E, Jansen, T., Hols, P., and Kleerebezem, M. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for neutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 217-235.
- Huppertz, Thom, Patrick F. Fox, and Alan L. Kelly. (2004). "Susceptibility of plasmin and chymosin in Cheddar cheese to inactivation by high pressure." *Journal of dairy research* 71 (04): 496-499.
- Hurley, M.J., Larsen, L.B., Kelly, A.L. and McSweeney, P.L.H. (2000). The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *Int. DairyJ.* 10,673-681.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Cesselin, B., van Sinderen, D., Benbadis, L. and Chapot-Chartier, M.-P. (2000). The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 558-565.
- Hynes, Erica, Jean-Claude Ogier, and Agnès Delacroix-Buchet. (2001). "Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture." *International dairy journal* 11 (8): 587-597.
- Iametti, S., Tedeschi, G., Oungre, E. and Bonomi, E (2001). Primary structure of K-casein isolated from mares' milk. *J. Dairy Res.* 68, 53-61.
- Imfeld, T.H., Hirsch, R.S. and Muhlmann, H.R. (1978). Telemetric recordings of interdental plaque pH during different meal patterns. *Br. Dent. J.* 139,351-356.

- Inoue, M. (1988). Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation- a review. *Gene* 72, 25-34.
- E. Dickinson and J.M. Rodriguez Patino, eds. *Interactions and Stability*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 307-317.
- Ip, C., Chin, S.E, Scimeca, J.A. and Pariza, M.W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 51, 6118-6124.
- Irvine, D.M. and Price, W.V. (1961). Influence of salt on the development of acid by lactic starters in skim milk and in curd submerged in brine. *J. Dairy Sci.* 44, 243-248.
- Ismail, H. A., M. M. Omar, A. H. Guirguis, and M. Z. El-Abbassy. (2012). "Comparative study on some commercial smear ripened cheeses." *Zagazig Journal of Agricultural Research*.
- Iverson, J. L., and A. J. Sheppard. (1989). "Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data." *Journal of Dairy Science* 72 (7): 1707-1712.
- Jablonka, M.S. and Munro, P.A. (1986). Effect of precipitation temperature and pH on the continuous pilot-scale recipitation of casein curd. *NZJ. Dairy Sci. Technol.* 21, 111-123.
- James, M.N.G. and Sielecki, A.R. (1986). Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 319, 33-38.
- James, M.N.G. and Sielecki, A.R. (1987). Aspartic proteinases and their catalytic pathway, in, *Biological Macromolecules and Assemblies*, Jurnak, E and McPherson, A., eds, John Wiley & Sons, New York. pp. 413-482.
- Jamet, Emmanuel, Elodie Akary, Marie-Ange Poisson, Jean-François Chamba, Xavier Bertrand, and Pascale Serror. (2012). "Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses." *Food microbiology* 31 (2): 191-198.
- Jamrozik, J., and L. R. Schaeffer. "Test-day somatic cell score, fat-to-protein ratio and milk yield as indicator traits for sub-clinical mastitis in dairy cattle." *Journal of Animal Breeding and Genetics* 129, no. 1 (2012): 11-19.
- Janhøj, T., and K. B. Qvist. (2010). "4 The Formation of Cheese Curd." *Technology of Cheesemaking* 14: 130.
- Jarvis, A.W., Fitzgerald, G.E, Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I.B., Ronda, C., Saxelin, M. and Teuber, M. (1991). Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* 32, 2-9.
- Jay, James M., Martin J. Loessner, and David A. Golden. (2005). *Modern food microbiology*. Springer.
- Jedidi, Hajer, Claude P. Champagne, Yves Raymond, Edward Farnworth, Marie-Rose Van Calsteren, P. Yvan Chouinard, and Ismail Fliss. (2014). "Effect of milk enriched with conjugated linoleic acid and digested in a simulator (TIM-1) on the viability of probiotic bacteria." *International Dairy Journal* 37 (1): 20-25.
- Jelen, P., Buchheim, W. and Peters, K.-H. (1987). Heat stability and use of milk with modified casein: whey protein content in yogurt and cultured milk products. *Milchwissenschaft* 42, 418-421.
- Jenkins, G.N. and Ferguson, D.B. (1966). Milk and dental caries. *Br. Dent. J.* 120, 472-477.
- Jerónimo, E., and F. X. Malcata. (2013). "3. Sensory characteristics of cheese." *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences* 6: 39.
- Jimeno, J., Lazaro, MJ. and Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and nonstarter lactic acid bacteria. *Lair* 75,401-413.

- Johnson, M. and Law, B.A., (1999). The origins, development and basic operations of cheesemaking technology, in *Technology of Cheese Making*, Law, B.A., Ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 1–32.
- Jordan, K.N. and Cogan, T.M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish J. Agric. Food Res.* 32, 47-55.
- Josephsen, J., Petersen, A., Neve, H. and Waagner Nielsen, E. (1999). Development of lytic *Lactococcus lactis* bacteriophages in a Cheddar cheese plant. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 163-171.
- Kabuki, D. Y., A. Y. Kuaye, M. Wiedmann, and K. J. Boor. (2004). "Molecular Subtyping and Tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style Fresh-Cheese Processing Plants." *Journal of dairy science* 87 (9): 2803-2812.
- Kageyama, T. (1995). Procathepsin E and cathepsin E. *Meth. Enzymol.* 248, 120-136.
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P. and Phipps-Todd, B.E. (1983). Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt. *Food Microstruct.* 2, 51-66.
- Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. and Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64, 409-421.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, non-sporing Gram positive rods, in *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., eds, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 1208-1234.
- Kaplan, Norman M. (2000). "The dietary guideline for sodium: should we shake it up? No." *The American journal of clinical nutrition* 71 (5): 1020-1026.
- Kaprlek, E., Jecmen, P., Sedlacek, J., Fabry, M. and Zadrazil, S. (1991). Fermentation conditions for high-level expression of the *tac-promoter-controlled* calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 71-79.
- Karagul Yuceer, Y., B. Tuncel, O. Guneser, B. Engin, M. Isleten, K. Yasar, and M. Mendes. (2009). "Characterization of aroma-active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese." *Journal of dairy science* 92 (9): 4146-4157.
- Karahadian, C. and Lindsay, R.C. (1987). Integrated roles of lactate, ammonia, and calcium in texture development of mould surface-ripened cheese. *J. Dairy Sci.* 70, 909-918.
- Karami, M., M. R. Ehsani, S. M. Mousavi, K. Rezaei, and M. Safari. (2009). "Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening." *Food chemistry* 112 (3): 539-544.
- Karimi, Reza, Amir Mohammad Mortazavian, and Adriano Gomes Da Cruz. (2011). "Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review." *Dairy Science & Technology* 91 (3): 283-308.
- Karlsson, Anders Ola, Richard Ipsen, and Ylva Ardö. (2007). "Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk." *International dairy journal* 17 (6): 674-682.
- Kashket, S. and De Paola, D.P. (2002). Cheese consumption and the development and progression of dental caries. *Nutr. Rev.* 60, 97-103.
- Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.E and Roussis, I.G. (2000a). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 10, 635-646.
- Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. and Roussis, I.G. (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 7, 465-472.
- Kawaguchi, Y., Kosugi, S., Sasaki, K., Uozumi, T. and Beppu, T. (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1871-1877.

- Kay, J. (1985). Aspartic proteinases and their inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 1027-1029.
- Kay, J. (1985). Design and synthesis of statine-containing inhibitors of chymosin, in, *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*, Kostka, V., ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin. pp. 479-483.
- Kelly, A. L., and P. F. Fox. (2006). "Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements." *International dairy journal* 16 (6): 707-715.
- Kelly, M., Fox, RE and McSweeney, EL.H. (1996). Effect of salt-in-moisture on proteolysis in Cheddar-type cheese. *Milchwissenschaft* 51,498-501.
- Kelly, W. and Ward, L. (2002). Genotypic vs. phenotypic biodiversity in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 148, 3332-3333.
- Kethireddipalli, Prashanti, Arthur R. Hill, and Douglas G. Dalgleish. (2011). "Interaction between casein micelles and whey protein/ $\kappa$ -casein complexes during renneting of heat-treated reconstituted skim milk powder and casein Micelle/Serum mixtures." *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (4): 1442-1448.
- Kim Ha, J., and R. C. Lindsay. (1991). "Contributions of cow, sheep, and goat milks to Characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses." *Journal of Dairy Science* 74 (10): 3267-3274.
- Kim, H.D., Lee, J.H., Shin, Z.I., Man, H.S. and Woo, H.J. (1995). Anticancer effects of hydrophobic peptides derived from a cheese slurry. *Food Biotechnol.* 4, 268-272.
- Kim, S-Y., S. Gunasekaran, and N. F. Olson. (2004). "Combined Use of Chymosin and Protease from *Cryphonectria parasitica* for Control of Meltability and Firmness of Cheddar Cheese." *Journal of dairy science* 87 (2): 274-283.
- Kinstedt, P.S. (1993). Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33, 167-187.
- Kirin (2001). Bitter taste - cheese failure. *Mljekarstvo* 51, 327-337.
- Kirmaci, Hueseyin A., Ali A. Hayaloglu, Mustafa Akcelik, and Nefise Akkoc. (2011). "Proteolytic properties of Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) made by using wild-type Lactococcal strains." *International Journal of Dairy Technology* 64 (3): 394-401.
- Kirwan, Mark J., and John W. Strawbridge. (2003). "7 Plastics in food packaging." *Food packaging technology*: 174.
- Klein, N., Zourari, A. and Lortal, S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products - comparison with several dairy bacteria. *Int. Dairy J.* 12,853-861.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H. and de Vos, W.M. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3390-3393.
- Koaze, Y., Goi, H., Ezawa, K., Yamada, Y. and Hara, T. (1964). Fungal proteolytic enzymes. Part 1. Isolation of two kinds of acid-proteases excreted by *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. *Agric. Biol. Chem.* 28, 216.
- Korolczuk, J., Maubois, J.L. and Fauquant, J. (1986). Mecanisation en fromagerie de p~ites molles. *Proc. XXII International Dairy Congress*. Reidel D. Publishing Company, The Hague, The Netherlands. pp. 123-128.
- Kosikowski, EV. and Mistry, V.V. (1997). *Cheese and Fermented Milk Products, Vol. 1, Origins and Principles*, Kosikowski, EV., ed., LLC, Wesport, CT.

