

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Marina R. Hovjecki

UTICAJ ODABRANIH FAKTORA NA TOK KISELE I
SIRIŠNE KOAGULACIJE KOZJEG MLEKA I KVALITET
JOGURTA I SIREVA

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Marina R. Hovjecki

INFLUENCE OF SELECTED FACTORS ON THE ACID AND
RENNET COAGULATION OF GOAT'S MILK AND THE
QUALITY OF YOGHURTS AND CHEESES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU

Mentor:

dr Jelena Miočinović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Predrag Puđa, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Mirela Iličić, vanredni profesor
Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

dr Vladislav Rac, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Milica Mirković, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Želim da se zahvalim svim članovima Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda - odeljenja za tehnologiju mleka, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći u izradi ove disertacije koja je realizovana kao deo nacionalnog projekta III46009.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Jeleni Miočinović, koja me je uvela u svet nauke i pokazala izuzetnu energiju i vođstvo kroz celokupan proces od ideje do realizacije i finalizovanja ove disertacije. Posebno se zahvaljujem na iskazanoj podršci i razumevanju, pruženoj motivaciji kada je to bilo potrebno, kao i na znanju i iskustvu koje je prenela na mene tokom dugogodišnje saradnje, kako u oblasti nauke tako i van nje.

Za veoma korisne savete, podršku i kolegijalnost, zahvaljujem se dragoj dr Zorani Miloradović, višem naučnom saradniku, koja je svojom agilnošću u radu, lakoćom u razmeni znanja i iskustva, ulepšala celokupni period mog rada na Odeljenju za tehnologiju mleka i doprinela unapređenju ove disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Predragu Puđi na pruženom znanju iz oblasti reoloških istraživanja, smernicama i savetima koji su bili od izuzetnog značaja za adekvatan pristup realizaciji i izradi ove disertacije.

Hvala prof. dr Vladislavu Racu na pomoći u realizaciji dela ogleda i tumačenju rezultata dobijenih DLS merenjima, koji su doprineli unapređenju vrednosti ove disertacije, kao i dragocenim savetima u toku pisanja rada.

Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Mireli Iličić i dr Milici Mirković na izuzetno vrednim sugestijama i savetima tokom pisanja disertacije koji su je učinili boljom.

Dragoj Danici Mićanović, velikoj ženi, koja je pratila moj razvoj kao istraživača veliko hvala, jer bez njene podrške i pomoći ne bih ostvarila svoj cilj.

Veoma sam zahvalna kompaniji "Beocapra" i Draganu Rackoviću iz Čačka na donaciji mleka za ovo istraživanje.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu, koji su verovali u mene, podržavali me i omogućili mi da stignem dovede.

Na kraju, najveće i najvažnije hvala mojima Hani, Bogdanu i Milošu, mojoj najvećoj motivaciji, koji su svojom ljubavlju, razumevanjem i podrškom učinili da ovo putovanje uspešno dovedem do kraja.

UTICAJ ODABRANIH FAKTORA NA TOK KISELE I SIRIŠNE KOAGULACIJE KOZJEG MLEKA I KVALITET JOGURTA I SIREVA

Rezime

Kozje mleko je nutritivno visoko vredna namirnica čija proizvodnja u svetu ima trend rasta. Njegov značaj sa socijalno-ekonomskog stanovišta posebno je veliki u pojedinim regionima, gde se znatna količina proizvedenog mleka koristi za konzumiranje ili prerađuje u veliki broj varijeteta sireva, koji često nose oznaku geografskog porekla, kao i jogurt.

Cilj ove disertacije je bio da se detaljnije prouči efekat niza odabranih faktora na reološke parametre kisele i sirišne koagulacije kozjeg mleka, svojstva dobijenog gela kao i kvalitet proizvedenih jogurta i sireva. Za istraživanje je korišćeno mleko dve rase koza, Sanske i Alpske i obuhvaćena su sva tri laktaciona perioda (rani, srednji i kasni).

Iako je fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka veoma sličan kravljem, razlike na nivou strukture i svojstava pojedinih komponenata kozjeg mleka, pre svega proteina, predstavljaju uzrok njegovih drugačijih tehnoloških svojstava i značajan su faktor koji utiče na inferiorniju teksturu proizvedenog jogurta ili manji randman sira. Sa druge strane, pojedini procesni parametri u proizvodnji mlečnih proizvoda, poput termičke obrade mleka ili dodavanja kalcijum-hlorida, imaju dobro poznat efekat na kravlje mleko, ali njihov uticaj na kozje mleko je često drugačiji, zbog čega se postavlja pitanje njihove adekvatne primene. Ovo polje ispitivanja je još uvek otvoreno i potrebna su dodatna istraživanja u cilju optimizacije tehnoloških postupaka proizvodnje kozjih mlečnih proizvoda.

Kako bi se istražio uticaj pojedinih faktora na svojstva kozjeg mleka tokom kisele i sirišne koagulacije kao i mogućnosti unapređenja kvaliteta jogurta i sireva, u okviru ove disertacije obavljen je niz oglada.

U prvom delu disertacije ispitan je uticaj dodatka izolata proteina mleka na reološka svojstva kisele koagulacije i kvalitet jogurta od kozjeg i kravljeg mleka, kako bi se utvrdile mogućnosti primene ovog dodatka za poboljšanje teksture kozjeg jogurta u poređenju sa jogurtom od kravljeg mleka.

U drugom delu je istražen uticaj enzima transglutaminaze i dva termička tretmana mleka na tok kisele koagulacije kozjeg mleka i teksturu jogurta tokom perioda skladištenja. Efekti ovog enzima, termičkih tretmana i acidifikacije pod dejstvom starter kulture na proteine mleka i jogurta određeni su elektroforetski. Takođe, ispitan je i uticaj ovog enzima na preživljavanje starter kulture tokom skladištenja i obavljena je senzorna ocena ovih proizvoda.

Efekti tri termička tretmana (72 °C/30 s, 85 °C/5 min i 95 °C/5 min) istraženi su u narednom delu oglada u pogledu reoloških svojstava kiselog gela i teksture jogurta čvrstog tipa (eng. set style). Ovom prilikom je ispitan i uticaj koji ovi tretmani imaju na prosečnu veličinu kazeinskih micela metodom dinamičkog rasejanja svetlosti i proteinski profil tretiranih mleka.

Sledeći segment disertacije obuhvatio je reološka ispitivanja uticaja niza faktora na tok sirišne koagulacije mleka i svojstva sirišnog gela. U okviru ovih oglada ispitani su navedeni faktori: 1) koncentracija sirila (0,054 g/l, 0,020 g/l, 0,015 g/l i 0,010 g/l); 2) pH mleka (6,5, 6,3 i 6,1); 3) temperatura koagulacije (27, 31 i 35 °C); 4) period laktacije (rani, srednji i kasni) i 5)

termički tretmani mleka i dodatak kalcijum-hlorida (65 °C/30 min, 80 °C/5 min i 90 °C/5 min, bez ili sa dodatkom 200 mg/l CaCl₂).

U poslednjoj fazi istraživanja obavljena je proizvodnja dva varijeteta kozjih sireva u salamuri, beli sir u kriškama i sir za grilovanje. U ovom delu je ispitan uticaj dodatka standardne količine CaCl₂ na osnovne parametre kvaliteta i teksturalna svojstva sireva neposredno nakon proizvodnje i nakon određenog perioda zrenja.

Rezultati ove disertacije pokazali su da su dodatkom izolata proteina mleka reološka svojstva i tekstura jogurta od kozjeg mleka poboljšana i približena svojstvima jogurta od kravljeg mleka.

Dodatak enzima transglutaminaze je unapredio kvalitet jogurta od kozjeg mleka što je potvrđeno reološkim ispitivanjem svojstava kiselog gela i analizom teksture nakon proizvodnje i nakon perioda skladištenja, ukoliko je prethodni termički tretman intenzivniji. Ovaj enzim je ispoljio i stabilizujući efekat na broj preživelih bakterija jogurtne starter kulture tokom 15 dana i uticao na dodatno umrežavanje proteina tokom skladištenja što je potvrđeno SDS PAGE analizom. Termički tretman mleka od 85 °C/5 min je bio dovoljan za postizanje boljih svojstava jogurta od kozjeg mleka u pogledu teksture, kada se upoređi sa umerenijim i intenzivnijim režimom pasterizacije. Nakon tretmana kozjeg mleka na 95 °C/5 min na osnovu srednjih vrednosti prečnika ustanovljeno je smanjenje prosečne veličine micela kazeina i pored većeg obima denaturacije proteina surutke što ukazuje na mogućnost pojave strukturnih promena u miceli i disocijacije.

Ispitivanjem faktora sirišne koagulacije utvrđeno je da povećanje koncentracije sirila nije imalo uticaja na čvrstinu sirišnog gela, dok je smanjenje koncentracije značajno produžilo vreme koagulacije. Uočen je i porast brzine agregiranja sa povećanjem koncentracije sirila. Snižavanje pH mleka dovelo je do značajnog skraćenja vremena koagulacije i povećanja brzine agregiranja. Povišenje temperature koagulacije uticalo je na skraćenje vremena koagulacije i na linearni porast brzine agregiranja. Najduže vreme koagulacije i najmanja čvrstina sirišnog gela utvrđeni su tokom srednje laktacije, kada se kozje mleko odlikovalo i najmanjim sadržajem proteina. Termički tretman mleka uticao je na produženo vreme koagulacije i formiranje sirišnog gela manje čvrstine. Dodatak kalcijum-hlorida nije značajno uticao na ispitivane parametre sirišne koagulacije. Kozji sir za grilovanje sa dodatkom kalcijum-hlorida odlikovale su značajno veće vrednosti čvrstine i gumastosti naposredno nakon proizvodnje, dok je nakon perioda zrenja uočeno drastično smanjenje vrednosti ovih parametara usled proteolize.

Ključne reči: kozje mleko, koagulacija, reološki parametri, termički tretman mleka, izolati proteina mleka, transglutaminaza, tekstura, senzorna analiza, jogurt, sir

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnologija animalnih proizvoda

UDK broj: 636.39:637.146.3(043.3)

INFLUENCE OF SELECTED FACTORS ON THE ACID AND RENNET COAGULATION OF GOAT'S MILK AND THE QUALITY OF YOGHURTS AND CHEESES

Abstract

Goat's milk is a nutritionally high-value food whose production in the world has a growing trend. Its importance from the socio-economic point of view is especially great in some regions, where a significant amount of this milk is used for consumption or processed into a large number of varieties of cheeses, which often possess a geographical indication, and yogurt.

The aim of this dissertation was to study in more detail the effect of a number of selected factors on the rheological properties of acid and rennet coagulation of goat's milk, the characteristics of the obtained gel as well as the quality of produced yoghurts and cheeses. Milk from two breeds of goats, Saanen and Alpine, was used for the research and all three lactation periods (early, middle and late) were included.

Although the physicochemical composition of goat's milk is very similar to cow's milk, differences in the structure and properties of individual components of goat's milk, primarily proteins, are the cause of its different technological properties and are a significant factor affecting the inferior texture of yogurt or lower yield of final cheese. On the other hand, certain process parameters in the production of dairy products, such as heat treatment of milk or addition of calcium chloride, have a well-known effect on cow's milk, but their impact on goat's milk is often different, which raises the question of their adequate application. This field of research is still open and further research is needed in order to optimize the technological procedures of goat dairy production.

In order to investigate the influence of certain factors on the properties of goat's milk during acid and rennet coagulation, as well as the possibility of improving the quality of yogurt and cheese, a series of experiments was performed within this dissertation.

In the first part of the dissertation, the influence of milk protein isolate on the rheological properties of acid coagulation and the quality of goat's and cow's milk yogurt was examined, in order to determine the possibilities of using this supplement to improve the texture of goat's yogurt compared to cow's milk yogurt.

In the second part, the influence of the enzyme transglutaminase and two heat treatments of milk on the course of acid coagulation of goat milk and the texture of yogurt during the storage period was investigated. The effects of this enzyme, heat treatments and acidification under the action of starter culture on milk and yogurt proteins were determined electrophoretically. Also, the influence of this enzyme on the survival of starter culture during storage was examined and a sensory evaluation of these products was conducted.

The effects of three goat milk heat treatments (72 °C/30 s, 85 °C/5 min and 95 °C/5 min) were investigated in the next part of the experiment in terms of rheological properties of acid gel and texture of set type yogurt. On this occasion, the influence that these treatments have on the average size of casein micelles by the method of dynamic light scattering and the protein profile of treated milk was also examined.

The next segment of the dissertation included rheological investigations of the influence of a number of factors on the course of rennet coagulation of milk and the properties of rennet

gel. Within these experiments, the following factors were examined: 1) rennet concentration (0.054 g/l, 0.020 g/l, 0.015 g/l and 0.010 g/l); 2) milk pH (6.5, 6.3 and 6.1); 3) coagulation temperature (27, 31 and 35 °C); 4) lactation period (early, middle and late) and 5) heat treatments of milk and addition of calcium chloride (65 °C/30 min, 80 °C/5 min and 90 °C/5 min, without or with the addition of 200 mg/l CaCl₂).

In the last phase of the research, two varieties of goat cheeses in brine, white cheese in slices and cheese for grilling, were produced. In this part, the influence of the addition of a standard amount of CaCl₂ on the basic quality parameters and textural properties of cheeses, immediately after production and after a certain ripening period, were determined.

The results of this dissertation showed that the addition of milk protein isolates improved the rheological properties and texture of goat milk yogurt and brought it closer to the properties of cow's milk yogurt.

The addition of the enzyme transglutaminase improved the quality of goat's milk yogurt, which was confirmed by rheological examination of the properties of the acid gel and texture analysis after production and after the storage period, if the previous heat treatment was more intensive. This enzyme also exhibited a stabilizing effect on the number of surviving bacteria of yogurt starter culture during 15 days and influenced the additional crosslinking of proteins during storage, which was confirmed by SDS PAGE analysis. Heat treatment of goat milk at 85 °C/5 min was sufficient to achieve better characteristics of yogurt in terms of texture, when compared to a more moderate and intensive pasteurization regime. After treatment at 95 °C/5 min, a decrease in the average casein micelle size was found, based on the mean diameter values, despite a larger amount of whey protein denaturation, which indicates the possibility of structural changes in the micelle and dissociation.

Examination of rennet coagulation factors showed that the increase in rennet concentration had no effect on the strength of rennet gel, while the decrease in concentration significantly extended the coagulation time. An increase in the rate of aggregation with rennet concentration was also observed. Lowering the pH of milk led to a significant shortening of the coagulation time and an increase in the rate of aggregation. An increase in the coagulation temperature affected the shortening of the coagulation time and a linear increase in the aggregation rate. The longest coagulation time and the lowest firmness of rennet gel were determined during the middle of lactation, when goat's milk was characterized by the lowest protein content. Heat treatment of milk affected the prolonged coagulation time and the formation of rennet gel of lower strength. The addition of calcium chloride did not significantly affect the examined parameters of rennet coagulation. Goat cheese for grilling with the addition of calcium chloride was characterized by significantly higher values of hardness and rubberiness immediately after production, while after the ripening period, a drastic decrease in the value of these parameters was observed due to proteolysis.

Key words: goat milk, coagulation, rheological parameters, heat treatments, milk protein isolates, transglutaminase, texture, sensory analysis, yoghurt, cheese

Scientific field: Technological engineering

Specific scientific field: Technology of animal source food technology

UDK number: 636.39:637.146.3(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka sa osvrtom na razlike u odnosu na kravlje mleko.....	3
2.1.1. Polimorfizam proteina kozjeg mleka kao uzrok specifičnih tehnoloških svojstava.....	5
2.1.2. Značaj rase koza u varijabilnosti sastava i količine kozjeg mleka	6
2.2. Uticaj termičkog tretmana na svojstva kozjeg mleka	7
2.2.1. Uticaj termičkog tretmana na proteine kozjeg mleka	7
2.2.2. Veličina kazeinskih micela kozjeg mleka.....	9
2.2.3. Uticaj termičkog tretmana na koloidnu stabilnost mleka	11
2.3. Kisela koagulacija i proizvodnja jogurta od kozjeg mleka.....	12
2.3.1. Uticaj termičkog tretmana kozjeg mleka na kiselu koagulaciju i svojstva kiselog gela.....	14
2.3.2. Mogućnosti poboljšanja reoloških i teksturalnih svojstava jogurta od kozjeg mleka.....	16
2.3.2.1. Uticaj izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta	16
2.3.2.2. Uticaj transglutaminaze na reološka i teksturalna svojstva jogurta	17
2.4. Sirišna koagulacija kozjeg mleka.....	20
2.4.1 Faktori koji utiču na sirišnu koagulaciju mleka	21
2.4.2. Specifičnosti proizvodnje i svojstava sireva od kozjeg mleka	23
2.4.3. Značaj kalcijum-hlorida u proizvodnji sira	25
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	27
4. MATERIJAL I METODE.....	28
4.1. Ispitivanje uticaja odabranih faktora na tok kisele koagulacije i svojstva jogurta.....	28
4.1.1. Materijal	28
4.1.2. Ispitivanje uticaja izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka.....	28
4.1.3. Ispitivanje uticaja termičkih tretmana kozjeg mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta	28
4.1.4. Ispitivanje uticaja transglutaminaze na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka	29
4.1.5. Kisela koagulacija i proizvodnja jogurta	29
4.1.6. Analitičke metode ispitivanja	29
4.1.6.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka	29
4.1.6.2. Reološka ispitivanja toka kisele koagulacije i svojstava kiselog gela	29
4.1.6.3. Merenje veličine kazeinskih micela.....	30
4.1.6.4. SDS PAGE.....	31

4.1.6.5. Određivanje sposobnosti vezivanja vode i spontanog sinerezisa	31
4.1.6.6. Analiza teksture jogurta	32
4.1.6.7. Mikrobiološke analize jogurta	33
4.1.6.8. Senzorno ocenjivanje jogurta.....	33
4.1.6.9. Statistička obrada podataka	33
4.2. Ispitivanje uticaja odabranih faktora na parametre sirišne koagulacije	
kozjeg mleka	33
4.2.1. Materijal	34
4.2.2. Ispitivanje uticaja pH vrednosti na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	34
4.2.3. Ispitivanje uticaja koncentracije sirila na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	34
4.2.4. Ispitivanje uticaja temperature koagulacije na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	34
4.2.5. Ispitivanje uticaja kalcijum-hlorida na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	34
4.2.6. Ispitivanje uticaja perioda laktacije na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	35
4.2.7. Analitičke metode ispitivanja	35
4.2.7.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka	35
4.2.7.2. Reološka ispitivanja toka sirišne koagulacije i svojstava gelova	35
4.2.7.3. Statistička analiza.....	36
4.3. Ispitivanje uticaja kalcijum-hlorida na svojstva sireva od kozjeg mleka	36
4.3.1. Proizvodnja sireva	36
4.3.1.1. Proizvodnja sireva u salamuri	36
4.3.1.2. Proizvodnja sireva za grilovanje.....	37
4.3.2. Analitičke metode ispitivanja	39
4.3.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvaliteta sireva	39
4.3.2.2. Analiza teksturalnih svojstava sireva od kozjeg mleka	39
5. REZULTATI I DISKUSIJA	40
5.1. Uticaj izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka.....	40
5.1.1. Fizičko-hemijska svojstva sirovog mleka	40
5.1.2. Uticaj izolata proteina mleka na kiselu koagulaciju.....	40
5.1.3. Uticaj izolata proteina mleka na teksturalna svojstva jogurta	42
5.2. Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka.....	43
5.2.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka.....	43
5.2.2. Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg i kravljeg mleka.....	43
5.2.3. Uticaj transglutaminaze, termičkih tretmana i skladištenja na teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka.....	50

5.2.4 Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na sinerezis i sposobnost vezivanja vode jogurta od kozjeg i kravljeg mleka	54
5.2.5. SDS PAGE	55
5.2.6 Uticaj termičkih tretmana, transglutaminaze i skladištenja na broj bakterija startera i pH jogurta od kozjeg mleka tokom skladištenja.....	57
5.2.7. Senzorna svojstva jogurta od kozjeg mleka.....	60
5.3. Uticaj termičkih tretmana kozjeg mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta.....	63
5.3.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka.....	63
5.3.2. Veličina kazeinskih micela kozjeg mleka.....	63
5.3.3. SDS PAGE	66
5.3.4. Uticaj termičkih tretmana na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg mleka.....	67
5.3.5. Uticaj termičkih tretmana na teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka.....	69
5.4. Uticaj odabranih faktora na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka	71
5.4.1. Uticaj koncentracije sirila na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	71
5.4.2. Uticaj pH na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	74
5.4.3. Uticaj temperature koagulacije na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	76
5.4.4. Uticaj perioda laktacije na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka.....	79
5.4.5. Uticaj termičkih tretmana i kalcijum-hlorida na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka	81
5.5. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva sireva od kozjeg mleka	84
5.5.1. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva kozjeg sira u salamuri	84
5.5.2. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva kozjeg sira za grilovanje.....	87
6. ZAKLJUČCI.....	90
7. LITERATURA.....	93
Biografija	107
Izjave.....	108

1. UVOD

Značaj kozjeg mleka kao namirnice se ogleda u njegovoj visokoj nutritivnoj vrednosti, boljoj probavljivosti, zatim u povoljnijem odnosu proteina surutke i kazeina u poređenju sa kravljim mlekom, a takođe je poznato da je biološka vrednost proteina surutke veća čak i od proteina jaja koji su dugo smatrani referentnim. Nutritivna vrednost kozijeg mleka ima svoje specifičnosti, koje se ogledaju u blagotvornom uticaju na razna medicinska stanja, kao što su pothranjenost, gastrointestinalni poremećaji i alergije na proteine kravljeg mleka (Marletta i sar., 2007).

Proizvodnja kozjeg mleka čini 2% ukupno proizvedene količine mleka u svetu. Međutim, u pojedinim regionima proizvodnja ovog mleka ima mnogo značajniju ulogu, pre svega sa socijalno-ekonomskog aspekta, za stanovništvo zemalja u razvoju na kontinentima Azije i Afrike, gde se većina proizvedenog mleka koristi odmah za konzumiranje (Božanić i sar., 2002; Skapetas i Bampidis, 2016), ali i u pojedinim zemljama Evrope. Interesantan je fenomen ubrzanog porasta proizvodnje kozjeg mleka u Okeaniji u periodu 2000.-2012. godine od čak 71,43% (Skapetas i Bampidis, 2016). U Evropi je proizvodnja kozjeg mleka značajno zastupljena u regionima Mediterana, pre svega u Francuskoj, Italiji, Španiji i Grčkoj, gde se koristi za izradu velikog broja različitih vrsta sireva i drugih proizvoda (Park, 2010). Vrednost kozjeg mleka u ishrani sve više se ističe na globalnom nivou, zbog njegovog blagotvornog uticaja na ljudsko zdravlje (Pal i sar., 2017). Usled navedenog, beleži se i povećanje njegove proizvodnje poslednje dve decenije (Božanić i sar., 2002; Haenlein, 2004).

Posebnu pažnju sektor proizvodnje i prerade kozjeg mleka dobija u Grčkoj, gde aktuelne tržišne prilike pospešuju proizvodnju pasterizovanog kozjeg mleka, Feta sira od mešanog mleka koji se odlikuje oznakom geografskog porekla PDO (eng. Protected Denomination of Origin- zaštita oznake porekla), kao i drugih sireva od čistog kozjeg mleka velikog lokalnog značaja. Zabeležen je i porast količine kozjeg mleka koja se prerađuje u industriji u Italiji na godišnjem nivou od oko 8,1% od 2002. do 2015. godine. U Španiji se preko 90% proizvedenog kozjeg mleka prerađuje u industriji u sireve, kojih sa oznakom PDO ova evropska zemlja ima sedam, sa značajnim izvozom (41%) u SAD. U Francuskoj se većina proizvedenog kozjeg mleka (78%) prerađuje u sir i jogurt u industrijskim uslovima. Međutim, veoma je značajna i zanatska izrada sireva na samoj farmi, koja obuhvata preradu 22% proizvedenog mleka. U ovoj zemlji se proizvodi 14 PDO kozjih sireva. U totalu, oko 18% proizvedenih kozjih sireva u Francuskoj se izvozi (Pulina i sar., 2018).

Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku za period od 2009. do 2019. godine (Republički zavod za statistiku, 2020), u Srbiji je registrovan rast ukupno proizvedene količine kozjeg mleka, sa 28 miliona litara u 2009. do 44 miliona litara u 2015. godini. Poslednjih godina proizvodnja kozjeg mleka se kreće u intervalu 31–33 miliona litara godišnje.

Daleko je manji broj naučnih studija koje se bave proučavanjem kozjeg mleka u odnosu na one čiji je predmet proučavanja kravlje pa čak i ovčije mleko, a potražnja za kozjim mlekom i proizvodima ima trend rasta (Pulina i sar., 2018). Kozje mleko se razlikuje od kravljeg na osnovu više fizičko hemijskih svojstava što objašnjava glavne razlike u tehnološkim svojstvima ove dve vrste mleka (Remeuf, 1992). Lošija sposobnost kozjeg mleka za sirišnu koagulaciju uglavnom se povezuje sa manjim sadržajem kazeina i sa specifičnim svojstvima kazeinskih micela kao što su njihova veličina, sastav i hidratisanost (Remeuf, 1992). Zbog većeg sadržaja proteina surutke veći je puferni kapacitet kozjeg mleka što uslovljava sporiji pad pH vrednosti tokom fermentacije (Božanić i sar., 2002). Takođe, važno je napomenuti da sastav kozjeg mleka

u velikoj meri varira u zavisnosti od rase, podneblja, ishrane, što dodatno usložnjava preradu ove vrste mleka.

Informacije koje se tiču sastava i fizičko hemijskih svojstava kozjeg mleka su od esencijalnog značaja kako za uspešnu preradu kozjeg mleka tako i za plasiranje ovih proizvoda na tržištu (Park i sar., 2007). Upravo zbog nedostatka naučnih informacija proizvodi od kozjeg mleka se uglavnom proizvode prema tehnološkim postupcima zastupljenim u preradi kravljeg mleka uprkos tome što im se tehnološka svojstva u izvesnoj meri razlikuju (Miloradovic i sar., 2015).

Kozje mleko se u najvećoj meri koristi za proizvodnju različitih vrsta sireva i fermentisanih mlečnih proizvoda.

Sirevi od kozjeg mleka svojim specifičnostima u pogledu ukusa, teksture i izgleda, doprinose diverzitetu sireva na svetskom tržištu. Pripadaju grupi veoma cenjenih delikatesa koji omogućavaju uspešnu ekonomsku valorizaciju proizvoda. Nedostatak u proizvodnji sireva od kozjeg mleka jeste postizanje znatno manjeg randmana primenom tehnoloških postupaka usvojenih za kravlje mleko. Usled toga, prerada kozjeg mleka zahteva modifikaciju parametara tehnoloških postupaka proizvodnje u cilju postizanja većeg randmana kao i prihvatljivih senzornih svojstava proizvoda.

Fermentisani proizvodi od kozjeg mleka imaju veliki potencijal da učestvuju sa većim udelom na tržištu mlečnih proizvoda zbog mogućnosti da ih konzumira šira populacija. Međutim, fermentisane proizvode od kozjeg mleka odlikuju često slabija teksturalna svojstva u poređenju sa analogima od kravljeg mleka. Usled toga, i proizvodnja fermentisanih proizvoda od kozjeg mleka zahteva modifikacije u cilju poboljšanja njihovih teksturalnih svojstava.

Koagulacija mleka predstavlja važnu fazu kako u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda, tako i u proizvodnji sireva, zbog svog fundamentalnog značaja u pogledu kvaliteta gotovih proizvoda. Mehanizmi nastajanja gelova kiselom i sirišnom koagulacijom su različiti, te stoga oni pokazuju veoma različita svojstva (Puđa, 2009). Destabilizacija sistema, posebno proteina, pri formiranju kiselokoagulisanog gela je uslovljena dejstvom bakterija mlečne kiseline koje fermentišu laktozu i stvaraju mlečnu kiselinu što doprinosi povećanju kiselosti i nerušavanju ravnoteže kazeinskih micela i potom formiranju kiselog gela. S druge strane sirišnokoagulisani gel nastaje delovanjem sirila i odvija se u dve faze koje obuhvataju destabilizaciju kazeinske micelle razgradnjom κ kazeina i agregiranjem stvarajući sirišnokoagulisani gel (Lucey, 2002; Puđa, 2009). Proces kisele i sirišne koagulacije mleka je opsežno izučavan (Lucey, 2002; van Vliet i sar., 2004), ali pojave pri geliranju i svojstva gela kozjeg mleka još nisu u potpunosti razjašnjene.

Reološke metode su vredan alat u ispitivanjima procesa koagulacije mleka. U istraživanjima se često koriste naizmenično sa analizom teksture gotovih proizvoda. Zapravo, reologija i tekstura instrumentalnim merenjima opisuju fizička svojstva prehrambenog proizvoda koja su značajna za senzornu percepciju hrane (Stokes i sar., 2013).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka sa osvrtom na razlike u odnosu na kravlje mleko

Hemijski sastav kozjeg i kravljeg mleka je vrlo sličan, a razlike između njih proizvod su drugačije strukture i odnosa njihovih komponenata. Specifičnost kozjeg mleka koja ima značajnu ulogu u drugačijim tehnološkim svojstvima u odnosu na kravlje mleko, jeste prvenstveno manji sadržaj α_s -kazeina. Pored toga što kozje mleko često sadrži manje α_s -kazeina, odlikuje se veoma često i većim sadržajem α_{s2} - nego α_{s1} -kazeina, a takođe su i udeli κ - i β -kazeina veći u kozjem nego u kravljem mleku (Park i sar., 2007; Remeuf i Lenoir, 1986).

Brojni faktori utiču na sastav i količinu proizvedenog kozjeg mleka, kao što su: ishrana, rasa, period laktacije, spoljašnja temperatura, itd. (Park, 2010), pa su često prisutna izražena variranja. Prosečan hemijski sastav kozjeg i kravljeg mleka prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Prosečne vrednosti i interval komponenti sastava kozjeg i kravljeg mleka (modifikovano prema Miočinović, 2020)

Parametar	Kozje mleko	Kravlje mleko
Suva materija (%)	13,2	12,7
	11,9-16,3	10,5-13,7
Proteini (%)	3,6	3,4
	2,5-5,1	2,9-5,0
Mlečna mast (%)	4,3	3,8
	2,5-7,8	2,5-6,0
Laktoza (%)	4,4	4,8
	3,9-6,3	3,6-5,5
Pepeo (%)	0,8	0,7
	0,7-1,1	0,6-0,9

Kazeinske micelle u kozjem mleku sadrže više kalcijuma, neorganskog fosfora, solvatisane su u manjem stepenu, odlikuju se i manjom termičkom stabilnošću, lakše gube β -kazein nego micelle u kravljem mleku i hidratisane su u manjem obimu (Jenness, 1980; Remeuf i Lenoir, 1986). Micelle kazeina u kozjem mleku imaju i veći prosečni dijametar u poređenju sa micelama kravljeg mleka (Montilla i sar., 1995; Silanikove i sar., 2010). Sa tim u vezi, utvrđeno je da je i čvrstina gela u inverznoj zavisnosti od prosečnog dijametra kazeinskih micela, što takođe, pored već pomenutog manjeg udela α_{s1} -kazeina, objašnjava pojavu manje čvrstine gela od kozjeg mleka u poređenju sa kravljim (Božanić i sar., 2002).

Tabela 2. Poređenje sastava proteina (%) kozjeg i kravljeg mleka (modifikovano prema Park i Haenlein, 2008)

Proteini	Kozje mleko	Kravlje mleko
Ukupni kazein	2,14-3,18	2,28-3,27
α_s-kazein	0,34-1,12	0,99-1,56
β-kazein	1,15-2,12	0,61-1,41
κ-kazein	0,42-0,59	0,27-0,61
Proteini surutke	0,37-0,70	0,88-1,04
β-laktoglobulin	0,18-0,28	0,23-0,49
α-laktalbumin	0,06-0,11	0,08-0,12
Serum albumin	0,01-0,11	0,02-0,04

Hlađenjem dolazi do delimičnog rastvaranja koloidnog kalcijum-fosfata i solubilizacije β -kazeina. Ove promene su odgovorne za izmenjena tehnološka svojstva mleka i manji randman u proizvodnji sira. β -kazein kozijeg mleka ima veću tendenciju da nakon hlađenja disosuje iz micele nego njegov analog u kravljem mleku (O'Connor i Fox, 1977).

