

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Zorana N. Miloradović

Karakteristike belih sireva u salamuri
proizvedenih od kozjeg mleka tretiranog
različitim termičkim tretmanima

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Zorana N. Miloradović

Characteristics of white brined cheeses made
from goat milk subjected to different heat
treatments

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mentor:

Dr Ognjen Maćej, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

Dr Snežana Jovanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Spasenija Milanović, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Dr Miroljub Barać, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Nikola Tomić, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Izražavam veliku zahvalnost svom mentoru prof. dr Ognjenu Maćeju na svemu, a posebno na tome što je verovao u moje sposobnosti, i poštovao moj rad.

Zahvaljujem se takođe svim članovima komisije na korisnim sugestijama i savetima.

Posebnu zahvalnost dugujem dipl. inž. Nemanji Kljajeviću, na nesebičnoj pomoći u svim segmentima izrade ove disertacije, i velikoj podršci kad god je to bilo potrebno.

Zahvaljujem se svim studentima master studija koji su učestvovali u pojedinim delovima eksperimenta.

Veliko hvala svim kolegama sa Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda koji su na brojne načine uticali na to da rad na ovoj doktorskoj disertaciji bude lakši i lepši.

Zahvalnost dugujem i kompaniji „Beocapra“ na donaciji mleka.

Finansijsku podršku u izradi eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije pružilo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, preko projekta III 46009, na čemu sam takođe vrlo zahvalna.

KARAKTERISTIKE BELIH SIREVA U SALAMURI PROIZVEDENIH OD KOZJEG MLEKA
TRETIRANOG RAZLIČITIM TERMIČKIM TRETMANIMA

Doktorska disertacija

Zorana N. Miloradović, dipl. inž. tehn.

REZIME

Proizvodnja i prerada kozjeg mleka je dinamična grana mlekarske industrije koja je u usponu i igra važnu ulogu u ekonomskom razvoju mnogih zemalja. Poslednjih godina na tržištu mlečnih proizvoda širom sveta, kozji mlečni proizvodi se nalaze u žiži interesovanja.

Termički tretmani su deo postupka proizvodnje velikog broja mlečnih proizvoda, a imaju za cilj poboljšanje pojedinih karakteristika proizvoda, podizanje nivoa njihove bezbednosti, kao i produženje roka trajanja. Proteini mleka podvrgnutog termičkom tretmanu menjaju svoje funkcionalne osobine što nalazi široku primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Za razliku od kravljeg mleka koje nakon visokih termičkih tretmana menja svoje tehnološke karakteristike, što otežava proces proizvodnje i dovodi do stvaranja sira lošijeg kvaliteta, za kozje mleko postoje naznake u literaturi, da se nakon termičkog tretmana koagulacija neometano odvija, što ukazuje na potencijalnu mogućnost dobijanja sira sa uvećanim randmanom i nutritivnom vrednošću.

Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnost proizvodnje kozjih belih sireva u salamuri dobijenih od mleka tretiranog režimima termičke obrade: 80°C/5 min i 90°C/5 min, bez prilagođavanja faktora proizvodnje u odnosu na kontrolnu varijantu proizvedenu od mleka tretiranog klasičnim postupkom niske pasterizacije (65°C/30 min), kao i da se ispitaju karakteristike ovako dobijenih sireva.

Navedeni cilj sproveden je kroz tri faze. Ispitivan je uticaj termičkih tretmana kozjeg mleka na (1) intenzitet promena na proteinima punomasnog i obranog kozjeg mleka, kako bi se dobila jasnija slika o sirovini koja se koristi za proizvodnju sireva; (2) enzimsku koagulaciju kroz određivanje parametara koagulacije (3) tok

zrenja kozjih belih sireva u salamuri, po pitanju osnovnih fizičko-hemijskih parametara, proteolitičkih promena, kao i promena teksturalnih i senzornih svojstava.

Rezultati ovog rada pokazali su da primenom visokih termičkih tretmana prilikom obrade kozjeg mleka dolazi do značajnih promena na proteinima, u pogledu formiranja kovalentno vezanih agregata. Promene na proteinima mleka uslovile su pojavu značajnih razlika u vremenu i brzini koagulacije, kao i u čvrstoći dobijenog gruš. Usled sporije koagulacije došlo je do značajnog uvećanja randmana sireva, kao i do značajno većeg stepena iskorišćenja proteina mleka i mlečne masti. Između kontrolne i eksperimentalnih varijanti sireva postojale su značajne razlike u pogledu pH vrednosti, sadržaja vode u bezmasnoj materiji, odnosa proteina i masti u sirevima kao i u pogledu proteinskog sastava. Sve navedene razlike uslovile su izmenjeni tok zrenja u pogledu proteolitičkih i teksturalnih svojstava. Deskriptivnom senzornom analizom je utvrđeno odsustvo neželjenih ukusa u svim uzorcima sireva. Od strane potrošača ni jedan od uzoraka nije okarakterisan kao neprihvatljiv. Sir proizveden od mleka tretiranog na 90°C/ 5 min stručna komisija ocenila je odličnom ocenom u svim ispitivanim fazama zrenja. Ova varijanta sira i od strane potrošača dobila je najbolju ocenu za ukupnu prihvatljivost.

Imajući u vidu sve dobijene rezultate, može se zaključiti da je moguće proizvesti kozji beli sir u salamuri od mleka tretiranog režimima termičke obrade oštrijim od klasične niske pasterizacije, uz uvećanje randmana i nutritivne vrednosti. Na osnovu senzorne analize realno je očekivati da bi ovakav proizvod bio prihvaćen na tržištu.

Ključne reči: kozje mleko, beli sir u salamuri, obiranje, termički tretman, agregati serum proteina/ κ -kazeina, randman, reologija, proteoliza, tekstura, senzorna analiza

Naučna oblast: Prehrambena tehnologija

Uža naučna oblast: Nauka o mleku

UDK: 637.333:637.12`639 (043.3)

CHARACTERISTICS OF WHITE BRINED CHEESES MADE FROM GOAT MILK SUBJECTED TO DIFFERENT HEAT TREATMENTS

Doctoral Dissertation

Zorana N. Miloradović, M.Sci

ABSTRACT

Production and processing of goat's milk is a dynamic and growing industry that is becoming an important part of economy in many countries. In recent years, the dairy products market has been showing great interest in goat's milk products.

Heat treatment has been used in dairy processing to enhance desirable properties of the products, such as texture and taste, to ensure their safety and to prolong their shelf-life. Heat-treatment modifies functional properties of milk proteins and the procedure has been widely used in the food, cosmetics and pharmaceutical industries.

Heat-treatment at high temperatures causes significant changes in the technological characteristics of cow's milk; it has a negative effect on the cheese-making process and lowers the quality of cheese. However, when goat's milk is subjected to high-heat treatment, it appears that the coagulation process is not impeded; this offers a possibility to produce cheeses from high-heat-treated milk with increased nutritional value and with a higher production yield.

The object of this study was to investigate the feasibility of production of white brined goat's cheese from milk heated at 80°C/5min and 90°C/5min, following the same production method used for cheeses made from pasteurized milk (65°C/30min); the characteristics of those cheeses were also to be analyzed and evaluated.

The experiments were conducted in three phases: (1) in order to obtain a clearer picture of the raw materials used for cheese production, changes in the protein structure of whole and of skimmed goat's milk after high-heat treatments were analyzed; (2) the coagulation parameters of high-heat-treated milk during enzymatic coagulation were measured in order to estimate the effect of high-heat treatments on enzymatic coagulation; (3) the maturing process of white brined goat's cheeses produced from

high-heat-treated milk was analyzed as a function of basic physico-chemical parameters, of the proteolytic changes and of the changes in textural and sensory properties.

The results of this study have shown that the use of high-heat treatment of goat's milk leads to significant changes in protein structure in the formation of covalently-bonded aggregates. Changes in milk proteins have caused significant differences in coagulation time and coagulation rate, as well as in curd firmness. A slower coagulation rate has led to a significant rise in yield of cheese production, and has also increased the percentage of fat and protein recovery from milk. A comparison of the control cheese with the experimental cheeses has revealed significant differences in pH, in the level of moisture in non-fat solids content, in the protein-to-fat ratio of cheese, and also in the protein composition. Because of these differences changes to the proteolytic and textural properties of the maturing processes have occurred. Descriptive sensory analysis showed the absence of off-flavors in all cheese samples. Regarding consumer's preferences, not a single sample was characterized as unacceptable. Cheese produced from milk heated at 90°C/5min was graded as "excellent" in all tested stages of maturity; the same cheese received the best score for overall acceptability by the consumers.

Considering all of the results obtained, it could be concluded that it is possible to produce white brined cheese from goat's milk subjected to high-heat treatment more severe than the common low pasteurization, giving a higher production yield and an increased nutritional value. Good consumer's sensory assessment suggests that the product would be received favourably by the market.

Key words: goat milk, white brined cheese, skimming, heat treatment, whey protein/ κ -casein aggregates, cheese yield, rheology, proteolysis, texture, sensory analysis

Scientific field: Food Technology

Specific scientific field: Dairy Science

UDK: 637.333:637.12`639 (043.3)

SKRAĆENICE

α_{s1} -CN	α_{s1} -kazein
α_{s2} -CN	α_{s2} -kazein
β -CN	β -kazein
κ -CN	κ - kazein
$p\kappa$ -CN	<i>para</i> - κ - kazein
β -lg	β -laktoglobulin
α -la	α -laktalbumin
LF	laktoferin
SA	serum albumin
Ig-HC	teški lanac imunoglobulina
GMP	glikomakropeptid
CMP	kazeomakropeptid
SDS-PAGE	natrijumdodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza
SDS-R-PAGE	SDS-PAGE u redukujućim uslovima
SDS-NR-PAGE	SDS-PAGE u neredukujućim uslovima
β -ME	β -merkaptoetanol
AR	brzina agregiranja
CF	čvrstina gela
CT	vreme koagulacije
VuBM	voda u bezmasnoj materiji
MuSM	mast u suvoj materiji
P/M	odnos proteina (P) i masti (M)

Sadržaj:

1. <i>Uvod</i>	1
2. <i>Pregled literature</i>	5
2.1. Razlike u hemijskom sastavu kozjeg i kravljeg mleka	5
2.1.1. <i>Mlečna mast</i>	6
2.1.2. <i>Proteini</i>	7
2.1.3. <i>Mineralne materije</i>	9
2.2. Uticaj različitih termičkih tretmana na kozje i kravlje mleko	9
2.2.1 <i>Uticaj termičkog tretmana na proteine mleka</i>	10
2.2.2. <i>Denaturacija serum proteina</i>	10
2.2.3. <i>Sastav agregata nastalih termičkim tretmanom</i>	12
2.2.4. <i>Kovalentno vezivanje proteina unutar agregata (formiranje disulfidnih mostova)</i>	13
2.2.5. <i>Nekovalentne interakcije unutar agregata</i>	14
2.2.6. <i>Lokacija agregata β-laktoglobulin/κ-kazein u mleku</i>	15
2.2.7. <i>Kinetika formiranja agregata</i>	16
2.2.8. <i>Veličina i oblik agregata – uticaj na veličinu i oblik kazeinske micelle</i>	16
2.2.9. <i>Fizičko-hemijske osobine agregata</i>	17
2.2.10. <i>Uticaj određenih tehnoloških faktora na osobine agregata nastalih termičkim tretmanom</i>	18
2.2.11. <i>Uticaj termičkih tretmana na promene na membranama masnih globula</i>	19
2.2.12. <i>Koloidna stabilnost mleka</i>	20
2.3. Uticaj termičkih tretmana na sirišnu koagulaciju kravljeg i kozjeg mleka	22
2.4. Uticaj termičkih tretmana mleka na randman sireva	25
2.5. Uticaj termičkih tretmana na zrenje kozjih belih sireva u salamuri	28
2.5.1 <i>Proteolitičke promene tokom zrenja sireva</i>	28
2.5.2. <i>Promene svojstava teksture tokom zrenja sireva</i>	36
2.5.3. <i>Uticaj različitih faktora na ukus kozjih sireva</i>	40
3. <i>Ciljevi rada</i>	43
4. <i>Materijal i metode</i>	45
4.1. Efekat termičkog tretmana mleka i obiranja na formiranje taloga	45
4.1.1. <i>Analize osnovnih parametara kvaliteta sirovog mleka</i>	45
4.1.2. <i>Termički tretman</i>	45
4.1.3. <i>Obiranje</i>	46
4.1.4. <i>Određivanje masenog udela taloga</i>	46
4.1.5. <i>Analiza hemijskog sastava supernatanta dobijenih nakon termičkih tretmana i obiranja mleka</i>	46
4.1.6. <i>Priprema uzoraka taloga i supernatanta za SDS-PAGE</i>	46
4.1.7. <i>SDS-PAGE</i>	47
4.1.8. <i>Kvantifikacija proteina i nomenklatura</i>	47
4.1.9. <i>Statistička obrada podataka</i>	48
4.2. Efekat sadržaja masti na kovalentno ireverzibilno agregiranje proteina mleka	48
4.2.1 <i>Termički tretman i obiranje uzoraka</i>	48
4.2.2 <i>Priprema uzoraka, SDS-PAG elektroforeza i kvantifikacija proteina</i>	49
4.2.3. <i>Statistička obrada podataka</i>	49
4.3. Određivanje kontrolnog randmana u slučaju punomasnog i obranog termički tretiranog kozjeg mleka	49

4.3.1. Određivanje kontrolnog randmana.....	49
4.3.2. Određivanje sadržaja suve materije u koagulumu.....	50
4.3.3. Statistička obrada podataka	50
4.4. Proizvodnja kozjeg belog sira u salamuri	51
4.4.1. Proces proizvodnje.....	51
4.4.2. Parametri koagulacije kozjeg mleka i randman sireva.....	52
4.4.3. Hemijski sastav i sastav proteina surutke	54
4.5. Zrenje kozjih belih sireva u salamuri.....	55
4.5.1. Promene osnovnih parametara kvaliteta sireva tokom zrenja.....	56
4.5.2. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva	56
4.5.3. Promena teksturalnih svojstava tokom zrenja sireva.....	58
4.5.4. Senzorna analiza sireva	59
5. Rezultati i diskusija.....	68
5.1. Efekat termičkog tretmana i intenziteta centrifugalne sile pri obiranju kozjeg i kravljeg mleka na formiranje taloga.....	68
5.1.1. Osnovni parametri kvaliteta sirovog kravljeg i kozjeg mleka	69
5.1.2. Maseni udeo taloga	70
5.1.3. Sadržaj proteina i masti u supernatantu	72
5.1.5. SDS-PAGE analiza taloga.....	75
5.2. Efekat sadržaja masti na kovalentno ireverzibilno agregiranje proteina kravljeg i kozjeg mleka.....	77
5.3. Uvećanje randmana sireva od punomasnog i obranog kozjeg mleka primenom različitih termičkih tretmana.....	83
5.4. Izrada sireva	86
5.4.1. Efekat termičkih tretmana na parametre koagulacije kozjeg mleka.....	87
5.4.2. Efekat termičkih tretmana na randman kozjih sireva.....	89
5.4.3. Efekat termičkih tretmana na parametre kvaliteta i sastav proteina surutke	91
5.5. Zrenje sireva.....	96
5.5.1. Promene osnovnih parametara kvaliteta sireva tokom zrenja.....	97
5.5.2. Efekat termičkih tretmana na proteolitičke promene tokom zrenja sireva	102
5.5.3. Promena teksturalnih svojstava tokom zrenja sireva.....	108
5.5.4. Senzorna analiza sireva	111
6. Zaključci	127
7. Literatura:.....	134

1. Uvod

Gajenje koza započelo je pre oko 10 000 godina na planinama Irana. Koze su među prvim životinjama bile pripitomljene (Haenlein, 2007). Ono što ih čini toliko jedinstvenim je njihova sposobnost da proizvedu hranu visokog kvaliteta kao što je mleko, čak i u ekstremno nepovoljnim životnim uslovima (Silanikove et al., 2010)

Proizvodnja i prerada kozjeg mleka posebno je zastupljena u regionu Mediterana i Srednjeg istoka (FAO, 2003), a izuzetno je dobro organizovana u Francuskoj i Italiji, gde se prerađuje u sir koji je visoko kotiran na tržištu. Uzgajanje koza je takođe tradicija i u zemljama kao što je Španija, Grčka, Turska i Maroko (Park et al., 2007). U nerazvijenim zemljama, uglavnom u Aziji, kozje mleko se konzumira u svežem, a manje u prerađenom stanju, dok se u zapadnim zemljama većina kozjeg mleka koristi za preradu. Najpopularniji proizvodi od kozjeg mleka su sirevi (Božanić et al., 2002).

Iako kozje mleko čini svega 2% ukupne svetske proizvodnje, sve se više ističu njegove prednosti (Božanić et al., 2002). U poređenju sa ostalim domaćim životinjama, poslednjih decenija (od 1980. godine) je zabeležen najveći porast populacije koza. Kada je u pitanju proizvodnja mleka, kozje mleko beleži najveći porast poslednjih par decenija (Božanić et al., 2002, Haenlein, 2004, Morand-Fehr et al., 2004). Ovakav trend javlja se u najvećoj meri u zemljama u razvoju (Boyazoglu et al., 2005). Vrlo je verovatno da je gajenje koza i proizvodnja kozjeg mleka još rasprostranjenija nego što to statistike pokazuju, obzirom na to da se ove životinje u značajnom broju gaje u stadima koja nisu registrovana, a proizvodnja i prerada mleka vrši se za domaće potrebe (Haenlein, 2004).

Postoje tri glavna razloga zbog kojih raste potražnja za kozjim mlekom. Prvi razlog je njegova potrošnja u domaćinstvima, koja se neprestano povećava zbog rasta ljudske populacije. Koza je glavni snabdevač ruralnog stanovništva proizvodima od mleka i mesa. Stara izreka koja kaže da je koza „krava siromaha” važi i danas. Drugi razlog za potražnjom kozjeg mleka proizilazi iz toga što usled alergijskih reakcija na kravlje mleko, koje su sve učestalije, ljudi se opredeljuju za kozje mleko koje je u

ovom pogledu znatno prihvatljivije. Treći aspekt je uvećanje broja kulinarskih specijaliteta koji se dobijaju od kozjeg mleka. Neke zemlje, poput Francuske, imaju veoma razvijenu tehnologiju prerade kozjeg mleka. Shodno tome u ovim zemljama se dosta ulaže u marketing kozjih mlečnih proizvoda, čime je stvoren širok krug potrošača veoma zainteresovanih za kupovinu i konzumiranje u prvom redu ekskluzivnih kozjih sireva (Haenlein, 2004). Proizvodnja i prerada kozjeg mleka u industrijskim uslovima je dosta otežana sezonskim karakterom individualne proizvodnje kao i niskim prinosom (Park et al., 2007). Jedan od razloga je takođe i oskudni podaci o biohemijskim i mikrobiološkim karakteristikama kozjeg mleka, koje su osnov za optimizaciju i kontrolu postupka proizvodnje sireva (Bontinis et al., 2012). Informacije koje se tiču sastava i fizičko-hemijskih karakteristika kozjeg mleka su od esencijalnog značaja kako za uspešan razvoj industrijske proizvodnje i prerade kozjeg mleka tako i za plasiranje ovih proizvoda na tržištu (Park et al., 2007).

U mnogim zemljama potrošači ne prihvataju specifičan ukus kozjeg mleka, jogurta ili sireva, što je još jedan razlog izostanka interesovanja proizvođača za mlečne poroizvode ove vrste. Međutim svakako postoji način da se uz primenu znanja o specifičnostima kozjeg mleka karakterističan ukus ublaži ili prilagodi odgovarajućem proizvodu (Morand-Fehr et al., 2004).

Postoji daleko manje naučnih studija koje se bave kozjim mlekom u odnosu na one čiji je predmet proučavanja kravlje pa čak i ovčije mleko (Dubeuf et al., 2004, Raynal-Ljutovac et al., 2007). Mnogi razlozi ukazuju na to da rezultati istraživanja koja se odnose na kravlje mleko ne mogu jednostavno da se primene na kozje mleko (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Pojačano interesovanje potrošača za kozje mleko i proizvode od mleka ukazuje na potrebu da se i sa naučne strane fokus usmeri na proučavanje kozjeg mleka, kako bi se dostigao nivo naučnih rezultata koji već postoje a odnose se na kravlje mleko (Morand-Fehr et al., 2004, Boyazoglu et al., 2005). Svakako, primena dobijenih rezultata u praksi ključni je korak u pravcu razvoja ove zapostavljene grane mlekarstva (Boyazoglu et al., 2005).

Prvi sirevi od kozjeg mleka proizvedeni su u Mesopotamiji. Pretpostavlja se da su u početku pravljeni meki sirevi, a zatim tvrdi, odnosno zreli sirevi. Iz centralnih

delova Bliskog istoka proizvodnja kozjih sireva se proširila u oblasti Mediterana – Grčkoj, Turskoj, Siriji, Izraelu. Mnoge od ovih zemalja su postale veliki proizvođači i potrošači brojnih vrsta kozjih sireva. Zahvaljujući Feta siru, koji se pravi od kozjeg i ovčijeg mleka, i koji je širom sveta poznat i konzumiran, Grčka se smatra jednim od najvećih proizvođača kozjih sireva (Park, 2001). Na prvom mestu nalazi se Francuska, gde se godišnje proizvede 68 000 tona kozjeg sira. Asortiman obuhvata više od 90 različitih varijeteta, od kojih je značajan broj onih koji se proizvode na tradicionalan način u domaćinstvima, prema originalnim recepturama. Uglavnom su to različite vrste autohtonih kozjih sireva karakterističnih za pojedina područja (Božanić et al., 2002).

Kozji sirevi postepeno stiču popularnost među ljubiteljima mlečnih proizvoda i širom sveta. Postoji široka paleta kozjih sireva koji se proizvode u zanatskim uslovima, dok postoji manji broj varijeteta koji se proizvode industrijski (Bontinis et al., 2012). Na popularnost kozjih sireva pozitivno utiču mnogi savremeni trendovi kao što su: povratak prirodi i zdravom životu, popularizacija autentičnih proizvoda specifičnog geografskog porekla, sve veće interesovanje za seoski turizam kao i navika žitelja Evrope da svoje godišnje odmore provode u nekoj od zemalja Mediterana gde su kozji sirevi široko rasprostranjeni (Morand-Fehr et al., 2004).

Kada se govori o što efikasnijem razvoju sektora proizvodnje i prerade kozjeg mleka, inicijativa je usmerena, između ostalog, ka proizvodnji sireva koji bi bili visokog kvaliteta, samim tim bi imali visoku cenu a bili bi prodavani urbanim potrošačima, uz veliku zaradu (Dubeuf et al., 2004). Kozji sirevi stoga moraju da odgovore na velike izazove, u smislu kvaliteta i dostupnosti, obzirom da im na tržištu konkurenciju čine kravljji sirevi sa svojom visoko standardizovanom proizvodnjom i ukusom na koji su potrošači navikli (Morand-Fehr et al., 2004). Međutim, izrazita posebnost kozjih sireva sve više se smatra prilikom za njihovu konkurentnost na tržištu koje se nalazi u uslovima sve veće globalizacije (Faccia et al., 2012).

Način proizvodnje i osobine sireva određeni su karakteristikama prostora sa kog potiču, prvenstveno klimom i reljefom (Alichanidis i Polychroniadou, 2008). U

našoj zemlji, zahvaljujući brdsko-planinskim područjima, postoji veliki potencijal za razvoj kozarske proizvodnje, pri čemu značajno mesto zauzima proizvodnja belih kozjih sireva koji sazrevaju u salamuri (Niketić et al., 2006). Ipak, u sadašnjim uslovima, proizvodnja kozih sirevima je ograničena a realizacija na tržištu skromna (Dozet et al., 2004).

U Srbiji su beli sirevi u salamuri najzastupljenija vrsta sireva što se tiče proizvodnje i konzumiranja (~ 60%). Uobičajeno je da se proizvode se od kravljeg, ovčijeg ili kozjeg mleka, mada se danas uglavnom proizvode od kravljeg mleka, dok kozji i ovčiji beli sirevi u salamuri čine svega nešto više od 1% ukupno proizvedenih sireva ove vrste. Trenutno se kod nas beli sirevi proizvode kako u domaćinstvima tako i u industriji. Tradicionalna proizvodnja podrazumeva uglavnom sirovo mleko i odsustvo starter kultura, nasuprot industrijskoj proizvodnji gde su odgovarajući termički tretman i dodatak startera obavezni (Radulović et al., 2011).

2. Pregled literature

2.1. Razlike u hemijskom sastavu kozjeg i kravljeg mleka

Podaci o razlikama u fizičko-hemijskim svojstvima kozjeg i kravljeg mleka su od esencijalnog značaja za uspešan razvoj grane mlekarske industrije koja se bavi preradom kozjeg mleka.

Kozje mleko se razlikuje od kravljeg po boljoj svarljivosti, izraženijoj alkalnosti, većem pufernom kapacitetu, a sa medicinskog i nutritivnog aspekta ono pokazuje određena terapijska svojstva (Park et al., 2007).

Tabela 1. Hemijski sastav i osobine kozjeg i kravljeg mleka (Božanić et al., 2002)

Parametar	Kozje mleko	Kravlje mleko
Suva materija (%)	11,94	12,89
Proteini (%)	3,1	3,38
Mlečna mast (%)	3,6	4,1
Laktoza (%)	4,6	4,6
Pepeo (%)	0,84	0,79
pH	6,74	6,68
Titraciona kiselost (°SH)	6,8	6,7
Slobodne masne kiseline (mg/l)	8,1	7,5
Holesterol (mg/100g)	10	13
Energetska vrednost (kJ/100g)	288	284

Hemijski sastav kozjeg i kravljeg mleka vrlo je sličan. Sastav kozjeg mleka se menja u zavisnosti od rase i genotipa koza, zatim od stadijuma laktacije i od godišnjeg doba. Dužina laktacije takođe je varijabilna, od 150 do 300 dana, a kod mlečnih rasa 210 do 300 dana. Tokom laktacije udeo masti i proteina visok je u kolostrumu i mleku početkom laktacije, dosta niži sredinom laktacije i ponovo se povećava krajem laktacije kada se količina mleka smanjuje (Božanić et al., 2002).

Uporedni hemijski sastav kozjeg i kravljeg mleka dat je u Tabeli 1.

2.1.1. Mlečna mast

Dve ključne razlike u karakteristikama mlečne masti kozjeg i kravljeg mleka uslovljavaju razlike i u karakteristikama mlečnih proizvoda. Prva razlika je veličina masnih globula. Naime, masne globule obe vrste imaju prosečan dijametar u opsegu od 1 – 10 μm , međutim, broj masnih globula manjih od 5 μm je u slučaju kravljeg mleka $\approx 60\%$ dok je u slučaju kozjeg mleka $\approx 80\%$. Ova razlika uslovljava mekšu teksturu kozjih mlečnih proizvoda. Druga razlika je hemijski sastav mlečne masti. Mlečna mast kozjeg mleka ima veći udeo masnih kiselina srednjeg lanca: kapronske (C6:0), kaprilne (C8:0) i kaprinske (C10:0), od kojih potiče karakterističan „kozji“ ukus (Silanikove et al., 2010). Struktura i sastav membrana masnih globula je slična kod kozjeg i kravljeg mleka, i predstavlja oko 1% zapremine ukupne mlečne masti (Park et al., 2007).

Zbog povećane relativne površine masnih globula varenje kozjeg mleka traje vremenski kraće za 20%. Boljoj svarljivosti mlečne masti kozjeg mleka doprinosi i udeo od 35% masnih kiselina kratkog i srednjeg lanca (C6-C14) koje lipaza brže hidrolizuje i koje se jednostavnijim mehanizmom apsorbuju u odnosu na masne kiseline dugog lanca. Određenu količinu kozjeg mleka čovek svari za 40 minuta dok je za varenje iste količine kravljeg mleka potrebno 2,5 sata (Antunac et al., 2000).

Zbog manjih masnih globula, vreme potrebno za separaciju mlečne masti kozjeg mleka je dosta duže što je tehnološki značajno. Obiranje masti u kravljem mleku kraće traje, zbog aglutinacije uzrokovane nakupljanjem masnih globula, koje kod kozjeg mleka praktično nema (Božanić et al., 2002).

Savremena literatura oskudeva podacima koji se tiču separacije mlečne masti kozjeg mleka. Kao objašnjenje se navodi činjenica da se ni sladoled ni maslac od kozjeg mleka ne proizvodi nigde u svetu u značajnim količinama (Park i Guo, 2006). Međutim, značajne sezonske varijacije sastava kozjeg mleka mogle bi se ublažiti, a proizvodnja sira ujednačenog sastava osigurati, ukoliko bi bila na raspolaganju mlečna mast i nemasni mlečni prah od kozjeg mleka, (Božanić et al., 2002).

2.1.2. Proteini

Struktura kazeinske micelle kozjeg i kravljeg mleka se razlikuje u prosečnom prečniku, hidrataciji i mineralizaciji. Prečnik micelle kozjeg mleka je veći kao i raspodela veličine (Montilla et al., 1995). Micele kozjeg kazeina sadrže više kalcijuma, neorganskog fosfora i kazeina rastvorljivog u serumu (serumskog kazeina) (Park et al., 2007). Po definiciji, serumski kazein je kazein koji ostaje u supernatantu nakon precipitacije kazeinskih micela ultracentrifugiranjem (45 000 g/45 min) (Fairise et al., 1999). Koloidni i serumski kazein su u ravnoteži koja zavisi od pH vrednosti i temperature. Snižavanjem temperature i pH, raste sadržaj serumskog kazeina, i obrnuto (Hallen, 2008).

Kozje mleko sadrži manje α_s kazeina nego kravlje, često sadrži više α_{s2} nego α_{s1} kazeina, što čini da je u ovakvim slučajevima α_{s2} dominantna frakcija α_s -kazeina, koji sa sobom nosi svoja specifična tehnološka i funkcionalna svojstva (Haenlein, 2004). Primera radi, utvrđeno je da kravlji α_{s2} – CN putem disulfidnih mostova u sirovom mleku gradi veoma termostabilne dimere, koji se nalaze u unutrašnjem delu kazeinske micelle, i nemaju tendenciju niti da disosuju na monomere, niti da se disulfidno povezuju sa drugim proteinima prilikom termičkih tretmana nižih od 100°C (Rasmussen et al., 1994, Patel, 2007). Udeo α_{s1} kazeina kozjeg mleka značajno varira u odnosu na individualne jединke. Kozje mleko karakteriše velika genetska varijabilnost zahvaljujući uglavnom α_{s1} -CN koji je do sad identifikovan u 10 varijanti. Pored ovog proteina genetski polimorfizam sreće se i kod β -lg, κ -CN i β -CN i utiče na čvrstoću i viskoznost jogurta, sinerezis nakon enzimske koagulacije, termičku stabilnost, kao i pH vrednost mleka (Božanić et al., 2002).

Niske temperature skladištenja imaju uticaj na micelarni sistem mleka. Hlađenje vodi parcijalnom rastvaranju koloidnog kalcijum fosfata i β -CN. Ove promene utiču na smanjenje randmana sira proizvedenog od hlađenog mleka. β -CN kozjeg mleka je podložniji rastvaranju tokom hlađenja nego β -CN kravljeg mleka (Park et al., 2007). Bitno je ove podatke imati u vidu obzirom na to da je β -CN dominantna kazeinska frakcija kozjeg mleka (Božanić et al., 2002). Za razliku od kravljeg β -CN-a koji je sačinjen od 209 aminokiselinskih ostataka, β -CN kozjeg mleka sadrži 207

ostataka aminokiselina. Dve kiseline koje nedostaju kozjem β -CN-u su vezane u dipeptid: Pro₁₇₉-Tyr₁₈₀ (Trujillo et al., 1995).

Kravlji κ -CN je rastvorljiv u prisustvu kalcijuma u mleku. Zahvaljujući posedovanju dva cisteinska ostatka (Cys₁₁ i Cys₈₈), u sirovom mleku delimično se nalazi u obliku velikih sfernih polimera u rasponu od dimera do dekamera (Rasmussen et al., 1992, Panouillé et al., 2004). Udeo κ -kazeina u kravljem mleku je $\approx 12\%$. On stabilizuje oko 10 puta veću masu ostalih kazeinskih frakcija koje su osetljive na prisustvo kalcijuma. Micela je organizovana tako da se njeno jezgro sastoji od elektroforetskih frakcija osetljivih na prisustvo kalcijuma, dok se na površini nalazi κ -CN. Ovaj model analogan je stabilizaciji lipida emulgujućim supstancama. Hidroliza κ -CN himozinom i reakcija sulfidril-disulfidne izmene sa β -lg pod uticajem termičkog tretmana mleka potvrđuje ovakav model organizacije micela. Međutim određeni literaturni podaci idu u prilog teoriji da su micela dovoljno porozne da veliki molekuli mogu slobodno da difunduju kroz nju. Otežana koagulacija mleka imobilizovanim sirilom ukazuje na to da κ -CN nije dostupan u velikoj meri. Činjenica da super-polimerizovane aminopeptidaze, koje obzirom na svoju veličinu ne mogu da difunduju unutar micela, oslobađaju N-terminalne aminokiselinske ostatke sve četiri kazeinske frakcije, potvrđuje teoriju da površina micela nije prekrivena isključivo κ -CN, već sadrži i određeni udeo ostale tri kazeinske frakcije (Fox i Brodtkorb, 2008). Pretpostavlja se da i β -CN doprinosi stabilizaciji kazeinske micela, posebno na nižim temperaturama (de Kruif, 1999). Prilikom hladnog skladištenja mleka, do 50% β -CN, koji je najhidrofobniji od sve četiri frakcije, disosuje reverzibilno iz micela. Ova pojava je pokazatelj važnosti hidrofobnih interakcija i potvrda teorije da je kazeinska micela dovoljno porozna da omogućuje β -CN da difunduje iz micela u serum. (Fox i Brodtkorb, 2008).

Kozje mleko sadrži 0,18-0,28% β -lg i 0,06-0,11% α -la. Sadržaj β -lg je veći, a α -la manji u odnosu na kravlje mleko. Udeo serum albumina i neproteinskog azota (NPN) u kozjem mleku je viši u odnosu na kravlje mleko (Antunac et al., 2000).

Pored koloidnog kalcijum fosfata (CCP) koji igra bitnu ulogu u integraciji kazeinske micela, činjenica da se micela mogu dispergovati ureom, SDS-om, etanolom (>35%, >70°C), podizanjem pH vrednosti mleka, ukazuje da u integraciji kazeinske micela

učestvuju takođe i vodonične veze, hidrofobne i elektrostatičke interakcije (Fox i Brodkorb, 2008).

Oko 30% kozjeg kazeomakropeptida (CMP) je glikozilovano, dok je 60% kravljeg CMP glikozilovano (Park et al., 2007).

Količina ukupnih amino-kiselina podjednaka je u oba mleka. Postoje izvesne razlike u aminokiselinskom sastavu, ali ključna razlika je u tome što su proteini kozjeg mleka svarljiviji od proteina kravljeg mleka, što čini da je apsorpcija aminokiselina efikasnija. Iako je biološka vrednost ova dva mleka približno jednaka ipak analiza amino-kiselina pokazuje nešto veću količinu slobodnih amino-kiselina u kozjem mleku, a posebno slobodnih esencijalnih amino-kiselina (Božanić et al., 2002).

2.1.3. Mineralne materije

Sadržaj mineralnih materija je viši u kozjem nego u kravljem mleku, pogotovu sadržaj kalijuma i hlorida, zbog čega je ukus kozjeg mleka blago slan. Slanost je posebno izražena krajem laktacije. Sadržaj kalcijuma, fosfora, i magnezijuma je takođe viši u kozjem mleku, dok je sadržaj natrijuma i sumpora niži u odnosu na kravlje mleko (Park et al., 2007). Kozje mleko sadrži oko 40% manje citrata u odnosu na kravlje, a bolji je izvor biorazgradivog gvožđa (Božanić et al., 2002).

2.2. Uticaj različitih termičkih tretmana na kozje i kravlje mleko

Termička obrada je najznačajnija operacija u obradi i preradi mleka, i sastavni je deo tehnološkog procesa proizvodnje svakog mlečnog proizvoda. Termički tretman se u mlekarstvu upotrebljava prvenstveno da bi se omogućila bezbednost proizvoda i duži rok trajanja (Oldfield et al., 2000, Donato i Guyomarc'h, 2009). Dejstvom visokih temperatura dolazi do eliminacije mikroflora sirovog mleka, do redukcije ili stimulacije aktivnosti mnogih nativnih enzima mleka kao što su plazmin/plazminogen kompleks, lipaze ili alkalne fosfataze (Buffa et al., 2001). Mleko podvrgnuto termičkom tretmanu menja svoja funkcionalna i tehnološka svojstva što nalazi široku primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

(Oldfield et al., 2000, Donato i Guyomarc'h, 2009). Pod dejstvom termičkih tretmana dolazi do ekspozicije -SH grupa što uslovljava porast antioksidativnih svojstava mleka (Raynal-Ljutovac et al., 2007).

2.2.1 Uticaj termičkog tretmana na proteine mleka

Termički tretmani u najvećoj meri utiču na serum proteine, u prvom redu β -lg i α -la. Usled dejstva visokih temperatura reaktivne tiolne grupe jednih proteina formiraju disulfidne mostove sa reaktivnim tiolnim grupama drugih proteina. Takođe, dolazi i do reakcije tiol-disulfidne izmene. Ova reakcija čini proces denaturacije proteina ireverzibilnim (Vasbinder i de Kruif, 2003). Najvažnija posledica termičkih tretmana je formiranje agregata denaturisanih serum proteina sa kazeinskom micelom ili formiranje rastvorljivih asocijata serum proteina (Vasbinder, 2002). Termin „asocijacija proteina” se odnosi na promene koje se dešavaju na molekulskom nivou (npr. nastanak dimera). Suprotno od asocijacije, termini: agregacija, polimerizacija, precipitacija, koagulacija se odnose na nespecifične protein-protein interakcije, što rezultira formiranjem agregata veće molekulske mase (Patel, 2007).

U slučaju kravljeg mleka, inkorporiranje serum proteina u sir nije uvek ekonomski opravdano, obzirom da postoje brojni preparati na bazi upravo serum proteina, koji se koriste kao vrlo popularni funkcionalni ingredijenti visoke nutritivne vrednosti (Hougaard et al., 2010). Međutim obzirom na činjenicu da se kozji sirevi, kao što je već spomenuto, i dalje mahom proizvode u tradicionalnim uslovima, prerada surutke je vrlo nerazvijena grana mlekarstva, pa je ovakav način iskorišćenja kozjih serum proteina i dalje najpogodniji.

2.2.2. Denaturacija serum proteina

U toku različitih termičkih tretmana mleka, pored ostalih procesa, u prvom redu dolazi do denaturacije serum proteina. Generalno, pri termičkom tretiranju mleka na temperaturama iznad 60°C započinje denaturacija serum proteina disocijacijom dimera β -lg (Vasbinder i de Kruif, 2003). Uočljive promene ponašanja mleka, kao što je: duže vreme potrebno za enzimsku koagulaciju i mekši formirani

sirni gel, dešavaju se kada se mleko tretira temperaturama iznad 70°C (Montilla et al., 1995). Termički tretman kravljeg mleka od 90°C/10 min izaziva denaturaciju serum proteina veću od 90% (Vasbinder et al., 2001). Ukoliko se kravlje mleko zagreva na temperaturama višim od 90°C u trajanju od 1 min ili više, koagulacija pod dejstvom sirila izostaje (Raynal i Remeuf, 1998, Sandra i Dagleish, 2007). U literaturi postoje podaci o dramatičnim razlikama u ponašanju kravljeg i kozjeg mleka kada je u pitanju tretman temperaturom od 90°C (Montilla et al., 1995). Kozje mleko tretirano ovom temperaturom u toku 30 min koaguliše neometano pod dejstvom sirila, pri čemu se javlja i značajno uvećanje randmana u odnosu na sirovo mleko (Calvo i Balcones, 1998).

Najveći obim denaturacije α -la i β -lg dešava se na temperaturama između 80 i 90°C (Donato i Guyomarc'h, 2009). Osetljivost serum proteina na dejstvo visokih temperatura opada sledećim redosledom: Ig>LF>SA> β -lg> α -la (Patel, 2007).

Proces denaturacije praćen je promenom konformacije β -lg što rezultuje u ekspoziciji reaktivne -SH grupe i građenju disulfidnih veza sa proteinima koji sadrže cistein (β -lg, SA) ili tiol-disulfidnom izmenom sa proteinima koji sadrže disulfidne mostove (α -la, κ -CN i α_{s2} -kazein). U procesu tiol-disulfidne izmene β -lg se ponaša kao inicijator. Interakcija β -lg sa κ -CN koji se nalazi na površini kazeinske micelle dovodi do oblaganja kazeinske micelle β -lg-om. Takođe, β -lg može formirati agregate sa kazeinima u serumu, kao i asocijate i agregate sa serum proteinima (α -la, β -lg, SA) (Vasbinder, 2002).

Grupa autora pratila je denaturaciju serum proteina u kravljem, kozjem i ovčijem mleku nakon različitih termičkih tretmana, određivanjem sadržaja rastvorljivih azotnih materija zaostalih nakon izoelektrične precipitacije kazeina. Utvrdili su da se brzina denaturacije proteina u zavisnosti od temperature uvećava, sa određenim razlikama između mleka tri životinjske vrste. Tretiranje mleka na 80°C 5 minuta vodi denaturaciji 70 – 80% serum proteina bez obzira na vrstu životinje. Nakon tretmana na 85°C maksimum denaturacije u slučaju kozjeg mleka postiže se nakon 1 min, u slučaju ovčijeg za 1 – 3 min, a kravljeg za 10 min. Na temperaturi od 90°C denaturacija se dešava vrlo brzo, a maksimum denaturacije se dešava nakon 2 min kod mleka sve tri životinjske vrste. Autori ističu da je čak i pri tretiranju

mleka na 90°C 20 – 25% proteina ostalo rastvoreno nakon precipitacije na pH 4.6. Zaostale rastvorljive azotne materije verovatno predstavljaju proteozo-peptonsku frakciju serum proteina. Razlike u kinetici denaturacije autori objašnjavaju različitim odnosom β -lg/ α -la, koji se razlikuje kod kravljeg i kozjeg mleka: 3,7 i 2.5, respektivno. U prilog govori i činjenica da je β -lg značajno termolabilniji od α -la, a takođe i to da su ova dva proteina u kozjem mleku osetljiviji na dejstvo visokih temperatura nego isti proteini kravljeg mleka (Raynal and Remeuf, 1998).

Druga grupa autora ispitivala je zavisnost stepena denaturacije od trajanja termičkog tretmana poredeći pritom kravlje i kozje mleko. Uticaj trajanja tretmana postoji ukoliko se mleko tretira na temperaturi od 75°C. Na temperaturama višim od 70°C u značajno većem obimu javlja se denaturacija serum proteina kozjeg mleka nego kravljeg. Manje od 5% nedenaturisanog β -lg detektovano je u kozjem mleku tretiranom na 80°C 5 minuta, dok je u slučaju kravljeg mleka nedenaturisanog istog serum proteina bilo više od 20% (Montilla et al., 1995).

2.2.3. Sastav agregata nastalih termičkim tretmanom

U model sistemima i u obranom mleku je ustanovljeno da termički tretman uzrokuje kovalentno povezivanje β -lg i κ -CN reakcijom tiol-disulfidne izmene. U agregatima se nalazi i α -lg vezan za β -lg disulfidnim vezama. U manjoj meri SA, LF i α_{s2} -CN, se povezuju u agregate, takođe tiol-disulfidnom izmenom. Imunoglobulini učestvuju u obrazovanju agregata uglavnom kroz hidrofobne interakcije (Donato i Guyomarc'h, 2009). Proteini koji ne poseduju Cys ostatak, α_{s1} -CN i β -CN, takođe u manjoj meri ulaze u sastav termički produkovanih agregata. Pretpostavlja se da se njihovo povezivanje u agregate vrši preko laktoze, putem *Maillard*-ove reakcije (Chevalier et al., 2009). Ukoliko se serum proteini dodaju u obrano mleko, pod uticajem termičkih tretmana dolazi do njihovog kompletnog ugrađivanja u agregate. Imajući u vidu da tom prilikom deo κ -CN i dalje ostaje van agregata, može se zaključiti da količina β -lg, određuje obim nastanka agregata pod dejstvom termičkih tretmana (Donato i Guyomarc'h, 2009).

2.2.4. Kovalentno vezivanje proteina unutar agregata (formiranje disulfidnih mostova)

Cisteinski ostatak Cys₁₆₀ β-Ig učestvuje u formiranju intermolekulskih disulfidnih mostova sa κ-CN na površini kazeinske micelle kozjeg mleka, sa κ-CN u serumu, kao i sa drugim molekulima β-Ig. Ostaci Cys₁₁₉ i Cys₁₂₁ β-Ig takođe učestvuju u formiranju intermolekulskih veza sa cisteinskim ostacima β-Ig i κ-CN. Nije ustanovljeno da Cys₁₀₆ β-laktoglobulina učestvuje u formiranju intermolekulskih veza u termički tretiranom mleku, što ukazuje na to da se ovaj ostatak nalazi u untrašnjosti proteina, pa iz tog razloga nije dostupan. Kod molekula κ-CN kravljeg mleka Cys₁₁ i Cys₈₈ jednako učestvuju u građenju intermolekulskih veza. U formiranju disulfidnih veza β-Ig sa α-la učestvuju Cys₆, Cys₆₁, Cys₁₁₁, i Cys₁₂₀ α-laktalbumina (Donato i Guyomarc'h, 2009).

Grupa autora (Henry et al., 2002) identifikovala je formiranje homopolimera između molekula β-Ig i takođe između molekula κ-CN povezanih disulfidnim mostovima, kao i agregat između molekula β-Ig i κ-CN, nakon izlaganja izolovane kazeinske micelle i β-Ig kozjeg mleka termičkim tretmanima od 80°C/10 min i 115°C/20s. Iako je teoretski moguće da se formiraju homopolimeri β-laktoglobulina sa više od dva monomera, navedeni autori su identifikovali samo dimere. Pretpostavlja se da se dalji polimerizacioni proces odigrava putem nekovalentnih interakcija, ili da je udeo većih polimera suviše mali da bi bio detektovan. Između κ-CN i β-Ig se formira disulfidni most između Cys₁₆₀ β-Ig (koji je u nativnom molekulu u intramolekulski disulfidno vezan sa Cys₆₆) i Cys₈₈ κ-kazeina, koji se u nativnoj formi molekula nalazi u obliku slobodne tiolne grupe, što znači da je u ovom slučaju u pitanju reakcija SH/SS intermolekulske izmene. Ova reakcija je favorizovana visokom temperaturom.

Ista grupa autora nije registrovala postojanje agregata između β-Ig i α_{s2}-CN, pa stoga zaključuju da ukoliko ih ima, prisutni su u suviše malim koncentracijama koje nisu mogle biti detektovane (Henry et al., 2002). Iako poseduje dva cisteinska ostatka, Cys₃₆ i Cys₄₁, kada je reč o kravljem mleku, učešće α_{s2}-CN u formiranju agregata je daleko ređa. Treba imati u vidu da on, kao što je već pomenuto, u mleku egzistira, pored monomera, u vidu termički vrlo stabilnog dimera, sa dve

intramolekularne disulfidne veze, što smanjuje njegovu reaktivnost (Rasmussen et al., 1992, Considine et al., 2007). Njegovo učešće u agregatima velike molekulske mase (>500 kDa) značajno je tek kad se mleko tretira temperaturama iznad 100°C. Odsustvo α_{s2} -CN u agregatima formiranim nakon termičkih tretmana kravljeg mleka na 85°C - 90°C može biti objašnjeno time što se α_{s2} -CN ne nalazi na površini micela pa su iz tog razloga njegove disulfidne veze nedostupne denaturaciji i reakciji sa denaturisanim β -lg (Patel, 2007)

Kozji κ -kazein se razlikuje od kravljeg po tome što umesto dva cisteinska ostatka poseduje tri (Cys₁₀, Cys₁₁ i Cys₈₈). U okruženju kakvo je mleko Cys ostaci su bez sumnje vezani disulfidnim mostovima, što uzrokuje formiranje polimera κ -CN. U nativnoj formi Cys₈₈ egzistira u formi slobodnog tiola (Henry et al., 2002). Utvrđeno je da Cys₈₈ ostatak reaguje sa Cys₁₆₀ ostatkom β -lg i u slučaju kravljeg, i u slučaju kozjeg mleka. Kada je Cys₁₆₀ β -lg u obliku tiola i nije vezan za Cys₆₆ reakcija može da se odigra sa nativnim κ -CN koji se nalazi u sklopu kazeinske micela uslovima bliskim fiziološkim, formirajući pritom stabilne agregate koji su baza za dobijanje mleka sa izmenjenim tehnološkim karakteristikama (Lowe et al., 2004)

Mehanizam formiranja agregata između β -lg i κ -CN do danas nije u potpunosti utvrđen, čak ni kada je kravlje mleko u pitanju, obzirom da su rezultati koji su objavljeni na ovu temu često kontradiktorni (Fouquier et al., 2012).