- Kotler, M., Danho, W., Katz, A.A., Leis, J. and Skalka, A.M. (1989). Avian retroviral protease and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 3428-3435.
- Kotoupas, A., Rigas, F., Chalaris, M., 2007. Computer-aided process design, economic evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. *Desalination* 213 (1e3), 238-252.
- Krobicka, A., Bowen, W.H., Pearson, S. and Young, D.A. (1987). The effects of cheese snacks on caries in desalivated rats. *J. Dent. Res.* 66, 1116-1119.
- Krstić, Darko M., Miodrag N. Tekić, Marijana D. Carić, and Spasenija D. Milanović. (2004). "Static turbulence promoter in cross-flow microfiltration of skim milk." *Desalination* 163 (1): 297-309.
- Kübarsepp, I., M. Henno, H. Viinalass, and D. Sabre. (2005). "Effect of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties." *Agron. Res* 3: 55-64.
- Kubícková, J.; W. Groscha (1998). "Evaluation of Flavour Compounds of Camembert Cheese". *International Dairy Journal* 314: 11–16.
- Kubis, I., Sousa, M.J., Walsh-O'Grady, D., Kelly, A.L. and McSweeney, P.L.H. (2001). Effects of coagulant level on proteolysis during cheese ripening were investigated in Cheddar type cheese made from goats' milk. 3 batches of cheese. *Milchwissenschaft* 56, 557-560.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W.N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
- Lane, C.N. and Fox, P.E (1999). The individual or combined action of chymosin and plasmin on sodium caseinate or [ $\kappa$ -casein in solution: effect of NaCl and pH. *Lait* 79, 423-434.
- Lane, C.N. and Fox, RE (1997). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 6, 715-728.
- Langton, M., Astrom, A. and Hermansson, A.-M. (1996). Texture as a reflection of microstructure. *Food Qual. Preference* 7, 185-191.
- Law, B. A., M. Elisabeth Sharpe, and Helen R. Chapman. (1976). "The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese." *Journal of Dairy Research* 43 (03): 459-468.
- Law, B.A., Castanon, M. and Sharpe, M.E. (1976). The effect of non-starter bacteria on the chemical composition and flavour of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 43, 117-125.
- Law, Barry A. (2009). "5 Enzymes in dairy product manufacture." *Enzymes in Food Technology*: 88.
- Lawrence, R.C. and Gilles, J. (1969). The formation of bitterness in cheese: a critical evaluation. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 4, 189-196.
- Lawrence, R.C., Gilles, J. and Creamer, L.K. (1983). The relationship between cheese texture and flavour. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 18, 175-190.
- Lawson P A, Papademas P, Wachter C, Falsen E, Robinson R K and Collins M D. (2001). *Lactobacillus cypricasei* sp. nov., isolated from halloumi cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 45–49.
- Le Squeren, J.C. and Canteri, G. (1995). Procédé pour éliminer les cellules somatiques des milieux alimentaires ou biologiques et produits correspondants. French Patent No. 2731587.
- Ledenbach, Loralyn H., and Robert T. Marshall. (2010). "Microbiological spoilage of dairy products." In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, pp. 41-67. Springer New York.

- Lee, K.N., Kritschinsky, D. and Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 118, 19-25.
- Lee, S., Kim, D., Watkins, S., and Batt, C. (1994). Reducing whey syneresis in yogurt by the addition of a thermolabile variant of beta-lactoglobulin. *Bioscience technology and biochemistry*, **58**:309–313.
- Lefier, D., Grappin, R., Grosclaude, G. and Curtat, G. (1987). Sensory properties and nutritional quality of lowsodium Gruyere cheese. *Lait* 67,451-464.
- Lemee, R., Lortal, S. and van Heijenoort, J. (1995). Autolysis of dairy propionibacteria: isolation and renaturing gel electrophoresis of the autolysins of *Prop. Freudenreichii* CNRZ 725. *Lair* 75,345-365.
- Lemieux, L., and R. E. Simard. (1991). "Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture." *Le Lait* 71 (6): 599-636.
- Leonarduzzi, Gabriella, Elena Chiarpotto, Fiorella Biasi, and Giuseppe Poli. (2005). "4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis." *Molecular nutrition & food research* 49 (11): 1044-1049.
- Lessard, Marie-Hélène, Catherine Viel, Brian Boyle, Daniel St-Gelais, and Steve Labrie. (2014). "Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese." *BMC genomics* 15 (1): 235.
- Limsowtin, G.K.Y., Powell, I.B. and Parente, E. (1996). Types of starters, in, *Dairy Starter Cultures*, Cogan, T.M. and Accolas, J.-E, eds, VCH Publishers, New York. pp. 101-129.
- Lin, H., Boylston, T.D., Chang, M.L., Luedecke, L.O. and Shultz, T.D. (1995). Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.* 78, 2358-2365.
- Lin, X. and Tang, J. (1990). Purification, characterization and gene cloning of thermopepsin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* 265, 1490-1495.
- Lindsay, R.C., Hargett, S.M. and Bush, S.C. (1982). Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 65,360-370.
- Lindsay, R.C., Karahadian, C. and Amudson, C.H. (1985). Low sodium cheese: an overview and properties of Cheddar cheese made with UF and RO retentate supplemented milk. *Proc. IDF Seminar*, Atlanta, GA, October 8-9, 1985. pp. 55-76.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Graham, D.C. and Beyatli, Y. (1989). Detection of pediococci and other non-starter organisms in American Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 72, 854-858.
- Liu, S.Q., Holland, R. and Crow, V.L. (2001). Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *Int. Dairy J.* 11, 27-35.
- Lock, Adam L., and Dale E. Bauman. (2004). "Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health." *Lipids* 39 (12): 1197-1206.
- Lopez, Christelle, Bénédicte Camier, and Jean-Yves Gassi. (2007). "Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy." *International Dairy Journal* 17 (3): 235-247.
- Lowrie, R.J. and Lawrence, R.C. (1972). Cheddar cheese flavour. IV. A new hypothesis to account for the development of bitterness. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 7, 51-53.
- Lucey, J. A. (eds) (2004). "Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels." *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* 1: 105-122.

- Lucey, J. A., M. E. Johnson, and D. S. Horne. (2003). "Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese." *Journal of Dairy Science* 86 (9): 2725-2743.
- Lucey, J.A. and Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Res. Int.* 30, 529-542.
- Lucey, J.A. and Singh, H. (eds) Acid coagulation of milk, in, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2, Proteins*, 2nd edn., Kluwer
- Lucey, J.A., Munro, P.A. and Singh, H. (1998). Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- $\delta$ -lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. *J. Texture Studies* 29,413-426.
- Lucey, J.A., Munro, R.A. and Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *Int. Dairy J.* 9,275-279.
- Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. and Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $\delta$ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *Int. Dairy J.* 7, 389-397.
- Lucey, John A., (2001). Michelle Tamehana, Harjinder Singh, and Peter A. Munro. "Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid." *International Dairy Journal* 11 (4): 559-565.
- Lücke, F.-K., (1998). Fermented sausages, in *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 2., 2nd ed., Wood, B.J.B., Ed., Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 441–483.
- Lunde M, Aastveit AH, Blatny JM, and Nes IF. (2005). Effects of diverse environmental conditions on  $\Phi$ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 71:721-727.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, RE, Cogan, T.M. and Drinan, F.D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6, 851-867.
- MacDonald, H.B. (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 111S-118S.
- MacKay, V.L., Welch, S.K., Insley, M.Y., Manney, T.R., Holly, J., Saari, G.C. and Parker, M.L. (1988). The *Saccharomyces cerevisiae* BAR1 gene encodes an exported protein with homology to pepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 55-59.
- Madera C, Garcia P, Rodriguez A, Suarez JE, and Martinez B. (2009). Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *Int J Food Microbiol*, 129:99-102.
- Madera C, Monjardin C, and Suarez JE. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol.* 70:7365-7371.
- Madkor, S.A., Tong, P.S. and El Soda, M. (2000). Ripening of Cheddar cheese with attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 83, 1684-1691.
- Madureira, A. Raquel, Ana I. Pintado, Ana Maria Gomes, Manuela E. Pintado, and F. Xavier Malcata. (2011). "Rheological, textural and microstructural features of probiotic whey cheeses." *LWT-Food Science and Technology* 44 (1): 75-81.
- Magni, C., de Mendoza, D., Konings, W.N. and Lolkema, J.S. (1999). Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. *J. Bacteriol* 181, 1451-1457.