Mlečna mast u kozjem mleku je dispergovana u vidu većeg broja manjih masnih globula nego što je to slučaj kod kravljeg mleka i smatra se „prirodno homogenizovanim“. Ovo svojstvo masti kozjeg mleka utiče i na njegova drugačija tehnološka svojstva: sporije izdvajanje masti na površini i duže potrebno vreme za obiranje mleka zbog odsustva pojave aglutinacije mlečne masti koja je inače prisutna u kravljem mleku (Božanić i sar., 2002). Ovakav oblik pojave i distribucije masti u mleku, formiranje mekšeg gruša, kao i veći udeo masnih kiselina kratkog i srednjeg lanca, doprinose zajedno boljoj svarljivosti kozjeg u odnosu na kravlje mleko (Park, 1994).

Kozje mleko karakteriše svojstven ukus, zbog prisustva većeg udela srednje-lančanih masnih kiselina: kapronske (C6:0), kaprilne (C8:0) i kaprinske (C10:0) (Silanikove i sar., 2010). Pojava neprihvatljivog mirisa i ukusa kozjeg mleka javlja se zbog nepravilnog postupanja sa mlekom pri čemu se narušava tanka membrana masnih kapi, oslobađaju masne kiseline jakog mirisa i podstiče enzimsku (lipazna) aktivnost. Sporo hlađenje, ponovno zagrevanje, nepažljiv transport, ne higijenski uslovi čuvanja životinja, neodgovarajuća ishrana, fiziološko stanje životinja, itd., neki su od najčešće spominjanih faktora koji dovode do pojave nepoželjnog ukusa ove vrste mleka (Park, 2010; Park i Haenlein, 2008).

Mlečna fermentacija utiče na ublažavanje karakterističnog „kozjeg“ ukusa pa su i sa tog aspekta, pored veće nutritivne vrednosti, fermentisani mlečni proizvodi od kozjeg mleka posebno interesantni za proizvodnju (Park i Haenlein, 2008). Drugačiji amino-kiselinski sastav

može biti razlog lošije senzorne ocene jogurta od kozjeg mleka u odnosu na kravljji, obzirom da sadrži manje treonina koji je prekursor nastanka acetaldehida, glavnog činioca arome jogurta (Božanić i sar., 2002). Međutim, dostupni podaci su kontradiktorni, te tako Haenlein (2004) navodi veći sadržaj treonina u kozjem mleku za 9% u odnosu na kravljje. Sa druge strane autori Rysstad i sar. (1990) smatraju da je relativno mala količina acetaldehida u jogurtu od kozjeg mleka zapravo posledica inhibicije treoninske aldolaze do koje dolazi zbog prisustva visokog sadržaja glicina u kozjem mleku.

2.1.1. Polimorfizam proteina kozjeg mleka kao uzrok specifičnih tehnoloških svojstava

Funkcionalna svojstva proteina mleka kao što su sposobnost vezivanja vode, geliranja, emulgovanja i stvaranja pene, direktno su povezana sa fizičko-hemijskim svojstvima proteina. Kazeini predstavljaju približno 80% ukupnih proteina mleka i jedini su koagulišući proteini u mleku. Randman i kvalitet sira zavisi prvenstveno od njihove količine i tipa. Postoje četiri vrste kazeina: α_{s1} , α_{s2} , β i κ (Moioli i sar., 1998).

Geni proteina, posebno kazeina, u kozijem mleku pokazuju neuobičajeni i veoma izraženi polimorfizam koji utiče na frekvenciju prisustva polimorfni alelnih varijanti proteina, a time na kvalitet i sastav mleka. Razlike u primarnoj strukturi kazeina mogu u velikoj meri izmeniti električni naboj, hidrofobna svojstva kao i veličinu i oblik molekula (Marletta i sar., 2007). Kao jedan od glavnih kazeina u kravljem mleku, α_{s1} -kazein predstavlja strukturnu komponentu kazeinskih micela i ima ključnu ulogu u procesima koagulacije mleka (Walstra i Jenness, 1984). Različite rase koza su detaljno ispitivane u pogledu polimorfizma proteina mleka koji se povezuje sa hemijskim sastavom, tehnološkim svojstvima (koagulacijom, veličinom micela i stepenom mineralizacije, randmanom u proizvodnji sira i senzornim svojstvima), biološkim i nutritivnim svojstvima (Ramunno i sar., 2007).

U zavisnosti od rase koza, kazeini pokazuju visoku kvantitativnu varijabilnost. Sintaza α_{s1} -kazeina može biti zastupljena u različitom stepenu, pa se i mleko odlikuje visokim (3,6 g/l), srednjim (1,6 g/l) ili niskim (0,6 g/l) sadržajem α_{s1} -kazeina, a takođe postoje rase kod kojih nije zabeležena sinteza ovog proteina. Takođe, ustanovljena je jaka pozitivna korelacija između sadržaja α_{s1} -kazeina i ukupnog sadržaja kazeina u mleku (Grosclaude i sar., 1987).

Genetski polimorfizam sreće se takođe i kod drugih proteina mleka, kao što su β -lg, κ -kazein i β -kazein i utiče na čvrstoću i viskoznost jogurta, sinerezis nakon enzimske koagulacije, termičku stabilnost, kao i pH vrednost mleka (Božanić i sar., 2002).

β -kazein koji je najzastupljenija kazeinska frakcija u kozijem mleku, dugo je smatran monomorfim, međutim identifikovano je nekoliko genetskih varijanti ovog proteina. Prema Chianese i sar. (1993), nulti alel (O) β -kazeina kod koza povezan je za veoma niskim sadržajem kazeina u mleku.

Utvrđeno je da α_{s2} -kazein ima sedam varijanti (genotipova proteina) koje se povezuju sa tri različita nivoa sinteze: normalnim sadržajem α_{s2} -kazeina (2,5 g/l), smanjenim i nultim sadržajem kod kog se količina ovog kazeina ne može detektovati (Gómez-Ruiz i sar., 2004).

Sa druge strane, κ -kazein koji je lociran na površini micela je jedini glikozilovani i hidrofilni kazein, rastvorljiv u širokom opsegu koncentracija jona kalcijuma i odlikuje ga manji nivo fosforilovanosti. Otkriveno je da ovaj kazein takođe utiče na tehnološka svojstva mleka, tako što se prisustvo određenih varijanti (alela) κ -kazeina povezuje sa većim sadržajem kazeina u mleku (Marletta i sar., 2007).

Prema navodima više autora (Martin i sar., 2002; Moatsou i sar., 2006; Moioli i sar., 1998), Ca-senzitivni kazeini (α_{s1} , α_{s2} i β), koji su locirani unutar micela, utiču na tehnološka svojstva mleka na način da prisustvo snažnih alela pozitivno utiču na proizvodnju sira i procent masti, dok slabiji i nulti aleli nepovoljno utiču na ove karakteristike.

2.1.2. Značaj rase koza u varijabilnosti sastava i količine kozjeg mleka

Rasa koza ima značajan uticaj na mlečnost grla i sastav mleka. Sanska rasa proizvodi veću količinu mleka u poređenju sa drugim rasama, ali sa nešto manjim sadržajem mlečne masti. Sa druge strane, nubijsku rasu odlikuje manji nivo mlečnosti, ali mleko ima veći udeo suve materije, podrazumevajući i veći nivo mlečne masti i veći udeo bezmasne suve materije (Park, 2010).

Tabela 3. Prosečan hemijski sastav kozjeg mleka različitih rasa (modifikovano prema Raynal-Ljutovac i sar., 2008)

Država	Rasa	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	Proteini (%)	Kazein (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)
Velika Britanija	Britanska	11,60	3,48	2,61	2,30	4,30	0,80
	Sanska						
Velika Britanija	Nubijska	-	4,94	3,60	-	4,51	-
Francuska	Alpska/ Sanska	-	3,60	3,20	-	-	-
Italija	Sardinijska	-	5,10	3,90	-	-	0,71
Grčka	Autohtona	14,80	5,63	3,77	3,05	4,76	0,73
Kipar	Damask	13,20	4,33	3,75	2,97	-	0,83
Španija	Mursijano-Granadina	-	-	4,09	3,21	-	-

Što se tiče rasne strukture koza u Republici Srbiji, najzastupljenije su one dobijene ukrštanjem balkanske i sanske rase kao i drugi varijeteti nastali ukrštanjem, a od plemenitih upravo mlečne rase: alpska, sanska, balkanska i domaća bela koza (Žujović i sar., 2011).

Švajcarska je zemlja koja je predvodila u evoluciji i razvoju mlečnih rasa koza, alpske, sanske, togenburg i oberhasli. Alpska rasa, koja je značajna i za naše podneblje, daje mleko koje je u pogledu količine i sastava između sanske i nubijske rase (Haenlein, 2007).

Ustanovljeno je da između različitih mlečnih rasa koza, sadržaj masti u mleku varira u mnogo većem obimu nego sadržaj proteina. Kod alpske, sanske i anglo-nubijske rase u tropskom podneblju sadržaj mlečne masti i suve materije mleka je niži nego kod istih rasa gajenih u uslovima umerene klime, što se povezuje i sa neadekvatnom ishranom i sa višim temperaturama (autori citirani od strane Park, 2010).

Ispitivanjem mlečnosti balkanske koze, utvrđeno je da na sadržaj mlečne masti veoma značajan uticaj imaju mesto, odnosno farma i godina laktacije, kao i red laktacije. Kako su autori ove studije istakli, varijabilnost ispitivanih osobina je pod većim uticajem odgajivačkih ili zootehničkih uslova, a manje pod uticajem bioloških karakteristika. Kako bi se osiguralo pravilno ispoljavanje genetskog potencijala određene rase, neophodno je posebnu pažnju posvetiti uslovima ishrane, smeštaja i nege životinja (Bogdanović i sar., 2008).

2.2. Uticaj termičkog tretmana na svojstva kozjeg mleka

Termički tretman mleka predstavlja veoma važnu operaciju u proizvodnji mlečnih proizvoda. Za fermentisane proizvode kao što je jogurt, primenjuju se viši temperaturni režimi koji povoljno utiču na teksturu finalnog proizvoda, dok se u proizvodnji sireva koristi samo kratkotrajna ili niska pasterizacija, u cilju postizanja mikrobiološke bezbednosti i održivosti proizvoda. U slučaju kravljeg mleka, zabeleženo je da intenzivnija termička obrada nepovoljno utiče na sirišnu koagulaciju, pri čemu može doći i do izostanka formiranja gela (Miloradović, 2015; Puđa, 2009; Raynal-Ljutovac i sar., 2007; Raynal i Remeuf, 1998). Primena viših termičkih tretmana dovodi do produžavanja vremena sirišne koagulacije, što se može objasniti termički-indukovanom denaturacijom proteina surutke i njihovim vezivanjem sa κ -kazeinom, čime se ometa delovanje enzima sirila (odbijanjem ili sternim zaklanjanjem), i produžava trajanje enzimatske faze koagulacije. Međutim, utvrđeno je da primena termičkih režima u opsegu 65-85 °C tokom 5-35 min kod kozjeg mleka ima daleko manji uticaj na vreme koagulacije i brzinu očvršćavanja sirišnog gela u poređenju sa kravljim mlekom (Park i sar., 2007; Raynal i Remeuf, 1998).

Usled izloženosti visokim temperaturama tokom termičke obrade, u mleku se odvijaju mnogobrojne promene: nastanak kiselina iz laktoze i promene u balansu kalcijuma, defosforilacija i hidroliza kazeina, denaturacija proteina surutke i njihova interakcija sa kazeinskim micelama, kao i Majardovo tamnjenje (Fox, 1981).

Iako su termički izazvane reakcije u kravljem i kozjem mleku u osnovi slične, efekti se razlikuju usled drugačije micelarne strukture, udela soli u koloidnoj i vodenoj fazi, kao i interakcija proteina između ove dve vreste mleka (Raynal-Ljutovac i sar., 2007).

2.2.1. Uticaj termičkog tretmana na proteine kozjeg mleka

Delovanjem visokih temperatura prilikom termičkog tretmana mleka, dolazi do denaturacije proteina surutke koji se vežu za površinu kazeinskih micela, a takođe i do razvijanja tercijarne strukture kazeinske micelle. Dokazano je da za konstantno trajanje termičkog tretmana (10, 15 ili 30 min), povišenje temperature termičke obrade obezmašćenog kravljeg mleka u opsegu 70-95 °C dovodi do povećanja stepena denaturacije proteina surutke (Dannenberga i Kessler, 1988a, 1988b). Tom prilikom se formiraju kompleksi u serum fazi (nastaju rastvorljivi agregati i asocijati proteina surutke, takođe i agregati kazeina i proteina surutke) kao i kompleksi vezani za površinu micela (koagregati proteina surutke i kazeina), rastu vrednosti pH geliranja i elastičnost kiselih gelova (Lucey i sar., 1997a; Vasbinder i sar., 2003).

Ispitivanjem kinetike denaturacije proteina surutke kozjeg i kravljeg mleka, utvrđeno je da se brzina denaturacije sa porastom temperature uvećava, ali na različit način u zavisnosti od vrste mleka. Zagrevanjem na 85 °C, maksimum denaturacije postignut je za kraće vreme kod kozjeg nego kod kravljeg mleka. Poznato je da je β -lg osetljiviji prema delovanju visokih temperatura u poređenju sa α -la, pri čemu je odnos β -lg/ α -la 3,7 kod kravljeg i 2,5 kod kozjeg mleka. Međutim, iako je odnos ova dva proteina veći kod kravljeg mleka, indikovana brža

denaturacija proteina kod kozjeg mleka, posledica je veće termičke osetljivosti njegovih pojedinačnih proteina surutke u poređenju sa kravljim (Raynal i Remeuf, 1998).

Prilikom termičke denaturacije proteina surutke na temperaturama preko 70 °C dolazi do promene njihove prirodne konformacije, koja je praćena ekspozicijom reaktivnih bočnih grupa amino kiselina, inače smeštenih u unutrašnjosti native globularne forme. Pri tome je naročito važan porast reaktivnosti slobodnih tiolnih grupa β -laktoglobulina koje mogu da učestvuju u tiol-disulfidnoj izmeni sa drugim denaturisanim proteinima surutke kao i sa κ -kazeinom na površini micela (Anema i Li, 2003). Neki autori smatraju da jonske i hidrofobne interakcije takođe imaju značajnu ulogu u agregiranju denaturisanih proteina surutke sa kazeinskim micelama, posebno u početnoj fazi reakcije (Mulvihill i Donovan, 1987).

Stepen i brzina interakcija proteina surutke sa kazeinskim micelama veoma zavise od metoda termičkog tretmana. Primena sistema indirektnog zagrevanja dovodi do većeg nivoa asociiranja proteina surutke sa kazeinskim micelama u odnosu na sistem direktnog ubrizgavanja pare (Anema i Li, 2003). Autori Corredig i Dalgleish, (1996) predložili su model po kome α -laktalbumin formira agregate sa β -laktoglobulinom inicijalno u serum fazi, a zatim produžetkom zagrevanja, ovi kompleksi asociiraju sa kazeinskim micelama.

Uticaj visokog termičkog tretmana na komponente mleka, posebno na proteine, prilično se razlikuje kod kozjeg i kravljeg mleka. Navodi se da je priroda proteinskih kompleksa koji se formiraju pod uticajem termičke obrade različita kod ove dve vrste mleka (Miloradovic i sar., 2015; Pesic i sar., 2012), kao i da količina formiranih kompleksa, kao i njihov sastav i raspodela između micelarne i serumske faze u mleku, zavise od više faktora kao što su: pH, temperatura, vreme termičkog tretmana i sastav mleka (autori citirani od Pesic i sar., 2012).

Ispitivanjem distribucije kompleksa proteina surutke/ κ -kazeina nakon termičkog tretmana od 90 °C/10 min, pri prirodnoj pH u kravljem i kozjem mleku, Pesic i sar. (2012) su utvrdili da je > 95% denaturisanih proteina surutke kozjeg mleka vezano u komplekse sa micelama, dok rastvorljivi kompleksi (u serum fazi) nisu detektovani. Nasuprot tome, u kravljem mleku je oko 30% denaturisanih proteina surutke vezano u rastvorljivim kompleksima. Takođe, istakli su da je udeo κ -kazeina uključen u komplekse nakon termičkog tretmana oko tri puta veći u kozjem nego u kravljem mleku. Specifičnost je i da su u kozjem mleku pored κ -kazeina, identifikovani i β - i α_{s2} -kazein kao konstituenti micelarnih kompleksa sa proteinima surutke, a što nije slučaj kod kravljeg mleka.

2.2.2. Veličina kazeinskih micela kozjeg mleka

Veličina kao i distribucija veličina čestica disperznih sistema, utiču na važne odlike poput koloidne stabilnosti, reaktivnosti, prozirnosti, gustine pakovanja, teksture i reoloških svojstava. Metoda dinamičkog rasipanja svetlosti (engl. dynamic light scattering - DLS) se kao brza i neinvazivna tehnika često koristi upravo za određivanje veličine i distribucije čestica u raznim koloidnim sistemima, uključujući i kazeinske micelle koje veoma dobro rasipaju svetlost (Beliciu i Moraru, 2009).

Princip DLS metode se zasniva na postojanju zavisnosti fluktuacija intenziteta rasute svetlosti tokom vremena i veličine dispergovanih čestica (Tscharnuter, 2000). Najvažniji rezultati koji se dobijaju iz DLS merenja (analizom korelacionih funkcija pomoću namenskog softvera za ovaj uređaj) su sledeći:

- Z-srednje (eng. z-average), koji predstavlja najčešće korišćeni DLS parametar za kvantifikaciju veličine čestica sa monomodalnom i monodisperznom raspodelom, i izračunava se na osnovu eksperimentalno dobijenog difuzionog koeficijenta D , primenom Stoks-Anštajnovе jednačine:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta(T)d_h}$$

gde je k_B Bolcmanova konstanta ($1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T je apsolutna temperatura (K), $\eta(T)$ je viskozitet (Pa s) (viskozitet zavisi od temperature tako da je neophodno održavati konstantnu temperaturu prilikom merenja); d_h je hidrodinamički dijametar čestice (z-srednje) (Tscharnuter, 2000);

- Indeks PI (engl. polydispersity index), koji predstavlja indeks polidisperzije sistema i ukazuje na širinu distribucije;
- Raspodele veličina čestica (na osnovu intenziteta rasejanja, broja ili zapremine čestica);
- Fizičke veličine koje karakterišu raspodele: srednja vrednost (engl. mean) i moda (engl. mode- najčešća vrednost), se odnose na veličinu čestica u uzorku.

Koloidni rastvori koji se analiziraju DLS metodom predstavljaju izazov, obzirom da se merenja moraju obavljati u bistrim rastvorima zbog mogućnosti pojave grešaka kao rezultat sekundarnog rasipanja svetlosti. Ovo se može izbeći visokim stepenom razblaženja rastvora (10 do 1 μg mleka u 1 ml rastvora). Na izmerene vrednosti dijametra kazeinske micelle značajno utiče i vrsta rastvarača zbog mogućnosti pojave disocijacije kompleksnih čestica, kao i temperatura. Uočeno je da se pri višim temperaturama rastvora dobijaju manje vrednosti dijametra usled intenziviranja hidrofobnih interakcija, dok su optimalne temperature za merenje veličine kazeinskih micela oko 20 °C (Beliciu i Moraru, 2009).

Veličina micela varira i u uslovima različitog režima ishrane životinja i između pojedinačnih grla, ali i sezonski, pri čemu su manje kazeinske micelle prisutne u letnjem mleku u poređenju sa zimskim (Glantz i sar., 2010).

Utvrđeno je da termički tretman mleka uzrokuje povećanje dijametra micela zbog agregiranja κ -kazeina i proteina surutke u kravljem mleku (Anema i Klostermeyer, 1997; Raynal i Remeuf, 1998). Termički tretman kravljeg mleka do 90 °C/10 min ima mali uticaj na veličinu kazeinskih micela, ukoliko se izuzmu termički indukovane interakcije sa proteinima

surutke. Međutim, kada se posmatraju micela kozjeg mleka, njihov dijametar se povećava već na 85 °C i nakon 10 min dostiže vrednost od oko 1,25 puta veću u poređenju sa prirodnom (Raynal i Remeuf, 1998). Anema (2008) ističe značaj i drugih termički izazvanih promena u mleku pored stepena denaturacije proteina surutke, poput strukturalnih promena unutar micela delovanjem temperatura ispod 100 °C.

Tabela 4. Poređenje svojstava micela kozjeg i kravljeg mleka (modifikovano prema Park i sar., 2007).

Parametar	Kozje mleko	Kravlje mleko
Kazeini koji se ne izdvajaju centrifugiranjem (% od ukupnog kazeina)	8,7	5,7
Prosečni dijametar (nm)	260	180
Hidratisanost micela (g/g MS)	1,77	1,9
Mineralizacija micela (g/ca/100 g kazeina)	3,6	2,9

Na veličinu micela kazeina u kozjem mleku utiče količina pojedinih kazeina, pri čemu je utvrđeno da su sadržaji α_{s1} - i κ -kazeina u negativnoj korelaciji sa prosečnom veličinom micela (Pierre i sar., 1998). Prema drugim autorima, na prosečni dijametar ovih čestica u kravljem mleku značajno utiče režim ishrane životinja, genotip α_{s1} - i κ -kazeina, pH mleka, kao i sadržaj kazeina, proteina surutke i kazeinski broj. Termički izazvane promene u veličini micela značajno zavise od aktivnosti jona kalcijuma koja doprinosi sa oko 40% u ukupnom variranju (Devold i sar., 2000).

Sa tehnološkog aspekta, značaj veličine kazeinskih micela je determinišući za gustinu pakovanja u proteinske lance, a time i za čvrstinu gela, koja je u negativnoj korelaciji sa prosečnim dijametrom micela. Manje micela se odlikuju većom specifičnom površinom čime omogućuju veći broj mesta za interakcije i kompaktnije uklapanje proteina. Kako je ustanovljeno da je pH vrednost mleka u pozitivnoj korelaciji sa prosečnim dijametrom, indikivano je da se primenom genetskog selekcionisanja može optimizovati proizvodnja mleka koje će se upravo odlikovati manjim micelama i nižom pH, a što će poboljšati gelirajuća svojstva mleka koja su od velikog značaja u proizvodnji sira i jogurta (Glantz i sar., 2010).

2.2.3. Uticaj termičkog tretmana na koloidnu stabilnost mleka

Precipitacija proteina izazvana termičkim tretmanom nekoliko puta je veća u kozjem mleku nego u kravljem, kada se primene isti uslovi, što ukazuje na manju koloidnu stabilnost kozjeg mleka (Miloradovic i sar., 2015; Park, 2010; Pesic i sar., 2012; Raynal i Remeuf, 1998). Kako se smatra, relativno velike kazeinske micle i veći udeo jonskog kalcijuma utiču na smanjenu koloidnu stabilnost kozjeg mleka, zbog čega je ono veoma osetljivo na dejstvo visokih temperatura (Anema i Stanley, 1998; Raynal-Ljutovac i sar., 2007; Raynal i Remeuf, 1998). Sadržaji kazeina i proteina surutke imaju značajan uticaj takođe, pa je kozje mleko koje se odlikuje većim udelom kazeina naspram proteina surutke stabilnije prema dejstvu visokih temperatura (Raynal-Ljutovac i sar., 2007).

Tabela 5. Zavisnost temperature termičke koagulacije rekonstituisanog kozjeg mleka od odnosa micelnog kazeina i proteina surutke

Odnos kazein/proteini surutke	4.8	6.0	6.4	6.7	10.5*
Termička stabilnost (°C)	135	136,5	138	140	146

Temperatura stabilnosti definisana je kao maksimalna temperatura pri kojoj je uzorak bio stabilan nakon 1 min tretmana; *Razblaženje retentata vodom (modifikovano prema Bouhallab i sar., 2002).

Utvrđeno je da termička stabilnost kozjeg mleka ispoljava kompleksnu zavisnost od pH vrednosti, i značajno je drugačija u odnosu na kravlje mleko. Ispitivanjem efekata zagrevanja mleka na 140 °C, zabeleženo je da kozje mleko pokazuje maksimum termičke stabilnosti pri pH 6,9 dok je ona smanjena pri nižim i višim vrednostima kiselosti sredine (Anema i Stanley, 1998). Smatra se da je ovakvo pH-zavisno ponašanje posledica asocijacije denaturisanih proteina surutke sa kazeinima, kao i disocijacije kazeina (prvenstveno κ -kazeina) iz micela usled zagrevanja. Pri pH nižoj od 6,7 dolazi do agregiranja termički denaturisanih proteina surutke sa kazeinskim micelama putem disulfidnih mostova koje formiraju sa κ -kazeinom. Pri višoj pH raste obim disocijacije kazeina iz micle, pri čemu prednjače kompleksi κ -kazeina i proteina surutke, uzrokujući na taj način redukciju električnog naboja na površini micela, i kao rezultat dolazi do smanjenja termičke stabilnosti mleka (Anema i Stanley, 1998; Morgan i sar., 2001).

2.3. Kisela koagulacija i proizvodnja jogurta od kozjeg mleka

Kisela koagulacija mleka je centralna faza u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda u koje spada i jogurt. Acidifikacija direktno utiče na stabilnost kazeinskih micela tako što im se smanjuje ukupno naelektrisanje, rastvara se deo CCP-a i modifikuje postojeće unutrašnje veze između proteina. Čvrstina kiselog gela mleka raste sa vremenom usled formiranja veza između kazeinskih čestica u proteinskoj mreži kiselog gela. Kod gelova proizvedenih od termički tretiranog mleka uočava se porast tangensa faznog ugla ubrzo nakon geliranja. Ovaj fenomen se povezuje sa gubitkom koloidnog kalcijum fosfata iz kazeinskih micela koje učestvuju u izgradnji matriksa gela i „labavljenjem“ njihove unutrašnje strukture. Teksturalna i fizička svojstva kiselokoaguliranih gelova zavise od niza uslova tokom geliranja kao što su: brzina acidifikacije, temperatura, obim denaturacije proteina surutke, sadržaj proteina i prisustvo stabilizatora (Lucey, 2016).

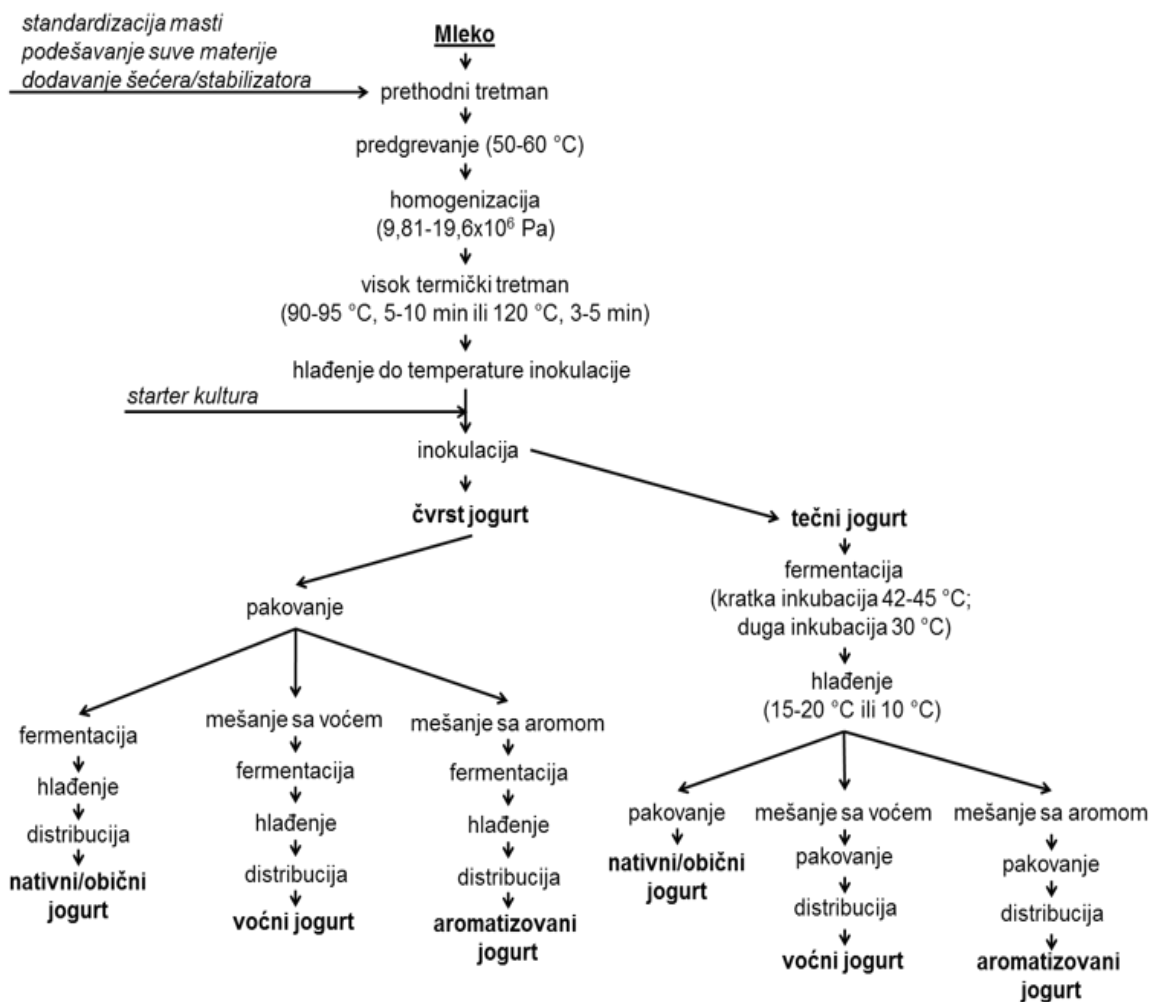
U mleku su kazeinske micelle stabilizovane negativnim naelektrisanjem, sternim odbijanjem i hidratacionim slojem. Tokom acidifikacije dolazi do agregiranja kazeinskih čestica usled neutralizacije naelektrisanja, pri čemu se formiraju proteinski lanci i klasteri koji čine mrežu ili proteinski matriks. Uporedo sa snižavanjem pH odvija se i demineralizacija micela, te one gotovo da više ne sadrže CCP pri pH 4,8. U proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda do formiranja gela dolazi usled dejstva bakterija mlečne kiseline koje fermentišu laktozu pri čemu se stvara mlečna kiselina (Lucey i Singh, 1997).

Dodatkom starter kultura, pH se inicijalno veoma malo menja, a brzina promene kiselosti sredine zavisi od pufernog kapaciteta mleka. Kozje mleko se odlikuje većim pufernim kapacitetom u poređenju sa kravljim, zbog visokog sadržaja neproteinskog azota i fosfata, usled čega i proces fermentacije kozjeg mleka uglavnom traje duže (Park i sar., 2006). U skladu sa tim, Nguyen i sar. (2018) su zabeležili duže vreme fermentacije i vreme geliranja, kao i niži modul elastičnosti kod kozjeg jogurta u poređenju sa kravljim. Kozji jogurt ima mekši gel i manje čestice, što se dovodi u vezu sa poroznijom mikrostrukturom.

Jogurt koji se konzumira u svetu uglavnom se proizvodi sa kulturama bakterija koje imaju optimum rasta u opsegu 37-45 °C, gde se pre svega misli na vrste *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* (jogurtna starter kultura). Univerzalni način proizvodnje jogurta je zasnovan na tradicionalnom procesu, pri čemu se mogu uočiti razlike u pojedinim fazama između proizvodnje čvrstog (eng. set style) i tečnog tipa jogurta od koraka fermentacije (Šema 1).

Na teksturu kiselog gela, čvrstinu i stabilnost, u velikoj meri utiče način obrade i pripreme mleka, kao i uslovi koji se primenjuju u postupku proizvodnje jogurta kao što su (Robinson i sar., 2006):

- fortifikacija mleka i dodaci koji se primenjuju;
- tip stabilizatora i količina;
- sadržaj mlečne masti i uslovi homogenizacije mleka;
- termički tretman mleka;
- starter kultura (tip, brzina acidifikacije, proizvodnja egzopolisaharida-EPS);
- temperatura inkubacije odnosno fermentacije (utiče na rast starter kulture, agregiranje i jačinu veza);
- pH u momentu razbijanja gela prilikom mešanja (tečni tip jogurta) odnosno pH u momentu početka hlađenja (za čvrsti tip);
- uslovi hlađenja;
- uslovi skladištenja.



Šema 1. Prikaz procesa proizvodnje jogurta i fermentisanih mlečnih proizvoda u tipu jogurta (Milanović i sar., 2017; Tamime i Robinson, 1999)

2.3.1. Uticaj termičkog tretmana kozjeg mleka na kiselu koagulaciju i svojstva kiselog gela

Termički izazvane pojave, poput denaturacije proteina surutke, formiranje koagregata na površini kazeinskih micela i shodno tome povećanje udela proteina (proteina surutke) koji učestvuju u procesu geliranja (Lucey i sar., 1997a), imaju pozitivan uticaj na teksturalna svojstva jogurta, zbog čega se visok termički tretman mleka (85 °C/30 min ili 90-95 °C/5 do 10 min) najčešće primenjuje u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda (Robinson i Tamime, 1993). Međutim, oštri termički tretmani (iznad 90 °C) uzrokuju i preuređenja kazeinskih komponenti u samoj strukturi micela putem niza reakcija agregiranja i disocijacije, što takođe dovodi do promena u procesu geliranja i posledično, do drugačijih teksturalnih svojstava kiselih gelova (Raynal i Remeuf, 1998).