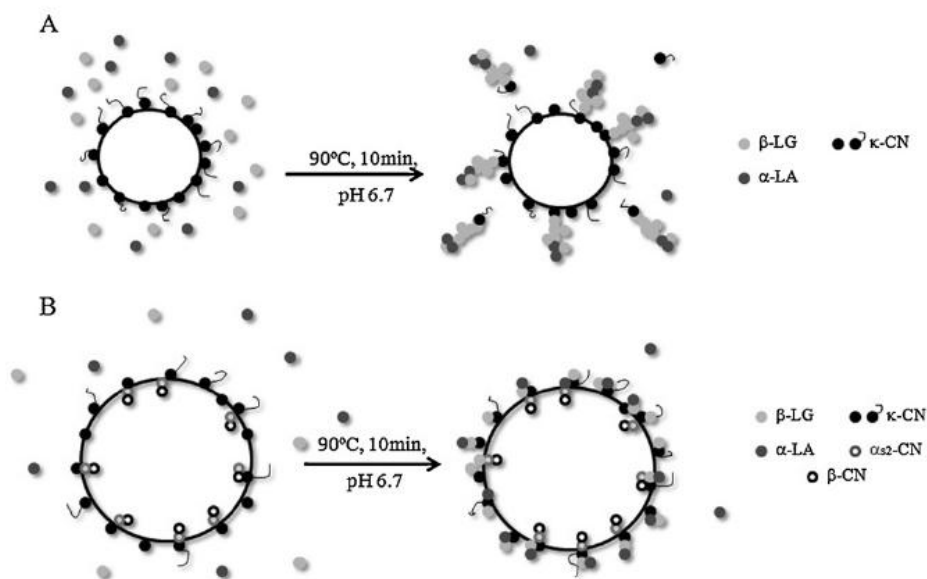
2.2.5. Nekovalentne interakcije unutar agregata

Utvrđeno je da u agregatima nastalim pod dejstvom termičkih tretmana mleka dominiraju kovalentne veze između molekula. Međutim, dodatkom supstanci koje blokiraju tiolne grupe (N-etilmaleimid – NEM) u model sistemima koji sadrže β -lg i κ -CN utvrđeno je da do formiranja agregata pod dejstvom termičkih tretmana ipak dolazi, što ukazuje na postojanje nekovalentnih interakcija (Donato i Guyomarc'h, 2009). Poznato je da su kazeinske frakcije kravljeg i kozjeg mleka relativno hidrofobni molekuli, sa relativno niskim nivoom uređenosti sekundarne i tercijarne strukture. Stoga su svakako hidrofobni segmenti ovih molekula delimično prisutni i na površini micela

(Yuksel et al., 2012). Međutim do sada nije utvrđeno da li κ -kazein učestvuje u nekovalentnim interakcijama u mleku pod uticajem termičkih tretmana. Blokiranjem slobodnih tiolnih grupa β -lg u mleku inhibira se tiol-disulfidna izmena i sve promene koje se dešavaju, sa tehnološkog aspekta, usled denaturacije proteina surutke termičkim tretmanom javljaju se u smanjenom obimu (Donato i Guyomarc'h, 2009).

2.2.6. Lokacija agregata β -laktoglobulin/ κ -kazein u mleku

Zbog uticaja na sposobnost koagulacije mleka, prihvaćna je pretpostavka da se agregati nastali termičkim tretmanom nalaze na površini kazeinske micelle. (Donato i Guyomarc'h, 2009). Separacijom seruma termički tretiranog kravljeg mleka (centrifugom ili enzimskom koagulacijom) i njegovom analizom (gel elektroforezom ili gel filtracijom) pokazano je da postoje agregati između serum proteina i κ -kazeina i u serumu (Singh i Creamer, 1991, Guyomarc'h et al., 2003).



Slika 1. Prikaz interakcije denaturisanih proteina surutke i kazeinske micelle A-kravlje mleko, V-kozje mleko (Pesic et al., 2012)

Upoređivanjem micelarnih i serumskih agregata, razdvojenih na pH 6,7 utvrđeno je da su oni sličnih veličina i sastava (autori citirani od strane Donato i Guyomarc'h, (2009)), mada micelarni agregati sadrže više κ - i α_{s2} -kazeina a manje proteina surutke (Guyomarc'h et al., 2003).

Treba istaći da se kozje mleko ne ponaša identično kao kravlje mleko. U kravljem mleku agregati postoje i u serumu i na površini kazeinske micela, dok su kod kozijeg oni prisutni samo na površini micela. Razlike postoje i u sastavu agregata, jer je kod kozjeg mleka u komplekse uključen i α_s - i β -kazein, što kod kravljeg mleka nije slučaj. Takođe, razlika postoji i u distribuciji agregata na površini micela (Slika 1). Kod kravljeg mleka agregati su veći i neravnomerno raspoređeni po površini kazeinske micela, dok kod kozijeg imamo ravnomernu distribuciju manjih agregata na površini micela (Pesic et al., 2012).

2.2.7. Kinetika formiranja agregata

Kinetika denaturacije i agregiranja kao posledice termičkog tretmana analizirana je uglavnom samo sa gledišta β -lg. Na temperaturama 70-90°C energija aktivacije je u rasponu 250-350 kJ/mol i u ovom slučaju je denaturacija korak koji određuje brzinu reakcije. Na temperaturama iznad 90°C denaturacija β -lg je gotovo trenutna pa brzina cele reakcije zavisi od koraka u kom se formiraju agregati. Kinetika disocijacije κ -CN do sada nije predložena u literaturi (Donato i Guyomarc'h, 2009).

2.2.8. Veličina i oblik agregata – uticaj na veličinu i oblik kazeinske micela

Metodama koje se zasnivaju na disperziji svetlosti dobijene su vrednosti prečnika micelarno vezanih agregata koji iznose oko 20 nm. Agregati koji se nalaze u serumu su veći a njihov prečnik iznosi od 30 do 100 nm (autori citirani od strane Donato i Guyomarc'h, (2009)).

Veličina kazeinske micela sirovog kravljeg mleka varira od 15 pa sve do 1000 nm (prosečna veličina je od 50 – 300 nm) u prečniku (Patel, 2007), odnosno 200 nm (Vasbinder, 2002). Veličina kazeinske micela kravljeg mleka se ne menja čak ni nakon tretmana na 90°C, dok micela kozjeg mleka počinje da raste prilikom tretmana na 85°C, kada se nakon 10 minuta uveća 1.25 puta. Isto ovo uvećanje uočeno je nakon 1 min na 90°C. Uticaj zagrevanja mleka na veličinu kazeinske micela rezultat je nekoliko procesa. Formiranje agregata između κ -CN i β -lg na miceli uzrokuje stvaranje nestabilnih hidrofobnih regija koje omogućuju micelama da se približe jedne drugima i agregiraju. Ovo dalje vodi uvećanju micela. Dalje,

precipitacija fosfata iz kazeinske micela vodi uvećanju hidratisanosti micela. Micela kozjeg mleka su u većoj meri mineralizovane, sadrže više β -CN i manje su hidratisane nego kravljje. Dalje, one poseduju nižu koloidnu stabilnost što vodi većem stepenu agregiranja kazeinskih micela. Sa druge strane, oštri termički tretmani izazivaju disocijaciju kazeina, posebno κ -CN, što dovodi do pojave većeg broja sitnijih kazeinskih micela. Svi ovi fenomeni dešavaju se u različitom odnosu kod različitih životinjskih vrsta. Očigledno dolazi do neutralisanja suprotnih efekata u slučaju kravljeg mleka, što nije slučaj sa kozjim, gde rezultanta efekata uslovljava uvećanje micela (Raynal i Remeuf, 1998).

2.2.9. Fizičko-hemijske osobine agregata

Zeta potencijal agregata izolovanih iz seruma termički tretiranog mleka iznosi od -15 do -20 mV (permeat ultrafiltriranog mleka, pH 6,7, temperature 25°C). Ove vrednosti su vrlo slične vrednostima za kazeinsku micelu (Donato i Guyomarc'h, 2009). Na ovu temu postoje nesuglasice u literaturi. Postoje podaci koji govore o tome da promene u mineralnom balansu tokom oštrih termičkih tretmana uslovljavaju porast zeta-potencijala, što uslovljava interakciju između micela, i njihovu dalju agregaciju (Raynal-Ljutovac et al., 2007).

Oprečna mišljenja postoje takođe i u vezi sa time da li je nakon termičkog tretmana izoelektrična tačka (pI) kazeina niža (4,4-4,5) od pI kazeina netretiranog mleka (autori citirani od strane Donato i Guyomarc'h, (2009)), ili viša - 5,2 (pI serum proteina) (Vasbinder et al., 2001).

Kazeinske micela nakon termičkog tretmana imaju veću hidrofobnost od kazeinskih micela koje nisu podvrgnute termičkom tretmanu (Jean et al., 2006), odnosno, micelarno vezani agregati povećavaju hidrofobnost kazeinske micela termički tretiranog mleka (Guyomarc'h et al., 2007). κ -kazein koji se nalazi u sastavu agregata podložan je razgradnji pod dejstvom himozina, nakon čega se hidrofobnost micela još više povećava (Mollé et al., 2006).

Termički tretmani ne uzrokuju značajnu promenu pH vrednosti mleka (Renan et al., 2007)

2.2.10. Uticaj određenih tehnoloških faktora na osobine agregata nastalih termičkim tretmanom

Sastav mleka na različite načine utiče na stvaranje proteinskih agregata u termički tretiranom mleku. U obranom mleku veća koncentracija ukupnih proteina ubrzava denaturaciju serum proteina. Viši sadržaj suve materije mleka uzrokuje veću disocijaciju κ -CN, ali usporava denaturaciju serum proteina, zbog zaštitne uloge laktoze i ostalih rastvorljivih neproteinskih komponenti u odnosu na slabljenje sekundarne i tercijarne strukture polipeptidnih lanaca proteina. Koncentracija κ -CN u rastvoru obrnuto je proporcionalna veličini proteinskih agregata. Drugim rečima, agregati koji sadrže višu koncentraciju κ -CN manje su molekulske mase i prečnika. Oblik u kom se nalazi κ -CN (vezan za micelu ili rastvoren u serumu), usmerava proces agregiranja ka nastajanju agregata koji su micelarno vezani ili rastvoreni u serumu, respektivno. Sa druge strane, i dodatak ostalih kazeina (α_s -, β -CN) utiče na formiranje agregata. Ovi proteini igraju zaštitnu ulogu tako što utiču na očuvanje integriteta polipeptidnih lanaca globularnih proteina povezivanjem preko fosfoserinskih ostataka i hidrofobne površine, pri čemu ne dolazi do formiranja novih heterogenih agregata (Donato i Guyomarc'h, 2009).

U model sistemima, dodavanje soli (posebno jona natrijuma i kalcijuma), utiče na agregiranje proteina surutke. Koncentracija rastvorljivih jona (jonska jačina) predstavlja faktor koji utiče na promene u veličini i obliku čestica agregata. Smanjenje jonske jačine u model sistemu gde je korišćeno obrano mleko bez laktoze, dovodi do smanjenja obima agregiranja β -lg sa kazeinskom micelom. Povećanje rastvorljivog kalcijuma ili smanjenje koncentracije fosfata u obranom mleku dovodi do manjeg obima disocijacije κ -kazeina, iz čega se može pretpostaviti da se formira manje serumskih, a više micelarno vezanih agregata ili da se agregati formiraju u manjem obimu. Manja koncentracija kalcijumovih jona u obranom mleku bez laktoze može dovesti do pripajanja α_s - i β -CN agregatima u serumu. U miceli, α_s - i β -CN vezuju kalcijumfosfat. Samim tim, što je više α_s - i β -CN u miceli, to više kalcijumfosfata prelazi iz seruma u kazeinsku micelu prilikom termičkog tretmana. Uklanjanje kalcijumfosfata iz seruma uzrokuje povećanje elektrostatičkog odbijanja serum proteina a samim tim njihovo otežano

agregiranje pod dejstvom termičkog tretmana (autori citirani od strane Donato i Guyomarc'h, (2009)).

2.2.11. Uticaj termičkih tretmana na promene na membranama masnih globula

Termički tretmani mleka između ostalog uzrokuju promene na membranama masnih globula (Singh i Waungana, 2001, Calvo, 2002). Obzirom da proteini koji se nalaze u sklopu membrane masnih globula sadrže disulfidne i sulfhidrilne grupe, logično je da se prepostavi da denaturisani serum proteini mogu formirati agregate i sa proteinima koji se nalaze u sklopu membrana. U svakom slučaju ove interakcije mogu posredno uticati na agregiranje serum proteina sa κ -kazeinom, pa samim tim i na dejstvo himozina na κ -CN (Calvo, 2002). Interakcije između serum proteina i proteina u sklopu membrana masnih globula, međutim, ne mogu biti objašnjene samo formiranjem disulfidnih mostova (Kim i Jimenez-Flores, 1995). Prilikom termičkih tretmana može doći i do zamene prvobitnog materijala membrane serum proteinima (nativnim ili denaturisanim). Do ugrađivanja serum proteina može doći njihovom direktnom zamenom sa proteinima membrane, ili tako što u toku izlaganja mleka oštrim termičkim tretmanima dolazi do delimičnog oštećenja membrana masnih globula, odnosno do stvaranja pukotina kroz koje serum proteini mogu proći i biti adsorbovani na otkrivenoj površini masti (Ye et al., 2004).

Proteini membrane masnih globula sadrže veliku količinu disulfidnih i sulfhidrilnih grupa. Kao primer se može navesti ksantin oksidaza, jedan od glavnih proteina membrane masnih globula koji sadrži 22 disulfidne veze i 38 sulfhidrilne grupe što znači da postoji mogućnost stvaranja agregata pod dejstvom termičkih tretmana. Utvrđeno je da slobodne tiolne grupe koje započinju reakciju tiol-disulfidne izmene potiču od proteina masnih globula a ne od serum proteina, što znači da je denaturacija proteina membrane masnih globula korak reakcije koji određuje njenu brzinu. Utvrđeno je takođe da je nakon termičkog tretmana punomasnog kravljeg mleka na temperaturama iznad 80°C, 1mg β -lg/g mlečne masti vezano za membranu, što čini oko 10-15% proteina membrane ali samo 1% od ukupnog β -lg.

Kad je u pitanju α -la, istim termičkim tretmanom za membranu se vezuje oko 0.25 mg α -la/g mlečne masti što čini 0.8% ukupnog α -la, i 3% ukupnih proteina membrane (Montilla et al., 1995).

2.2.12. Koloidna stabilnost mleka.

Mleko je veoma stabilan koloidni sistem. Bez ikakvih vidnih promena koloidne stabilnosti, ono može biti podvrgnuto ključanju ili zamrzavanju. Uspešno rekonstituisanje mleka u prahu takođe potvrđuje stabilnost koloidnog sistema mleka (Vasbinder, 2002).

Razumevanje stabilnosti koloidnog sistema kazeinskih micela u mleku znatno je unapređena polovinom prošlog veka, razvojem DLVO teorije (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) (Verwey i Overbeek, 1948). Prema ovoj teoriji za stabilnost koloida zaslužno je elektrostatičko odbijanje dispergovanih koloidnih čestica, kojim se kompenzuje Van der Waals-ovo privlačenje. Međutim, primenom ove teorije na koloidni sistem mleka (Walstra i Jenness, 1984), ispostavlja se da elektrostatičko odbijanje nije dovoljno da kompenzuje Van der Waals-ove privlačne sile između kazeinskih micela u mleku. Ono što ipak čini mleko stabilnim koloidnim sistemom je odbijanje kazeinskih micela koje je omogućeno postojanjem treplji κ -kazeina koje se nalaze na površini kazeinske micelle. Naime, κ -kazein se može posmatrati kao blok kopolimer, sačinjen od dela proteinskog lanca absorbovanog u micelu i dela koji prodire u rastvor. Ovakav tip stabilizacije naziva se polimerna ili sterna stabilizacija, i predstavlja najbitniji stabilizujući faktor u koloidnom sistemu mleka (Tuinier i de Kruif, 2002). Ukoliko je u pitanju polipeptid koji, kao u slučaju κ -CN sadrži vezane jonizujuće grupe, deo makromolekula koji prodire u rastvor može se nazvati „polielektrolitna treplja”. Ovaj deo κ -CN, kazeomakropeptid naziva se još i glikomakropeptid iz tog razloga što sadrži ugljenohidratne ostatke tipa N-aminoneuraminske kiseline (NANA). Stabilnost koloidnog sistema mleka u direktnoj je zavisnosti od sledećih faktora: dužina polielektrolitne treplje (N), jonska jačina rastvora (I), stepen jonizacije pojedinačnih treplji ($\alpha=1/m$; m – razmak između susednih naelektrisanja duž

lanca), gustina polielektrolitnih treplji (σ ; $1/\sigma$ – površina po jediničnoj treplji) (de Kruif i Zhulina, 1996).

Neuraminska kiselina hidrolizuje na pH 6.7 čime doprinosi delu negativnog naelektrisanja polielektrolitne treplje. Postoji ukupno 10 negativno naelektrisanih grupa u glikomakropeptidu. Glikomakropeptid kravljeg mleka sadrži 64 aminokiselinska ostatka, a njegova dužina iznosi 7 nm. Jonska jačina svežeg kravljeg mleka na pH 6.7 je 0.1M (de Kruif i Zhulina, 1996), odnosno 0,08M. Ovako visoka jonska jačina čini da postoji jaka interakcija između polielektrolitne treplje sa vodenom fazom mleka (de Kruif, 1999).

Kazeinske micelle u termički tretiranom mleku se i dalje mogu posmatrati kao sterno stabilizovani entiteti, ali sa redukovanom gustinom polielektrolitnih kazeinskih treplji, jer su neke od njih blokirane vezanim serum proteinima (Sandra i Dalglish, 2007).

Kao posledica drugačije biohemijske kompozicije kozjeg mleka u odnosu na kravlje mleko (mineralizacija, hidratacija, interakcije između proteina), kozje mleko ima nižu koloidnu stabilnost, što uzrokuje velike razlike u tehnološkim karakteristikama ove dve vrste mleka. Kozje mleko brže koaguliše pod dejstvom sirila a uticaj termičkih tretmana na prethodno pomenuti proces je slabiji (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Kao posledica višeg sadržaja jonskog kalcijuma, i slabije solvatacije kazeinske micelle (Park i Guo, 2006), kozje mleko takođe ima i nižu otpornost na dejstvo ultra visokih temperatura u poređenju sa kravljim mlekom (Anema i Stanley, 1998, Morgan et al., 2001, Park et al., 2007, Raynal-Ljutovac et al., 2007). Utvrđeno je da čak i dejstvo temperature nižih od 100°C mogu da poremete stabilnost koloidnog sistema proteina kozjeg mleka, usled čega može doći do njihove precipitacije na grejnim površinama razmenjivača toplote u značajnoj meri, što nije slučaj sa proteinima kravljeg mleka (Rafael i Calvo, 1996). Niža koloidna stabilnost manifestuje se takođe i većom osetljivošću kozjeg mleka na etanol. Naime, do precipitacije svežeg kozjeg mleka dolazi nakon dodatka jednake zapremine 45% etanola i mleka, dok se precipitacija svežeg kravljeg mleka javlja tek nakon dodatka jednakih zapremina 70% etanola i mleka (Guo et al., 1998, Raynal-Ljutovac et al., 2007).

2.3. Uticaj termičkih tretmana na sirišnu koagulaciju kravljeg i kozjeg mleka.

Koagulacija mleka pod dejstvom sirila je jedan od najčešće proučavanih procesa, kada je u pitanju proizvodnja sira, obzirom da je ova faza proizvodnje od fundamentalnog značaja u pogledu kvaliteta gotovog proizvoda. Poznato je da se koagulacija odvija u dve faze. Prva faza je raskidanje veze Phe₁₀₅-Met₁₀₆, i oslobađanje kazeomakropeptida (CMP – κ -CN 106-169) u serum, dok *para*- κ -CN (κ -CN 1-106) ostaje vezan za kazeinsku micelu. Obzirom da je κ -CN velikim delom na površini micela (u slučaju kravljeg mleka oko 30% (Donato et al., 2007)), njegova razgradnja utiče na naelektrisanje micela, kao i na sternu stabilizaciju. Kada je dovoljna količina κ -CN hidrolizovana, kazeinske micela su destabilizovane i počinju da se agregiraju formirajući grušu, što se smatra drugom fazom koagulacionog procesa (Sandra i Dalgleish, 2007).

Visoki termički tretmani mleka se često upotrebljavaju u tehnologiji izrade sireva kako bi se zajedno sa kazeinom u sir inkorporirali i serum proteini, koji bi inače pri sinerezi bili odliveni zajedno sa surutkom. Cilj koji se postiže je veći randman, zbog veće sposobnosti vezivanja vode, i većeg sadržaja proteina. Međutim, agregati koji se stvaraju između serum proteina i κ -CN utiču na enzimsku koagulaciju. Gel koji se dobija od termički tretiranog mleka je mekši, sadrži puno vode, a vreme koagulacije je produženo.

Kako je κ -CN supstrat za himozin, a proteini surutke upravo sa njim grade agregate, postojala je pretpostavka da formiranje agregata ometa enzimsku fazu koagulacije. Kao razlog za produženje koagulacije i lošije karakteristike gela u literaturi se mogu naći različite hipoteze: nekompletna hidroliza κ -CN usled formiranja agregata između proteina surutke i κ -kazeina, precipitacija rastvorljivog kalcijumfosfata usled dejstva visokih temperatura, stabilizacija kazeinske micela usled pozitivno naelektrisanih proteina surutke koji se nalaze na površini kazeinske micela. Obzirom na to da je pokazano da precipitacija kalcijumfosfata ne utiče na aktivnost himozina i na agregiranje kazeinskih micela, može se reći da je jedini faktor koji značajno doprinosi produženoj enzimskoj

koagulaciji termički tretiranog mleka stvaranje agregata između serum proteina i κ -kazeina na površini micela (Vasbinder, 2002).

Detaljnija ispitivanja enzimske koagulacije su ukazala na to da denaturacija serum proteina ne utiče u značajnoj meri na iniciranje flokulacije, odnosno pojavu vidljivih agregata. Denaturacijom se ometa fizičko-hemijska faza koagulacije, otežan je proces stvaranja gela i sinerezis tako dobijenog gela (Vasbinder, 2002, Mollé et al., 2006, Donato i Guyomarc'h, 2009). Naime, utvrđeno je da prilikom izlaganja termički tretiranog kravljeg mleka (85°C/10min) dejstvu himozina, kazeinske micela međusobno interaguju, iako ne dolazi do formiranja gela. Odnosno, inhibicija formiranja gela nije izazvana uvećanim odbijanjem micela koje se nalaze na velikoj udaljenosti jedne od drugih, već problem predstavljaju nekompatibilnosti između micela koje se nađu na maloj udaljenosti. Naime, ispostavlja se da serum proteini na površini kazeinske micela ne kreiraju dodatne odbijajuće interakcije, pa se one mogu približiti na vrlo malu distancu. Sa druge strane, površina micela je takva da ometa njihovo efikasno povezivanje (Sandra i Dagleish, 2007).

Smatra se da je vreme koagulacije (eng. Rennet Coagulation Time – RCT) trenutak u kome enzimska koagulacija mleka postaje vidljiva (Vasbinder, 2002), odnosno RCT obuhvata i enzimsku i agregacionu fazu koagulacije (Montilla et al., 1995). Utvrđeno je da formiranje agregata u toku termičkih tretmana, kada je kravlje mleko u pitanju, utiče na produžavanje vremena koagulacije (RCT), i takođe uslovljava nastanak gela lošijih karakteristika (Calvo, 2002). U slučaju kravljeg mleka, RCT vrednost je već posle 10 minuta na 75 i 80°C 1.5 puta veća (Raynal i Remeuf, 1998). Kravlje mleko izloženo termičkim tretmanima od 75°C/25 min, 80°C/20 min i 85°C/15 min ne koaguliše ni nakon 90 minuta (Montilla et al., 1995). Na vreme gotovosti gela kravljeg mleka znatno utiču termički tretmani, dok na gotovost gela kozjeg mleka takođe utiču ali znatno slabije (Montilla et al., 1995). Što se tiče vremena koagulacije (RCT), u slučaju kozjeg mleka postoje vrlo raznorodni rezultati i zaključci. Naime, utvrđeno je da termički tretman na 70°C/30 min ne utiče značajno na RCT kozjeg mleka (Calvo, 2002). Značajan porast RCT vrednosti postoji nakon termičkog tretmana kozjeg mleka na 80°C duže od 1

minut, koja je tada 1.3 puta veća u odnosu na sirovo kozje mleko, da bi nakon tretmana na 90°C u trajanju od 1 minut i više ova vrednost ponovo bila vrlo bliska sirovom mleku (Raynal i Remeuf, 1998). Postoje čak podaci koji govore o tome da oštriji termički tretmani dovode do skraćivanja vremena koagulacije kozjeg mleka (95°C/1,3,10 min) (Alloggio et al., 2000). Nije utvrđena značajna korelacija između stepena denaturisanih serum proteina i vremena koagulacije kozjeg mleka (Raynal i Remeuf, 1998).

Jedno od tumačenja razlika u ponašanju termički tretiranog kozjeg i kravljeg mleka prilikom sirišne koagulacije je sledeće. Generalno je prihvaćeno da agregacija kazeinskih micela kravljeg mleka započinje nakon što je oko 70% (Hallen, 2008), odnosno 75 – 80% κ -CN hidrolizovano od strane himozina (Raynal i Remeuf, 1998), dok je najmanje 90% potrebno za brzo formiranje gela (Sandra i Dagleish, 2007). Nakon kompletne denaturacije serum proteina oko 75% κ -CN ostaje dostupno dejstvu himozina, što znači da u slučaju kravljeg mleka stvaranje agregata između κ -CN i β -lg može biti limitirajući faktor za agregiranje micela. Sa druge strane, poznato je da kazeinske micelle kozjeg mleka poseduju nižu koloidnu stabilnost u odnosu na kravlje mleko, što ima za rezultat između ostalog kraće RCT. Postoji mogućnost da je u slučaju kozjeg mleka potrebno manje hidrolizovanog κ -CN kako bi faza agregiranja micela započela, tako da denaturacija serum proteina nije limitirajući faktor za sekundarnu fazu hidrolize κ -CN-a. Agregacija micela se dešava sporije, ali ne u tolikoj meri kao u slučaju kravljeg mleka. Podatak koji ide u prilog ovoj hipotezi je činjenica da postoji korelacija između procenta denaturisanih serum proteina i RCT kod kravljeg mleka, dok ova korelacija u slučaju kozjeg mleka ne postoji (Raynal i Remeuf, 1998).

Termički tretirano kozje mleko poseduje isti kapacitet umrežavanja micela kao i sirovo mleko. Koagulacija je sporija ali krajnji broj veza koje učestvuju u obrazovanju gela nije izmenjena (Raynal i Remeuf, 1998, Park et al., 2007) Redukcija sinerezisa izazvana termičkim tretmanima može biti izazvana stvorenim agregatima koji ometaju privlačenje micela. Sa druge strane, kapacitet vezivanja vode denaturisanih serum-proteina je visok, i doprinosi zadržavanju vode u grušu. U slučaju kozjeg mleka, obzirom da je utvrđeno da ne postoji razlika u

umrežavanju proteina prilikom stvaranja sirnog gela kada je u pitanju sirovo i termički tretirano mleko, smanjenje sinerezisa se pripisuje jedino smanjenju permeabilnosti gela koje je u relaciji sa denaturacijom serum proteina (Raynal i Remeuf, 1998).

U istraživanjima rađenim na temu uticaja sadržaja masti i termičkog tretmana na koagulaciju kozjeg mleka izneti su zaključci da u slučaju termički tretiranih uzoraka postoji uticaj sadržaja masti. U cilju tumačenja ovog uticaja autori navode pojavu adsorpcije denaturisanih serum proteina na membranama masnih globula nakon termičkog tretmana mleka. Tako nastale promene na membranama masnih globula povećavaju sposobnost agregiranja micela destabilizovanih termičkim tretmanom, što se može potvrditi manjim RCT kod punomasnog u odnosu na obrano mleko. Sa druge strane, moguće je da agregiranje denaturisanih serum proteina sa proteinima membrane masnih globula utiče na agregiranje ovih proteina sa κ -CN, pa na ovaj način utiče direktno na enzimsku fazu koagulacije, a indirektno i na fazu agregiranja kazeinskih micela (Calvo, 2002).

Parametri koagulacije kozjeg mleka vezana su takođe i za njegov sastav. Razlike postoje u mleku različitih rasa, pa čak i individualnih grla koza. Kozje mleko ostvaruje manji randman sira u odnosu na kravlje. Kada je reč o proteinskom sastavu mleka, α_{s1} -CN je glavni faktor brzine nastajanja gruša i njegove čvrstine. Čvrstina gruša je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim udelom kalcijuma i β -CN, a u negativnoj korelaciji sa prosečnim prečnikom micela (Božanić et al., 2002).

Prethodno iznete činjenice govore u prilog tome da je povećanje randmana termičim tretmanom pogodan metod za proizvodnju sireva koji se odlikuju manjim sinerezisom (Donato i Guyomarc'h, 2009), kakvi su na primer beli sirevi u salamuri svrstani u kategoriju mekih sireva.

2.4. Uticaj termičkih tretmana mleka na randman sireva

Randman sira se može definisati kao masa sira [kg] dobijena od 100 kg mleka, i kao takav predstavlja glavni pokazatelj efikasnosti i profitabilnosti u sirarstvu (Fenelon i Guinee, 1999). Imajući u vidu da je proizvodnja sira proces

koncentrisanja mlečnih komponenti, posebno mlečne masti i proteina, samim tim oni predstavljaju najznačajniji faktor randmana (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). Na randman sireva utiču mnogi faktori: sastav mleka, predtretman, vrsta koagulanta, način sečenja i obrade gruša (Fenelon i Guinee, 1999), genetske varijante kazeina, starter kulture koje se koriste, somatske ćelije u mleku. U ekonomskom smislu on je od vitalnog značaja, jer se malim uvećanjem randmana ostvaruje značajno uvećanje profita (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). Sa druge strane, u sirarskoj praksi se toleriše gubitak randmana od svega 1% (Zeng et al., 2007).

Predviđanje randmana je stoga vrlo bitan faktor menadžmenta u proizvodnji sira. Već decenijama se naučnici bave pronalaženjem brze, jeftine i tačne metode koja bi omogućila predviđanje randmana na osnovu sirovine, njenog sastava i svojstava (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). Randman utvrđen na osnovu predviđanja, u literaturi sa našeg govornog područja naziva se još i „kontrolni randman“ (Slanovec, 1973), tako da će se i u daljem tekstu ovog rada koristiti navedeni termin. Kontrolni randman predstavlja potencijal mleka kao sirovine da u realnom sistemu ostvari realan randman. Poređenje kontrolnog randmana i realnog randmana pruža mogućnost proizvođačima da imaju konstantnu kontrolu efikasnosti procesa proizvodnje a takođe i uvid u to kako pojedine tehnološke strategije utiču na čitav proces proizvodnje sira.

Jedan od načina predviđanja randmana je računanje takozvanog teorijskog randmana, koje se vrši pomoću određenih formula. Postoji veliki broj različitih formula koje su prilagođene posebnim sirnim varijetetima. Najpoznatija i najčešće korišćena je formula po Van Slyke-u koja se odnosi na sir Čedar, ali je uspešno korišćena i za brojne druge varijetete:

$$\text{Teoretski randman} = [(0.93 G + C - 0.1) \times 1.09 \times 100] / (100 - U)$$

G: sadržaj masti u mleku (%); C: sadržaj kazeina u mleku (%); U: sadržaj vode u siru (%) (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011).

Postoji od nedavno i niz formula za izračunavanje teorijskog randmana kozjih sireva na osnovu hemijskog sastava (Zeng et al., 2007)

Međutim za male pogone, kakvi su u najvećem slučaju pogoni za proizvodnju kozjih sireva, analize hemijskog sastava mleka su skupe i dugotrajne (Melilli et al., 2002). U literaturi se sreće nekoliko empirijskih metoda za predviđanje randmana, odnosno određivanje laboratorijskog randmana (ILCY – Individual laboratory cheese yield) koje su praktičnije, kraće traju i manje koštaju (Calvo i Balcones, 1998, Othmane et al., 2002, Hallen, 2008).

Još devedesetih godina prošlog veka termički tretman je predložen kao metod za uvećanje randmana sireva inkorporiranjem denaturisanih serum proteina u kazeinsku micelu (Benfeldt et al., 1997, Sandra i Dalgleish, 2007). Pored uvećanja randmana, uspešna inkorporacija serum proteina u sir značila bi takođe i uvećanje njegove nutritivne vrednosti (Calvo i Balcones, 1998), obzirom da su serum proteini biološki najvredniji proteini (Božanić et al., 2002).

Kao što je poznato, himozin svoju aktivnost ispoljava jedino prema kazeinu, serum proteini odlaze sa surutkom, što se sa aspekta sirarstva smatra gubitkom proteina (Vasbinder, 2002). Tehnološki najjednostavniji i najjeftiniji način da se serum proteini uključe u sir je izlaganje mleka namenjenog proizvodnji sira visokim termičkim tretmanima (Vasbinder, 2002).

Termički tretman se primenjuje uglavnom u cilju uvećanja randmana kiselo-koagulišućih sireva kao što je sir Cottage (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). Međutim postoje interesantni podaci o inkorporiranju serum proteina i uvećanju randmana kravljih sireva u tipu Camembert, kada se sirovom mleku doda mleko tretirano na 90°C/6 min ili kada se pasterizovanom mleku doda mleko tretirano na 80°C/3 min (Ghosh et al., 1999). Postoji još jedan izuzetak – italijanski sir Caciocotta, koji se proizvodi od kozjeg ili ovčijeg mleka. Mleko namenjeno za proizvodnju ovog sira izlaže se temperaturama od 90-95°C u vrlo kratkom vremenskom intervalu (1 min), nakon čega se koagulacija vrši na višoj temperaturi nego što je uobičajena, uz veću količinu sirila (Pasqualone et al., 2000, Caponio et al., 2001, Faccia et al., 2007, Faccia et al., 2012).

Obzirom da termički tretman ne utiče na vreme koagulacije kozjeg mleka, može se pretpostaviti da postoji mogućnost da se od ovako obrađenog kozjeg mleka

proizvede sir čiji bi randman i nutritivna vrednost bili uvećani (Calvo i Balcones, 1998).

2.5. Uticaj termičkih tretmana na zrenje kozjih belih sireva u salamuri

Zrenje sireva nastalih enzimskom koagulacijom mleka može da traje od 2 nedelje do 2 godine. U toku ovog perioda razvijaju se tekstura i ukus karakteristični za odgovarajuću vrstu sira (Upadhyay et al., 2004). Termički tretman mleka može da prouzrokuje brojne fiziko-hemijske promene na njegovim konstituentima, tako da se sirevi proizvedeni od termički tretiranog mleka razlikuju od sireva proizvedenih na tradicionalni način, prvenstveno u pogledu teksture i senzornih karakteristika (Benfeldt et al., 1997, Singh i Waungana, 2001). Pored toga, tok proteolitičkih promena koje se dešavaju prilikom sazrevanja sireva sa visokim sadržajem serum proteina drugačiji je nego kod sireva proizvedenih na tradicionalan način (Benfeldt et al., 1997).

2.5.1 Proteolitičke promene tokom zrenja sireva

Biohemijske reakcije koje se odvijaju u siru u toku zrenja obično se grupišu u četiri najbitnije kategorije: 1) katabolizam laktata; 2) katabolizam citrata; 3) lipoliza i katabolizam masnih kiselina; 4) proteoliza i katabolizam aminokiselina. U mnogim varijetetima sira proteoliza je najkompleksnija i najbitnija od četiri primarne kategorije biohemijskih transformacija koje se dešavaju tokom zrenja. Odvija se u nekoliko faza, započinje razgradnjom kazeina, a katalizuju je proteaze i peptidaze koje potiču iz šest različitih izvora: 1) koagulant (sirilo), 2) mleko, 3) bakterije mlečne kiseline startera (BMK startera), 4) nestarterska mikroflora, 5) sekundarni starteri i 6) egzogene proteaze i peptidaze (Upadhyay et al., 2004).

Šema proteolize mnogih varijeteta sireva prikazana je na Slici 2. U većini sirnih varijeteta, kao što se može uočiti sa Slike 2, do inicijalne hidrolize kazeina dolazi dejstvom enzima rezidualnog koagulanta, i u nešto manjem obimu dejstvom plazmina. Proizvodi navedenih reakcija su peptidi velikih molekulskih masa. Dalja degradacija ovih peptida odvija se posredstvom enzima koagulanta, nativnih enzima ali i posredstvom enzima starterske i nestarterske mikroflore sireva (Sousa

et al., 2001). Proteoliza se može podeliti na primarnu i sekundarnu, pri čemu su za primarnu odgovorni enzimi rezidualnog koagulanta i nativni enzimi u mleku, dok su enzimi starterske i nestarterske mikroflore odgovorni za sekundarne proteolitičke promene (Barać et al., 2013).



Slika 2. Proteolitički agensi u siru u toku zrenja (Sousa et al., 2001)

2.5.1.1. Dejstvo enzima rezidualnog koagulanta na kazein

Rezidualni koagulant koji se u određenom procentu (0-15%) zadržava u grušu, daje glavni i esencijalni doprinos proteolizi sireva tokom zrenja, pa samim tim i razvoju ukusa i teksture (Awad et al., 1998). Tradicionalni način proizvodnje još uvek zauzima bitno mesto u ukupnoj proizvodnji sireva u svetu. Prilikom proizvodnje sireva na tradicionalan način koristi se sirilo animalnog porekla, pretežno iz želuca teladi (Sousa et al., 2001), u vidu vodenog ekstrakta, paste ili praha. U sirilu animalnog porekla od enzima su najzastupljeniji himozin i pepsin, a njihov maseni odnos zavisi najviše od starosti životinja. Himozin je u najvećem procentu prisutan kod teladi i jagnjadi, dok se hrane pretežno mlekom (himozin: 88-94%, pepsin: 6-12%) (Macej et al., 2007).

U potpuno svežem mleku himozin pokazuje umanjenu aktivnost, ali već pri pH 6.5 pokazuje izraženiju aktivnost. Maksimalna aktivnost u pogledu primarnog delovanja na kazein himozin pokazuje u pH intervalu od 6.3 do 5.3. Optimalna pH vrednost za sekundarnu proteolitičku aktivnost himozina, tj. razgradnju kazeina,

prvenstveno α_{s1} -kazeina u toku zrenja sireva nalazi se oko pH 5. Optimalna temperatura delovanja himozina se kreće u intervalu 38 – 40°C (Puđa, 2009)

Primarna uloga himozina u toku proizvodnje sira je hidroliza veze Phe₁₀₅ - Met₁₀₆ κ -CN u mleku, čime se koloidna stabilnost micle narušava, što dovodi do koagulacije mleka na temperaturama višim od 20°C (enzimska koagulacija). Za razliku od drugih proteinaza, himozin ima limitiranu proteolitičku aktivnost: α_{s1} , α_{s2} i β -CN ne bivaju hidrolizovani u toku koagulacije mleka, mada bivaju hidrolizovani u siru u toku zrenja. (Hynes et al., 2004).

Primarno mesto hidrolize α_{s1} - CN himozinom u toku zrenja sira je Phe₂₃-Phe₂₄. Cepanje ove veze je odgovorno za inicijalno omekšavanje teksture sira. Tom prilikom nastaje α_{s1} -CN f24-199 (α_{s1} -I-CN), peptid dugog lanca, nerastvorljiv u vodi i peptid kratkog lanca α_{s1} -CN f1-23 koji ubrzo biva hidrolizovan od strane peptidaza startera (Upadhyay et al., 2004). U toku zrenja mekih i polutvrdih sireva raskidanje ove veze događa se na početku zrenja, usled visoke aktivnosti rezidualnog himozina. Kod tvrdih sireva, međutim, raskidanje veze Phe₂₃-Phe₂₄ javlja se tek u kasnijim fazama zrenja (Hynes et al., 2004). Pod istim uslovima, kozji α_{s1} -CN i primarni produkti razgradnje ovog proteina podložniji su proteolizi od analognih proteina kravljeg mleka (Trujillo et al., 1997).

U model-sistemu, himozin ispoljava proteolitičku aktivnost kako u odnosu na α_{s1} -CN tako i u odnosu na β -CN. Međutim, u slučaju da se radi o istim proteolitičkim promenama u siru, ispostavlja se da glavni supstrat za ovaj enzim predstavlja α_{s1} -CN, obzirom da usled hidrofobnog agregiranja β -CN, dolazi do maskiranja potencijalnih mesta hidrolize ovog molekula (Fox i Stepaniak, 1993).

Primarno mesto hidrolize β -CN himozinom je veza Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ pri čemu nastaju β -I-CN (f1-192) i β -CN (f193-209) (Awad et al., 1998). β -CN (f193-209) se nalazi na C terminalnom kraju β -CN, i poznat je po izuzetno gorkom ukusu (Madsen i Ardö, 2001). U kasnijim fazama zrenja ovaj peptid biva razgrađen peptidazama BMK (Visser, 1993).

Konformacijski raspored molekula β -CN u siru zavisi od različitih parametara kao što su pH, temperatura, jonska jačina. Pri niskim temperaturama (<10°C) β -CN se

nalazi u obliku monomera, što olakšava njegovu razgradnju pod dejstvom himozina. Na višim temperaturama dolazi do hidrofobnog agregiranja molekula supstrata, čime je dejstvo himozina otežano (Visser, 1993)

Mesta podložna hidrolizi α_{s2} -CN-a, koji je inače relativno rezistentan na proteolizu himozinom, su hidrofobne sekvence, između 90. i 120. i između 160. i 207. aminokiseline (Upadhyay et al., 2004)

U molekulu *para*- κ -CN postoji nekoliko mesta za koje bi se moglo pretpostaviti da su podložna hidrolizi himozinom, međutim, hidroliza izostaje. Objašnjenje za ovu rezistentnost je njegova složenija sekundarna struktura u poređenju sa ostalim elektroforetskim frakcijama kazeina (Sheehan et al., 2007).

Na aktivnost himozina u toku zrenja i količinu rezidualnog himozina utiče niz faktora:

Količina dodatog sirila – veća količina sirila upotrebljenog pri podsirivanju mleka rezultira većom količinom rezidualnog sirila koje ostaje u sirnoj grudi nakon odlivanja surutke.

Sadržaj vode u siru – Ukoliko je sadržaj vode u siru veći, supstrat (kazein) je pristupačniji za delovanje koagulanata pa su samim tim i procesi razgradnje intenzivniji. U tom smislu je i aktivnost rezidualnog sirila veća.

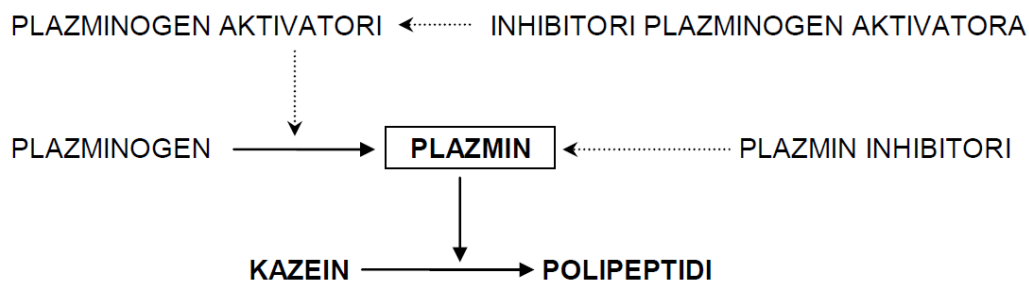
Sadržaj soli u siru – himozin je dosta otporan na visoke koncentracije soli, tako da se soljenjem njegova aktivnost ne zaustavlja u potpunosti već samo usporava. Hidrolizu β -CN-a himozinom inhibira NaCl, u meri zavisnoj od pH sira. Pri pH 5.4 (što je kod velikog broja sireva pH vrednost sira na početku zrenja) nivo soli u vodenoj fazi >5% značajno inhibira dejstvo himozina na β -CN, a 10% potpuno. Razlog tome leži u supstratu, a ne u aktivnosti enzima. Naime pri visokoj jonskoj jačini koja je prouzrokovana visokim sadržajem soli, dolazi do agregacije β -CN pri čemu potencijalna mesta hidrolize bivaju maskirana. Ova pojava može doprineti objašnjenju izostanka gorkog ukusa u sirevima sa visokim sadržajem soli. Veza Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ u β -CN kozjeg mleka posebno je osetljiva na visoke koncentracije soli, koje čine da ona postane vrlo otporna na dejstvo himozina. Ova pojava može biti jedan od razloga zbog kog se kod kozjeg mleka pomenut gorak ukus vrlo retko

javlja. Za razliku od β -CN, na hidrolizu α ₁-CN-a ne utiče prisustvo NaCl u koncentraciji od 5-10% (Awad et al. 1998). Ova elektroforetska frakcija pokazuje visoku osetljivost na himozin čak i kada je koncentracija NaCl 15% (Trujillo et al., 1997).

pH vrednost tokom obrade gruša - što je niža pH vrednost gruša u toku odlivanja surutke, to je veći procenat koagulanta koji se zadržava u siru (usled vezivanja enzima za kazein), termička stabilnost himozina, a samim tim i njegova aktivnost u toku zrenja (Sheehan et al., 2007).

2.5.1.2. Nativne proteaze mleka

Postojanje native proteolitičke aktivnosti u mleku ustanovljeno je pre više od sto godina. Neko vreme je pomenuta aktivnost pripisivana enzimima bakterija, ali kasnijim ispitivanjima utvrđeno je prisustvo nativnih proteinaza u mleku. Skorija istraživanja ukazala su na postojanje dve glavne grupe nativnih proteolitičkih enzima u mleku, od kojih obe vode poreklo iz krvi. Glavni nativni enzimski sistem sastoji se od plazmina čija je aktivnost kontrolisana kompleksnim sistemom inhibitora i aktivatora. Druga grupa nativnih proteolitičkih enzima, koja je proučavana tek od skoro, vodi poreklo iz belih krvnih zrnaca. U lizozomima somatskih ćelija nalaze se proteolitički enzimi u koje spadaju elastaza, kolagenaza, i katepsini B, D, G, H i L. Od svih kiselih proteinaza poreklom iz lizozoma katepsin D je najviše proučavan (Kelly i Mc Sweeney, 2003).



Slika 3. Plazminogen/plazmin sistem u mleku (Bastian i Brown, 1996)

Optimalni uslovi dejstva plazmina su 37°C i pH 7.5. Plazmin se izlučuje u krv kao neaktivni zimogen, plazminogen koji dalje biva aktiviran i konvertovan u plazmin. Sistem plazmin/plazminogen postoji u krvi, kao i u mleku i sastoji se od plazmina, plazminogena, plazminogen aktivatora, plazmin inhibitora i inhibitora plazminogen aktivatora (Slika 3) (Upadhyay et al., 2004).

Pri normalnoj pH vrednosti mleka plazmin je i u aktivnoj formi i u formi zimogena u velikoj meri vezan za kazeinske micelle, a manjim delom čak i za membrane masnih globula. Plazminogen aktivatori su takođe vezani za kazeinske micelle, tako da zajedno sa plazminom i plazminogenom bivaju inkorporirani u sirno testo. Snižavanjem pH vrednosti mleka ili dodatkom 1M NaCl u mleko dolazi do disocijacije plazmina iz kazeinskih micela. Pri pH vrednosti < 4.8, disocijacija je kompletna. Što se inhibitora tiče, oba su prisutna u mleku, ali bivaju odstranjeni iz sira zajedno sa surutkom.

Pored pH vrednosti, i koncentracije NaCl, na aktivnost plazmina u siru takođe utiče i termički tretman mleka namenjenog proizvodnji sireva. Naime, temperatura pasterizacije povećava aktivnost plazmina u toku zrenja. Ova pojava je objašnjena termolabilnošću plazmin inhibitora i inhibitora plazminogen aktivatora. Usled denaturacije ova dva inhibitora pod dejstvom visokih temperatura, raste stepen konverzije plazminogena u plazmin. Plazminogen aktivator, plazminogen i plazmin preživljavaju uslove pasterizacije (Visser, 1993). Nasuprot pasterizaciji, oštrij termički tretmani kao što je UHT tretman u velikoj meri redukuje aktivnost plazmina (Kelly i Mc Sweeney, 2003).

Plazmin pokazuje specifičnost prema vezama Lys-X i nešto manju specifičnost prema vezama Arg-X, a deluje na kazeinske frakcije po sledećem redosledu $\beta \approx \alpha_2 > \alpha_1$ (Bastian i Brown, 1996).

Kao rezultat proteolitičkog delovanja plazmina na β -CN nastaju γ -kazeini. Delovanjem plazmina, sa N-terminalnog kraja β -CN odvajaju se komponente proteozo-peptonske frakcije: PP5 (β -CN f1-105/107), PP8 spora (β -CN f29-105/107) i PP8 brza (β -CN f1-28) pri čemu nastaju γ_1 , γ_2 i γ_3 (Macej et al., 2007). β -I-CN (β -CN f1-192), koji nastaje dejstvom himozina na β -CN biva dalje razgrađen

od strane plazmina (Kelly i Mc Sweeney, 2003). Produkti razgradnje β -CN pod uticajem plazmina mogu se naći i u mleku.

Hidroliza α_{s2} -CN pod dejstvom plazmina je takođe vrlo izražena. Nakon 4h inkubacije samo 20% ove frakcije ostaje intaktno (Bastian i Brown 1996). Postoji 8 mesta u molekulu α_{s2} -kazeina koja su podložna delovanju plazmina (Upadhyay et al., 2004). Pri tome nastaje oko 14 peptida od kojih su tri potencijalno gorki, odnosno, mogu da izazovu gorak ukus u siru ukoliko su prisutni u dovoljnoj količini (Kelly i Mc Sweeney, 2003).

Identifikovano je 17 Arg-X i Lys-X veza u molekulu α_{s1} -CN koje su osetljive na dejstvo plazmina (Upadhyay et al., 2004). Identifikovano je tri peptida velike molekulske mase koji nastaju dejstvom plazmina na α_{s1} -CN (Mooney et al., 1998).