- Maguire, H., J. Cowden, M. Jacob, B. Rowe, D. Roberts, J. Bruce, and E. Mitchell. (1992). "An outbreak of Salmonella dublin infection in England and Wales associated with a soft unpasteurized cows' milk cheese." *Epidemiology and infection* 109 (03): 389-396.
- Maher, M. M., K. N. Jordan, M. E. Upton, and A. Coffey. (2009). "Growth and survival of E. coli O157: H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk." *Journal of applied microbiology* 90 (2): 201-207.
- Malacarne, M., Martuzzi, E, Summer, A. and Mariani, P. (2002). Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cows' milk. *Int. Dairy J.* 12,869-877.
- Mangia, Nicoletta Pasqualina, Marco Ambrogio Murgia, Giovanni Garau, and Pietrino Deiana. (2011). "Microbiological and physicochemical properties of Pecorino Romano Cheese produced using a selected starter culture." *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 585-600.
- Mansour, S., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme. (2008). "Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*." *Applied and environmental microbiology* 74 (21): 6505-6512.
- Marciniszyn, J., Hartsuck, J.A. and Tang, J. (1976a). Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J. Biol. Chem.* 251, 7088-7094.
- Marsh, A.C., Klippstein, R.N. and Kaplan, S.D. (1980). *The Sodium Content of your Food*. USDA Home Garden Bulletin No. 233.
- Martens, R., van den Poorten, R. and Naudts, M. (1976). Production, composition and properties of low-sodium Gouda cheese. *Revue de l'Agriculture* 29, 681-698 (cited from *Dairy Sci. Abstr.* 1977;39:70).
- Martin, N., Savonitto, S., Molimard, R, Berger, C., Brousse, M. and Spinnler, H.E. (1999). Flavor generation in cheese curd by coculturing with selected yeast, mold and bacteria. *J. Dairy Sci.* 82, 1072-1080.
- Martley, EG. and Crow, V.L. (1993). Interactions between non-starter micro-organisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3, 461-483.
- Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J.S., Schmitt, P., Divies, C. and Konings, W.N. (1996). Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 178, 2178-2185.
- Mateo, M. J., C. D. Everard, C. C. Fagan, C. P. O'Donnell, M. Castillo, F. A. Payne, and D. J. O'Callaghan. (2009). "Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making." *International dairy journal* 19 (4): 264-268.
- Mathot, A.G., Kihal, M., Prevost, H. and Divies, C. (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *Int. Dairy J.* 4,459-469.
- Maubois, J.L. (1979). Application des techniques /t membrane dans l'industrie fromagere. *Genie Rural* 1, 15-19.
- Maubois, J.L. (2002). Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. *Aust. J. Dairy Technol.* 57, 92-96.
- Maubois, J.L., Fauquant, J., Famelart, M.H. and Caussin, E (2001). Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives. The importance of whey and whey components in food and nutrition. B. Behr's Verlag, Hamburg, Germany, 3rd International Whey Conference. Munich, Germany. pp. 59-72.
- Maubois, J.L., Mocquot, G. and Vassal, L. (1969). Procde de traitement du lait et de sous produits laitiers. French Patent 2052121.



- Maubois, J.L., Mocquot, G. and Vassal, L. (1972). Procédé de traitement du lait et de sous-produits laitiers. French Patent No. 2166315.
- Maubois, J.L., Mocquot, G. and Vassal, L. (1973). Procédé de traitement du lait et des sous-produits laitiers. French Patent 2218821.
- Maudet, Célia, and Pierre Taberlet. (2001). "Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism." *Journal of Dairy Research* 68 (02): 229-235.
- Mc Brearty S., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Wallace J.M., and Stanton C., (2001). Influence of two Commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality, *Int. Dairy J.* 11: 599–610.
- McCaman, M.T., Andrews, W.H. and Files, J.G. (1985). Enzymatic properties and processing of bovine prochymosin synthesized in *Escherichia coll.* *J. Biotechnol.* 2, 177-190.
- McDowall, E.H. and Whelan, L.A. (1933). The distribution of salt in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 4, 147-153.
- McGrath, S., Fitzgerald, G, and van Sinderen, D. (eds). (2004). "Starter Cultures: Bacteriophage", *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1. Elsevier, pp. 163-189.
- McGrath, S., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G.E (2002b). Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Int. DairyJ.* 12, 3-15.
- McNamara, D.J. (1987). Effects of fat-modified diets on cholesterol and lipoprotein metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 7, 273-290.
- McSweeney, Paul LH, and Maria José Sousa. (2000). "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review." *Le Lait* 80 (3): 293-324.
- Meile L., Le Blay G., and Thierry A., (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*, *Int. J. Food Microbiol.* 126: 316– 320.
- Meisel, H. (1993). Casokinins as inhibitors of angiotensin-converting- enzyme, in, *New Perspectives in Infant Nutrition*, Sawatzki, G. and Renner, B., eds., Thieme, Stuttgart. pp. 153-159.
- Meisel, H., Goepfert, A. and Gunther, S. (1997). ACE inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft* 52,307-311.
- Melilli, C., Barbano, D.M., Licitra, G., Tumino, G., Farina, G. and Carpino, S. (2003). Influence of presalting and brine concentration on salt uptake by Ragusano Cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 1083-1100.
- Menendez, S., Centeno, J.A., Godinez, R. and Rodruiguez Otero, J.L. (2000). Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzua Ulloa cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 37-46.
- Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, Quiberoni A. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol*, 144:503-510.
- Mercier, Jean-Claude, François Grosclaude, and Bruno Ribadeau-Dumas. (1971). "Structure primaire de la caséine asl-bovine." *European Journal of Biochemistry* 23 (1): 41-51.
- Messens, W., Dewettinck, K.M. and Huyghebaert, A. (1999). Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining. *Int. Dairy J.* 9, 569-576.
- Miao, Song, Susan Mills, Catherine Stanton, Gerald F. Fitzgerald, Yrjo Roos, and R. Paul Ross. (2008). "Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics." *Dairy Science and Technology* 88 (1): 19-30.
- Michael Ventris and John Chadwick, (1973). *Documents in Mycenaean Greek*, 2nd ed. (Cambridge University Press), 572 - 588

- Miescher Schwenninger S., and Meile L., (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts, *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 229–237.
- Minhalma, M., Magueijo, V., Queiroz, D.P., Pinho, M.N., 2007. Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *J. Environ. Manage.* 82 (2), 200-206.
- Mistry, V. V., and J. L. Maubois (eds). (2004). "Application of membrane separation technology to Cheese production." *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* 1: 261-285.
- Miyazaki, H., Fukamizu, A., Hirose, S., Hayashi, T., Hori, H., Ohkubo, H., Nakanishi, S. and Murakami, K. (1984). Structure of the human renin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5999-6003.
- Moatsou, Golfo, Constantinos Bakopanos, Dimitis Katharios, George Katsaros, Ioannis Kandarakis, Petros Taoukis, and Ioannis Politis. (2008). "Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk." *Journal of dairy research* 75 (3): 262.
- Modler, H. W. (1988). "Development of a continuous process for the production of ricotta cheese." *Journal of Dairy Science* 71 (8): 2003-2009.
- Moineau S, Lévesque C (2005) The control of bacteriophages in industrial fermentations. In *Bacteriophages: Biology and applications*. Boca Raton, FL,
- Moineau, S. (1999). Application of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 377-382.
- Moineau, S. (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 377-382.
- Møller, Kirsten Kastberg, Fergal P. Rattray, and Ylva Ardö. (2013). "Application of selected lactic acid bacteria and coagulant for improving the quality of low-salt Cheddar cheese: Chemical, microbiological and rheological evaluation." *International Dairy Journal* 33 (2): 163-174.
- Moraes, P. M., L. M. Perin, Svetoslav Dimitrov Todorov, A. Silva, B. D. G. M. Franco, and L. A. Nero. (2012). "Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese." *Journal of applied microbiology* 113 (2): 318-328.
- Morales, P., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. (2001). Hydrolysis of caseins and formation of hydrophobic peptides by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *J. Appl. Microbiol.* 91,907-915.
- Morea, M., Baruzzi, E and Cocconcelli, P.S. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.* 87,574-582.
- Morr, C.V., and Barrantes, L., (1998). Lactose-hydrolysed cottage cheese whey nanofiltration retentate in ice cream. *Milchwissenschaft* 53 (10), 568-572.
- Morris GK, and Dunn CG. (1970). Influence of incubation temperature and sodium heptadecyl sulfate (Tergitol No. 7) on the isolation of salmonellae from pork sausage. *Appl Microbiol.* 20: 192-5.
- Morris, P.C., Miller, R.C. and Bowles, D.J. (1985). Endopeptidase activity in dry harvest-ripe wheat and barley grains. *Plant Sci.* 39, 121-124.
- Mortensen, Grith, Grete Bertelsen, Børge K. Mortensen, and Henrik Stapelfeldt. (2004). "Light-induced changes in packaged cheeses—a review." *International Dairy Journal* 14, no. 2 (2004): 85-102.