Horne (2020) takođe navodi da termički tretman uzrokuje promene toka geliranja acidifikovanog mleka u zavisnosti od visine temperature i trajanja tretmana. Pomenuti autor je istakao da nivo denaturisanih serum proteina, koji zavisi od primenjenog termičkog tretmana mleka, direktno utiče na pH geliranja i maksimalnu vrednost modula elastičnosti koja je izmerena reološkim praćenjem toka formiranja kiselog gela mleka.

Mnogobrojna istraživanja reoloških svojstava kiselih gelova i fermentisanih mlečnih proizvoda obavljena su na kravljem mleku (Guggisberg i sar., 2009; Lee i Lucey, 2003; Lucey i sar., 1998a; Lucey i sar., 1997a; Lucey i sar., 1997b; Peng i sar., 2009), međutim, kada su u pitanju kozije mleko i proizvodi, objavljen je daleko manji broj radova na tu temu (Domagała i sar., 2007; Jumah i sar., 2001; Vargas i sar., 2008).

Većina reoloških svojstava kazeinskih gelova zavise od broja i jačine veza između kazeinskih čestica, njihove strukture i prostornog rasporeda proteinskih „lanaca“ izgrađenih od ovih čestica (Lucey i Singh, 1997; Roefs i sar., 1990).

Dinamički nedestruktivni testovi u kojima se primenjuje oscilujući napon ili deformacija, pružaju veoma korisne informacije o samom procesu formiranja gela. Osnovi parametri koji se najčešće određuju ovim testovima su modul elastičnosti (G'), koji je mera skladištene energije po ciklusu oscilacije, modul viskoznosti (G'') kao mera energije koja se rasipa u vidu toplote po ciklusu, i tangens faznog ugla ($\tan \delta$), koji predstavlja odnos viskoznih i elastičnih svojstava uzorka (Lopes da Silva i Rao, 1999). Pomenuti parametri su definisani kao:

$$G' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta$$

$$G'' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \sin \delta$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

gde je τ_0 amplituda napona smicanja, γ_0 predstavlja amplitudu deformacije a δ je fazni ugao.

Termički tretman mleka uzrokuje porast vrednosti dinamičkih modula kod kiselokoaguliranih gelova. Tretman mleka pri temperaturama ≥ 78 °C značajno utiče na povećanje G' kod kiselog gela mleka dobijenog acidifikacijom sa glukono- δ -laktonom (GDL)

kada se upoređi sa termički netretiranim mlekom. Smatra se da povećan obim umrežavanja aktivnim učesćem denaturisanih proteina surutke u gelovima od termički tretiranog mleka, može biti uzrok povećane krutosti takve strukture i većih vrednosti G' (Lucey i sar., 1998b; Lucey i sar., 1997a).

Više autora ističe i pojavu određenog reološkog fenomena ubrzo nakon formiranja kiselog gela od termički tretiranog mleka, gde $\tan \delta$ opada inicijalno, ali nakon toga raste do maksimalne vrednosti pre nego što dođe do ponovnog pada vrednosti. Visok $\tan \delta$ ukazuje na povećanu sklonost veza i proteinskih lanaca u gelu ka raskidanju ili relaksaciji, što doprinosi većem stepenu reorganizacije strukture gela (Lucey i sar., 1998b; Rönnegård i Dejmeck, 1993; van Vliet i sar., 1991). Sa tim u vezi, Lucey i sar. (1997a) su objavili da termički tretman mleka pre acidifikacije uzrokuje značajno smanjenje vrednosti deformacije pri naponu popuštanja strukture, sa oko 1,5 kod gelova od termički netretiranog mleka na 0,5-0,8 kod gelova od mleka tretiranog na temperaturama ≥ 80 °C, što govori u prilog pojavi krte strukture, povećane čvrstine ali smanjene elastičnosti.

Pretpostavlja se da postoje fundamentalne razlike u kinetici i dinamici procesa formiranja gelova od termički tretiranog i sirovog mleka, kao i da termički tretman mleka utiče na brzinu kojom se formiraju veze između proteina i na mehanizam nastajanja klastera proteina u matriksu gela (Horne, 1999).

2.3.2. *Mogućnosti poboljšanja reoloških i teksturalnih svojstava jogurta od kozjeg mleka*

Postizanje željene teksture fermentisanih mlečnih proizvoda od kozjeg mleka u praksi nailazi na niz otežavajućih okolnosti. Ograničavajući faktor je pre svega sastav same sirovine (manji sadržaj ili odsustvo α_{s1} -kazeina) i struktura glavnih komponenata ovog mleka (genetski polimorfizam kazeina, veličina i struktura micela). Sa tim u vezi, u literaturi se navodi da više faktora doprinosi manjoj čvrstini kiselog gela od kozijeg mleka: pH, sadržaj kalcijuma, stepen hidratisanosti, veličina kazeinskih micela, kao i sadržaj proteina i kazeina (Dimassi i sar., 2005; Martin-Diana i sar., 2003; Schorsch i sar., 2000).

Dodatno, sezonske varijacije sastava mleka bitno utiču na tehnološka svojstva (And i Guo, 2006; Park i sar., 2007). Tokom godine, sadržaji suve materije, masti, proteina i mineralnih materija se znatno menjaju. Razlog tome je povezanost faze laktacije koza sa određenim godišnjim dobom. Udeo glavnih komponenti mleka, prvenstveno masti i proteina, je tokom laktacije visok u kolostralnom mleku i početkom laktacije koja nastupa u proleće, značajno se smanjuje sredinom laktacije (kod mlečnih koza podudara se sa letnjim periodom, pri čemu klimatski uslovi takođe pogoduju proizvodnji mleka sa manjim sadržajem suve materije), zatim ponovo beleži inkliniranje maksimalnim vrednostima ka kraju laktacije (Antunac i sar., 2001).

Metode koje se uobičajeno primenjuju u komercijalnoj proizvodnji jogurta radi poboljšanja teksture, podrazumevaju povećanje sadržaja suve materije mleka i dodavanje stabilizatora (Lucey i Singh, 1997). Savremeniji pristup modifikovanju teksture fermentisanih mlečnih proizvoda odnosi se na primenu novih vrsta stabilizatora, različitih ingredijenata mlečnog porekla, upotrebu različitih tipova koncentrata, specifičnih kultura, enzimatsko umrežavanje proteina mleka pomoću npr. transglutaminaze, tretman visokim hidrostatičkim pritiskom kako bi se izazvala denaturacija proteina surutke i sprečio razvoj naknadne kiselosti, kao i homogenizaciju pod visokim pritiskom (Lucey, 2004).

2.3.2.1. *Uticaj izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta*

U cilju poboljšanja teksturalnih svojstava fermentisanih mlečnih proizvoda, mogu se koristiti različiti dodaci kao što su obrano mleko u prahu, koncentrat proteina surutke (Herrero i Requena, 2006; Martin-Diana i sar., 2003), polimerizovani proteini surutke (And i Guo, 2006), mikrobiološki enzim transglutaminaza (Ardelean i sar., 2012), itd. Izolat proteina mleka (IPM) koji se dobija ultrafiltracijom, dijafiltracijom i sprej-sušenjem mleka, a koji ima sadržaj proteina sličan obranom mleku i niži sadržaj laktoze, takođe se može koristiti u cilju poboljšanja strukture i teksture jogurta (Mistry i Hassan, 1992). IPM se često dodaje kravljem mleku, ali isto tako i kozjem, mada se kod nas uglavnom koristi obrano mleko u prahu zbog dostupnosti i cene koštanja.

Suplementacijom obranog mleka proteinima mleka u prahu do 5,6%, može se postići dobar kvalitet čvrstog tipa jogurta. Dodati proteini imaju ulogu u formiranju čvršće strukture proizvoda i smanjenju pojave sinerezisa, bez upotrebe stabilizatora. Sa povećanjem sadržaja proteina smanjuje se poroznost proteinske mreže jogurta, što je vidljivo razmatranjem mikrostrukture dobijene skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Mistry i Hassan, 1992).

Obzirom da osnovu strukture jogurta čini kazein, dodavanjem kazeinskih preparata se povećava njegova čvrstina, tako da se dodaci poput natrijum-kazeinata ili micelnog kazeina takođe koriste za poboljšanje teksture. Kazein je efikasan dodatak i zbog toga što reaguje sa β -laktoglobulinom nakon zagrevanja, što povećava koncentraciju gelirajućih proteina u matriksu jogurta i smanjuje sinerezis povećanjem stepena obuhvatanja seruma u međuprostorima

proteina surutke pričvršćenih za površinu kazeina (Keogh i O'Kennedy, 1998). Na teksturalna svojstva jogurta utiče prvenstveno odnos kazeina i proteina surutke, ali i drugi faktori, te na primer, razlike u reološkim svojstvima neki autori objašnjavaju i micelarnim stanjima kazeina u različitim preparatima mlečnih ingredijenata (Karam i sar., 2013; Modler i sar., 1983; Peng i sar., 2009).

Takođe, ustanovljeno je da je jogurt proizveden uz dodatak ingredijenata na bazi kazeina čvršći i odlikuje se manjim obimom sinerezisa u poređenju sa jogurtom proizvedenim uz povećanje sadržaja proteina do istog nivoa dodavanjem dodataka na bazi proteina surutke (Modler i sar., 1983). Pored toga, zapaženo je i da jogurti proizvedeni sa dodatkom obranog mleka u prahu ili uz dodatak IPM imaju niže vrednosti permeabilnosti gela u odnosu na proizvode koji su fortifikovani drugom vrstom mlečnih proteina (Peng i sar., 2009). Permeabilnost gela nam pruža informacije o nehomogenosti strukture formiranog gela i veličini pora njegove proteinske mreže (Lucey i Singh, 1997; Roefs i sar., 1990), tako da visoke vrednosti permeabilnosti ukazuju na prisustvo većih pora i grublji karakter gela. Vrednosti modula elastičnosti (G') na kraju fermentacije (pH 4,6) su značajno veće kod jogurta koji su obogaćeni dodatkom IPM u poređenju sa jogurtom sa obranim mlekom u prahu ili dodatim preparatom micelnog kazeina (Peng i sar., 2009).

Značajne razlike u reološkim svojstvima između jogurta fortifikovanih različitim vrstom dodataka mlečnih proteina, verovatno su posledica različitih interakcija između proteina mleka i izmenjenog mineralnog sastava raznih tipova mlečnih preparata u prahu (Peng i sar., 2009). Metoda kojom se vrši obogaćivanje suve materije mleka utiče na sastav jogurta, menja pufarni kapacitet, obim interakcija proteina, dužinu fermentacije kao i mikrostrukturu, a time utiče i na teksturalna i senzorna svojstva finalnog proizvoda.

2.3.2.2. Uticaj transglutaminaze na reološka i teksturalna svojstva jogurta

Pored konvencionalnih metoda koje se primenjuju za poboljšanje teksture jogurta, postoje i alternativne, kao što je već pomenuto enzimatsko tretiranje mleka enzimom mikrobiološke transglutaminaze (mTG), koji menja interakcije proteina i uvodi nove intra- i inter-molekulske veze (Ozer i sar., 2007). Više autora je zabeležilo da ovakav enzimatski tretman mleka doprinosi poboljšanju teksturalnih svojstava i smanjenju sinerezisa, što je presudno u prihvatljivosti jogurta. Ispitivanja uticaja mTG uglavnom su do sada vršena na kravljem mleku (García-Gómez i sar., 2018; Iličić i sar., 2013; Ozer i sar., 2007) dok su ovi efekti istraženi na kozijem mleku u daleko manjem obimu (Ardelean i sar., 2013; Domagała i sar., 2013).

Primena mTG u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda ima i povoljan ekonomski uticaj jer smanjuje neophodnu količinu skupljih mlečnih komponenata koje se uobičajeno primenjuju za fortifikaciju mleka. Objavljeno je da korišćenje 1 U/g mTG smanjuje troškove proizvodnje jogurta (García-Gómez i sar., 2018). Zbog svojih prednosti i mogućnosti isplative masovne proizvodnje primenom tradicionalne tehnologije fermentacije, mTG je široko rasprostranjena u raznim granama prehrambene industrije kao funkcionalni enzim (Jaros i sar., 2006a).

Proteinski matriks konvencionalno proizvedenog jogurta stabilizovan je samo nekovalentnim interakcijama: elektrostatičkim, vodoničnim i hidrofobnim, ali primena mTG dovodi do nastanka novih kovalentnih veza i modifikovanja strukture i svojstava kiselih gelova (Farnsworth i sar., 2006).

Transglutaminaza predstavlja enzim iz grupe protein-glutamin γ -glutamiltransferaza (klasa enzima [EC] 2.3.2.13), koji se prirodno nalazi u tkivima animalnog porekla, ribi, biljkama i mikroorganizmima. Ovaj enzim se za svrhe upotrebe u prehrambenoj industriji dobija izolovanjem iz *Streptovercillium* S-8112, jer bakterija vrši ekskreciju enzima u bujon i nije potrebna disrupcija ćelije, tako da je i prečišćavanje enzima olakšano. mTG je po strukturi monomerni enzim sačinjen od 331 amino kiseline, raspoređene u jednom polipeptidnom lancu, diskolike sekundarne strukture sa ostatkom cisteina unutar nje (Slika 1). Izoelektrična tačka (pI) mTG je pri 8,9, a optimalna pH se kreće u opsegu od 6,0 do 7,0 sa optimalnom temperaturom reakcije od 50 °C pri pH 6,0 (Jaros i sar., 2006a).

mTG katalizuje acil-transfer reakcije između karboksamidne grupe ostataka glutamina (acil donori) i različitih primarnih amina (acil akceptora), uključujući amino grupu ostataka lizina. mTG može da modifikuje proteine putem inkorporacije amina, umrežavanja i deaminacije (Jaros i sar., 2006a). Zbog velikog potencijala da unapredi razna funkcionalna svojstva proteina, mTG se uglavnom koristi da poboljša teksturu, stabilnost i sposobnost vezivanja vode različitih prehrambenih proizvoda (Dube i sar., 2007).



Slika 1. Prikaz trodimenzionalne strukture mikrobiološke transglutaminaze (Jaros i sar., 2006a)

Mera aktivnosti nekog enzima se izražava enzimskim jedinicama koje predstavljaju količinu enzima koja pretvara 1 mol substrata u jedinici vremena (1 mol/s). Aktivnost enzima se izražava prema SI sistemu u jedinici [1 *kat*] koja se definiše kao količina enzima koja pretvara 1 mol supstrata formirajući 1 mol proizvoda/s. Pored ove jedinice, u širokoj upotrebi su internacionalne jedinice (eng. international units) [*IU*] pri čemu je 1 *IU* definisana kao količina enzima koja pretvara 1 μ mol supstrata (formirajući 1 μ mol proizvoda)/min (Bisswanger, 2014). Aktivnost enzima se odnosi na njegovu jačinu i mnogo je značajnija od količine enzima koja se dodaje, jer različiti faktori mogu uticati na njegovo dejstvo te je preporučljivo ispitivanje aktivnosti i pre same primene ukoliko postoje uslovi, što se najčešće vrši spektrofotometrijski.

Umrežavanje proteina je prvenstveno uslovljeno strukturom molekula i dostupnošću rezidua (ostataka) glutamina i lizina, tako da na reakcije koje katalizuje mTG utiču različiti parametri kao što su toplota, pritisak i hemijski reagensi (Jaros i sar., 2006a). Generalno, termički tretman mleka pre umrežavanja je neophodan, jer je reaktivnost mTG u netretiranom mleku veoma niska, uprkos visokoj reaktivnosti kazeina (Iličić i sar., 2013).

Utvrđeno je da se jačina/čvrstina (engl. strength/firmness) čvrstog tipa jogurta proizvedenog od mleka tretiranog sa mTG povećava u odnosu na proizvode proizvedene bez enzima. Postoje dva sledeća načina primene mTG:

- dvostepeni metod podrazumeva inkubaciju enzima u mleku i naknadno termičko tretiranje mleka u cilju inaktivacije enzima pre fermentacije;
- drugi metod obuhvata primenu u jednom koraku, odnosno enzim se dodaje istovremeno sa starter kulturom, pri čemu se mTG postepeno inaktiviše usled pada pH tokom fermentacije.

I mada dvostepeni metod obezbeđuje konstantnost pH tokom delovanja mTG, istovremena primena enzima i starter kulture ima izraženiji pozitivni uticaj na teksturu finalnog proizvoda, u poređenju sa uzorcima kod kojih je enzim inaktivisan pre fermentacije (García-Gómez i sar., 2018; Lorenzen i sar., 2002; Neve i sar., 2001).

Sa druge strane, produženo vreme inkubacije (duže od 60 min), ili koncentracija enzima veća od 3 U/g proteina ima negativan uticaj na teksturu jogurta koji se ogleda u manjoj izmerenoj čvrstini. Ovo ukazuje na smanjen ukupni broj veza kao rezultat ograničenja u pravilnom reorganizovanju strukture tokom acidifikacije (Jaros i sar., 2006b).

2.4. Sirošna koagulacija kozjeg mleka

Proces sirošne koagulacije mleka se odvija kroz dve faze. Tokom prve ili enzimatske faze koja predstavlja tipičnu biohemijsku reakciju hidrolize peptidnih veza, obavi se proteoliza oko 90% κ -kazeina pod dejstvom koagulišućih enzima. Hidroliza κ -kazeina dovodi do destabilizacije kazeinskih entiteta, koji se u tako izmenjenom stanju nazivaju parakazeinske micela, i one postaju podložne precipitaciji pomoću kalcijuma. Agregiranje parakazeinskih micela se odvija u drugoj, neenzimatskoj, odnosno fizičko-hemijskoj fazi procesa uz aktivno učesće jona kalcijuma, pri čemu mleko prelazi iz tečnog u stanje gela (Puđa, 2009; Walstra i Jenness, 1984).

Osnove strukture proteinskog matriksa u proizvodnji sirošnokoagulišućih sireva, uspostavljaju se kroz proces sirošne koagulacije mleka i zbog toga je ispitivanje parametara koji definišu ovu fazu u formiranju sireva od velikog značaja.

Osnovni parametri kojima se opisuje proces sirošne koagulacije mleka su vreme koagulacije (engl. RCT- rennet coagulation time), brzina agregiranja (engl. AR- aggregation rate) i čvrstina gela/gruša (engl. CF- curd firmness).

Za vreme koagulacije se uzima momenat pojave prvih vidljivih agregata parakazeinskih micela, odnosno trenutak u kome dolazi do flokulacije. Brzina koagulacije je mera očvršćavanja gela od momenta početka koagulacije. Čvrstina gela/gruša predstavlja najvažnije svojstvo koagulacije jer utiče na kvalitet sira, randman i isplativost proizvodnje. Čvršći gruš omogućuje bolje zadržavanje komponenti mleka i na taj način povećava randman sira. Pored toga, postizanje kraćeg vremena koagulacije i veće brzine koagulacije skratilo bi vreme potrebno za izradu sira, tako da je optimizacija navedenih parametara od velike važnosti proizvođačima (Clark i Sherbon, 2000).

Kao indikator pravilnog toka procesa koagulacije pri uobičajenim parametrima proizvodnje sireva, uzima se vrednost faznog ugla (δ) koji treba da počne da opada u vremenu do 1000 s od momenta dodavanja sirila, čime koagulacija neće biti ni preuranjena niti razvučena. Mleko kao tečni sistem karakteriše visoka vrednost faznog ugla. Sa otpočinjanjem procesa agregiranja parakazeinskih micela vrednost faznog ugla naglo opada. Momenat početka opadanja vrednosti faznog ugla predstavlja momenat otpočinjanja sekundarne faze koagulacije. Opadanje prestaje u momentu kada se uspostavi trodimenzionalna struktura. Što je vreme između početnog i završnog momenta opadanja faznog ugla kraće, to je proces sekundarne faze koagulacije brži (Puđa, 2009).

Reološkim merenjima modula elastičnosti (G') i modula viskoznosti (G'') omogućeno je lakše određivanje vremena koagulacije, čvrstine gela u datom trenutku kao i brzine agregiranja (Sandra i sar., 2011). Tangens faznog ugla ($\tan \delta$) koji predstavlja odnos modula G''/G' , ukazuje na uslove potrebne za raskidanje veza između proteina kazeinskih agregata ili klastera, nakon čega se formiraju snažnije interakcije i dolazi do preuređenja strukture u proteinskom matriksu, rezultujući povećanjem čvrstine gela. Usled toga može doći do stvaranja unutrašnjeg pritiska i pomeranja obuhvaćenog seruma, što dovodi do pojave mikrosinerezisa. Ustanovljeno je da je reorganizacija proteinske strukture olakšana pri višoj temperaturi i nižoj pH gela (Mellema i sar., 2002).

Prelazak mleka iz tečnog u stanje gela tokom sirošne koagulacije, praćeno je padom pomenutog tangensa faznog ugla do određene vrednosti koja ostaje umnogome konstantna po uspostavljanju trodimenzionalne mreže matriksa. U momentu sećenja gela, $\tan \delta$ je postigao gotovo konstantnu vrednost, koja ukazuje da je gel formiran i dalje opada vrlo malo,

zadržavajući se u granicama postignutog „zaravnjenja“. Takođe, ustanovljena je jaka linearna zavisnost između vizuelno utvrđenog vremena sečenja gela i maksimuma prvog izvoda modula elastičnosti (max dG'/dt), što potvrđuje povezanost empirijskog znanja sirarskih majstora sa fundamentalnim reološkim svojstvima (López i sar., 1998).

2.4.1 Faktori koji utiču na sirišnu koagulaciju mleka

Momenat pravovremenog sečenja sirišnokoagulisanog gela u proizvodnji sira se određuje iskustveno, na osnovu subjektivne procene teksturalnih i vizuelnih svojstava gela. Treba istaći da pri tome, na postignuta reološka svojstva i randman sira snažno utiče sam proces koagulacije. Neki od najvažnijih faktora koji određuju tok sirišne koagulacije su: koncentracija sirila, temperatura koagulacije, pH mleka, sadržaj proteina, prethodni termički tretman mleka („istorija“ sirovine) i sadržaj jonskog kalcijuma Ca²⁺ (Gunasekaran i Ay, 1996; Nájera i sar., 2003).

Specifičnost u tehnološkom ponašanju kozjeg mleka utvrđena je najpre istraživanjima efekata različitog proteinskog sastava i sadržaja. Poznato je da povećanje ukupnog sadržaja proteina ili kazeina u kravljem mleku skraćuje vreme koagulacije, a brzina agregiranja i čvrstina gela se povećavaju (autori citirani od strane Clark i Sherbon, 2000). Međutim, ispitivanjem mleka Sanske i Alpske rase, ustanovljeno je da povećanje sadržaja proteina ili kazeina dovodi do ubrzanja koagulacije i dobijanja čvršćeg sirišnog gela, ali se vreme koagulacije produžava. Takođe je utvrđena korelacija između količine α_{s1} -kazeina u kozjem mleku i drugih komponenata kao i svojstava koagulacije. Tako je mleko sa visokim sadržajem α_{s1} -kazeina imalo i visok sadržaj suve materije, proteina, kazeina i fosfora, a nižu pH u odnosu na mleko sa niskim sadržajem ovog proteina. Pored toga, mleko sa većim nivoom α_{s1} -kazeina odlikovalo se i dužim vremenom koagulacije, ali i čvršćim sirišnim gelom (Ambrosoli i sar., 1988).

Koncentracija sirila. Sa povećanjem koncentracije koagulišućeg enzima vreme koagulacije se skraćuje, jer se time omogućava veći nivo proteolize κ -kazeina. Ustanovljena je linearna veza između koncentracije enzima i recipročne vrednosti vremena koagulacije, a takođe je i povećanje brzine očvršćavanja gela povezano sa većom koncentracijom enzima (López i sar., 1998; Nájera i sar., 2003).

Ranije utvrđena inverzna zavisnost vremena koagulacije od koncentracije sirila predefinisana je od strane Holter (1932) i Foltmann (1959) postavljanjem poznate jednačine:

$$RCT = \frac{k}{[E]} + A$$

gde su k i A konstante, a [E] je koncentracija enzima. Prema ovoj jednačini, dijagram zavisnosti vremena koagulacije i recipročne vrednosti koncentracije koagulant ili Holter-Foltmanov dijagram, daje pravu liniju sa pozitivnom vrednošću odsečka (A) (Horne i Lucey, 2017).

Temperatura koagulacije. Proces koagulacije mleka pokazuje visoku zavisnost od temperature (Gunasekaran i Ay, 1996). Poznato je da temperatura utiče i na enzimatsku i na neenzimatsku fazu agregiranja prilikom koagulacije mleka, pri čemu je utvrđeno da je taj uticaj daleko veći na sekundarnu fazu, odnosno na samu reakciju agregiranja (Castillo i sar., 2000).

Uobičajena temperatura koagulacije u proizvodnji sireva se kreće između 28 °C i 34 °C, u zavisnosti od vrste sira koji se proizvodi. Nešto niže temperature od optimalne za delovanje himozina (38-40 °C), primenjuju se kako bi se optimizirao rast starter kultura (najčešće su to

mezofilne bakterije), i kako bi se dobila željena tekstura gela. Sa tim u vezi, u proizvodnji mekih sireva se primenjuje duže vreme koagulacije pri nižoj temperaturi, dok se viša temperatura koagulacije koristi u proizvodnji tvrdih sireva, pri čemu je i vreme koagulacije kraće (Miočinović, 2020). Prema nekim autorima, brzina formiranja gela pokazuje linearni porast u opsegu od 20 °C do 40-42 °C, međutim na višim temperaturama proces se usporava. Smatra se da temperatura mleka utiče na agregiranje proteina u velikom stepenu i da povišenje temperature ubrzava očvršćavanje gela (povećava brzinu agregiranja) (autori citirani od strane Nájera i sar., 2003). Panthi i sar. (2019) su utvrdili da se sa snižavanjem temperature koagulacije dobija finija mreža proteina koja čini sirišni gel, a da viša temperatura koagulacije povećava čvrstinu gela i brzinu geliranja.

U proizvodnji sirišnokoaguliranih sireva se nakon postizanja potrebne gotovosti gela pristupa sečenju čime se indukuje sinerezis. U reološkim testovima, merenja se nastavljaju i nakon postignute gotovosti gela, te se sinerezis javlja kao spontani, pri čemu se registruje opadanje vrednosti modula elastičnosti. Sa tim u vezi, formiranje sirišnog gela na reometru pri višim temperaturama mleka, uzrokuje bržu koagulaciju i nastanak grublje strukture, ali i bržu reorganizaciju proteinskog matriksa pod dejstvom spontanog sinerezisa, te su finalne vrednosti G' kod ovakvih gelova niže u poređenju sa vrednostima koje se dobiju za duže vreme koagulacije pri nižim temperaturama (Puđa, 2009).

pH mleka. Uticaj pH mleka na vreme koagulacije je veoma izražen. Snižavanjem pH sa 7,0 na 5,2 skraćuje se RCT, pri čemu je optimalna pH za hidrolizu κ -kazeina u intervalu 5,1-5,3 (López i sar., 1998; Nájera i sar., 2003). Najvažniji efekti snižavanja pH mleka su rastvaranje micelnog kalcijum fosfata, smanjenje naelektrisanja kazeina kao i disocijacija kazeina iz micela (Dalglish i Law, 1989). Takođe je utvrđeno da snižavanje pH dovodi do ubrzavanja očvršćavanja gruš (Daviau i sar., 2000).

Promene pH vrednosti mleka utiču i na enzimatsku hidrolizu i na reakcije agregiranja u sekundarnoj fazi sirišne koagulacije, mada je efekat pH na primarnu fazu zanemarljiv u poređenju sa uticajem koji ima na agregiranje (Castillo i sar., 2000).

Sadržaj Ca^{2+} . Generalno, dodavanje jonskog kalcijuma skraćuje vreme koagulacije (Montilla i sar., 1995). Posebno je značajan dodatak $CaCl_2$ u proizvodnji sireva od termički tretiranog mleka kako bi se prenebegao termički indukovani efekat gubitka jonskog kalcijuma neophodnog za odvijanje sekundarne faze koagulacije.

Dodavanje $CaCl_2$ takođe snižava pH mleka, na taj način uzrokujući brže agregiranje proteina, a utvrđeno je i da jonski kalcijum dodat u nižim koncentracijama (do 10 mM) utiče na povećanje čvrstine gela, dok veće koncentracije imaju suprotan efekat. Deo dodatog Ca^{2+} se u jonskom obliku veže za kazein, direktno za negativno naelektrisane ostatke kazeina, a deo se transformiše i prelazi u koloidnu formu kao CCP (Lucey i Fox, 1993).

Treba istaći značaj obe pojavne forme kalcijuma za sekundarnu fazu koagulacije mleka. Snižavanje pH mleka koje se inače postiže aktivnošću dodatih starter kultura u proizvodnji sira, dovodi do demineralizacije kazeinskih micela, i prelaska dela CCP-a u jonski oblik. Sledi da u slučaju kraće koagulacije, pH vrednost opadne u manjem obimu, tako da su aktuelna koncentracija jona kalcijuma i nivo nativnog CCP-a na kraju koagulacije zavisni od dinamike koagulacije. Smanjenje sadržaja CCP-a uz zadržavanje početne koncentracije jonskog kalcijuma uzrokuje produženje koagulacije (Puđa, 2009).

Termički tretman mleka. Većina sireva se komercijalno proizvodi od pasterizovanog mleka, tako da ne čudi što je u literaturi fokus ispitivanja sirišne koagulacije uglavnom na uticaju koji ostvaruju termički tretmani mleka.

Pasterizacija kravljeg mleka, pored povoljnih uticaja na kvalitet sireva, uzrokuje i negativne efekte po proces sirišne koagulacije. Deo jonskog kalcijuma se usled termičkih tretmana prevodi u nerastvorljivu formu koja više nema učešća u sekundarnoj fazi koagulacije, te se pasterizovanom mleku namenjenom proizvodnji sira dodaje CaCl_2 (najčešće 200 mg/l) kako bi se u određenoj meri nadoknadio taj gubitak. Dodatno, termički tretman preko 75 °C dovodi do denaturacije proteina surutke pri čemu se formiraju koagregati. Tom prilikom lanci κ -kazeina bivaju uključeni u koagregate i postaju teško dostupni za delovanje sirila. Površina micela prekrivena surutkinim proteinima ima izmenjeni karakter i takve micelle ispoljavaju manji afinitet ka agregiranju. Koagulacija je usled pomenutih pojava veoma otežana, usporena a svojstva gela umnogome izmenjena (Puđa, 2009).

Ispitivanjem kozjeg mleka je sa druge strane ustanovljeno da termički tretman od 85 °C/30 min ne skraćuje značajno vreme koagulacije. Takođe, dejstvo temperatura viših od 70 °C/15 min koje kod kravljeg mleka uzrokuju nastanak dosta slabijeg gela, ne utiču u većoj meri na konzistenciju gela od kozjeg mleka. Koncentracija prisutnog CaCl_2 na RCT je značajnija kod kravljeg nego kod kozjeg mleka kada se posmatraju efekti delovanja tretmana do 80 °C/30 min. Pored toga, objavljeno je da denaturacija proteina surutke ne uzrokuje promene u vremenu koagulacije kozjeg mleka, što nije slučaj kod kravljeg mleka (Montilla i sar., 1995).

Period laktacije. Na sastav i količinu proizvedenog mleka takođe utiče stadijum laktacije koza koje se muzu. Ustanovljeno je da relativno visok nivo proizvodnje mleka kod koza nastupa nakon jarenja i dostiže maksimum nakon 3-4 nedelje od početka muže. Visok prinos mleka se može održati nekoliko nedelja, a nakon toga količina mleka postepeno opada prema kraju laktacije. Sadržaj masti i proteina u kozjem mleku se smanjuje posmatrano od početka laktacije do četvrtog ili petog meseca, zatim se zadržava na relativno niskom nivou određeno vreme čije je trajanje varijabilno, a onda se ponovo povećava na kraju laktacije. Takođe je utvrđena inverzna zavisnost između količine ovih komponenata u mleku i količine proizvedenog mleka (autori citirani od strane Park, 2010).

Značajno sezonsko variranje fizičko-hemijskog sastava mleka snažno utiče na tehnološka svojstva kozjeg mleka, obzirom da su za koagulaciju mleka izuzetno važni sadržaji masti i proteina (Antunac i sar., 2001; Casper i sar., 1998; Park i sar., 2007).