Iako poseduje nekoliko Lys i Arg rezidua, κ -CN je rezistentan na delovanje plazmina što je vrlo važno sa tačke gledišta protektivne uloge ove elektroforetske frakcije na stabilnost kazeinske micelle u mleku (Visser, 1993). Jedan od uzroka rezistentnosti je ometajući efekat ugljenih hidrata vezanih za molekul κ -CN. Kada se ugljeni hidrati uklone, ova frakcija postaje nešto podložnija hidrolizi plazminom.

Kod sireva od ultrafiltriranog mleka može se uočiti smanjena aktivnost plazmina, što se objašnjava inhibitornim dejstvom β -lg koji je integrisan u proteinski matriks, pa je samim tim prisutan u znatno većoj količini nego u drugim vrstama sireva (Bastian i Brown, 1996). Prilikom tretmana mleka na temperaturama preko 80°C dolazi do osetnog pada aktivnosti plazmina usled formiranja intermolekulskih tiol-disulfidnih interakcija sa serum-proteinima, prvenstveno sa β -lg (Visser, 1993).

Aktivnost plazmina je veća u mleku dobijenom pri kraju laktacije, zatim u mleku starijih krava i u mleku krava obolelih od mastitisa. Najviši nivo plazmina uočava se u mleku krava obolelih od mastitisa. Čak i nakon što je infekcija izlečena, nivo se ne vraća na početni, što je mogući razlog izraženije aktivnosti plazmina kod starijih krava. Postoje takođe i varijacije aktivnosti plazmina kod različitih rasa krava (Bastian i Brown, 1996).

Dodavanjem plazmina u mleko namenjeno proizvodnji sira, ili aktiviranjem plazminogena može se ubrzati zrenje. Činjenica da se plazmin vezuje za kazeinske micelle omogućava da prilikom podsirivanja ne dolazi do velikih gubitaka plazmina dodatog u mleko. Aktivacija plazminogena može se vršiti dodatkom urokinaze.

Plazmin ne utiče direktno na razvoj ukusa u siru, obzirom na to da su proizvodi njegovog delovanja peptidi velikih molekulskih masa. Međutim, ovi molekuli predstavljaju prekursore od kojih dalje dejstvom drugih agenasa zrenja nastaju aminokiseline i brojna aromogena jedinjenja koja su bitni nosioci ukusa sira.

Posebno je važno istaći da i sa pojačanom aktivnošću plazmin nije uzročnik gorkog ukusa sira (Kelly i Mc Sweeney, 2003).

2.5.1.3. *Proteaze i peptidaze startera*

Upotreba startera u proizvodnji sireva pruža mogućnost dobijanja odgovarajuće vrste sireva standardnog kvaliteta. Primarna uloga starter kultura je produkcija mlečne kiseline, i pravilno usmeravanje toka zrenja (Dagdemir et al., 2003). Starter kulture koje se najčešće dodaju tokom proizvodnje belih sireva u salamuri su *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Alichanidis i Abd El-Salam, 2004).

Bakterije mlečne kiseline (BMK) ispoljavaju slabu proteolitičku aktivnost, međutim sadrže proteozo/peptidazni sistem koji katalizuje hidrolizu oligopeptida do peptida malih molekulskih masa i slobodnih aminokiselina (McSweeney, 2004).

Dodatak starter kulture tokom proizvodnje belih sireva doprinosi znatnom snižavanju pH vrednosti sirnog testa, čime se favorizuje aktivnost himozina. (Hayaloglu et al., 2005).

Proteoliza se smatra najbitnijim fenomenom koji se odigrava u siru tokom zrenja. Tok proteolize determiniše razvoj teksturalnih i senzornih svojstava sira (Bontinis et al., 2012). Kao posledica proteolitičkih promena tokom zrenja javljaju se sledeće pojave:

- Promena teksture sira:
 - usled hidrolize proteinskog matriksa;
 - usled opadanja a_w vrednosti, što je uslovljeno hidrolizom peptidnih veza i oslobađanjem novih karboksilnih i amino grupa za koje se vezuje voda;
 - indirektno, preko povećanja pH vrednosti, pri oslobađanju amonijaka iz aminokiselina – produkata proteolize;
- Generisanje željenih ali i neželjenih senzornih svojstava sira:
 - direktno produkcijom kratkih peptida i aminokiselina, nosioca ukusa;
 - indirektno, oslobađanjem aminokiselina koje predstavljaju supstrate za veliki broj kataboličkih reakcija u toku kojih se obrazuju važna isparljiva jedinjenja koja su nosioci ukusa;
 - olakšanim oslobađanjem jedinjenja - nosioca ukusa u toku žvakanja putem razgradnje proteinskog matriksa proteolizom (Upadhyay et al., 2004);

Tokom poslednje decenije nekoliko autora bavilo se proučavanjem proteolitičkih promena koje se dešavaju prilikom zrenja različitih varijeteta kozjih sireva (Faccia et al., 2007, Tejada et al., 2008, Ferrandini et al., 2011, Abellán et al., 2012, Faccia et al., 2012, Barać et al., 2013, Hayaloglu et al., 2013, Van Hekken et al., 2013). Istraživanja koja su najbližnja temi ovog rada tiču se italijanskog kozjeg sira Cacioricotta dobijenog sirišnom koagulacijom kozjeg mleka termički tretiranog temperaturama 90-95°C u trajanju od 1 min. Rezultati koji se tiču proteolize ovog sira ukazuju na veoma limitiranu, kako primarnu tako i sekundarnu proteolizu, koja se odigrava tokom zrenja uglavnom kao rezultat aktivnosti enzima rezidualnog sirila tokom početne faze zrenja. Smatra se da što se proteolize tiče ove sireve karakteriše nepotpuno zrenje, za šta je zaslužna specifična tehnologija njihove proizvodnje. Dominantan proces koji se odigrava tokom zrenja je lipoliza (Faccia et al., 2007, Faccia et al., 2012).

2.5.2. Promene svojstava teksture tokom zrenja sireva

Po definiciji tekstura predstavlja skup karakteristika nekog prehrambenog proizvoda koje se formiraju kao rezultat kombinacije njegovih fizičkih i hemijskih svojstava, a mogu se percipirati čulom dodira, vida i sluha. Kad je reč o siru,

tekstura igra jednu od najvažnijih uloga u identitetu proizvoda (Buffa et al., 2001). Teksturalna svojstva hrane često su odlučujući faktor prilikom odabira proizvoda od strane potrošača, često bitniji od ukusa i boje. Razvoj odgovarajuće teksture u određenom proizvodu jedan je od najzahtevnijih zadataka prehrambene industrije u današnje vreme, a podrazumeva: a) definisanje teksturalnih svojstava koja zajedno čine da proizvod bude prihvatljiv; b) razvoj tehnologije koja obezbeđuje definisanu prihvatljivu teksturu proizvoda; v) merenje i karakterizacija teksture u dobijenom proizvodu.

Strukturu sira zajedno formiraju: kazeinski matriks unutar kog su uklopljene globule mlečne masti, mineralne materije i serum koji je ili vezan za kazein ili popunjava šupljine matriksa. Na strukturu sira utiču: sadržaj proteina, masti i vode, kao i biohemijske transformacije koje se skoro kontinualno odvijaju u sirevima tokom zrenja i skladištenja. Struktura i tekstura međusobno su čvrsto povezane (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003). Na sobnoj temperaturi proteini doprinose tvrdoći sira, dok viši sadržaj masti čini sir mekšim. Svakako, tekstura sira se menja u zavisnosti od fizičkog stanja u kome se nalaze proteini i mlečna mast, i to najpre kao posledica različite temperature. Razumevanje same strukture sireva, a posebno strukture proteina i masti, kao i brojnih transformacija koje se dešavaju na ovim komponentama u toku proizvodnje i zrenja, mogu pružiti informacije koje su ključne prilikom razumevanja teksture sireva na molekulskom nivou (Dufour et al., 2001).

Postoji nekoliko faktora koji mogu doprineti razvoju određenih karakteristika teksture tokom proizvodnje sireva. U prvom redu tu su faktori koji utiču na sadržaj vode u siru: termički tretman mleka, struktura sirnog gela, obrada gruša (intenzitet, temperature, trajanje). U zavisnosti od pH vrednosti mleka u trenutku dodavanja sirila, ili odlivanja surutke sir će imati različita teksturalna svojstva – niža pH vrednost u momentu dodavanja sirila i odlivanja surutke rezultuje u izraženijoj tvrdoći sira (Jack i Paterson, 1992).

Takođe, pH samog sira u velikoj meri utiče na teksturu. Interakcije između proteina, koje su vrlo bitne za stabilnu strukturu kazeinskog matriksa, bivaju oslabljene adsorpcijom vode od strane jonizovanih grupa koje se nalaze u sklopu proteinskog lanca. Ovakvim vezivanjem vode za proteine biva limitirana količina

vode koja se nalazi u šupljinama sirnog matriksa, što znači da su sirevi koje karakteriše visoka pH vrednost nešto nalik proteinskoj emulziji, dok se sirevi niske pH vrednosti mogu posmatrati kao porozna masa kazeina i inkorporirane mlečne masti. U tom smislu, sireve niske pH vrednosti najčešće karakteriše lomljiva struktura, što znači da ovi sirevi imaju tendenciju ka lomljenju pri malim deformacijama. Sa druge strane, sirevi čija je pH vrednost visoka (posebno u rasponu od pH 5.2 do 6.2) imaju manju sklonost ka lomljenju, odnosno, potrebna je relativno velika deformacija da bi došlo do pojave pukotina u siru (Watkinson et al., 2001).

Sadržaj vode, soli i kalcijuma mogu da promene efekat pH vrednosti na teksturu sira. Jasno je da su sirevi sa višim sadržajem vode, ukoliko imaju jednak sadžaj soli i pH, mekši nego analogni sirevi sa nižim sadržajem vode. Vrlo male promene u sadržaju vode mogu imati značajan efekat na teksturu sireva (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003).

Efekat koji mlečna mast ima na teksturu sireva je dosta ispitivana. Generalno, tekstura sireva sa višim sadržajem masti prihvatljivija je za potrošače nego tekstura istih sirnih varijeteta sa nižim sadržajem masti, koja je okarakterisana kao tvrda, kompaktna, elastična i adhezivna. Viši sadržaj vode i masti u sirevima ima tendenciju da oslabi proteinski matriks sira. Ipak, priroda proteinskog matriksa ima veći uticaj na teksturu sira nego sadržaj vode i masti (Bryant et al., 1995).

Tekstura većine sirnih varijeteta menja se kontinualno tokom zrenja, velikim delom kao posledica proteolitičkih promena koje se dešavaju dejstvom proteolitičkih enzima prisutnih u siru. Ove promene uzrokuju razgradnju proteinskog matriksa, usled čega sirevi postaju manje krti i lomljivi, postaju mekši i kremasti (Hort i Le Grys, 2001). Tri faktora koja imaju najveći uticaj na teksturu sira tokom zrenja su: a) pH vrednost prilikom odlivanja surutke, koja opredeljuje udeo rezidualnog himozina i plazmina u siru; b) so u vodenoj fazi sira, koja zajedno sa temperaturom utiče na aktivnost rezidualnog himozina i plazmina u siru; v) pH sira nakon soljenja – faktor koji najviše utiče na teksturu sira. Temperatura i relativna vlažnost vazduha tokom zrenja sireva takođe utiču na razvoj teksturalnih svojstava (Jack i Paterson, 1992).

U literaturi se mogu naći podaci o efektu termičkih tretmana mleka na teksturu

sireva. U prvom redu pominju se niže vrednosti tvrdoće sireva, kao posledica većeg udela vode. Ova pojava zapažena je čak i kod sireva proizvedenih od pasterizovanog mleka, kada se uporede sa analognim sirevima od sirovog mleka (Lau et al., 1990, Buffa et al., 2001). Pored većeg udela vode, postoji još jedan uzrok nižih vrednosti tvrdoće pomenutih sireva koji se navodi, a to je finiji kazeinski matriks dobijen usled usporene koagulacije termički tretiranog mleka. Kada je reč o lomljivosti, u dosadašnjoj literaturi mogu se naći podaci da inkorporiranjem serum proteina, kazeinski matriks postaje slabiji, što rezultira u izraženijoj lomljivosti sireva (Rynne et al., 2004). Međutim na ovu temu postoje i oprečni rezultati, koji se objašnjavaju dominantnim efektom većeg udela vode u sirevima proizvedenim od termički tretiranog mleka (Visser, 1991, Watkinson et al., 2002). Uprkos tome što postoje bogati literaturni podaci o efektima različitih faktora proizvodnje na strukturu i teksturu sireva, u praksi je vrlo teško uskladiti sve faktore i utvrditi njihov kombinovani uticaj u cilju postizanja što prihvatljivije teksture (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003).

Postoji nekoliko radova koji su se bavili proučavanjem teksture kozjih sireva (Delgado et al., 2011, Medeiros et al., 2013, Van Hekken et al., 2013). Kozje mleko je u odnosu na kravlje deficitarno u elektroforetskoj frakciji α_{s1} -CN, odgovornoj za čvrstinu i izdržljivost kazeinskog matriksa tokom zrenja sireva. Takođe, masne globule, koje prave prekide u strukturi sira koju formiraju protein, manje su kod kozjeg mleka a ima ih više, što znači da je izraženiji njihov negativan uticaj na održivost povezane strukture proteina u kozjem siru. Osim toga veći prečnik kazeinske micle kozjeg mleka uslovljava stvaranje mekšeg koaguluma dobijenog enzimskom koagulacijom (Van Hekken et al., 2013). Jasno je na osnovu izloženog da kozje sireve generalno karakteriše veći udeo vode, odnosno mekša tekstura od kravljih analoga (Park i Guo, 2006, Van Hekken et al., 2013). Štaviše, dve trećine kozjih sireva mogu se svrstati u kategoriju mekih sireva što govori o tome da hemijski sastav i struktura kozjeg mleka kao sirovine pogoduje upravo proizvodnji ove vrste sireva (Park i Guo, 2006).

2.5.3. Uticaj različitih faktora na ukus kozjih sireva

Pored teksture, ukus nekog prehrambenog proizvoda je od strane mlekarske industrije odavno prepoznat kao jedan od najkritičnijih, i u isto vreme najvažnijih zadataka koji se direktno reflektuju na prodaju i marketing. Karakteristike ukusa kravljih mlečnih proizvoda proučavane su u velikoj meri, dok je literatura koja se bavi ukusom kozjih proizvoda od mleka daleko oskudnija. Ukus mlečnih proizvoda proizilazi iz kombinacije nekoliko jedinjenja prisutnih u odgovarajućim koncentracijama. Kravlje mleko karakteriše slatkast, mlečni ukus, dok je ukus mleka ostalih mlečnih životinja često okarakterisan kao jak, sa specifičnim, oštrijim notama (Whetstine i Drake, 2006). Kozje mleko ima karakterističan »kozji« ukus, koji potiče od slobodnih masnih kiselina kratkog lanca. Rasprostranjeno je mišljenje o neprihvatljivom ukusu i mirisu kozjeg mleka. Međutim, sveže pomuženo kozje mleko sa kojim se pravilno i higijenski postupa ne razlikuje se značajno po ukusu i mirisu od kravljeg mleka. Do karakterističnog nepoželjnog ukusa može doći tokom lošeg postupanja s mlekom, od trenutka muže do prodaje ili proizvodnje određenih proizvoda. Mlečna mast kozjeg mleka sadrži veći udeo masnih kiselina koje su nosioci jakog mirisa (kaprilna, kaprinska i kapronska) a koje tokom pravilne obrade mleka ostaju vezane u gliceridima. Membrana masne globule kozjeg mleka ima osetljiviju strukturu nego membrana masne globule kravljeg mleka i lakše se ošteti tokom nepravilnog rukovanja mlekom, čime se može ubrzati lipoliza i razvoj karakterističnog nepoželjnog ukusa i mirisa (Božanić et al., 2002).

Razvoj ukusa sireva tokom zrenja zavisi od mnoštva hemijskih reakcija, u prvom redu od proteolitičkih i lipolitičkih promena koje se kontinualno odvijaju. Kod kozjih sireva, lipoliza ima dominantan uticaj na ukus, posebno na razvoj karakterističnog ukusa na vosak i na životinje, koji je pored pomenutih kiselina delimično uzrokovan i prisustvom masnih kiselina razgranatog lanca. Intenzitet ukusa sirovog mleka zavisi od nekoliko faktora: rase koza, sezone, perioda laktacije, načina ishrane, hemijskog sastava mleka a posebno udela masti (Whetstine i Drake, 2006). Primera radi, pri kraju laktacije, i na početku perioda zasušenja, kozje mleko ima intenzivniji karakterističan „kozji“ ukus. Takođe,

primitivne rase ekstenzivno gajenih koza u većini slučajeva daju mleko vrlo izraženog nepoželjnog kozjeg ukusa, koji se u sirevima dobijenim od ovakvog mleka može intenzivirati do oporosti. U ovakvim slučajevima se, u cilju eliminisanja neželjenog oporo-kozjeg ukusa, pored jednostavne zamene dela kozjeg mleka kravljim, vrši modifikovanje dela mlečne masti transesterifikacijom uz pomoć imobilizovane lipaze uz dodatak oleinske i linolne kiseline (Caponio et al., 2000).

Lipoliza može da se intenzivira tokom muže, skladištenja, obrade i prerade mleka, pod dejstvom nativnih lipaza i lipaza koje vode poreklo od mikrobioloških kultura, bilo starterskih ili nestarterskih.

Na intenzitet karakterističnog ukusa kozjeg mleka, a samim tim i sira, veliki uticaj ima njegova obrada. Generalno, termička obrada mleka prouzrokuje liziranje ćelija nestarterskih bakterija mlečne kiseline, čime se oslobađaju intracelularne proteaze, peptidaze i lipaze, što bi značilo da termički tretmani vode uvećanju uzročnika lipolize a samim tim i razvoja neželjenih ukusa (Whetstone i Drake, 2006). Međutim, utvrđeno je da relativno niska temperatura termičke obrade mleka (65°C, 1 min) umanjuje intenzitet kozjeg ukusa, ukusa na vosak, i životinje, redukovanjem lipolize toplotnom inaktivacijom lipaza. Nasuprot tome, skladištenje mleka na niskim temperaturama kao i homogenizacija, pojačavaju intenzitet pomenutih karakteristika, a mogu čak doprineti i pojavi ukusa na užeglo. Homogenizacija doprinosi povećanju površine masnih globula, što uzrokuje bolju dostupnost mlečne masti dejstvu lipaza. Skladištenje dovodi do razmnožavanja mikroorganizama u mleku, što bez obzira na kasniju termičku obradu vodi obrazovanju višeg nivoa lipaza, a samim tim i slobodnih masnih kiselina u mleku koje se duže skladišti. Jasno je da će sirevi od kozjeg mleka lošeg kvaliteta, sa izraženim neželjenim senzornim karakteristikama zadržati iste te mane ukusa, koje će tokom zrenja imati potencijal ka intenziviranju. Međutim, utvrđeno je da parametri zrenja (odabir starter kultura, termički tretman, uslovi zrenja itd.) imaju veći uticaj na ukus sireva nego sam kvalitet sirovog mleka od kog je proizveden.

Svi navedeni literaturni podaci pružaju informacije koje mogu poslužiti kao osnova za kontrolisanje ukusa kozjih sireva (Morgan i Gaborit, 2001). Međutim činjenica je

da kao i u slučaju teksture, samo dobrim poznavanjem uticaja pojedinih faktora na razvoj željenog ukusa, i njihovim pravilnim kombinovanjem u praksi, može se proizvesti sir prihvatljiv od strane potrošača. Što se kozjih sireva tiče, obzirom na specifičnost ukusa same sirovine, ovaj zadatak je još teži.

3. Ciljevi rada

Polazni cilj istraživanja je da se ispita intenzitet promena na proteinima kozjeg mleka podvrgnutog različitim termičkim tretmanima, kako bi se dobila jasnija slika o sirovini koja se koristi za proizvodnju sireva.

Cilj istraživanja je takođe da se ispita uticaj termičkih tretmana kozjeg mleka na enzimsku koagulaciju, kroz određivanje parametara koagulacije. U ovom delu ogleda cilj bi bio sagledati kakva je povezanost eventualnih razlika između parametara koagulacije tri ispitivane varijante termički tretiranog mleka, sa stepenom ireverzibilnog kovalentnog agregiranja proteina mleka, kao i sa randmanom proizvedenih sireva.

Važan segment istraživanja je takođe da se ispitaju razlike u fizičko-hemijskom sastavu, proteolitičkim promenama i teksturi kozjih sireva u salamuri tokom zrenja, nastale kao rezultat termičkog tretmana mleka.

Cilj ovog rada je takođe da se deskriptivnom senzornom analizom sireva u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi zrenja utvrdi uticaj termičkog tretmana mleka na senzorne karakteristike kozjih sireva, a takođe i da se utvrdi da li je uz primenu termičkog tretmana oštrijeg od klasične niske pasterizacije moguće proizvesti kozji beli sir u salamuri prihvatljiv od strane potrošača.

Svi pojedinačni ciljevi vodili bi ka opštem cilju, da se ispita mogućnost proizvodnje kozjeg sira u salamuri od mleka tretiranog režimima termičke obrade koji su oštrij od režima klasične niske pasterizacije. Ovakav sir bi sa svojim specifičnim karakteristikama svakako imao svoje mesto na tržištu proizvoda od mleka.

U okviru svih eksperimenata koji će se sprovesti, rezultati analiza kozjeg mleka i sireva biće poređeni sa istim rezultatima dobijenim za kravlje analoge, delom eksperimentalno a delom u odnosu na literaturne podatke. Na ovaj način biće utvrđene eventualne razlike između kozjeg i kravljeg mleka, gledano sa različitim aspektata. Isticanje razlika imalo bi za cilj prilagođavanje tehnoloških postupaka koji su ustanovljeni za kravlje mleko, specifičnim svojstvima kozjeg mleka, što se često u praksi zanemaruje.

Takođe, izlaganje termički tretiranog kozjeg mleka različitim režimima obiranja ili enzimskoj koagulaciji, zatim upoređivanje dejstva termičkih tretmana na obrano i punomasno mleko, ima za cilj da donekle doprinese razjašnjavanju mehanizma koji se dešavaju na molekulskom nivou prilikom različitih procesa obrade i prerade kozjeg mleka, čime bi se upotpunila oskudna literaturu na ovu temu.

4. Materijal i metode

Sirovo kozje i kravlje mleko za potrebe svih segmenata istraživanja prikupljeni su sa lokalnih farmi. Uzorci kozjeg mleka su uzeti sa farme Sanskih koza "Beokapra" iz Kukujevaca, dok je kravlje mleko uzeto sa farme krava Holštajn-Frizijske rase, PIK iz Zemuna. Za prva tri seta oglada uzorci su prikupljeni po tri puta tokom aprila i maja, a ogledi su rađeni paralelno. Za ostali deo oglada, odnosno ispitivanje uticaja termičkih tretmana na koagulaciju i zrenje sireva, mleko je prikupljeno takođe tri puta u toku juna i jula.

Proizvodnja sireva odvijala se u mini-mlekari Poljoprivrednog fakulteta, dok su sve analize rađene u Laboratoriji za tehnologiju mleka, takođe na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

4.1. Efekat termičkog tretmana mleka i obiranja na formiranje taloga

4.1.1. Analize osnovnih parametara kvaliteta sirovog mleka

Analiza sirovog mleka obavljena je odmah nakon prikupljanja uzoraka. Primenjene su sledeće metode: određivanje sadržaja suve materije - standardnom metodom sušenja na $102 \pm 2^\circ \text{C}$ (FIL-IDF, 1987), sadržaj masti metodom po Gerber-u (FIL-IDF, 1981), određivanje sadržaja azota, odnosno proteina Kjeldal-ovom metodom (AOAC, 1990), titraciona kiselost ($^\circ\text{Soxlet-Henkel}$) određivana je korišćenjem 0,1 M NaOH kao titranta, uz indikator fenolftalein. pH vrednost merena je digitalnim pH-metrom (Consort, Turnhout, Belgium).

4.1.2. Termički tretman

Uzorci sirovog kozjeg i kravljeg mleka, odmah nakon prikupljanja, zagrevani su na 40°C . Po 10 ml kozjeg i kravljeg mleka je zatim prebačeno u polipropilenske kivete sa navojem. Termički tretmani vršeni su u vodenom kupatilu sa kontrolisanjem temperature unutar kontrolne kivete u kojoj se takođe nalazilo 10 ml mleka. Primenjena su tri različita termička tretmana: 70°C , 80°C i 90°C , u trajanju od pet minuta. Nakon termičkih tretmana uzorci mleka su odmah ohlađeni vodom do

postizanja temperature od 20°C. Svi uzorci mleka su ostavljeni preko noći u frižideru, na temperturi 7-10°C. Sirovo kozje i sirovo kravlje mleko korišćeno je kao kontrolni uzorak.

4.1.3. Obiranje

Uzorci termički tretiranog kozjeg i kravljeg mleka zagrejani su do 40°C i ohlađeni do 20°C, a potom centrifugirani laboratorijskom centrifugom (Eppendorf AG 5430 Hamburg, Germany), na 20°C, 15 min primenom tri različite centrifugalne sile: 600g, 2000g, i 4500g. Nakon centrifugiranja, obzirom da se na površini kivete formirao masni sloj, tečna faza je pažljivo pipetirana iz centra kivete. Imajući u vidu činjenicu da se prilikom centrifugiranja na dnu kivete formirao talog, tečna faza će se u daljem tekstu nazivati „supernatant“ umesto „obrano mleko“ kao što bi bilo očekivano. Talog i supernatant dobijeni obiranjem dalje su analizirani.

4.1.4. Određivanje masenog udela taloga

Na osnovu vrednosti prethodno izmerenih masa praznih kiveta (m_0), masa kiveta sa mlekom (m_1), i masa kiveta sa talogom nakon pažljivog uklanjanja ostataka masti i supernatanta (m_2), izračunati su maseni udeli taloga prema formuli:

$$(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) * 100$$

4.1.5. Analiza hemijskog sastava supernatanta dobijenih nakon termičkih tretmana i obiranja mleka

Analiza sadržaja masti u uzorcima supernatanta je vršena metodom po Gerber-u (FIL-IDF, 1981). Sadržaj proteina u supernatantu određen je metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1990).

4.1.6. Priprema uzoraka taloga i supernatanata za SDS-PAGE

Uzorci taloga dobijenih centrifugiranjem na 4500g u toku 15 min na 20°C pripremljeni su za natrijum-dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezu u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE). Za pripremu uzoraka korišćen je *redukujući pufer za ekstrakciju* pH 8,00 koji sadrži 0,125M Tris-HCl, 4% SDS i 5% β -ME. U polipropilenskoj kivetu talogu je dodat navedeni pufer u masenom odnosu 1:20. Kivete su smeštene u ključalo vodeno kupatilo dok se sav talog nije rastvorio.

Nakon toga, rastvor taloga je pomešan u odnosu 1:3 sa *redukujućim puferom za uzorke* pH 6,8 sledećeg sastava: 0,055 M Tris-HCl, 7% glicerola, 5% β -ME i 0,0025% bromfenolplavog, dajući konačno razblaženje taloga od 1:60.

Supernatanti su pripremljeni za elektroforezu u redukujućim i neredukujućim uslovima po metodi Anema i Stanley, (1998). Supernatanti su pomešani u odnosu 1:10 kako sa redukujućim tako i sa neredukujućim puferom za uzorke. *Redukujući pufer* za uzorke je identičan prethodno opisanom puferu koji je korišćen za pripremu uzoraka taloga, dok *neredukujući pufer* ne, sadrži β -ME što omogućuje da disulfidne veze ostanu neredukovane, a proteini koji su tokom termičkog tretmana povezani u agregate putem disulfidnih mostova, ostanu u tom obliku.

4.1.7. SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforeza je izvedena prema po metodi Laemmli (1970). Pre same analize uzorci su zagrevani u ključaloj vodi u trajanju od 5 minuta. Na gel je nanošeno po 5 μ l uzoraka. Elektroforeza je vršena pomoću elektroforetske jedinice Twin Plate 20,5 x 10 cm TV200YK (Consort, Turnhout, Belgium), i napajanje EV202 istog proizvođača. Radni uslovi su bili sledeći: konstantna struja od 80 mA, i maksimalan napon od 300 V. Nakon elektroforeze gelovi su fiksirani i bojeni u rastvoru koji sadrži 0,23% Coomassie Brilliant blue R250, 3,9% trihlorsirćetne kiseline, 6% sirćetne kiseline i 17% metanola. Bojenje je trajalo 1 h na temperaturi od 45° C. Nakon toga vršeno je obezbojavanje rastvorom koji sadrži 8% sirćetne kiseline, i 18% metanola, nakon čega su gelovi skenirani.

4.1.8. Kvantifikacija proteina i nomenklatura

Identifikacija proteinskih traka vršena je na osnovu standarda Roti-Mark 10-150 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), kao i na osnovu poređenja sa elektroforetskom pokretljivošću proteina na elektroforetogramima publikovanim do sada (Pesic et al., 2012, Barać et al., 2013), koji se odnose na kozje mleko i sireve. Kvantifikacija proteina vršena je denzitometrijskom analizom skeniranih gelova, na osnovu računanja površine ispod maksimuma koji odgovara pojedinačnim proteinima, uz korišćenje računarskog programa LabImage 1D L340 (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Germany). Prema nomenklaturi koju je

predložio Havea, (1998), proteini koji su dobijeni SDS-PAG elektroforezom u neredukujućim uslovima nazvani su „*SDS-monomerni*“ a oni dobijeni u redukujućim uslovima „*ukupni redukovani*“ proteini. Nivo ireverzibilne denaturacije svake proteinske frakcije posmatran je kao udeo „*SDS-monomerni*“ / „*ukupni redukovani*“ proteini. Na ovaj način, svi uzorci pripremljeni u redukujućim uslovima predstavljali su kontrolne uzorke za svoje ne-redukovane analoge.

4.1.9. Statistička obrada podataka

Deo oglada u kome se analizira efekat termičkog tretmana i uticaja centrifugalne sile tokom obiranja na maseni udeo formiranog taloga postavljen je prema planu podeljenih parcela (SPLIT-PLOT). Oba navedena faktora definisani su kao slučajni. Na glavnoj parceli (main plot) posmatran je uticaj centrifugalne sile i bloka, dok je u okviru podparcele (subplot) posmatran uticaj termičkog tretmana i interakcije između centrifugalne sile i termičkog tretmana. Uzorci kozjeg i kravljeg mleka uzeti su tri puta, tokom tri dana, gde je svaka šarža bila posmatrana kao zaseban blok. Maseni udeo taloga svakog bloka ponaosob predstavljao je aritmetičku sredinu tri uzastopna merenja. Analiza varijanse za plan podeljenih parcela izvršena je korišćenjem GLM procedure (General Linear Model) uz korišćenje programa Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, USA).

Za parna poređenja rezultata denzitometrijske analize, odnosno stepena ireverzibilnog agregiranja proteina nakon termičkih tretmana korišćen je t-test na nivou značajnosti $\alpha=0,05$.

4.2. Efekat sadržaja masti na kovalentno ireverzibilno agregiranje proteina mleka

4.2.1 Termički tretman i obiranje uzoraka

U ovom delu oglada sirovo kravlje i kozje mleko podeljeno je na dva seta uzoraka. Prvi set uzoraka oba mleka je podvrgnut obiranju, na način kao što je opisano u poglavlju 4.1.3., i to primenom najblažih uslova: 600 g/15 min/20°C, a zatim

termički tretiran, procedurom opisanom u poglavlju 4.1.2. Drugi set uzoraka termički je tretiran u prisustvu mlečne masti. Nakon termičkog tretmana ovi uzorci su takođe obrani pomenutim režimom. Obzirom na to da prilikom obiranja mleka pod navedenim uslovima ne dolazi do pojave taloga, u ovom slučaju tečna faza može da se posmatra kao obrano mleko, pa će i u daljem tekstu biti tako označavana.

4.2.2 Priprema uzoraka, SDS-PAG elektroforeza i kvantifikacija proteina

Uzorci obranog mleka pripremani su analogno uzorcima supernatanata, kao što je opisano u poglavlju 4.1.6, elektroforetska analiza uzoraka sprovedena je metodom prikazanom u poglavlju 4.1.7, dok je kvantifikacija proteina vršena na način opisan u poglavlju 4.1.8.

4.2.3. Statistička obrada podataka

Eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su obrađeni primenom trofaktorijalne analize varijanse (ANOVA). Ispitivan je uticaj faktora: termičkog tretmana, vrste mleka i prisustva masti, na stepen ireverzibilnog agregiranja proteina koji učestvuju u formiranju agregata nakon termičkog tretmana (zavisna promenljiva).

U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$ (nivo pouzdanosti od 95 %). Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0

4.3. Određivanje kontrolnog randmana u slučaju punomasnog i obranog termički tretiranog kozjeg mleka

4.3.1. Određivanje kontrolnog randmana

Mogućnost uvećanja randmana termičkim tretmanom mleka ispitivana je određivanjem takozvanog *kontrolnog* randmana na osnovu metode (Hallen, 2008) sa minimalnim modifikacijama. Ova metoda predstavlja simulaciju proizvodnje sira u laboratoriji. Uzorci mleka (10 ml) zagrevani su na 31°C. Svakom uzorku je dodato 0,02% CaCl₂ i 25 µl, 1.5 mg/ml telećeg sirila u prahu (Caglificio Clerici, 94%

himozin, 6% pepsin, Clerici-Sacco Group, Cadorago, Italy) jačine 765-1620 IMCU/g. Nakon dodatka sirila, uzorci su izmešani vibracionom mešalicom, i ostavljeni na 30 min u vodenom kupatilu gde je njihova temperatura održavana na 31°C. Nakon 30 min, formirani koagulum špatulom je presečen vertikalno u krst, i ostavljen dodatnih 30 min na istoj temperaturi. Nakon toga je proces presovanja simuliran centrifugiranjem na 1260 g/20 min laboratorijskom centrifugom. Surutka-supernatant je odliven, a masa precipitata odnosno koaguluma, koji je predstavljao pandan siru u realnom sistemu izmerena je (zajedno sa kivetom), pa je na osnovu ove mase (m_2), kao i mase prazne kivete (m_0) i kivete sa mlekom (m_1) računat kontrolni randman.

4.3.2. Određivanje sadržaja suve materije u koagulumu

Sadržaj suve materije u koagulumu određen je metodom sušenja, standardnom metodom koja se primenjuje za sir (FIL-IDF, 1982).

Radi uporedivosti merenih veličina, određeno je procentualno uvećanje kontrolnog randmana termički tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni randman uzorka sirovog kozjeg mleka. Na osnovu dobijenog sadržaja suve materije u koagulumu računato je takođe i procentualno uvećanje sadržaja vode u koagulumima dobijenim iz termički tretiranog mleka, u odnosu na koagulum dobijen iz sirovog mleka, kako bi se mogao ustanoviti stepen korelacije ove veličine sa uvećanjem kontrolnog randmana.

4.3.3. Statistička obrada podataka

Eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su obrađeni primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde su posmatrani faktori: termički tretman i prisustvo masti (dva nivoa faktora - punomasno i obrano mleko), kao i njihove interakcije. U okviru prve analize varijanse, kao zavisna promenljiva posmatrano je uvećanje kontrolnog randmana, a u okviru druge analize varijanse, uvećanje sadržaja vode. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$ (nivo pouzdanosti od 95 %).

Vršena je takođe i korelaciona analiza kako bi se utvrdio stepen povezanosti između procentualnog uvećanja kontrolnog randmana i: (1) procentualnog uvećanja sadržaja vode, (2) procentualnog uvećanja stepena kovalentnog agregiranja proteina (β -lg, α -la i κ -CN), izračunatih na osnovu rezultata prikazanih u prethodnom poglavlju.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.4. Proizvodnja kozjeg belog sira u salamuri

4.4.1. Proces proizvodnje

Proizvodnja sira vršena je u tri ponavljanja u toku jula i avgusta. Osnovni parametri kvaliteta sirovog kozjeg mleka – sirovine za proizvodnju sireva, određivani su standardnim metodama, kao što je navedeno u poglavlju 4.1.1.

U šaržnom razmenjivaču toplote, odnosno duplikatorskom sudu, 60 L sirovog kozjeg mleka podeljeno je u tri šarže od po 20 L, a zatim tretirano pomoću tri različita režima termičke obrade: 65°C/30 min (65/30 – kontrolna varijanta), 80°C/5 min (80/5 – eksperimentalna varijanta I) i 90°C/5 min (90/5 – eksperimentalna varijanta II). Nakon termičkog tretmana mleko je hladeno na <math><10^{\circ}\text{C}</math> i smešteno u hladnjaču gde je ostavljeno preko noći. Narednog dana vršeno je zagrevanje mleka do 31°C, a zatim inokulacija starter kulturom na nivou od 5% (w/v), oznake Lyofast MO 030 (Clerici-Sacco Group, Cadorago, Italy), koja se sastoji od mezofilnih bakterija mlečne kiseline: *Lactococcus lactis subsp. lactis* i *L. lactis subsp. cremoris*. Nakon 30 min, kada je pH vrednost dostigla 6,5, dodat je CaCl_2 u koncentraciji od 0,2 g/L, a potom teleće sirilo u prahu (karakteristike navedene u poglavlju 4.3.1.) u koncentraciji od 0.2 g/10 L. Koagulacija je trajala 45 min, a potom je gruš sečen na kocke dimenzija ~ 5 cm i ostavljen da stoji još 15 min. Sirni gruš je zatim pažljivo prebačen iz duplikatora u kalupe gde je vršeno ceđenje 5-10 min, a zatim presovanje pod opterećenjem od ~2 kg/kg sira u trajanju od 1h nakon čega je opterećenje povećano na ~4 kg/kg sira u trajanju od dodatnih 1 h, na sobnoj temperaturi.

Po završetku presovanja sir je sečen na kriške dimenzija 15 x 7 cm, dok je debljina kriške varirala od 2 do 3 cm u zavisnosti od termičkog tretmana, odnosno randmana. Kriške su zatim suvo soljene i pakovane u plastičnu ambalažu odgovarajućih dimenzija, pri čemu je u svakom pakovanju bilo po 2 kriške. Na ovaj način je dobijeno po 5 pakovanja, svako za po jednu tačku zrenja kada je vršen odgovarajući set analiza. Nakon 24 h na sobnoj temperaturi, kriške su potopljene u salamuru sa 6% NaCl, čija je pH vrednost podešena dodatkom mlečne kiseline na 5,0. Zrenje se odvijalo na temperaturi 13-15°C u trajanju od 40 dana.

Bitno je istaći, da su svi parametri proizvodnje sira bili identični u kontrolnoj i dve eksperimentalne varijante sireva. Ovakav pristup imao je za cilj eliminisanje što je moguće više faktora koji bi uticali na karakteristike tri proizvedene varijante sireva, kako bi se dobijene razlike mogle pripisati različitom termičkom tretiranju mleka.

4.4.2. Parametri koagulacije kozjeg mleka i randman sireva

4.4.2.1. Reološka merenja parametara koagulacije

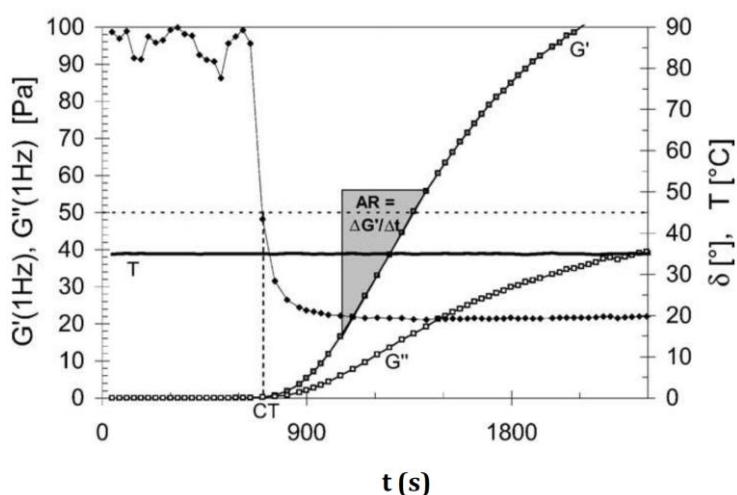
Za potrebe merenja parametara koagulacije korišćen je reometar Kinexus Pro (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), u kombinaciji sa „Vane“ geometrijom istog proizvođača. Primenjena je oscilatorna reometrija sa malom amplitudom (eng. SAOR – Small Amplitude Oscillatory Rheometry). Reometrija je započeta 4 min nakon dodavanja sirila (poglavlje 4.4.), unošenjem uzorka u donji deo „Vane“ geometrije koja je prethodno temperirana na 31°C.

Formiranje gela praćeno je merenjem modula viskoznosti G'' i modula elastičnosti G' , kao i odgovarajućeg faznog ugla $\delta = \arctan(G''/G')$ u funkciji od vremena (time sweep measurement), pri frekvenciji oscilacije od 1Hz i deformaciji od 0,01%. Merenje je trajalo 60 min.

Neposredno posle pomenute sekvence, izvršeno je merenje modula elastičnosti, G' sukcesivnom promenom frekvencije od 20 Hz do 0.1 Hz sa deformacijom od 0.01% (frequency sweep measurement).

Na osnovu grafika dobijenih reološkim merenjima računati su sledeći parametri: vreme koagulacije (CT), brzina agregiranja (AR) i čvrstina gruša (CF), po metodi Dimassi et al., (2005).

Vreme koagulacije [s] je računato kao momenat u kom fazni ugao dostiže vrednost 45° . Brzina agregiranja je definisana kao nagib tangente u prevojnoj tački krive zavisnosti modula viskoznosti od vremena [Pa/s], a računata je kao maksimum prvog izvoda navedene funkcije (Slika 3).



Slika 3. Reometrija procesa prelaska mleka iz stanja sola u stanje gela pod uticajem sirila (Dimassi et al., 2005)

Čvrstoća gruša je određena na osnovu krive zavisnosti modula elastičnosti G' od frekvencije. CF zapravo predstavlja vrednost izmerenog modula elastičnosti pri frekvenciji od 1.5 Hz i izražava se u [Pa].

Svi navedeni parametri računati su pomoću računarskog programa OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA)

4.4.2.2. Određivanje kontrolnog i realnog randmana

Odmah nakon dodatka sirila u mleko (poglavlje 4.4.1.), direktno iz duplikatorskog suda uzeti su uzorci za određivanje kontrolnog randmana (po tri uzorka od svake varijante termičkog tretmana), i postavljeni u vodeno kupatilo temperirano na 31°C . Dalji tok eksperimenta vršen je metodom po Hallen-u (2008), na način opisan u poglavlju 4.3.1.

U cilju računanja realnog randmana merena je masa grude, odmah nakon faze presovanja, pre soljenja. Randman je računat kao masa grude [kg] koja se dobija od 100 kg mleka (Sabadoš, D, 1996, Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). Kontrolni randman je radi poređenja izražavan na isti način.

4.4.2.3. Statistička obrada podataka

Svi opisani eksperimenti su ponovljeni tri puta. Rezultati su obrađeni primenom jednofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde je termički tretman posmatran kao faktor. Četiri zasebne analize varijanse obuhvatile su sledeće zavisne promenljive: CT, AR, CF i randman. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Vršena je takođe i korelaciona analiza kako bi se utvrdio stepen povezanosti između realnog randmana i: (1) kontrolnog randmana; (2) CT; (3) AR; (4) CF, na nivou statističke značajnosti takođe $\alpha = 0,05$.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.4.3. Hemijski sastav i sastav proteina surutke

U toku čitave faze ceđenja i presovanja sireva, kako kontrolnih tako i eksperimentalnih, sakupljana je surutka. Iz celokupne mase surutke, nakon mešanja uzet je uzorak od 300 ml. Sva tri uzorka surutke analizirani su u pogledu sadržaja suve materije, masti i proteina prema metodama opisanim u poglavlju 4.1.1. Sastav proteina analiziran je SDS-PAGE metodom opisanom u poglavljima 4.1.6., 4.1.7. i 4.1.8. Jedina razlika u postupku pripreme uzoraka surutke u odnosu na pripremu uzoraka mleka je u tome što se uzorci surutke mešani sa *redukujućim puferom za uzorke* u odnosu 1:1.

Procenat iskorišćenje masti i proteina mleka prilikom proizvodnje sira računat je prema metodi Lau et al., (1990) na sledeći način:

$$DFW = ((Wm-R) \times Fs) / (Wm \times Fm) \times 100$$

$$DFC = 100 - DFW$$

DFW – udeo masti koji odlazi u surutku (%)

DFC – udeo masti koji se zadržava u siru (%), odnosno iskorišćenje masti.

Wm – masa mleka - 100kg

R– randman (kg)

Fs – sadržaj masti u surutki (%)

Fm – sadržaj masti u mleku (%)

Na isti način računato je iskorišćenje proteina.

4.4.3.1. Statistička obrada podataka

Svaki opisani eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su obrađeni primenom jednofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde je termički tretman posmatran kao faktor. Tri zasebne analize varijanse obuhvatile su sledeće zavisne promenljive: sadržaj masti, sadržaj proteina i sadržaj suve materije. U cilju poređenja srednjih vrednosti ispitivanih parametara hemijskog sastava surutke primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.5. Zrenje kozjih belih sireva u salamuri

Nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja, uzorci kontrolne i eksperimentalne varijanti sireva su analizirani, kako bi se odredili osnovni parametri njihovog kvaliteta, proteolitičke promene i teksturalna svojstva. Vršena je takođe i senzorna analiza sireva, i to nakon 3, 10 i 40 dana.

Obzirom na to da su sve tri varijante sira proizvedene tri puta, sve analize vršene su takođe u triplicatu.

4.5.1. Promene osnovnih parametara kvaliteta sireva tokom zrenja

Sadržaj ukupne suve materije u ispitivanim uzorcima određen je standardnom metodom sušenja na temperaturi $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ (FIL-IDF, 1982). Sadržaj masti je određen metodom po Van Gulik-u (FIL-IDF, 1986). Sadržaj azota odnosno proteina je određen metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1990). Sadržaj soli u siru određen je metodom po Volhart-u (FIL-IDF, 1988b). pH vrednost je merena nakon homogenizacije 10 g uzorka sa 10 mL destilovane vode, uz upotrebu digitalnog pH-metra (Consort, Belgium) (Ardö i Polychroniadou, 1999).

Računati su takođe i međusobni odnosi pojedinih parametara hemijskog sastava sireva značajnih za analizu toka zrenja: voda u bezmasnoj materiji sira (VuBM), mast u suvoj materiji sira (MuSM), so u vodenoj fazi sira (SuVF), odnos proteina i masti u siru (P/M).

4.5.1.1. Statistička obrada podataka

Svaki opisani eksperiment je ponovljen tri puta, na sirevima iz tri zasebne proizvodnje. Rezultati su obrađeni primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde su termički tretman i stadijum zrenja posmatrani kao faktor. Kao zasebne zavisne promenljive analizirani su svi navedeni parametri fizičko-hemijskog sastava, kao i njihovi međusobni odnosi. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.5.2. Proteolitičke promene tokom zrenja sireva

4.5.2.1. Primarna proteoliza

Praćenje primarne proteolize, vršeno je pomoću SDS-PAGE. Priprema uzoraka sireva vršena je na sledeći način: 0,4 g uzorka odmereno je u polipropilensku kivetu, a zatim je dodato 5 ml *redukujućeg pufera za ekstrakciju* čiji je sastav opisan u poglavlju 4.1.6. Nakon potpunog rastvaranja uzoraka sira u ključalom vodenom

kupatilu, i hlađenja, rastvoru je dodat *redukujući pufer za uzorke* u razmeri 1:3. Dalji tok analize identičan je metodi opisanoj u poglavljima 4.1.7. i 4.1.8.

4.5.2.2. Sekundarna proteoliza

Sekundarna proteoliza, odnosno dubina zrenja, praćena je sadržajem azotnih materija sira rastvorljivih u 12% TCA. Na ovaj način dobija se azotna frakcija koja sadrži neproteinske azotne materije, odnosno aminokiseline i peptide koji sadrže do 20 aminokiselinskih ostataka (Rohm et al., 1996).

Koncentracija TCA upotrebljena za frakcionisanje varira u literaturi od 2 – 12% (w/v). Postoje takođe i grupe metoda koje se razlikuju u odnosu na to da li je frakcionisanje pomoću TCA vršeno iz vodenog ekstrakta sira ili iz frakcije rastvorljive pri pH 4.4. (Ardö i Polychroniadou, 1999, Polychroniadou et al., 1999).

U ovom radu analiza je vršena metodom (O'Keeffe et al., 1978), po kojoj se azotne materije rastvorljive u 12% TCA frakcionišu iz vodenog ekstrakta sira, a izražene su kao procentni udeo od ukupnih azotnih materija $(TCA-SN/TN) \times 100$

4.5.2.3. Statistička obrada podataka

Svaki opisani eksperiment je ponovljen tri puta, odnosno obuhvatao je sireve iz tri zasebne proizvodnje. Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde su termički tretman i stadijum zrenja posmatrani kao faktor, obrađeni su rezultati dobijeni denzitometrijskom analizom elektroforetograma za procentualno učešće procenta rezidualnog α_{s1} -CN i β -CN, koji su posmatrani kao zasebne zavisne promenljive.

Jednofaktorijalnom analizom varijanse obrađeni su podaci za procentualno učešće kazeinskih frakcija, glavnih serum proteina kao i serum proteina velikih molekulskih masa, u usirevima, jedan dan nakon proizvodnje. Svi navedeni procentualni udeli posmatrani su kao zavisne promenljive, dok je termički tretman posmatran kao faktor.