- Moss, M. and Freed, D. (2003). The cow and the coronary: epidemiology, biochemistry and immunology. *Int. J. Cardiol.* 87,203-216.
- Mougiou, V., Matsakas, A., Petridou, A., Ring, S., Sagredos, A., Melissopoulou, A., Tsigilis, N. and Nicolaidis, M. (2001). Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.* 12, 585-594.
- Mounier, J., S. Goerges, Roberto Gelsomino, Marc Vancanneyt, Katrien Vandemeulebroecke, Bart Hoste, N. M. Brennan. (2006). "Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese." *Journal of applied microbiology* 101 (3): 668-681.
- Muliawan, Edward B., and Savvas G. Hatzikiriakos. (2008). "The effect of refrigerated storage on the rheological properties of three commercial mozzarella cheeses." *International Journal of Food Engineering* 4 (4): .
- Müller-Merbach M, Peter K, Weidendorfer K, and Hinrichs J. (2007). Diffusion of bacteriophages in an agar gel and in a fermented milk matrix. *Milchwissenschaft*, 62:24-27.
- Mulvihill, D.M. and Grufferty, M.B. (1995). Effect of thermal processing on the coagulability of milk by acid, in, *heat induced Changes in Milk: Special Issue No. 9501*, 2nd edn., RE Fox, ed., International Dairy Federation, Brussels. pp. 188-205.
- Nelson, B. K., and D. M. Barbano. (2005). "A microfiltration process to maximize removal of serum proteins from skim milk before cheese making." *Journal of dairy science* 88 (5): 1891-1900.
- Nes I.F., Diep D.B., and Holo H., (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*, *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Neve H, Laborius A, and Heller KJ. (2003). Testing of the applicability of battery-powered portable microbial air samplers for detection and numeration of airborne *Lactococcus lactis* dairy bacteriophages. *Kieler Milchw Forsch.* 55:301-315.
- Nielsen, ES. and Foltmann, B. (1993). Activation of porcine pepsinogen A: the stability of two non-covalent activation intermediates at pH 8.5. *Eur. J. Biochem.* 217, 137-142.
- Nielsen, S.S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6628-6634.
- Nieto-Arribas, Pedro, Susana Seseña, Justa M. Poveda, Llanos Palop, and Lourdes Cabezas. (2010). "Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego Cheese manufacture." *Food microbiology* 27 (1): 85-93.
- Niku-Paavola M.L., Laitila A., Mattila- Sandholm T., and Haikara A., (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*, *J. Appl. Microbiol.* 86: 29–35.
- Noomen, A. (1978). Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 1. Activity of milk protease. *Neth. Milk Dairy J.* 32, 26.
- Noomen, A. (1983). The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. *Neth. Milk Dairy J.* 37,229-232.
- Norat, T. and Riboli, E. (2003). Dairy products and colorectal cancer: a review of possible mechanism and epidemiological evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 1-17.
- Nunez, M. (1976). Microflora of Manchego Cheese. VI. *Pediococci*. An Inst. Nac. Invest. Agrarias, General, No. 4, 75 (cited from *Dairy Sci. Abstr.* 1978;458).
- O'Callaghan, DJ., and Guinee, T. P. (eds). (2004). "Rheology and Texture of Cheese." *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1 (2004): 511-541.

- Oberg, C. J., L. V. Moyes, M. J. Domek, C. Brothersen, and Donald J. McMahon. (2011). "Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media." *Journal of dairy science* 94 (5): 2220-2230.
- Oberg, C.J. and Broadbent, J.R. (1993). Thermophilic starter cultures: another set of problems. *J. Dairy Sci.* 76, 2392-2406.
- Oberg, C.J. and Broadbent, J.R. (1993). Thermophilic starter cultures: another set of problems. *J. Dairy Sci.* 76, 2392-2406.
- Oberg, C.J., Merrill, R.K., Moyes, L.V., Brown, R.J. and Richardson, G.H. (1991). Effects of *Lactobacillus helveticus* culture on physical properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 74, 4101-4107.
- O'Brien, N.M. and T.P. O'Connor (eds). (2004). "Nutritional Aspects of Cheese "; Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1. Elsevier, 573-580.
- O'Brierl, N.M. and O'Connor, T.P. (1993). Milk, cheese and dental caries. *J. Soc. Dairy Technol.* 46, 46-49.
- Ochirkhuyag, B., Chobert, J.-M., Dalgalarondo, M. and Haertle, T. (2000). Characterization of mare caseins. Identification of alpha s1- and s2-caseins. *Lait* 80, 223-235.
- O'Connor, C.B. (1974). The quality and composition of Cheddar cheese: effect of various rates of salt addition. Part III. *Irish Agric. Creamery Rev.* 27 (1), 11-13.
- Okigbo, L.M., Richardson, G.H., Brown, R.J. and Ernstrom, C.A. (1985). Effect of pH, calcium chloride, and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *J. Dairy Sci.* 68, 2527-2533.
- Okpala, Charles OR, John R. Piggott, and Carl J. Schaschke. (2010). "Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (1): 61-67.
- Ollikainen, P. and Kivela, T. (1989). The importance of plasmin in Swiss-type cheese ripening. *Milchwissenschaft* 44, 204-207.
- Ong L., Henriksson A., and Shah N.P., (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acids, *Int. Dairy J.* 16: 446-456.
- Ong, Lydia, A. Henriksson, and Nagendra P. Shah. (2007). "Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp." *International dairy journal* 17 (8): 937-945.
- O'Nulain, M. (1986). *Manufacture of Modified Camembert and Cheddar Cheeses*. MSc Thesis, National University of Ireland, Cork.
- O'Reilly, Ciara E., Alan L. Kelly, Patrick M. Murphy, and Thomas P. Beresford. (2001). "High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening." *Trends in Food Science & Technology* 12 (2): 51-59.
- Orla-Jensen, S. (1931). *Dairy Bacteriology*, 2nd edn, P. Blackiston, Son and Co., Inc., Philadelphia, PA.
- Orla-Jensen, S., Anna D. Orla-Jensen, and Agnete Kjaer. (1947). "On the ensiling of lucerne by means of lactic acid fermentation." *Antonie van Leeuwenhoek* 12 (1): 97-114.
- O'Sullivan, Daniel J., Linda Giblin, Paul LH McSweeney, Jeremiah J. Sheehan, and Paul D. Cotter. (2013). "Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects." *Frontiers in microbiology* 4 (2013).

- Oterholm, A. (1984). Cheesemaking in Norway. Bulletin 171, International Dairy Federation, Brussels. pp. 21-29.
- Ouwehand A.C., (2004). The probiotic potential of propionibacteria, in: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Marcel Dekker Inc., New-York, USA, 2004, pp. 159–174.
- Ozturk, Mustafa, Selvarani Govindasamy-Lucey, John J. Jaeggi, Mark E. Johnson, and John A. Lucey. (2013). "The influence of high hydrostatic pressure on regular, reduced, low and no salt added Cheddar cheese." *International Dairy Journal* 33 (2): 175-183.
- P.L.H., eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 675-697.
- Pagana, M.M. and Hardy, J. (1986). Effect of salting on some rheological properties of fresh Camembert cheese as measured by uniaxial compression. *Milchwissenschaft* 41, 210-213.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S. and Cogan, T.M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 147-154.
- Palmquist, D. L., A. Denise Beaulieu, and D. M. Barbano. (1993). "Feed and animal factors influencing milk fat composition." *Journal of Dairy Science* 76 (6): 1753-1771.
- Pappas, C.P., Kondyli, E., Voutsinas, L.R and Mallatou, H. (1996). Effects of salting method and storage time on composition and quality of Feta cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 49, 113-118.
- Parente, D., de Ferra, E, Galli, G. and Grandi, G. (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 243-250.
- Parente, E. and Cogan, T.M. (eds). (2004). "Starter Cultures: General Aspects", " , *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1. Elsevier, 123-148
- Parente, E., Rota, M.A., Ricciardi, A. and Clementi, E (1997). Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of *Pasta Filata* cheese in Basilicata (Southern Italy). *Int. Dairy J.* 7, 775-783.
- Park, Y. W., M. Juárez, M. Ramos, and G. F. W. Haenlein. (2007). "Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk." *Small Ruminant Research* 68 (1): 88-113.
- Parkash, S., Jenness, R., (1968). The composition and characteristics of goat's milk: a review. *Dairy Sci. Abstr.* 30: 67–75.
- Pastorino, A. J., C. L. Hansen, and Donald J. McMahon. (2003). "Effect of salt on structure-function relationships of cheese." *Journal of Dairy Science* 86 (1): 60-69.
- Pastorino, A. J., N. P. Ricks, C. L. Hansen, and Donald J. McMahon. (2003). "Effect of calcium and water injection on structure-function relationships of cheese." *Journal of dairy science* 86 (1): 105-113.
- Pavia, M., Guamis, B. and Ferragut, V. (1999). Effects of ripening time and salting method on glycolysis in Manchego Cheese. *Milchwissenschaft* 54, 379-381.
- Pearse, MJ. and Mackinlay, A.G. (1989). Biochemical aspects of syneresis: a review. *J. Dairy Sci.* 72, 1401-1407.
- Peighambaroust, S. H., A. Golshan Tafti, and J. Hesari. (2011). "Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review." *Trends in Food Science & Technology* 22 (5): 215-224.
- Pérez, Tania, José Luis Balcázar, Alvaro Peix, Angel Valverde, Encarna Velázquez, Ignacio de Blas, and Imanol Ruiz-Zarzuela. (2011). "*Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61 (8): 1894-1898.