Istraživanjem uticaja klimatskih uslova i perioda laktacije na sezonsko variranje fizičko-hemijskog sastava mleka Sanske rase koza tokom četiri godine, utvrđeno je da sastav mleka varira u značajnoj meri u zavisnosti od laktacionog perioda i godine. Sadržaj mlečne masti, proteina, bezmasne suve materije i laktoze u kozjem mleku je značajno niži tokom srednje laktacije, dok su najviše vrednosti za ove parametre zabeležene tokom kasne laktacije. Pored toga, ustanovljena je i značajna negativna korelacija između temperature, vlažnosti vazduha, trajanja solarnog zračenja i količine pomenutih glavnih komponenata mleka (Kljajević i sar., 2018).

2.4.2. Specifičnosti proizvodnje i svojstava sireva od kozjeg mleka

Za razliku od kravljeg mleka proizvodnja kozjih sireva je sezonskog karaktera zbog čega su sirevi dostupni samo u određenom delu godine i često se smatraju ekskluzivnim sa većom cenom koštanja (Miočinović, 2020). Usled toga, često se iznalaze rešenja kako bi se nadomestio sezonski karakter proizvodnje kozjeg mleka, a samim tim i proizvoda od ove vrste mleka.

Ispitivanjem uticaja zamrzavanja kozjeg mleka u trajanju od 60 dana na svojstva koagulacije, utvrđeno je da svojstva mleka nisu značajno izmenjena i sugerisano je da se ovaj postupak može koristiti u cilju prevazilaženja sezonskog karaktera dostupnosti sirovine u proizvodnji kozjih sireva (Kljajevic i sar., 2016).

Kao što je ranije napomenuto, često mali sadržaj proteina, posebno α_{s1} -kazeina u kozjem mleku, doprinosi slabijim svojstvima odnosno manjoj čvrstini sirišnokoagulisanog gela od kozjeg mleka, a takođe i manjem randmanu proizvodnje usled većih gubitaka prilikom obrade gruša. Usled toga, nije iznenađujuće što sirevi od kozjeg mleka često pripadaju grupi mekih sireva koji se odlikuju manjim obimom mehaničke obrade gruša, ali se pronalaze i rešenja za poboljšanje randmana proizvodnje modifikacijama tehnološkog postupka proizvodnje.

Usled slabijih mehaničkih svojstava sirišnokoagulisanog gela od kozjeg mleka, tehnološki postupci proizvodnje kozjih sireva imaju određena ograničenja, a takođe je i diverzitet vrsta sireva koje se proizvode limitiran. Većina sireva koji se izrađuju od kozjeg mleka spadaju u sledeće grupe prema Medina i Nuñez (2004):

- Sveži ili beli sirevi bez zrenja, sa malim sadržajem suve materije, uobičajeno nižim od 25%;
- Meki sirevi, tradicionalno proizvedeni pretežno kiselom koagulacijom, malih dimenzija, cilindričnog ili piramidalnog oblika i uglavnom sa plesnima ili pepelom na površini;
- Polu-tvrđi ili tvrđi sirevi, proizvedeni koagulacijom mleka pomoću sirila, dimenzija većih u odnosu na meke sireve, cilindričnog oblika sa ravnom i suvom površinom.

Usled lošijih tehnoloških svojstava kozjeg mleka, često se u proizvodnji sireva dodaju i mleka drugih vrsta (kravlje, ovčije). Neki od najpoznatijih predstavnika sireva koji se izrađuju od mešavina mleka sa određenim udelom kozjeg su (Miočinović, 2020):

- ❖ Kaseri (*Kasseri*) iz grupe grčkih sireva parenog testa koji se proizvodi od ovčijeg i mešavine ovčijeg i kozjeg mleka (sa maksimalnim učešćem do 20% kozjeg);
- ❖ Kefalotiri (*Kafalotyri*) i kefalogravijera se svrstavaju u grupu grčkih tvrđih sireva, koji se proizvode od mešavine kozjeg i ovčijeg mleka;
- ❖ Feta (*Feta*), najpoznatiji grčki sir spada u grupu sireva u salamuri i odlikuje se oznakom geografskog porekla. Proizvodi se od ovčijeg ili mešavine ovčijeg i kozjeg mleka (sa učešćem do 30% kozjeg mleka);
- ❖ Halumi (*Halloumi*), kao najpoznatiji kiparski sir se odlikuje oznakom geografskog porekla. Koristi se kao sir za grilovanje. Specifičnost u postupku proizvodnje ovog sira je kuvanje kriški sira, dok se zrenje obavlja u salamuri. Proizvodi se od mešanog ovčijeg i kozjeg mleka (49% udela) i kravljeg mleka (sa 51% udela);
- ❖ Kabrales (Cabrales) se proizvodi u Španiji od mešavine kozjeg i ovčijeg mleka i nosi oznaku geografskog porekla (PDO).

Značajni predstavnici sireva koji se proizvode od čistog kozjeg mleka su španski sirevi koji imaju i oznaku geografskog porekla (PDO): Queso de Ibores, Palmero, Majorero, Queso de Murcia i Queso de Murcia al vino (Nicolau i Villellas, 2015). U Francuskoj se proizvodi 14 sireva od kozjeg mleka sa oznakom PDO, kao primer navedeni: Sainte Maure de Touraine, Rocamadour, Selles sur Cher i Chavignol (Pulina i sar., 2018).

Nekoliko metoda je predloženo za poboljšanje čvrstine sirišnog gela od kozjeg mleka i kako bi se izbegao prekomerni sinerezis. Ustanovljeno je da na primer dodatak koncentrata proteina surutke povećava čvrstinu sirišnokoagulisanog gela i smanjuje nivo sinerezisa. Neke druge metode u cilju poboljšanja svojstava sirišnog gela poput termičkog tretmana, visokog pritiska i primene ultrazvuka, ispitivane su na kravljem mleku, međutim retko na kozjem (Nicolau i Vilellas, 2015; Zhao i sar., 2014).

Uticaj visokih temperatura na komponente sastava kozjeg mleka, posebno na proteine, je drugačiji u poređenju sa efektom koji imaju na kravlje mleko, te se strogi termički režimi obrade mleka mogu primenjivati u proizvodnji kozjih sireva. Primena visokih temperatura izaziva denaturaciju proteina surutke i formiranje koagregata, pri čemu dolazi do inkorporiranja ovih komponenti u masu sira, što doprinosi poboljšanju randmana kozjeg sira i povećava njegovu biološku vrednost (Miloradović, 2015).

U proizvodnji pojedinih tradicionalnih kozjih sireva u Italiji, Portugaliji, Španiji i Francuskoj, kao koagulanti se koriste ekstrahovani enzimi biljnog porekla. Ovi enzimi pored uloge u koagulaciji mleka ostvaruju i značajan uticaj na formiranje specifičnih senzornih svojstava sireva. Ovi sirevi najčešće nose oznaku geografskog porekla (Miočinović, 2020).

Obavljena su i ispitivanja himozina kao najčešćeg koagulanta, iz različitih izvora životinjskog porekla, poput kamiljeg, kozjeg, jagnječeg i bivoljeg. Kada je u pitanju upotreba biljnih koagulanata, u proizvodnji sireva se efikasno primenjuje enzim koji se dobija iz cveta *Cynara cardunculus*, a koji je pokazao visoku pogodnost u proizvodnji sireva od kozjeg ili ovčijeg mleka. Jedna od najznačajnijih razlika između biljnih i životinjskih koagulanata je veći indeks zrenja koji se postiže primenom biljnih enzima (Lucey i sar., 2003; Roseiro i sar., 2003), što može pozitivno uticati na senzorna svojstva kozjeg sira poput ukusa i teksture. Sa druge strane, ispitivanjem koagulanata mikrobiološkog porekla utvrđeno je da oni dovode do brže koagulacije u poređenju sa biljnim (García i sar., 2012).

Senzorna svojstva sireva od kozjih mleka su specifična i posledica su jedinstvenog sastava posebno sadržaja i vrsta masnih kiselina tipičnih za ovu vrstu mleka. Kako se navodi, mnoga svojstva kozjeg mleka koja ga izrazito razlikuju od drugih, potiču upravo od njegove lipidne frakcije. Više spoljašnjih faktora, kao što su godišnje doba ili ishrana, dodatno utiče na sadržaj mlečne masti i sastav masnih kiselina kozjeg mleka. Razlike u strukturi triglicerida mlečne masti u kozjem mleku utiču i na ukus proizvedenog sira. Na primer, kozje mleko sadrži masne kiseline sa manje razgranatim lancima, koje odlikuje niži prag osetljivosti ukusa (Scintu i Piredda, 2007).

2.4.3. Značaj kalcijum-hlorida u proizvodnji sira

Najznačajnije komponente mineralnog sastava sira su u reološkom smislu, kalcijum i fosfor. Kazeinske micelle sadrže ove minerale u znatnoj količini u formi koloidnog kalcijum-fosfata (CCP). Tokom acidifikacije mleka u proizvodnom procesu sireva, dolazi do intenzivne demineralizacije parakazeinskih micela. Step demineralizacije zavisi od dinamike acidifikacije i dehidratacije sirnih zrna i u momentu odlivanja surutke od ključne je važnosti za reološka svojstva sira. Veći obim demineralizacije parakazeina uzrokuje pojavu plastičnog sirnog testa što je poželjno kod određenih vrsta sireva. Nasuprot tome, sirevi koje odlikuju veća elastičnost i čvrstina sirnog testa sadrže veću količinu CCP-a (Puđa, 2009).

Modifikovanje sadržaja kalcijuma i pH vrednosti u proizvodnji sira ima snažan efekat na dinamiku koagulacije i svojstva sirišnokoagulisanog gela, ali i reološka i teksturalna svojstva, kao i randman finalnog sira. Utvrđeno je da dodavanje 200-300 mg/l mleka CaCl_2 dovodi do

nastanka gušće mreže sirišnog gela od kravljeg mleka i većeg stepena zadržavanja masti u sirnoj grudi čime se smanjuju i gubici prilikom odlivanja surutke. Dodavanje CaCl_2 u kombinaciji sa nižom pH u momentu odlivanja surutke utiče na ubrzavanje sirišne koagulacije i pospešuje zadržavanje mlečne masti i održavanje sličnog nivoa ukupnog kalcijuma u siru (Ong i sar., 2015). Takođe, Miočinović (2020) ističe da se u proizvodnji sirišno koaguliranih sireva od pasterizovanog mleka dodaje CaCl_2 u cilju skraćenja vremena koagulacije i povećanja čvrstine gela, ali da veće količine CaCl_2 od 200 mg/l negativno utiču na čvrstinu gela zbog interakcije viška kalcijuma sa česticama parakazeina, pri čemu im se povećava pozitivno naelektrisanje i deluje inhibirajuće na agregiranje.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da se ispita uticaj odabranih faktora na kiselu i sirišnu koagulaciju kozjeg mleka i da se sagleda kakva je povezanost parametara koagulacije i reoloških svojstava formiranih gelova mleka sa kvalitetom gotovih proizvoda. Cilj je takođe da se instrumentalnom analizom teksture finalnih proizvoda, dođe do zaključaka o mogućnostima za unapređenje kvaliteta proizvoda od kozjeg mleka i optimizaciju postupaka proizvodnje.

Prikupljanjem eksperimentalnih podataka o efektima delovanja različitih faktora na procese kisele i sirišne koagulacije kozjeg mleka koji će se pratiti reološkim metodama, cilj je i da se upotpune dosadašnja saznanja i delom rasvetle nejasnoće koje su prisutne u literaturi.

Osnovni cilj istraživanja je ispitivanje uticaja različitih faktora na tok kisele i sirišne koagulacije kozjeg mleka kao i sagledavanje svojstava fermentisanih mlečnih proizvoda i sireva u zavisnosti od primenjenih parametara postupka proizvodnje. Na ovaj način moguće je definisanje optimalnih parametara u funkciji dobijanja proizvoda poboljšanih svojstava. Cilj istraživanja je ostvaren praćenjem:

- uticaja dodavanja IPM na tok kisele koagulacije i svojstva jogurta;
- uticaja različitih termičkih tretmana kozjeg mleka na tok kisele koagulacije, distribuciju proteina, veličinu kazeinskih micela i svojstva jogurta;
- uticaja dodavanja mTG na tok kisele koagulacije i svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka;
- efekata primene različitih koncentracija sirila, pH vrednosti i temperature koagulacije na tok sirišne koagulacije kozjeg mleka i svojstva gela;
- toka sirišne koagulacije kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima, bez i uz dodavanje kalcijum-hlorida i svojstava sireva.

4. MATERIJAL I METODE

Istraživanja tokom doktorske disertacije su obavljena u Laboratoriji za tehnologiju mleka i u mini pogonu za preradu mleka na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Deo istraživanja vezan za ispitivanje veličine kazeinskih micela, obavljen je u Laboratoriji za fizičku hemiju, takođe na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

4.1. Ispitivanje uticaja odabranih faktora na tok kisele koagulacije i svojstva jogurta

Istraživanja u ovom delu disertacije sastoje se od ispitivanja uticaja odabranih faktora koja su obuhvatala dodatak IPM, termičkog tretmana mleka i enzima transglutaminaze na tok kisele koagulacije, reološke parametre kiselih gelova i teksturalna svojstva jogurta.

4.1.1. Materijal

Za potrebe ovog dela oglada korišćeno je kozje mleko sa farme Sanskih koza „Beocapra“ iz Kukujevaca i sa farme Alpskih koza iz Čačka, a kravlje mleko je pribavljeno sa farme krava PIK u Zemunu. Ostali dodaci koji su korišćeni u ogledu su:

- IPM sledećeg sastava: 80% proteina, 1% mlečne masti i 5% vlage (Promilk 852A, Ingredia, Aras, Francuska);
- Enzim mTG deklarisan aktivnosti 50 U/g (BDF Probind CH, BDF Ingredients, Đirona, Španija);
- Starter kultura “Yoflex 812” (Chr Hansen, Danska).

4.1.2. Ispitivanje uticaja izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

Ovaj deo eksperimenta je obuhvatio ispitivanja toka koagulacije i svojstava jogurta proizvedenih od:

- kozjeg mleka sa 2,5% proteina (GM),
- fortifikovanog kozjeg mleka sa 5% proteina (FGM) i
- kravljeg mleka sa 3% proteina (CM).

Kozje mleko za svrhu ovih oglada je termički tretirano na 90 °C/5 min. Ispitivanja su obuhvatila analizu toka kisele koagulacije i reoloških svojstava kiselih gelova kao i teksturalna svojstva jogurta.

4.1.3. Ispitivanje uticaja termičkih tretmana kozjeg mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta

U ovom delu ispitivanja kozje mleko je podvrgnuto sledećim termičkim tretmanima:

- 72 °C/30 s,
- 85 °C/5 min i
- 95 °C/5 min

Ispitivanja su obuhvatila reološka merenja toka kisele koagulacije, svojstava kiselih gelova, merenje veličine kazeinskih micela, elektroforetsko određivanje proteinskog profila mleka tretiranog na različitim temperaturama, kao i određivanje teksturalnih svojstava jogurta.

4.1.4. Ispitivanje uticaja transglutaminaze na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

U ovom segmentu ispitan je uticaj dodatka enzima mTG na tok kisele koagulacije i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima, uz prikaz uticaja ovih faktora na reološka i teksturalna svojstva kiselog gela i jogurta od kravljeg mleka radi poređenja. U skladu sa temom ove disertacije, fokus je stavljen na ispitivanja kozjeg mleka, te su detaljnije analize u pogledu elektroforetskog određivanja profila proteina, mikrobiološkog statusa proizvedenog jogurta tokom skladištenja i senzorne ocene proizvoda, sprovedena upravo sa ovom sirovinom.

Kozje i kravlje mleko je termički tretirano režimom visoke (90 °C/5 min) ili srednje pasterizacije (72 °C/30 s) a potom ohlađeno na 43 °C i tom prilikom je, zajedno sa starter kulturom, dodato 0,5 g preparata enzima mTG na 1 l mleka, što je ekvivalentno koncentraciji od ~1 U/g proteina. Ovako pripremljeni uzorci obeleženi su oznakama G90TG i C90TG od visoko pasterizovanog kozjeg i kravljeg mleka, a G72TG i C72TG od kozjeg odnosno kravljeg mleka pasterizovanog blažim režimom. Kontrolni uzorci (G90 i G72, odnosno C90 i C72) nisu sadržali mTG, dok je celokupna procedura pripreme bila identična kao i za eksperimentalne uzorke.

Ispitivanja su obuhvatila reološka merenja toka kisele koagulacije i svojstava kiselih gelova, elektroforezu mleka i jogurta, određivanje sposobnosti vezivanja vode i obim sinerezisa, analizu teksturalnih i senzornih svojstava jogurta, kao i mikrobiološki status. Senzorna i teksturalna svojstva jogurta, kao i vijabilnost bakterija starter kulture, ispitivani su neposredno nakon proizvodnje i tokom dve nedelje skladištenja na temperaturi 4-7 °C. Eksperiment je ponovljen tokom tri nedelje za redom.

4.1.5. Kisela koagulacija i proizvodnja jogurta

Mleko je nakon određenog termičkog tretmana u zavisnosti od oglada ohlađeno na temperaturu inokulacije od 43 °C i zasejano sa 0,2% (w/w) „Yoflex 812“ starter kulturom (Chr Hansen, Hersholm, Danska). Nakon inokulacije, uzorci mleka su mešani 2 minuta a potom je celokupna količina raspoređena u plastične čaše koje su prekrivene aluminijumskom folijom i stavljene u termostat. Fermentacija je obavljena na 43 °C do postizanja pH 4,6, koja je praćena digitalnim pH-metrom (Consort C 931, Turnaut, Belgija). Nakon kompletirane fermentacije, uzorci jogurta su ohlađeni i skladišteni 24 h na 4-7 °C, a potom analizirani. Svaki ogleđ proizvodnje jogurta je ponovljen tri puta. Deo inokulisanog mleka je istovremeno analiziran na reometru, a reološka merenja su opisana u poglavlju 4.1.6.2.

4.1.6. Analitičke metode ispitivanja

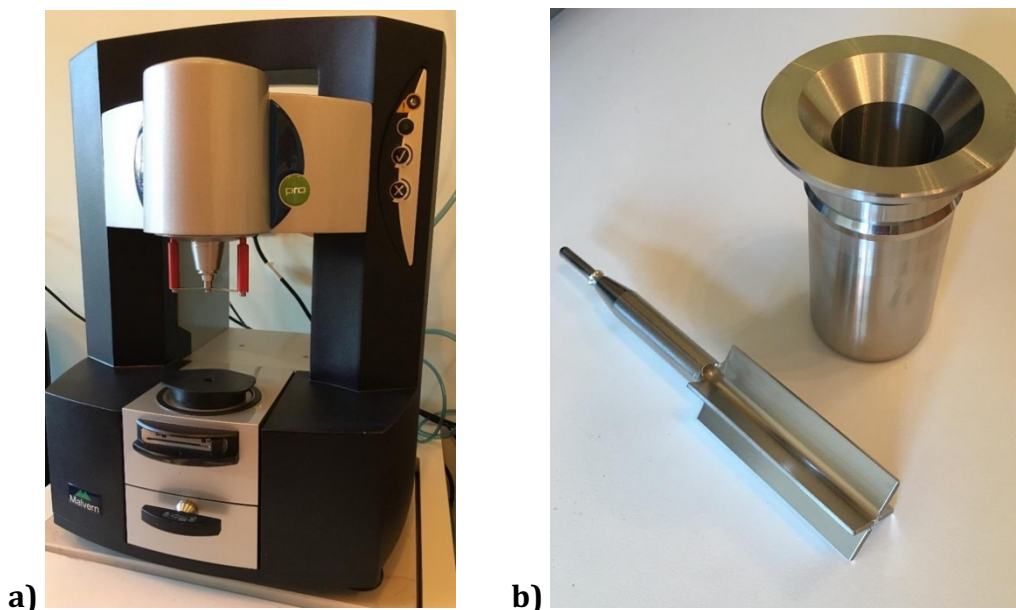
4.1.6.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka

Ispitivanje sirovog mleka obavljeno je odmah po uzorkovanju referentnim i rutinskim metodama: sadržaj suve materije određen je standardnom metodom sušenja na 102±2 °C (FIL-IDF, 1987), sadržaj proteina metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1990), sadržaj mlečne masti metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981), određivanje pH vrednosti digitalnim pH-metrom Consort C 931 (Consort, Turnaut, Belgija). Svako merenje je obavljeno u triplikatu.

4.1.6.2. Reološka ispitivanja toka kisele koagulacije i svojstava kiselog gela

Tok kisele koagulacije i viskoelastična svojstva kiselog gela tokom i nakon acidifikacije, praćena su merenjima primenom dinamičkog oscilatornog smicanja, koja su vršena na Kinexus

Pro reometru (Malvern Ltd., Vusteršir, Velika Britanija), opremljenim „vetrokaz“ (engl. vane) geometrijom (Slika 2.).



Slika 2. Reometar Kinexus Pro **a)** i alat „vetrokaz“ **b)** (Malvern Ltd., Vusteršir, Velika Britanija)

Prethodno inokulisani uzorci mleka uneti su u donji deo geometrije na reometru, a isparavanje i isušivanje površine tokom merenja sprečeno je stavljanjem plastičnog poklopca sa gornje strane uzorka.

Uzorci su podvrgnuti oscilacijama frekvencije 1 Hz ili 0,1 Hz, uz 1% ili 0,1% deformacije smicanjem, sve do postizanja pH 4,6 koja je paralelno merena u uzorcima u termostatu. Vreme geliranja i pH u tački geliranja određeni su u momentu kada je vrednost modula elastičnosti (G') ≥ 1 Pa (Lucey i sar., 1997a). Po završetku fermentacije, kiseli gelovi su brzo ohlađeni na 5 °C (1 °C/min) i ostavljeni da miruju na toj temperaturi 30 minuta.

Nakon toga, uzorci su podvrgnuti testu variranja frekvencija oscilovanja (engl. frequency sweep) u opsegu 0,01-10 Hz, uz konstantni obim deformacije od 0,1%. Parametri G' i modul viskoznosti (G'') određeni su pri 1 Hz kao pokazatelji svojstava gelova nakon hlađenja, a nagibi log-log grafika modula u funkciji frekvencije izračunati su pomoću Microsoft Office Excel programa. Naredni test podrazumevao je variranje obima deformacije (engl. strain sweep) u opsegu 0,001-500% pri stalnoj frekvenciji od 1 Hz odakle je izračunata vrednost napona popuštanja (prinosni napon) u prelaznoj tački ($G'=G''$) (Guggisberg i sar., 2009). Sva merenja su vršena u triplikatu.

4.1.6.3. Merenje veličine kazeinskih micela

Veličina kazeinskih micela kozjeg mleka određena je metodom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS), na uređaju Horiba NanoPartica SZ-100 (Horiba, Japan). Nakon odabranih termičkih tretmana (poglavlje 4.1.3), uzorci mleka su brzo ohlađeni imerzijom u ledenom kupatilu i ostavljeni u frižideru tokom noći. Uzorci su sledećeg dana ponovo zagrejani na 40 °C i ohlađeni do 20 °C kako bi se uspostavila ravnoteža. Sirovo mleko i termički tretirani uzorci obezmašćeni su centrifugiranjem na 20 °C pri 600 g/15 minuta (model centrifuge 5430; Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka). Ovaj režim za obezmašćivanje kozjeg mleka je odabran

kako bi se izbegao gubitak proteina (Miloradovic i sar., 2015). Nakon obezmaščivanja, uzeto je po 1 ml supernatanta i razblaženo 100 puta destilovanom vodom prema metodi Day i sar. (2015). Merenje je obavljeno na 25 °C, u polidisperznom modu, uz automatsko biranje ugla rasejanja svetlosti (90° ili 173°).

Merenja su obavljena minimum po tri puta na svakom uzorku.

4.1.6.4. SDS PAGE

Elektroforetsko ispitivanje je vršeno prilikom analiziranja uticaja različitih termičkih tretmana i dodatka enzima mTG na tok kisele koagulacije i svojstva jogurta sa ciljem da se objasne promene na proteinima nastale delovanjem odabranih faktora.

Uzorci sirovog i termički tretiranog mleka su ohlađeni na 20 °C i centrifugirani (model centrifuge 5430; Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka) 15 minuta pri 600 g (Miloradovic i sar., 2015) kako bi se obezmastili.

Slično tome uzorci kozjeg mleka namenjeni ispitivanju uticaja mTG su nakon termičkih tretmana i hlađenja do 43 °C, inkubirani sa enzimom u termostatu paralelno sa odvijanjem fermentacije jogurta, u trajanju vremena fermentacije svake od odgovarajućih varijanti jogurta. Cilj je bio da se ispita obim proteinskih veza koje se formiraju u mleku pod dejstvom enzima, uz pomoć SDS PAG elektroforeze. Obzirom da na stepen umrežavanja proteina utiču i delovanje enzima i proces acidifikacije pod dejstvom aktivnosti bakterija starter kulture, uzeti su i uzorci jogurta od kozjeg mleka na kraju fermentacije sve četiri proizvedene varijante i pripremljeni za elektroforezu.

Sirovo i termički tretirano mleko nakon aktivacije enzima, kao i njihovi kontrolni uzorci koji nisu sadržali enzim, su centrifugirani u cilju obezmaščivanja prethodno naznačenim režimom. Uzorci jogurta su nakon završene fermentacije, rastvoreni u redukujućem puferu za uzorke pH 6,8 (u odnosu 1:9) koji sadrži β -merkaptetanol, a potom centrifugirani pri istim uslovima kao i mleko.

Supernatanti mleka su pripremljeni za elektroforezu u redukujućim i neredukujućim uslovima po metodi Anema i Stanley (1998), razblaženjem 10 puta u odgovarajućim puferima za uzorke, dok su uzorci jogurta razblaženi istim puferima pre centrifugiranja. Redukujući pufer (SDS-R-PAGE) pH 6,8, sadržao je 0,055 M Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 7% (v/v) glicerola, 5% (v/v) β -merkaptetanola, i 0,0025% (w/v) bromfenol plavog. Neredukujući pufer za uzorke (SDS-NR-PAGE) se razlikovao samo u tome što nije sadržao β -merkaptetanol.

SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE) je izvedena prema metodi Laemli (1970), pri čemu je korišćen 4% gel za koncentrisanje (pH 6,80) i 15% gel za razdvajanje (pH 8,85). Po 5 μ l uzoraka pripremljenih u redukujućim uslovima naneto je na gel. Za razdvajanje je korišćena elektroforetska jedinica TV200YK Twin Plate (Consort, Belgija), jačina struje je podešana na konstantnu vrednost od 80 mA, a maksimalna voltaža je iznosila 300 V tokom 1,5 h. Gelovi su zatim bojani 1 h na 45 °C u rastvoru boje koji je sadržao 0,23% (w/v) boje Coomassie Brilliant Blue R250, 3,9% (w/v) trihlorsirćetne kiseline, 6% (v/v) sirćetne kiseline i 17% (v/v) metanola. Nakon bojenja vršeno je obezbojavanje gelova rastvorom sa 8% (v/v) sirćetne kiseline i 18% (v/v) metanola u nekoliko navrata, a potom skeniranje.

4.1.6.5. Određivanje sposobnosti vezivanja vode i spontanog sinerezisa

Ispitivanje sposobnosti vezivanja vode kod odabranih uzoraka kiselih gelova i jogurta izvršeno je prema metodi Parnell Clunies (cit. Riener i sar., 2010) prema kojoj je 25 g

koagulisanog mleka 1 dan nakon hlađenja centrifugirano pri 3000 g/10 minuta (što odgovara 5500 RPM/10 min) (model centrifuge 5430; Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka), posle čega je izmerena masa izdvojene surutke i rezultat izražen kao masa izdvojene surutke na 100 g jogurta.

Sklonost jogurta prema spontanom izdvajanju seruma određena je 1 dan posle proizvodnje i nakon 15 dana skladištenja uzoraka metodom prema Riener i sar. (2010) na sledeći način: 30 g nepromešanog jogurta ravnomerno je raspoređeno po površini Whatman No. 1 filter papira postavljenog na levku iznad menzure. Zapremina izdvojenog seruma izmerena je nakon 5 h stajanja u frižideru (4-7 °C). Analize su ponovljene tri puta.

4.1.6.6. Analiza teksture jogurta

Analize teksture jogurta su vršene u plastičnim čašama u kojima je prethodno odmereno po 100 g inokulata, radi postizanja ponovljivosti, a potom obavljene fermentacija i hlađenje. Teksturalna svojstva jogurta kao što su, čvrstina, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta, analizirana su pomoću analizatora teksture TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija) sa ćelijom kapaciteta 5 kg. Primenjen je test jednostepene kompresije uz alat sa diskom za povratnu ekstruziju (A/BE; prečnika 35 mm; rastojanje 30 mm; brzina 0,001 m/s) na 5 °C. Nakon merenja, izračunavanje vrednosti parametara teksture sa dobijenih grafika vršeno je kompjuterskim programom EXPONENT istog proizvođača (Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija).



Slika 3. Analizator teksture TA.XT Plus sa alatom „A/BE disk za povratnu ekstruziju“ (Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija)

Ovim merenjima određeni su sledeći parametri: (1) čvrstina (g) koja se definiše kao pik maksimuma sile; (2) konzistencija (gs) koja predstavlja površinu ispod te krive; (3) kohezivnost (g) se računa kao maksimum negativne sile tokom vraćanja alata u početni položaj; (4) indeks viskoziteta (gs) koji predstavlja negativnu vrednost površine ispod krive koja se formira pri vraćanju alata u početni položaj. Za svaku varijantu jogurta analizirano je po 6 uzoraka, pri čemu je ceo ogled ponovljen tri puta.

4.1.6.7. Mikrobiološke analize jogurta

Broj živih ćelija bakterija *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* koje su činile sastav komercijalne starter kulture "Yoflex 812" (Chr Hansen, Danska) korišćene u proizvodnji jogurta, određen je u četiri tačke: 1) neposredno nakon inokulacije mleka; 2) na kraju fermentacije; 3) nakon 1 nedelje skladištenja jogurta na 4-7 °C; 4) nakon 2 nedelje skladištenja jogurta na 4-7 °C.

Po 10 mL svakog uzorka razblaženo je u 90 mL sterilnog fiziološkog rastvora (0,85% NaCl) i homogenizovano 1 min (Interlab, BagMixer 400P). Pripremljena su decimalna razblaženja i alikvoti od 100 µL su naneti na selektivne podloge. *S. thermophilus* je inkubiran na 42 °C na M17 (Oxoid, Basington, Hempšir, UK) sa dodatkom 0,5% glukoze (GM17). *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je inkubiran na MRS agaru (Oxoid, Basington, Hempšir, UK) pri 42 °C tokom 48 h u anaerobnim uslovima (Gas Pak, BBL, Nemačka) sa reagensom „Anaerocult A“ (Merck, GmbH, Darmštat, Nemačka).

4.1.6.8. Senzorno ocenjivanje jogurta

Senzorna svojstva jogurta od kozjeg mleka tretiranog na dva termička tretmana, sa i bez dodatka enzima mTG, ocenjena su u pogledu opšteg izgleda, mirisa, ukusa i teksture. Vrednovanje ovih odabranih parametara je vršeno pridruživanjem odgovarajućeg broja bodova na skali od 1 do 5, sa mogućnošću davanja 0,25 bodova. Ocenu kvaliteta jogurta obavio je stručni senzorni panel sastavljen od šest članova iz redova profesora, stručnih i naučnih saradnika Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, primenom metode bodovanja kvaliteta (Koca i Metin, 2004). Po četiri šifrirana uzorka predstavljena su slučajnim redom grupi panelista na svakoj sesiji i ocenjivanje je ponovljeno dva puta. Senzorna evaluacija jogurta obavljena je 1 dan nakon proizvodnje, kao i posle jedne i dve nedelje skladištenja pri 4-7 °C.

4.1.6.9. Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni u eksperimentu o uticaju dodatka IPM na tok kisele koagulacije, reološka svojstva kiselih gelova i teksturu jogurta su statistički analizirani korišćenjem analize varijanse (ANOVA) u programu Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, SAD), a poređenje razlika sredina za ispitivane parametre izvršeno je primenom t-testa, na nivou značajnosti od 0,05.

Jednofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) primenjena je za obradu rezultata merenja u programu Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, SAD), kako bi se ocenili efekti termičkih tretmana na reološka i teksturalna svojstva kiselih gelova i jogurta od kozjeg mleka, kao i na veličinu micela. Razlike sredina određivanih parametara utvrđene su pomoću Fišerovog LSD-testa, na nivou značajnosti 0,05.

Kako bi se ocenili efekti dodatka enzima, termičkog tretmana i skladištenja na reološka svojstva kiselih gelova, sinerezis i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i od kravljeg mleka, korišćena je dvo- i trofaktorijalna analiza varijanse u programu Statistica 10.0 (Stat Sof. Inc., Tulsa, SAD). Poređenje razlika sredina vrednosti ispitivanih parametara obavljeno je Fišerovim LSD-testom, na nivou značajnosti 0,05.