Dvofaktorijalna ANOVA primenjena je takođe i na rezultate dobijene analizom azotne frakcije rastvorljive u 12% TCA, gde je procentni udeo ove frakcije u

ukupnim azotnim materijama predstavljao zavisnu promenljivu, dok su termički tretman i statijum zrenja posmatrani kao faktori.

U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.5.3. Promena teksturalnih svojstava tokom zrenja sireva

Analiza teksture izvedena je pomoću instrumenta: Texture Analyser TA.XTPlus, sa ćelijom kapaciteta 5 kg (Stable Micro Systems, Surrey, UK), primenom tri metode: metod preloma klinom, metod penetracije sferičnom sondom i metod sečenja žicom. Pre nego što je izvedena analiza teksture sirevi su izvađeni iz salamure i temperirani na sobnoj temperaturi ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) tri sata kako bi se ova temperatura uspostavila u čitavoj masi svakog uzorka.

4.5.3.1. Metod preloma klinom (Wedge Fracture Test)

Analiza teksture metodom preloma klinom izvršena je na po šest uzoraka svake varijante sira, dimenzije 3 x 2 x 2 cm. Prelom uzoraka klinom vršen je do dubine od 10 mm računajući ukupno dubinu do koje je penetrirao gornji i donji klin. Brzina penetracije klina bila je 2 mm/s, a sila aktivacije 5 g. Ovom metodom izmeren je parametar „Tvrdoća pri lomljenju“ [g].

4.5.3.2. Metod penetracije sferičnom sondom (Spherical probe test)

Metodom penetracije sferičnom sondom izvršena je analiza teksture na po šest uzoraka sve tri varijante sira, dimenzije 3 x 2 x 2 cm. Vršena kompresija od 25% od početne visine uzorka (5 mm), brzinom od 2mm/s, pri čemu je sila aktivacije bila 2,5 g. Ovom metodom merena su dva parametra: „Tvrdoća pri kompresiji“ [g] i „Lepljivost“ [g]

4.5.3.3. Metod sečenja žicom (Wire Cutter Test)

Metodom sečenja žicom analizirani su uzorci sira dimenzije 6 x 4 x 2 cm, na kojima je izvršena analiza teksture metodom sečenja uz pomoć žice debljine 0,3 mm.

Sečenje uzoraka je izvršeno do dubine od 15 mm, brzinom od 0,5 mm/s, pri čemu je sila aktivacije iznosila 50 g. "Čvrstoća pri sečenju" [g]

4.5.3.4. Softverska analiza grafika

Nakon merenja teksture izvršenih pomenutim metodama, izračunavanje vrednosti parametara teksture sa dobijenih grafika vršeni su kompjuterskim programom EXPONENT specijalno dizajniranim za navedeni analizator teksture.

4.5.3.5. Statistička obrada podataka

Svaki opisani eksperiment je ponovljen tri puta, na sirevima iz tri zasebne proizvodnje. Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde su termički tretman i stadijum zrenja posmatrani kao faktor, obrađeni su rezultati analize teksture za tvrdoću pri lomljenju, tvrdoću pri kompresiji, čvrstinu pri sečenju, koji su posmatrani kao zasebne zavisne promenljive.

U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Vršena je takođe i korelaciona analiza između parametara: tvrdoća pri lomljenju i čvrstina pri sečenju; tvrdoća pri lomljenju, pH vrednost;

Statistička obrada podataka izvršena je primenom kompjuterskog programa Statistika 10.0.

4.5.4. Senzorna analiza sireva

Senzorna analiza oglednih proizvoda obuhvatila je: deskriptivnu senzornu analizu, senzorno testiranje potrošača i senzorno ocenjivanje kvaliteta. Deskriptivna analiza i senzorno testiranje potrošača realizovani su u Laboratoriji za senzorno ispitivanje namirnica, dok je senzorno ocenjivanje kvaliteta izvedeno u Laboratoriji za tehnologiju mleka, na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

4.5.4.1. Uzorci

Za potrebe ispitivanja obezbeđena je dovoljna količina sireva proizvedenih od mleka tretiranog primenom tri različita termička tretmana (65°C/30 min, 80°C/30 min i 90°C/30 min). Svi primenjeni oblici senzornog ispitivanja izvedeni su u

ranoj, srednjoj i kasnoj fazi zrenja sira, odnosno nakon 3, 10 i 40 dana zrenja. Na ovaj način, ispitivanjem je obuhvaćeno devet oglednih proizvoda (potpuni blok).

Za potrebe deskriptivne analize od strane senzornog panela obezbeđeno je svih devet uzoraka istovremeno, u dva ponavljanja. Pre analize uzorci su vađeni iz salamure i temperirani na sobnu temperaturu 1h. Svih 9 uzoraka servirani su istovremeno.

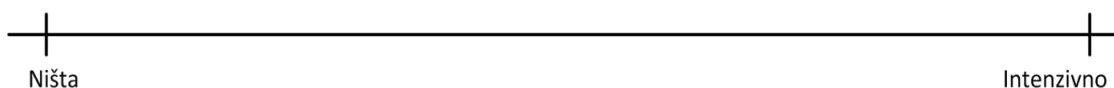
Za potrebe ocenjivanja prihvatljivosti od strane potrošača, kao i ocene kvaliteta od strane stručne komisije, obezbeđeno je po 3 varijante sireva u tri različita dana. Najpre su servirani sirevi koji su sazrevali 3, zatim 10 i na kraju 40 dana.

Svi radni uzorci sira šifrirani su slučajno odabranim trocifrenim brojevima i servirani ocenjivačima na papirnim tanjirima.

Za ispiranje usta tokom rada korišćena je niskomineralizovana flaširana voda.

4.5.4.2. Deskriptivna senzorna analiza i eksterno mapiranje preferencije

Senzorni panel za deskriptivnu analizu se sastojao od 8 osoba iz redova osoblja i studenta master studija Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U okviru tri dvočasovne sesije, panel je uvežbavan u pogledu prepoznavanja svojstava od interesa uz korišćenje referentnih uzoraka prikazanih u Tabeli 1. Deskriptivnom analizom, u ovom radu, obuhvaćena su samo određena svojstva vezana za ukusnost proizvoda. Senzorna svojstva prikazana u Tabeli 2. odabrana su iz leksikona senzornih svojstava za kozji sir (Carunchia Whetstine et al., 2003), uz određena prilagođavanja u odnosu na specifičan tip sireva koji je u ovom radu analiziran.



Slika 4. Izgled skale za ispitivanje intenziteta odabranih senzornih svojstava

Deskriptivna analiza je izvedena u skladu sa metodologijom opisanom u literaturi (Meilgaard et al., 1999; Lawless i Heymann, 2010), u okviru koje je, međusobnim poređenjem uzoraka, meren intenzitet odabranih senzornih svojstava. Definicije ispitivanih senzornih svojstava prikazane su takođe u Tabeli 2. Za ispitivanje

intenziteta senzornih svojstava korišćena je linearna nestruktuirana skala dužine 15 cm sa opisanim krajnjim vrednostima (Slika 4). Ocenjivači su merili intenzitet pojedinačnih senzornih svojstava međusobnim poređenjem uzoraka, pri čemu im je bila ostavljena sloboda da različite delove skale koriste po svom nađenju.

Deskriptivna senzorna analiza je izvedena u dva ponavljanja.

Tabela 2. Spisak senzornih svojstava sa definicijama i referentnim proizvodima koji su korišćeni u deskriptivnoj analizi

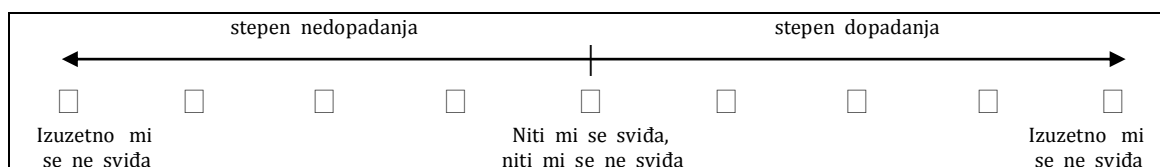
Senzorno svojstvo aroma/ukus	Opis senzornog svojstva	Referentni proizvodi
Na maslac	Aroma povezana sa prirodnim, svežim, maslacom	Maslac "Meggle", Kragujevac
Na kuvano mleko	Aroma povezana sa kuvanim mlekom (kombinacija slatkog i karamelizovanog)	Pasterizovano mleko "Imlek", Padinska Skela, 2.8% masti, kuvano na 85°C/10 min
Na kozu	Aroma koja podseća na vlažnu životinjsku dlaku (vuče na jetko, ustajalo i donekle kiselo)	Sirovo kozje mleko
Na surutku	Aroma povezana sa surutkom	Sveža kravlja surutka
Na kvasac	Aroma povezana sa fermentujućim kvascima	Sveži pekarski kvasac, "Vrenje", Beograd, rastvoren u vodi (3%)
Na jogurt	Aroma povezana sa jogurtom	Jogurt, "Imlek", Padinska Skela, 2.8% masti
Slan ukus	Osnovni ukus koji proizvode vodeni rastvori NaCl i drugih soli	Rastvor NaCl u vodi (1%)
Kiseo ukus	Osnovni ukus koji proizvode vodeni rastvori različitih kiselina kao što su limunska, sirćetna, fosforna, jabučna i dr.	Rastvor limunske kiseline u vodi (0,08%)
Sladak ukus	Osnovni ukus koji proizvode vodeni rastvori saharoze i drugih šećera.	Rastvor saharoze u vodi (1%)

4.5.4.3. Senzorno testiranje potrošača

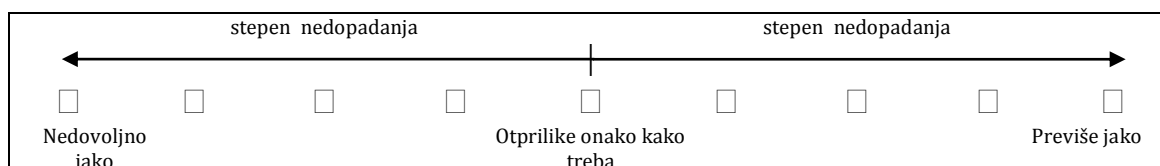
Senzorno testiranje potrošača u pogledu prihvatljivosti sireva proizvedenih od mleka tretiranog pomoću tri različita termička tretmana vršeno je u okviru tri odvojena dana, tako što su svi sirevi u okviru jednog testiranja bili istog stepena zrelosti. Ukupno je testirano 40 potrošača, pri čemu je svaka testirana osoba ocenila svih devet oglednih uzoraka.

Ocenjivački list se sastojao od dve grupe pitanja, u okviru kojih su korišćeni i različiti tipovi skala za merenje prihvatljivosti.

U okviru prve grupe pitanja od ispitanika je traženo da ocene: (1) stepen ukupne prihvatljivosti proizvoda (kao celine), (2) stepen prihvatljivosti mirisa (3) stepen prihvatljivosti ukusa i (4) stepen prihvatljivosti teksture odnosno konzistencije, primenom hedonske skale od 9 podeoka (Slika 5). Centralna vrednost hedonske skale se odnosi na indiferentan stav potrošača prema proizvodu (“niti mi se dopada niti mi se ne dopada”). Od ove vrednosti u desnu stranu raste stepen dopadanja, a u levu stepen nedopadanja (Meilgaard et al., 1999; Lawless i Heymann, 2010).



Slika 5. Hedonska skala korišćena za ispitivanje stepena prihvatljivosti odabranih senzornih svojstava



Slika 6. Skala “upravo onako kako bi trebalo da bude”

U okviru druge grupe pitanja od ispitanika je traženo da ocene: (1) intenzitet kiselog ukusa, (2) intenzitet slanog ukusa, (3) intenzitet ukupne jačine ukusa, (4) tvrdoću i (5) masnoću sireva, primenom skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” koja se takođe sastojala od 9 podeoka (Slika 6). Centralna vrednost skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” se odnosi na optimalni nivo intenziteta ispitivanog svojstva (“kako treba da bude”), onako kako ga potrošač doživljava kao prihvatljivog, dok prema desnoj i levoj strani raste stepen nedopadanja zbog jače i slabije izraženog svojstva, respektivno. Naime, kod intenziteta kiselog ukusa leva strana skale se odnosila na “nedovoljno kiselo”, a desna na “previše kiselo”; kod intenziteta slanog ukusa leva strana se odnosila na “nedovoljno slano”, a desna na “previše slano”; kod tvrdoće sira, leva strana se odnosila na “previše meko”, a

desna na “previše tvrdo”; kod ukupne jačine ukusa, leva strana odnosila se na “nedovoljno jak ukus” a desna na “previše jak ukus”, dok se za stepen masnoće sira leva strana odnosila na “nedovoljno mastan” a desna na “previše mastan” sir.

4.5.4.4. Senzorna ocena kvaliteta sireva

Senzorno ispitivanje kvaliteta sireva vršeno je primenom korigovanog petobalnog bod sistema (Radovanović i Popov-Raljić, 2001), u okviru kojeg je ukupan senzorni kvalitet ocenjivan preko sledećih odabranih grupa senzornih svojstava: spoljni izgled, izgled preseka, miris, ukus i konzistencija.

Stručna komisija sastojala se od 5 članova: 4 doktora nauka u naučnoj oblasti “nauka o mleku” i 1 stručni saradnik na Odeljenju za tehnologiju mleka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Tabela 3. Uputstvo za senzornu ocenu kvaliteta kozjih belih sireva u salamuri

Senzorni atributi	Senzorni defekti
Spoljašnji izgled	Kriška pravilnih dimenzija bez oštećenja, ujednačene izrazito bele boje (5) Delimično oštećena i deformisana kriška, primese žute ili ružičaste boje (3) Nepravilan oblik, izražena oštećenja, rupe, pukotine, neujednačena boja (1) Ostali defekti (1, 2, 3)
Izgled preseka	Gladak presek, pravilne, ne suviše izražene šupljike (5) Povećan broj krupnih i/ili sitnih šupljika nepravilnog oblika i rasporeda (3) Veliki broj šupljika, znaci nadimanja (1) Ostali defekti (1, 2, 3)
Miris	Mlečno kiseo, jasno izražen (5) Mlečno kiseo slabo izražen (3) Jako kiseo sa primesama stranih mirisa (na loj, kvasce...) (1) Ostali defekti (1, 2, 3)
Ukus	Prijatan, mlečno kiseo umereno slan, jasno izražen (5) Prijatan ali nedovoljno izražen, izraženija kiselost ili slanost (4) Neprijatan, prekiseo, metalan, gorak, ukus na loj (1) Ostali defekti (1, 2, 3)
Konzi- stencija	Srednje čvrsta, povezana (5) Slabije povezana, delimično lomljiva, brašnjava, suva (3) Suviše meka ili suviše čvrsta, izrazito lomljiva, brašnjava, suva (1) Ostali defekti (1, 2, 3)

Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 0 do 5 sa mogućnošću davanja polubodova (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5). Korišćeno je takođe i uputstvo dato u Tabeli 3. Obzirom da reprezentativna svojstva nemaju jednak uticaj na ukupni kvalitet, za

svako odabrano svojstvo kvaliteta određen je koeficijent važnosti (KV) pomoću kojeg je vršena korekcija (množenjem) date ocene. Ispitivani parametri kvaliteta sa određenim koeficijentima važnosti su obuhvatili sledeće: spoljni izgled-2, izgled preseka-3, miris-4, ukus-6 i konzistencija-5. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na ukupan kvalitet, a izbalansirani tako da njihov zbir iznosi 20. Sabiranjem pojedinačnih korigovanih ocena dobijen je jedinstven kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet i koji se izražava kao “% od maksimalno mogućeg kvaliteta”. Deljenjem ove vrednosti sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobijena je ponderisana srednja ocena koja takođe izražava ukupni senzorni kvalitet sira.

Senzorno ocenjivanje kvaliteta je izvedeno sa jednim ponavljanjem.

4.5.4.6. Statistička obrada podataka

- Deskriptivna senzorna analiza

Izmerene vrednosti sa skala intenziteta očitavane su “ručno”, uz pomoć lenjira. U cilju provere značajnosti multivarijacionog efekta kod uzoraka u pogledu ispitivanih svojstava, originalni deskriptivni podaci su, za svakog ocenjivača posebno uključujući oba ponavljanja, prvo standardizovani (Romano et al., 2008), da bi zatim bili podvrgnuti jednofaktorskoj multivarijacionoj analizi varijanse (MANOVA) u okviru koje je “uzorak” odabran kao promenljiva sa fiksnim nivoom faktora. Standardizovani deskriptivni podaci su dalje, u cilju identifikovanja senzornih svojstava u okviru kojih su se ispitivani proizvodi značajno razlikovali, bili podvrgnuti trofaktorijalnoj analizi varijanse (ANOVA), pri čemu je “uzorak” odabran kao promenljiva sa fiksnim nivoom faktora, dok su “ocenjivači” i “ponavljanje ispitivanja” odabrani kao promenljive sa slučajnim nivoom faktora.

Statistička analiza koja je imala za cilj redukciju polaznih dimenzija obuhvatila je sva ispitivana senzorna svojstva. Originalni podaci deskriptivne analize su prvo grupisani po ocenjivačima za svako ponavljanje ispitivanja posebno (matrice sa po 9 redova – uzorci, i 9 kolona – ispitivana senzorna svojstva) i inicijalno obrađeni primenom uopštene Prokrust analize (GPA – Generalized Procrustes Analysis) u cilju dobijanja konsenzus podataka (Dijtherhuis, 1996). Konsenzus podaci

dobijeni GPA analizom su obrađeni primenom analize glavnih komponentata (PCA – Principal Component Analysis) bazirane na korelacionoj matrici (Næs et al., 2010). Ekstrahovane glavne komponente su korišćene kao prediktori (nezavisno-promenljive) u daljoj analizi podataka primenom linearne višestruke regresije.

Ocene ukupne prihvatljivosti sireva, dobijene testiranjem potrošača uz primenu hedonske skale su, posebno za svakog potrošača, podvrgnute linearnoj višestrukoj regresiji na glavne komponente ekstrahovane primenom PCA analize (McEwan, 1996). Ukupan broj potrošača čije su ocene uključene u postupak višestruke regresije iznosio je 40. Dobijeni nestandardizovani regresioni koeficijenti su podvrgnuti klaster analizi (klasterovanje pomoću K-sredina) u cilju izdvajanja grupa potrošača (klastera) sa sličnim mišljem o prihvatljivosti sireva. Srednje vrednosti regresionih koeficijenata za identifikovane klasterne unošene su u PCA dijagrame. Ovakva metoda, gde se prvo primeni PCA na deskriptivne senzorne podatke, a zatim primeni regresioni model kako bi se izvršila regresija ocena prihvatljivosti od strane potrošača na uzoračke PCA koordinate, naziva se eksterno mapiranje prihvatljivosti (PREFMAP - External preference mapping) (McEwan, 1996; Næs et al., 2010).

- Senzorno testiranje potrošača

Uzimajući u obzir klasterne/grupe potrošača formirane primenom klaster analize u okviru eksternog mapiranja preferencije, ocene prihvatljivosti dobijene primenom hedonske skale, za svaki ispitivani parametar posebno (miris, ukus, tekstura i ukupna prihvatljivost), su podvrgute trofaktorijalnoj ANOVA gde su kao nezavisno promenljive sa fiksnim nivoima faktora odabrane “grupe potrošača / klasteri”, “termički tretman” i “stadijum zrenja”. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Podaci dobijeni primenom hedonske skale su takođe, nezavisno od klaster/grupa potrošača, obrađeni primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), za miris, ukus, teksturu i ukupnu prihvatljivost posebno, gde su ispitivani efekti primenjenih nivoa termičkog tretmana i stadijuma zrenja, kao i njihove interakcije.

U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je Tukey HSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Podaci dobijeni primenom skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” najpre su prikazani u vidu distribucije učestalosti ocena. U ovom delu analize podataka izvršena je transformacija originalnih ocena iz skale od 9 podeoka u skalu sa 5 podeoka. Drugim rečima, originalne ocene su raspoređene u pet novih podgrupa. Ocene 4, 5 i 6 svrstane su grupu “kako treba”, ocene 2 i 3 u grupu “umereno odstupa (-)”, ocene 7 i 8 u grupu “umereno odstupa (+)”, dok su ocene 1 i 9 činile grupe “izrazito odstupa (-)” i “izrazito odstupa (+), redosledno”. Ukoliko je više od 80% potrošača za određeno svojstvo dalo ocenu 4, 5 ili 6, može se smatrati da je za konkretan uzorak intenzitet tog istog svojstva prihvatljiv za potrošače.

Nakon toga, podaci dobijeni na osnovu skale “onako kako treba da bude” obrađeni su takođe i primenom metode “pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda” (Mean drop analysis). U okviru ove metode, pad srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda se posmatra u odnosu na ocene dobijene primenom skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” za svako ispitivano svojstvo, gde se podaci grupišu u tri grupe: (1) grupa ocena ispod “kako treba da bude”, (2) grupa ocena “kako treba da bude” i (3) grupa ocena iznad “kako treba da bude”. Uzimajući u obzir da je skala bila relativno osetljiva, sa 9 podeoka (od 1 do 9), u grupu ocena “kako treba da bude” svrstane su originalne ocene “4”, “5” i “6”. Ovakav pristup je opravdan uzimajući u obzir da je psihologija potrošača takva da se, prilikom probanja uzorka, po pravilu teže odlučuje za davanje ocene “kako treba da bude” iz razloga što u mislima uvek postoji neki idealan proizvod čija su svojstva na višem nivou u odnosu na proizvod koji se trenutno testira. Grupa ocena ispod “kako treba da bude” obuhvatila je originalne ocene “1”, “2” i “3”, a grupa ocena iznad “kako treba da bude” ocene “7”, “8” i “9”. Razlika u srednjim vrednostima ocena ukupne prihvatljivosti proizvoda ispitana je primenom jednofaktorijalne ANOVA (gde su pomenute grupe ocena posmatrane kao fiksni faktor) i Tukey HSD testa. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Grupe ocena ispod ili iznad “kako treba da bude” kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ocena ukupne prihvatljivosti proizvoda, ispitane su u pogledu broja testiranih potrošača koji su dali ocenu koja pripada odgovarajućoj grupi. Samo kod onih grupa kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika u ukupnoj prihvatljivosti i kod kojih je pripadajući broj potrošača bio značajno veliki, izvođen je zaključak da su potrošači ocenili posmatrani uzorak kao proizvod sa većim ili manjim intenzitetom posmatranog svojstva u odnosu na proizvod “kako treba da bude”. Sve grupe koje su brojale više ili jednako 20 % od ukupnog broja testiranih potrošača tretirane su kao značajno velike, što je i uobičajena praksa za ovakvu vrstu ispitivanja (Lawless i Heymann, 2010).

- Ocena kvaliteta sireva

Podaci dobijeni primenom petobalnog bod sistema obrađeni su primenom trofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde su “stadijum zrenja” i “termički tretman” odabrane kao nezavisne promenljive sa fiksnim nivoima faktora, a “ocenjivači” kao promenljiva sa slučajnim nivoom faktora. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocene kvaliteta ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Između srednje vrednosti ocena koje su potrošači dali za ukupnu prihvatljivost uzoraka i srednje ponderisane ocene koje je stručna komisija dala za ukupan kvalitet sireva izvršena je korelaciona analiza na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

- Softver

GPA analiza urađena je primenom statističkog softvera Idiogrid verzija 2.4 od 05.19.2008 (Grice, 2002). Svi preostali statistički testovi su izvedeni uz primenu statističkog softvera SPSS (verzija 17.0 od 01.12.2008).

5. Rezultati i diskusija

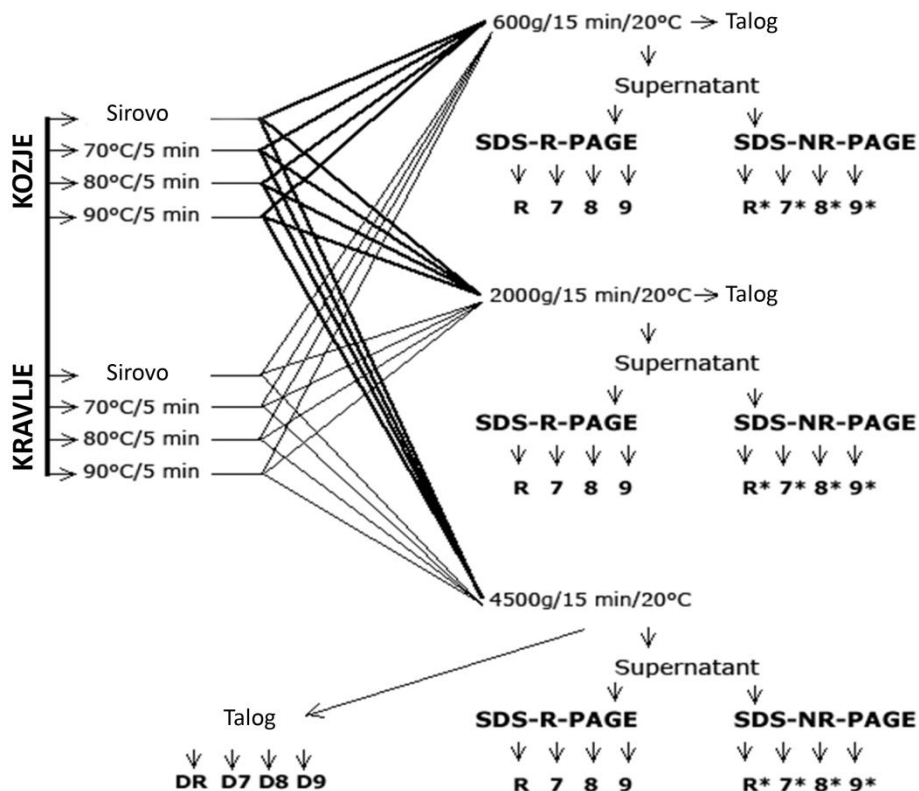
5.1. Efekat termičkog tretmana i intenziteta centrifugalne sile pri obiranju kozjeg i kravljeg mleka na formiranje taloga

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, uticaj termičkog tretmana na proteine mleka, o kom će biti reči u ovom i sledećem poglavlju, praćen je elektroforetskim tehnikama, koje podrazumevaju prethodno uklanjanje masti iz uzorka. Tokom preliminarnih istraživanja (rezultati nisu prikazani), prilikom obiranja uzoraka za elektroforezu, primećeno je stvaranje taloga tokom centrifugiranja. Primećeno je takođe i to da je količina taloga u slučaju kozjeg mleka veća nego u slučaju kravljeg mleka ukoliko se primeni isti režim obiranja.

U literaturi se može naći čitav niz uslova centrifugiranja u cilju obiranja uzoraka mleka za elektroforezu: 8500 g/15 min/4 °C (Lindmark-Månsson et al., 2005), 5000 g/20 min/4 °C (Sandra i Dalgleish, 2007), 4500 g/20min/20 °C (García-Risco et al., 2002), 3000 g/30min/5 °C (Calvo i Espinoza, 1999), 3000 g/30 min/15 °C (Lieske et al., 1997), 2000 g/30 min/32 °C (Devold et al., 2000), 2000 g/30 min/4 °C (Moatsou et al., 2004), 1620 g/10 min/20 °C (Shuiep et al., 2013), 1000 g/30 min/4 °C (Law i Leaver, 2000), 600 g/15 min/20 °C (Raynal i Remeuf, 1998). Ni u jednoj od navedenih publikacija nije navedeno na osnovu čega je izvršen odabir primenjenih uslova obiranja, samim tim nije moguće utvrditi koji je razlog za postojanje tako širokog spektra režima koji se koriste za centrifugiranje uzoraka mleka.

S tim u vezi, pre nego što se pristupi elektroforetskoj analizi uticaja termičkih tretmana na proteine mleka, potrebno je utvrditi uslove obiranja koji će biti primenjeni. Optimalni uslovi obuhvatali bi visoku efikasnost obiranja mleka bez gubitaka u pogledu sadržaja proteina. Cilj ovog dela rada je da se uporedi maseni udeo formiranog taloga, da se utvrdi u kojoj meri dolazi do taloženja proteina tokom obiranja, a takođe i da se ispita da li termički tretman, koji prethodi obiranju

ima uticaj na taloženje proteina tokom centrifugiranja mleka. Odgovori na navedena pitanja imali bi za cilj takođe i da daju doprinos u utvrđivanju razlika u koloidnoj stabilnosti kozjeg i kravljeg mleka.



Slika 7. Šema pripreme i označavanja uzoraka

U cilju pojednostavljenja analize i diskusije dobijenih rezultata, na Slici 7 prikazana je šema pripreme uzoraka opisanih u poglavlju *Materijal i metode*, kao i način označavanja uzoraka.

5.1.1. Osnovni parametri kvaliteta sirovog kravljeg i kozjeg mleka

Pre bilo kakve pripreme uzoraka analizirani su osnovni fizičko-hemijski parametri sirovog kozjeg i kravljeg mleka. Dobijeni rezultati (Tabela 4) su u velikoj meri uporedivi sa parametrima objavljenim od strane autora (Raynal-Ljutovac et al., 2008), međutim u odnosu na parametre kvaliteta objavljene od strane (Božanić et al., 2002, Park, 2006) možemo uočiti da postoji nešto niži sadržaj proteina i suve materije u uzorcima mleka analiziranim u ovom radu.

Iz Tabele 4 se može uočiti da postoji velika sličnost između fizičko-hemijskih parametara kravljeg i kozjeg mleka. Međutim, postoji razlika između vrednosti standardne devijacije, pri čemu je ona nešto viša kod kozjeg nego kod kravljeg mleka. Razlog tome je uobičajeno variranje u sastavu kozjeg mleka na početku laktacije (Park, 2006).

Tabela 4. Osnovni fizičko-hemijski parametri kvaliteta sirovog mleka (april-maj)

	Kozje mleko	Kravlje mleko
pH	6,63±0,04	6,74±0,04
Titraciona kiselost (°SH)	6,18±0,09	7,32±0,11
Sadržaj proteina (%)	2,79±0,22	2,94±0,11
Sadržaj masti (%)	3,5±0,42	3,72±0,26
Sadržaj suve materije (%)	11,64±1,00	11,77±0,27

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

5.1.2. Maseni udeo taloga

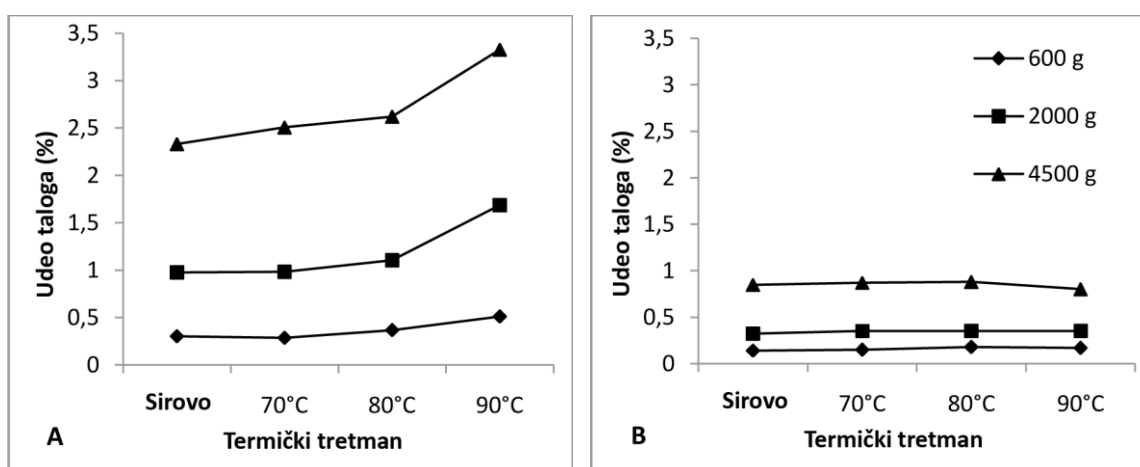
Na osnovu statističke obrade podataka prema planu podeljenih parcela (Split-Plot) (Tabela 5) pokazalo se da postoji značajan uticaj centrifugalne sile na formiranje taloga i kod kozjeg i kod kravljeg mleka ($p < 0,05$). U slučaju kozjeg mleka, termička obrada koja je prethodila obiranju, značajno je uticala na maseni udeo taloga nakon ($p < 0,05$): oštrij termički tretman uslovio je uvećanje taloga.

Tabela 5. Statistička analiza masenih udela taloga prema planu podeljenih parcela

Faktor	Kravlje mleko		Kozje mleko	
	MS	P	MS	P
Glavna parcela				
Blok	0.0029	0.2136	0.0131	0.4710
Centrifugalna sila	1.5501	<0.0001	16.7355	<0.0001
Podparcela				
Termički tretman	0.0018	0.4435	0.7600	0.0151
Interakcija	0.0018	0.4331	0.0922	0.0013
(Centrifugalna sila x termički tretman)				
Eksperimentalna greška	0.0017		0.01676	

Značajan uticaj bloka na formiranje taloga nije postojao ni kod kravljeg ni kod kozjeg mleka, što govori o tome da ne postoji uticaj varijacija u fizičko-hemijskom sastavu između tri različite šarže mleka.

Efekti primenjenih uslova obiranja, kao i termičkog tretmana kozjeg i kravljeg mleka na maseni udeo formiranog taloga predstavljani su na Slici 8. Sa slike se jasno može uočiti postojanje razlike u količini formiranog taloga između dve ispitivane vrste mleka. U zavisnosti od primenjene centrifugalne sile i jačine termičkog tretmana, količina taloga nastala obiranjem kozjeg mleka je 2-4 puta veća u odnosu na kravlje mleko, u zavisnosti od termičkog tretmana i centrifugalne sile. Usled različitog načine sekrecije mleka, broj somatskih ćelija koje se mogu naći u ispravnom sirovom kozjem mleku je viši nego u ispravnom sirovom kravljem mleku (Park i Humphrey, 1986). Vrlo je moguće da u talogu kozjeg mleka postoji veća količina somatskih ćelija nego u talogu kravljeg mleka, ali postavlja se pitanje da li u toku centrifugiranja određeni proteini precipitiraju i zajedno sa somatskim ćelijama, ćelijskim ostacima i nečistoćama ulaze u sastav taloga. Dobijeni rezultati ukazuju na to da primenjeni režimi obiranja mleka imaju značajan uticaj i na kozje i na kravlje mleko, što ukazuje na potrebu da se definišu odgovarajući uslovi obiranja mleka u cilju što veće efikasnosti i što manjih gubitaka proteina.



Slika 8. Maseni udeli taloga formirani nakon centrifugiranja sirovog i termički tretiranog kozjeg (A) i kravljeg (B) mleka. Prikazane vrednosti predstavljaju aritmetičke sredine tri bloka

Može se uočiti takođe da sa povećanjem centrifugalne sile dolazi do izraženijeg uticaja termičkog tretmana na maseni udeo taloga dobijenog obiranjem kozjeg mleka (Slika 8A). Efekat termičkog tretmana koji je prethodio obiranju, na

formiranje taloga, posebno je uočljiv kada su u pitanju uzorci tretirani na 90°C centrifugirani silom od 2000 g i 4500 g.

U revijalnom radu koji se bavi procesima termičke obrade mleka (Livney et al., 2003) istaknuto je da pasterizacija ili termički tretmani na temperaturama ispod 100°C ne destabilizuju koloidni sistem mleka, međutim rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da se u slučaju kozjeg mleka koloidna stabilnost u određenoj meri narušava primenom sub-ultra visokih temperatura. U slučaju kravljeg mleka nije detektovana ovakva pojava.

5.1.3. Sadržaj proteina i masti u supernatantu

Supernatanti dobijeni centrifugiranjem sirovog mleka obe životinjske vrste analizirani su u pogledu sadržaja masti i proteina. Kada je reč o sadržaju masti dobijeni su isti rezultati za kozje i kravlje mleko. Prilikom obiranja masti primenom centrifugalne sile od 600g u supernatantu zaostaje 0,1 % masti dok je primenom sile od 2000g i 4500g postignuto kompletno obiranje (Tabela 5).

Tabela 5. Sadržaj proteina i masti u supernatantima kozjeg i kravljeg mleka

Vrsta mleka	Parametri	600g	2000g	4500g
Kozje	UP (%)	2,368±0,004 ^a	1,955±0,021 ^b	1,505±0,028 ^c
	M (%)	0,1	0	0
Kravlje	UP(%)	2,931±0,009 ^a	2,858±0,058 ^a	2,557±0,012 ^b
	M(%)	0,1	0	0

UP-ukupan sadržaj protein; M-ukupan sadržaj masti;

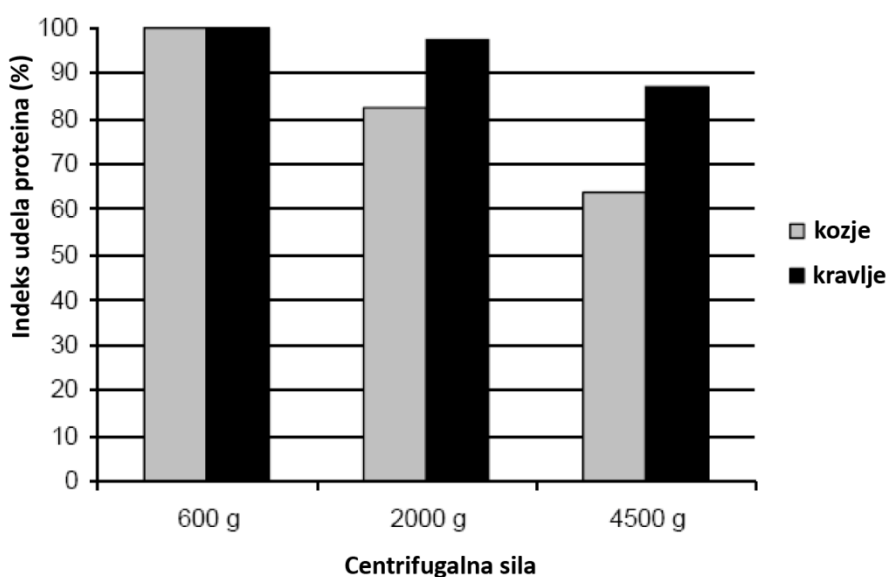
Rezultati u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja±standardna devijacija

Vrednosti za sadržaj proteina koje imaju različita slova u superskriptu značajno se razlikuju (p<0.05)

U Tabeli 5. pored sadržaja masti prikazan je sadržaj proteina u supernatantima dobijenim prilikom obiranja primenom različitih centrifugalnih sila.

Poređenjem sadržaja proteina t-testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između supernatanta dobijenog centrifugiranjem kravljeg mleka silom od 600 g i 2000 g. Međutim značajna razlika postoji između supernatanta dobijenog primenom centrifugalne sile od 600 g i 4500 g, iz čega proizilazi da obiranje mleka režimom 4500 g/15 min/20°C nije preporučljivo čak ni za kravlje mleko. Što se kozjeg mleka tiče, postoji statistički značajna razlika (p<0,05) između supernatanta dobijenog centrifugiranjem na 2000 g i 4500 g u poređenju sa 600 g.

Na osnovu ovakvog rezultata može se zaključiti da se u slučaju kozjeg mleka mora još pažljivije pristupiti odabiru centrifugalne sile prilikom obiranja, kako bi se izbegli gubici proteina taloženjem. Ispostavlja se na osnovu prethodno izloženog, da je režim obiranja 600 g/15 min/20°C jedini prihvatljiv izbor kada je reč o kozjem mleku. U slučaju kravljeg mleka postoji mogućnost da se izvrši potpuno obiranje režimom 2000 g/15 min/20°C. Režim obiranja 4500 g/15 min/20°C ispostavio se nepodesan za obe vrste mleka.



Slika 9. Indeks udela proteina u supernatantima kravljeg i kozjeg mleka

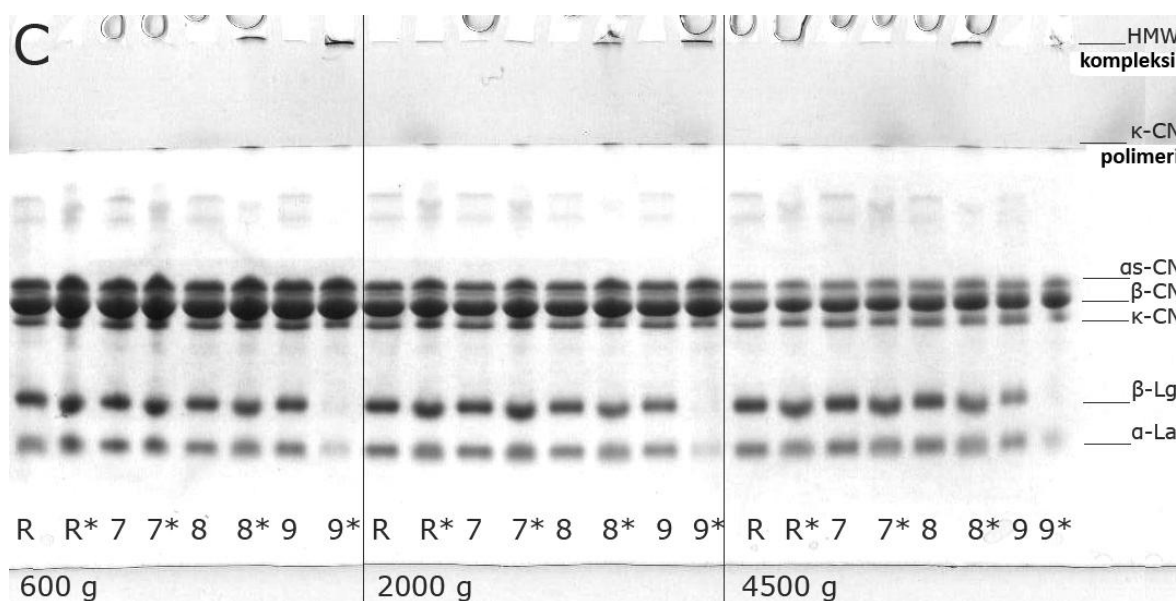
Na Slici 9, sadržaj proteina u supernatantima dobijenim centrifugiranjem mleka na 2000 g i 4500 g predstavljeni su u odnosu na sadržaj proteina u supernatantu dobijenom primenom najniže centrifugalne sile (600 g), i izraženi su kao indeks udela proteina. Na ovaj način, sadržaj proteina u supernatantu dobijenom najblažim režimom obiranja prikazan je kao 100% (Slika 9). Ovakav prikaz ilustruje razliku u uvećanju gubitaka proteina kod kozjeg i kravljeg mleka, odnosno predstavlja još jednu ilustraciju niže koloidne stabilnosti kozjeg mleka u odnosu na kravlje.

5.1.4. SDS-PAGE analiza supernatanta

Elektroforetogrami uzoraka supernatanta kravljeg i kozjeg mleka prikazani su na Slikama 10 i 11. Može se uočiti da 0,1 % masti koja je zaostala u supernatantu

nakon procesa centrifugiranja nije uticala na vidljivost proteinskih traka, pa samim tim ni na tačnost denzitometrijske analize.

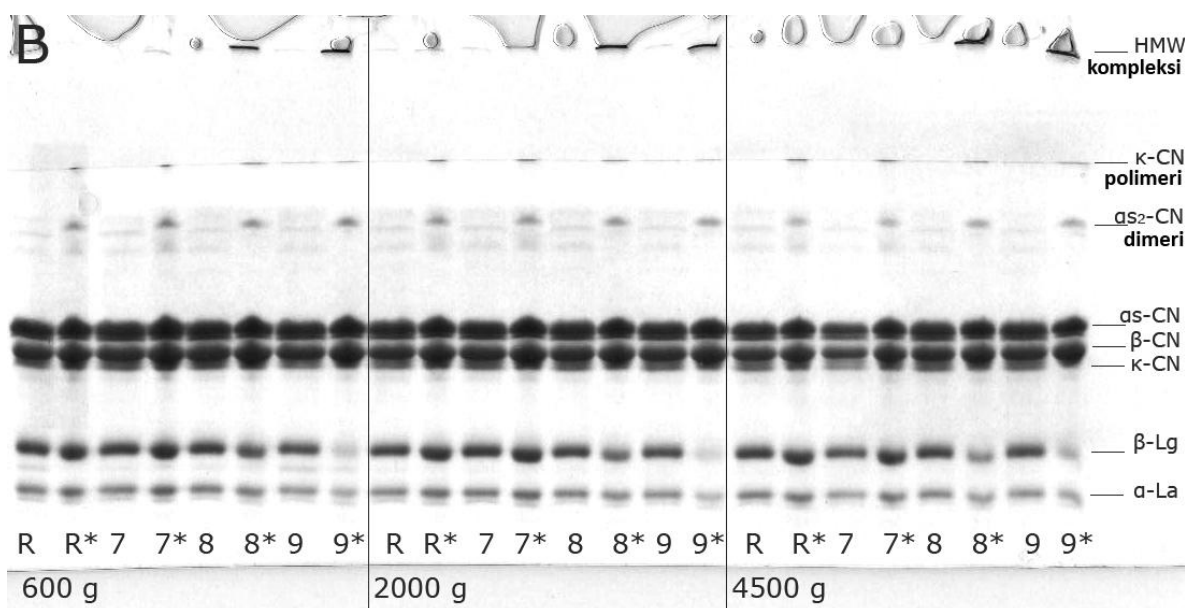
Kada se kozje mleko centrifugira na 4500 g, može se primetiti postojanje razlika između uzoraka supernatanta pripremljenih u redukujućim uslovima dobijenih od sirovog mleka (Slika 10. 4500g, traka R), i uzoraka grejanih na 80°C i 90°C (Slika 10. 4500g, trake 8 i 9), u pogledu intenziteta obojenja linija koje odgovaraju sadržaju β -lg. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji kada je u pitanju uzorak tertiran režimom 90°C/5 min i ostali uzorci pripremljeni u redukujućim uslovima. Intenzitet obojenja se smanjuje sa pooštavanjem termičkog tretmana, što je u saglasnosti sa predhodno prikazanim rezultatima masenih odnosa taloga (Slika 8) i sadržaja proteina u supernatantima (Tabela 5), odnosno govori u prilog tome da centrifugiranjem kozjeg mleka pomenutom centrifugalnom silom dolazi do taloženja određene količine proteina. Ovakva pojava izostaje kada je u pitanju kravlje mleko, a razlog može biti to što je maseni udeo taloga u slučaju kravljeg mleka višestruko manji.



Slika 10. SDS-PAGE elektroforetogrami supernatanta kozjeg mleka pripremljenih u redukujućim (trake R, 7, 8, 9) i neredukujućim uslovima (trake R*, 7*, 8*, 9*)

Takođe, na osnovu elektroforetograma uzoraka supernatanta kozjeg i kravljeg mleka (Slika 10 i 11), može se uočiti da odnos SDS-monomera/ukupnih monomera

β -laktoglobulina opada sa primenom jače centrifugalne sile. Kad je reč o uzorku prethodno tretiranom na 90°C/5 min, kod obe vrste mleka postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka centrifugiranih na 600 g i 4500 g. Do ove pojave dolazi usled taloženja ovog proteina zajedno sa kazeinom pri oštrijim režimima obiranja, a posledica je ta da neadekvatni uslovi obiranja mogu dovesti do pogrešnog zaključka da je obim denaturacije β -lg veći nego što zaista jeste.



Slika 11. SDS-PAGE elektroforetogrami supernatata kravljeg mleka pripremljenih u redukujućim (trake R,7,8,9) i neredukujućim uslovima (trake R*, 7*, 8*, 9*)

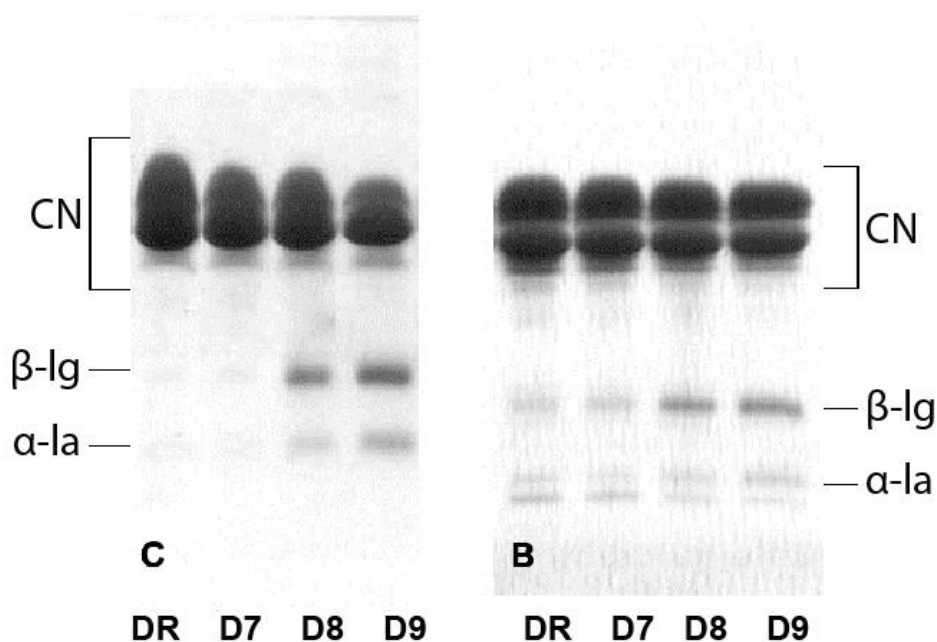
5.1.5. SDS-PAGE analiza taloga

Talozi formirani obiranjem mleka centrifugalnom silom od 4500 g analizirani su metodom SDS-R-PAGE. Dobijeni elektroforetogrami prikazani su na Slici 12. Može se uočiti da uzorci D8 i D9 kozjeg mleka sadrže viši udeo β -laktoglobulina i α -laktalbumina nego uzorci DR i D7. Kod kravljeg mleka što se tiče β -laktoglobulina uočava se slična pojava, dok u količini α -laktalbumina ne postoji statistički značajna razlika između četiri analizirana uzorka.