- Perreten, Vincent, Beat Kollöffel, and Michael Teuber. (1997). "Conjugal Transfer of the Tn916-like Transposon TnFO1 from *Enterococcus faecalis* Isolated from Cheese to Other Gram-positive Bacteria." *Systematic and applied microbiology* 20 (1): 27-38.
- Petersen, Karen Mee, Signe Westall, and Lene Jespersen. (2002). "Microbial Succession of *Debaryomyces hansenii* Strains During the Production of Danish Surfaced-Ripened Cheeses." *Journal of dairy science* 85 (3): 478-486.
- Pierro, Prospero Di, Loredana Mariniello, Angela Sorrentino, C. Valeria L. Giosafatto, Lina Chianese, and Raffaele Porta. (2010). "Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese." *Food Biotechnology* 24 (2): 107-120.
- Pierson, Merle D., and Donald A. Corlett. (1992). "HACCP: principles and applications."
- Pihlanto-Leppala, A. (2002). Bioactive peptides, in, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski, H., Fuquay, J.W. and Fox, P.F., eds., Academic Press, London. pp. 1960-1967.
- Pitts, J.E. (1992). Crystallization by centrifugation. *Nature* 355, 117-120.
- Polanowski, A., Wilusz, T., Kolaczowska, M.K., Wieczorek, M. and Wilimowska-Pelc, A. (1985). Purification and characterisation of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* seeds, in, *Aspartic Proteinases and their Inhibitors*, Kostka, V., ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin. pp. 49-52.
- Poli, Giuseppe, Barbara Sottero, Simona Gargiulo, and Gabriella Leonarduzzi. (2009). "Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis." *Molecular aspects of medicine* 30 (3): 180-189.
- Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 125-148.
- Poolman, B. (2002). Transporters and their role in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 147-164.
- Popović, Svetlana, and Miodrag N. Tekić. (2011). "Twisted tapes as turbulence promoters in the microfiltration of milk." *Journal of Membrane Science* 384 (1): 97-106.
- Popović, Svetlana, Dragica Jovičević, Marko Muhadinović, Spasenija Milanović, and Miodrag N. Tekić. (2013). "Intensification of microfiltration using a blade-type turbulence promoter." *Journal of Membrane Science* 425: 113-120.
- Porcellato, Davide, Hilde M. Østlie, Mona E. Brede, Aleksandra Martinovic, and Siv B. Skeie. (2013). "Dynamics of starter, adjunct non-starter lactic acid bacteria and propionic acid bacteria in low-fat and full-fat Dutch-type cheese." *International Dairy Journal* 33 (2): 104-111.
- Porter, Forbes D., David E. Scherrer, Michael H. Lanier, S. Joshua Langmade, Vasumathi Molugu, Sarah E. Gale, and Dana Olzeski. (2010). "Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease." *Science translational medicine* 2, (56), 56ra81-56ra81.
- Poulet, B., Huertas, M., Sanchez, A., Caceres, P. and Larriba, G. (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Caceres cheese. *J. Dairy Res.* 60, 123-127.
- Powell, M. J., R. J. Holdsworth, T. S. Baker, R. C. Titmas, C. C. Bose, A. Phipps, M. Eaton, C. E. Roph, M. J. Valler, and J. Kay. (1985). "Design and synthesis of statine-containing inhibitors of chymosin." *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*, 479-483.
- Prazeres, Ana R., Fátima Carvalho, and Javier Rivas. "Cheese whey management: a review." *Journal of environmental management* 110 (2012): 48-68.

- Preetha, S., and R. Boopathy. (1997). "Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13 (5), ~~(1997)~~ 573-578.
- Pyne, G.T. (1955). The chemistry of casein: a review of the literature. *Dairy Sci. Abstr.* 17, 532-553.
- Pyne, G.T. and McGann, T.C.A. (1960). The colloidal calcium phosphate of milk. II. Influence of citrate. *J. Dairy Res.* 27, 9-17.
- Quiberoni, Andrea, Sylvain Moineau, Geneviève M. Rousseau, Jorge Reinheimer, and Hans-Wolfgang Ackermann. (2010): "Streptococcus thermophilus bacteriophages." *International Dairy Journal* 20, (10), 657-664.
- R.A., Lamsa, M.H., Przetak, M.M., Rey, M.W., Wilson, L.J. and Ward, M. (1991). *Aspergillus niger* var. *awamori* as a host for the expression of heterologous genes, in, *Applications of Enzyme Biotechnology*, Kelly, J.W. and Baldwin, T.O., eds, Plenum Press, New York. pp. 273-292.
- Rajagopalan, T.G., Stein, W.H. and Moore, S. (1966). The inactivation of pepsin by diazoacetylornithine methyl ester. *J. Biol. Chem.* 241, 4295-4297.
- Ramos, A., Neves, A.R. and Santos, H. (2002). Metabolism of lactic acid bacteria studied by nuclear magnetic resonance. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82,249-261.
- Ramos, M., Juarez, M., (2003). Sheep milk. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 2539-2545.
- Randazzo, C. L., C. Caggia, and E. Neviani. (2009). "Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses." *Journal of Microbiological Methods* 78 (1), 1-9.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. and Vaughan, E.E. (2002). Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1882-1892.
- Re, G.D., Di Giacomo, G., Aloisio, L., Terreri, M., (1998). RO treatment of waste waters from dairy industry. *Desalination* 119 (1e3), 205-206.
- Rehn, U., Mikael Agerlin Petersen, K. Hallin Saedén, and Y. Ardö. (2010). "Ripening of extra-hard cheese made with mesophilic DL-starter." *International dairy journal* 20 (12), 844-851.
- Reiter, B. (1956). Inhibition of lactic *Streptococcus* bacteriophage. *Dairy Industries* 21,877-879.
- Reiter, R., Fryer, T.E, Pickering, A., Chapman, H.R., Lawrence, R.C. and Sharpe, M.E. (1967). The effect of the microbial flora on the flavour and free fatty acid composition of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 34, 257-272.
- Rektor, A., Vatai, G., (2004). Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desalination* 162 (1e3), 279-286.
- Remeuf, F., Lenoir, J., (1986). Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Intl. Dairy Bull.* 202, 68.
- Renner, E. (1987). Nutritional aspects of cheese, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, General Aspects*, Fox, RE, ed., Elsevier Applied Science, London. pp. 345-363.
- Reps, Arnold, L. J. Drychowski, Jan Tomasik, and K. Winiewska. (2002). "Natamycin in ripening cheeses." *Pakistan Journal of Nutrition* 1 (5), 243-247.
- Reynolds, E.C. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J. Dent. Res.* 76, 1587-1595.

- Reynolds, E.C. and Black, C.L. (1987). Reduction of chocolate's cariogenicity by supplementation with sodium caseinate. *Caries Res.* 21,445-451.
- Reynolds, E.C. and del Rio, A. (1984). Effect of casein and whey protein solutions on caries experience and feeding patterns of the rat. *Arch. Oral Biol.* 29,927-933.
- Reynolds, E.C., Black, C.L. and Cai, E (1999). Advances in enamel remineralization: casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J. Clin. Dent.* 10, 86-88.
- Riahi, M. H., I. C. Trelea, M-N. Leclercq-Perlat, D. Picque, and G. Corrieu. (2007). "Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under controlled temperature and relative humidity." *International Dairy Journal* 17 (8), 946-953.
- Richardson, B.C. and Pearce, K.N. (1981). The determination of plasmin in dairy products. *NJ J. Dairy Sci. Technol.* 16, 209-220.
- Ricke, S.C., Diaz, I.Z., and Keeton, J.J.T., (2001). Fermented meat, poultry and fish products, in *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed., Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J., Eds., ASM Press, Washington, 681–700.
- Ridgwell, Jenny; Ridgway, Judy (1968). *Food Around the World*. Oxford University Press
- Robinson, Richard Kenneth, and Adnan Y. Tamime. (1996). *Feta & Related Cheeses*. CRC Press.
- Rodrigues, F., B. Sarmiento, J. Andrade, and B. Oliveira. (2012): "Review: Can Microencapsulation Be A Means To Increase Survival Of Probiotics In Cheese." *International Journal of Probiotics & Prebiotics* 7(2).
- Rodríguez, Lorena, Beatriz Martínez Fernández, Ana Rodríguez González, and María Pilar García Suárez. (2009): "Antimicrobial activity of phage lytic proteins against *Staphylococcus aureus* in dairy products". 3rd Symposium on Phages Interaction.
- Rodriguez-Aguilera, Rocio, Jorge C. Oliveira, Julio C. Montanez, and Pramod V. Mahajan. (2011). "Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of surface mould ripened cheese: Part I constant temperature." *LWT-Food Science and Technology* 44 (1), ~~(2011):~~ 330-336.
- Roefs, S.P.E.M. (1986). *Structure of Acid Casein Gels. A Study of Gels Formed after Acidification in the Cold*. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Roefs, S.P.E.M., de Groot-Mostert, A.E.A. and van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels. 1. Formation and model of gel network. *Colloids Surfaces* 50, 141-159.
- Roefs, S.P.E.M., Walstra, P., Dalgleish, D.G. and Horne, D.S. (1985). Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Neth. Milk Dairy J.* 39, 119-122.
- Rogers, N. R., M. A. Drake, C. R. Daubert, Donald J. McMahon, T. K. Bletsch, and E. A. Foegeding. (2009). "The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture." *Journal of dairy science* 92 (10), 4756-4772.
- Rollema H.S., Kuipers O.P., Both P., de Vos W.M., Siezen R.J.. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide. *Appl Environ Microbiol* 61(8): 2873–2878.
- Roos, Andreas Leonardus. (1999): *The Adsorption of Chymosin and Lysozyme Onto Emulsion Droplets and Their Association with Casein*. Landbouwwuniversiteit Wageningen, ~~1999~~.
- Rosen, S., Min, D.B., Harper, D.S., Harper, W.J., Beck, E.X. and Beck, EM. (1984). Effect of cheese, with or without sucrose, on dental caries and recovery of *Streptococcus mutans* in rats. *J. Dent. Res.* 63,894-896.
- Ross P.R., Stanton C., Hill C., Fitzgerald G.F., Coffey A., (2000). Novel cultures for cheese improvement, *Trends Food Sci. Technol.* 11, 96–104.