4.2. Ispitivanje uticaja odabranih faktora na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

U ovom delu disertacije vršeno je ispitivanje uticaja različitih faktora na tok sirišne koagulacije mleka koji su obuhvatili pH vrednost, koncentraciju sirila, temperaturu koagulacije, dodavanje kalcijum-hlorida i period laktacije. Standardni uslovi su bili sledeći: pasterizovano

kozje mleko (65 °C/30 min), pH vrednost 6,5, temperatura koagulacije 31 °C, 0,054% sirila i 0,2 g/l CaCl₂. Za svaki set oglada u kom je ispitivan uticaj određenog faktora, mleko je uzimano tri nedelje uzastopno tako da je eksperiment ponovljen po tri puta.

4.2.1. Materijal

U ovim ogledima korišćeno je kozje mleko Alpske i Sanske rase. Za sirišnu koagulaciju korišćeno je teleće sirilo u prahu jačine 765-1620 IMCU/g (Caglifificio Clerici, 94% himozin, 6% pepsin, Clerici-Sacco Group, Kadorago, Italija).

4.2.2. Ispitivanje uticaja pH vrednosti na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Za ovaj deo istraživanja korišćeno je kozje mleko Alpske rase tokom septembra-oktobra 2019. godine. Ispitan je uticaj tri pH vrednosti na tok sirišne koagulacije sirovog i pasterizovanog mleka tretiranog režimom niske pasterizacije (65 °C/30 min). pH vrednosti koje su ispitane u ovom ogledu su: 6,5, 6,3 i 6,1.

pH kozjeg mleka je podešavana na odgovarajuću vrednost na temperaturi koagulacije (31 °C), dodatkom male količine 10% (v/v) mlečne kiseline ili 0,1 M NaOH uzorcima sirovog mleka, a pH pasterizovanog mleka je podešena nakon dodavanja standardne količine kalcijum-hlorida (0,2 g/l).

4.2.3. Ispitivanje uticaja koncentracije sirila na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Ispitivanje uticaja četiri različite koncentracije sirila je sprovedeno tokom novembra na kozjem mleku kasne laktacije. Zbirnom sirovom mleku je podešavana pH na 20±2 °C pri pH 6,5, nakon dodatka standardne količine CaCl₂.

U ispitivanjima je korišćeno sirovo i termički tretirano (65 °C/30 min) kozje mleko a ispitivan je uticaj sledećih koncentracija sirila: 0,054 g/l, 0,020 g/l, 0,015 g/l i 0,010 g/l. Preračunata količina sirila je dodata u kozje mleko pri temperaturi 31 °C.

4.2.4. Ispitivanje uticaja temperature koagulacije na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Zbirno rashlađeno sirovo kozje mleko je nakon dopremanja u laboratoriju zagrejano na temperaturu od 20±2 °C pri čemu je izvršeno podešavanje pH vrednosti na 6,5 kako bi se eliminisao uticaj variranja prirodne kiselosti mleka između ponavljanja. Zatim je mleko podeljeno, deo je pasterizovan režimom niske pasterizacije, a deo je korišćen za paralelno ispitivanje efekata na uzorcima od sirovog mleka. Uzorci su zagrevani na odgovarajuću temperaturu koagulacije nakon čega je dodato 0,054 g/l sirila, a pasterizovanom mleku prethodno je dodata i standardna količina CaCl₂. Ispitivanja su obuhvatila analizu uticaja sledeće tri temperature koagulacije: 27 °C, 31 °C i 35 °C.

4.2.5. Ispitivanje uticaja kalcijum-hlorida na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Ispitivanja uticaja dodavanja kalcijum-hlorida su vršena sa kozjim mlekom Sanske rase koza. Poređenja uticaja ovog faktora su vršena sa kozjim mlekom podvrgnutog na tri različita termička tretmana (65 °C/30 min, 80 °C/5 min i 90 °C/5 min). Nakon hlađenja na 31 °C dodata

je standardna količina CaCl_2 (0,2 g/l) dok su analogni eksperimentalni uzorci pripremljeni bez ovog dodatka. U sledećem koraku koagulacija je inicirana dodavanjem 0,02 g/l sirila.

4.2.6. Ispitivanje uticaja perioda laktacije na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Za potrebe ispitivanja uticaja perioda laktacije na tok koagulacije i svojstva sirišnog gela, mleko je nabavljano u periodu jun-jul 2019. (srednja laktacija), novembar 2019. (kasna laktacija) i mart 2020. (rana laktacija). Mleko je pripremljeno pri standardnim uslovima za sirišnu koagulaciju (pH zbirnog mleka podešena na 6,5, temperatura koagulacije 31 °C i količina sirila 0,054 g/l). Ogled je obavljen i na sirovom i na pasterizovanom (65 °C/30 min) mleku.

4.2.7. Analitičke metode ispitivanja

4.2.7.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka

Ispitivanje sirovog mleka obavljeno je odmah po uzorkovanju referentnim i rutinskim metodama: sadržaj suve materije određen je standardnom metodom sušenja na 102 ± 2 °C (FIL-IDF, 1987), sadržaj proteina metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1990), sadržaj mlečne masti metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981), određivanje pH vrednosti digitalnim pH-metrom Consort C 931 (Consort, Turnaut, Belgija). Svako merenje je obavljeno u triplikatu.

4.2.7.2. Reološka ispitivanja toka sirišne koagulacije i svojstava gelova

Tok sirišne koagulacije praćen je metodom oscilatorne reometrije sa malom amplitudom na reometru. Merenje je započeto 4 minuta nakon dodavanja sirila unošenjem uzorka u donji deo geometrije koja je prethodno temperirana na temperaturu koagulacije. Formiranje gela je praćeno pri frekvenciji oscilacije od 1Hz i deformaciji od 0,01% tokom 60 minuta merenjem modula G' i G'' , kao i faznog ugla $\delta = \arctan(G''/G')$.

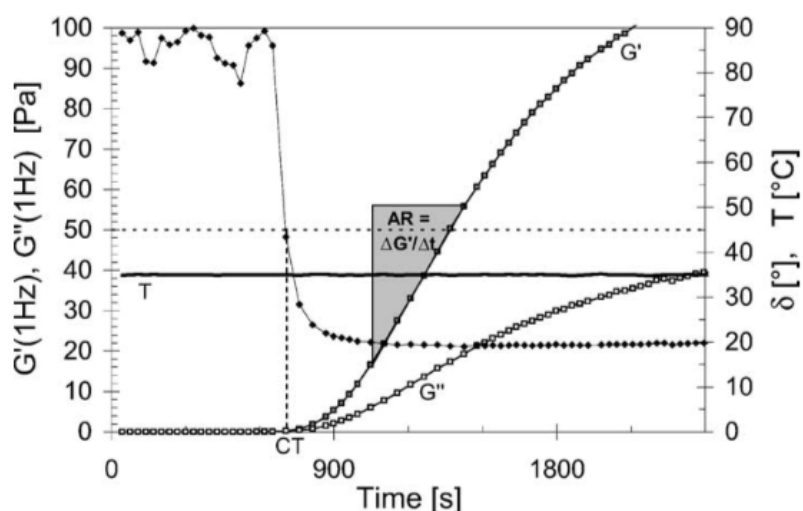
Odmah nakon ove sekvence vršeno je merenje modula elastičnosti promenom frekvencije od 20 do 0,1 Hz sa deformacijom od 0,01%.

Na osnovu dobijenih grafika izračunati su brzina agregiranja (BA) i čvrstina gela (ČG) po metodi Dimassi i sar. (2005).

Vreme koagulacije (VK) je računato kao momenat kada je vrednost modula elastičnosti (G') ≥ 1 Pa (Lucey i sar., 1997a). Brzina agregiranja je definisana kao nagib tangente u tački koja odgovara maksimumu prvog izvoda funkcije $G'(t)$ (Slika 4).

Čvrstina gela je određena testom variranja opsega frekvencija oscilovanja i zapravo predstavlja vrednost izmerenog modula elastičnosti pri frekvenciji od 1,5 Hz. Takođe, zabeležena je i vrednost modula elastičnosti nakon 60 minuta merenja (G^*), što je predstavljalo još jedan pokazatelj čvrstine formiranog sirišnog gela mleka.

Navedeni parametri izračunati su pomoću programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD).



Slika 4. Reološki prikaz formiranja sirišnog gela. Tačkastom vertikalnom linijom označena je vrednost modula pri faznom uglu $\delta = 45^\circ$ koja ukazuje na momenat konverzije sistema koji iz preovlađujuće tečnog stanja prelazi u preovlađujuće čvrsto agregato stanje. Nagib u osenčenom trouglu predstavlja brzinu agregiranja $AR = dG'/dt$ (Dimassi i sar., 2005)

4.2.7.3. Statistička analiza

Dvofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za utvrđivanje značajnosti uticaja faktora kao i njihove interakcije na odabrane reološke parametre sirišne koagulacije – vreme koagulacije, brzinu agregiranja i modul elastičnosti nakon 60 minuta, kao pokazatelja čvrstine gela. S tim u vezi, jedan faktor je termički tretman kozjeg mleka (sirovo ili pasterizovano) a drugi faktor su koncentracija sirila, pH, temperatura koagulacije, termički tretman mleka ili dodatak kalcijum-hlorida, u zavisnosti od eksperimenta. Poređenje parova unutar grupa je vršeno sa post hoc Tukey HSD testom ili LSD testom, u programu Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, SAD).

Korelacija (pirsonova korelacija) je vršena kako bi se utvrdila jačina veze između odabranih merenih reoloških parametara - da li postoji zavisnost između parametara i kolika je (pozitivna ili negativna; značajna ili ne).

4.3. Ispitivanje uticaja kalcijum-hlorida na svojstva sireva od kozjeg mleka

4.3.1. Proizvodnja sireva

4.3.1.1. Proizvodnja sireva u salamuri

U ovoj fazi proizvedene su dve varijante sireva u salamuri od kozjeg mleka Sanske rase koza. Mleko je nabavljeno sa farme „Beocapra“. Osnovni fizičko-hemijski sastav mleka određen je standardnim metodama navedenim u potpoglavlju 4.2.7.1. U ovom delu ispitivanja sirevi u salamuri su proizvedeni od pasterizovanog mleka sa i bez dodavanja standardne količine CaCl_2 .

Kozje mleko namenjeno proizvodnji sireva je tretirano na temperaturi pasterizacije ($65^\circ\text{C}/30\text{ min}$) nakon čega je ohlađeno na 31°C , a potom je dodato $0,05\text{ g/l}$ starter kulture koju su činile termofilne i mezofilne bakterije: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, komercijalnog naziva MFC – 4 (Biochem s.r.l., Italija); zatim je dodato $0,2\text{ g/l}$ CaCl_2 (kod varijanti sa kalcijum-hloridom) i $0,02\text{ g/l}$ sirila u prahu (Caglifacio Clerici, 94% himozin - 6% pepsin, jačine 765-1620 IMCU/g, Clerici-Sacco Group, Kadorago, Italija).

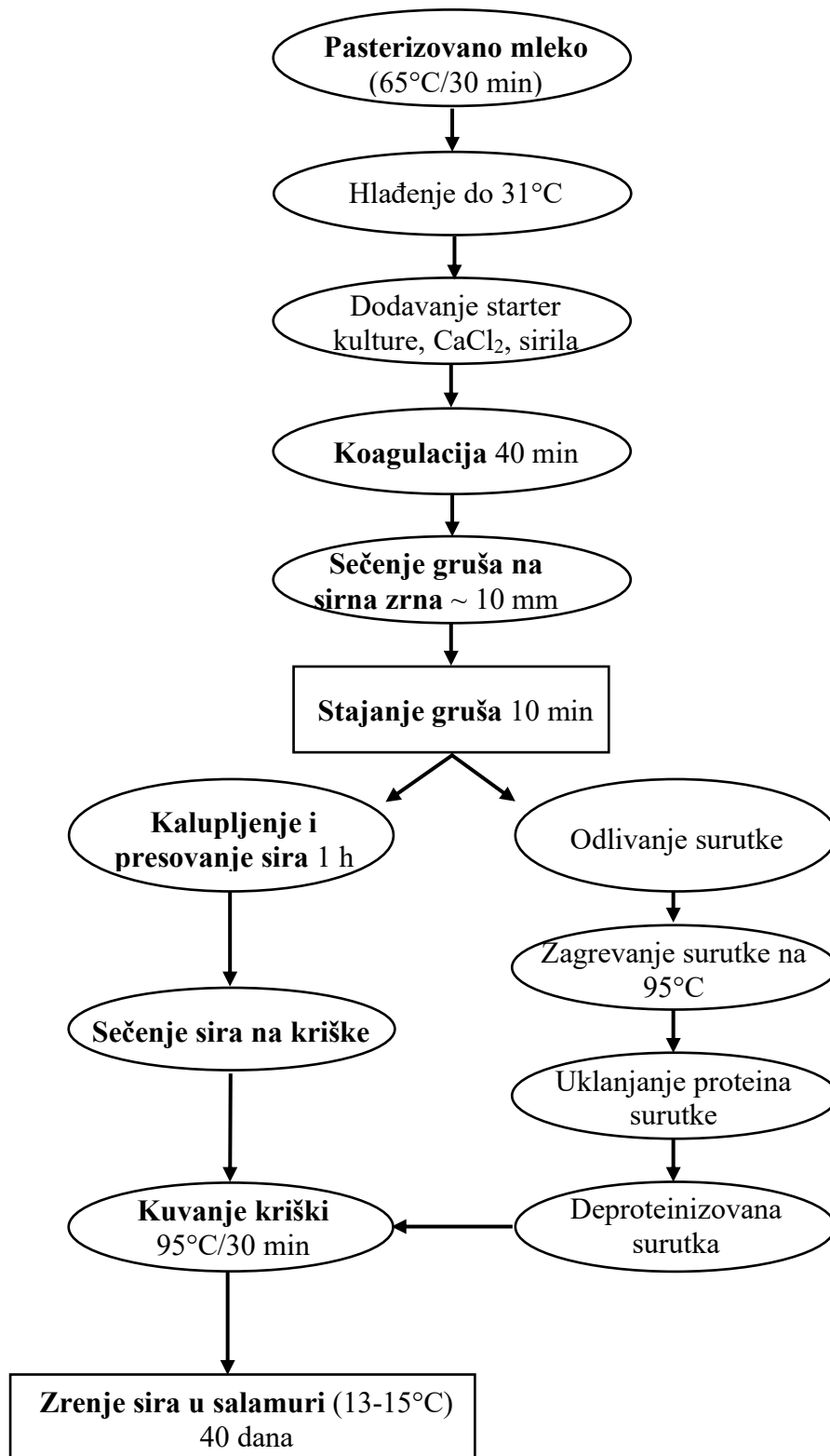
Koagulacija je obavljena na temperaturi od 31 °C u trajanju od 45 minuta. Gel je isečen na zrna veličine 5 cm, ostavljen da odstoji 15 minuta, a potom je obavljena operacija mešanja. Nakon obrade gruša usledile su faze odlivanja surutke, kalupljenja, presovanja tokom 2 h, formiranja kriški dimenzija 7 x 15 cm i nakon toga, suvo soljenje u trajanju od 24 h na sobnoj temperaturi. U ovoj tački uzeti su uzorci sireva za analize neposredno nakon proizvodnje. Ostatak sira je stavljen u ambalažne jedinice u kojima je nalivena salamura, a zrenje je trajalo 9 dana pri 12-14 °C. Sirevi su analizirani i nakon perioda zrenja. Proizvodnja sireva je obavljena u dva ponavljanja.

4.3.1.2. Proizvodnja sireva za grilovanje

Za potrebe ispitivanja uticaja dodatka CaCl_2 na svojstva i kvalitet sireva od kozjeg mleka za grilovanje (sireva u tipu Halumi), korišćeno je mleko Sanske rase koza. Osnovni fizičko-hemijski sastav mleka određen je standardnim metodama navedenim u potpoglavlju 4.2.7.1. Proizvodene su dve varijante sireva od pasterizovanog kozjeg mleka (65 °C/30 min), bez i sa dodavanjem standardne količine kalcijum-hlorida.

Tehnološki postupak izrade ovih sireva prikazan je na Šemi 2. Može se videti da se razlike u odnosu na postupak proizvodnje sireva u salamuri, odnose na fazu obrade gruša i faze koje slede. U proizvodnji kozjih sireva za grilovanje primenjeno je sečenje sirišnog gela na sitnija sirna zrna (veličine oko 10 mm). Nakon odlivanja, surutka je zagrejana na 95 °C kako bi se obavila deproteinizacija. Ovako pripremljena surutka je korišćena kao medijum u kome su kriške sira kuvane na 95 °C/30 min, što predstavlja specifičnost u proizvodnji sireva u tipu Halumi.

Sirevi su nakon izrade stavljeni na zrenje u salamuri (13-15 °C), koje je trajalo 40 dana.



Šema 2. Tehnološki postupak proizvodnje kozjih sireva za grilovanje

4.3.2. Analitičke metode ispitivanja

Ispitivanje osnovnog fizičko-hemijskog sastava sireva i teksture obavljeno je neposredno nakon proizvodnje na uzorcima mladih sireva, kao i nakon finalizovanog perioda zrenja na uzorcima zrelih sireva.

4.3.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvaliteta sireva

Sadržaj suve materije u proizvedenim sirevima određen je standardnom metodom sušenja pri 102 ± 2 °C (FIL-IDF, 1982). Sadržaj masti je ispitan metodom po Van Gulik-u (FIL-IDF, 1986). Određivanje sadržaja ukupnog azota obavljeno je metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1990) i računski je utvrđen sadržaj ukupnih proteina množenjem sa faktorom 6,38. Na osnovu ovih parametara određeni su i sadržaj vode u suvoj materiji sira bez masti (VuBMS) i sadržaj masti u suvoj materiji sira (MuSM). pH vrednost je merena u suspenziji dobijenoj mešanjem 10 g uzorka homogenizovanog sira sa 10 mL destilovane vode, pomoću pH-metra (Consort, Belgija) (Ardö i Polychroniadou, 1999). Parametri sastava sireva određivani su neposredno nakon proizvodnje i nakon perioda zrenja.

4.3.2.2. Analiza teksturalnih svojstava sireva od kozjeg mleka

Tekstura je instrumentalno analizirana pomoću analizatora teksture TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija) sa ćelijom kapaciteta 5 kg. Uzorci su isecani iz kriški sira cilindričnom modlom, visina im je podešena na 10 mm, kako bi svi posedovali ujednačen oblik i dimenzije, što je od značaja za preciznost analiza. Neposredno pre merenja, uzorci su temperirani na sobnu temperaturu. Parametri teksture određeni su neposredno nakon proizvodnje sireva i nakon perioda zrenja testom analize profila teksture (TPA – eng. Texture Profile Analysis), primenom cilindra kao alata. Analiza je vršena tokom dve uzastopne kompresije bez lomljenja uzorka, uz deformaciju uzorka do 5 mm. Brzina kretanja sonde tokom deformacije iznosila je 2 mm/s. Analizom grafika određeni su sledeći parametri: čvrstoća, adhezivnost, elastičnost, kohezivnost, gumastost, žvakljivost i fleksibilnost. Merenje je obavljeno na po minimum pet pripremljenih uzoraka za svaku ispitivanu varijantu sira.

4.3.2.3. Statistička analiza

Ocena efekata dodatka kalcijum-hlorida i perioda zrenja na teksturalna svojstva sireva od kozjeg mleka izvršena je primenom dvofaktorijalne analize varijanse u programu Statistica 10.0 (Stat Sof. Inc., Tulsa, SAD). Poređenje razlika sredina vrednosti ispitivanih parametara obavljeno je Fišerovim LSD-testom, na nivou značajnosti 0,05.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Uticaj izolata proteina mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

5.1.1. Fizičko-hemijska svojstva sirovog mleka

Kozje mleko koje je korišćeno za proizvodnju jogurta čvrstog (eng. set style) tipa (GM) je sadržalo 2,5% proteina i 2,8% mlečne masti. Fortifikovana varijanta kozjeg mleka (FGM) je pripremljena dodatkom komercijalnog izolata proteina kravljeg mleka tako da je sadržala 5,0% proteina i 2,8% mlečne masti. Kravlje mleko (CM) je imalo 3,0% proteina i 2,8% masti.

5.1.2. Uticaj izolata proteina mleka na kiselu koagulaciju

Rezultati reoloških ispitivanja toka kisele koagulacije i svojstava kiselih gelova prikazani su u Tabeli 6.

Poređenjem tri varijante jogurta, može se uočiti postojanje značajnih razlika u vremenima geliranja i vremenima potrebnim za postizanje pH 4,6 (trajanje fermentacije). Najveće vrednosti ovih parametara zabeležene su kod jogurta od fortifikovanog kozjeg mleka (FGM) a najmanje kod jogurta od kravljeg mleka (CM). Značajan porast u vremenima geliranja i fermentacije kod FGM u poređenju sa GM (jogurtom od kozjeg mleka), verovatno je posledica većeg pufernog kapaciteta usled povećanog sadržaja proteina (5%). Prethodno je utvrđeno da se puforni kapacitet jogurta fortifikovanih različitim preparatima proteina mleka, uključujući i IPM, značajno razlikuje od svojih analoga bez ovih dodataka (Peng i sar., 2009).

pH u tački geliranja se značajno razlikovala kod GM jogurta ($p < 0,05$) od pH vrednosti zabeleženih kod FGM i CM uzoraka. Zaključuje se da je dodatak preparata IPM kozjem mleku uticao na povećanje vrednosti pH u momentu geliranja. Ova vrednost zavisi od izoelektrične tačke proteina koji čine kisel gel (Lucey i sar., 1997a), kao i od odnosa kazeina i proteina surutke (Puvanenthiran i sar., 2002).

Na kraju fermentacije (pH 4,6) utvrđene su značajne razlike i u vrednostima modula elastičnosti G' između tri varijante jogurta. Kiseli gel od kozjeg mleka imao je veoma nizak G' što ukazuje na slabu strukturu gela. Dodatak IPM značajno je uticao na porast G' kod FGM uzorka, ali je ta vrednost ipak bila niža od one koju je postigao jogurt od kravljeg mleka (CM). Obzirom da modul elastičnosti predstavlja meru jačine i broja veza u proteinskoj mreži gela (Roefs i sar., 1990; van Vliet i sar., 1991), rezultati ukazuju da kisel gel kozjeg mleka ima manji broj veza u proteinskom matriksu u poređenju sa gelom od kravljeg mleka. Povećanje jačine gela nakon dodatka IPM verovatno je posledica većeg sadržaja proteina.

Tabela 6. Reološki parametri kisele koagulacije i svojstava kiselog gela od kozjeg (GM), fortifikovanog kozjeg (FGM) i kravljeg mleka (CM)

Parametar	Vrsta jogurta		
	GM	FGM	CM
Vreme geliranja (min)	78 ± 1 ^b	84 ± 1 ^c	66 ± 2 ^a
pH geliranja	5,10 ± 0,08 ^a	5,38 ± 0,04 ^b	5,37 ± 0,06 ^b
Vreme do pH 4,6 (min)	172 ± 15 ^b	305 ± 10 ^c	166 ± 10 ^a
G' pri pH 4,6 (Pa)	5,8 ± 0,5 ^a	112 ± 17 ^b	124 ± 5 ^c
Modul elastičnosti, G' pri 1 Hz	33 ± 4 ^a	720 ± 40 ^b	1334 ± 32 ^c
Modul viskoznosti, G'' pri 1 Hz	7 ± 0,8 ^a	177 ± 15 ^b	393 ± 3 ^c
Nagib log G' vs. log frekvencija	0,142 ± 0,004 ^a	0,185 ± 0,002 ^b	0,210 ± 0,002 ^c
Nagib log G'' vs. log frekvencija	0,093 ± 0,004 ^a	0,091 ± 0,006 ^a	0,131 ± 0,007 ^b
tan δ	0,223 ± 0,002 ^a	0,245 ± 0,002 ^b	0,294 ± 0,006 ^c
Napon popuštanja (Pa)	5,2 ± 0,3 ^a	33,4 ± 2,8 ^b	39,6 ± 1,9 ^c

*Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu su statistički značajno različite (p<0,05).

Značajno povećanje vrednosti G' zabeleženo je kod svih kiselih gelova nakon hlađenja (Tabela 6), u saglasnosti sa drugim autorima (Lucey i sar., 1997a). Ova pojava je verovatno posledica bubrenja kazeinskih micela i povećanja kontaktne površine između njih. Međutim, povećanje G' se značajno razlikovalo između različitih kiselih gelova (p < 0,05), što ukazuje na postojanje razlika između njih u brzini bubrenja i prirodi proteinskog matriksa.

Jogurt od kozjeg mleka imao je značajno niže vrednosti G', G'' i δ u odnosu na FGM i CM jogurte. Međutim, svi jogurti su se odlikovali svojstvima tipičnim za viskoelastične gelove, sa vrednostima G' većim od G'' pri ispitivanim frekvencijama. Moduli G' i G'' ispoljili su sličnu zavisnost od frekvencije kod svih uzoraka. Veće vrednosti nagiba pravih sa grafika log G' i log G'' u funkciji frekvencije ipak su dobijene za jogurt od kravljeg mleka što ukazuje na postojanje veće zavisnosti modula od frekvencije kod ove vrste jogurta. Slične rezultate su objavili i drugi autori (Peng i sar., 2009; Roefs i van Vliet, 1990).

Vrednosti napona popuštanja kod oba jogurta od kozjeg mleka (GM i FGM) bile su značajno niže (p<0,05) u poređenju sa CM. Dodatak IPM kozjem mleku uticao je značajno na povećanje vrednosti prinosnog napona približivši je vrednosti napona kod kravljeg jogurta, međutim i dalje je bila niža. Napon popuštanja predstavlja meru težine raskidanja veza,

reflektujući svojstva strukture gela u pogledu uslova za potpuni kolaps strukture koji zavisi od broja veza na poprečnom preseku lanaca proteina matriksa kao i od jačine veza (van Vliet i sar., 1991). Veoma mala vrednost napona popuštanja kod kiselog gela od kozjeg mleka ukazuje na podložnost takve strukture reorganizovanju i rušenju, u poređenju sa gelovima FGM ili CM.

Razlike u reološkim svojstvima kiselih gelova od kravljeg i kozjeg mleka posledica su različitog sastava i svojstava ove dve vrste mleka. Niža vrednost G' kiselog gela od kozjeg mleka verovatno je povezana sa specifičnim svojstvima kazeinskih micela kao što su sastav, veličina i hidratisanost (Park i sar., 2007) ali takođe i sa različitim ponašanjem kravljeg i kozjeg mleka usled dejstva termičkog tretmana (Pesic i sar., 2012; Raynal i Remeuf, 1998). Različiti udeli četiri glavne kazeinske frakcije u kozjem mleku u poređenju sa kravljim, pogotovo sadržaj α_{s1} -kazeina, koji je najvažniji činilac proteinske strukture gela, kao i genetska varijabilnost pojedinih komponentata, jesu najvažniji faktori koji utiču na reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka (Božanić i sar., 2002).

5.1.3. Uticaj izolata proteina mleka na teksturalna svojstva jogurta

Sva teksturalna svojstva GM jogurta bila su inferiornija u poređenju sa CM jogurtom (Tabela 7). Jogurt od kozjeg mleka se nije mogao klasifikovati kao čvrsti tip zbog veoma male čvrstine (engl. firmness), slabe konzistencije (engl. consistency) i kohezivnosti (engl. cohesiveness). Ovde treba napomenuti da sastav kozjeg mleka značajno varira usled brojnih faktora, kao što je ranije pomenuto, i u zavisnosti od toga svojstva finalnog proizvoda, odnosno jogurta se razlikuju. Usled sastava kozjeg mleka koje je korišćeno u ovom ogledu i kako se može uočiti, malog sadržaja proteina, GM jogurt se odlikovao znatno lošijom teksturom i nije se mogao klasifikovati kao čvrsti tip. Dodatak IPM zaista je poboljšao njegovu teksturu, ali je FGM jogurt i dalje bio značajno slabiji u poređenju sa CM jogurtom. Mistry i Hassan (1992) su objavili da se kvalitet jogurta od obranog mleka može poboljšati suplementacijom mleka dodatkom preparata visokog sadržaja proteina, do 5,6% proteina, dok preko ove granice proizvod postaje previše čvrst i ima opor ukus.

Tabela 7. Teksturalna svojstva jogurta od kozjeg (GM), fortifikovanog kozjeg (FGM) i kravljeg mleka (CM)

Parametar	Vrsta jogurta		
	GM	FGM	CM
Čvrstina (g)	48,4 ± 5,2 ^a	234 ± 14 ^b	329 ± 16 ^c
Konzistencija (gs)	1137 ± 104 ^a	5416 ± 369 ^b	7780 ± 415 ^c
Kohezivnost (g)	20,4 ± 2,7 ^a	206 ± 24 ^b	290 ± 45 ^c
Indeks viskoziteta	18,7 ± 7,1 ^a	397 ± 38 ^b	480 ± 22 ^c

*Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu su statistički značajno različite (p<0,05).

Obzirom na dobijene rezultate u ovom delu istraživanja, može se zaključiti da se jogurt od kozjeg mleka ne može klasifikovati kao čvrsti tip zbog veoma malih vrednosti modula elastičnosti, napona popuštanja i svih ispitivanih teksturalnih svojstava. Obogaćivanje mleka dodatkom IPM značajno je poboljšalo reološka, teksturalna i senzorna svojstva jogurta, i

približilo ovaj proizvod čvrstom jogurtu od kravljeg mleka po svojstvima, ali i dalje je jogurt od kozjeg mleka bio slabiji u pogledu većine ispitanih reoloških i teksturalnih parametara.

5.2. Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

5.2.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka

Određivanje fizičko-hemijskih svojstava mleka obavljeno je nakon uzorkovanja referentnim metodama navedenim u poglavlju 4.1.6.1, pri čemu je utvrđen sastav sirovog kozjeg mleka (G): $3,04 \pm 0,53\%$ mlečne masti, $2,69 \pm 0,05\%$ proteina, $11,13 \pm 0,93\%$ suve materije, i pH vrednost od $6,57 \pm 0,06$. Parametri sastava kozjeg mleka bili su uporedivi sa literaturnim podacima, a niži sadržaj proteina je karakterističan za period srednje laktacije tokom kog je mleko nabavljano, kako su drugi autori prethodno objavili (Kljajevic i sar., 2018; Miloradovic i sar., 2018).

Fizičko-hemijski sastav kravljeg mleka (C) bio je sledeći: $3,58 \pm 0,08\%$ mlečne masti, $3,31 \pm 0,22\%$ proteina, $12,26 \pm 0,41\%$ suve materije i pH $6,60 \pm 0,04$.

5.2.2. Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg i kravljeg mleka

Uticaj termičkog tretmana je bio značajan na sve reološke parametre kiselih gelova od kozjeg mleka osim za pH geliranja i trajanje fermentacije. Dodatak enzima mTG je značajno uticao na vrednost G' pri pH 4.6, module elastičnosti i viskoznosti pri 1 Hz nakon fermentacije i hlađenja gelova, kao i na tangens faznog ugla (Tabela 8).

Kada se posmatraju reološki parametri kisele koagulacije kozjeg mleka, moment geliranja nastupio je ranije i pri višoj pH kod G90 i G90TG uzoraka u poređenju sa nižim termičkim tretmanom. Najkraće vreme geliranja i najviša pH geliranja zabeleženi su kod kiselog gela G90.

Viši termički tretman mleka utiče na povećanje vrednosti pH u momentu geliranja, verovatno zbog više izoelektrične tačke proteina surutke koji denaturišu i formiraju komplekse sa κ -kazeinom (Robinson i sar., 2006). Sa druge strane, dodavanje mTG nije imalo uticaja na vreme geliranja i pH u tački geliranja. Slično tome, drugi autori su utvrdili da umrežavanje indukovano dejstvom enzima mTG nije značajno uticalo na brzinu acidifikacije niti na pH pri kojoj dolazi do agregiranja proteina (Lam i sar., 2019).