Ukoliko se uporede elektroforetogrami uzoraka taloga kozjeg i kravljeg mleka (Slika 12) sa analognim elektroforetogramima supernatanta (Slika 10 i 11), može se uočiti da značajna količina serum proteina odlazi u talog nakon termičkog

tretmana na 80°C/5 min, dok značajno ireverzibilno kovalentno agregiranje serum proteina započinje tek nakon tretmana 90°C/5 min.

U ovom radu je utvrđeno da je koloidni sistem kozjeg mleka mnogo podložniji destabilizaciji tokom centrifugiranja nego koloidni sistem kravljeg mleka, pri čemu određena količina koloidnih čestica napušta rastvor i odlazi u talog, uglavnom najveće odnosno najnestabilnije čestice. Samim tim je objašnjivo zbog čega većinu taloga u uzorcima DR i D7 čini kazein. Međutim, kada se uzorci mleka izlože termičkom tretmanu od 80°C i 90°C u trajanju od 5 minuta pre centrifugiranja, pored kazeina značajan udeo proteina u talogu čine i glavni serum proteini. Može se pretpostaviti da nakon ovih termičkih tretmana serum proteini postaju deo kazeinskih micela, pa zajedno sa njima odlaze u talog. Na osnovu elektroforetske analize taloga nije moguće utvrditi prirodu veza kojima su serum proteini pripojeni kazeinskim micelama, moguće je da su zastupljene sve vrste veza: hidrofobne, elektrostatičke i kovalentne.



Slika 12: SDS-R-PAG elektroforetogrami kozjeg (C) i kravljeg (B) taloga dobijenog obiranjem sirovog mleka (DR), i mleka termički tretiranog na 70°C/5 min (D7), 80°C/5 min (D8), 90°C/5 min (D9)

Kao što je spomenuto u poglavlju *Pregled literature*, kinetika denaturacije i agregiranja β - lg prilikom zagrevanja mleka na 80°C i na 90°C je različita. Naime, energija aktivacije reakcije denaturacije β - lg je znatno veća ukoliko se mleko

tretira temperaturom od 80°C, što za posledicu ima sporiju denaturaciju ovog proteina na toj temperaturi. Na 90°C denaturacija β – laktoglobulina dešava se gotovo trenutno, što očigledno omogućava njegovo uključivanje u agregate u značajno većem obimu. Imajući prethodnu teoriju u vidu, pojavljivanje pomenutog proteina u talogu mleka zagrevanog na 80°C/5 min, dovodi do zaključka da se nakon ovakvog termičkog tretmana β – Ig vezuje za micelu elektrostatički ili hidrofobno. Prema određenim autorima, nakon termičkog tretmana između proteina prvo dolazi do hidrofobnih interakcija koje su u izvesnoj meri praćene tiol-disulfidnom izmenom (Donato i Guyomarc'h, 2009). Osim toga, pri blažim termičkim tretmanima, promene u konformaciji serum proteina, do kojih inicijalno dolazi, mogu biti reverzibilne dok su pri oštrijim tretmanima ove konformacijske promene u mnogo većoj meri praćene formiranjem asocijata serum proteina ili njihovim agregiranjem sa kazeinskom micelom (Law i Leaver, 2000).

U literaturi postoje podaci da je stepen denaturacije α -laktalbumina i β -laktoglobulina viši od 50% i 75%, respektivno, kada se kozje mleko tretira temperaturom od 80°C u trajanju od 5 minuta (Montilla et al., 1995). Pojedini autori detektovali su čak i viši stepen denaturacije, i objavili podatak da manje od 5% nedenaturisanog β – laktoglobulina zaostaje u kozjem mleku nakon tretmana na 80°C /5 minuta, dok pri istom termičkom tretmanu kravljeg mleka zaostaje više od 20%. Ovakvi rezultati, obzirom da je u pitanju bila druga metodologija, ukazuju na to da do denaturacije serum proteina dolazi u značajnoj meri i na temperaturama nižim od 90°C, međutim prema istraživanjima na kojima je ovaj rad baziran, ireverzibilno kovalentno agregiranje se dešava u značajnoj meri tek tretiranjem mleka na 90°C/5 min.

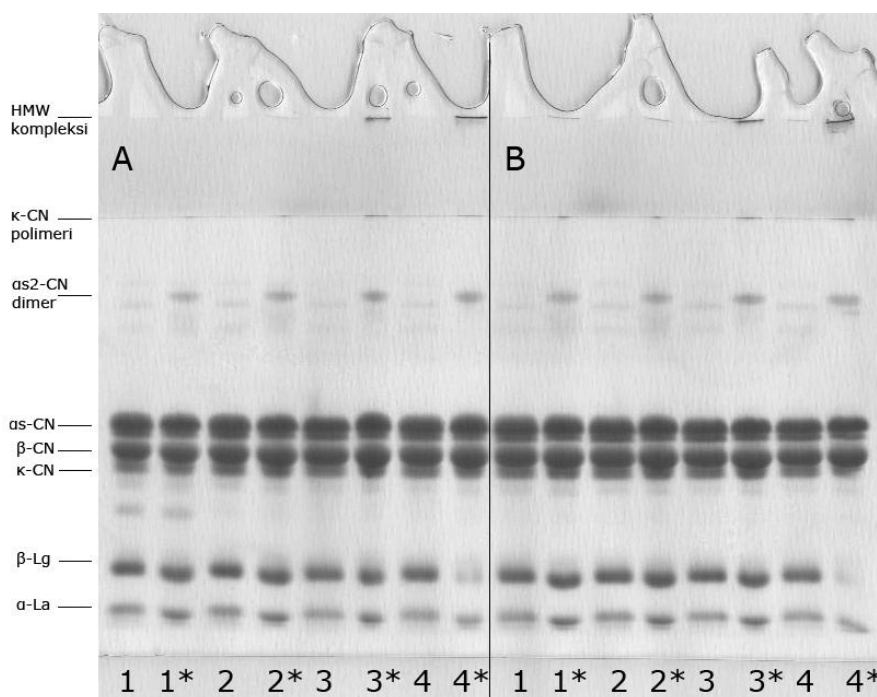
5.2. Efekat sadržaja masti na kovalentno ireverzibilno agregiranje proteina kravljeg i kozjeg mleka

U ovom delu rada cilj je bio utvrditi da li i na koji način prisustvo masti utiče na ireverzibilno agregiranje serum proteina i κ -CN nakon termičke obrade. Takođe, obzirom na razlike u strukturi proteina kao i veličini masnih globula kozjeg i

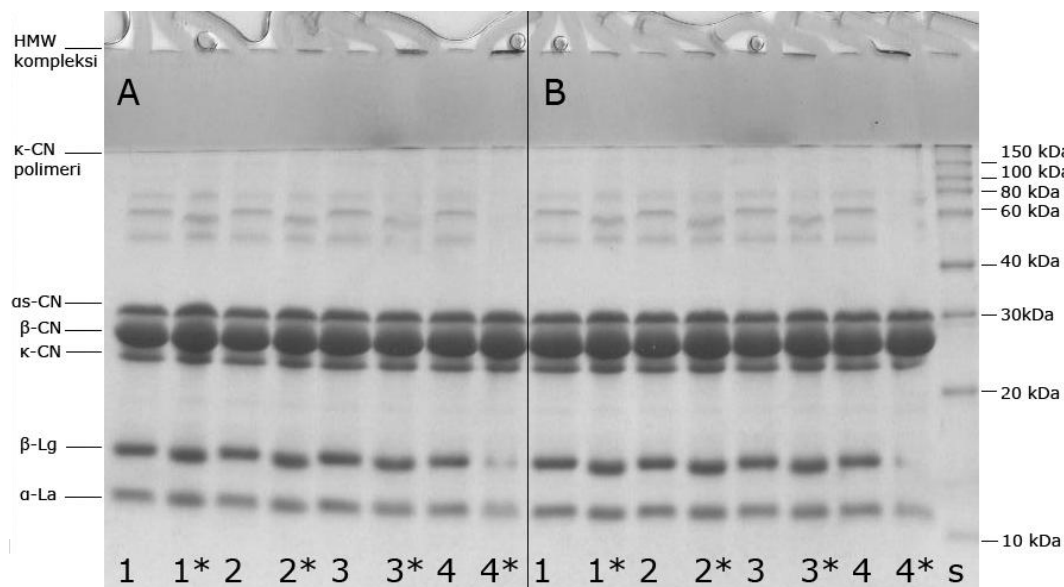
kravljeg mleka, o čemu je bilo reči u poglavlju *Pregled literature*, cilj je bio ispitati da li postoji razlika u navedenim efektima termičke obrade između ove dve vrste mleka.

Na Slici 13 i 14 prikazani su elektroforetogrami uzoraka kravljeg i kozjeg mleka, punomasnog (A) i obranog (B), analizirani SDS-PAG elektroforezom, u redukujućim (1, 2, 3 i 4) i neredukujućim uslovima (1*, 2*, 3* i 4*). Kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*, u cilju pripreme uzoraka izvršeno je obiranje režimom koji je u prethodnom poglavlju odabrano kao najadekvatnije (600 g/15 min/20°C), u cilju izbegavanja gubitaka proteina taloženjem tokom centrifugiranja.

Sa prikazanih elektroforetograma (Slike 13 i 14), mogu se uočiti pojedine sličnosti i razlike u ireverzibilnom agregiranju proteina kravljeg i kozjeg mleka, bez obzira na to da li je termički tretman izvršen na punomasnom ili obranom mleku. Naime, u mleku obe vrste pojava HMW kompleksa koji se mogu detektovati na ulazu u gornji gel (gel za koncentrisanje) tek nakon tretmana na 80°C/5 min i 90°C/5 min.



Slika 13. Elektroforetogram uzoraka kravljeg mleka: punomasno (A); obrano (B); sirovo (1); 70°C/5min (2); 80°C/5min (3); 90°C/5min (4); redukujući uslovi (1, 2, 3, 4) i neredukujući uslovi (1*, 2*, 3*, 4*)



Slika 14. Elektroforetogram uzoraka kozjeg mleka: punomasno (A); obrano (B); sirovo (1); 70°C/5min (2); 80°C/5min (3); 90°C/5min (4); redukujući uslovi (1, 2, 3, 4) i neredukujući uslovi (1*, 2*, 3*, 4*)

Linija koja odgovara dimeru α_{s2} -CN, detektovana je u svim uzorcima kravljeg mleka pripremljenim u neredukujućim uslovima (Slika 13), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Ova linija se ne pojavljuje na trakama koje označavaju uzorke pripremljene u redukujućim uslovima. Kao što je već spomenuto u poglavlju *Pregled literature*, u sirovom kravljem mleku α_{s2} -CN se nalazi u obliku dimera koji je formiran vezivanjem monomera disulfidnim mostovima. Ovaj dimer se nalazi u unutrašnjosti kazeinske micelle i veoma je stabilan na dejstvo visokih temperatura. Ukoliko se mleko podvrgava termičkim tretmanima na temperaturama nižim od 100°C, on ne disosuje do monomera niti se pripaja HMW kompleksima (Rasmussen et al., 1994, Patel, 2007). Rezultati ovog rada potvrđuju literaturne navode u slučaju kravljeg mleka, ali kada je u pitanju kozje mleko, dimer α_{s2} -CN nije detektovan ni u uzorku sirovog niti termički tretiranog mleka (Slika 14). Odsustvo dimerne forme α_{s2} -CN može se posmatrati kao još jedna specifičnost kazeinske micelle kozjeg mleka.

U svim uzorcima pripremljenim u neredukujućim uslovima, bilo da je u pitanju sirovo ili termički tretirano kozje ili kravlje mleko, potvrđeno je postojanje polimera κ -CN, detektovanih na ulazu u donji gel (gel za razdvajanje). Poznato je da κ -CN kravljeg mleka preko svojih Cys ostataka formira polimere koji mogu sadržati

i do deset monomernih jedinica (Rasmussen et al., 1994, Panouillé et al., 2004). Postojanje polimera κ -CN kozjeg mleka je u literaturi takođe potvrđeno (Henry et al., 2002), sa tom razlikom što broj monomera koji ulaze u njihov sastav nije ispitan. Na osnovu ovog rada može se pretpostaviti da u određenoj meri i kod kozjeg mleka dolazi do pojave homopolimera κ -CN čija je molekulska masa na osnovu standarda proteina poznate mase >150 kDa. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se ova pretpostavka potvrdila.

Identifikacija proteinskih linija vršena po ugledu na rezultate drugih autora (Manzo et al., 2008, Pesic et al., 2012), i uz pomoć standardnog rastvora proteina poznate molekulske mase.

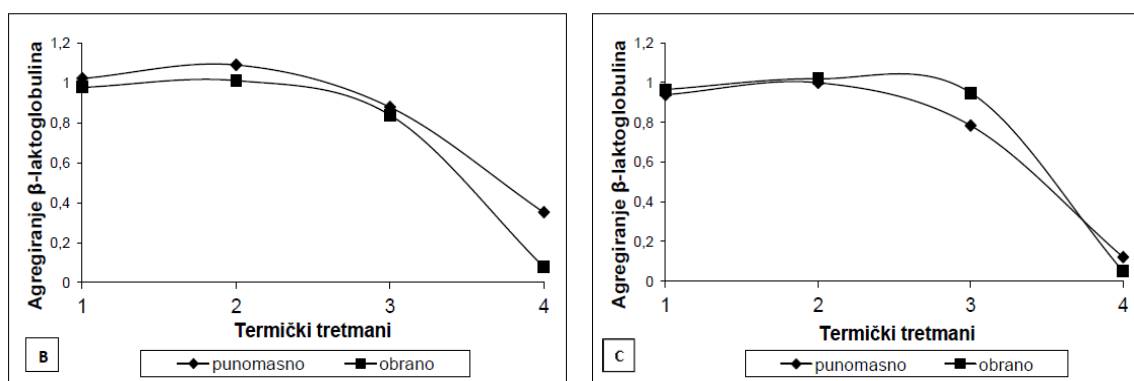
Radi sagledavanja uticaja termičkog tretmana, vrste mleka i uticaja masti na stepen ireverzibilnog agregiranja proteina koji učestvuju u formiranju agregata (β -lg, α -la i κ -CN) vršena je trofaktorijalna analiza varijanse.

Kad je u pitanju β -lg, na stepen kovalentnog agregiranja statistički značajno utiče ($p < 0,05$) termički tretman i prisustvo masti u sprezi sa vrstom mleka. Nakon parnih poređenja srednjih vrednosti u okviru faktora koji imaju značajan uticaj, utvrđeno je da nakon termičkog tretmana na $70^{\circ}\text{C}/5$ min ne postoji statistički značajno kovalentno agregiranje ovog proteina ($p < 0,05$), za razliku od tretmana na 80°C i 90°C u trajanju od 5 min, nakon kojih je stepen agregiranja statistički značajno različit u odnosu na sirovo mleko. Sa Slike 15 se navedene razlike jasno mogu videti, kako za kravlje (B) tako i za kozje mleko (C).

Nekoliko autora objavilo je podatak da se denaturacija serum proteina kozjeg mleka javlja u većem obimu nego u slučaju kravljeg mleka ukoliko se primene termički tretmani na temperaturama od 85°C i višim (Law, 1995, Montilla et al., 1995, Raynal i Remeuf, 1998). Navedeni autori objašnjavaju ovakvu razliku time što su zbog različite primarne strukture serum proteini kozjeg mleka osetljiviji na dejstvo visokih temperatura u poređenju sa proteinima kravljeg mleka. U ovom radu, međutim, rezultati analize varijanse nisu utvrdili statistički značajan uticaj interakcije faktora vrste mleka i termičkog tretmana. Ako se ipak izvrši parno poređenje, dobija se podatak da statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji jedino između uzoraka punomasnog kravljeg i kozjeg mleka tretiranog na $90^{\circ}\text{C}/5$ min, pri

čemu je β -lg kravljeg mleka značajno manje učestvovao u kovalentnim agregatima nego isti protein kozjeg mleka. Ovaj podatak ide u prilog tvrdnji prethodno navedenih autora.

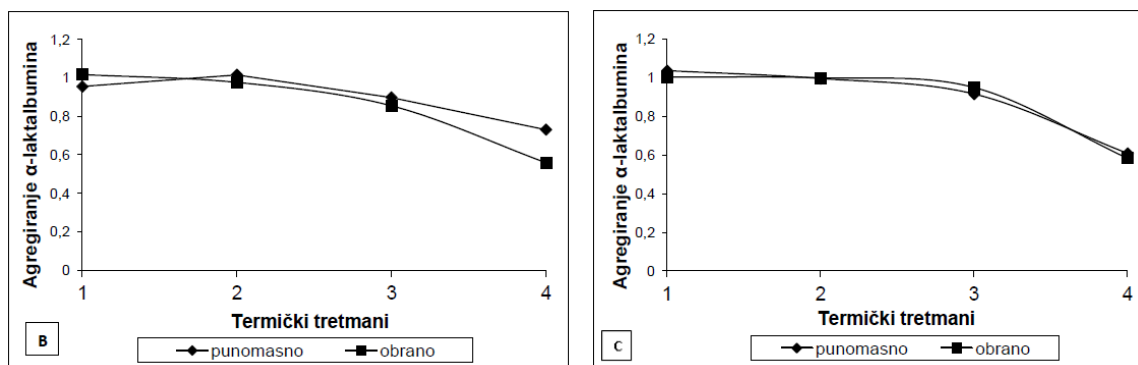
Ako izvršimo parna poređenja u okviru interakcije faktora vrste mleka i prisustva masti, možemo zaključiti da u slučaju kravljeg mleka postoji značajna razlika ($p < 0,05$) između stepena kovalentnog agregiranja β -lg u obranom i punomasnom mleku, pri čemu do intenzivnijeg agregiranja dolazi u slučaju obranog mleka. Kod kozjeg mleka značajna razlika između obranog i punomasnog mleka u navedenoj pojavi ne postoji.



Slika 15. Stepen ireverzibilnog agregiranja β -laktoglobulina kravljeg (B) i kozjeg (C) punomasnog i obranog mleka

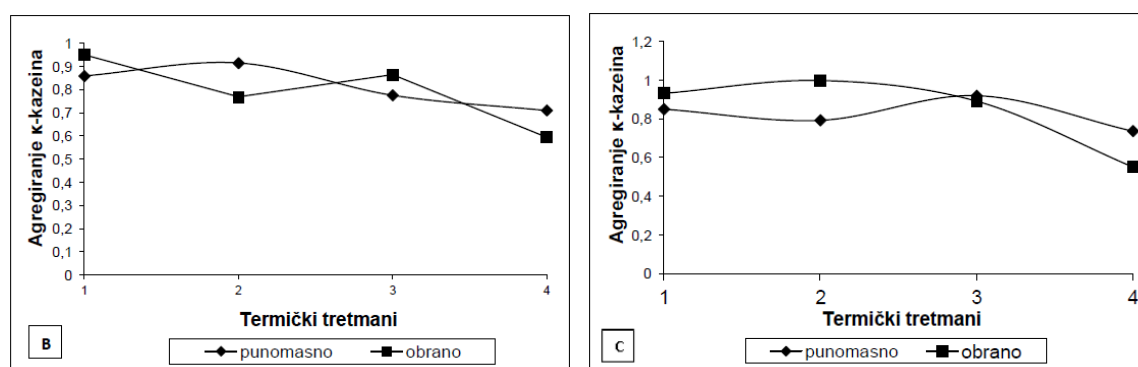
Na koji način prisustvo mlečne masti značajno ometa agregiranje β -lg u kravljem mleku, ne spominje se u literaturi. Poznato je da veći udeo proteina u mleku uslovljava viši stepen denaturacije serum proteina. Međutim, imajući u vidu da je primenjena temperatura od 90°C , kada sama denaturacija β -lg nastupa gotovo trenutno (Donato i Guyomarc'h, 2009), možemo pretpostaviti da mlečna mast inhibira fazu agregiranja denaturisanih molekula β -lg. Obzirom na veličinu masnih globula, može se pretpostaviti da je u pitanju sterni efekat.

Daljom statističkom analizom se dobija da je termički tretman jedini faktor koji ima značajan uticaj ($p < 0,05$) na stepen kovalentnog agregiranja α -la. Nakon parnih poređenja ispostavlja se da jedino nakon termičkog tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min postoji statistički značajan ($p < 0,05$) stepen kovalentnog agregiranja ovog proteina u agregate, u poređenju sa sirovim mlekom.



Slika 16. Stepen ireverzibilnog agregiranja α -laktalbumina kravljeg (B) i kozjeg (C) punomasnog i obranog mleka

Analogno opisanoj pojavi vezanoj za β -lg, postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između stepena kovalentnog agregiranja α -lg punomasnog kozjeg i kravljeg mleka nakon termičkog tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min. Sa Slike 16, kao sa elektroforetograma na Slikama 13 i 14, može se uočiti da je bez obzira na sadržaj masti i vrstu mleka, obim vezivanja α -la u proteinske agregate putem disulfidnih veza višestruko manji nego što je to slučaj sa β -lg.



Slika 17. Stepen ireverzibilnog agregiranja κ -kazeina kravljeg (B) i kozjeg (C) punomasnog i obranog mleka.

Sa Slike 17 može se pratiti obim povezivanja κ -CN u agregate putem disulfidnih mostova. Bilo da je reč o kozjem ili kravljem mлеку, punomasnom ili obranom, sa grafika se vidi da je trend udela SDS-monomera u ukunim monomerima ove kazeinske frakcije sa pooštavanjem termičkog tretmana vrlo neujednačen, odnosno naizmenično raste i opada bez ikakvog jasnog reda. U toku različitih termičkih tretmana dolazi do (1) disocijacije polimera κ -kazeina i (2) uključivanja monomera u proteinske agregate velikih molekulskih masa. Izgled krive

kovalentnog agregiranja svih analiziranih uzoraka mleka ukazuje na to da se pri različitim termičkim tretmanima dva pomenuta procesa odigravaju u različitom obimu. Značajan uticaj termičkog tretmana ($p < 0,05$) postoji i u slučaju ovog proteina na kovalentno vezivanje njegovih monomera u proteinske agregate, pri čemu se na osnovu parnih poređenja može utvrditi da statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji između uzorka tretiranog na $90^{\circ}\text{C}/5$ min u poređenju sa sirovim mlekom. Što se tiče uticaja masti na stepen denaturacije, ne postoji statistički značajan efekat na stepen kovalentnog agregiranja ovog proteina.

Na osnovu prethodno iznetih rezultata može se zaključiti da je β -lg pored toga što je inicijator reakcije stvaranja agregata proteina mleka reakcijom tiol-disulfidne izmene, u značajnoj meri iz svog monomernog oblika pod dejstvom termičkog tretmana na $80^{\circ}\text{C}/5$ min i $90^{\circ}\text{C}/5$ min prešao u neku vrstu asocijata ili agregata. Takođe, može se zaključiti da se značajno kovalentno agregiranje α -la i κ -CN dešava samo nakon tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min. Na osnovu toga se može zaključiti da na $80^{\circ}\text{C}/5$ min u najvećoj meri dolazi do formiranja homopolimera β -lg. Detaljnijom analizom sastava HMW kompleksa metodom 2D-elektroforeze (Havea, 1998, Patel, 2007), ili nekom drugom metodom, mogla bi se potvrditi ova pretpostavka. Svakako, dalja istraživanja na temu uticaja termičkih tretmana na mehanizme koji se odigravaju na molekulskom nivou osnovnih komponenata kozjeg mleka su potrebna, kako bi se u što većoj meri ispitala specifičnosti kozjeg mleka, i na osnovu njih izvršila optimizacija procesa njegove obrade i prerade (Alloggio et al., 2000).

5.3. Uvećanje randmana sireva od punomasnog i obranog kozjeg mleka primenom različitih termičkih tretmana

Uporedni prikaz uvećanja kontrolnog randmana i uvećanja sadržaja vode u "model" sirevima (koagulumima) pod uticajem termičkih tretmana punomasnog i obranog mleka prikazan je na Slici 18.

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da termički tretman ima statistički značajan uticaj ($p < 0,05$), kao i prisustvo mlečne masti u sprezi sa termičkim

tretmanom. Nakon parnih poređenja ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uvećanja kontrolnog randmana koji se odnose na uzorke dobijene od punomasnog i obranog mleka tretiranog na 70°C . Što se tiče ostalih uzoraka, sva parna poređenja dala su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

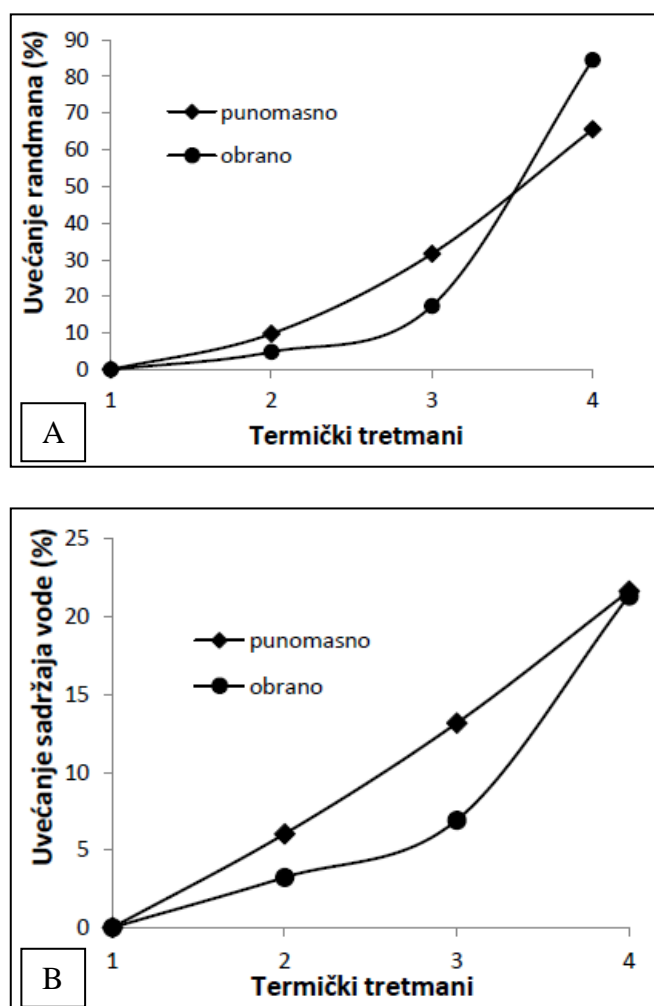
Ukoliko se na isti način obrade podaci za uvećanje sadržaja vode, dobija se da oba faktora, kao i njihova interakcija imaju statistički značajan uticaj ($p < 0,05$).

Sa Slike 18 možemo uočiti razlike u uvećanju kontrolnog randmana ukoliko se primene različiti tretmani na obrano ili punomasno mleko. Prvo što se može uočiti je da u slučaju obranog mleka imamo blaži trend uvećanja u odnosu na punomasno mleko, sve do tretmana od $80^{\circ}\text{C}/5$, nakon čega sledi nagli skok, da bi kontrolni randman iz obranog mleka nakon termičkog tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min bio uvećan čak $84,48(\pm 4,32)\%$ u odnosu na sirovo mleko. Nasuprot obranom mleku, u slučaju punomasnog mleka uvećanje kontrolnog randmana kontinualno raste, da bi nakon tretmana mleka na $90^{\circ}\text{C}/5$ min bio uvećan $65,54(\pm 0,22)\%$.

Interesantno je to da termički tretman na $80^{\circ}\text{C}/5$ min utiče više na uvećanje kontrolnog randmana punomasnog mleka nego obranog, dok je situacija u slučaju tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min suprotna. Drugim rečima, kada je u pitanju uvećanje kontrolnog randmana, prisustvo masti doprinosi intenzivnijem uvećanju ukoliko se kozje mleko tretira režimom na $80^{\circ}\text{C}/5$ min a inhibira isto uvećanje primenom tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min.

Sa Slike 18 (B) može se uočiti da uvećanje sadržaja vode u velikoj meri prati trend uvećanja sadržaja randmana, što potvrđuje i korelaciona analiza. Na osnovu koeficijenta korelacije prikazanih u Tabeli 6 se vidi da bez obzira da li je u pitanju obrano ili punomasno mleko, korelacija između uvećanja kontrolnog randmana i uvećanja sadržaja vode je visoka i statistički značajna. U slučaju punomasnog mleka, jedina statistički značajna korelacija ($p < 0,05$) postoji između uvećanja kontrolnog randmana uvećanja sadržaja vode. Određeni autori navode da je uvećanje randmana pod uticajem termičkog tretmana gotovo isključivo posledica uvećanja sadržaja vode u siru (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011).

Međutim na osnovu korelacione analize parametara koji se tiču obranog mleka, iz Tabele 6, možemo uočiti da pored izuzetno visoke, statistički značajne ($p < 0,05$) korelacije između uvećanja kontrolnog randmana i uvećanja vode, postoji isto tako visoka korelacija, takođe značajna ($p < 0,05$) između uvećanja kontrolnog randmana i uvećanja stepena kovalentnog agregiranja β -lg i α -la.



Slika 18. Uporedni prikaz uvećanja laboratorijskog randmana (A) i sadržaja vode u “model” sirevima (B) pod uticajem termičkih tretmana punomasnog i obranog kozjeg mleka: sirovo (1); 70°C/5min (2); 80°C/5min (3); 90°C/5min (4);

Na osnovu rezultata korelacione analize možemo zaključiti da stepen kovalentnog agregiranja serum proteina prouzrokovan termičkim tretmanima obranog mleka, kao i uvećanje sadržaja vode u “model” siru, dovodi do uvećanja kontrolnog randmana. Međutim kada je punomasno mleko u pitanju, stepen formiranja kovalentno vezanih agregata u kojima učestvuju glavni serum proteini nisu u

značajnoj meri povezani sa uvećanjem kontrolnog randmana. Potrebna su detaljnija istraživanja kako bi se utvrdilo u kojoj meri i na koji način mast utiče na navedene pojave.

Tabela 6. Koeficijenti korelacije između uvećanja kontrolnog randmana i: uvećanja sadržaja vode; uvećanja stepena kovalentnog agregiranja β -lg, α -la i κ -CN

	Uvećanje sadržaja vode	Uvećanje stepena kovalentnog agregiranja		
		β -lg	α -la	κ -CN
Uvećanje kontrolnog randmana Punomasno mleko	0,997*	0,993 ^{nz}	0,980 ^{nz}	0,414 ^{nz}
Uvećanje kontrolnog randmana Obrano mleko	0,999*	0,999*	0,999*	0,949 ^{nz}

* značajna korelacija ^{nz}nije značajna korelacija (p<0,05)

Na kraju ovog dela rada, pored ostalog, utvrđeno je i to da nakon termičkih tretmana mleka na 80°C/5 min i 90°C/5 min, koagulacija pod dejstvom sirila ne izostaje, kao što je to inače slučaj kod kravljeg mleka. Na osnovu dobijenih rezultata u model sistemu može se očekivati uvećanje randmana sireva u realnom sistemu ukoliko se kozje mleko namenjeno proizvodnji sira termički tretira nekim od ispitivanih režima termičke obrade.

5.4. Izrada sireva

Nakon ispitivanja uticaja termičkih tretmana na proteine kozjeg mleka i nakon što je u model sistemu ispitana i potvrđena mogućnost proizvodnje sireva od termički tretiranog mleka, koje evidentno poseduje potencijal da ostvari veći randman, pristupilo se proizvodnji sireva. Obzirom da se pokazalo da termički tretman na 70°C/5 min ne utiče značajno na ispitivane promene na proteinima, odabrani su tretmani: 80°C/5 min i 90°C/5 min za proizvodnju dve eksperimentalne varijante sireva. Radi poređenja proizvedena je kontrolna varijanta sira, od mleka tretiranog niskom pasterizacijom (65°C/30 min), standardnim termičkim tretmanom koji se koristi u proizvodnji sireva.

Kao što je već pomenuto, mleko za proizvodnju sira uzimano je tri puta, tokom juna i jula, a osnovni parametri njegovog kvaliteta prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Osnovni parametri kvaliteta sirovog kozjeg mleka (jun-jul)

Parametri	
pH	6,63±0,04
Titraciona kiselost (°SH)	6,02±0,03
Sadržaj proteina (%)	2,57±0,10
Sadržaj masti (%)	2,75±0,15
Sadržaj suve materije (%)	10,30±0,04

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

Iz tabele se može videti da kozje mleko proizvedeno u junu i julu (Tabela 7) ima niži sadržaj proteina i masti, a samim tim i suve materije u odnosu na mleko proizvedeno u aprilu i maju (Tabela 2), što je u saglasnosti sa literaturom (Božanić et al., 2002, Park et al., 2007). Na osnovu ovako niskog sadržaja suve materije a posebno proteina, realno je očekivati i nizak randman.

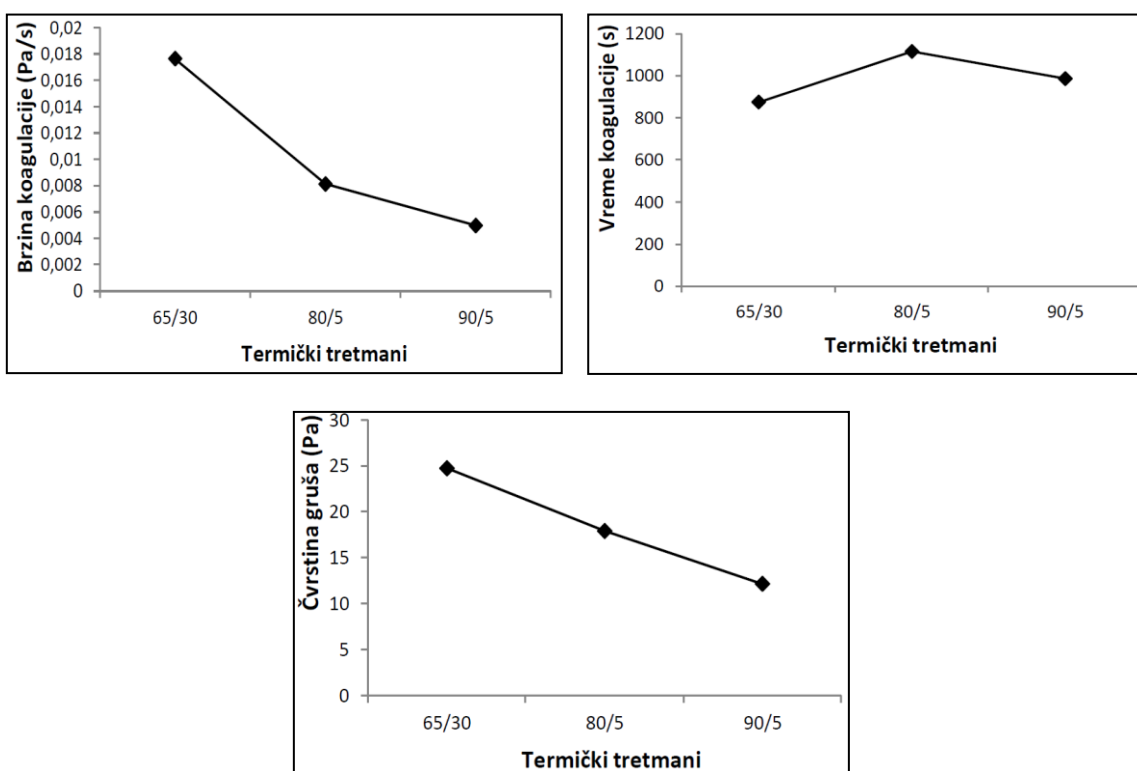
5.4.1. Efekat termičkih tretmana na parametre koagulacije kozjeg mleka

Efikasnost procesa proizvodnje sireva je u velikoj meri određena procesom koagulacije, od kog zavisi i kvalitet sireva, i količina sira koja se može dobiti od litre mleka. Proces koagulacije može se okarakterisati sledećim parametrima: vreme koagulacije (CT), brzina formiranja gela (AR), čvrstina gela (CF) i randman sireva. Parametri koagulacije determinišu ne-enzimsku fazu sirišne koagulacije. CT (odnosno RCT) definiše tačku u kojoj su kazeinske micelle agregirale u dovoljnoj meri da počinje formiranje vidljivih agregata – flokulacija. AR je srednja brzina kojom se formira sirni gel, od momenta pojave prvih vidljivih flokula. Ova dva parametra su bitna sa aspekta vremena koje je potrebno utrošiti do momenta sečenja gruš, dok parametar CF određuje kvalitet i randman sireva (Dimassi et al., 2005). Navedeni parametri se već decenijama koriste u cilju ocene učinka procesa proizvodnje sira (Ustunol i Brown, 1985, Alloggio et al., 2000, Clark i Sherbon, 2000, Mishra et al., 2005, Tan et al., 2007).

Kao što je u poglavlju *Materijal i metode* opisano, proizvedeno je tri varijante sireva, od mleka tretiranog (1) niskom pasterizacijom 65°/30 min – kontrolna varijanta; (2) 80°C/5 min – prva eksperimentalna varijanta, i (3) 90°C/5 min – druga eksperimentalna varijanta.

Na Slici 19. Prikazani su parametri koagulacije kozjeg mleka tretiranog navedenim termičkim tretmanima.

Rezultati koji se tiču brzine koagulacije i čvrstine gruša ukazuju na to, da što se oštrije termički tretman primeni, sve je sporija koagulacija, a stvoreni gel ima manju čvrstinu. Nakon statističke analize navedenih rezultata pokazalo se da je i u slučaju AR i CF, termički tretman značajno ($p < 0,05$) uticao na smanjenje svakog od navedenih parametara koagulacije. Ova pojava ne razlikuje se od iste pojave u kravljem mleku, a takođe potvrđuje postojeće literaturne podatke koji se tiču kozjeg mleka (Calvo, 2002, Vasbinder, 2002).



Slika 19. Parametri koagulacije: brzina koagulacije, vreme koagulacije i čvrstina gruša u zavisnosti od termičkih tretmana (65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 min)

Međutim, zanimljiv podatak dobija se po pitanju vremena koagulacije (CT). Na osnovu rezultata statističke analize, utvrđeno je da termički tretman ne utiče značajno ($p < 0,05$) na vreme koagulacije. Ipak, sa Slike 19 se može uočiti da u odnosu na mleko tretirano na 65°C/30 min, nakon tretmana na 80°C/5 min CT raste, dok nakon tretmana na 90°C/5 min opada. U literaturi su podaci na ovu temu naizgled različiti i kontradiktorni. Naime, postoje autori koji iznose zaključak

da termički tretman (70°C/30 min) ne utiče značajno na CT (Alloggio et al., 2000, Calvo, 2002). Drugi autori pak daju podatak, da se nakon tretmana na 80°C/1 min, CT uvećava 1,3 puta da bi nakon tretmana na 90°C/1 min ova vrednost ponovo bila vrlo bliska sirovom mleku (Raynal i Remeuf, 1998). Postoji takođe grupa autora (Alloggio et al., 2000) sa sledećim zaključkom: nakon termičkog tretmana kozjeg mleka na 80°C/1, 3 ili 10 min ne postoji uticaj termičkog tretmana na CT, dok se nakon tretmana na 95°C/1, 3 ili 10 min vreme koagulacije skraćuje.

Kada se navedeni literaturni podaci sumiraju, zajedno sa rezultatima ovog rada, dolazi se do sledećeg zaključka: ukoliko se kozje mleko termički tretira na $T \leq 80^\circ\text{C}$, vreme koagulacije ili ostaje isto, ili raste, dok termički tretmani na $T \geq 90^\circ\text{C}$ ili nemaju uticaj ili utiču tako što skraćuju vreme koagulacije. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio uzrok suprotnog dejstva različitih termičkih tretmana na vreme koagulacije kozjeg mleka.

Važno je takođe istaći da termički tretmani na $T \geq 90^\circ\text{C}$ imaju suprotan efekat na vreme koagulacije kravljeg i kozjeg mleka. Objašnjenje koje se najčešće sreće u literaturi na ovu temu je: različit mineralni i proteinski sastav kozjeg i kravljeg mleka (Caponio et al., 2001). Potrebna su dalja istraživanja da bi se detaljnije utvrdilo šta je tačno uzrok ovakvih razlika.

5.4.2. Efekat termičkih tretmana na randman kozjih sireva

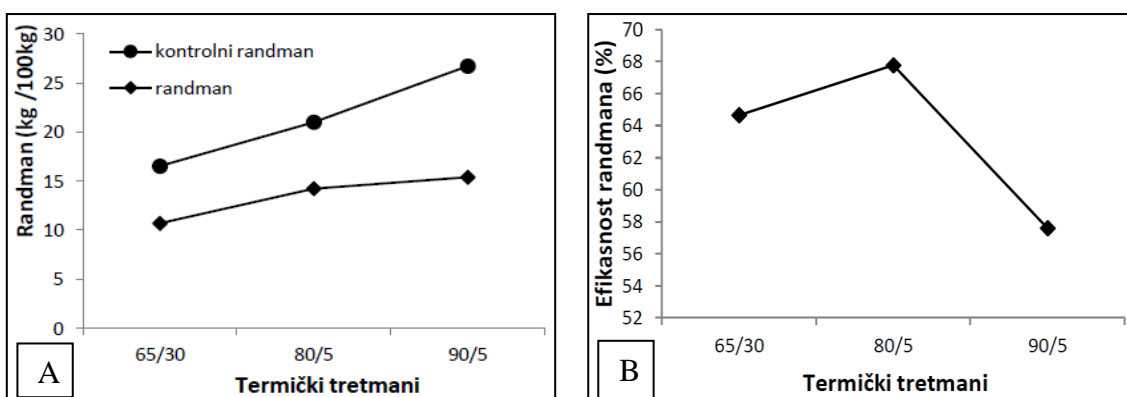
Iako parametri koagulacije u velikoj meri utiču na randman i kvalitet sireva (Ostersen et al., 1997, Clark i Sherbon, 2000), sam randman je glavno merilo kojime se karakteriše efikasnost procesa i potencijal mleka, obzirom da parametri koagulacije oslikavaju proces proizvodnje sira samo do momenta sečenja grušā (Hallen, 2008).

U proizvodnji kozjih sireva postiže se generalno manji randman u odnosu na kravlje mleko (Caponio et al., 2001, Božanić et al., 2002). To je još jedan razlog više da se ispita mogućnost uvećanja randmana upravo kozjih sireva, u ovom radu konkretno belih sireva u salamuri.

Na Slici 20(A) dat je uporedni prikaz randmana i kontrolnog randmana koji se odnose na mleko tretirano niskom pasterizacijom, i tretmanima 80°C/5 min i

90°C/5 min. Takođe, na Slici 20(B) prikazan je procentualni odnos randmana i kontrolnog randmana za iste režime termičke obrade mleka. Ovaj odnos se u literaturi naziva “efikasnost randmana”, i služi u ekonomske svrhe, radi kontrole procesa proizvodnje sireva (Abd El-Gawad i Ahmed, 2011).

Statistička analiza podataka dobijenih za randman i kontrolni randman pokazuje da u oba slučaja postoji značajan uticaj temperature ($p < 0,05$). Ukoliko se pak izvrše parna poređenja između različitih režima termičke obrade, ispostavlja se da se randman sireva dobijenih od mleka tretiranog na 80°C/5 min i 90°C/5 min ne razlikuju statistički značajno ($p < 0,05$). Dakle, iako se potencijal mleka u pogledu ostvarivanja randmana nakon tretmana na 90°C/5 min statistički značajno razlikuje od potencijala mleka tretiranog na 80°C/5 min, u realnosti se ovaj potencijal ne ostvaruje u potpunosti. Sa Slike 20 (B) se jasno vidi da efikasnost u slučaju najoštrijeg primenjenog tretmana čak niža od efikasnosti u slučaju niske pasterezacije.



Slika 20. Uporedni prikaz randmana i kontrolnog randmana sireva (odnosno “model” sireva) dobijenih od mleka termički tretiranog na 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 min (A); Efikasnost proizvodnje – procentualni odnos randmana i kontrolnog randmana (B)

Ono što se prvo nameće kao razlog male efikasnosti randmana nakon termičkog tretmana kozjeg mleka na 90°C/5 min je čvrstina gruša koja je u slučaju pomenutog tretmana ima najnižu vrednost. Literaturni podaci o uticaju čvrstine gruša na randman sireva su kontradiktorni. Pored pomenute tvrdnje da je CF parametar koji određuje kvalitet i randman sireva (Dimassi et al., 2005), postoji i suprotan uvid, a to je da ne postoji čvrsta veza između CF i randmana, obzirom na

to što pored ovog faktora postoji još čitav niz drugih faktora koji mogu uticati na gubitke masti i kazeina tokom proizvodnje sira: konstrukcija opreme, način sečenja i obrade gruša, vrsta sira koji se proizvodi (Hallen, 2008, Abd El-Gawad i Ahmed, 2011). parametar CF određuje kvalitet i randman sireva (Dimassi et al., 2005).

Ispitivanjem korelacije između randmana sve tri varijante sira i parametara koagulacije dobijenih u prethodnom poglavlju (AR, CT, CF) dobijen je sledeći rezultat. Jedina značajna korelacija ($p < 0,05$, $R = -0,999$), i to vrlo jaka, negativna, postoji između brzine agregiranja i randmana sireva. Rezultatima ovog rada se dakle potvrđuju literaturni podaci (Hallen, 2008, Abd El-Gawad i Ahmed, 2011), da ne postoji značajna korelacija između randmana i čvrstine gruša. Može se zaključiti takođe da je uvećanje randmana pod uticajem termičkih tretmana nastalo kao posledica sporijeg stvaranja proteinske mreže (niža vrednost AR).

Iako je efikasnost randmana nakon tretiranja mleka na $90^{\circ}\text{C}/5$ min najmanja u odnosu na ostale ispitivane režime termičke obrade, sam randman je i dalje najveći (Slika 20 (A)). Naime, od 100 kg mleka tretiranog niskom pasterizacijom dobija se 10,68 ($\pm 0,59$) kg sira, dok se od mleka podvrgnutog tretmanu na $90^{\circ}\text{C}/5$ min dobija 15,38 ($\pm 0,60$) kg. U ekonomskom smislu uvećanje od 44% ($90^{\circ}\text{C}/5$ min) je vrlo povoljno, kao takođe i uvećanje od 33,2% koliko se postiže tretmanom na $80^{\circ}\text{C}/5$ min u odnosu na nisku pasterizaciju.

Nakon ovog seta ispitivanja potvrđena je jedna od glavnih hipoteza: ustanovljeno je da prilikom proizvodnje kozjih belih sireva u salamuri dolazi do veoma izraženog uvećanja randmana ukoliko se mleko termički tretira ispitanim režimima oštrijim od uobičajene niske pasterizacije, i to bez ikakvih prilagođavanja ostalih faktora proizvodnje (količina sirila, količina CaCl_2 , temperatura i dužina koagulacije).

5.4.3. Efekat termičkih tretmana na parametre kvaliteta i sastav proteina surutke

Obzirom na to da randman sireva zavisi od udela različitih komponenata koje su se zadržale u grušu, ispitivanjem sastava surutke može se dobiti informacija o gubicima, posmatrano iz ugla proizvodnje sireva (Lau et al., 1990). Sa druge strane,

poslednjih decenija naglo raste interesovanje potrošača za surutkom, a posebno kozjom, budući da je ona veoma bogat izvor bioaktivnih jedinjenja pa stoga ima veliku nutritivnu vrednost. Iako je značajno manje proučavana u odnosu na kravlju surutku, kozja surutka u poslednje vreme dobija na važnosti, obzirom na to da širom sveta raste proizvodnja kozjih mlečnih proizvoda (Hernández-Ledesma et al., 2011). Pored brojnih komponenata koje ulaze u sastav surutke, proteini su posebno bitni sa aspekta biološke vrednosti (Lau et al., 1990), pri čemu proteini kozje surutke u poređenju sa kravljom imaju veću nutritivnu vrednost (Pintado i Malcata, 1996).

Postoji relativno mali broj autora koji se bavio analizom sastava kozje surutke dobijene kiselom koagulacijom (Pintado i Malcata, 1996, Pesic et al., 2011) i sirišnom koagulacijom (Casper et al., 1998) Postoje takođe radovi na temu uticaja termičkog predtretmana mleka na sastav kravlje surutke (Outinen et al., 2010a, Outinen et al., 2010b). Međutim koliko je poznato, ne postoji ni jedna publikacija koja se bavi uticajem termičkog tretmana mleka na sastav kozje surutke dobijene sirišnom koagulacijom. S tim u vezi zadatak ovog dela rada bio je da se ispita osnovni hemijski sastav i sastav proteina surutke dobijene nakon proizvodnje sireva od nisko pasterizovanog kozjeg mleka, kao i od mleka tretiranog režimima oštrijim od niske pasterizacije, sa ciljem da se utvrde gubici - sa aspekta proizvodnje sireva, a takođe i sa ciljem da se okarakterišu tri dobijene varijante surutke.

Tabela 8. Osnovni parametri kvaliteta surutke dobijene nakon proizvodnje sira od mleka tretiranog na tri režima termičke obrade: 65°C/30 min (W1), 80°C/5 min (W2) i 90°C/5 min (W3); W*-surutka dobijena nakon proizvodnje kozjeg sira u tipu Čedra od pasterizovanog mleka

Uzorci surutke	W1	W2	W3	W*
Sadržaj proteina (%)	0,92±0,14	0,72±0,08	0,50±0,02	0,77
Sadržaj masti (%)	1,05±0,10	0,58±0,17	0,35±0,05	0,51
Sadržaj suve materije (%)	6,78±0,17	6,16±0,26	5,78±0,15	6,61

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

*Izvor podataka: (Casper et al., 1998)

U Tabeli 8 prikazani su osnovni parametri kvaliteta surutke dobijene proizvodnjom sira od mleka tretiranog niskom pastserizacijom (W1), termičkim tretmanom na 80°C/5 min (W2) i termičkim tretmanom na 90°C/5 min (W3).