- Rosshaug, Per Sand, Ann Detmer, Hanne Ingmer, and Marianne Halberg Larsen. (2012). "Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue-white cheese." *Applied and environmental microbiology* 78 (24): 8508-8514.
- Ruegg, M. and Blanc, B. (1981). Influence of water activity on the manufacture and aging of cheese, in, *Water Activity, Influences on Food Quality*, Rockland, L.B. and tewart, G.E, eds, Academic Press, New York. pp. 791-811.
- Ruettimann, K. W., and M. R. Ladisch. (1987). "Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation." *Enzyme and Microbial Technology* 9 (10), 578-589.
- Rugg-Gunn, A.J., Edgar, W.M., Geddes, D.A.M. and Jenkins, G.N. (1975). The effect of different meal patterns upon plaque pH in human subjects. *Br. Dent. J.* 139, 351-356.
- Rulikowska, A., K. N. Kilcawley, I. A. Doolan, M. Alonso-Gomez, A. B. Nongonierma, J. A. Hannon, and M. G. Wilkinson. (2013). "The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality." *International Dairy Journal* 28 (2), 45-55.
- Saboya, L.V. and Maubois, J.L. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait* 80, 541-553.
- Sala, Claudia, K. Imre, Ileana Nichita, Carmen David, Florentina Stoica, And Adriana Morar. (2013): "Detection Of Staphylococcal Enterotoxins In Samples Of Cheese Sold On Free Market." *A Comparative Evaluation Of Carried Bacterial Strains In Sheep And Goats Raised In A Mixed Heard*, 107.
- Salama, M.S., Jeknic-Musafija, T., Sandine, WE. and Giovannoni, S.J. (1995). An ecological study of lactic acid bacteria:
- Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, *et al* (2012). "Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe". *Nature* (Nature Publishing Group).
- Salvat-Brunaud, D., Thierry, A. and Maubois, J.-L. (1997). Development of a medium simulating Emmental juice for propionibacteria. *J. Dairy Res.* 64, 573-580.
- Samelis, John, Alexandra Lianou, Athanasia Kakouri, Celine Delbes, Irena Rogelj, Bojana Bogovič-Matijašić, and Marie-Christine Montel. (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 (4), 783-790.
- Sanchez, E.S., Simal, S., Femenia, A., Benedito, J. And Rossello, C. (2001). Effect of acoustic brining on lipolysis and sensory characteristics of Mahon cheese. *J. Food Sci.* 66,892-896.
- Sandine, W.E. (1996). Commercial production of dairy starter cultures, in, *Dairy Starter Cultures*, Cogan, T.M. and Accolas, J.-P., eds, VCH, New York. pp. 191-206.
- Sandra, S., M. A. Stanford, and L. Meunier Goddik. (2004). "The Use of High-pressure Processing in the Production of Queso Fresco Cheese." *Journal of food science* 69 (4), FEP153-FEP158.
- Sanz Sampelayo, M. R., Y. Chilliard, Ph Schmidely, and J. Boza. (2007). "Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk." *Small Ruminant Research* 68 (1), 42-63.
- Sardinas, J.L. (1968). Rennin enzymes of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.* 16,248-253.
- Schafer, A., Gels, A., Neve, H. and Teuber, M. (1991). Bacteriophage receptors of *Lactococcus lactis* subsp. '*diacetylactis*' F7/2 and *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* Wg2-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 69-73.
- Schmidt, J.L. and Lenoir, J. (1980). Contribution a l'etude de la flore levure du fromage de Camembert. *Lait* 60, 272-282.

- Schneider, Nadine, Cord-Michael Becker, and Monika Pischetsrieder. (2010). "Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 878, no. 2: 201-206.
- Schnürer J., and Magnusson J., (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, *Trends Food Sci. Technol.* 16: 70–78.
- Schroeder, C.L., Bodyfeh, E.W., Wyatt, C.J. and McDaniel, M.R. (1988). Reduction of sodium chloride in Cheddar cheese: effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *J. Dairy Sci.* 71, 2010-2020.
- Scott, Peter M., and Barry PC Kennedy. (1976). "Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*." *Journal of agricultural and food chemistry* 24 (4), 865-868.
- Seratić, Sanja V., Zorana N. Miloradović, Zorica T. Radulović, And Ognjen D. Maćej. (2011). "The effect of two types of mould inoculants on the microbiological composition, physicochemical properties and protein hydrolysis in two Gorgonzola-type cheese varieties during ripening." *International Journal of Dairy Technology* 64 (3), 408-416.
- Server-Busson, C., Foucaud, C. and Leveau, J.-Y. (1999). Selection of dairy *Leuconostoc* isolates for important technological properties. *J. Dairy Res.* 66, 245-256.
- Shakeel-Ur-Rehman, Banks, J.M., McSweeney, P.L.H. and Fox, P.E (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. *Int. Dairy J.* 10, 45-53.
- Sheehan, Jeremiah J., Martin G. Wilkinson, and Paul LH McSweeney. (2008). "Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses." *International dairy journal* 18 (9), 905-917.
- Shehata A E, El-Sadek G M, Khalafalla S M and El-Magroub M J N (1975) Effect of pasteurization and hydrogen peroxide–catalase treatment of milk on lactic acid bacteria in domiati cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science* 3 139–142.
- Shidara, Hideo, Junichi Otsuji, Kiyotaka Takahashi, and Takeshi Goto. (2013). "Continuous emulsification process for process cheese type and equipment therefor, and continuous production method for process cheese type and equipment therefor." U.S. Patent 8,372,458.
- Sielecki, A.R., Fujinaga, M., Read, R.J. and James, M.N.G. (1991). Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219, 671-692.
- Siezen, R.J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 139-155.
- Silanikove, Nissim, Fira Shapiro, Avi Shamay, and Gabriel Leitner. (2005). "Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates." *Free Radical Biology and Medicine* 38 (9), 1139-1151.
- Silanikove, Nissim, Uzi Merin, and Gabriel Leitner. (2006). "Physiological role of indigenous milk enzymes: an overview of an evolving picture." *International Dairy Journal* 16 (6), 533-545.
- Simal, S., Sanchez, E.S., Bon, J., Femenia, A. and Rosello, C. (2001). Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. *J. Food Eng.* 48,269-275
- Simons, G., Rutten, G., Hornes, M., Nijhuis, M. and van Asseldonk, M. (1991). Production of prochymosin in lactococci, in, *Structure and Function of Aspartic Proteinases*, Dunn, B.M., ed., Plenum Press, New York. pp. 115-119.

- Simoons, Frederick J. (1971). "The antiquity of dairying in Asia and Africa". *Geographical Review* (American Geographical Society) 61 (3)
- Singh, Harjinder, and Algane Waungana. (2001). "Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties." *International Dairy Journal* 11 (4), 543-551.
- Sjögren, J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L., (2003): Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7554–7557.
- Skeie, Siv. (2007). "Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality." *Journal of Animal and Feed Sciences* 16 (1), 130-142.
- Smacchi, E. and Gobbetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2,687-694.
- Smit, Gerrit, Bart A. Smit, and Wim JM Engels. (2005). "Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products." *FEMS microbiology reviews* 29 (3), 591-610.
- Smits G.J., and Brul S., (2005). Stress tolerance in fungi – to kill a spoilage yeast, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 225–230.
- Sogawa, K., Fujii-Kuriayma, Y., Mizukami, Y., Ichihara, Y. and Takahashi, K. (1983). Primary structure of human pepsinogen gene. *J. Biol. Chem.* 258, 5306-5315.
- Sousa M.J., Ardö Y., McSweeney P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening, *Int. Dairy J.* 11: 327–345.
- Souza, R.R., Bergamasco, R., Costa, S.C., Feng, X., Faria, S.H.B., Gimenes, M.L., (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *Chem. Eng. Process.* 49 (11), 1137-1143.
- Spanamberg, Andréia, Jesus Pais Ramos, Orílio Leoncini, Sydney Hartz Alves, and Patrícia Valente. (2009). "High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil." *Acta Scientiae Veterinariae* 37(2), 133-141.
- Special Issue. (2005) 01. Future of Dairy Sheep and Dairy Goat Sectors, Proc. Int'l Symposium, Zaragoza, Spain.
- Stadhouders, J. and Leenders, G.J.M. (1984). Spontaneously developed mixed-strain cheese starters: their behaviour toward phages and their use in the Dutch cheese industry. *Neth. Milk DairyJ.* 38, 157-181.
- Stadhouders, J., G. Hup, F. A. Exterkate, and S. Visser. (1983). "Bitter flavour in cheese. I: Mechanism of the formation of the bitter flavour defect in cheese." *Netherlands milk and dairy journal* 37(3), 157-167.
- Stanley, G. (1998). Cheeses, in, *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, J.B., ed., Blackie Academic and Professional, London. pp. 263-307.
- Stanton, C. and Devery, R. (2002). Formation and content of cholesterol oxidation products in milk and dairy products, in, *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects*, Guardiola, E, Dutta, R C., Codony, R. and Savage, G.R, eds., AOCS Press, Champaign, IL. pp. 147-161.
- Steffen, C., Eberhard, P., Bosset, J.O. and Riegg, M. (1993). Swiss-type varieties, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London. pp. 83-110.
- Stepaniak, L., Fox, RE, Sorhaug, T. and Grabska, J.J. (1995). Effect of peptides from the sequence 58-72 of beta-casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase and X-propyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus*. *J. Agric. Food Chem.* 43,849-853.