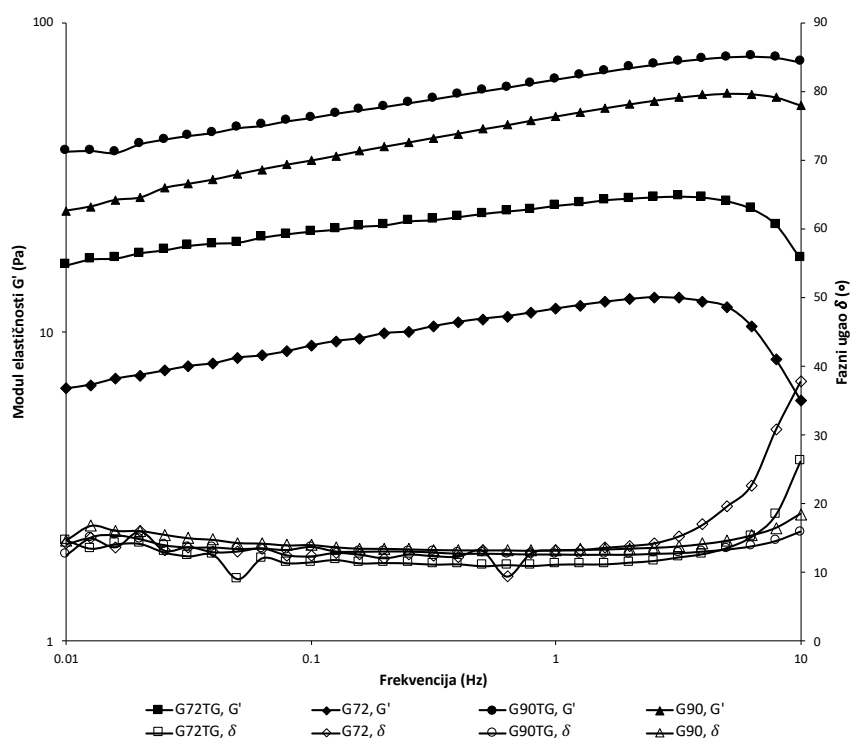
Najveća vrednost modula elastičnosti (G') na kraju fermentacije utvrđena je kod kiselog gela od visoko pasterizovanog mleka sa mTG (G90TG) i razlikovala se značajno od vrednosti dobijenih kod svih ostalih gelova. Ovakav rezultat ukazuje da dodatak enzima mTG doprinosi čvrstini kiselog gela mleka u ovoj fazi proizvodnje jogurta. Termički tretman je takođe značajno uticao na porast modula elastičnosti, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Lucey i sar., 1997a). Smatra se da na porast modula elastičnosti utiče umrežavanje denaturisanih proteina surutke termički tretiranog mleka u kiselom gelu. Prethodno pomenuti autori su takođe utvrdili i da termički tretman mleka istovremeno smanjuje obim deformacije smicanjem koju gel trpi u prinosnoj tački (tačka sloma strukture) što ukazuje na krti karakter takvog gela.

Tabela 8. Reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg mleka kao rezultat uticaja različitog termičkog tretmana i dodatka enzima mTG

Parametar	Kiseli gelovi od kozjeg mleka				Uticaj termičkog tretmana	Uticaj mTG	Interakcija faktora
	G72TG	G72	G90TG	G90			
Vreme geliranja (min)	202±60 ^a	194±61 ^a	124±17 ^{ab}	109±8 ^b	*	nz	nz
pH geliranja	4,95±0,5 ^a	4,82±0,2 ^a	5,03±0,2 ^a	5,05±0,05 ^a	nz	nz	nz
Vreme do pH 4,6 (min)	300±65 ^a	276±58,08 ^a	279±55 ^a	246±6 ^a	nz	nz	nz
G' pri pH 4,6 (Pa)	2,9±0,2 ^a	1,3±0,2 ^b	8,3±0,3 ^c	6,1±0,1 ^d	*	*	*
Napon popuštanja (Pa)	16,7±1,8 ^a	17,4±1,5 ^a	23±4,5 ^b	23,2±0,8 ^b	*	nz	nz
Modul elastičnosti, G' pri 1Hz (Pa)	25±0,6 ^a	11,2±0,7 ^b	63,7±1,8 ^c	47,3±2,4 ^d	*	*	*
Modul viskoznosti, G'' pri 1 Hz (Pa)	4,9±0,1 ^a	2,7±0,1 ^b	14,5±0,3 ^c	11,2±0,5 ^d	*	*	*
tan δ pri 1Hz	0,197±0,006 ^a	0,237±0,002 ^b	0,227±0,005 ^c	0,237±0,001 ^b	*	*	*

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu su statistički značajno različite (p<0,05). nz- nije značajno; * Nivo značajnosti (p<0,05)

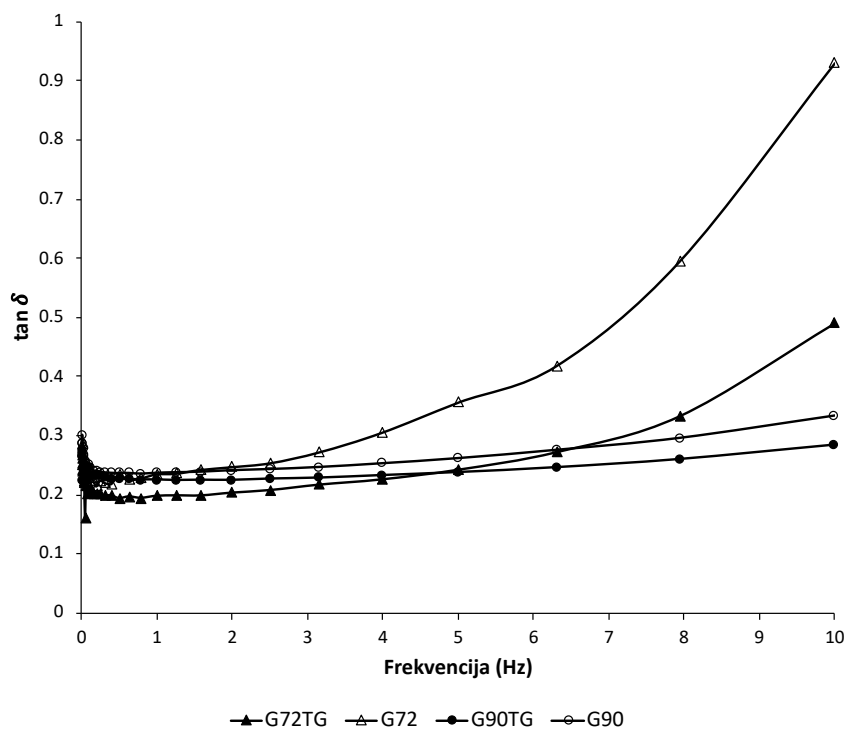
Značajno veće vrednosti prinosnog napona (napona popuštanja) zabeležene su kod kiselih gelova od mleka tretiranog višim termičkim režimom. Prethodno je utvrđeno da termički tretman mleka viši od 75 °C uzrokuje porast napona u tački popuštanja kiselih gelova (Lucey i sar., 1997a). Neki autori navode i da kiseli gelovi od termički tretiranog mleka koji se odlikuju većim vrednostima napona popuštanja (što odgovara većoj čvrstini) takođe imaju i niže vrednosti obima deformacije u tački u kojoj dolazi do kolapsa strukture, koja je onda okarakterisana kao krta ili „kratka“. Ovakvo stanje ukazuje na reorganizovanje strukture gela i veću sklonost ka sinerezi (Lucey, 2001). Porast vrednosti modula elastičnosti nakon hlađenja zabeležen je kod svih uzoraka, saglasno ranije objavljenim rezultatima (Lucey i sar., 1997a; Miocinovic i sar., 2016).



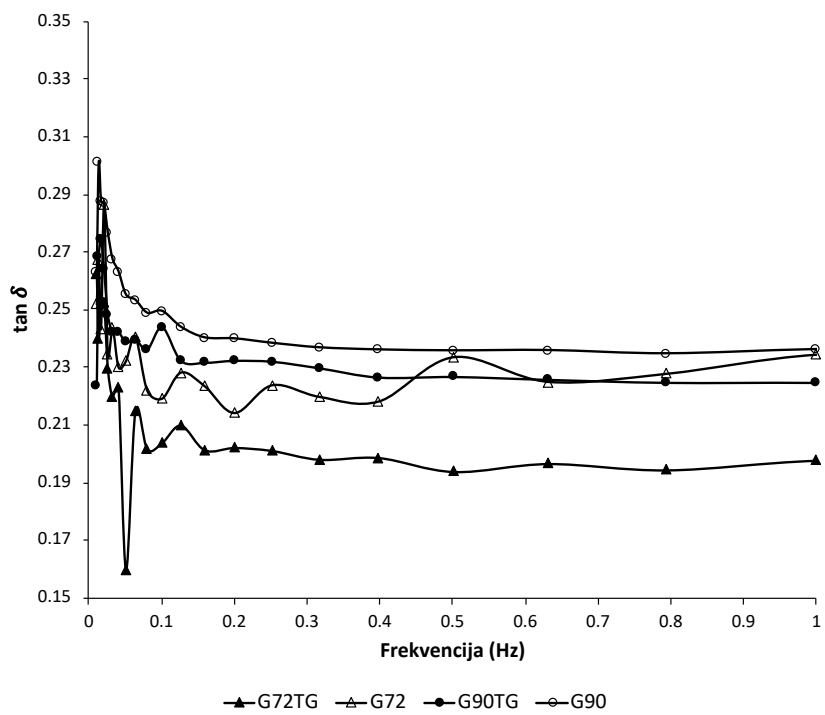
Grafik 1. Viskoelastična svojstva jogurta od kozjeg mleka ispitana testom variranja frekvencija (0,01 do 10 Hz). Grafikon predstavlja rezultate jednog reprezentativnog merenja od tri ponavljanja. Ispunjeni i šuplji simboli označavaju modul elastičnosti i fazni ugao, redosledno.

Rezultati dobijeni testom sa variranjem frekvencija pokazali su da su uzorci od kozjeg mleka sa enzimom mTG imali značajno veće vrednosti G' pri 1 Hz u poređenju sa onima koji nisu sadržali mTG, i to je bilo prisutno kod oba nivoa termičkog tretmana mleka: 24,96±0,64 (G72TG) i 63,65±1,77 (G90TG) nasuprot 11,20±0,67 (G72) i 47,33±2,39 (G90). Ove razlike su takođe uočljive i na Grafiku 1.

Tangens faznog ugla ($\tan \delta$) predstavlja odnos viskoznih i elastičnih svojstava i ukazuje na relaksiranje veza u sistemu (Peng i sar., 2009). Veće vrednosti favorizuju relaksiranje veza, zavisno od obima primenjene deformacije (frekvencije) i vremena tokom kog se dešavaju procesi poput sinerezi. Ukoliko se $\tan \delta$ tokom geliranja povećava, povećava se i mogućnost za reorganizovanje strukture. Prema Lucey (2001), porast $\tan \delta$ ubrzo nakon formiranja kiselog gela od termički tretiranog mleka, ukazuje na preuređenja i reorganizaciju interakcija unutar matriksa gela.



a)



b)

Grafik 2. $\tan \delta$ u funkciji frekvencije 0,01-10 Hz **a)** i 0,01-1 Hz **b)**, kiselih gelova od kozjeg mleka sa mTG (ispunjeni simboli) i bez mTG (šuplji simboli) tretiranog režimima: 72 °C/30 s (trouglasti simboli) i 90 °C/5 min (kružni simboli). Grafik prikazuje srednje vrednosti tri ponavljanja.

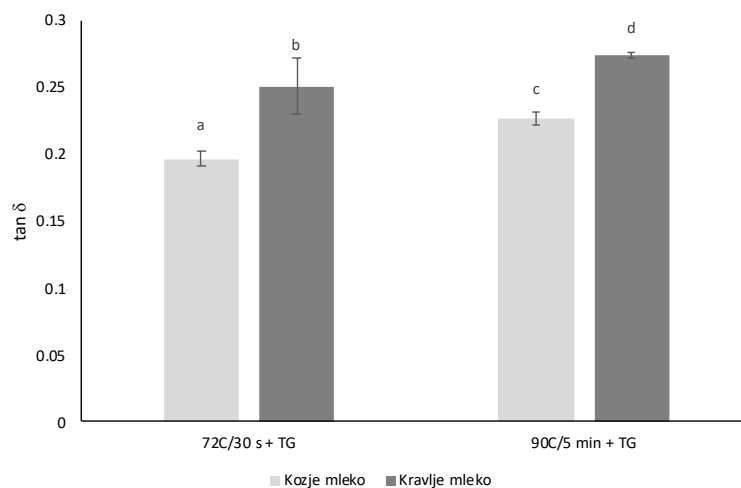
Kako se može videti sa Grafika 2, nakon hlađenja kiselih gelova na 5 °C, tan δ je porastao pri nižim frekvencijama nešto više kod gelova od visoko pasterizovanog mleka u poređenju sa nižim termičkim tretmanom, što je u saglasnosti sa drugim autorima (Lucey i sar., 1997a). Ovo ukazuje na veću sklonost gelova od mleka tretiranog na 90 °C/5 min ka sinerezisu. Pored toga, neki autori su utvrdili da kod kiselih gelova od termički tretiranog mleka dolazi do porasta tan δ tokom geliranja i do smanjenja obima deformacije u tački popuštanja što doprinosi preuređenju strukture i izdvajanju seruma (Lucey i sar., 1998b).

Dodatak mTG značajno je smanjio vrednosti tan δ pri 1 Hz, u poređenju sa uzorcima bez enzima (Tabela 8). Ovi rezultati govore u prilog zaključcima drugih autora da uvođenje kovalentnih veza dejstvom enzima mTG povećava elastičnost gelova (Jaros i sar., 2006b).

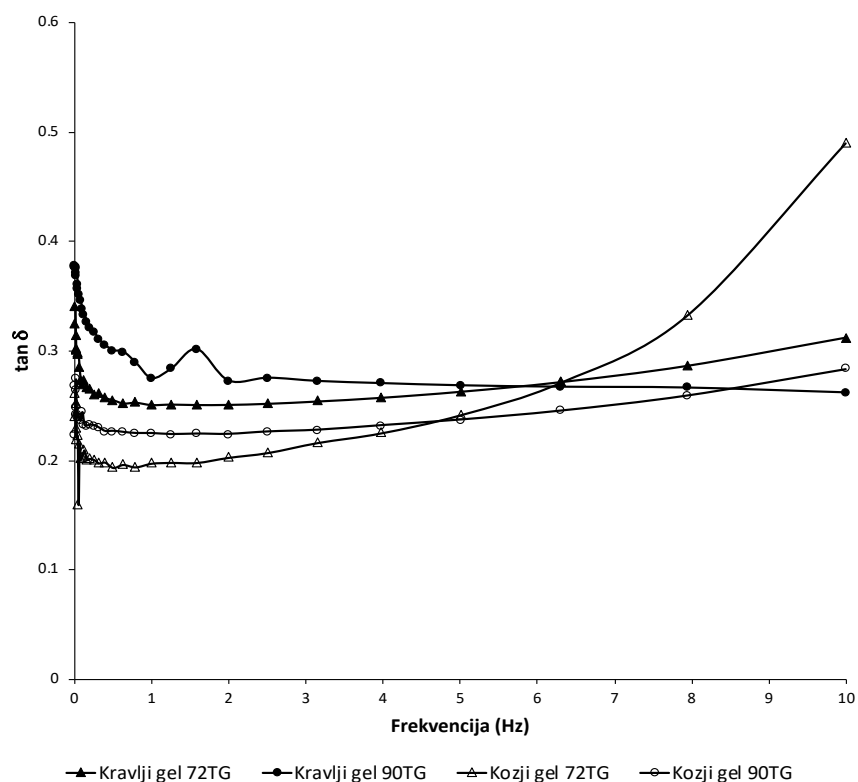
Uvođenje kovalentnih veza tretiranjem mleka sa mTG modifikuje strukturu kiselih gelova mleka, pri čemu je utvrđeno da takvi gelovi imaju povećanu čvrstinu, manju permeabilnost i mnogo finiju mikrostrukturu nego gelovi od mleka koje nije tretirano sa mTG (Lorenzen i sar., 2002).

U ovom ogledu nisu utvrđene statistički značajne razlike u vremenu fermentacije između jogurta sa i bez enzima kao ni između različitih termičkih tretmana, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Bönisch i sar., 2007).

Kako je prethodno pomenuto, variranjem obima deformacije tokom testa sa različitim opsegom frekvencija, dobija se uvid u prirodu veza koje postoje u proteinskoj mreži ispitivanog gela. Reološki parametri kiselih gelova od kravljeg mleka, ukazuju na postojanje značajnih razlika između varijante proizvedene oštrim režimom pasterizacije (90 °C/5 min) i svih ostalih varijanti kiselih gelova, bez obzira na poreklo mleka. Na osnovu log – log grafika modula elastičnosti (G') u funkciji frekvencije (rezultati nisu prikazani) dobijene su vrednosti nagiba pravih tipične za kisele gelove mleka. Tretman 72 °C/30 s dao je manje nagibe kod kozjeg (0,09) i kravljeg (0,13) mleka, u poređenju sa vrednostima nagiba nakon tretmana 90 °C/5 min kozjeg (0,11) i kravljeg (0,19) mleka. Ovi rezultati ukazuju da se priroda i tip veza u proteinskom matriksu gela razlikuju u zavisnosti od primenjenog termičkog tretmana. Navedene vrednosti nagiba pravih log – log grafika modula elastičnosti (G') u funkciji frekvencije za uzorke kiselih gelova dobijene visokom pasterizacijom mleka (90 °C/5 min) su uporedive sa onima prikazanim prethodno u Tabeli 6.



Grafik 3. Uporedni prikaz uticaja termičkih tretmana na tangens faznog ugla ($\tan \delta$ pri 1 Hz, kiselih gelova od kozjeg i kravljeg mleka. Podaci predstavljaju prosečne vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Različita slova ukazuju na značajnu razliku ($p < 0.05$).



Grafik 4. $\tan \delta$ u funkciji frekvencije (opseg 0,01-10 Hz) kiselih gelova od kravljeg (ispunjeni simboli) i kozjeg (šuplji simboli) mleka tretiranog režimima: 72 °C/30 s (trouglasti simboli) i 90 °C/5 min (kružni simboli). Grafik prikazuje srednje vrednosti tri ponavljanja.

Tabela 9. Poređenje reoloških svojstva kiselih gelova od kozjeg i kravljeg mleka nakon različitih termičkih tretmana i dodatka enzima mTG

Parametar	Kiseli gel od kozjeg mleka		Kiseli gel od kravljeg mleka	
	72 °C/30 s + TG	90 °C/5 min + TG	72 °C/30 s + TG	90 °C/5 min + TG
Vreme geliranja (min)	202±60 ^a	124±17 ^b	112±26 ^b	37±3 ^c
pH geliranja	4,95±0,49 ^a	5,03±0,16 ^a	5,04±0,19 ^a	5,74±0,03 ^b
Vreme do pH 4,6 (min)	300±65 ^a	279±55 ^{ab}	201±27 ^b	271±14 ^{ab}
G' pri pH 4,6 (Pa)	2,9±0,2 ^a	8,3±0,3 ^b	2,9±0,8 ^a	180,2±5,3 ^c
Napon popuštanja (Pa)	16,7±1,8 ^a	23±4,5 ^b	25,2±4,6 ^b	111±1 ^c
Modul elastičnosti, G' pri 1Hz (Pa)	25±0,6 ^a	63,7±1,8 ^a	60±9 ^a	1662±62 ^b
Modul viskoznosti, G'' pri 1 Hz (Pa)	4,9±0,1 ^a	14,5±0,3 ^a	15±1,3 ^a	457±21 ^b
tan δ pri 1Hz	0,197±0,006 ^a	0,227±0,005 ^b	0,251±0,021 ^c	0,275±0,002 ^d

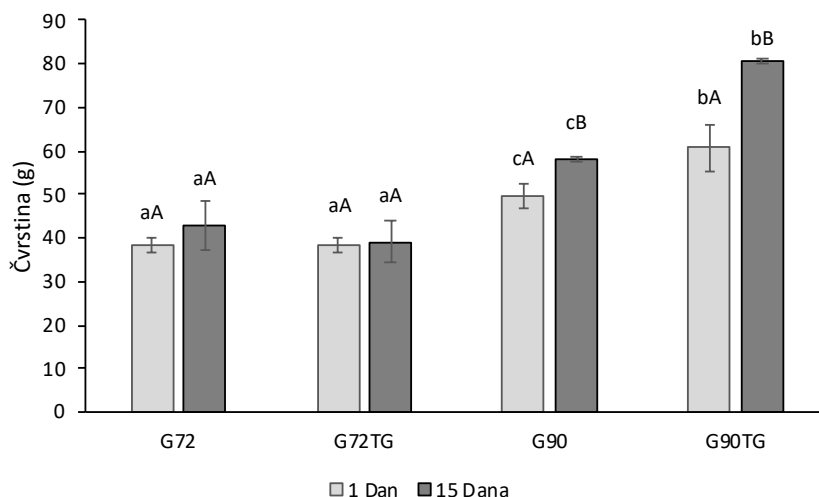
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu su statistički značajno različite (p<0,05).

5.2.3 Uticaj transglutaminaze, termičkih tretmana i skladištenja na teksturalna svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

Primenom testa jednostepene kompresije za analizu teksture jogurta 24 h nakon proizvodnje, zabeležene su najveće vrednosti čvrstine i konzistencije kod jogurta proizvedenog od mleka tretiranog režimom 90 °C/5 min uz dodatak mTG. Nakon 15 dana skladištenja, ispitivanje teksture je takođe potvrdilo da je jogurt G90TG imao najveću čvrstinu, konzistenciju i kohezivnost. Izmerene vrednosti kod ove varijante jogurta su se statistički značajno razlikovale od ostalih uzoraka (Tabela 10 i Grafik 5). Uticaj faktora enzima i termičkih tretmana je bio značajan na čvrstinu i konzistenciju jogurta u obe tačke skladištenja.

Kada se porede vrednosti čvrstine jogurta nakon 1 i 15 dana skladištenja (Grafik 5), porast je bio značajan i kod G90TG i kod G90 jogurta. Međutim kao što se može uočiti enzim je ispoljio izraženiji uticaj što se ogleda u značajno većoj vrednosti čvrstine za ovu varijantu jogurta u poređenju sa uzorkom bez enzima (G90). Ovo se može objasniti simultanim dejstvom starter bakterija i mTG, koje ima snažan uticaj na teksturu finalnog proizvoda, što se pripisuje pojavi daljeg umrežavanja tokom hladnog skladištenja (Lorenzen i sar., 2002; Neve i sar., 2001).

Povećanje koncentracije enzima do određenog nivoa uzrokuje porast čvrstine i elastičnosti gela. Ukupan broj veza je od ključne važnosti za porast čvrstine gela pri malim deformacijama, što je predstavljeno G' vrednošću, ali i hidrofobne interakcije imaju značajnu ulogu. Porast čvrstine gela pod uticajem termičkog tretmana mleka, određivan penetracionim testom merenjem sile razaranja, uslovljen je većim brojem snažnijih interakcija kao što su disulfidne veze (Jaros i sar., 2006b).

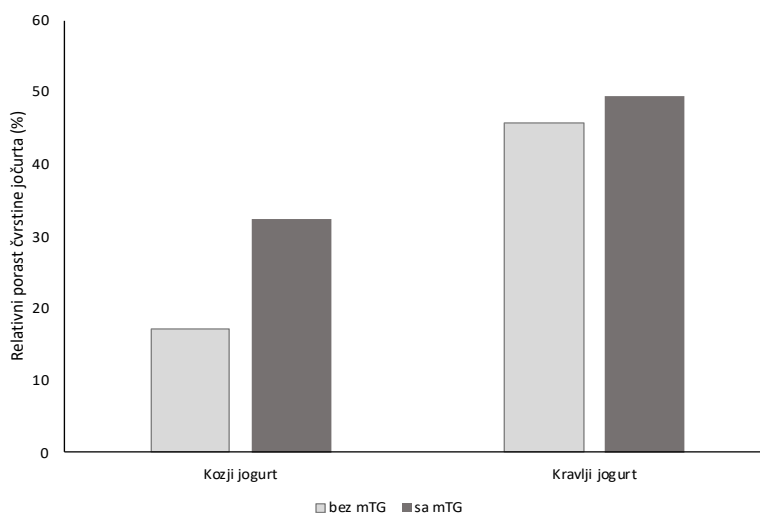


Grafik 5. Čvrstina jogurta od kozjeg mleka određena instrumentalnim merenjem nakon 1 i 15 dana skladištenja. Vrste jogurta: G90TG (tretman mleka na 90 °C/5 min sa mTG); G90 (kontrola za tretman 90 °C/5 min); G72TG (tretman mleka na 72 °C/30 s sa mTG); G72 (kontrola za tretman 72 °C/30 s). Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; različita mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku između jogurta za isti period skladištenja; različita velika slova ukazuju na značajne razlike za isti jogurt kada se porede 1 i 15 dana skladištenja; ($p < 0,05$).

Rezultati ove disertacije su u saglasnosti sa Domagała i sar. (2013) koji su takođe utvrdili da tretman kozjeg mleka sa mTG poboljšava teksturalna svojstva čvrstog tipa jogurta u poređenju sa uzorkom bez ovog enzima.

Analizom rezultata teksture jogurta od kravljeg mleka (Tabela 11), može se uočiti da je uticaj termičkog tretmana bio značajan za sve ispitivane parametre teksture i nakon 1 i 15 dana skladištenja proizvoda. Kao što je i očekivano, tekstura jogurta od kravljeg mleka tretiranog na 90 °C/5 min je bila značajno bolja u odnosu na uzorke od mleka tretiranog na 72 °C/30 s. Enzim mTG je ispoljio značajan uticaj na povećanje čvrstine i konzistencije jogurta od visoko pasterizovanog kravljeg mleka (C90TG), samo nakon 15 dana skladištenja. Nasuprot tome, pozitivan uticaj dodatka enzima na porast pomenutih parametara teksture zabeležen je u jogurtu od kozjeg mleka (G90TG) i posle 1 i 15 dana skladištenja.

Relativni porast vrednosti čvrstine jogurta od kravljeg i kozjeg mleka tretiranog enzimom mTG nakon 15 dana skladištenja iznosio je: 49,5% (C90TG) i 32,3% (G90TG), u poređenju sa kontrolnim uzorcima kod kojih je porast bio 45,6% (C90) odnosno 17,2% (G90). Ovo ukazuje da je značaj dodatka mTG u cilju poboljšanja čvrstine jogurta veći u slučaju kozjeg mleka (Grafik 6), dok je uticaj na čvrstinu jogurta od kravljeg mleka daleko manji. Međutim, i nakon dodavanja ovog enzima, vrednosti svih parametara teksture jogurta od kozjeg mleka bile su višestruko niže u odnosu na analogne uzorke od kravljeg mleka.



Grafik 6. Poređenje relativnog porasta čvrstine jogurta od visoko pasterizovanog kravljeg i kozjeg mleka sa (C90TG, G90TG) i bez mTG (C90, G90) nakon 15 dana skladištenja

Tabela 10. Teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka kao rezultat uticaja termičkih tretmana, dodatka enzima (mTG) i skladištenja

Parametri	Jogurti od kozjeg mleka				Uticaj termičkog tretmana	Uticaj mTG	Interakcija	
	G72TG	G72	G90TG	G90				
Dan 1	Čvrstina (g)	38,2±1,7 ^{aA}	38,4±1,9 ^{aA}	60,8±5,3 ^{bA}	49,7±2,6 ^{cA}	*	*	nz
	Konzistencija (gs)	797±103 ^{aA}	753±52 ^{aA}	1478±97 ^{bA}	1217±97 ^{cA}	*	*	nz
	Kohezivnost (g)	20,7±2,5 ^{aA}	20,3±1,8 ^{aA}	24,7±2 ^{aA}	20,1±3,4 ^{aA}	nz	nz	nz
Dan 15	Čvrstina (g)	39,2±4,7 ^{aA}	42,9±5,4 ^{aA}	80,5±0,6 ^{bB}	58,2±0,5 ^{cB}	*	*	*
	Konzistencija (gs)	732±200 ^{aA}	860±35 ^{aB}	1997±40 ^{bB}	1463±86 ^{cA}	*	*	*
	Kohezivnost (g)	17,6±4,2 ^{aA}	24,4±4,8 ^{bA}	39,5±2,2 ^{cB}	25,5±2,1 ^{bA}	*	nz	*

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija;

Vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu (mala slova) i u istoj koloni (velika slova) su statistički značajno različite ($p < 0,05$); nz- nije značajno;

* Nivo značajnosti ($p < 0,05$).

Tabela 11. Teksturalna svojstva jogurta od kravljeg mleka kao rezultat uticaja termičkih tretmana, dodatka enzima (mTG) i skladištenja

Parametri	Jogurti od kravljeg mleka				Uticaj termičkog tretmana	Uticaj mTG	
	C72TG	C72	C90TG	C90			
Dan 1	Čvrstina (g)	91,3±5,8 ^{aA}	83,1±12,7 ^{aA}	378±25 ^{bA}	332±42 ^{bA}	*	nz
	Konzistencija (gs)	2326±133 ^{aA}	2221±346 ^{aA}	9118±574 ^{bA}	8326±838 ^{bA}	*	nz
	Kohezivnost (g)	52±5 ^{aA}	52±11 ^{aA}	257±37 ^{bA}	278±27 ^{bA}	*	nz
Dan 15	Čvrstina (g)	100±15 ^{aA}	92,3±14,6 ^{aA}	565±30 ^{bB}	483±31 ^{cB}	*	*
	Konzistencija (gs)	2529±341 ^{aA}	2410±392 ^{aA}	13629±1080 ^{bB}	11222±951 ^{cB}	*	*
	Kohezivnost (g)	61±15 ^{aA}	58,8±11,1 ^{aA}	286±23 ^{bA}	255±22 ^{bA}	*	nz

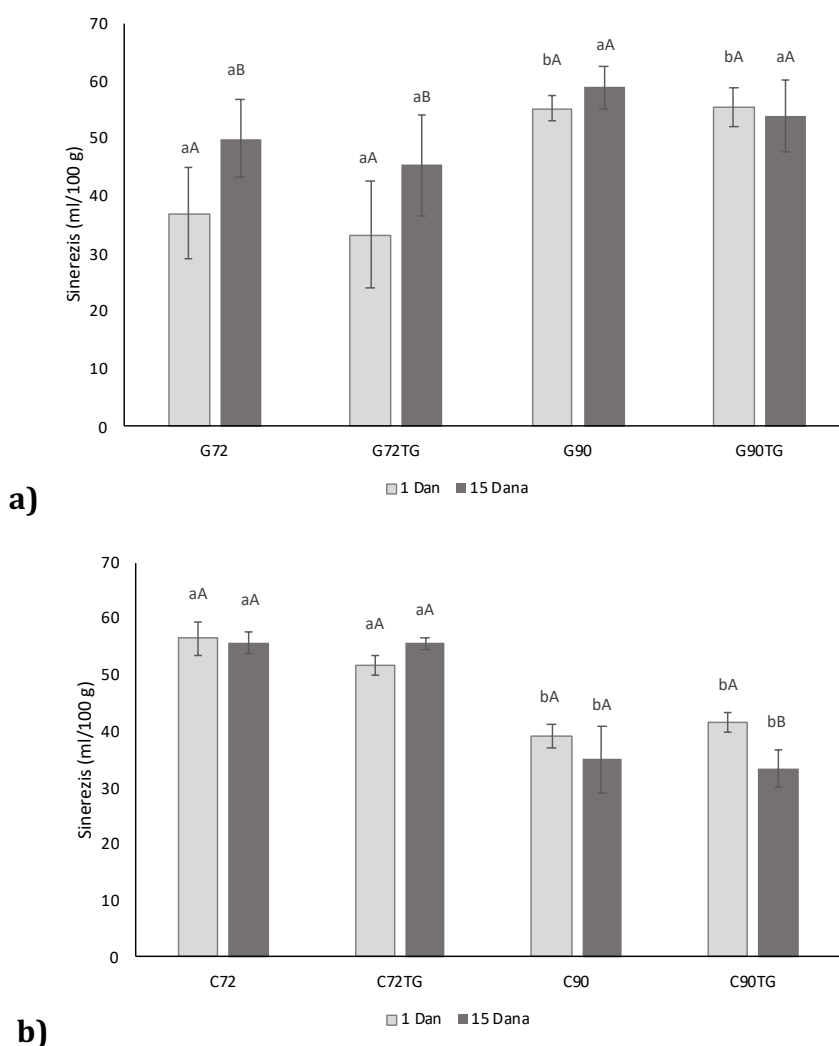
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija;

Vrednosti sa različitim superskriptom u istom redu (mala slova) i u istoj koloni (velika slova) su statistički značajno različite ($p < 0,05$); nz- nije značajno;

* Nivo značajnosti ($p < 0,05$).