Nakon statističke analize podataka utvrđeno je da termički tretman mleka značajno utiče ($p < 0,05$) na sva tri parametra kvaliteta surutke, pri čemu između svih uzoraka u pogledu sadržaja masti, proteina i suve materije postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Obzirom da se u oba slučaja radi o pasterizovanom mleku, parametri kvaliteta kontrolnog uzorka surutke (W1) poređeni su sa rezultatima iz literature (Casper et al., 1998), koji su takođe prikazani u Tabeli 7 (W*). U pitanju je naime sastav kozje surutke dobijene prilikom proizvodnje sira u tipu Čedar, sirišnom koagulacijom pasterizovanog punomasnog mleka. Uočljive su velike razlike u svim parametrima, koje se mogu pripisati ili različitoj tehnologiji proizvodnje sira ili različitom sastavu mleka kao polazne sirovine. Na žalost, u navedenoj publikaciji nije dat hemijski sastav kozjeg mleka od kog je sir u tipu Čedra proizveden.

Na osnovu sadržaja masti i proteina u uzorcima surutke W1, W2 i W3, sadržaja masti u mleku od kog su sirevi proizvedeni (poglavlje 5.4.), i na osnovu randmana (poglavlje 5.4.2.), izračunat je procenat iskorišćenja masti i proteina mleka, nakon primene tri različita termička tretmana (Tabela 9).

Tabela 9. Procenat iskorišćenja masti i proteina mleka prilikom proizvodnje sira od mleka termički tretiranog na: 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 min

Uzorci surutke	W1	W2	W3
Iskorišćenje proteina (%)	67,30±5,47	76,20±4,02	83,36±1,30
Iskorišćenje masti (%)	64,49±3,11	79,95±5,73	89,22±1,27

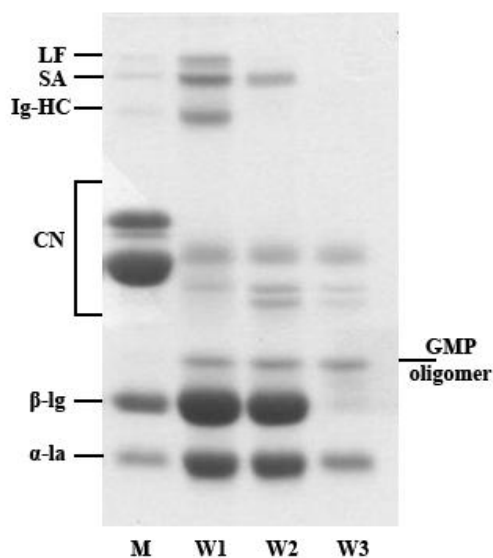
Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

Iz Tabele 9 jasno se vidi da iskorišćenje glavnih komponenata mleka znatno raste sa pooštavanjem termičkog tretmana. Interesantan podatak je taj da ukoliko se posmatra procentualno uvećanje iskorišćenja ove dve komponente mleka u slučaju termičkog tretmana mleka na 80°C/5 min i 90°C/5 min u odnosu na nisku pasterizaciju, može se uočiti da termički tretman više utiče na uvećanje sadržaja masti (23,92% i 38,34%, respektivno) nego na uvećanje sadržaja proteina (13,22%

i 23,86%, respektivno). Ista pojava utvrđena je kada su u pitanju kravljji sirevi proizvedeni od termički tretiranog mleka (Macej, 1989, Jovanović, 2001).

Na Slici 21 prikazan je elektroforetogram sve tri varijante uzoraka surutke kao i uzorka mleka koje je u ovom slučaju predstavljalo kontrolni uzorak.

Sa Slike 21 možemo uočiti da su u uzorku surutke W1 identifikovani glavni serum proteini, kao i serum proteini velikih molekulskih masa: LF, SA i Ig-HC. U uzorku W2 pak, izostaju LF i Ig-HC, dok su u uzorku W3 odsutna sva tri serum proteina velikih molekulskih masa, β -lg je prisutan u izrazito maloj količini a prisustvo α -la je značajno redukovano.



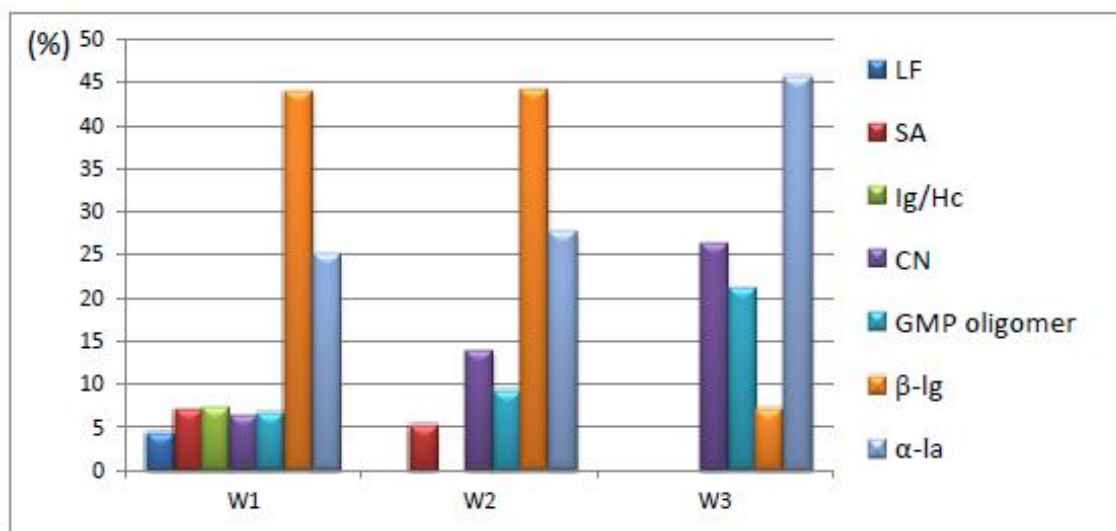
Slika 21. Elektroforetogram uzoraka surutke dobijene prilikom proizvodnje sira od mleka tretiranog termičkim tretmanima 65°C/30 min (W1), 80°C/5 min(W2) i 90°C/5 min(W3), kao i uzorka mleka (M)

Na osnovu redosleda izostajanja serum proteina iz surutke proizilazi redosled osetljivosti serum proteina ka ireverzibilnoj denaturaciji pod dejstvom termičkih tretmana: $Ig \approx LF > SA > \beta\text{-lg} > \alpha\text{-la}$. U literaturi se navodi isti redosled osetljivosti serum proteina kravljeg mleka na dejstvo visokih temperatura: $Ig > LF > SA > \beta\text{-lg} > \alpha\text{-la}$ (Patel, 2007). Jedina razlika je u tome što se na osnovu termičkih tretmana primenjenih u ovom radu nije mogla utvrditi razlika između osetljivosti Ig i LF.

U svim uzorcima surutke na elektroforetogramu je detektovana linija koja se nalazi na poziciji koja odgovara molekulskoj masi oko 20 kDa. Ova linija je na osnovu

literaturnih podataka (El-Salam et al., 1996, Mikkelsen et al., 2005, Abd El-Salam et al., 2009, Rojas i Torres, 2013) identifikovana kao GMP oligomer, sastavljen od monomera povezanih preko svojih glikozidnih ostataka.

Denzitometrijskom analizom proteinskih traka uzoraka surutke W1, W2 i W3, dobija se procentualni proteinski sastav navedenih uzoraka, koji je prikazan na Slici 22.



Slika 22. Procentualni sastav proteina prisutnih u uzorcima surutke dobijene proizvodnjom sireva od mleka tretiranog termičkim tretmanom na 65°C/30 min (W1), 80°C/5 min (W2) i 90°C/5 min (W3)

Kao što se može videti sa Slike 22, proteinski sastav analiziranih uzoraka je veoma različit, što pruža mogućnost da se primenom različitih termičkih tretmana mleka namenjenog proizvodnji sira dođe do potpuno novog, specifičnog proizvoda. Primera radi, kao što je poznato, visoka koncentracija α -la (uzorak W3) predstavlja potencijal kozje surutke kao sirovine za dobijanje proizvoda sa poboljšanim emulgujućim svojstvima, dok prisustvo β -lg (uzorak W1, W2) doprinosi poboljšanju penivih, gelirajućih i emulgujućih svojstava (Casper et al., 1998). Posebno je interesantano prisustvo GMP u uzorku surutke dobijene iz mleka tretiranog na 90°C/5 min kao polazne sirovine (W3). Udeo GMP u ovom uzorku je znatno veći nego u druga dva uzorka (>20%), usled izostanka proteina osetljivih na dejstvo navedenog termičkog tretmana. Zbog biološke aktivnosti koju poseduje, ovaj protein budi sve veću pažnju naučne javnosti i farmaceutske industrije

(Mikkelsen et al., 2005). Nasuprot β -lg i α -la, glikomakropeptid ima slabo izražena peniva i emulgujuća svojstva, pa njegovo prisustvo u navedenoj varijanti surutke čini da ona, iako najsiromašnija u pogledu sadržaja masti i proteina, ima svoju specifičnu vrednost i karakteristike. Potrebna su dalja istraživanja kako bi svaka od tri varijante surutke bila detaljnije okarakterisana.

5.5. Zrenje sireva

Prilikom proizvodnje sireva od kravljeg mleka tretiranog termičkim tretmanima oštrijim od niske pasterizacije, neophodno je prilagoditi određene faktore, kako bi se kompenzovao negativan efekat termičkog tretmana na sirišnu koagulaciju mleka. U literaturi se mogu naći različiti načini prilagođavanja tehnološkog postupka: (1) podešavanje pH mleka na 6,2 (Singh i Waungana, 2001), ili čak 5,8, (2) uvećanje sadržaja kalcijumhlorida, (3) koagulacija na temperaturi višoj od uobičajene (Jovanović, 2001) (4) snižavanje pH vrednosti mleka do 6,2 a zatim neutralizacija do pH 6,6 (Singh i Waungana, 2001). Čak i u slučaju proizvodnje kozjeg sira Caccioricotta, nakon visokog termičkog tretmana (90°C/1 min) vrši se prilagođavanje tehnološkog postupka, dodavanjem veće količine sirila i povišenjem temperature koagulacije, u cilju kompenzovanja negativnih efekata termičkog tretmana (Caponio et al., 2001). U ovom radu, međutim, kao što je već rečeno, obe eksperimentalne varijante sira (80/5 i 90/5) proizvedene su bez ikakve modifikacije u odnosu na kontrolnu varijantu (65/30), kako bi se posmatrane razlike između sireva mogle pripisati isključivo uticaju termičkog tretmana.

U literaturi postoji veliki broj radova na temu uticaja termičkog tretmana na parametre koagulacije kravljeg mleka, i fizičkih karakteristika gelova nastalih sirišnom koagulacijom. Međutim, savremena literatura je dosta siromašna u podacima o efektu termičkog tretmana na teksturu, ukus, funkcionalnost i tok zrenja (Singh i Waungana, 2001), posebno kada su u pitanju kozji sirevi.

Cilj narednih poglavlja je da se ispita uticaj termičkih tretmana mleka oštrijih od uobičajene niske pasterizacije (80°C/5 min i 90°C/5 min) na fizičko-hemijske

karakteristike, promene na proteinima i teksturalne promene tokom zrenja kozjih belih sireva u salamuri. Cilj je takođe i da se ispita senzorni kvalitet i prihvatljivost ovih sireva u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi zrenja.

5.5.1. Promene osnovnih parametara kvaliteta sireva tokom zrenja

U Tabeli 10, dati su osnovni parametri kvaliteta sireva dobijenih od mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima, u cilju njihove karakterizacije, kroz ukupno pet tačaka zrenja: 1, 10, 20, 30 i 40 dan. Odnosi između pojedinih parametara kvaliteta dati su u Tabeli 11. U odnosu na parametre kvaliteta kozjeg sira Caccioricotta, proizvedenog od termički tretiranog mleka na 90°C/1 min, ekperimentalni sirevi analizirani u ovom radu imaju manji sadržaj suve materije, pa samim tim i proteina i masti (Caponio et al., 2001). Parametri kvaliteta su u velikoj meri uporedivi sa parametrima kozjeg belog sira u salamuri od sirovog mleka, analiziranog u radu (Barać et al., 2013), kao i turskog belog sira u salamuri od pasterizovanog mleka (Topçu i Saldamli, 2006).

Na osnovu statističke analize parametara kvaliteta sireva, može se zaključiti da termički tretman utiče značajno ($p < 0,05$) na sadržaj suve materije i proteina. Parna poređenja ukazuju na to da se ova razlika zasniva na statistički značajnoj razlici ($p < 0,05$) između sadržaja suve materije u uzorku sira 65/30 i oba eksperimentalna uzorka, prvog dana zrenja. Naime, usled slabo izraženog sinerezisa koji se javlja kod sireva proizvedenih od mleka tretiranog režimima oštrijim od niske pasterizacije zaostaje značajno više vode u sirevima (Singh i Waungana, 2001). Shodno tome, i sadržaj proteina je značajno viši u kontrolnom uzorku prvog dana zrenja. Nasuprot sadržaju proteina, iz Tabele 10 se vidi da ne postoji značajna razlika u sadržaju masti između kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka sireva prvog dana zrenja, što statistička analiza i potvrđuje.

Ovakav rezultat se može objasniti izraženijim iskorišćenjem masti u poređenju sa iskorišćenjem proteina (poglavlje 5.4.3.). Obzirom da sirevi sazrevaju u salamuri, sadržaj suve materije kontrolnog i eksperimentalnih sireva se tokom zrenja izjednačavaju, usled postojanja dinamičke ravnoteže između sira i salamure.

Tabela 10. Promena osnovnih parametara kvaliteta tokom zrenja (1, 10, 20, 30 i 40 dan) kozjih belih sireva u salamuri proizvedenih od mleka tretiranog na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5), 90°C/5 min (90/5);

	Termički tretman	Dani zrenja				
		1	10	20	30	40
%SM	65/30	44,27±1,62	40,34±1,31	38,76±0,43	39,82±1,66	38,16±3,82
	80/5	38,54±1,18	39,93±1,52	38,98±0,90	39,48±1,74	39,84±0,99
	90/5	38,08±0,30	38,76±0,43	39,25±1,07	39,21±2,05	39,49±1,38
%UP	65/30	18,43±0,25	16,35±0,87	16,76±2,13	15,69±1,17	16,03±1,32
	80/5	14,81±1,31	16,17±0,96	16,05±0,19	16,23±1,63	15,63±0,90
	90/5	14,77±1,45	14,94±0,33	15,56±0,79	15,33±1,21	15,86±0,90
%M	65/30	18,50±0,71	17,67±1,53	18,00±1,73	18,83±1,04	17,50±2,64
	80/5	17,50±2,12	18,00±0,87	18,50±0,71	18,83±1,04	18,58±0,52
	90/5	18,25±0,35	18,17±0,28	19,17±0,29	18,50±0,71	19,00±1,73
%NaCl	65/30	1,27±0,05	2,71±0,37	2,46±0,20	3,20±0,83	3,29±0,53
	80/5	1,09±0,14	2,58±0,26	2,68±0,17	3,12±0,48	3,09±0,46
	90/5	1,09±0,36	2,67±0,45	2,60±0,23	3,01±0,33	3,39±0,92
pH	65/30	5,04±0,21	4,94±0,11	4,88±0,15	5,00±0,1	5,00±0,07
	80/5	4,97±0,11	4,59±0,04	4,53±0,07	4,52±0,12	4,50±0,08
	90/5	4,96±0,09	4,47±0,10	4,43±0,07	4,49±0,06	4,49±0,12

SM – suva materija; UP – ukupni proteini; M – mast

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

Na osnovu sadržaja VuBM i MuSM (Tabela 10), sve tri varijante spadaju u meke sireve, na granici između polumasnih i punomasnih (CAC, 2013).

Termički tretman ima značajan uticaj ($p<0,05$) na sadržaj VuBM, MuSM i P/M. Iz Tabele 11 se može videti da se sa pooštavanjem termičkog tretmana mleka sva tri navedena parametra uvećavaju.

Ukoliko se izvrše parna poređenja, dobija se podatak da što se tiče sadržaja VuBM i odnosa P/M, postoji statistički značajno uvećanje ($p<0,05$) već nakon termičkog

tretmana na 80°C/5 min, dok se dve eksperimentalne varijante visokog termičkog tretmana (80/5 i 90/5) statistički značajno ne razlikuju. Parnim poređenjem istih uzoraka sireva u pogledu sadržaja MuSM može se utvrditi da značajan porast prouzrokuje tek termički tretman na 90°C/5 -min. Uticaj termičkih tretmana na navedene parametre zabeležen je u literaturi kada je u pitanju kravlje mleko (Macej, 1989, Jovanović, 2001, Rynne et al., 2004).

Tabela 11. Promena određenih odnosa između pojedinih parametara kvaliteta tokom zrenja (1, 10, 20, 30 i 40 dan) kozjih belih sireva u salamuri proizvedenih od mleka tretiranog na 65°C/30 min, 80°C/5 min, 90°C/5 min

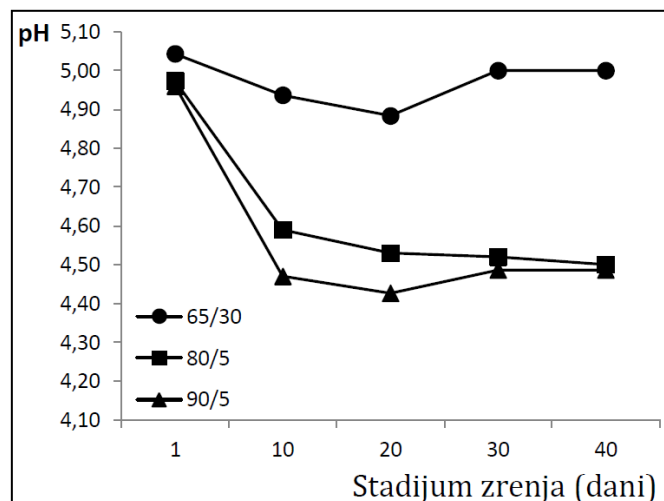
	Termički tretman	Dani zrenja				
		1	10	20	30	40
VuBM(%)	65/30	67,52±1,29	72,46±0,67	72,22±0,77	73,62±2,35	74,92±2,99
	80/5	74,41±0,10	73,26±1,92	75,82±1,50	74,56±1,22	73,89±0,77
	90/5	75,81±0,16	74,83±0,77	75,16±1,06	76,04±0,58	74,70±0,11
MuSM (%)	65/30	41,14±0,17	43,75±2,59	47,55±1,24	45,89±2,80	45,86±0,47
	80/5	45,25±3,55	45,12±2,55	47,62±0,30	47,69±0,67	46,64±0,32
	90/5	47,99±0,42	46,87±1,24	48,85±0,59	48,65±1,78	48,05±2,66
SuVF (%)	65/30	2,24±0,12	4,52±0,54	4,33±0,49	5,15±1,02	5,27±0,40
	80/5	1,76±0,21	4,28±0,28	4,37±0,22	5,21±0,99	5,19±0,77
	90/5	1,76±0,57	4,37±0,72	4,31±0,29	5,02±0,76	5,67±1,69
P/M	65/30	1,00±0,01	0,93±0,11	0,93±0,07	0,89±0,07	0,92±0,04
	80/5	0,90±0,12	0,90±0,06	0,86±0,02	0,85±0,02	0,84±0,04
	90/5	0,85±0,05	0,82±0,03	0,81±0,03	0,79±0,05	0,84±0,05

VuBM – voda u bezmasnoj materiji, MuSM – mast u suvoj materiji, SuVF – so u vodenoj fazi, P/M – odnos proteina i masti.

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja±standardna devijacija

Bitno je istaći da se eksperimentalni sirevi ne razlikuju značajno od kontrolne varijante po pitanju osnovnog hemijskog sastava. Odnosno, termičkim tretmanom kozjeg mleka ne dobijaju se beli sirevi u salamuri obogaćeni visokim sadržajem proteina ili masti, kao što bi se možda moglo očekivati na osnovu stepena

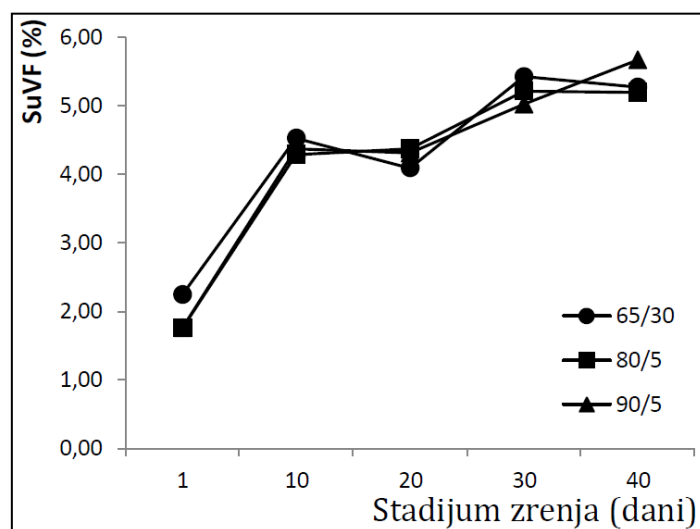
iskorišćenja ovih parametara. Ipak, uticaj koji termički tretman mleka vrši na sadržaj VuBM, MuSM i P/M može se odraziti na tok zrenja, kao i na teksturalne i senzorne karakteristike sireva.



Slika 23. Uporedni prikaz promene pH vrednosti sireva dobijenih termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja

Prilikom proizvodnje sireva od termički tretiranog mleka, kao što je već pomenuto, sinerezis je otežan. Još jedan efekat slabije izraženog sinerezisa je i veće zadržavanje laktoze u grušu, koja fermentiše posredstvom bakterija mlečne kiseline, čime doprinosi opadanju pH (Hougaard et al., 2010). Na ovaj način, početna značajna razlika u sadržaju suve materije eksperimentalnih sireva i kontrolne varijante doprinela je da termički tretmani mleka imaju statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na promene pH vrednosti tokom zrenja sireva. Takođe, poznato je da niži sadržaj VuBM u siru podrazumeva veći puforni kapacitet (Puđa i Macej, 1996), što je verovatno doprinelo zadržavanju pH vrednosti sira 65/30 na višoj vrednosti tokom čitavog perioda zrenja. Na Slici 23 dat je uporedni prikaz promene pH vrednosti sve tri ispitivane varijante sireva tokom zrenja. Statističkom analizom je utvrđeno da se u pogledu pH vrednosti prvog dana zrenja sirevi ne razlikuju statistički značajno ($p < 0,05$), da bi se već nakon 10 dana uspostavila statistički značajna razlika između kontrolne varijante i obe eksperimentalne varijante, pri čemu se eksperimentalne varijante između sebe ne razlikuju značajno ($p < 0,05$).

U slučaju uzorka 65/30 može se uočiti blagi porast pH vrednosti nakon 20 dana zrenja. Na osnovu porasta pH vrednosti može se pretpostaviti da kontrolni uzorak podleže intenzivnijim proteolitičkim promenama, kao što je naznačeno u literaturi (Upadhyay et al., 2004).



Slika 24. Uporedni prikaz promene sadržaja soli u vodenoj fazi (SuVF) sireva dobijenih termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja

Na Slici 24 prikazan je trend promene sadržaja SuVF u kontrolnoj i eksperimentalnim varijantama sireva. Poznato je da pored konzervišućeg efekta, so vrši uticaj na sastav, mikrofloru, tok zrenja, teksturu i senzorna svojstva sireva (Trujillo et al., 1997). Međutim, statističkom analizom podataka utvrđeno je da termički tretman ne utiče značajno ($p < 0,05$) na sadržaj soli, kao ni na sadržaj soli u vodenoj fazi sira, što se jasno može videti i sa Slike 24. Na SuVF sireva utiče stadijum zrenja statistički značajno ($p < 0,05$). Naime, značajno uvećanje sadržaja SuVF detektovano je nakon 10 dana. Od 10 do 30 dana ova vrednost se postepeno uvećava, nakon čega nema statistički značajne promene ($p < 0,05$) u poslednjih deset dana zrenja.

Bitno je napomenuti da se intenzivniji biohemijski i mikrobiološki procesi javljaju ukoliko je koncentracija SuVF $< 3\%$, dok koncentracija $> 5\%$ uslovljava inhibiranje aktivnosti pojedinih enzima (Puđa, 1992). Kod sve tri varijante sireva već nakon 10

dana zrenja uspostavlja se koncentracija SuVF koja se nalazi između navedene dve granične vrednosti.

Trend promene sadržaja soli u vodenoj fazi kao i pH vrednosti, treba imati u vidu prilikom posmatranja proteolitičkih, teksturalnih i senzornih promena tokom zrenja ispitivanih sireva.

5.5.2. Efekat termičkih tretmana na proteolitičke promene tokom zrenja sireva

5.5.2.1. Primarna proteoliza

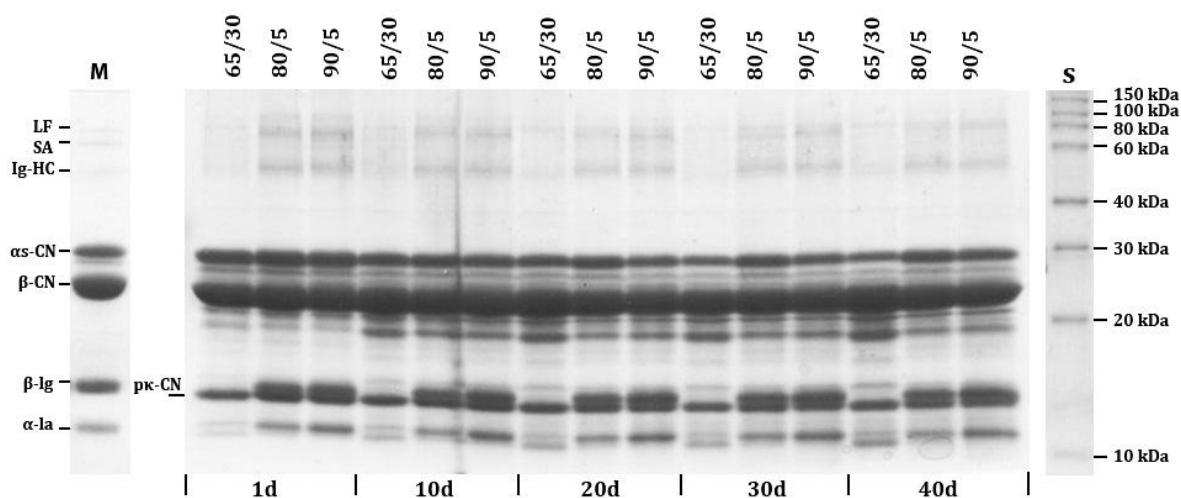
Uticaj termičkih tretmana na primarnu proteolizu praćen je SDS-PAG elektroforezom. Iako ova elektroforetska tehnika ne omogućuje potpuno razdvajanje kazeinskih frakcija, smatra se najadekvatnijom tehnikom ukoliko su u siru pored kazeina prisutni i serum proteini (Faccia et al., 2007).

Prisustvo serum proteina u uzorcima sireva čije je mleko tretirano oštrijim termičkim tretmanom od niske pasterizacije može se uočiti sa elektroforetograma (Slika 25). Treba pritom naglasiti da se pored glavnih serum proteina, u uzorcima 80/5 i 90/5 može detektovati i prisustvo serum proteina velike molekulske mase (LF, SA i Ig-HC).

Denzitometrijskom analizom elektroforetograma, izvršena je relativna kvantifikacija svih identifikovanih proteinskih frakcija, kako bi se utvrdilo: (1) u kojoj meri se razlikuje proteinski sastav uzoraka sireva 65/30, 80/5 i 90/5 prvog dana zrenja (Slika 26); i (2) koji je intenzitet i obim proteolitičkih promena, na osnovu promene udela rezidualnog α -CN (Slika 27) i β -CN (Slika 28) u sve tri varijante sireva tokom zrenja. Nije bilo moguće odvojeno kvantifikovati udeo β -lg i μ -CN, obzirom da su linije koje se odnose na ova dva proteina preklapljene na elektroforetogramu. Zato je i na Slici 26 i u statističkoj analizi uzeta vrednost koja obuhvata udeo oba proteina, pod pretpostavkom da se uvećanje udela ove dve preklapljene linije odnosi samo na uvećanje β -lg.

Statističkom analizom podataka za proteinski sastav sireva utvrđeno je da termički tretman značajno utiče na uvećanje sadržaja glavnih serum proteina kao i serum proteina velikih molekulskih masa. Usled većeg udela serum proteina u eksperimentalnim uzorcima sireva javlja se umanjeno udeo kazeina. U slučaju β -CN,

smanjenje udela pod uticajem termičkog tretmana je i statistički značajno ($p < 0,05$).

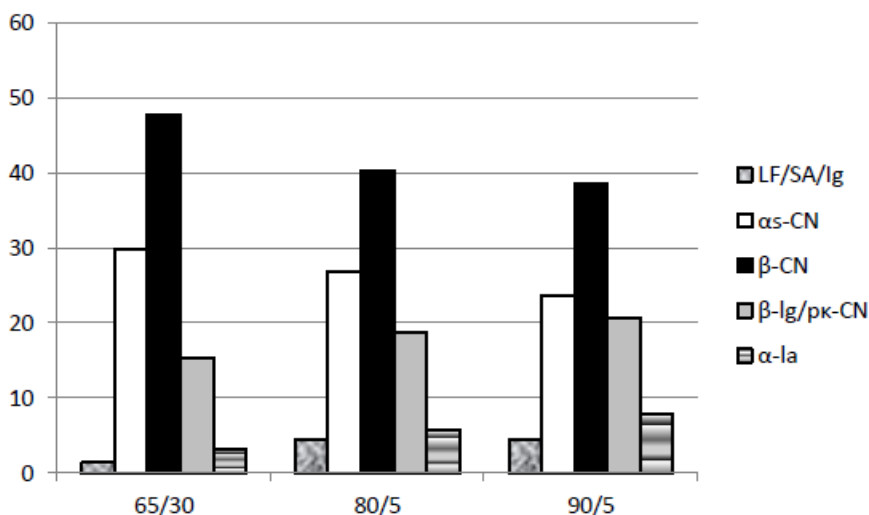


Slika 25. Elektroforetogram sireva dobijenih termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja, M-uzorak sirovog mleka; S - standard poznatih molekulskih masa od 10-150 kDa

Na osnovu parnih poređenja uzoraka u pogledu udela proteina jedan dan nakon proizvodnje, može se zaključiti sledeće: udeo svih serum proteina isuzev α -la statistički značajno raste već nakon termičkog tretmana na 80°C/5 min, dok između dve eksperimentalne varijante sireva ne postoji statistički značajna razlika. Uzorak 90/5 sadrži značajno manje ($p < 0,05$) β -CN od kontrolnog uzorka i značajno više α -la. Na osnovu statističke analize, i histograma (Slika 26) može se zaključiti da se radi o tri varijante sira značajno različitih u pogledu proteinskog sastava na početku zrenja, što može uticati na pojedine procese koji se tokom zrenja odigravaju, ali takođe i na senzorna svojstva i nutritivnu vrednost sireva.

Ukoliko se statistička analiza primeni u cilju sagledavanja intenziteta i obima zrenja kontrolnog i eksperimentalnih sireva, može se zaključiti sledeće: termički tretman, stadijum zrenja i interakcija ova dva faktora utiču značajno na sadržaj rezidualnog α _s-CN. Parnim poređenjima utvrđeno je da se nakon deset dana izjednačava početna razlika u udelu ovog proteina između kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka, da bi se nakon 30 dana zrenja kontrolni uzorak statistički značajno razlikovao ($p < 0,05$) od uzorka 80/5, a nakon 40 dana od oba

eksperimentalna uzorka sira. Naime, kod eksperimentalnih uzoraka statistički značajan ($p < 0,05$) pad udela rezidualnog α_s -CN detektovan je nakon 10 dana, da bi u daljem toku zrenja udeo ovog proteina ostao konstantan. U prethodnom poglavlju je napomenuto da je %SuVF u prvih 10 dana bila $< 3\%$, što je svakako, barem delimično, pogodovalo intenzivnijim biohemijskim reakcijama.

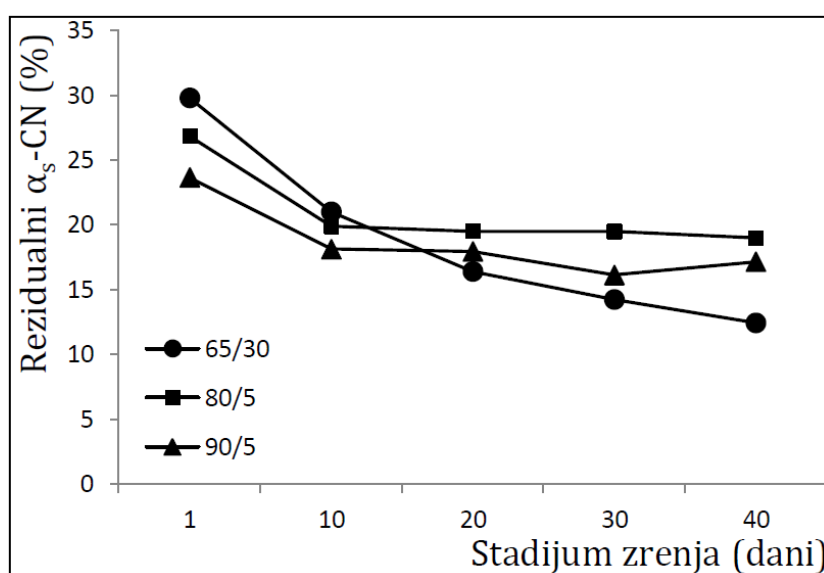


Slika 26. Procentualni sastav proteina prisutnih prvog dana zrenja u uzorcima sireva proizvedenim od mleka tretiranog termičkim tretmanom na $65^\circ\text{C}/30$ min (65/30), $80^\circ\text{C}/5$ min (80/5) i $90^\circ\text{C}/5$ min (90/5)

U kontrolnom uzorku, proteolitičke promene na α_s -CN su izraženije, što se jasno vidi sa Slike 27. Nakon 10, kao i nakon 20 dana dolazi do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja udela rezidualnog α_s -CN u odnosu na početni udeo. Nakon 30 i 40 dana dolazi do smanjenja intenziteta proteolize α_s -CN, odnosno ne dolazi do statistički značajnog smanjenja udela rezidualnog α_s -CN. Od početnog udela ovog proteina koji je iznosio $29,8(\pm 2,7)\%$, na kraju zrenja ostaje $12,4(\pm 1,9)\%$. Uzorak 80/5 i 90/5, u kojima je na početku zrenja bilo prisutno $26,8(\pm 3,3)$ i $23,7(\pm 1,4)\%$, nakon 40 dana ostali su sa $18,9(\pm 4,2)$ i $17,1(\pm 2,5)\%$ α_s -CN respektivno.

Statističkom analizom utvrđeno je da stadijum zrenja nema značajan uticaj ($p < 0,05$) na procentualni udeo rezidualnog β -CN, što se i sa Slike 28 može jasno videti. Početna, značajna razlika u udelu β -CN u eksperimentalnim uzorcima sireva zadržava se do kraja zrenja. Nizak stepen razgradnje ovog proteina tokom zrenja ispitivanih sireva je i očekivano imajući u vidu sledeće: (1) β -CN je u najvećoj meri

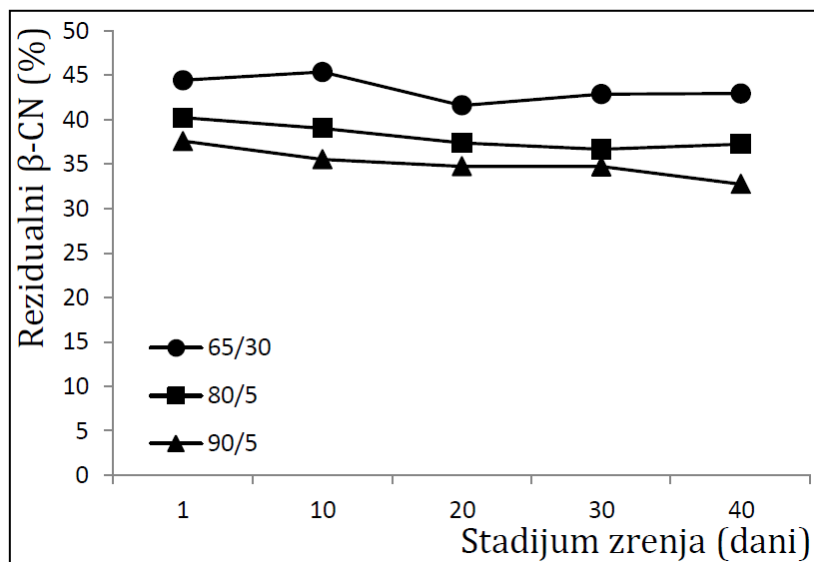
supstrat za plazmin, kome ne pogoduje niska pH vrednost karakteristična za sireve koji sazrevaju u salamuri (Upadhyay et al., 2004); (2) visoki termički tretmani mleka redukuju aktivnost plazmina (Kelly i Mc Sweeney, 2003); (3) β -lg koji je integrisan u proteinski matriks inhibitorno deluje na dejstvo plazmina (Bastian i Brown, 1996) (4) dejstvo himozina na β -CN je sa druge strane inhibirano visokom koncentracijom SuVF koja se javlja u svim varijantama sira nakon 20 dana zrenja (>5%); Kao rezultat svega navedenog dobijamo da uzorak 65/30 početnih 44,4(\pm 2,9)% na kraju zrenja sadrže 42,9(\pm 3,7)% β -CN, dok uzorci 80/5 i 90/5 sa početnih 40,2(\pm 0,3)% i 37,6(\pm 1,1)% na kraju zrenja imaju 37,2(\pm 4,0)% i 32,8(\pm 2,6)% β -CN respektivno.



Slika 27. Promena procentualnog udela rezidualnog α_s -CN u sirevima dobijenim termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja

U odnosu na postojeću literaturu koja se bavi istom tematikom rezultati prezentovani u ovom radu slični su po pitanju intenzivnijih proteolitičkih promena na α_s -CN i limitirane proteolize β -CN. Generalno u mnogim sirnim varijetetima susreće se intenzivnija razgradnja α_s -CN u odnosu na β -CN. Nekoliko autora je registrovalo istu pojavu u kozjim sirevima proizvedenim na sličan način (Astari et al., 2010, Bontinis et al., 2012, Hayaloglu et al., 2013). Bontinis et al., (2012) navode da, ukoliko se koristi sirilo životinjskog porekla (što je u ovom radu bio slučaj), dolazi do intenzivnije proteolize α_s -CN u odnosu na β -CN. Pored toga, na niskim pH

vrednostima himozin je aktivniji, a budući da je glavni supstrat za himozin upravo α_s -CN, u sirevima koji se odlikuju niskom pH vrednošću, izraženija je hidroliza ovog proteina (Sousa et al., 2001).

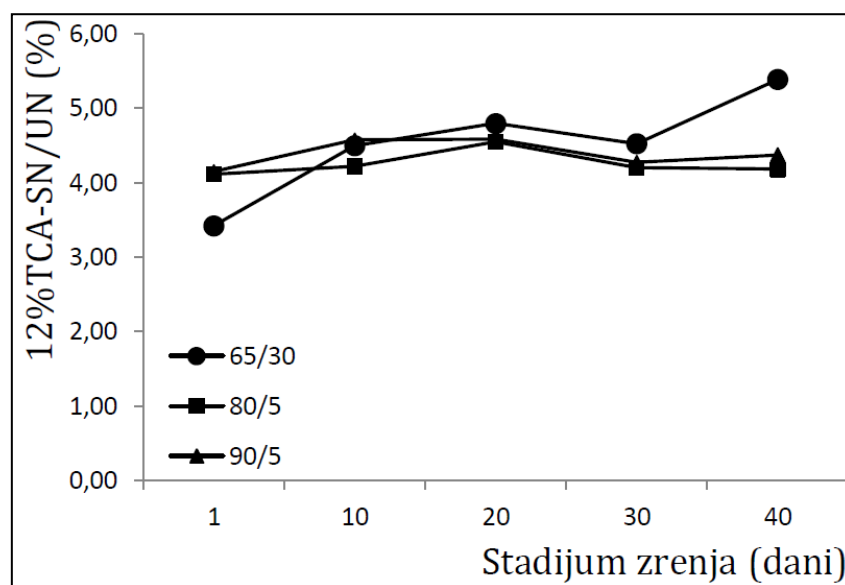


Slika 28. Promena procentualnog udela rezidualnog β -CN u sirevima dobijenim termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja

Razlog za značajno inhibiranu proteolizu α_s -CN u sirevima dobijenim od kozjeg mleka tretiranog tretmanima oštrijim od niske pasterizacije u literaturi do sada nije razjašnjen. Postoje čak i kontradiktorni rezultati određenih autora, prema kojima se pod dejstvom visokih termičkih tretmana inhibira proteolitička razgradnja β -CN, dok na proteolizu α_s -CN-a termički tretman ne utiče (Benfeldt et al., 1997). U ovom radu, veći sadržaj VuBM i niža pH vrednost eksperimentalnih sireva čak idu u prilog intenziviranju proteolize α_s -CN. Negativan uticaj termičkih tretmana na razgradnju α_s -CN može se objasniti time da su usled kompleksnije umreženog matriksa, u eksperimentalnim uzorcima sira potencijalna mesta hidrolize manje dostupna dejstvu himozina (Benfeldt et al., 1997). Dodatni razlog može da predstavlja to što je odnos P/M značajno manji kod eksperimentalnih sireva u odnosu na kontrolni, čime je dostupnost potencijalnih mesta hidrolize dejstvu enzima dodatno umanjena.

5.5.2.2. Sekundarna proteoliza

Jedan od načina sagledavanja obima sekundarne proteolize, koja se često posmatra kao pokazatelj “dubine zrenja” (Tejada et al., 2008) je praćenje udela azotne frakcije koja ostaje rastvorljiva u 12% rastvoru TCA tokom zrenja. Rezultati navedene analize dati su grafikom na Slici 29, gde je dat udeo azota rastvorljiv u 12% TCA (u odnosu na ukupan azot prisutan u siru) u zavisnosti od stadijuma zrenja.



Slika 29. Promena procentualnog udela azotne frakcije rastvorljive u 12% TCA u sirevima dobijenim termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min, nakon 1, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja

Na osnovu statističke analize rezultata dolazi se do zaključka da ni termički tretman ni stadijum zrenja ne vrše značajan uticaj na dubinu zrenja odnosno sekundarnu proteolizu. Slični rezultati mogu se naći u literaturi kada su u pitanju kozji sirevi, po pitanju limitiranog obima sekundarne proteolize (Faccia et al., 2007, Bontinis et al., 2012, Hayaloglu et al., 2013). U revijalnom radu, Singh i Waungana, (2001) navode da termički tretman izaziva usporeno generisanje neproteinske azotne frakcije rastvorljive u 12% TCA. Sa Slike 29 se može uočiti da nakon 40 dana zrenja, kontrolni uzorak sadrži nešto više 12% TCA rastvorljive frakcije, međutim ova razlika ipak nije statistički značajna. Ipak na osnovu postojeće razlike nameće se pretpostavka da bi termički tretman značajno uticao ukoliko bi sirevi sazrevali u dužem vremenskom intervalu.

5.5.3. Promena teksturalnih svojstava tokom zrenja sireva

Analiza teksture obuhvatila je merenje četiri različita parametra korišćenjem tri različita alata, prema metodama opisanim u poglavlju *Materijal i metod*. Grupa analiza primenjenih u ovom radu spada u takozvane imitativne ili semifundamentalne metode, kojima se mehanički imitira senzorno ocenjivanje ispitivanog svojstva hrane koje bi čovek mogao da oceni svojim čulima (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003).

Bitna komponenta doživljaja teksture sira je način na koji se on lomi, posebno prilikom prvog zagrižaja. Metodom preloma klinom (fracture wedge test), primenjenom u ovom radu simulira se upravo prvi zagrižaj, na osnovu kog instrument meri tvrdoću pri prelomu odnosno lomljivost uzorka (Vincent et al., 1991).

Druga primenjena metoda je metoda sečenja žicom (wire cutter test). Sečenje žicom ili nožem uključuju prelom, plastičnu deformaciju i trenje u unutrašnjosti uzorka sira (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003). Na osnovu ove metode određivana je čvrstoća pri sečenju.

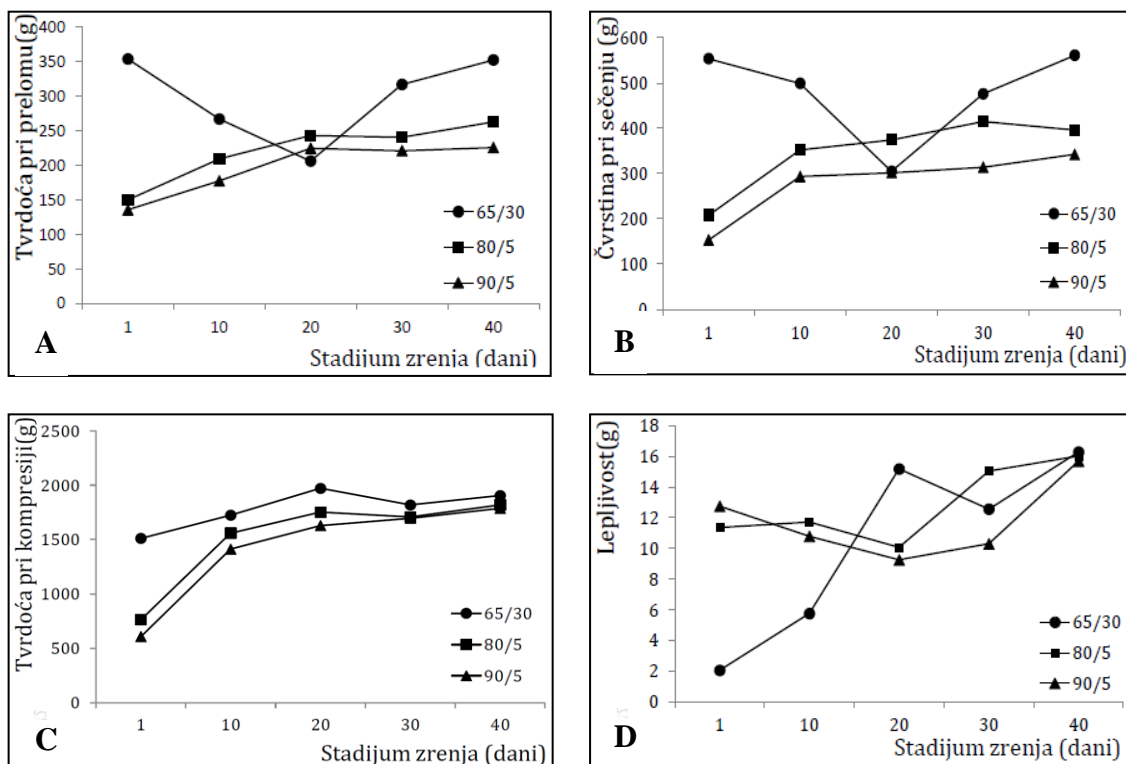
Kao poslednji alat za merenje teksturalnih svojstava uzoraka upotrebljena je sferična sonda (spherical probe test) koja vrši kompresiju uzoraka (Buňka et al., 2013). Pomenutom metodom vrši se merenje dva parametra: tvrdoća pri kompresiji, i lepljivost uzorka.

Na Slici 30 prikazane su promene teksturalnih svojstava tokom 40 dana zrenja sireva proizvedenih od mleka tretiranog na 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 min.

Statističkom obradom rezultata analize teksturalnih svojstava utvrđeno je da termički tretman i stadijum zrenja utiču na sve parametre teksture osim na lepljivost, na koju utiče samo stadijum zrenja, pri čemu na tvrdoću sira pri lomljenju i čvrstoću pri sečenju, kao i na lepljivost utiče interakcija navedenih faktora.

Kad je reč o tvrdoći uzoraka pri lomljenju (Slika 30A) kod kontrolnog uzorka je statističkom analizom utvrđen značajan pad ove vrednosti ($p < 0,05$) nakon 10 dana

zrenja, da bi se nakon trideset dana tvrdoća kontrolnog uzorka pri lomljenju ponovo uvećala. U prvoj fazi zrenja porast krtosti kontrolne varijante može se objasniti padom pH vrednosti tokom ovog perioda što se kao objašnjenje sreće i u literaturi (Watkinson et al., 2001). Nakon 30 dana, obzirom da je došlo do značajne razgradnje proteinskog matriksa, sirevi postaju manje krti i lomljivi, što je i očekivano na osnovu literaturnih navoda (Hort i Le Grys, 2001).



Slika 30. Promena teksturalnih svojstava: A – tvrdoća pri prelomu; B – čvrstina pri sečenju; C – tvrdoća pri kompresiji; D – lepljivost; tokom zrenja sireva (1, 10, 20, 30 i 40 dan) dobijenih termičkim tretmanom mleka na 65°C/30 min (65/30), 80°C/5 min (80/5) i 90°C/5 min

Na eksperimentalne uzorke sireva stadijum zrenja ne utiče statistički značajno ($p < 0,05$) po pitanju ovog parametra, mada se sa Slike 30 može uočiti blagi porast tvrdoće tokom zrenja. Što se tiče uticaja termičkog tretmana, postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između kontrolnog i oba eksperimentalna uzorka, dok se eksperimentalni uzorci međusobno ne razlikuju značajno ($p < 0,05$). Sa Slike 30B se može uočiti gotovo identičan trend promene čvrstoće ispitivanih varijanti sireva, što se potvrđuje korelacionom analizom kojom je utvrđeno postojanje značajne pozitivne korelacije za uzorke 65/30, 80/5 i 90/5 ($R=0,92$, $R=0,95$ i $R=0,92$,

respektivno ($p < 0,05$)). Značajna korelacija između tvrdoće uzoraka pri lomljenju i čvrstoće pri sečenju je donekle i očekivana obzirom da kao što je napomenuto, sečenje žicom ili nožem uključuju prelom, plastičnu deformaciju i trenje u unutrašnjosti uzorka sira. Na osnovu utvrđene korelacije može se zaključiti da ukoliko se kozji beli sirevi u salamuri seku žicom, dominira efekat preloma.