- Sternberg, M.Z. (1971). Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.* 54, 159-167.
- Storry, J.E., Grandison, A.S., Milliard, D., Owen, A.J., Ford, G.D., (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *J. Dairy Res.* 50, 215–229.
- Strange, E.D., van Hekken, D.L. and Holsinger, V.H. (1994). Effect of sodium chloride on the solubility of casein. *J. Dairy Sci.* 77, 1216-1222.
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., and Schnürer J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phetrans- 4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4322– 4327.
- Strop, P, Sedlacek, J., Stys, J., Kaderabkova, Z., Blaha, I., Pavlickova, L., Pohl, J., Fabry, M., Kostka, V., Newman, M. (1990). Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and X-ray analysis at 2.0-Å resolution of Val111Phe site-mutated calf chymosin. *Biochemistry* 29: 9863-9871
- Sturino, J.M. and Klaenhammer, T.R. (2002). Expression of antisense RNA targeted against *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 588-596.
- Suárez, E., Lobo, A., Álvarez, S., Riera, F.A., Álvarez, R., (2006). Partial demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by nanofiltration at pilot-plant scale.
- Suguna, K., Bott, R.R., Padlan, E.A., Subramanian, E., Sheriff, S., Cohen, G.H. and Davies, D.R. (1987). Structure and refinement at 1.8 Å resolution of the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*. *J. Mol. Biol.* 196, 877-900.
- Sutherland, B.J. (1974). Control of salt absorption and whey drainage in Cheddar cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Technol.* 29, 86-93.
- Suwonsichon, T. and Peleg, M. (1999). Rheological characterisation of almost intact and stirred yogurt by imperfect squeezing flow viscometry. *J. Sci. Food Agric.* 79, 911-921.
- Suzzi, G., Caruso, N., Gardini, E., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C. and Lanorte, M.T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto Caprino). *Int. J. Food Microbiol.* 89,267-274.
- T.L., Valler, M.J., Norey, C.G., Kay, J., Boger, J., Dunn, B.M., Leckie, B.J., Jones, D.M., Atrash, B., Hallett, A. And Szelke, M. (1987). High resolution X-ray analysis of renin inhibitor-aspartic proteinase complexes. *Nature* 327, 349.
- Tamime, Adnan Y., (2008). ed. *Brined cheeses*. John Wiley & Sons.
- Tang, J., Sepulveda, P., Marciniszyn, J., Chen, K.C.S., Huang, W.-Y., Tao, N., Liu, D. and Lanier, J.P. (1973). Amino acid sequence of porcine pepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3437-3439.
- Tavaria, EK. and Malcata, EX. (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *J. Food Prot.* 61,601-607.
- Thakur, M.K., Kirk, J.R. and Hedrick, T.I. (1975). Changes during ripening of unsalted Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 58, 175-180.
- Thierry, Anne, Stéphanie-Marie Deutsch, Hélène Falentin, Marion Dalmasso, Fabien J. Cousin, and Gwenaël Jan. (2011). "New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*." *International journal of food microbiology* 149(1), 19-27.
- Thomas, T. D. (1987). Cannibalism among bacteria found in cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 22, 215e219

- Thomas, T.D. and Pearce, K.N. (1981). Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 16, 253-259.
- Thomas, T.D. and Pritchard, G.G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 245-268.
- Tobin, J. (1999). *Effects of Adjunct Cultures and Starter Blends on the Quality of Cheddar Cheese*. PhD Thesis, National University of Ireland, Cork.
- Todorov, Svetoslav. (2014). "Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides: Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water-buffalo Mozzarella Cheese." In *2014 Annual Meeting*. Iafp.
- Toelstede, Simone, and Thomas Hofmann. (2008). "Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese." *Journal of agricultural and food chemistry* 56(8), 2795-2804.
- Togni, G., Sanglard, D., Falchetto, R. and Monod, M. (1991). Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.* 286, 181-185.
- Tonouchi, N., Shoun, H., Uozumi, T. and Beppu, T. (1986). Cloning and sequencing of the gene for mucor rennin, an aspartate protease for *Mucor pusillus*. *Nucl. Acids Res.* 14, 7557-7568.
- Trmčić, Aljoša, Tanja Obermajer, Andreja Čanžek Majhenič, Bojana Bogovič Matijašić, and Irena Rogelj. (2011). "Competitive advantage of bacteriocinogenic strains within lactic acid bacteria consortium of raw milk cheese." *Mljekarstvo* 61(1),26-32.
- Tropea, J.E., Nashed, N.T., Louis, J.M., Sayer, J.M. and Jerina, D.M. (1992). Effect of salt on the kinetic parameters of retroviral and mammalian aspartic proteases. *Bioorg. Chem.* 20, 67-76.
- Trujillo, A.J., 2005. Rennet for clotting raw, pasteurized and highpressure treated milk. In: International dairy Federation (Ed.),
- Tsakalidou E., Zoidou E., Pot B., Wassill L., Ludwig W., Devriese L.A., Kalantzopoulos G., Schleifer K.H., Kersters K., (1998). Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 519–527.
- Tulini, Fabrício Luiz, Lizziane Kretli Winkelströter, and Elaine CP De Martinis. (2013). "Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese." *Anaerobe* 22, 57-63.
- Turhan, M. and Gunasekaran, S. (1999). Analysis of moisture transfer in white cheese during brining. *Milchwissenschaft* 54, 446-450.
- Turhan, M. and Kaletung, G. (1992). Modelling of salt diffusion in white cheese during long-term brining. *J. Food Sci.* 57, 1082-1085.
- Turner, K.W. and Thomas, D.T. (1980). Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 15,265-276.
- Turner, K.W. and Thomas, T.D. (1980). Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *NZ J. Dairy Sci. Technol.* 15,265-276.
- Tzanetakis N and Litopoulou-Tzanetaki E (1992) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in feta and teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *Journal of Dairy Science* 75 1389–1393.
- Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1989). Biochemical activities of *Pediococcus pentosaceus* isolates of dairy origin. *J. Dairy Sci.* 72,859-863.

- Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewes' milk. *J. Dairy Sci.* 75, 1389-1393.
- Uchiyama, H., Uozumi, T., Beppu, T. and Arima, K. (1980). Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1373-1381.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. and Takeuchi, T. (1970). Pepstatin, a new peptide inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* 23, 259-262.
- Umpierrez, A., S. Quirce, F. Maranon, J. Cuesta, Y. Garcia-Villamuza, C. Lahoz, and J. Sastre. (1999). "Allergy to goat and sheep cheese with good tolerance to Cow cheese." *Clinical and Experimental Allergy* 29, no. 8 (1999): 1064-1068.
- Upreti, P., and L. E. Metzger. (2006). "Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Manufacture and composition." *Journal of dairy science* 89(2), 420-428.
- Upreti, P., L. L. McKay, and L. E. Metzger. (2006). "Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening." *Journal of dairy science* 89(2), 429-443.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki A, Litopoulou-Tzanetaki E and Tzanetakis N (1990) Effect of *Pediococcus pentosaceus* on ripening changes of feta cheese. *Microbiologie Aliments Nutrition* 8, 53-62.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. And Tzanetakis, N. (1994). Proteinase, peptidase and esterase activity of crude cell-free extracts of *Pediococcus pentosaceus* isolated from cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27, 342-346.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. (1999). Influence of pH and NaCl on proteolytic and esterolytic activity of intracellular extract of *Leuconostoc mesenteroides* subsp, *mesenteroides* strain KIGs. *Milchwissenschaft* 54, 314-316.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E. and Geller, B.L. (1990). The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1882-1889.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E. and Geller, B.L. (1994). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 bacteriophage ski receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J. Dairy Sci.* 77, 1-6.
- van den Berg, G., de Vries, A.E. and Stadhouders, J. (1986). The salt content of Gouda cheese. *Voedingsmiddelentechnologie* 19 (7), 37-39 (cited from *Dairy Sci. Abstr.* 1988; 50:210).
- Van den Berg, G., W. C. Meijer, E-M. Düsterhöft, and G. Smit. (2004). "Gouda and related cheeses." *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* 2, 103-140.
- Van den Berghe E., Skourtas G., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture, *Int. J. Food Microbiol.* 107, 138-147.
- van den Tempel, T. and Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaromyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danblu. *Int. Dairy J.* 10, 263-270.
- Van den Tempel, T., and M. Jakobsen. (2000). "The technological characteristics of *Debaromyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu." *International dairy journal* 10(4), 263-270.