5.2.4 Uticaj transglutaminaze i termičkih tretmana na sinerezis i sposobnost vezivanja vode jogurta od kozjeg i kravljeg mleka

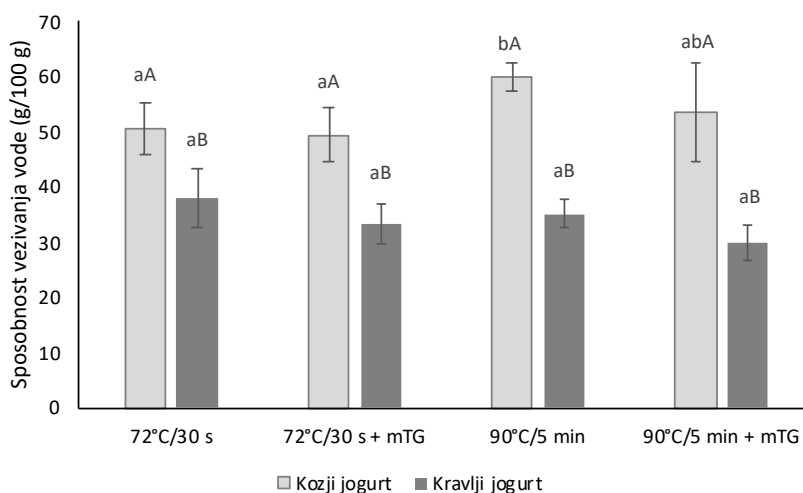
Rezultati određivanja nivoa sinerezisa (Grafik 7a) ukazuju da iako su jogurti od kozjeg mleka tretiranog na 90 °C/5 min ispoljili izraženiji sinerezis 24 h nakon proizvodnje, ovi uzorci su bili stabilniji tokom hladnog skladištenja kako nisu imali značajan porast količine izdvojene surutke nakon 15 dana, nasuprot jogurtima od mleka tretiranog blažim termičkim tretmanom. Pored toga, dodatak enzima nije imao uticaj na količinu izdvojene surutke kod uzoraka proizvedenih primenom oba režima pasterizacije. U saglasnosti sa rezultatima za jogurte od visoko pasterizovanog mleka, Domagała i sar. (2013) takođe su zabeležili sličan nivo sinerezisa i kod jogurta sa mTG (1 U/g proteina) i kod kontrolnog uzorka, koji nije sadržao enzim.



Grafik 7. Spontani sinerezis jogurta od **kozjeg (G a)** i **kravljeg (C b)** mleka nakon 1 i 15 dana skladištenja (izražen u ml izdvojene surutke na 100 g jogurta). Vrste jogurta: G90TG i C90TG (tretman mleka na 90 °C/5 min sa mTG); G90 i C90 (kontrola za tretman 90 °C/5 min); G72TG i C72TG (tretman mleka na 72 °C/30 s sa mTG); G72 i C72 (kontrola za tretman 72 °C/30 s). Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; različita mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku između jogurta za isti period skladištenja; različita velika slova ukazuju na značajne razlike za isti jogurt kada se porede 1 i 15 dana skladištenja; (p<0,05).

Interesantna pojava je da je zabeležen niži nivo sinerezisa kod jogurta od blaže pasterizovanog mleka. Ovo može biti posledica veće aktivnosti *S. thermophilus*, koji produkuje egzopolisaharide (EPS), nakon ovog termičkog tretmana. Takođe se može pretpostaviti da je deo native mikrobiote mogao preživeti blaži režim pasterizacije i uzrokovao pojavu mukozne i tegljive teksture jogurta koja je uočena kod G72 i G72TG jogurta, ali ne i kod G90 ili G90TG. Međutim neophodna su dodatna ispitivanja u cilju potvrde ovih hipoteza.

Instrumentalno ispitivanje teksture je zabeležilo manju čvrstinu jogurta od mleka tretiranog na 72 °C, ali očigledno su ovi tipovi jogurta uspeali da vežu više surutke nego jogurti od mleka pasterizovanog na 90°C. Prethodno je objavljeno da su fermentisani mlečni proizvodi koji sadrže EPS-produkujuće starter kulture, manje čvrsti u poređenju sa kontrolnim jogurtom (Hassan i sar., 1996). Egzopolisaharidi poseduju izraženu sposobnost vezivanja vode, što rezultuje povećanom retencijom vode u jogurtu (Amatayakul i sar., 2006). Sa tim u vezi, na Grafiku 8 može se uočiti da je 24 h nakon proizvodnje, centrifugiranjem izdvojena manja količina surutke iz jogurta proizvedenih blažim režimom pasterizacije kozjeg mleka, što ukazuje na veću sposobnost vezivanja vode ovih uzoraka u poređenju sa oštrijim režimom pasterizacije. Enzim nije ispoljio značajan uticaj na zadržavanje vode u jogurtu, mada se može zapaziti da je kod jogurta od kozjeg mleka tretiranog na 90 °C sa dodatkom mTG smanjena prosečna količina izdvojene surutke centrifugiranjem u poređenju sa kontrolnim uzorkom.

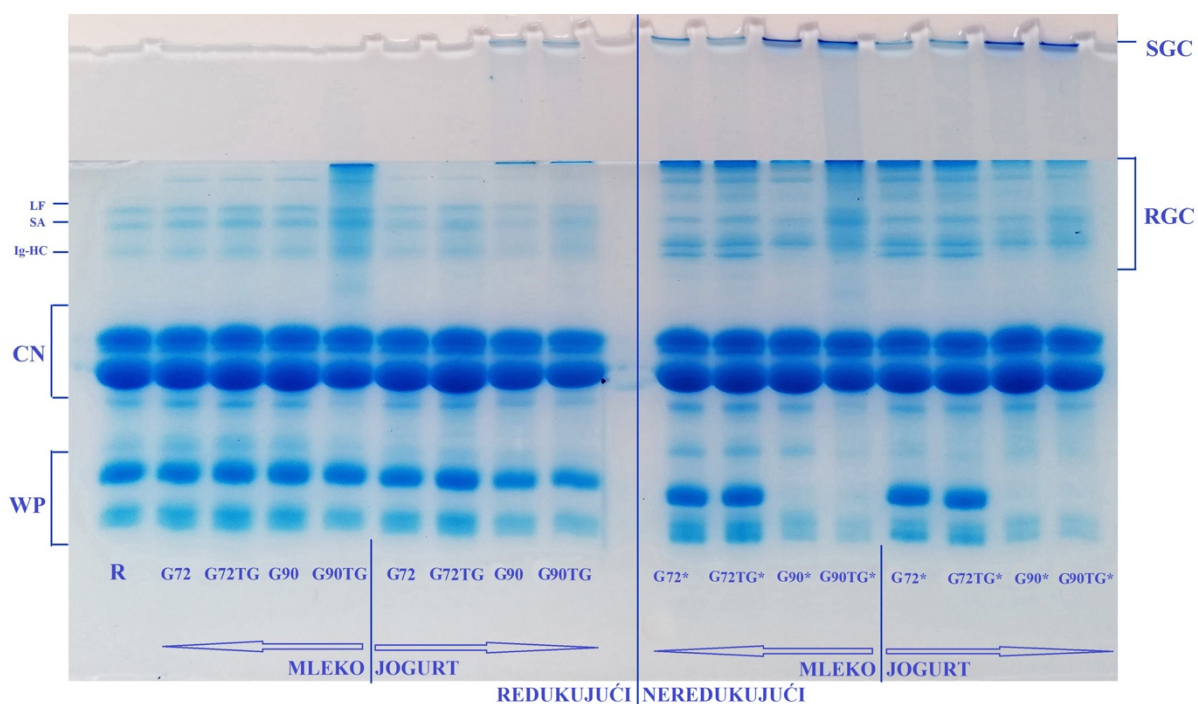


Grafik 8. Sposobnost vezivanja vode jogurta određena metodom centrifugiranja nakon 1 dana skladištenja. Jogurti od kozjeg i kravljeg mleka proizvedeni su različitim termičkim tretmanima mleka, sa ili bez mTG. Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija; različita mala slova ukazuju na statistički značajnu razliku između jogurta od iste vrste mleka; različita velika slova ukazuju na značajne razlike kod jogurta istog tipa od različite vrste mleka; ($p < 0,05$).

5.2.5. SDS PAGE

Uticaj dodatka enzima (mTG) na umrežavanje proteina u mleku, može se uočiti posmatranjem traka G90 i G90TG na elektroforetogramu (Slika 5). Zapaža se smanjeni intenzitet obojenja linija koje predstavljaju frakcije kazeina u G90 trakama i pojava rasutog zamućenja na delu gela za razdvajanje u traci G90TG. Ovo zamućenje umesto jasno definisane linije, ukazuje da je došlo do formiranja većeg broja umreženih molekula sa molekulskom masom od oko 50 kDa (IgHC), 78 kDa (LF) i nešto većih. Međutim, kompleksi velike molekulske mase (SGC) nisu uočeni, što ukazuje da mTG nema tendenciju da povezuje veliki broj monomera zajedno.

Kada je reč o efektu aktivnosti starter kulture na umrežavanje, poređenje uzoraka mleka i jogurta sa mTG i u redukujućim i u neredukujućim uslovima otkrilo je da acidifikacija doprinosi daljem umrežavanju. Trake uzoraka jogurta i u redukujućim (G90TG) i u neredukujućim (G90TG*) uslovima, sadrže definisane linije u poređenju sa odgovarajućim mlekom (G90TG i G90TG*) (Slika 5). Štaviše, trake ovih uzoraka jogurta sadrže i komplekse velike molekulske mase koji se mogu uočiti kao linije na ulasku u gel za koncentrisanje. Vidljivi kompleksi na gelu za razdvajanje (RGC) koji su prisutni kod mleka tretiranog sa mTG, gotovo da su u potpunosti nestali u odgovarajućim (analognim) jogurtima, što ukazuje da su sadržali molekule koji su uključeni u proces umrežavanja tokom acidifikacije. Jogurti bez enzima (mTG) imali su gotovo identične profile kao i mleko od kog su proizvedeni. Međutim, smanjenje intenziteta obojenja linija kazeina kod jogurta u redukujućim i neredukujućim uslovima (G90TG i G90TG*) praćeno pojavom agregata koji nisu ušli u gel za koncentrisanje, u poređenju sa svojim analogima bez mTG, sugeriraju da je došlo do promena izazvanih dejstvom mTG.



Slika 5. SDS PAGE elektroforetogrami kozjeg mleka i jogurta pripremljenih u redukujućim i neredukujućim (trake obeležene sa *) uslovima [R – sirovo mleko, G90 – mleko tretirano na 90 °C/5 min (i odgovarajući jogurt), G90TG mleko tretirano na 90 °C/5 min sa mTG (i odgovarajući jogurt), G72 - mleko tretirano na 72 °C/30 s (i odgovarajući jogurt), G72TG - mleko tretirano na 72 °C/30s sa mTG (i odgovarajući jogurt)]; skraćenice [SGC – kompleksi gela za koncentrisanje, RGC – kompleksi gela za razdvajanje, CN – kazein, WP – proteini surutke, LF – laktoferin, SA – serum albumin, Ig-HC – imunoglobulin teškog lanca].

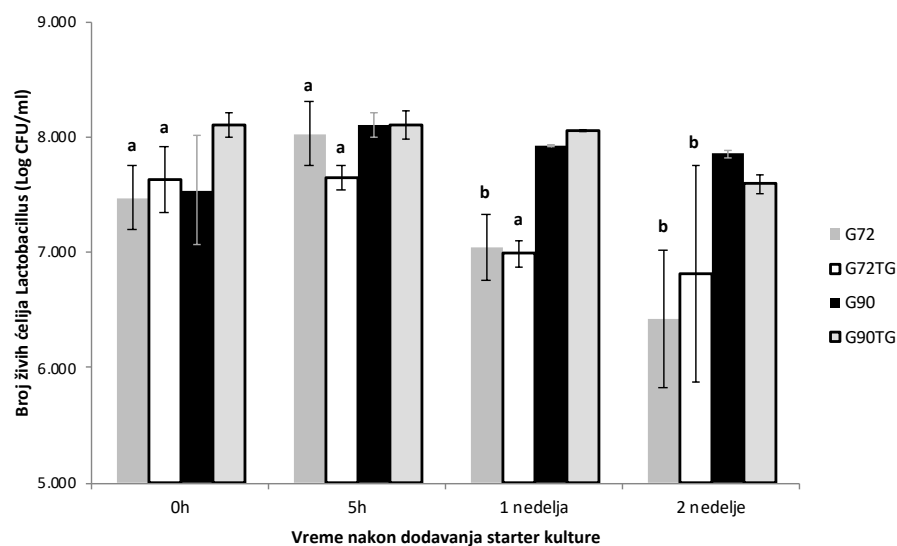
Promene na proteinima surutke su bile evidentnije kod visoko pasterizovanog mleka, što je u saglasnosti sa Ardelean i sar. (2013). Primećuje se da je α -laktalbumin (α -la) bio reaktivniji prema mTG nego β -laktoglobulin (β -lg), što se ogleda u izraženijem smanjenju intenziteta obojenja linija α -la u odnosu na β -lg u trakama uzoraka sa mTG. Rezultati ove disertacije predložili su da pasterizacija mleka na 90 °C pre reakcije sa mTG poboljšava reaktivnost proteina mleka prema umrežavanju. Termička denaturacija proteina surutke kao i preuređenja komponenata kazeina u micelarnoj strukturi putem niza reakcija agregiranja i disocijacije do kojih dolazi tokom termičke obrade mleka, pospešuju reaktivnost proteina prema umrežavanju (Rodriguez-Nogales, 2006).

Kazeini u mTG- tretiranom mleku su podložni umrežavanju prema opadajućem redosledu: κ -kazein > β -kazein > α_s -kazein, što indikuje da se umrežavanje dešava i na površini i u jezgri kazeinske micelle (Lam i sar., 2018). Ovakav sled se može primetiti i na Slici 5, kada se uporede trake mleka G90TG i G90TG* sa njihovim kontrolnim uzorcima bez enzima. Ardelean i sar. (2013) su utvrdili da se nakon inkubacije mleka sa 3 U mTG/g proteina na 40 °C tokom 60 min, pojavljuju nove linije koje sadrže dimere i oligomere kazeina formirane umrežavanjem aktivnošću mTG.

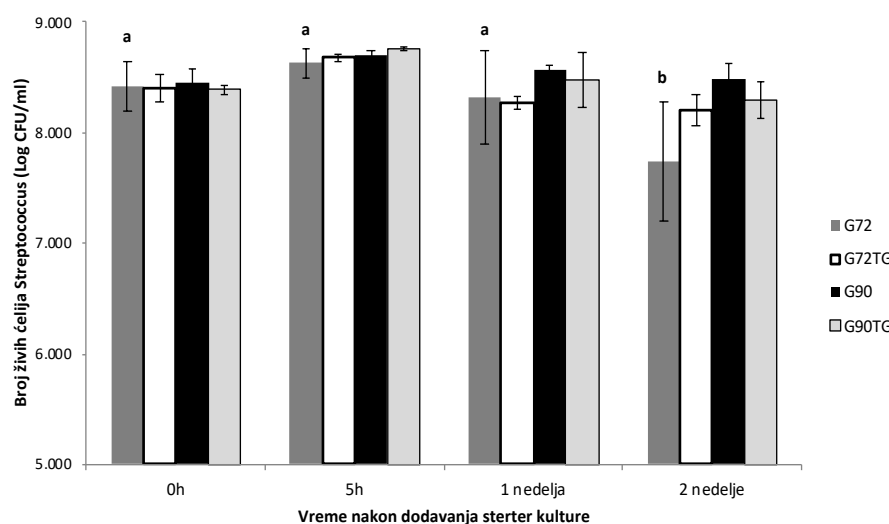
Afinitet enzima mTG prema proteinima je uslovljen dostupnošću i lokacijom ostataka glutamina i lizina (Jaros i sar., 2006a). Koncentracija reaktivnih ostataka lizina i glutamina može se povećati termičkim tretmanom mleka. SDS PAGE analiza obezmašćenog mleka tretiranog visokim termičkim tretmanom i inkubiranim sa mTG, otkrila je smanjenje intenziteta obojenja linija koje predstavljaju kazeine i serum proteine sa produženjem vremena inkubacije (Lorenzen i Neve, 2003).

5.2.6 Uticaj termičkih tretmana, transglutaminaze i skladištenja na broj bakterija startera i pH jogurta od kozjeg mleka tokom skladištenja

Grafici 9 a) i b) ilustruju da je 5 h nakon dodatka starter kulture, broj živih ćelija dva soja bakterija, bio uporediv kod kontrolnih jogurta (bez mTG) i kod jogurta sa mTG. Vijabilnost *S. thermophilus* značajno je opala posle dve nedelje skladištenja u G72 jogurtu, ali ne i u jogurtu sa enzimom (G72TG). mTG je takođe ispoljio stabilizujući efekat na vijabilnost laktobacila u G72TG jogurtu tokom skladištenja, gde je značajan pad broja živih ćelija zabeležen nakon dve nedelje dok je u jogurtu bez enzima (G90) do ovog pada došlo nedelju dana ranije (Grafik 9). Stabilizujući uticaj enzima mTG na održivost laktobacila prethodno su utvrdili Neve i sar. (2001) kod jogurta od kravljeg mleka. Pored toga, pomenuti autori nisu zabeležili značajan pad u broju *S. thermophilus* tokom šest nedelja skladištenja jogurta bez enzima, nasuprot rezultatima ove disertacije za G72 jogurt. Takođe, Neve i sar. (2001) su objavili da je vijabilnost ovog mikroorganizma značajno opala nakon dve nedelje skladištenja u njihovim jogurtima od kravljeg mleka tretiranog enzimom mTG, u suprotnosti sa rezultatima ove disertacije za G72TG jogurt od kozjeg mleka. Ove razlike navode na zaključak da dodavanje mTG kozjem mleku poboljšava vijabilnost *S. thermophilus* u jogurtu tokom skladištenja, nasuprot efektu koji ima u kravljem mleku.



a)



b)

Grafik 9. Broj ćelija bakterija *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* **a)** i *Streptococcus thermophilus* **b)** u kozjem mleku i jogurtu, određen nakon: 0 h i 5 h posle dodatka starter kulture; nakon 1 i 2 nedelje skladištenja jogurta. Stubići predstavljaju jogurte: G72 (■), G72TG (□), G90 (■) i G90TG (□). Različita slova ukazuju na značajne razlike kod istog tipa jogurta između različitih perioda. Prikazani rezultati su srednje vrednosti ± standardna devijacija; ($p < 0,05$).

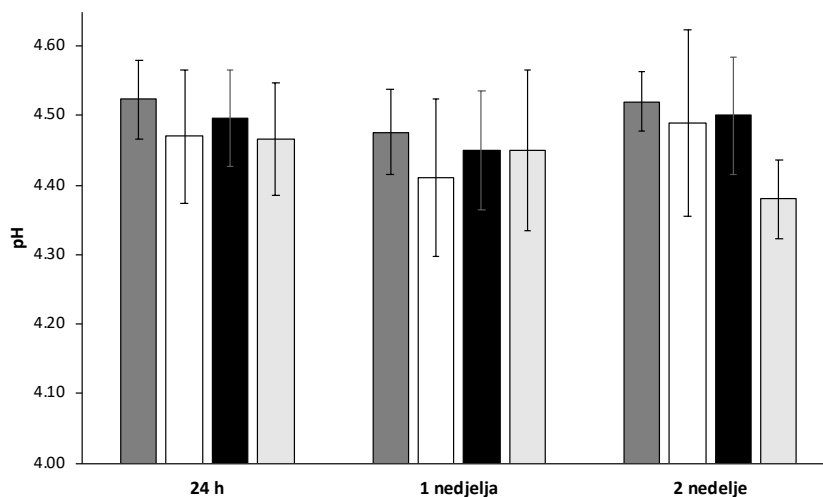
U drugoj studiji je dokazano da enzimatsko umrežavanje proteina indukovano aktivnošću mTG ima pozitivan efekat na preživljavanje probiotskih bakterija u jogurtu od kozjeg mleka (Farnsworth i sar., 2006).

Verovatno je pad broja laktobacila nakon jedne nedelje skladištenja u G72 jogurtu uticao i na pad broja *S. thermophilus* koji je usledio nakon dve nedelje u istom uzorku. Ova dva mikroorganizma imaju simbiotsku vezu u kojoj *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* proteolitičkom aktivnošću obezbeđuje amino kiseline, koje služe kao glavni faktor rasta za *S. thermophilus*. Prethodno je objavljeno da bakterije jogurtne starter kulture poseduju metaboličku aktivnost tokom prve dve nedelje skladištenja (Neve i sar., 2001).

Značajan uticaj visokog termičkog tretmana na preživljavanje oba mikroorganizma može se pripisati potpunijoj eliminaciji kompetitivne mikrobiote u visoko pasterizovanom mleku (90 °C) kao i poboljšanom nutritivnom kvalitetu mleka usled oslobađanja malih peptida i amino kiselina (Tamime i Robinson, 1999). Pored toga, visok termički tretman dovodi do

efikasnijeg uklanjanja rastvorenog kiseonika, što pospešuje rast anaerobnih laktobacila (Mortazavian i sar., 2006).

U ovom ogledu nije zabeležena statistički značajna promena pH jogurta tokom skladištenja (Grafik 10). Sa tim u vezi, Farnsworth i sar. (2006) takođe nisu utvrdili značajne razlike ni u titracionoj kiselosti, niti u pH između jogurta od kozjeg mleka koji je sadržao mTG i kontrolnog bez enzima. Visok termički tretman mleka doprinosi i povećanju pufernog kapaciteta mleka (Salaün i sar., 2005), što može objasniti odsustvo značajnih promena pH vrednosti tokom skladištenja jogurta G90 i G90TG.



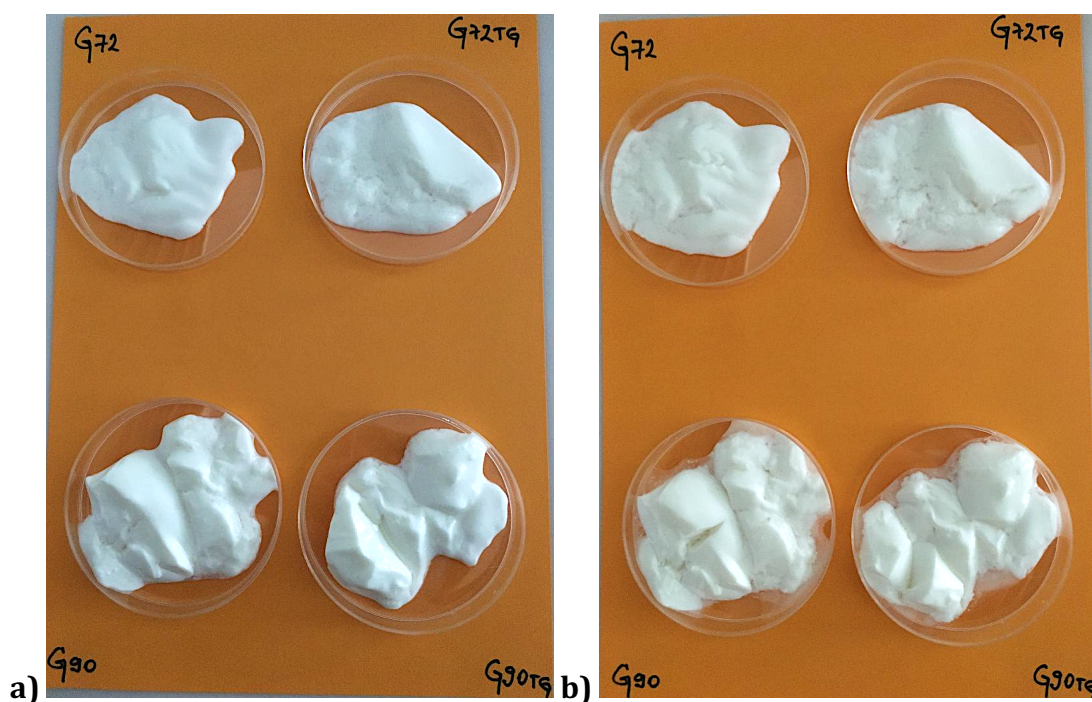
Grafik 10. pH jogurta tokom skladištenja. Stubići predstavljaju jogurte: G72 (■), G72TG (□), G90 (■) i G90TG (□). Prikazani rezultati su srednje vrednosti ± standardna devijacija; ($p < 0,05$).

Činjenica da pH nije opala dovoljno tokom prve nedelje skladištenja kako bi indukovala i zabeleženo smanjenje broja laktobacila u G72 jogurtu, navodi na pretpostavku da su antimikrobna svojstva kozjeg mleka možda imala ulogu u tome (Atanasova i Ivanova, 2010), ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ova hipoteza ispitala.

5.2.7. Senzorna svojstva jogurta od kozjeg mleka

Prosečne vrednosti ocena senzornih svojstava jogurta od kozjeg mleka prikazane su u Tabeli 12. Uticaji termičkog tretmana i skladištenja na ocenjivane parametre kvaliteta bili su značajni. Svi uzorci jogurta su imali belu boju, bez prisustva izdvojene surutke na površini do kraja ispitivanog perioda hladnog skladištenja.

Opšti izgled jogurta G90 ocenjen je značajno nižom prosečnom ocenom u poređenju sa ostalim proizvodima, uz primećenu pojavu grudvičaste konzistencije od strane pojedinih članova ocenjivačkog panela, jedan dan nakon proizvodnje. Sa druge strane, analogni jogurt koji je sadržao enzim mTG (G90TG) dobio je višu prosečnu ocenu i ova mana proizvoda nije primećena. Tokom skladištenja ocena opšteg izgleda G90 jogurta se značajno popravila. Tekstura jogurta G72TG se senzorno takođe značajno poboljšala u poređenju sa G72.



Slika 6. Izgled jogurta od kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanom bez (G72 i G90) i sa transglutaminazom (G72TG i G90TG) dan nakon proizvodnje, slikano neposredno po uzimanju uzorka **a)** i nakon 10 min **b)**

Značajno više prosečne ocene za teksturu dodeljene su jogurtima G90 i G90TG nakon jednog i sedam dana skladištenja u poređenju sa G72 i G72TG, što je i instrumentalnom analizom teksture nakon 24 h potvrđeno. Međutim, duže skladištenje je eliminisalo ovu razliku, pri čemu je prosečna ocena dodeljena za G72TG jogurt bila slična oceni datoj proizvodima od visoko pasterizovanog mleka nakon dve nedelje skladištenja. U poređenju sa instrumentalno dobijenim rezultatima parametara teksture, veća vrednost konzistencije koja je instrumentalno izmerena kod G72 jogurta nakon skladištenja, senzorno nije opažena od strane ekspertskeg panela. Senzornom ocenom je ustanovljeno da su neki elementi teksture jogurta G72TG poboljšani tokom skladištenja, što sa druge strane instrumentalna analiza teksture nije utvrdila. Međutim, može se uočiti da je velika standardna devijacija bila pridružena uz instrumentalno određenu srednju vrednost konzistencije, što ukazuje da je možda potreban veći broj ponavljanja merenja.

Svi članovi stručnog panela istakli su pojavu tegljive i sluzave teksture G72 i G72TG jogurta, koja je bila prisutna tokom celokupnog perioda skladištenja. Nasuprot tome, tekstura

jogurta G90 i G90TG opisana je kao odlična i čvrsta nakon jednog dana, mada je nakon dužeg skladištenja opažena kao slaba uz pridruženi opis „vodenastog“ ukusa. Ovaj utisak se može povezati sa prirodom kiselog gela od visoko pasterizovanog mleka koji se odlikuje većom čvrstinom, ali manjom elastičnošću (krta struktura) usled čega je podložnija sinerezisu (Lucey et al., 1997a).

Jogurte G90 i G90TG odlikovao je izraženiji karakterističan „kozji“ ukus nakon jednog dana u poređenju sa jogurtima od blaže pasterizovanog mleka i bio je primetan u manjoj meri tokom skladištenja, nakon čega su panelisti zapazili dominantno kiseli ili čak „prazan“ ukus ovih uzoraka. Jogurti G72 i G72TG su imali blaži ukus nakon jednog dana, dok je skladištenje intenziviralo „kozji“ ukus ovih proizvoda.

Ispitivanje uticaja niza različitih koncentracija mTG (0, 2, 4, 6 i 8 U/g) na senzorna svojstva jogurta od kozjeg mleka pokazalo je da povećanje koncentracije enzima ima negativan uticaj na ukus jogurta (Abdulqadr i sar., 2014). Takođe, neki autori su utvrdili da mTG može da inhibira formiranje acetaldehida u jogurtu, i taj ukus su opisali kao „manje specifičan za jogurt“ (Lorenzen i sar., 2002; Ozer i sar., 2007). Nasuprot tome, u ovom ogledu nisu zabeležene značajne razlike u ukusu između jogurta sa mTG i kontrole pri koncentraciji enzima koja je korišćena (1 U/G proteina).

Tabela 12. Senzorna ocena jogurta od kozjeg mleka kao rezultat uticaja termičkih tretmana mleka, dodatka enzima mTG i skladištenja proizvoda

Period skladištenja	Parameter	Vrste jogurta			
		G72	G72TG	G90	G90TG
1 Dan	Opšti izgled	4,98±0,07 ^{aA}	4,98±0,07 ^{aA}	4,79 ±0,35 ^{bA}	4,90 ±0,17 ^{abA}
	Miris	4,88±0,20 ^{aA}	4,92± 0,16 ^{aAC}	4,94±0,11 ^{aA}	4,81 ±0,30 ^{aA}
	Ukus	4,50± 0,32 ^{aA}	4,65± 0,31 ^{aA}	4,69± 0,44 ^{aA}	4,42± 0,56 ^{aA}
	Tekstura	4,06±0,43 ^{aA}	4,06±0,48 ^{aA}	4,60± 0,36 ^{bA}	4,88±0,20 ^{bA}
7 Dana	Opšti izgled	5,00 ± 0,00 ^{aA}	5,00 ± 0,00 ^{aA}	5,00 ± 0,00 ^{aB}	5,00 ± 0,00 ^{aA}
	Miris	5,00 ± 0,00 ^{aA}	5,00 ± 0,00 ^{aA}	5,00 ± 0,00 ^{aA}	5,00 ± 0,00 ^{aA}
	Ukus	4,80 ± 0,27 ^{aA}	4,75 ± 0,25 ^{aA}	4,50 ± 0,35 ^{aA}	4,50 ± 0,35 ^{aA}
	Tekstura	3,90 ± 0,42 ^{aA}	3,90 ± 0,42 ^{aA}	4,55 ± 0,37 ^{bA}	4,55 ± 0,37 ^{bA}
15 Dana	Opšti izgled	4,95±0,11 ^{aA}	5,00± 0,00 ^{aA}	5,00± 0,00 ^{aB}	5,00± 0,00 ^{aA}
	Miris	4,85 ±0,22 ^{aA}	4,75± 0,25 ^{aBC}	4,85± 0,22 ^{aA}	4,90± 0,22 ^{aA}
	Ukus	4,40± 0,29 ^{aA}	4,55± 0,37 ^{aA}	4,65± 0,42 ^{aA}	4,65± 0,42 ^{aA}
	Tekstura	4,15± 0,49 ^{aA}	4,55± 0,37 ^{abB}	4,70± 0,45 ^{bA}	4,70 ±0,45 ^{bA}

Vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dva ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim slovom u istom redu (mala slova) i u istoj koloni (velika slova) značajno se razlikuju ($p < 0,05$).

5.3. Uticaj termičkih tretmana kozjeg mleka na reološka i teksturalna svojstva jogurta

5.3.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka

Za ovaj segment oglada korišćeno je mleko koza Sanske rase sledećeg prosečnog sastava: $3,1 \pm 0,2\%$ mlečne masti, $2,64 \pm 0,04\%$ proteina, $7,22 \pm 0,11\%$ suve materije bez masti i pH $6,72 \pm 0,06$, koje je podvrgnuto različitim termičkim tretmanima ($72\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$, $85\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$ i $95\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$). Navedeni sastav mleka je uporediv sa parametrima sastava mleka koza Sanske rase koje su objavili Kljajevic i sar. (2016) i Miloradovic i sar. (2017), sa tim što je sadržaj mlečne masti u pomenutim studijama bio niži. Međutim, poznato je da fizičko-hemijski sastav mleka varira tokom godine i u istom stadiu, u zavisnosti od ishrane, uslova u kojima se životinje čuvaju i perioda laktacije (Park i sar., 2006).