Što se tiče ispitivane tvrdoće sireva pri lomljenju kao i čvrstine pri sečenju, utvrđeno je da na početku zrenja kontrolni uzorak pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$) veću vrednost oba parametra u odnosu na eksperimentalne uzorke. Nakon 20 dana, po pitanju oba parametra, ispitivane tri varijante sira se izjednačavaju, da bi nakon toga ovi parametri rasli u slučaju kontrolnog uzorka, i značajno se razlikovali ($p < 0,05$) od eksperimentalnih uzoraka i nakon 30 i nakon 40 dana. Velika tvrdoća pri lomljenju kontrolnog uzorka na početku zrenja može se objasniti značajno većim udelom SM odnosno manjim udelom VuBM u odnosu na eksperimentalne uzorke. Smanjenje tvrdoće tokom zrenja, do dvadesetog dana uslovljeno je padom pH vrednosti, usled čega sir postaje krt, lako se lomi odnosno ima nižu vrednost tvrdoće lomljenja. U nastavku zrenja, obzirom da u ovom uzorku dolazi do značajne proteolize α_s -kazeina, pri čemu pH vrednost raste, dolazi do smanjenja krtosti sira, odnosno tvrdoća pri lomljenju se ponovo povećava, kao i čvrstina pri sečenju. U literaturi se smanjenje tvrdoće pri lomljenju pripisuje gubitku elastičnih svojstava sireva prouzrokovanom razgradnjom proteina tokom zrenja. Na višim pH vrednostima dolazi do delimične adsorpcije vode na molekulima kazeina, usled čega se uvećava tvrdoća sireva pri lomljenju, odnosno krtost sira se smanjuje (Buffa et al., 2001).

Na Slici 30C prikazana je promena tvrdoće sira pri kompresiji. Na osnovu parnih poređenja podataka utvrđeno je da statistički značajna razlika postoji između kontrolnog uzorka i eksperimentalnih uzoraka, pri čemu se eksperimentalni uzorci ne razlikuju značajno ($p < 0,05$). Sa Slike 30C se vidi da je navedena razlika posebno naglašena prvog dana, što je i očekivano na osnovu značajno nižeg sadržaja VuBM u kontrolnom uzorku. Tokom zrenja se uočava nagli porast tvrdoće pri kompresiji eksperimentalnih uzoraka sireva nakon 10 dana, što je verovatno posledica značajnog pada pH vrednosti u ovom vremenskom intervalu. Kontrolni uzorak sira

pokazuje blaži porast tvrdoće pri kompresiji, što se takođe poklapa sa blažim padom pH vrednosti u ovom uzorku nakon 10 dana.

Na osnovu testa kompresijom dobija se takođe i podatak o lepljivosti sira. Ovaj parametar teksture se prvog dana zrenja takođe značajno razlikuje kod kontrolnog uzorka u odnosu na oba eksperimentalna uzorka. Eksperimentalni uzorci imaju značajno izraženiju lepljivost, što je takođe očekivano s obzirom na značajno viši sadržaj VuBM. Statističkom analizom podataka utvrđeno je da se tokom zrenja lepljivost eksperimentalnih uzoraka ne menja značajno ($p < 0,05$). Značajan porast lepljivosti kontrolnog uzorka nakon 20 dana ($p < 0,05$) može se pripisati značajnom porastu sadržaja VuBM. Kod uzorka 65/30 u navedenoj tački zrenja zabeležen je takođe i najveći sadržaj MuSM, koji verovatno doprinosi visokoj vrednosti za posmatrani parametar teksture.

Na osnovu analize teksturalnih svojstava tri ispitivane varijante sireva, možemo zaključiti sledeće: (1) termički tretman značajno utiče na sve ispitivane parametre teksture kao i na tok promena teksturalnih svojstava sireva tokom zrenja; (2) između uzoraka 80/5 i 90/5 ne postoje značajne razlike u ispitivanim parametrima teksture, što znači da sve promene koje se dešavaju, nastaju već pri termičkom tretmanu od 80°C/5 min; (3) parametri koji u najvećoj meri direktno doprinose tome da se tekstura sira dobijenog od pasterizovanog mleka značajno razlikuje od sireva dobijenih oštijim termičkim tretmanima su pH vrednost, stepen proteolitičkih promena i sadržaj VuBM, što je i ranije u literaturi navedeno (Buffa et al., 2001). Indirektno, ove razlike svakako mogu biti pripisane uticaju termičkih tretmana na izmenjen oblik i sastav kazeinskih micela u samom mleku, usled čega su izmenjeni parametri koagulacije, pojedini parametri fizičko-hemijskih svojstava sireva, kao i tok proteolitičkih promena tokom zrenja.

5.5.4. Senzorna analiza sireva

5.5.4.1. Deskriptivna senzorna analiza i eksterno mapiranje preferencije

Rezultati multivarijacione analize varijanse (MANOVA), koja je obuhvatila svih devet ispitivanih senzornih svojstava, su pokazali značajni multivarijacioni efekat u pogledu dejstva posmatranih tretmana. Wilks' lambda vrednost je bila statistički

značajna ($p < 0,0001$). Trofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA), kojoj su bili podvrgnuti podaci za svako ispitivano svojstvo pojedinačno, je pokazala da se u okviru tri od devet ispitivanih svojstava (ukus na maslac, ukus na surutku i ukus na jogurt) ne javlja statistički značajna razlika između oglednih uzoraka ($p > 0,05$). Međutim, uzimajući u obzir da su pojedinačne p – vrednosti za pomenuta tri svojstva bile bliske graničnoj vrednosti od 0,05, ova tri svojstva nisu bila izbačena iz dalje statističke analize koja je obuhvatila postupak redukcije dimenzija. Kod svih ispitivanih svojstava razlike između ponavljanja ocenjivanja nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$), međutim, interakcije “ocenjivači” – “ponavljanje” su u većini slučajeva bile statistički značajne ($p < 0,05$), što ukazuje na to da su ocenjivači koristili različite delove skale u različitim ponavljanjima ocenjivanja. Uticaj ovog efekta, kao i efekta različitog korišćenja skale od strane različitih ocenjivača, se u velikoj meri redukuje primenom uopštene Prokrust analize (GPA).

GPA analiza je obuhvatila originalne deskriptivne podatke za svih devet ispitivanih svojstava, koji su bili grupisani u 16 pojedinačnih matrica (8 ocenjivača x 2 ponavljanja). Kao rezultat GPA analize, posle dimenzionog skaliranja, centriranja, izotropnog skaliranja i rotiranja inicijalnih matrica podataka, dobijena je matrica (9 kolona/svojstva x 9 redova/uzorci) sa konsenzus podacima. Ukupni indeks varijabiliteta između matrica dobijenih nakon reskaliranja i rotiranja (*consensus proportion*) iznosio je 0,74 (74%), što ukazuje na relativno jaku saglasnost između ocena datih od strane različitih ocenjivača, posmatrajući sva ponavljanja ocenjivanja posebno. Ova vrednost je testirana u pogledu statističke značajnosti (*randomization test*) (Grice and Assad, 2009). Rezultati testa su pokazali da je dobijena vrednost statistički značajna na nivou $\alpha = 0,05$ ($p < 0,01$).

Konsenzus podaci, dobijeni GPA analizom, su dalje podvrgnuti analizi glavnih komponentata (PCA). Varimax rotacija je odabrana iz razloga što je ona pružala najbolji raspored koeficijenata korelacije glavnih komponentata i originalnih promenljivih (*loading values*) u poređenju sa Quartimax i Equamax rotacijama, kao ortogonalnim rotacijama koje su bile dostupne u okviru korišćenog statističkog softvera. Odabir broja glavnih komponentata je izvršen na osnovu Kaiser-ovog kriterijuma koji sugeriše zadržavanje onih glavnih komponentata kod kojih

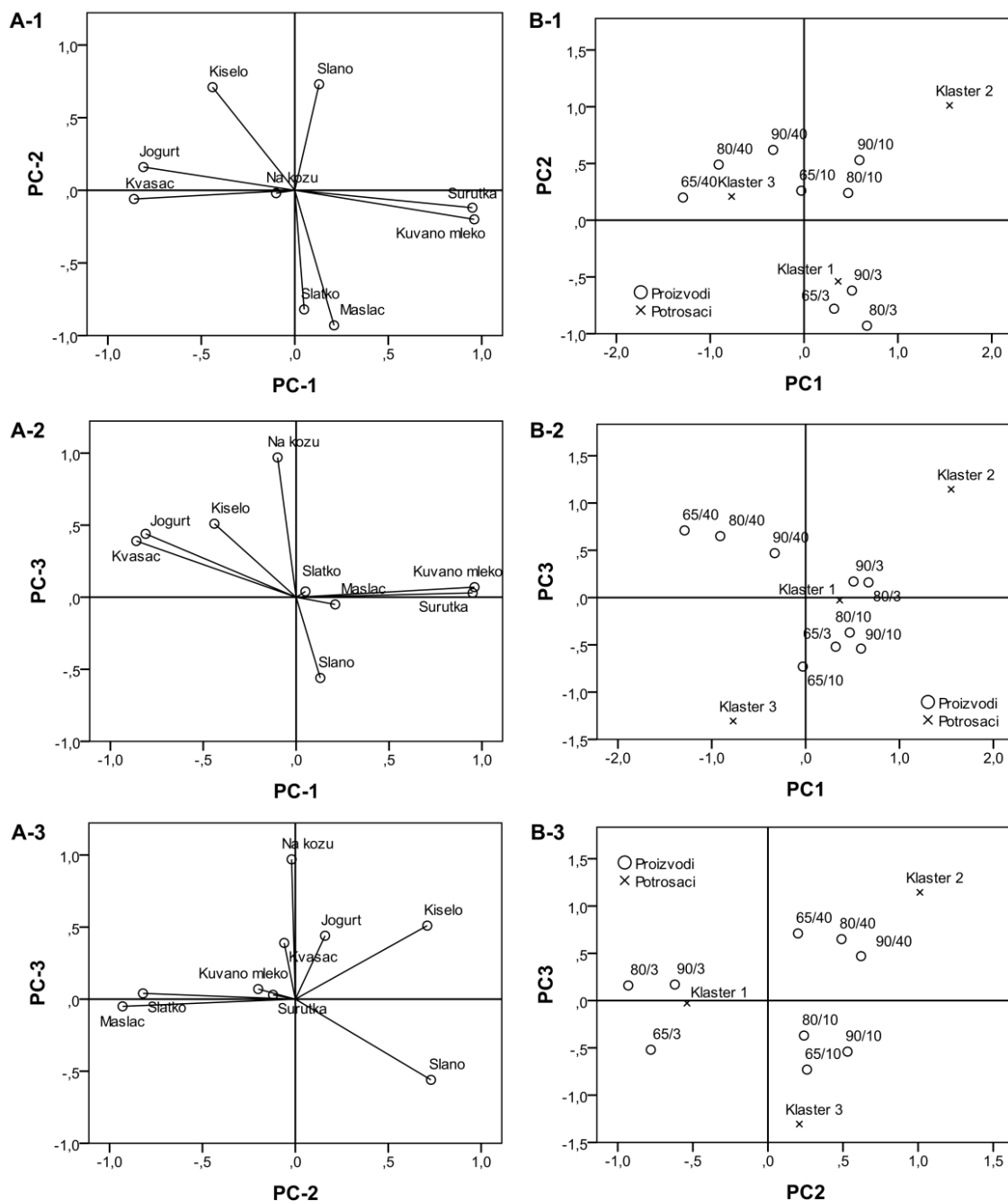
karakteristični koren (*eigen*-vrednost) ima vrednost veću od jedinice. Prve tri ekstrahovane glavne komponente su zadovoljavale ovaj kriterijum u kom smislu su zadržane za dalju analizu i objašnjavanje varijacija između objekata posmatranja.

Pomoću prve tri ekstrahovane glavne komponente može da se objasni 89,25 % od ukupnih varijacija vezanih za originalne promenljive (ispitivana senzorna svojstva), i to: komponenta 1 = 38,88 %; komponenta 2 = 29,60 %; i komponenta 3 = 20,78 %.

Za originalnu promenljivu se podrazumevalo da stoji u visokoj korelaciji sa glavnom komponentom ukoliko je vrednost koeficijenta korelacije (r) bila jednaka ili veća od 0,72 (Stevens, 2009) U visokoj korelaciji sa komponentom 1 stoje ukus na kuvano mleko, surutku, kvasac i jogurt, sa komponentom 2 ukus na maslac, sladak ukus, kiselost i slanost, dok je sa komponentom 3 u visokoj korelaciji jedino ukus na kozu, odnosno kozje mleko. Nijedna od navedenih originalnih promenljivih nije u visokoj korelaciji sa preostale dve glavne komponente ($r < 0,5$).

Pojedinačne ocene ukupne prihvatljivosti ispitivanih proizvoda, dobijene testiranjem potrošača, podvrgnute su višetrukoj linearnoj regresiji korišćenjem prve tri ekstrahovane glavne komponente u svojstvu regresora, a preko ocena pojedinačnih eksperimentalnih uzoraka dobijenih PCA analizom. Dobijeni nestandardizovani regresioni koeficijenti su korišćeni kao koordinate za testirane osobe u trodimenzionalnom prostoru glavnih komponenata.

U okviru Slika 31, na graficima označenim sa "A" prikazana su ispitivana svojstva (originalne promenljive) preko korelacionih vrednosti u odnosu na glavne komponente, dok je na graficima označenim sa "B" prikazan položaj ispitivanih uzoraka i grupa testiranih potrošača dobijenih klaster analizom u prostoru glavnih komponenata. Klaster analizom je izvršeno grupisanje testiranih potrošača u 3 klastera (grupe). Ovakvo grupisanje predstavlja najveći mogući broj formiranih klastera, pri čemu je zadovoljen uslov da svaki klaster broji više (ili jednako) od 20 % od ukupnog broja testiranih potrošača. Naime, klaster 1 se sastoji od 47,5 % potrošača, klaster 2 = 32,5%, i klaster 3 = 20%.



Slika 31. Eksterno mapiranje prihvatljivosti potrošača (PCA analiza bazirana na korelacionoj matrici; Varimax rotacija). A: korelacioni dijagram originalnih promenljivih; B: položaj ispitivanih uzoraka i grupa (klastera) testiranih potrošača u trodimenzionom prostoru glavnih komponenta.

U srednjoj fazi zrenja, nakon 10 dana, sireve karakteriše izražena slanost. Nakon 40 dana zrenja, kontrolni uzorak (65/40), i donekle uzorak 80/40 imali su izraženu kiselost, ukus na jogurt, i kvasac. Treba napomenuti da od svih analiziranih svojstava, jedino koje bi se moglo donekle okarakterisati kao

nepoželjno je ukus na kvasac, koji je ujedno i jedini detektovan nepoželjan ukus u svih 9 uzoraka.

Bilo je očekivano da će sirevi od termički tretiranog mleka imati jače izražen ukus na surutku i kuvano mleko. Ova svojstva ukusa imala su najjači intenzitet kod eksperimentalnih uzoraka nakon 3 i 10 dana zrenja i to sledećim redosledom: 80/3 zatim 90/10, 90/3 i 80/10. Očigledno je da se u kasnijim fazama zrenja pomenuta svojstva, koja su slabog intenziteta i na početku zrenja, ili potpuno gube ili bivaju maskirana drugim svojstvima.

Ukus na kozje mleko bio je takođe slabo izražen u svim analiziranim uzorcima sira, bez obzira na termički tretman i stadijum zrenja. Obzirom na to da su sirevi proizvedeni od mleka Sanske rase koza, gajenih u intenzivnim uslovima, ovaj podatak je u saglasnosti sa literaturom (Božanić et al., 2002), odnosno potvrđuje teoriju da ukoliko je kozje mleko sveže, i sa njim se pravilno i higijenski postupaju, izostaje karakterističan ukus koji određen broj potrošača ne prihvata. Ukoliko pak uporedimo sve uzorke, možemo uočiti da su najizraženiji kozji ukus imali sirevi stari 40 dana. Ovaj podatak se takođe može objasniti literaturnim navodima iz prethodnih poglavlja, prema kojima su lipolitičke promene koje se dešavaju tokom zrenja odgovorne za intenziviranje kozjeg ukusa, putem generisanja slobodnih masnih kiselina kratkog lanca (Caponio et al., 2001, Božanić et al., 2002). Međutim ono što takođe možemo utvrditi na osnovu dobijenih rezultata je to da u slučaju belih sireva u salamuri oštrije termički tretmani mleka ne utiču na razvoj kozjeg ukusa tokom zrenja. Štaviše, sa dijagrama B možemo da uočimo da od sireva koji su sazrevali 40 dana najslabije izražen kozji ukus ima uzorak 90/40, dok je kod kontrolnog uzorka dobijenog od mleka tretiranog niskom pasterizacijom ovo svojstvo najizraženije.

Po pitanju prihvatljivosti od strane potrošača, na dijagramima "B" u okviru Slike 31 može da se uoči da su mladi sirevi bili najprihvatljiviji grupi 1 (47,5 % testiranih potrošača), dok se grupa 2 i 3 (ukupno 52,5 % potrošača) opredelila za zrelije sireve. Grupa 2 (32,5% potrošača) pokazivala je naklonost ka sirevima izraženije kiselosti, slanosti i kozjeg ukusa, dok je grupa 3 (20%) težila sirevima kod kojih je kozji ukus bio najslabije izražen. Poslednji podatak ide u prilog činjenici da ipak

postoji značajan broj potrošača koji ne pokazuje naklonost ka karakterističnom ukusu kozjeg sira bez obzira na to što je u pitanju beli sir u salamuri koji je na našem tržištu veoma zastupljen.

5.5.4.2. Senzorno testiranje potrošača

Na osnovu analize varijanse utvrđeno je da postoji statistički značajan efekat klastera na ocene za ukus, miris, teksturu i ukupnu prihvatljivost sireva.

Tabela 12. Poređenje srednjih vrednosti ocena između različitih grupa (klastera), u okviru pojedinih senzornih kategorija

MIRIS									
D.zrenja	3			10			40		
T. tretman	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5
Klaster 1	7.25	6.85	7.85 ^a	7.45	7.35	7.90 ^a	5.15	6.05	7.55 ^a
Klaster 2	7.84	7.30	7.92 ^a	6.69	7.31	6.23 ^b	4.92	6.77	7.31 ^{ab}
Klaster 3	7.28	5.71	5.57 ^b	7.28	8.00	7.28 ^{ab}	5.00	5.71	5.57 ^b
UKUS									
D. zrenja	3			10			40		
T. tretman	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5
Klaster 1	6.95	7.25	8.00 ^a	6.85 ^a	7.45	8.35 ^a	6.20	6.55	8.40
Klaster 2	7.84	7.77	8.46 ^a	8.08 ^b	7.61	7.23 ^b	6.61	7.23	7.85
Klaster 3	7.43	6.43	5.86 ^b	7.57 ^{ab}	7.28	7.71 ^{ab}	7.28	6.57	7.86
TEKSTURA									
D. zrenja	3			10			40		
T. tretman	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5
Klaster 1	6.75 ^a	6.60	7.55 ^a	6.90	7.00 ^{ab}	7.95	6.0	6.25	7.85
Klaster 2	8.23 ^b	7.31	8.00 ^a	7.54	8.15 ^a	7.31	6.38	6.69	7.00
Klaster 3	7.14 ^{ab}	6.28	5.00 ^b	7.57	6.14 ^b	6.86	7.28	5.86	7.28
UKUPNA PRIHVATLJIVOST									
D. zrenja	3			10			40		
T. tretman	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5	65/30	80/5	90/5
Klaster 1	6.85 ^a	7.20	8.35 ^a	6.75 ^a	7.25	8.30 ^a	6.15 ^a	6.80	8.40
Klaster 2	8.38 ^b	7.61	8.23 ^a	7.54 ^{ab}	7.23	7.08 ^b	6.85 ^{ab}	7.15	7.69
Klaster 3	8.00 ^{ab}	6.71	6.43 ^b	8.57 ^b	7.71	8.28 ^{ab}	7.71 ^b	7.28	7.57

vrednosti u tabeli predstavljaju aritmetičku sredinu ocena unutar klastera statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u srednjoj vrednosti ocena postoji ukoliko one unutar kolone imaju različita slova u superskriptu.

Na osnovu poređenja srednjih vrednosti pomoću LSD testa utvrđene su statistički značajne razlike između srednjih vrednosti ocena koje su potrošači u okviru grupa davali za miris, ukus, teksturu i ukupnu prihvatljivost svakog od devet uzoraka. U ovom delu istraživanja cilj je bio utvrditi šta je to što u pogledu navedenih senzornih kategorija svrstava potrošače u jednu od tri grupe. Rezultati opisanih parnih poređenja ocena prikazani su u Tabeli 12.

Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da grupa 1 kojoj su najprihvatljiviji mladi sirevi, značajno višu ocenu u odnosu na treću grupu potrošača daje siru 90/3 u pogledu ukupne prihvatljivosti i teksture. Nakon deset dana zrenja ova grupa potrošača daje značajno višu ocenu istom siru, u odnosu na grupu 2 u pogledu ukupne prihvatljivosti, ukusa i mirisa. Nakon 40 dana zrenja za ovu grupu potrošača ista varijanta sira ostaje najprihvatljivija, s tim što u odnosu na ostale grupe, jedino ocena za miris statistički značajno odstupa od grupe 3. Prosečna ocena za sir 65/40 koju daje grupa 1 statistički je značajno niža u odnosu na prosečnu ocenu grupe 3, kada je u pitanju ukupna prihvatljivost.

Grupa 3 i grupa 2 se razlikuju statistički značajno po naklonosti prema sirevima nakon 3 dana zrenja, gde je grupa 3 dala značajno nižu ocenu siru 90/3 u pogledu mirisa, ukusa, teksture i ukupne prihvatljivosti. Grupa 3 dala je najvišu ocenu za ukupnu prihvatljivost sira 65/40, značajno višu u odnosu na grupu 1. Takođe, što se tiče sireva starih 10 dana, grupa 3 je najbolje ocenila sir 65/10, u odnosu na grupu 1, ova ocena je statistički značajno viša. Može se uočiti da je grupa 3 što se tiče ukupne prihvatljivosti generalno najviše ocene davala sirevima nakon 10 dana zrenja. U pogledu teksture, uzorak 80/10 značajno je niže ocenjen u poređenju sa ocenom grupe 1 i 2.

Na osnovu analiziranih rezultata, uopšteno se može zaključiti da grupa 1 (47,5 % potrošača), koja je i najbrojnija, pokazuje naklonost ka mladim sirevima, a takođe i prema sirevima proizvedenim od mleka tretiranog najoštrijim termičkim tretmanom u svim stadijumima zrenja. Grupa 3 (20%) sa druge strane, najbolje ocenjuje kontrolnu varijantu sireva, dobijenu od mleka tretiranog uobičajenom, niskom pasterizacijom, kroz sve analizirane tačke zrenja. Ovakvi sirevi se trenutno mogu naći na tržištu. U pogledu stadijuma zrenja ova grupa pokazuje najveću naklonost, u odnosu na ostale grupe, ka siru starom 10 dana. Obzirom da je deskriptivnom analizom ustanovljeno da sireve u ovoj fazi zrenja karakteriše samo izražena slanost, možemo zaključiti da se tih istih 20% potrošača opredeljuje za sireve koji nemaju izražena bilo koja od analiziranih specifičnih svojstava ukusa.

U cilju poređenja srednjih vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti ispitivanih proizvoda izvršena je dvofaktorijalna analiza varijanse gde su posmatrani faktori:

starost proizvoda i termički tretman, kao i njihova interakcija, dok su ocene potrošača (ukupno 40), posmatrane kao zavisne promenljive.

Tabela 13. Statistička značajnost efekta stadijuma zrenja, termičkog tretmana i njihove interakcije na ocene prihvatljivosti mirisa, ukusa, teksture kao i ukupne prihvatljivosti uzoraka sireva

Faktori	p-vrednosti			
	Miris	Ukus	Tekstura	Ukupna prihvatljivost
Starost proizvoda	0,000*	0,104 ^{nz}	0,035*	0,131 ^{nz}
Termički tretman	0,018*	0,000*	0,021*	0,000*
Statost proizvoda x Termički tretman	0,002*	0,127 ^{nz}	0,296 ^{nz}	0,282 ^{nz}

* faktori koji su imali statistički značajan uticaj na ocene,

^{nz}faktori koji nisu imali statistički značajan uticaj na ocene

U Tabeli 13 prikazane su p-vrednosti navedenih faktora i njihove interakcije, odnosno njihova statistička značajnost u pogledu ocena u okviru senzornih kategorija: miris, ukus, tekstura, kao i u pogledu ukupne prihvatljivosti.

Dalja analiza bila je izvršena u cilju poređenja srednjih vrednosti ocene kvaliteta ispitivanih proizvoda hedonskom skalom za miris, ukus teksturu i ukupnu prihvatljivost. Rezultati parnih poređenja prikazani su u Tabeli 14 gde su uzorci svrstani u podgrupe, unutar kojih se njihove ocene ne razlikuju statistički značajno ($p < 0,05$).

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 14 može se uočiti da ni jedan od uzoraka nije prešao granicu neprihvatljivosti. U pogledu mirisa uzorak 65/40 zajedno sa uzorkom 80/40, izdvajao se od ostalih po svojoj statistički značajno nižoj oceni (5,0, 6,2, respektivno). Što se tiče ukusa i ukupne prihvatljivosti, uzorak 65/40 je dobio takođe najnižu srednju ocenu (6,5, 6,6, respektivno), mada se statistički nije izdvajao iz grupe od 6 bolje ocenjenih uzoraka, što se može povezati sa rezultatima deskriptivne analize, gde je za isti uzorak senzorni panel utvrdio postojanje najintenzivnijeg ukusa na kvasac u poređenju sa ostalim uzorcima. Isto važi i za uzorak 80/40, čija je ocena nešto viša iako ne statistički značajno (6,8, i 7,0 za ukus i ukupnu prihvatljivost).

Interesantno je uočiti da su svi uzorci što se teksture tiče svrstani u istu homogenu podgrupu, u kojoj je opseg ocena bio od 6,3 do 7,5. Na osnovu ovog podatka

možemo zaključiti da iako su razlike u teksturi postojale, kao što je to u prethodnom poglavlju utvrđeno, po pitanju njene prihvatljivosti potrošači nisu izdvojili ni jedan od uzoraka.

Tabela 14. Poređenje srednjih vrednosti ocena između različitih grupa (klastera), u okviru pojedinih senzornih kategorija

Miris		Ukus		Tekstura		Ukupna prihvatljivost	
65/40	5,0±2,52 ^a	65/40	6,5±1,85 ^a	80/40	6,3±2,03	65/40	6,6±1,67 ^a
80/40	6,2±2,15 ^{ab}	80/40	6,8±1,87 ^{ab}	65/40	6,4±2,02	80/40	7,0±1,59 ^{ab}
80/3	6,8±2,22 ^b	80/3	7,3±1,77 ^{abc}	80/3	6,8±1,99	80/3	7,3±1,61 ^{ab}
90/40	7,1±1,95 ^b	65/3	7,3±1,67 ^{abc}	65/10	7,2±1,85	65/10	7,3±1,39 ^{ab}
65/10	7,2±1,95 ^b	65/10	7,4±1,60 ^{abc}	80/10	7,2±1,95	80/10	7,3±1,46 ^{ab}
90/10	7,3±1,82 ^b	80/10	7,5±1,52 ^{abc}	90/3	7,3±1,92	65/3	7,6±1,38 ^{ab}
65/3	7,5±1,77 ^b	90/3	7,8±1,67 ^{bc}	65/3	7,3±1,67	90/10	7,9±1,68 ^b
80/10	7,5±1,43 ^b	90/10	7,9±1,47 ^{bc}	90/40	7,5±1,74	90/3	8,0±1,29 ^b
90/3	7,5±1,94 ^b	90/40	8,1±1,07 ^c	90/10	7,6±1,50	90/40	8,0±1,21 ^b

Vrednosti u tabeli predstavljaju aritmetičku sredinu svih ocena ± standardnu devijaciju Homogene podgrupe uzoraka za svaku ispitivanu kategoriju, odnosno njihove prosečne ocene obeležene su istim slovima u superskriptu

Suprotno očekivanjima, najbolje ocene u svim kategorijama dobili su sirevi proizvedeni od mleka tretiranog termičkim tretmanom 90°C/5 min (≥7,5) i to: za ukus i ukupnu prihvatljivost – uzorak 90/40, za teksturu uzorak 90/10 a za miris 90/3. Ipak, obzirom da se oni nisu izdvajali statistički značajno od ostalih uzoraka treba napomenuti da je mala pouzdanost u pogledu izvođenja zaključka o razlici po pitanju prihvatljivosti ovog sira u odnosu na ostale.

U nastavku analize rezultata senzornog testiranja, prikazana je distribucija učestalosti ocena koje su potrošači davali za svih 9 uzoraka sireva na skali “upravo onako kako bi trebalo da bude” (Slika F). Kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode* ocene su podeljene u 5 grupa. Da bi se za intenzitet nekog svojstva u određenom uzorku izveo zaključak da je kao takav prihvatljiv potrošačima, bez dodatne statističke analize, potrebno je da postoji 80% ili više odgovora u grupi “kako treba”.

Sa grafika koji su prikazani na Slici 32 bitno je naglasiti nekoliko interesantnih detalja. Ono što je najuočljivije je to da je za uzorak 90/40 svako ispitivano

svojestvo više od 80% testiranih potrošača svrstalo u kategoriju “kako treba”. Obzirom na to da ni jedan od 9 uzoraka nije dobio ovako dobre ocene, možemo zaključiti da su senzorna svojstva uzorka 90/40 najbolje izbalansirana što se tiče mišljenja potrošača.

Ako posmatramo uporedno distribuciju učestalosti ocena za sva tri uzorka nakon tri dana zrenja, uzimajući u obzir ocene koje se odnose na masnoću sira, možemo primetiti da je više od 80% potrošača ocenilo masnoću uzorka 90/3 ocenama “kako treba”. Sa druge strane, određeni broj potrošača (navesti koliko %) u slučaju uzorka 80/3 opredelio za ocenu koja ga karakteriše kao nedovoljno masnog. Isti je slučaj sa uzorkom 65/3, osim što je broj potrošača još veći. Ovakav redosled odgovara rezultatima analize fizičko-hemijskih parametara kvaliteta (Poglavlje 5.5.1.) iz kojih se vidi da je uzorak sa najmanjim sadržajem masti zaista 65/3. Isti pak uzorci nakon 40 dana zrenja dobili su suprotnu distribuciju ocena. Naime prema mišljenju određenog broja potrošača, sir dobijen od mleka obrađenog niskom pasterizacijom (65/40) umereno odstupa ka previše masnom siru, sir 80/40 takođe, u manjoj meri, s tim što je isti broj potrošača smatrao da je ovaj uzorak premalo mastan, dok se u pogledu uzorka 90/40 ni jedan potrošač nije opredelio za ocenu koja teži ka desnoj strani skale što se tiče ovog svojstva, a određen mali broj smatrao je da je uzorak 90/40 nedovoljno mastan. Ovakav stav potrošača ne poklapa se sa utvrđenim sadržajem masti u siru, premda razlike nisu velike. Ono što možemo pretpostaviti je da potrošači “mazivost” poistovećuju sa “masnoćom”, obzirom da zbog najintenzivnije proteolize kazeinske frakcije α_s -CN (Poglavlje 5.5.2.) kontrolni uzorak u kasnijim fazama zrenja zaista poseduje najmaziviju strukturu.

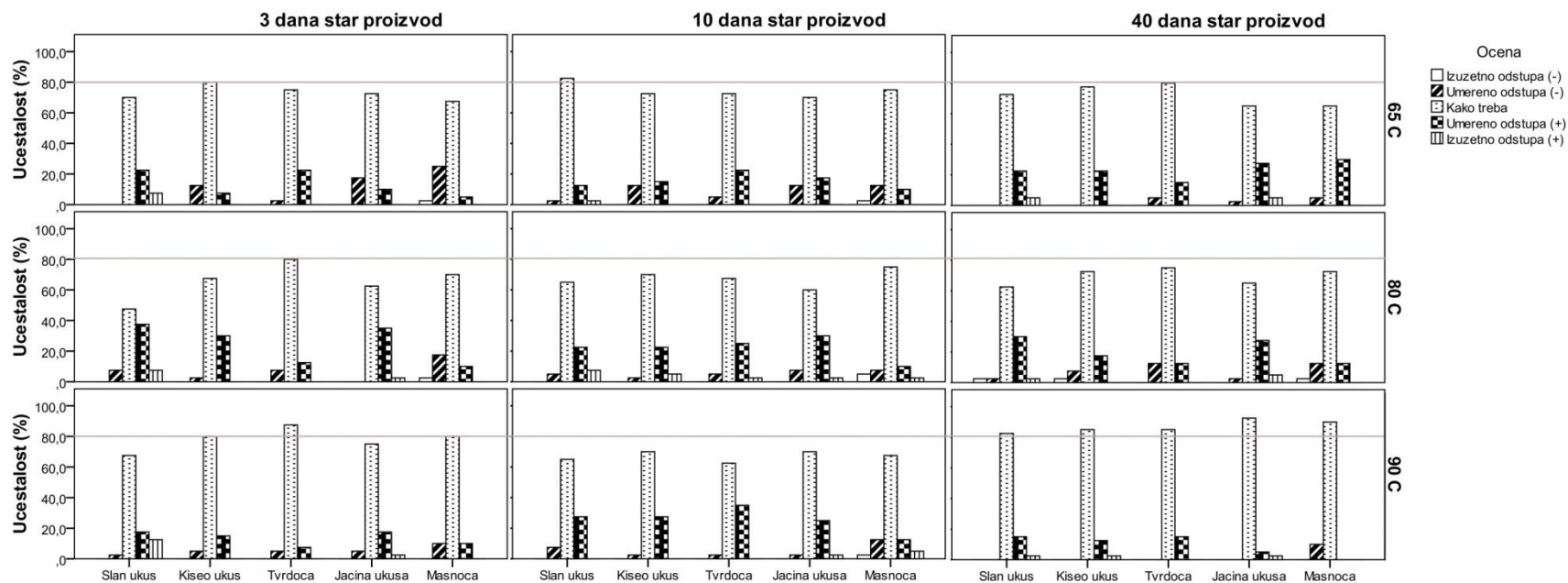
Interesantno je takođe istaći da su za sireve u ranoj fazi zrenja potrošači u najvećem broju u odnosu na ostale tačke zrenja, za slanost davali ocene koje ih karakterišu kao preslane, iako sirevi u ovoj fazi zapravo imaju značajno manji sadržaj soli u odnosu na završnu fazu zrenja (Poglavlje 5.5.1.).

Objašnjenje za reakciju potrošača možemo naći u tome da u kasnijim fazama zrenja kiselost koja raste, kao i ostala svojstva ukusa, maskiraju slanost koja je određenom broju potrošača izražena nego što bi trebalo da bude.

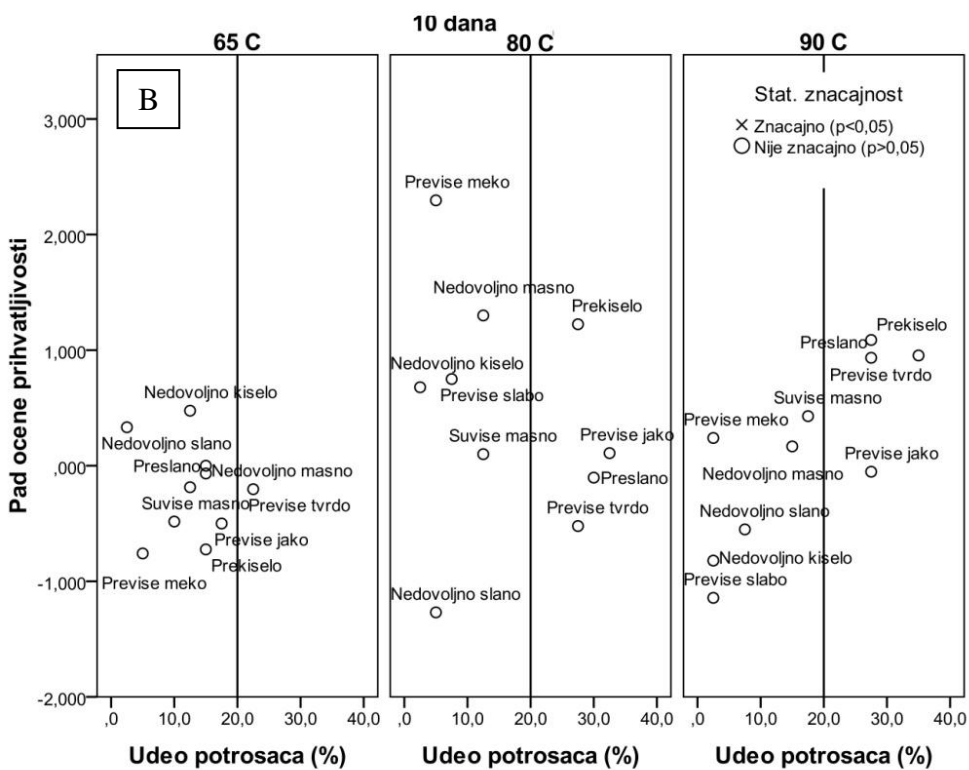
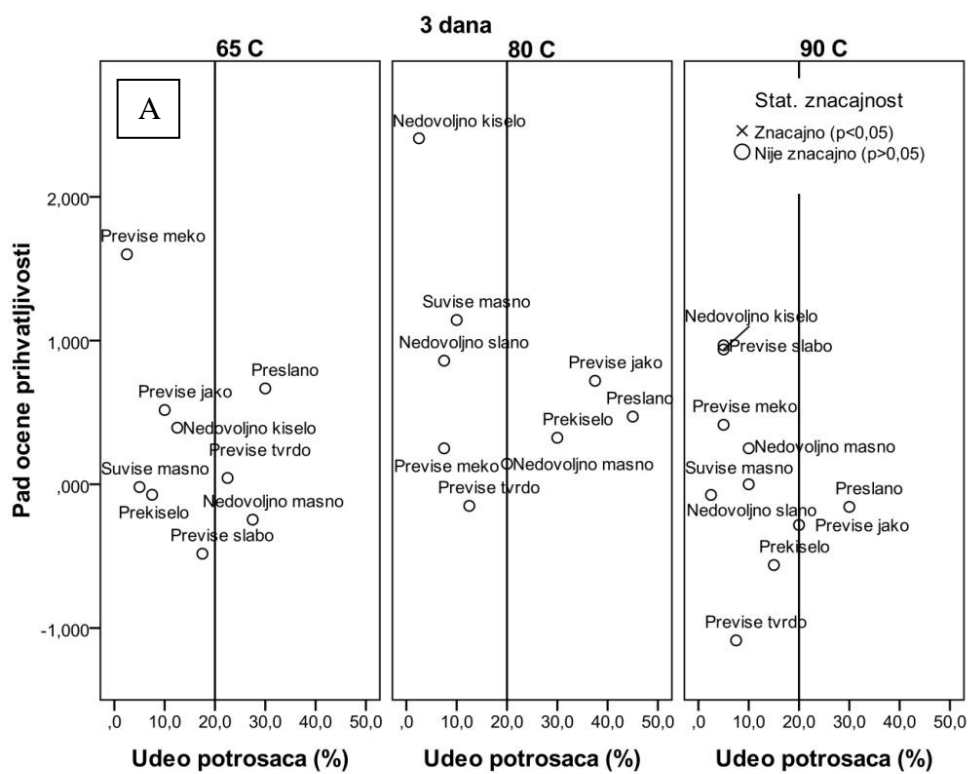
Rezultati analize pada srednje vrednosti ocene prihvatljivosti dati su na slikama 32(A), 32(B) i 32(C). Navedeni dijagrami prikazuju: (1) pad srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda za onaj broj potrošača koji su intenzitet pojedinačno ispitivanih svojstava ocenili kao veći ili manji u odnosu na "kako treba da bude" u poređenju sa srednjom vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda za broj potrošača koji su intenzitet pojedinačno ispitivanih svojstava ocenili sa "kako treba da bude", zatim (2) statističku značajnost tog smanjenja srednje vrednosti ocene, kao i (3) procentualni udeo potrošača koji su intenzitet pojedinačno ispitivanih svojstava ocenili kao veći ili manji u odnosu na "kako treba da bude". U poglavlju koje se odnosi na materijal i metod ispitivanja rečeno je da su sve grupe koje su brojale više ili jednako 20 % od ukupnog broja testiranih potrošača smatrane kao značajno velike. Ovo znači da se za sve vrednosti pada ocene ukupne prihvatljivosti koje su statistički značajne i koje se na dijagramima nalaze desno od graničnih 20 % potrošača može izvesti zaključak da su potrošači ocenili posmatrani uzorak kao proizvod sa većim ili manjim intenzitetom posmatranog svojstva u odnosu na proizvod "kako treba da bude".

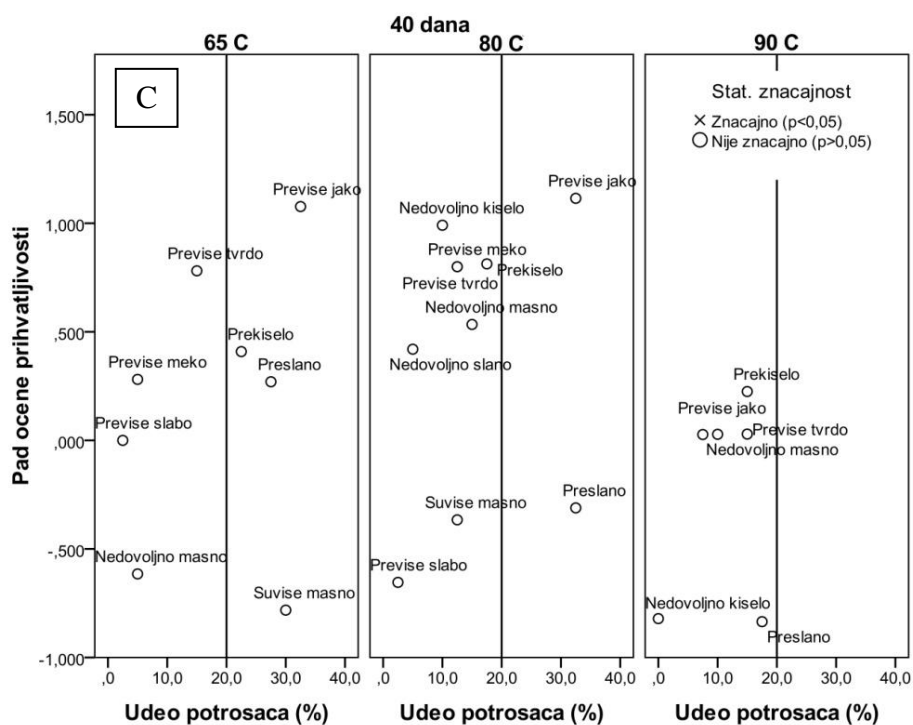
Sa Slike 33, možemo uočiti da ne postoji nijedan uzorak, a takođe i u okviru uzoraka nijedno svojstvo koje je ispitivano, kod kog je usled odstupanja ocene od one "kako treba da bude" došlo do značajnog pada ocene ukupne prihvatljivosti. Ovo bi značilo sledeće, da iako su odgovarajuće grupe potrošača dale primedbu u pogledu manje ili veće izraženosti pojedinih ispitivanih svojstava, u odnosu na to "kako bi trebalo da bude", to nije uticalo negativno na njihovo mišljenje o ukupnoj prihvatljivosti proizvoda. Konkretno za slanost, objašnjenje za ovakvu pojavu pri ocenjivanju možemo dati na osnovu toga što potrošači verovatno uzimaju u obzir način na koji je uobičajeno konzumirati bele sireve u salamuri, što dopušta njihovu izraženiju slanost.

Zamerka koja se pored preterane slanosti takođe sreće kod najvećeg broja uzoraka, mada ne uzrokuje statistički značajan pad ocene ukupne prihvatljivosti, je previše jak ukus (Uzorci: 80/3, 90/3, 80/10, 90/10, 65/40, 80/40). Potrošačima je prepušteno da sami pretpostave šta podrazumeva jak ukus. Imajući u vidu njihov odgovor u slučaju sireva u ranoj i srednjoj fazi zrenja, može se zaključiti da



Slika 32. Distribucija učestalosti ocena dobijenih primenom skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” u pogledu prihvatljivosti slanog i kiselog ukusa, tvrdoće, masnoće i jačine ukusa, za uzorke tretirane termičkim tretmanima: 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 min nakon 3, 10 i 40 dana zrenja.





Slika 33. Rezultati analize pada srednje vrednosti ocena ukupne prihvatljivosti za uzorke tretirane termičkim tretmanima: 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 minuta nakon 3 (Slika 33(A)), 10 (Slika 33 (B)) i 40 dana zrenja Slika 33 (C)

potrošači varijante sireva dobijene od mleka tretiranog termičkim tretmanom oštrijim nego što je niska pasterezacija ocenjuju kao sireve sa previše jakim ukusom. Međutim, nakon 40 dana zrenja kod varijante sira proizvedenog od mleka tretiranog najoštrijim primenjenim režimom termičke obrade, jačina ukusa je ocenjena “kako treba da bude”, od strane više od 80% potrošača, što ukazuje na to da naznačeni termički tretman prouzrokuje pojavu specifičnog ukusa, jačeg nego što su potrošači navikli, koji se tokom zrenja gubi ili biva maskiran ostalim komponentama ukusa koje se tokom zrenja generišu.

5.5.4.3. Ocena kvaliteta sireva

Na osnovu ocena koje su članovi stručne komisije dali za spoljni izgled, izgled preseka, miris, ukus i konzistenciju oglednih uzoraka, za svakog ocenjivača posebno računata je ponderisana srednja ocena koja izražava ukupni kvalitet proizvoda, na način opisan u poglavlju *Materijal i metod*. Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

Analizom varijanse ponderisanih srednjih ocena kvaliteta ustanovljeno je da značajan efekat ($p < 0.05$) na ukupan kvalitet imaju i termički tretman i stadijum zrenja, dok interakcija ova dva faktora nije bila statistički značajna.

Na osnovu ponderisanih srednjih ocena može se izvesti zaključak da odličan kvalitet koji podrazumeva izražena pozitivna svojstva bez nedostataka (ocena $> 4,5$) imaju uzorci: 80/3, 90/3, 90/10 i 90/40, dok svi ostali uzorci imaju vrlo dobar kvalitet ($3,5 < \text{ocena} \leq 4,5$), koji podrazumeva manje nedostatke.

Može se uočiti da se nakon tri dana zrenja kvalitet svih uzoraka ponaosob značajno razlikuje, pri čemu je uzorak 65/3 ocenjen najslabijom ocenom dok je uzorak 90/3 najbolje ocenjen. Sir dobijen od mleka tretiranog termičkim tretmanom 90°C/5 minuta dobio je od strane stručne komisije značajno bolju ukupnu ocenu kvaliteta od ostalih uzoraka ($p < 0,05$).

Tabela 15. Ponderisane srednje vrednosti ocena kvaliteta za uzorke tretirane termičkim tretmanima: 65°C/30 min, 80°C/5 min i 90°C/5 minuta nakon 3, 10 i 40 dana zrenja, dobijene metodom bodovanja pojedinačnih svojstava (spoljašnji izgled, izgled preseka, miris, ukus i konzistencija)

Stadijum zrenja	Termički tretman		
	65°C/30min	80°C/5min	90°C/5min
3 dan	4.22±0,13 ^a	4.52±0,20 ^{Ab}	4.97±0,45 ^{Ac}
10 dan	4.24±0,06 ^a	4.10±0,10 ^{Ba}	4.57±0,12 ^{Bb}
40 dan	4.29±0,06 ^a	4.16±0,33 ^{Ba}	4.80±0,18 ^{ABb}

Srednje vrednosti koje su obeležene različitim malim slovima značajno se razlikuju unutar reda (Uticao termičkog tretmana)

Srednje vrednosti koje su obeležene različitim velikim slovima značajno se razlikuju unutar kolone (Uticao stadijuma zrenja)

Ukoliko se ponaosob posmatraju tri različite varijante sireva kroz zrenje, može se zaključiti da se ukupna ocena kvaliteta za sir dobijen od mleka tretiranog niskom pasterizacijom ne razlikuje značajno u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi zrenja. Sir od mleka tretiranog na 80°C/5 minuta najbolje je ocenjen nakon 3 dana zrenja, dok je u srednjoj i kasnoj fazi zrenja dobio značajno nižu ocenu ukupnog kvaliteta ($p < 0,05$). I poslednja varijanta, sir dobijen najoštrijim termičkim tretmanom (90°C/5 minuta), na početku zrenja dobio je značajno višu ocenu nego nakon 10 dana. Zapravo uzorku 90/3 stručna komisija je dala najbolju ocenu od svih analiziranih uzoraka, koja se ipak statistički značajno ($p < 0,05$) ne razlikuje od

ocene koja je dodeljena uzorku 90/40. Drugim rečima, stručna komisija smatra da sir proizveden od mleka tretiranog na 90°C/5 minuta ima najbolji kvalitet bilo da je sasvim mlad (3 dana) ili da je zreo (40 dana). Generalno najslabije ocene za kvalitet dobili su uzorci nakon 10 dana zrenja, što se može povezati sa deskriptivnom senzornom analizom, na osnovu koje se vidi da u ovom stadijumu zrenja sirevi imaju najužu paletu senzornih svojstava, što je stručna komisija i prepoznala.