- Van Hekken, D. L., Y. W. Park, and M. H. Tunick. (2013). "Effects of reducing fat content on the proteolytic and rheological properties of Cheddar-like caprine milk cheese." *Small Ruminant Research* 110(1), 46-51.
- Van Hooydonk, A.C.M., De Koster, P.G., Boerrigter, I.J., 1987. The renneting properties of heated milk. *Netherlands Milk Dairy J.* 41, 3–18.
- van Vliet, T. (1988). Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. *Colloid Polym. Sci.* 266, 518-524.
- van Vliet, T. (1999). Factors determining small-deformation behaviour of gels, in, *Food Emulsions and Foams: Interfaces*,
- van Vliet, T. and Dentener-Kikkert, A. (1982). Influence of the composition of the milk fat globule membrane on the rheological properties of acid milk gels. *Neth. Milk Dairy J.* 36, 261-265.
- van Vliet, T. and Keetels, C.J.A.M. (1995). Effect of preheating of milk on the structure of acidified milk gels. *Neth. Milk Dairy J.* 49, 27-35.
- van Vliet, T. and Walstra, P. (1994). Water in casein gels; how to get it out or keep it in. *J. Food Eng.* 22, 75-88.
- van Vliet, T., Lucey, J.A., Grolle, K. and Walstra, R (1997). Rearrangements in acid-induced casein gels during and after gel formation, in, *Food Colloids: Proteins, Lipids and Polysaccharides*, E. Dickinson and B. Bergenstahl, eds, Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 335-345.
- van Vliet, T., van Dijk, H.J.M., Zoon, P. and Walstra, R (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid Polym. Sci.* 269, 620-627.
- Van Wey, A. S., A. L. Cookson, N. C. Roy, W. C. McNabb, T. K. Soboleva, R. J. Wieliczko, and P. R. Shorten. (2014). "A mathematical model of the effect of pH and food matrix composition on fluid transport into foods: An application in gastric digestion and cheese brining." *Food Research International* 57, 34-43.
- Vandenbergh, Els, Svetlana Choucharina, Bart De Ketelaere, Josse De Baerdemaeker, and Johan Claes. (2014). "Spatial variability in fundamental material parameters of Gouda cheese." *Journal of Food Engineering* 131, 50-57.
- Veerapandian, B., Cooper, J.B., Sali, A. and Blundell, T.L. (1990). X-ray analyses of aspartic proteinases. III. Threedimensional structure of endothiapepsin complexed with a transition-state isostere inhibitor of renin at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 216, 1017-1029.
- Velez-Ruiz, J.E and Barbosa Canovas, G.V. (1997). Rheological properties of selected dairy products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 311-359.
- Vera Pingitore, Esteban, Svetoslav Dimitrov Todorov, Fernando Sesma, and Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco. (2012). "Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese." *Food microbiology* 32(1), 38-47.
- Villegas, Josefina M., Gianluca Picariello, Gianfranco Mamone, Maria Beatriz Espeche Turbay, Graciela Savoy de Giori, and Elvira Maria Hebert. (2014). "Milk-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581." *Peptidomics* 1(1).
- Visciano, Pierina, Francesco Pomilio, Rosanna Tofalo, Lorena Sacchini, Maria Antonietta Saletti, Elga Tieri, Maria Schirone, and Giovanna Suzzi. (2014) "Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms." *Food Control* 46(1), 532-538.

- Visser, EM.W. and de Groot-Mostert, A.E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Neth. Milk Dairy J.* 31, 247-264.
- Visser, J. (1991). Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. *Rheological and Fracture Properties of Cheese*, Bulletin 268. International Dairy Federation, Brussels. pp. 49-61.
- Voigt, Daniela D., François Chevalier, Michael C. Qian, and Alan L. Kelly. (2010). "Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(1), 68-77.
- Voigt, Daniela D., Margaret F. Patterson, Mark Linton, and Alan L. Kelly. (2011). "Effect of high-pressure treatment of milk prior to manufacture on ripening of Camembert cheese." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12(1), 1-5.
- Waldron, D.S. (1997). *Effect of Lactose Concentration on the Quality of Cheddar Cheese*. MSc Thesis, National University of Ireland, University College, Cork.
- Walstra, P. (1993). The syneresis of curd, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Vol. I, General Aspects*, 2nd edn, P.E Fox, ed., Chapman & Hall, London. pp. 141-191.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2010). *Dairy science and technology*. CRC press.
- Walstra, Pieter, Pieter Walstra, Jan TM Wouters, and Tom J. Geurts. (2010). *Dairy science and technology*. CRC press.
- Walter, H. E., & Hargrove, R. C. (1972). *Cheeses of the World*.
- Weiss, M.E. and Bibby, B.G. (1966). Effects of milk on enamel solubility. *Arch. Oral Biol.* 11, 49-57.
- Welshagen, J.J. and Vijoën, B.C. (1999). The isolation and identification of yeasts obtained during the maturation and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiol.* 16, 63-73.
- Whitehead, H.R. and Cox, G.A. (1935). The occurrence of bacteriophages in starter cultures of lactic streptococci. *NZ J. Sci. Technol.* 16, 319-320.
- Whitehead, W.E., Ayres, J.W. and Sandine, W.E. (1993). A review of starter media for cheesemaking. *J. Dairy Sci.* 93, 2344-2353.
- WHO. (2007). Reducing salt intake in populations. Report of a World Health Organization forum and technical meeting. 5e7 October 2006, Paris, France. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/reducingsalt/en/index.html>.
- Whorlow, R.W. (1992). *Rheological Techniques*. Ellis Horwood, Chichester, England.
- Wiking, Lars, Jan Stagsted, Lennart Björck, and Jacob H. Nielsen. (2004). "Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows." *International dairy journal* 14(10),909-913.
- Williams, A.G. and Banks, J.M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *Int. Dairy J.* 7, 763-774.
- Williams, A.G., Withers, S.E. and Banks, J.M. (2000). Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 10, 17-23.
- Wilson, G.G. and Murray, N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Ann. Rev. Genet.* 25,585-627
- Wolf, Irma V., María C. Perotti, and Carlos A. Zalazar. (2011). "Composition and volatile profiles of commercial Argentinean blue cheeses." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(2), 385-393.



- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91-109.
- Wyder, M.-T. and Puhán, Z. (1999). Investigation of the yeast flora in smear ripened cheeses. *Milchwissenschaft* 54, 330-333.
- Yamada, T. and Ogrydziak, D.M. (1983). Extracellular acid proteases produced by *Saccharomyces lipolytica*. *J. Bacteriol.* 154, 23-31.
- Yanai Y, Rosen B, Pinsky A and Sklan D (1977) The microbiology of pickled cheese during manufacture and maturation. *Journal of Dairy Research* 44, 149–153.
- Yang Z., Suomalainen T., Mäyrä-Mäkinen A., Huttunen E. (1997). Antimicrobial activity of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid produced by lactic acid bacteria, *J. Food Prot.* 60 (1997): 786–790.
- Yasar, Kurban, and Nuray Guzeler. (2011). "Effects of coagulant type on the physicochemical and organoleptic properties of Kashar cheese." *International Journal of Dairy Technology* 64(3), 372-379.
- Yorgun, M.S., Balcioglu, I.A., Saygin, O., 2008. Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. *Desalination* 229 (1e3), 204-216.
- Yvon, M. and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11, 185-201.
- Zamora, Anna, Victoria Ferragut, Joan Miquel Quevedo, Buenaventura Guamis, and Antonio-José Trujillo. "Ultra-high pressure homogenisation of milk: technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese." *Journal of Dairy Research* 79, no. 02 (2012): 168-175.
- Zhang, D. and Mahoney, A.W. (1990). Effect of iron fortification on Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 73, 2252-2258.
- Zhang, D. and Mahoney, A.W. (1991). Iron fortification of process Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 74, 353-358.
- Zoon, P., van Vliet, T. and Walstra, P. (1989). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 4. The effect of pH and NaCl. *Neth. Milk Dairy J.* 43, 17-34.

# BIODATA PENULIS



**Basuni Hamzah** merupakan Guru Besar di program studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya. Ia memperoleh gelar insinyur dari Institut Pertanian Bogor dan merampungkan pendidikan S2 dan S3 dari University of Kentucky, USA. Bidang keahlian yang ditekuni ialah kimia pangan, mikrobiologi, dan teknologi pengolahan susu.

**Agus Wijaya** merampungkan pendidikan S1 dari Universitas Sriwijaya, kemudian Ia melanjutkan Pendidikan S2 di Universitas Gadjah Mada dan S3 di Karlsruhe Institut fuer Technologie (Germany). Saat ini Ia merupakan dosen aktif di program studi Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Sriwijaya. Bidang keahlian yang ditekuni ialah mikrobiologi pangan dan bioteknologi.



**Tri Wardani Widowati** menempuh pendidikan Sarjana dan Magister dari Universitas Gadjah Mada serta menyelesaikan pendidikan Doktor di Universitas Sriwijaya. Ia merupakan dosen senior program studi Teknologi Hasil Pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya sejak tahun 1992. Bidang keahlian yang ditekuni adalah mikrobiologi pangan dan hasil pertanian.