Između srednje vrednosti ocena koje su potrošači dali za ukupnu prihvatljivost uzoraka i srednje ponderisane ocene koje je stručna komisija dala za ukupan kvalitet sireva izvršena je korelaciona analiza. Utvrđeno je da između navedenih ocena postoji statistički značajna pozitivna korelacija ($p < 0,05$, $R = 0,73$). Na osnovu korelacione analize možemo da zaključimo da su potrošači "prepoznali" kvalitet onih sireva za koje je stručna komisija dala visoku objektivnu ocenu kvaliteta.

6. Zaključci

1. Činjenica da se nakon obiranja formira veća količina taloga u slučaju kozjeg mleka nego u slučaju kravljeg mleka, kao i činjenica da se termičkim tretmanom koji se primeni pre obiranja kozjeg mleka utiče na formiranje značajno većeg udela taloga u slučaju kozjeg mleka u odnosu na kravlje, predstavlja još jednu od manifestacija niže koloidne stabilnosti kazeinskih micela kozjeg mleka. Iako je ovakva razlika u koloidnom sistemu kazeina kozjeg i kravljeg mleka poznata decenijama, rezultati ovog rada mogu poslužiti kao osnova za buduća istraživanja koja bi se bavila prilagođavanjem uslova obiranja kozjeg mleka u industrijskim uslovima, što bi rezultovalo boljim kvalitetom kozjeg mleka i mlečnih proizvoda.
2. Obzirom na to da je utvrđeno da se nakon uklanjanja masti iz kozjeg mleka primenom režima obiranja na 600 g/ 15 min/ 20°C ne umanjuje vidljivost proteinskih traka nakon elektroforetske analize, može se zaključiti da je navedeni režim adekvatan u okviru pripreme uzoraka, kako bi se izbegli gubici proteina taloženjem, a samim tim i pogrešna interpretacija rezultata.
3. Nakon termičkog tretmana na 80°C/5 min i 90°C/5 min, kako kravljeg tako i kozjeg mleka, uočava se pojava HMW kompleksa. Takođe, stepen agregiranja β -CN nakon tretmana na 80°C i 90°C u trajanju od 5 min, statistički je značajno različit u odnosu na sirovo mleko.
4. Za razliku od kravljeg α_{s2} -CN koji se u sirovom mleku nalazi u obliku dimera, u slučaju kozjeg mleka dimer α_{s2} -CN nije detektovan ni u uzorku sirovog niti u termički tretiranim uzorcima mleka. Odsustvo dimerne forme α_{s2} -CN može se posmatrati kao još jedna specifičnost kazeinske micelle kozjeg mleka.
5. Na osnovu ovog rada, odnosno rezultata elektroforetske analize termički tretiranog mleka, može se pretpostaviti da u određenoj meri i kod kozjeg mleka dolazi do pojave homopolimera κ -CN čija je molekulska masa na osnovu standarda proteina poznate mase >150 kDa. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se ova pretpostavka potvrdila.

-
6. Kad je u pitanju β -lg, na stepen kovalentnog agregiranja statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) ima termički tretman i prisustvo masti u sprezi sa vrstom mleka. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji između uzoraka punomasnog kravljeg i kozjeg mleka tretiranog na $90^{\circ}\text{C}/5$ min, pri čemu β -lg kravljeg mleka značajno manje učestvuje u kovalentnim agregatima nego isti protein kozjeg mleka. U slučaju kravljeg mleka postoji značajna razlika ($p < 0,05$) između stepena kovalentnog agregiranja β -lg u obranom i punomasnom mleku, pri čemu do intenzivnijeg agregiranja dolazi u slučaju obranog mleka. Kod kozjeg mleka značajna razlika između obranog i punomasnog mleka u navedenoj pojavi ne postoji.
 7. Obim vezivanja α -la u proteinske agregate putem disulfidnih veza višestruko manji nego što je to slučaj sa β -lg. Statistički značajna razlika postoji između stepena agregiranja α -la u mleku tretiranom na $90^{\circ}\text{C}/5$ min i sirovog mleka. Trend udela SDS-monomera κ -CN u ukunim monomerima ove kazeinske frakcije sa pooštavanjem termičkog tretmana vrlo je neujednačen, odnosno naizmenično raste i opada bez ikakvog jasnog reda. Značajan uticaj termičkog tretmana postoji i u slučaju ovog proteina na kovalentno vezivanje njegovih monomera u proteinske agregate, pri čemu se na osnovu parnih poređenja može utvrditi da statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji između uzorka tretiranog na $90^{\circ}\text{C}/5$ min u poređenju sa sirovim mlekom. Na osnovu prethodno iznetih rezultata može se zaključiti da je β -lg pored toga što je inicijator reakcije stvaranja agregata proteina mleka reakcijom tiol-disulfidne izmene, u značajnoj meri iz svog monomernog oblika pod dejstvom termičkog tretmana na $80^{\circ}\text{C}/5$ min i $90^{\circ}\text{C}/5$ min prešao u neku vrstu asocijata ili agregata. Takođe, može se zaključiti da se značajno kovalentno agregiranje α -la i κ -CN dešava samo nakon tretmana na $90^{\circ}\text{C}/5$ min. Na osnovu toga se može pretpostaviti da na $80^{\circ}\text{C}/5$ min u najvećoj meri dolazi do formiranja homopolimera β -lg. Dalja istraživanja na temu uticaja termičkih tretmana na mehanizme koji se odigravaju na molekularskom nivou osnovnih komponenata kozjeg mleka su poželjne, kako bi se u što većoj meri ispitala specifičnosti kozjeg mleka, i na osnovu njih izvršila optimizacija procesa njegove obrade i prerade.
-

8. Sirišnom koagulacijom termički tretiranog mleka potvrđeno je da čak i kad se primeni tretman 90°C/5 min, koagulacija ne izostaje, kao u slučaju kravljeg mleka. Na osnovu dobijenih rezultata u model sistemu utvrđeno je da se pod dejstvom termičkih tretmana značajno uvećava kontrolni randman. Na osnovu rezultata korelacione analize može se zaključiti da stepen kovalentnog agregiranja serum proteina prouzrokovan termičkim tretmanima obranog mleka, kao i uvećanje sadržaja vode u "model" siru, dovodi do uvećanja kontrolnog randmana. Međutim kada je punomasno mleko u pitanju, formiranje kovalentno vezanih agregata u kojima učestvuju glavni serum proteini nisu u značajnoj meri povezani sa uvećanjem kontrolnog randmana. Potrebna su detaljnija istraživanja kako bi se utvrdilo u kojoj meri i na koji način mast utiče na navedene pojave.
 9. Pod dejstvom termičkih tretmana dolazi do značajnog snižavanja čvrstine gruša (CF) i do značajnog smanjenja brzine agregiranja (AR), što je i očekivano. Ukoliko se kozje mleko termički tretira na $T \leq 80^\circ\text{C}$, vreme koagulacije ili ostaje isto, ili raste, dok termički tretmani na $T \geq 90^\circ\text{C}$ ili nemaju uticaj ili utiču tako što skraćuju vreme koagulacije. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio uzrok suprotnog dejstva različitih termičkih tretmana na vreme koagulacije kozjeg mleka. Važno je takođe istaći da termički tretmani na $T \geq 90^\circ\text{C}$ imaju suprotan efekat na vreme koagulacije kravljeg i kozjeg mleka. Objašnjenje koje se najčešće sreće u literaturi na ovu temu je: različit mineralni i proteinski sastav kozjeg i kravljeg mleka. Potrebna su dalja istraživanja da bi se detaljnije utvrdilo šta je tačno uzrok ovakvih razlika.
 10. Ispitivanjem korelacije između randmana sve tri varijante sira i parametara koagulacije (AR, CT, CF) utvrđeno je da jedina značajna korelacija ($p < 0,05$, $R = -0,999$), i to vrlo jaka, negativna, postoji između brzine agregiranja i randmana sireva, odnosno, uvećanje randmana nastaje kao posledica sporijeg formiranja gruša, dok između čvrstine gruša i randmana ne postoji značajna korelacija, a takođe ni između vremena koagulacije i randmana.
 11. Iako je efikasnost randmana nakon tretiranja mleka na 90°C/5 min najmanja u odnosu na ostale ispitivane režime termičke obrade, sam randman je i dalje značajno uvećan u odnosu na randman nakon tretiranja mleka režimom niske
-

pasterizacije. Naime, od 100 kg mleka tretiranog niskom pasterizacijom dobija se 10,68(\pm 0,59) kg sira, dok se od mleka podvrgnutog tretmanu na 90°C/5 min dobija 15,38(\pm 0,60) kg. U ekonomskom smislu uvećanje od 44% je vrlo povoljno, kao takođe i uvećanje od 33,2% koliko se postiže tretmanom na 80°C/5 min.

12. Ukoliko se posmatra procentualno uvećanje iskorišćenja masti i proteina mleka prilikom proizvodnje sira nakon termičkog tretmana mleka na 80°C/5 min i 90°C/5 min u odnosu na nisku pasterizaciju, može se uočiti da termički tretman više utiče na uvećanje sadržaja masti (23,92% i 38,34%, respektivno) nego na uvećanje sadržaja proteina (13,22% i 23,86%, respektivno).
13. Osnovni hemijski sastav, kao i proteinski sastav uzoraka surutke dobijene prilikom proizvodnje sira od niskopasterizovanog mleka, od mleka tretiranog na 80°C/5 min i 90°C/5 min je značajno različit, što pruža mogućnost da se primenom različitih termičkih tretmana mleka namenjenog proizvodnji sira dođe do potpuno novog, specifičnog proizvoda. Potrebna su dalja istraživanja kako bi svaka od tri varijante surutke bila detaljnije okarakterisana.
14. Nakon proizvodnje sira, i određivanja promena osnovnih parametara kvaiteta tokom zrenja, na osnovu sadržaja VuBM i MuSM, prema *Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura* sve tri varijante proizvedenih sireva spadaju u meke sireve na granici između polumasnih i punomasnih sireva.
15. Po pitanju osnovnog hemijskog sastava, eksperimentalni sirevi se ne razlikuju značajno od kontrolne varijante. Odnosno, termičkim tretmanom kozjeg mleka ne dobijaju se beli sirevi u salamuri obogaćeni visokim sadržajem proteina ili masti, kao što bi se možda moglo očekivati na osnovu stepena iskorišćenja ovih parametara. Ipak, uticaj koji termički tretman mleka vrši na sadržaj VuBM, MuSM P/M kao i na pH vrednost, može se odraziti na tok zrenja, kao i na teksturalne i senzorne karakteristike sireva. Termički tretman ne utiče značajno ($p < 0,05$) na sadržaj soli, kao ni na sadržaj soli u vodenoj fazi sira. Kod sve tri varijante sireva već nakon 10 dana zrenja uspostavlja se koncentracija SuVF koja se nalazi između 3 i 5%.
16. Termički tretman značajno utiče na uvećanje sadržaja glavnih serum proteina kao i serum proteina velikih molekulskih masa u siru. Usled većeg udela serum

proteina u eksperimentalnim uzorcima sireva javlja se umanjen udeo kazeina. U slučaju β -CN, smanjenje udela pod uticajem termičkog tretmana je i statistički značajno ($p < 0,05$) Može se zaključiti da se radi o tri varijante sira značajno različitih u pogledu proteinskog sastava na početku zrenja, što može uticati na pojedine procese koji se tokom zrenja odigravaju, ali takođe i na nutritivnu vrednost i senzorne karakteristike sireva.

17. Na osnovu statističke analize može se zaključiti da oba faktora: termički tretman i stadijum zrenja utiču značajno na sadržaj rezidualnog α_s -CN u sirevima. U kontrolnom uzorku, proteolitičke promene na α_s -CN su izraženije, što se može objasniti time da su usled kompleksnije umreženog matriksa, u eksperimentalnim uzorcima sira potencijalna mesta hidrolize manje dostupna dejstvu himozina.
 18. Statističkom analizom utvrđeno je da stadijum zrenja nema značajan uticaj ($p < 0,05$) na procentualni udeo rezidualnog β -CN, Početna, značajna razlika u udelu β -CN u eksperimentalnim uzorcima sireva zadržava se do kraja zrenja. Što se tiče sekundarne proteolize, ni termički tretman ni stadijum zrenja ne vrše značajan uticaj na promenu udela azotne frakcije rastvorljive u 12% TCA, odnosno ne utiču na dubinu zrenja, koja je u slučaju sve tri varijante sira limitirana.
 19. Na osnovu analize teksturalnih svojstava tri ispitivane varijante sireva, možemo zaključiti sledeće: (1) termički tretman značajno utiče na sve ispitivane parametre teksture kao i na tok promena teksturalnih svojstava sireva tokom zrenja; (2) između uzoraka 80/5 i 90/5 ne postoje značajne razlike u ispitivanim parametrima teksture, što znači da sve promene koje se dešavaju, nastaju već pri termičkom tretmanu od 80°C/5 min; (3) parametri koji u najvećoj meri direktno doprinose tome da se tekstura sira dobijenog od pasterizovanog mleka značajno razlikuje od sireva dobijenih oštijim termičkim tretmanima su pH vrednost i sadržaj VuBM. Indirektno, ove razlike svakako mogu biti pripisane uticaju termičkih tretmana na izmenjen oblik i sastav kazeinskih micela u samom mleku, usled čega su izmenjeni parametri koagulacije, i pojedini parametri fizičko-hemijskih svojstava sireva, kao i tok proteolitičkih promena tokom zrenja.
-

20. Deskriptivnom senzornom analizom utvrđeno je sledeće: (1) sirevi proizvedeni od mleka tretiranog režimima oštrijim od niske pasterizacije imali su izraženiji ukus na surutku i kuvano mleko u odnosu na sireve dobijene od niskopasterizovanog mleka, mada je i kod njih intenzitet ovih ukusa bio slabiji od očekivanog, posebno u kasnijim fazama zrenja. (2) Ni u jednom uzorku, bez obzira na termički tretman i stadijum zrenja, ukus na kozje mleko nije bio izražen, mada je do intenziviranja ukusa došlo u završnoj fazi zrenja, što se može objasniti uvećanjem sadržaja slobodnih masnih kiselina putem lipolitičkih promena.
21. Po pitanju prihvatljivosti od strane potrošača, utvrđeno je da su mladi sirevi, kao i sirevi dobijeni od mleka termički tretiranog na 90°C/5 min kroz sve faze zrenja bili najprihvatljiviji grupi 1 (47,5 % testiranih potrošača). Nasuprot grupi 1, grupa 2 i 3 (ukupno 52,5 % potrošača) se opredelila za zrelije sireve. Grupa 2 (32,5% potrošača) pokazivala je naklonost ka sirevima izraženije kiselosti, slanosti i kozjeg ukusa, dok je grupa 3 (20%) težila sirevima kod kojih je kozji ukus bio najslabije izražen. Poslednji podatak ide u prilog činjenici da ipak postoji značajan broj potrošača koji ne pokazuje naklonost ka karakterističnom ukusu kozjeg sira bez obzira na to što je u pitanju beli sir u salamuri koji je na našem tržištu veoma zastupljen. Ova grupa takođe, najbolje ocenjuje kontrolnu varijantu sireva, dobijenu od mleka tretiranog uobičajenom, niskom pasterizacijom, kroz sve analizirane tačke zrenja. U pogledu stadijuma zrenja ova grupa pokazuje najveću naklonost, u odnosu na ostale grupe, ka siru starom 10 dana. Obzirom da je deskriptivnom analizom ustanovljeno da sireve u ovoj fazi zrenja karakteriše samo izražena slanost, možemo zaključiti da se tih istih 20% potrošača opredeljuje za sireve koji nemaju izražena bilo koja od analiziranih specifičnih svojstava ukusa.
22. Iz rezultata dobijenih na osnovu ocene prihvatljivosti od strane potrošača, može se uočiti da ni jedan od uzoraka nije prešao granicu neprihvatljivosti. Što se teksture tiče, može se zaključiti da iako su razlike u teksturi potvrđene instrumentalnim metodama, po pitanju njene prihvatljivosti potrošači nisu izdvojili ni jedan od uzoraka. Suprotno očekivanjima, najbolje ocene u svim kategorijama dobili su sirevi proizvedeni od mleka tretiranog termičkim
-

tretmanom 90°C/5 min i to: za ukus i ukupnu prihvatljivost – uzorak 90/40, za teksturu uzorak 90/10 a za miris 90/3.

23. Na osnovu distribucije učestalosti ocena koje su potrošači davali za svih devet uzoraka sireva na skali “upravo onako kako bi trebalo da bude” uzorku 90/40 za svako ispitivano svojstvo više od 80% potrošača dalo je jednu od ocena iz grupe “kako treba”. Što se ostalih uzoraka tiče, nije postojao ni jedan uzorak kod kog je usled odstupanja ocene od one “kako treba da bude” došlo do značajnog pada ocene ukupne prihvatljivosti. Ovo bi značilo da iako se potrošači izjašnjavaju za svojstva pojedinih uzoraka nepovoljno, oni smatraju ipak da je taj isti uzorak prihvatljiv.
24. Stručna komisija ocenila je kvalitet sira dobijenog od mleka tretiranog termičkim tretmanom 90°C/5 minuta značajno boljom ukupnom ocenom kvaliteta od druge dve varijante sireva. Stručna komisija smatra da sir proizveden od mleka tretiranog na 90°C/5 minuta ima najbolji kvalitet ukoliko je sasvim mlad (3 dana) ili zreo (40 dana). Generalno najslabije ocene za kvalitet dobili su uzorci nakon 10 dana zrenja, što se može povezati sa deskriptivnom senzornom analizom, na osnovu koje se vidi da u ovom stadijumu zrenja sirevi imaju najužu paletu senzornih svojstava, što je stručna komisija i prepoznala.
25. Između srednje vrednosti ocena koje su potrošači dali za ukupnu prihvatljivost uzoraka i srednje ponderisane ocene koje je stručna komisija dala za ukupan kvalitet sireva izvršena je korelaciona analiza. Utvrđeno je da između navedenih ocena postoji statistički značajna pozitivna korelacija ($p < 0,05$, $R = 0,73$). Na osnovu korelacione analize možemo da zaključimo da su potrošači “prepoznali” kvalitet onih sireva za koje je stručna komisija dala visoku objektivnu ocenu kvaliteta.
26. Imajući u vidu sve dobijene rezultate, može se zaključiti da je moguće proizvesti kozji sir u salamuri od mleka tretiranog režimima termičke obrade oštrijim od klasične niske pasterizacije uz uvećanje randmana i višu nutritivnu vrednost. Na osnovu senzorne analize realno je očekivati da bi ovakav proizvod bio prihvaćen na tržištu.
-

7. Literatura:

Abd El-Gawad and Ahmed, N. S. (2011): Cheese Yield as affected by some parameters, review. *Acta Scientiarum Polonorum* 10(2):131-153.

Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S. and Salem, A. (2009): Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. *Food Reviews International* 25(3):251-270.

Abellán, A., Cayuela, J. M., Pino, A., Martínez-Cachá, A., Salazar, E. and Tejada, L. (2012): Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(8):1657-1664.

Alichanidis, E. and Abd El-Salam, M. H. (2004): Cheese Varieties Ripened in Brine. in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition. Vol. 1. P. F. Fox, P. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, ed. Elsevier Applied Science, London.

Alichanidis, E. and Polychroniadou, A. (2008): Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology* 88(4-5):495-510.

Alloggio, V., Caponio, F., Pasqualone, A., and Gomes, T. (2000): Effect of heat treatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. *Food Chemistry* 70(1):51-55.

Anema, S. G. and Stanley, D. J. (1998): Heat-induced, pH-Dependent Behaviour of Protein in Caprine Milk. *International Dairy Journal* 8(10-11):917-923.

Antunac, N., Samardžija, D. and Havranek, J. (2000): Hranidbena i terapeutska vrijednost kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* 50(4):297-304.

AOAC. (1990): Pages 841-842, 807-809 in *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Ardö, Y. and Polychroniadou, A. (1999): *Laboratory manual for chemical analysis of cheese*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Asteri, I.-A., Kittaki, N. and Tsakalidou, E. (2010): The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* 63(2):234-242.

Awad, S., Lüthi-Peng, Q.-Q. and Puhan, Z. (1998): Proteolytic Activities of Chymosin and Porcine Pepsin on Buffalo, Cow, and Goat Whole and β -Casein Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(12):4997-5007.

Barać, M. B., Smiljanić, M., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. T. and Maćej, O. D. (2013): Primary proteolysis of white brined goat cheese monitored by high molarity Tris buffer SDS- PAGE system. *Mljekarstvo* 63(3):122-131.

-
- Bastian, E. D. and Brown, R. J. (1996): Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal* 6(5):435-457.
- Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K. H. and Petersen, T. E. (1997): Heat Treatment of Cheese Milk: Effect on Plasmin Activity and Proteolysis. *International Dairy Journal* 97:723-731.
- Bontinis, T. G., Mallatou, H., Pappa, E. C., Massouras, T. and Alichanidis, E. (2012): Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research* 105(1-3):193-201.
- Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, I. and Morand-Fehr, P. (2005): The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research* 60(1-2):13-23.
- Božanić, R., Tratnik, Lj. and Drgalic, I. (2002): Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* 52(3):207-237.
- Bryant, A., Ustunol, Z. and Steffe, J. (1995): Texture of Cheddar Cheese as Influenced by Fat Reduction. *Journal of Food Science* 60(6):1216-1219.
- Buffa, M. N., Trujillo, A. J., Pavia, M. and Guamis, B. (2001): Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal* 11(11-12):927-934.
- Buňka, F., Pachlová, V., Pernická, L., Burešová, I., Kráčmar, S. and Lošák, T. (2013): The Dependence of Peleg's Coefficients on Selected Conditions of a Relaxation Test in Model Samples of Edam Cheese. *Journal of Texture Studies* 44(3):187-195.
- CAC. (2013): Codex General Standard for Cheese. in 283-1978. FAO and WHO, Rome, Italy.
- Calvo, M. M. (2002): Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropeptide formation. *European Food Research and Technology* 214:182-185.
- Calvo, M. M. and Balcones, E. (1998): Influence of Heat Treatment on Rennet Clotting Properties of Mixtures of Cow's, Ewe's and Goat's Milk and on Cheese Yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:2957-2962.
- Calvo, M. M. and Espinoza, N. A., (1999): Syneresis Rate of Cow's, Ewe's, and Goat's Curd. Effect of Thermal Treatment and Ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(3):883-886.
- Caponio, F., Gomes, T., Alloggio, V. and Pasqualone, A. (2000): An effort to improve the organoleptic properties of a soft cheese from rustic goat milk. *European Food Research and Technology* 211:305-309.
- Caponio, F., Pasqualone, A. and Tommaso, G. (2001): Apulian Cacioricotta goat's cheese: technical interventions for improving yield and organoleptic characteristics. *European Food Research and Technology* 213:178-182.
-

- Carunchia Whetstine, M. E., Karagul-Yuceer, Y., Avsar, Y. K. and Drake, M. A. (2003): Identification and Quantification of Character Aroma Components in Fresh Chevre-style Goat Cheese. *Journal of Food Science* 68(8):2441-2447.
- Casper, J. L., Wendorff, W. L. and Thomas, D. L. (1998): Seasonal Changes in Protein Composition of Whey from Commercial Manufacture of Caprine and Ovine Specialty Cheeses. *Journal of Dairy Science* 81(12):3117-3122.
- Chevalier, F., Hirtz, C., Sommerer, N. and Kelly, A. L. (2009): Use of Reducing/Nonreducing Two-Dimensional Electrophoresis for the Study of Disulfide-Mediated Interactions between Proteins in Raw and Heated Bovine Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(13):5948-5955.
- Clark, S. and Sherbon, J. W. (2000): α_{s1} -casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research* 38(2):123-134.
- Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H. and Creamer, L. K. (2007): Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(1):1-23.
- Dagdemiir, E., Celik, S. and Ozdemir, S. (2003): The Effects of Some Starter Cultures on the Properties of Turkish White Cheese. *International Journal of Dairy Technology* 56(4):215-218.
- De Kruif, C. G. (1999): Casein micelle interactions. *International Dairy Journal* 9(3-6):183-188.
- De Kruif, C. G. and Zhulina, E. B. (1996): κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 117(1-2):151-159.
- Delgado, F. J., Gonzales-Crespo, J., Cava, R. and Ramirez, R. (2011): Proteolysis, texture and colour of raw goat milk cheese throughout the maturation. *European Food Research and Technology* 233:483-488.
- Devold, T. G., Brovold, M. J., Langsrud, T. and Vegarud, G. E. (2000): Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle—effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *International Dairy Journal* 10(5-6):313-323.
- Dijtherhuis, G. (1996): Procrustes analysis in sensory research. Pages 185-220 in *Multivariate analysis of data in sensory science*. T. Naes and E. Risvik, ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Dimassi, O., Neidhart, S., Carle, R., Mertz, L., Migliore, G., Mané-Bielfeldt, A. and Zárate, A. V. (2005): Cheese production potential of milk of Dahlem Cashmere goats from a rheological point of view. *Small Ruminant Research* 57(1):31-36.
- Donato, L. and Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein- κ -casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Sci. Technol.* 89(1):3-29.
- Donato, L., Guyomarc'h, F., Amiot, S. and Dalglish, D. G. (2007): Formation of whey protein/ κ -casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with κ -casein in the casein micelles. *International Dairy Journal* 17(10):1161-1167.

- Dozet, N., Maćej, O., Jovanović, S. (2004): Kozije mlijeko i koziji sirevi – osnova za proizvodnju kvalitetne hrane. *Biotechnology in animal husbandry* 20(5-6): 147-156.
- Dubeuf, J. P., Morand-Fehr, P. and Rubino, R. (2004): Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research* 51(2):165-173.
- Dufour, E., Devaux, M. F., Fortier, P. and Herbert, S. (2001): Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy—relationship with texture. *International Dairy Journal* 11(4-7):465-473.
- El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S. and Buchheim, W. (1996): Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal* 6(4):327-341.
- Faccia, M., Gambacorta, G., Caponio, F., Pati, S. and Di Luccia, A. (2007): Influence of type of milk and ripening time on proteolysis and lipolysis in a cheese made from overheated milk. *International Journal of Food Science & Technology* 42(4):427-433.
- Faccia, M., Picariello, G., Trani, A., Loizzo, P., Gambacorta, G., Lamacchia, C. and Di Luccia, A. (2012): Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with capriferin (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology* 234:527-533.
- Fairise, J. F., Cayot, P. and Lorient, D. (1999): Characterisation of the protein composition of casein micelles after heating. *International Dairy Journal* 9(3-6):249-254.
- FAO (2003). *Production Yearbook 2002*. Food and Agriculture Organisation, UN Rome, Italy.
- Fenelon, M. A. and Guinee, T. P. (1999): The effect of milk fat on cheddar cheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. *Journal of Dairy Science* 82:2287-2299.
- Ferrandini, E., López, M. B., Castillo, M. and Laencina, J. (2011): Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. *Food Chemistry* 124(2):583-588.
- FIL-IDF. 1981: Determination of fat content. Gerber butyrometers. in *Milk*. Vol. 105. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF. 1982: Determination of the total solids content. in *Cheese and processed cheese*. Vol. 4A. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF. 1986. Determination of fat content. in *Cheese and processed cheese products*. Vol. 5B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF. 1987. Determination of total solids content. in *Milk, cream and evaporated milk*. Vol. 021B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF. 1988b. Determination of chloride content. in *Cheese and processed cheese*. Vol. 88A. International Dairy Federation, Brussels Belgium.

-
- Foucquier, J., Chantoiseau, E., Le Feunteun, S., Flick, D., Gaucel, S., and Perrot, N. (2012): Toward an integrated modeling of the dairy product transformations, a review of the existing mathematical models. *Food Hydrocolloids* 27(1):1-13.
- Fox, P. F. and Brodtkorb, A. (2008): The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* 18(7):677-684.
- Fox, P. F. and Stepaniak, L. (1993): Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal* 3(4-6):509-530.
- García-Risco, M. R., Ramos, M. and López-Fandiño, R. (2002): Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. *International Dairy Journal* 12(8):679-688.
- Ghosh, B. C., Steffi, S. A., Hinrichs, J. and Kessler, H. G. (1999): Effect of heat treatment and homogenization of milk on Camembert-type cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science* 27:331-343.
- Grice, J.W. (2002): Idiogrid: Software for the management and analysis of repertory grids. *Behavior Research Methods, Instruments, and Computers* 34(3): 338-341.
- Grice, J. W., and Assad, K. K. (2009): Generalized Procrustes Analysis: a tool for exploring aggregates and persons. *Applied Multivariate Research* 13(1): 93-112.
- Gunasekaran, S. and Mehmet Ak, M. (2003): *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Guo, M. R., Wang, S., Li, Z., Qu, J., Jin, L. and Kindsted, P. S. (1998): Ethanol stability of goat's milk. *International Dairy Journal* 8(1):57-60.
- Guyomarc'h, F., Law, A. J. R. and Dalgleish, D. G. (2003): Formation of Soluble and Micelle-Bound Protein Aggregates in Heated Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16):4652-4660.
- Guyomarc'h, F., Renan, M., Chatriot, M., Gamberre, V. and Famelart, M.-H. (2007): Acid Gelation Properties of Heated Skim Milk as a Result of Enzymatically Induced Changes in the Micelle/Serum Distribution of the Whey Protein/ κ -Casein Aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26):10986-10993.
- Haenlein, G. F. W. (2004): Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 51(2):155-163.
- Haenlein, G. F. W. (2007): About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research* 68(1-2):3-6.
- Hallen, E. (2008): *Coagulation Properties of Milk*. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Havea, P. (1998): *Studies on heat-induced interactions and gelation of whey protein*. PhD Thesis. Massey University, New Zeland.
- Hayaloglu, A. A., Tolu, C. and Yasar, K. (2013): Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokceada goat cheese during ripening. *Small Ruminant Research* 113(1):231-238.
-

-
- Hayaloglu, M., Guven, M., Fox, P. F. and Mc Sweeney, P. L. H. (2005): Influence of Starters on Chemical, Biochemical, and Sensory Changes in Turkish White-Brined Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science* 88(10):3460-3474.
- Henry, G., Mollé, D., Morgan, F., Fauquant, J. and Bouhallab, S. (2002): Heat-Induced Covalent Complex between Casein Micelles and β -Lactoglobulin from Goat's Milk: Identification of an Involved Disulfide Bond. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(1):185-191.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M. and Gómez-Ruiz, J. Á. (2011): Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research* 101(1-3):196-204.
- Hort, J. and Le Grys, G. (2001): Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal* 11(4-7):475-481.
- Hougaard, A. B., Ardö, Y. and Ipsen, R. H. (2010): Cheese made from instant infusion pasteurized milk: Rennet coagulation, cheese composition, texture and ripening. *International Dairy Journal* 20:449-458.
- Hynes, E. R., Aparo, L. and Candiotti, M. C. (2004): Influence of Residual Milk-Clotting Enzyme on α 1 Casein Hydrolysis During Ripening of Reggianito Argentino Cheese. *Journal of Dairy Science* 87(3):565-573.
- Jack, F. R. and Paterson, A. (1992): Texture of hard cheeses. *Trends in Food Science and Technology* 3:160-164.
- Jean, K., M. Renan, Famelart, M.-H. and Guyomarc'h, F. (2006): Structure and surface properties of the serum heat-induced protein aggregates isolated from heated skim milk. *International Dairy Journal* 16(4):303-315.
- Jovanović, S. T. (2001): Uticaj obrazovanja koagregata proteina mleka na veće iskorišćenje ukupnih proteina pri proizvodnji polutvrdih sireva. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Kelly, A. L. and Mc Sweeney, P. L. H. (2003): Indigenous Proteinases in Milk. Pages 495-544 in *Advanced Dairy Chemistry - 1 Proteins*, 3rd Edition. Vol. 1. P. F. Fox and P. L. H. Mc Sweeney, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Kim, H.-H. Y. and Jimenez-Flores, R. (1995): Heat-Induced Interactions Between the Proteins of Milk Fat Globule Membrane and Skim Milk. *Journal of Dairy Science* 78(1):25-35.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural properties during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lau, K. Y., Barbano, D. M. and Rasmussen, R. R. (1990) Influence of Pasteurization on Fat and Nitrogen Recoveries and Cheddar Cheese Yield. *Journal of Dairy Science* 73(3):561-570.
- Law, A. J. R. (1995): Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft* 50:384-388.
-

- Law, A. J. R. and Leaver, J. (2000): Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3):672-679.
- Lawless, H. T. and Heymann, H. (2010): *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (Second Edition ed.). Springer Science and Business Media, LLC, New York.
- Lieske, B., Konrad, G. and Faber, W. (1997): A new spectrophotometric assay for native β -lactoglobulin in raw and processed bovine milk. *International Dairy Journal* 7(12):805-812.
- Lindmark-Månsson, H., Timgren, A., Aldén, G. and Paulsson, M. (2005): Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk. *International Dairy Journal* 15(2):111-121.
- Livney, Y. D., Corredig, M. and Dalgleish, D. G. (2003): Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(4-5):359-364.
- Lowe, E. K., Anema, S. G., Bienvenue, A., Boland, M. J., Creamer, L. K. and Jiménez-Flores, R. (2004): Heat-Induced Redistribution of Disulfide Bonds in Milk Proteins. 2. Disulfide Bonding Patterns between Bovine β -Lactoglobulin and κ -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(25):7669-7680.
- Maćej, O. D. (1989): Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi koagregata belančevina mleka. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Maćej, O. D., Jovanović, S. T. and Barać, M. B. (2007): *Proteini mleka, Monografija*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Madsen, J. S. and Ardö, Y. (2001): Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. *International Dairy Journal* 11(4-7):423-431.
- Manzo, C., Pizzano, R. and Addeo, F. (2008): Detection of pH 4.6 Insoluble β -Lactoglobulin in Heat-Treated Milk and Mozzarella Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17):7929-7933.
- McEwan, J. A. (1996): Preference mapping for product optimisation. Pages 71-102 in *Multivariate analysis of data in sensory science*. N. T and E. Risvik, ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- McSweeney, P. L. H. (2004): Symposium contribution: Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57(2/3):127-144.
- Medeiros, E. J. L. d., Queiroga, R. d. C. R. d. E., Medeiros, A. N. d., Bomfim, M. A. D., Batista, A. S. M., Félex, S. S. d. S., and Madruga, M. S. (2013): Sensory profile and physicochemical parameters of cheese from dairy goats fed vegetable oils in the semiarid region of Brazil. *Small Ruminant Research* 113(1):211-218.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. and Carr, B. T. (1999): *Sensory evaluation techniques*. Third edition. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

- Melilli, C., Lynch, J. M., Carpino, S., Barbano, D. M., Licitra, G. and Cappa, A. (2002): An Empirical Method for Prediction of Cheese Yield. *Journal of Dairy Science* 85(10):2699-2704.
- Mikkelsen, T. L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P. and Barkholt, V. (2005): Caseinomacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein. *Journal of Dairy Science* 88:4228-4238.
- Mishra, R., Govindasamy-Lucey, S. and Lucey, J. A. (2005): Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: impact of processing conditions. *Journal of Texture Studies* 36(2):190-212.
- Moatsou, G., Samolada, M., Panagiotou, P. and Anifantakis, E. (2004): Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *Food Chemistry* 87(1):75-81.
- Mollé, D., Jean, K. and Guyomarc'h, F. (2006): Chymosin sensitivity of the heat-induced serum protein aggregates isolated from skim milk. *International Dairy Journal* 16(12):1435-1441.
- Montilla, A., Balcones, E. Olano, A., and Calvo, M. M. (1995): Influence of Heat Treatments on Whey Protein Denaturation and Rennet Clotting Properties of Cow's and Goat's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(7):1908-1911.
- Mooney, J. S., Fox, P. F., Healy, A. and Leaver, J. (1998): Identification of the Principal Water-insoluble Peptides in Cheddar Cheese. *International Dairy Journal* 8(9):813-818.
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J. P., Devendra, C., Dubeuf, J. P., Haenlein, G. F. W., Holst, P., Mowlem, L. and Capote, J. (2004): Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research* 51(2):175-183.
- Morgan, F. and Gaborit, P. (2001): The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology* 54(1):38-40.
- Morgan, F., Micault, S. and Fauquant, J. (2001): Combined effect of whey protein and α_{s1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. *International Journal of Dairy Technology* 54(2):64-68.
- Næs, T., Brockhoff, P. B. and Tomic, O. (2010): *Statistics for sensory and consumer science*. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, United Kingdom.
- Niketic, G., Kasalica, A., Popovic-Vranjes, A., Gavric, M. and Miocinovic, D. (2006): Tehnološka podobnost kozjeg mleka za preradu u sir. *Prehrambena industrija* 17:15-18.
- O'Keefe, A. M., Fox, P. F. and Daly, C. (1978): Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacterija. *Journal of Dairy Research* 46:465-477.
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., and Pearce, K. N. (2000): Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. *International Dairy Journal* 10(8):509-518.

-
- Ostersen, S., Foldager, J. and Hermansen, J. E. (1997): Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 64(02):207-219.
- Othmane, M. H., Carriedo, J. A., de la Fuente Crespo, L. F. and San Primitivo, F. (2002): An individual laboratory cheese-making method for selection in dairy ewes. *Small Ruminant Research* 45(1):67-73.
- Outinen, M., Heino, A. and Uusi-Rauva, J. (2010a): Pre-treatment methods of Edam cheese milk. Effect on the whey composition. *LWT - Food Science and Technology* 43(4):647-654.
- Outinen, M., Rantamäki, P. and Heino, A. (2010b): Effect of Milk Pretreatment on the Whey Composition and Whey Powder Functionality. *Journal of Food Science* 75(1):E1-E10.
- Panouillé, M., Nicolai, T. and Durand, D. (2004): Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles. *International Dairy Journal* 14(4):297-303.
- Park, Y. W. (2001): Proteolysis and Lipolysis of Goat Milk Cheese. *Journal of Dairy Science* 84:E84-E92.
- Park, Y. W. (2006): Goat Milk - Chemistry and Nutrition. Pages 34-59 in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Y. W. Park and G. F. W. Haenlein, ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Park, Y. W. and Guo, M. (2006): Goat Milk Products: Types of Products, Manufacturing Technology, Chemical Composition and Marketing. Pages 34-58 in *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. 1st ed. Y. W. Park and G. F. W. Haenlein, ed. Blackwell Publishing, New York.
- Park, Y. W. and Humphrey, R. D. (1986): Bacterial Cell Counts in Goat Milk and Their Correlations with Somatic Cell Counts, Percent Fat, and Protein¹. *Journal of Dairy Science* 69(1):32-37.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68(1-2):88-113.
- Pasqualone, A., Caponio, F., Alloggio, V. and Gomes, T. (2000): Content of taurine in Apulian Cacioricotta goat's cheese. *European Food Research and Technology* 211:158-160.
- Patel, H. A. (2007): Studies on heat- and pressure-induced interactions of milk proteins. in Massey University. Vol. PhD thesis, Palmerston North, New Zeland.
- Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., and Vrvic, M. M. (2012): Heat induced casein-whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. *Small Ruminant Research* 108(1-3):77-86.
- Pesic, M. B., Barac, M. B., Vrvic, M. M., Ristic, N. M., Macej, O. D., Stanojevic, S. P. and Kostic, A. Z. (2011): The distributions of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal* 21(10):831-838.
-

-
- Pintado, M. E. and Malcata, F. X. (1996): Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. *International Dairy Journal* 6(5):497-518.
- Polychroniadou, A., Michaelidou, A. and Paschaloudis, N. (1999): Effect of time, temperature and extraction method on the trichloroacetic acid-soluble nitrogen of cheese. *International Dairy Journal* 9(8):559-568.
- Puđa, P. (1992): Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Puđa, P. (2009): Tehnologija mleka I. Sirarstvo. Opšti deo. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Puđa, P. and Macej, O. D. (1996): Savremena proizvodnja sireva i perspektive razvoja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Radovanović, R. and Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Univerzitet u Beogradu/Univerzitet u Novom Sadu, Beograd/Novi Sad.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Pudja, P., Barać, M., Miloradović, Z., Paunović, D. and Obradović, D. (2011): The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo* 61(1):15-25.
- Rafael, D. D. and Calvo, M. M. (1996): Deposit formation during heat treatment of cows', goats' and ewes' milks. *Journal of Dairy Research* 63(04):635-638.
- Rasmussen, L. K., P. Højrup, and Petersen, T. E. (1992): Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine α_{s2} -casein. *European Journal of Biochemistry* 203(3):381-386.
- Rasmussen, L. K., Højrup, P. and Petersen, T. E. (1994): Disulphide arrangement in bovine caseins: localization of intrachain disulphide bridges in monomers of κ - and α_{s2} -casein from bovine milk. *Journal of Dairy Research* 61(04):485-493.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I. and Chilliard, Y. (2008): Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 79(1):57-72.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F. and Bouhallab, S. (2007): Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68(1-2):207-220.
- Raynal, K. and Remeuf, F. (1998): The Effect of Heating on Physicochemical and Renneting Properties of Milk: A Comparison between Caprine, Ovine and Bovine Milk. *International Dairy Journal* 8(8):695-706.
- Renan, M., Guyomarc'h, F., Chatriot, M., Gamberre, V. and Famelart, M.-H. (2007): Limited Enzymatic Treatment of Skim Milk Using Chymosin Affects the Micelle/Serum Distribution of the Heat-Induced Whey Protein/ κ -Casein Aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(16):6736-6745.
- Rohm, H., Jaros, D., Rockenbauer, C., Riedler-Hellrigl, M., Uniacke-Lowe, T. and Fox, P. F. (1996): Comparison of ethanol and trichloroacetic acid fractionation for
-

measurement of proteolysis in Emmental cheese. *International Dairy Journal* 6(11–12):1069-1077.

Rojas, E. and Torres, G. (2013): Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology* 33(1):14-20.

Romano, R., Brockhoff, P.B., Hersleth, M., Tomic, O., Næs, T. (2008): Correcting for different use of the scale and the need for further analysis of individual differences in sensory analysis. *Food Quality and Preference* 19(2): 197-209.

Rynne, N. M., Beresford, T. P., Kelly, A. L. and Guinee, T. P. (2004): Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 14(11):989-1001.ž

Sabadoš, D. (1996): Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb.

Sandra, S. and Dalgleish, D. G. (2007): The effect of ultra high-pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *International Dairy Journal* 17(9):1043-1052.

Schreiber, R. (2001): Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability. *International Dairy Journal* 11(4–7):553-558.

Sheehan, J. J., Oliveira, J. C., Kelly, A. L., and Mc Sweeney, P. L. H. (2007): Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal* 17(7):826-834.

Shuiep, E. T. S., Giambra, I. J. El Zubeir, I. E. Y. M. and Erhardt, G. (2013): Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of α_{s1} -casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. *International Dairy Journal* 28(2):88-93.

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U. and Prosser, C. G. (2010): Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research* 89(2–3):110-124.

Singh, H. and Creamer, L. K. (1991): Aggregation and Dissociation of Milk Protein Complexes in Heated Reconstituted Concentrated Skim Milks. *Journal of Food Science* 56(1):238-246.

Singh, H. and Waungana, A. (2001): Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal* 11(4–7):543-551.

Slanovec, T. (1973): Značaj kontrole randmana kod standardizacije kvalitete emmentalskog sira. *Mljekarstvo* 23(6):129-134.

Sousa, M. J., Ardö, Y. and McSweeney, P. L. H. (2001): Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11:327-345.

Stevens, J. P. (2009): *Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences*. New York: Taylor & Francis Group, LLC.

-
- Tan, Y. L., Singh, A., Ye, H. and Hemar, Y. (2007): Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems. *Journal of Texture Studies* 38(3):404-422.
- Tejada, L., Abellán A., Cayuela, J. M., Martínez-Cacha, A. and Fernández-Salguero, J. (2008): Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal* 18(2):139-146.
- Topçu, A. and Saldamli, I. (2006): Proteolytical, Chemical, Textural and Sensorial Changes During the Ripening of Turkish White Cheese Made of Pasteurized Cows' Milk. *International Journal of Food Properties* 9(4):665-678.
- Trujillo, A.-J., Guamis, B. and Carretero, C. (1995): Proteolysis Of Goat .beta.-Casein by Calf Rennet under Various Factors Affecting the Cheese Ripening Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(6):1472-1478.
- Trujillo, A. J., Guamis, B. and Carretero, C. (1997): Proteolysis of goat casein by calf rennet. *International Dairy Journal* 7(8-9):579-588.
- Tuinier, R. and de Kruif, C. G. (2002): Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics* 117(3):1290-1295.
- Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A. and Fox, P. F. (2004): Proteolysis in Cheese During Ripening. Pages 390-434 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition. Vol. 1. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and G. T.P., ed. Elsevier Applied Science, London.
- Ustunol, Z. and Brown, R. J. (1985): Effects of Heat Treatment and Post treatment Holding Time on Rennet Clotting of Milk. *Journal of Dairy Science* 68(3):526-530.
- Van Hekken, D. L., Park, Y. W. and Tunick, M. H. (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.
- Vasbinder, A. J. (2002): Casein - whey protein interactions in heated milk. PhD Thesis. Utrecht University, Netherlands.
- Vasbinder, A. J. and de Kruif, C. G. (2003): Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International Dairy Journal* 13(8):669-677.
- Vasbinder, A. J., van Mil, P. J. J. M., Bot, A. and de Kruif, K. G. (2001): Acid-induced gelation of heat-treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 21(1-3):245-250.
- Verwey, E. J. W. and Overbeek, J. T. G. (1948): *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam.
- Vincent, J. F. V., Jeronimidis, G., Khan, A. A. and Luyten, H. (1991): The wedge fracture test, a new method for measurement of food texture. *Journal of Texture Studies* 22(1):45-57.
- Visser, J. (1991): Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. Pages 49-61 in *Proc. Rheological and fracture properties of cheese*. IDF Bulletin.
-

Visser, S. (1993): Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor: An Overview. *Journal of Dairy Science* 76(1):329-350.

Walstra, P. and Jenness, R. (1984): *Dairy Chemistry and Physics*. Wiley, New York.

Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A. and White, N. (2001): Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal* 11(4-7):455-464.

Watkinson, P., Crawford, R. and Dodds, C. (2002): Effect of moisture on instrumentally measured texture properties of model cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 57:153.

Whetstone, M. E. C. and Drake, M. A. (2006): Flavor Characteristics of Goat Milk and Other Minor Species Milk Products. Pages 107-121 in *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Y. W. Park and G. F. W. Haenlein, ed. Blackwell Publishing, New York.

Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W. and Anema, S. (2004): Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait* 84(3):269-283.

Yuksel, Z., Avci, E., Uymaz, B. and Erdem, Y. K. (2012): General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida. *Small Ruminant Research* 106(2-3):137-144.

Zeng, S. S., Soryal, K., Fekadu, B., Bah, B. and Popham, T. (2007) Predictive formulae for goat cheese yield based on milk composition. *Small Ruminant Research* 69(1-3):180-186.

BIOGRAFIJA

Zorana Miloradović rođena je 09.07.1977. godine u Beogradu. Gimnaziju „Sveti Sava“ u Beogradu završila je 1996. godine. Odsek za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu upisala je školske 1996/97 godine. Diplomirala je 2004. godine sa prosečnom ocenom 7,92 i ocenom 10 na diplomskom radu, čime je stekla zvanje diplomiranog inženjera tehnologije.

Od 2006. do 2007. godine radila je u kompaniji „Biomed“ na poziciji šefa proizvodnje.

Od 2007. godine zaposlena je na Odeljenju za tehnologiju mleka kao stručni saradnik, u kom svojstvu se i sad nalazi. Doktorske studije, studijski program Prehrambena tehnologija upisala je školske 2008/2009. godine. Stručni i naučni rad kandidata Zorane Miloradović, dipl. inž. sastoji se iz istraživačkog laboratorijskog rada, kao i učešća u realizaciji studentskih vežbi iz oblasti “Hemije i fizike mleka” i “Obrade mleka”, i master radova iz oblasti nauke u mleku.

Od 2011. godine je angažovana kao stručni saradnik na projektu pod nazivom «Unapređenje i razvoj novih tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica animalnog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu», br. 46009, koji se finansira od strane Ministarstva za prosvetu i nauku.

Do sada je, u saradnji sa drugim autorima, objavila ukupno 23 naučna rada od kojih je 6 radova objavljeno u međunarodnim časopisima sa Sci. Liste. Kao koautor učestvovala je u dva tehnička rešenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Зорана Н. Милорадовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације: 08/45

Изјављујем

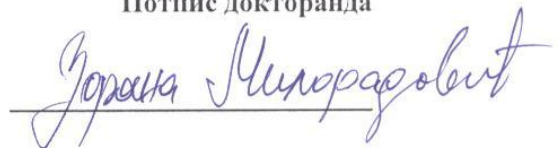
да је докторска дисертација под насловом:

„Карактеристике белих сирева у саламури произведених од козјег млека третираног различитим термичким третманима“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 27.03.2015.

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора: Зорана Н. Милорадовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације: 08/45

Студијски програм: Прехрамбена технологија

Наслов докторске дисертације: „Карактеристике белих сирева у саламури
произведених од козјег млека третираног различитим термичким третманима“

Ментор: проф.др Огњен Мађеј

Потписани/а: Зорана Н. Милорадовић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 27.03.2015.

Зорана Милорадовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Карактеристике белих сирева у саламури произведених од козјег млека третираног различитим термичким третманима“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

У Београду, 27.03.2015.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.