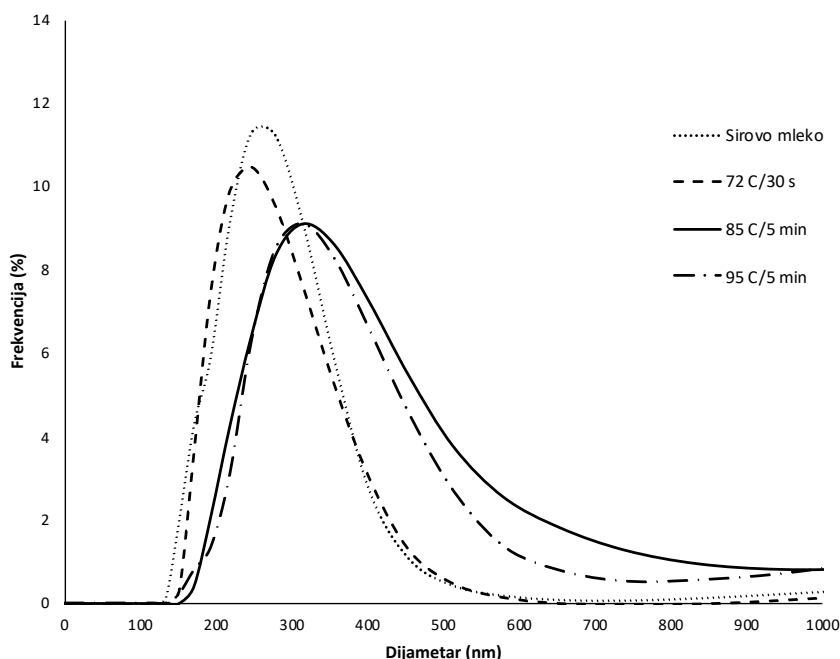
5.3.2. Veličina kazeinskih micela kozjeg mleka

Rezultati DLS merenja ukazuju da se prosečna veličina micela nije promenila nakon termičkog tretmana kozjeg mleka na $72\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ u poređenju sa sirovim mlekom ($\sim 253\text{ nm}$). Sa druge strane, tretiranje kozjeg mleka višim temperaturama uzrokovalo je značajan porast srednje vrednosti dijametra kazeinske micelle do $\sim 360\text{ nm}$ i $\sim 321\text{ nm}$, zagrevanjem na $85\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$ odnosno $95\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$, (Tabela 13).

Tabela 13. Veličina kazeinske micelle kao rezultat uticaja termičkih tretmana kozjeg mleka

Termički tretman	Srednja vrednost (nm)	Najčešća vrednost (nm)	PI
Sirovo mleko	253 ± 15^a	225 ± 32	$0,53 \pm 0,05$
$72\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$	253 ± 11^a	232 ± 1	$0,60 \pm 0,02$
$85\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$	360 ± 14^b	292 ± 34	$0,54 \pm 0,08$
$95\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$	321 ± 3^c	281 ± 32	$0,55 \pm 0,09$

Prikazane su srednje vrednosti minimum tri ponavljanja \pm standardna devijacija; Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). PI - indeks polidisperzije sistema.

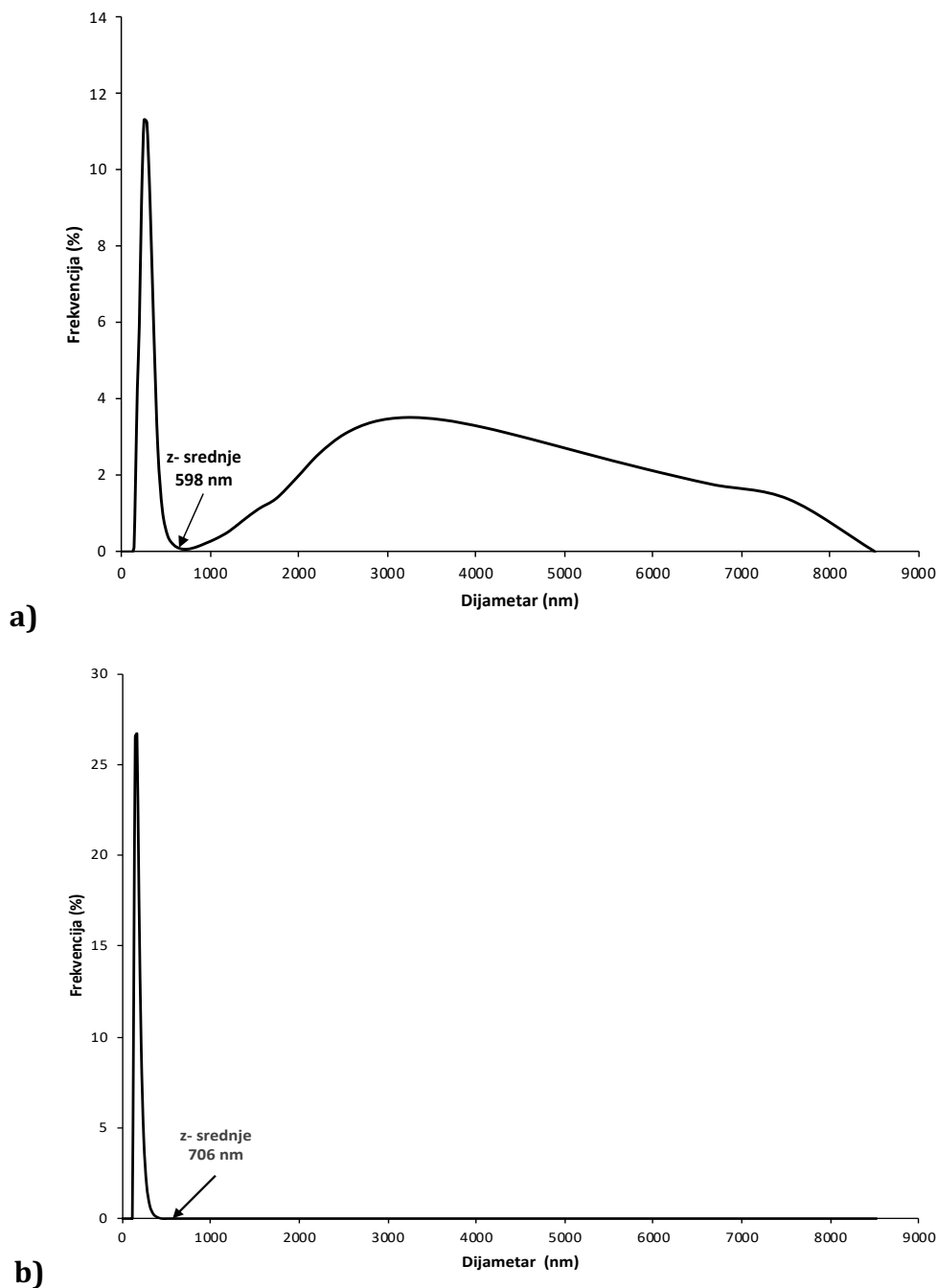


Grafik 11. Uticaj termičkog tretmana mleka na distribuciju veličina kazeinskih micela u kozjem mleku. Krive predstavljaju usrednjene vrednosti minimum tri ponavljanja (raspodela veličina na osnovu intenziteta rasejane svetlosti).

Porast dijametra micela uzrokovana termičkim tretmanom posledica je više faktora, pre svega intenzivnog formiranja agregata micela i proteina surutke, kao i porasta voluminoznosti micela usled termički indukovane precipitacije fosfata (Jeurnink i De Kruif, 1993; Raynal i Remeuf, 1998). Kako su Anema i Li (2003) utvrdili, većina promena u veličini kazeinske micelle posledica je povezivanja denaturisanih proteina surutke sa površinom micelle. Ipak, ovi autori nisu mogli utvrditi da li su uočene promene veličine nastale isključivo zbog vezivanja proteina surutke na površini micela ili i zbog delimičnog agregiranja kazeinskih micela koje se dešava istovremeno i proporcionalno je nivou proteina surutke koji su vezani sa kazeinskim micelama, mada su postavili i tu hipotezu.

Raynal i Remeuf (1998) su objavili da se veličina micela u kozjem mleku nakon zagrevanja na 75 °C nije promenila, ali je porasla nakon tretmana na 85 °C i ostala ista i na 90 °C. Rezultati ove disertacije pokazuju da se na osnovu vrednosti srednjih prečnika micela može zaključiti da je termički tretman mleka na 95 °C/5 min doveo do značajno manjih veličina micela, u poređenju sa rezultatima koje je proizveo tretman 85 °C/5 min. Ovakav rezultat može se objasniti pojavom disocijacije kazeina nakon oštrog termičkog tretmana (95 °C/5 min), pogotovo κ -kazeina (Singh i Creamer, 1991) koji reaguje sa denaturisanim proteinima surutke u serumu mleka. Objašnjenje bi bilo i da se κ -kazein u formi kompleksa sa proteinima surutke oslobađa iz micelle u serum fazu. Druge studije su utvrdile da κ -kazein disosuje već na temperaturama koje su niže od temperatura denaturacije proteina surutke i da dostiže maksimum pre maksimuma denaturacije proteina surutke. Takođe je sugerisano da pored toga što disocijacija κ -kazeina može prethoditi denaturaciji proteina surutke, prvenstveno dolazi do interakcija denaturisanih proteina surutke sa κ -kazeinom iz serumske faze (Anema, 2008b; Anema i sar., 2007). Pored toga, istaloženi kalcijum-fosfat kao posledica delovanja termičkog tretmana više ne može održati integritet native micelle usled čega se favorizuje disocijacija kazeina (Anema i Klostermeyer, 1997), ili dolazi do „skupljanja“ micelle (Jeurnink i De Kruif, 1993). Međutim, raspodele prikazane na Grafiku 11 i odgovarajuće vrednosti najčešćih vrednosti prečnika ne podržavaju u potpunosti zaključak o smanjenju veličina micela. Na osnovu svih pomenutih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi da je do smanjenja došlo.

Razlog leži u postojanju malog broja čestica sa velikim dijametrima u uzorcima, koje negativno utiču na preciznost merenja i o kojima će biti reči dalje u tekstu.



Grafik 12. Raspodela veličina micela kazeina sirovog kozjeg mleka na osnovu **intenziteta** rasejane svetlosti **(a)** i na osnovu **broja (b)**. Krive predstavljaju usrednjene vrednosti minimum tri ponavljanja.

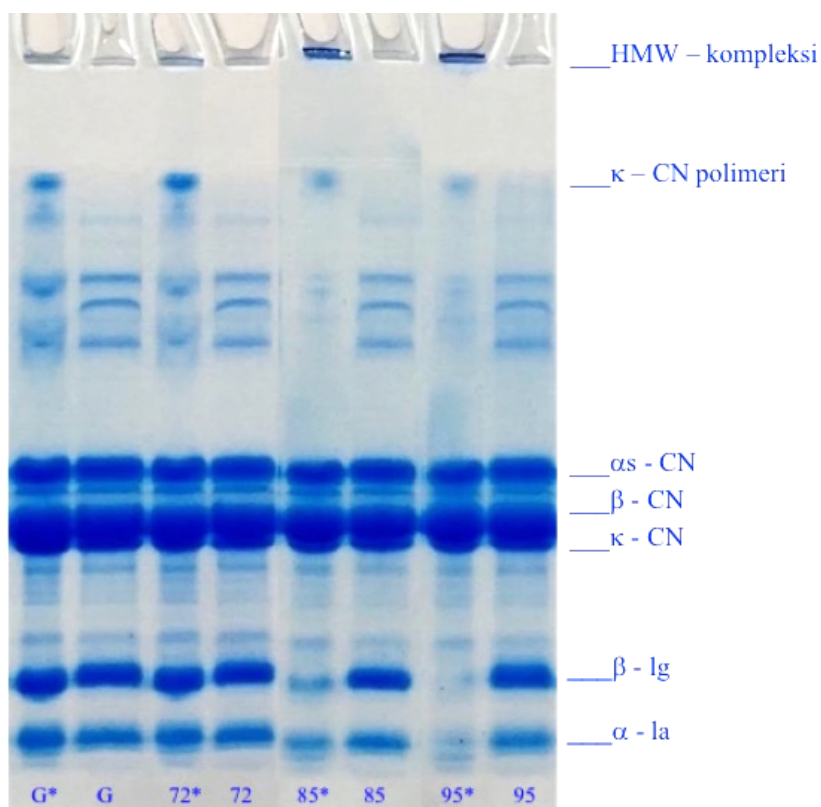
Osnovna veličina koja se najčešće prikazuje kao rezultat DLS merenja je z-srednje (engl. z- average), međutim ova vrednost ima smisla samo ukoliko je raspodela monomodalna i monodisperzna. Iz ovog oglada na osnovu indeksa polidisperzije se može zaključiti da su uzorci polidisperzni, stoga predstavljanje vrednosti z- srednje ne bi bilo reprezentativno. Može se takođe uočiti da osim kazeinskih micela u uzorcima postoje i veće čestice, sa širokom raspodelom veličina u mikrometarskoj oblasti (nađeno kod svih uzoraka, prikazano za sirovo

mleko na Grafiku 12a. Broj velikih čestica je mali, što se vidi i iz nepostojanja pika u prikazanoj raspodeli prema broju (Grafik 12b). Treba napomenuti da se široka raspodela (> 1000 nm) ne može tumačiti kao kvantitativan rezultat, s obzirom na činjenicu da njen oblik, širina i pozicija maksimuma nimalo nisu ponovljivi u uzastopnim merenjima. Razlog pojave širokog pika u prikazanoj raspodeli na osnovu intenziteta jeste to što intenzitet rasejanja svetlosti zavisi od dijametra čestice na šesti stepen, tako da mali broj velikih čestica može dovesti do velikih intenziteta. Ovo je takođe objašnjenje zašto je raspodela na osnovu broja uvek pomerena ka nižim vrednostima u poređenju sa raspodelom zasnovanom na intenzitetu rasejane svetlosti. Na Grafiku 12 su prikazane i vrednosti z-srednje koje očigledno nemaju nikakvog realnog smisla.

Može se zaključiti da u uzorcima sirovog i termički tretiranog mleka preovladavaju kazeinske micelle čija veličina zavisi od termičkog tretmana. Detektovane su i veće čestice u jako malom broju koje mogu predstavljati zaostale globule mlečne masti ili agregate manjih micela.

5.3.3. SDS PAGE

Posmatranjem elektroforetograma (Slika 7) sirovog i različitim termičkim režimima tretiranog kozjeg mleka, može se zapaziti pojava kompleksa koji nisu mogli da difunduju u gel za koncentrisanje. Ovo su zapravo proteinski kompleksi velike molekulske mase (engl. high molecular weight/ HMW- kompleksi) povezani disulfidnim vezama, koji se uočavaju kod uzoraka mleka tretiranih na $85\text{ }^{\circ}\text{C}/5$ min i $95\text{ }^{\circ}\text{C}/5$ min pripremljenih u neredukujućim uslovima. Takođe, primetno je značajno ireverzibilno kovalentno agregiranje proteina surutke kod uzoraka tretiranih temperaturama preko $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pored toga, kod uzorka 95* (pripremljenog u neredukujućim uslovima), evidentan je veći stepen denaturacije β -laktoglobulina nakon tretmana od $95\text{ }^{\circ}\text{C}/5$ min.



Slika 7. SDS PAGE elektroforetogrami sirovog (G) i termički tretiranog (72, 85 i 95 oznake odgovaraju termičkim tretmanima od: $72\text{ }^{\circ}\text{C}/30$ s, $85\text{ }^{\circ}\text{C}/5$ min i $95\text{ }^{\circ}\text{C}/5$ min) kozjeg mleka pripremljenog u redukujućim i neredukujućim (*) uslovima.

U neredukujućim uslovima, uočljivo je značajno smanjenje intenziteta obojenja linija koje odgovaraju glavnim proteinima surutke (β -lg i α -la) kao i pojava polimera κ -kazeina (κ -CN) u uzorcima tretiranim na temperaturama preko 72 °C. Može se primetiti takođe i da je α -laktalbumin bio stabilniji u poređenju sa β -laktoglobulinom, što je u saglasnosti sa drugim autorima (Pesic i sar., 2012).

5.3.4. Uticaj termičkih tretmana na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg mleka

Utvrđene su značajne razlike u prosečnim vremenima geliranja i dužini fermentacije (vreme do postizanja pH 4,6) između kiselih gelova od mleka Sanske rase koza, tretiranog različitim termičkim tretmanima (Tabela 14). Najkraća vremena, za oba pomenuta parametra, zabeležena su kod uzorka mleka tretiranog na 85 °C/5 min (B), dok su najduža vremena nađena kod uzorka tretiranog režimom od 72 °C/30 s (A). pH u tački geliranja kod uzorka A (4,67) bila je značajno niža ($p < 0,05$) od pH geliranja kod uzorka B i C ($4,91 \pm 0,10$ i $4,88 \pm 0,10$, redosledno). Skraćenje vremena geliranja i porast pH u tački geliranja usled termičkog tretmana takođe je utvrđeno kod kravljeg mleka (Lucey i sar., 1998a; Lucey i sar., 1997a). U saglasnosti sa rezultatima ove disertacije, Lucey i sar. (1997a) su utvrdili da se pH u tački geliranja povećava sa porastom temperature termičkog tretmana do 85 °C, nakon čega dalji porast temperature nema uticaja na pH geliranja. Ova termički izazvana promena je posledica više izoelektrične tačke proteina surutke (5,2 – 5,3) koji denaturišu i formiraju komplekse sa κ -kazeinom i na taj način doprinose da do agregiranja dođe ranije.

Tabela 14. Uticaj termičkih tretmana na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg mleka

Parametar	Termički tretmani - vrste jogurta		
	72 °C/30 s - A	85 °C/5 min -B	95 °C/5 min - C
Vreme geliranja (min)	247±13 ^a	118±6 ^b	168±22 ^c
pH geliranja	4,67±0,04 ^a	4,91±0,10 ^b	4,88±0,10 ^b
Vreme do pH 4,6 (min)	310±36 ^a	241±21 ^b	277±20 ^c
G' pri pH 4,6 (Pa)	1,12±0,11 ^a	3,7±0,5 ^b	2,0±0,15 ^c
Modul elastičnosti, G' pri 1 Hz (Pa)	9,5±1,9 ^a	27,5±9,3 ^b	25,5±1,7 ^b
Modul viskoznosti, G'' pri 1 Hz (Pa)	2,23±0,38 ^a	6,65±2,34 ^b	6,52±0,4 ^b
tan δ	0,235±0,006 ^a	0,241±0,005 ^b	0,256±0,003 ^b
Napon popuštanja (Pa)	12,3±2,1 ^a	19,5±1,7 ^b	17,1±1,5 ^c

Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija; Vrednosti sa različitim slovom u superskriptu u istom redu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Iz Tabele 14, mogu se uočiti značajno različite vrednosti G' na kraju fermentacije (pH 4,6) između različitih jogurta. Najveći modul elastičnosti izmeren je kod B varijante jogurta (85 °C/5 min) dok je najnižu vrednost imao uzorak A (72 °C/30 s). Ovakav rezultat je indikacija za

postojanje većeg broja jačih veza u proteinskom matriksu kiselog gela od mleka tretiranog na 85 °C/5 min u poređenju sa ostalim kiselim gelovima (Roefs i sar., 1990; van Vliet i sar., 1991).

Svi ispitani kiseli gelovi mleka imali su isti trend porasta vrednosti G' nakon hlađenja na 5 °C, što je verovatno posledica bubrenja kazeinskih micela i povećanja kontaktne površine između čestica koje čine gel (Lucey i sar., 1997a), kao i prirode proteinske mreže. Međutim, kiseli gelovi od mleka tretiranog oštrijim termičkim režimom (85 °C/5 min i 95 °C/5 min) imali su značajno veće vrednosti G' , G'' i tangensa faznog ugla ($\tan \delta$) u poređenju sa uzorkom od mleka tretiranog blažim tretmanom (72 °C/30 s).

Prosečne vrednosti napona popuštanja značajno su se razlikovale ($p < 0,05$) između ispitivanih kiselih gelova. Najveći napon popuštanja utvrđen je kod uzorka B, od mleka tretiranog na 85 °C/5 min, što ukazuje da je struktura ovog gela manje podložna urušavanju (frakturi) i reorganizovanju u odnosu na druga dva gela. Poređenja radi, Lucey i sar. (1997a) su utvrdili da zagrevanje mleka na temperaturama preko 75 °C dovodi do porasta napona popuštanja kiselih gelova od kravljeg mleka i zabeležili su maksimalnu vrednost kod uzorka od mleka tretiranog na 85 °C/15 min, nakon čega je dalji porast temperature uzrokovao opadanje vrednosti ovog napona. Generalno, svojstva gela koja karakterišu podložnost ka urušavanju strukture, zavise od broja veza na poprečnom preseku proteinskih lanaca kao i od jačina veza (van Vliet i sar., 1991), stoga niže vrednosti napona popuštanja utvrđene kod kiselog gela C od 95 °C/5 min tretiranog mleka, ukazuju da ovaj termički tretman dovodi do slabljenja veza.

Razlike u reološkim svojstvima kiselih gelova mleka ispitanih u ovom ogledu, posledica su različitih termičkih tretmana mleka. Poznato je da termički tretman mleka uzrokuje denaturaciju proteina surutke, koji se vežu za kazeinske micelle i tokom acidifikacije ovi formirani agregati se ponašaju kao mostovi između kazeinskih micela čineći veze u proteinskom matriksu jačim, što za posledicu ima i veće vrednosti G' (Lucey i Singh, 1997). Pored toga, koncentracija proteina koji su uključeni u geliranje je povećana zbog aktivnog učesća denaturisanih proteina surutke u uspostavljanju strukture kiselog gela. Oba ova faktora su odgovorna za porast G' kiselih gelova od termički tretiranog mleka kada se uporede sa gelovima od sirovog ili blažim termičkim režimom tretiranog mleka.

Većina studija o kiseloj koagulaciji kravljeg mleka su utvrdile pozitivan uticaj termičkog tretmana na reološka svojstva kiselih gelova (Dannenberg i Kessler, 1988a, 1988b; Lee i Lucey, 2003; Lucey i sar., 1997a). Međutim vrednosti reoloških parametara u slučaju gelova od kravljeg mleka poput G' , daleko su veće u poređenju sa kozjim mlekom zbog suštinskih razlika u svojstvima komponenata ovih mleka, pogotovo proteina, kao i sastava, veličine, stepena mineralizacije i hidratisanosti micela (Park i sar., 2007). Dodatno, Martín-Diana i sar. (2002) su utvrdili da je κ -kazein u kozjem mleku glikozilovan u daleko manjem stepenu nego u kravljem mleku. Stepenu glikozilovanosti κ -kazeina je u negativnoj korelaciji sa veličinom kazeinske micelle, što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije, obzirom da su zabeležene značajno veće vrednosti prosečnog dijametra kazeinskih micela u kozjem mleku u poređenju sa literaturnim podacima za kravlje mleko (Day i sar., 2015).

Rezultati ovog oglada ukazuju da su bolja reološka svojstva kiselih gelova dobijena nakon termičkog tretmana mleka na 85 °C/5 min nego na 95 °C/5 min. Lucey i sar. (1997a) su zapazili sličan trend nakon primene veoma oštrog termičkog tretmana kravljeg mleka (90 °C/30 min), koji je doveo do smanjenja vrednosti G' kiselog gela mleka, u poređenju sa blažim termičkim tretmanima. Ovi autori takođe smatraju da je mogući uzrok ovakve pojave u visokom nivou denaturacije proteina surutke i formiranju velikih agregata koji doprinose smanjenju G' . Međutim, manja prosečna veličina kazeinskih micela koja je utvrđena merenjima u ovoj

disertaciji u mleku tretiranom na 95 °C/5 min, ne podržava to mišljenje te je potrebno potražiti drugo objašnjenje.

U mnogim studijama je istaknuto da veći nivo denaturacije proteina surutke doprinosi boljim reološkim svojstvima kiselih gelova od kravljeg mleka (Dannenberg i Kessler, 1988a, 1988b; Lucey i sar., 1997a; Vasbinder i sar., 2003). Međutim, posmatranjem elektroforetograma u ovom ogledu (Slika 6) zapaža se da je nivo denaturisanih proteina surutke na 95 °C/5 min bio veći nego na 85 °C/5 min, što takođe nije moglo dati objašnjenje za nižu izmerenu vrednost G' kiselog gela od kozjeg mleka.

Anema (2008a) je zaključio da promene u svojstvima kiselih gelova mleka ne zavise samo od nivoa denaturacije proteina u mleku. U tom istraživanju je utvrđeno da temperature tretmana preko 70 °C daju gelove sa značajno višom finalnom vrednošću G' , pri čemu je porast G' zabeležen sa povišenjem temperature do oko 85 °C, nakon čega je sledi pad vrednosti G' primenom oštrijih termičkih tretmana. Denaturacija proteina surutke je nedovoljan pokazatelj koji bi predvideo finalna svojstva kiselih gelova mleka. Smatra se da su interakcije denaturisanih proteina surutke sa drugim proteinima u mleku kao i promene u strukturi kazeinske micela značajnije za svojstva kiselog gela mleka (Anema, 2008a), što u svetlu rezultata o veličini micela iz ove disertacije, bolje opisuje zapaženi fenomen niže vrednosti G' kiselog gela od mleka tretiranog oštrijim tretmanom. Dodatno, unutrašnji micelarni integritet i promena strukture i sastava micela sa promenom pH takođe imaju ulogu u definisanju viskoelastičnih svojstava rezultujućeg gela (Horne, 2003).

Dalje, Raynal i Remeuf (1998) su predočili da termički tretmani preko 90 °C dovode do preuređenja komponenata kazeina u micelarnoj strukturi kroz seriju reakcija agregiranja i disocijacije, što takođe umanjuje sposobnost micela da formiraju snažne protein-protein interakcije tokom procesa geliranja.

Iako su u ovom ogledu vrednosti prosečne veličine micela u mleku tretiranom na 95 °C/5 min bile manje u odnosu na tretman 85 °C/5 min, može se pretpostaviti da je oštiri termički tretman indukovao promene u strukturi kazeinske micela tako da je njihova sposobnost da formiraju snažne proteinske lance smanjena, usled čega je postignuta i slabija struktura gela, u poređenju sa B jogurtom.

5.3.5. Uticaj termičkih tretmana na teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka

Teksturalna svojstva jogurta su važan kriterijum u oceni kvaliteta. Generalno, čvrstoća opisuje otpornost proizvoda prema deformaciji. Konzistencija se odnosi na „čvrstoću“ (engl. firmness), „gustinu“ (engl. thickness) ili „viskoznost“ (engl. viscosity) tečnosti ili tečnog polučvrstog materijala. Kohezivnost predstavlja tendenciju proizvoda da se poveže ili da se njegovi delovi „drže zajedno“. Intermolekulske privlačne veze pomoću kojih se elementi materijala u nekoj masi drže zajedno određuju njenu kohezivnost. Povezana je sa unutrašnjom „lepljivošću“ proizvoda i obično se određuje merenjem sile koja je potrebna za uklanjanje predmeta iz mase proizvoda (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003). Neki autori (Nishinari i sar., 2019; Peleg, 2019) su razmatrali ograničenja instrumentalne analize profila teksture (engl. texture profile analysis/ TPA) pri čemu su istakli važnost konzistentnosti u uslovima izvođenja testova (temperatura, vlažnost), zatim u obliku i veličini uzorka, geometriji koja se koristi kao i podešenom obimu deformacije, jer svi ovi faktori utiču na TPA merenje.

U ovom delu oglada, rezultati ukazuju da je na čvrstinu i konzistenciju jogurta snažno uticao termički tretman kozjeg mleka, dok statistički značajne razlike za kohezivnost i za indeks

viskoziteta između uzoraka nisu utvrđene. Jogurt proizveden od mleka tretiranog na 85 °C/5 min imao je najveće vrednosti čvrstine i konzistencije (Tabela 15).

Tabela 15. Uticaj termičkih tretmana na teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka

Parametar	Termički tretmani - vrste jogurta		
	72 °C/30 s - A	85 °C/5 min -B	95 °C/5 min - C
Čvrstina (g)	30,2 ± 4,3 ^a	40,0 ± 1,4 ^b	25,9 ± 6,3 ^c
Konzistencija (g s)	749 ± 90 ^a	1034 ± 30 ^b	659 ± 37 ^c
Kohezivnost (g)	13,6 ± 0,6 ^a	20,3 ± 0,2 ^b	13,6 ± 1,8 ^a
Indeks viskoziteta (g s)	18,4 ± 1,4 ^a	25,2 ± 3,5 ^b	21,9 ± 1,3 ^a

Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim slovom u superskriptu u istom redu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Termički tretman mleka ima važan uticaj na proteine mleka i doprinosi poboljšanju teksture jogurta. Prisustvo denaturisanih proteina surutke povezanih sa kazeinskim micelama dovodi do povećanja čvrstine gela kravljeg mleka, što je podrobno dokumentovano (Dannenberg i Kessler, 1988a, 1988b; Lucey i sar., 1999; Lucey i sar., 1997a). Takođe, utvrđena je veza između čvrstine i viskoziteta jogurta i obima denaturacije β -laktoglobulina usled termičkog tretmana (Dannenberg i Kessler, 1988b). Međutim, rezultati ove disertacije ukazuju da čvrstina kiselog gela kozjeg mleka pored nivoa denaturacije proteina zavisi i od promena u strukturi micela, što je indikovano izmerenom prosečnom veličinom micela.

Oliveira i sar. (2001) smatraju da povećanje čvrstine kiselog gela mleka zavisi i od sadržaja suve materije, kao i od sadržaja i vrste proteina. Sa druge strane, čvrstina koaguluma od kozjeg mleka bila je duplo manja u poređenju sa gelom od kravljeg mleka, čak i sa sličnim sadržajem suve materije, što ukazuje da je tekstura zavisna isto tako i od sadržaja kazeina i od strukture micela koja se razlikuje kod ove dve vrste mleka (Vegarud i sar., 1999).

U proizvodnji jogurta, hlađenje gela nakon obavljene fermentacije se smatra važnim faktorom u poboljšanju teksture finalnog proizvoda (Robinson i Tamime, 1993), na šta ukazuju i povećane vrednosti G' kod svih kiselih gelova od kozjeg mleka izmerene nakon hlađenja u ovom ogledu.

Guggisberg i sar. (2009) su ustanovili jaku korelaciju između senzorno ocenjene čvrstine jogurta i vrednosti napona popuštanja određene reometrijom. U ovoj disertaciji utvrđeno je postojanje značajnih razlika između vrednosti napona popuštanja, kao i instrumentalno izmerene čvrstine između uzoraka. Takođe, može se primetiti da je vrednost napona popuštanja u korelaciji sa rezultatima čvrstine u slučaju jogurta proizvedenog od mleka tretiranog na 85 °C/5 min.

Vrednosti parametara teksture ispitanih varijanti jogurta bile su značajno niže u poređenju sa literaturnim podacima za uzorke od mleka kravljeg porekla. Smatra se da su manji sadržaj kazeina i druge specifičnosti poput udela α s-kazeina i veličine micela, odgovorni za slabu teksturu jogurta od kozjeg mleka (Park i sar., 2007).

Odabir pravih procesnih parametara i dodatak različitih sredstava za fortifikaciju mogu poboljšati kvalitet jogurta u pogledu teksture, što je detaljno ispitano na kravljem mleku. Herrero i Requena (2006) su zaključili da je suplementacija kozjeg mleka koncentratom proteina surutke, praćena termičkim tretmanom, povećala čvrstinu jogurta, adhezivnost, lomljivost (engl. fracturability) i uticala na dobijanje proizvoda vrednosti sličnih onima zabeleženim kod jogurta od kravljeg mleka. (Nguyen i sar., 2018) su istakli da je na čvrstinu kiselog gela od kravljeg mleka uticao nivo pasterizacije mleka, ali je i sastav proteina mleka (odnos kazeina/ proteina surutke, termički indukovani agregati proteina surutke) bio veoma značajan takođe.

5.4. Uticaj odabranih faktora na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

5.4.1. Uticaj koncentracije sirila na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

U ovom delu ogleđa korišćeno je mleko koza Alpske rase tokom perioda kasne laktacije (novembar 2019.). Parametri fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka bili su sledeći: $3,60 \pm 0,17$ % proteini, $4,57 \pm 1,46$ % mlečna mast, $13,27 \pm 2,07$ % suva materija i pH $6,54 \pm 0,02$.

Na osnovu rezulta prikazanih u Tabeli 16 i na Slici 13a može se zaključiti da je uticaj koncentracije sirila na vreme koagulacije (VK) bio značajan i kod sirovog i kod pasterizovanog mleka. Smanjenje koncentracije sirila značajno je produžilo vreme koagulacije kada se porede prosečne vrednosti VK između sva četiri nivoa ovog faktora. Takođe, značajna razlika u vremenu koagulacije ustanovljena je između sirovog i pasterizovanog mleka pri nižoj koncentraciji sirila (1,0 i 1,5 g/100 l). Ovim je pretpostavka da bi povećanje koncentracije sirila skratilo vreme koagulacije potvrđena i kod kozjeg mleka, što je u saglasnosti sa rezultatima koje je objavila Bencini (2002) za kravlje i ovčije mleko. Ovakav zaključak nije iznenađujući obzirom da je primarna faza koagulacije enzimaska reakcija prvog reda čija je brzina zavisna od koncentracije enzima.

Nájera i sar. (2003) su prilikom ispitivanja svojstava koagulacije kravljeg mleka zabeležili da koncentracija sirila ima veoma izražen uticaj na skraćenje vremena koagulacije kada se povećava u opsegu od 14-56 IMCU/l (ekvivalentno 1,0 - 4,0 g/100 l), nakon čega dalje povećanje koncentracije enzima nema uticaja i VK teži konstantnoj vrednosti. Kao što se može uočiti sa Slike 13a, kod kozjeg mleka se pri većoj koncentraciji enzima i dalje skraćuje VK.

Evidentno je i da drastično povećanje koncentracije sirila (sa 2,0 na 5,4 g/100 l) nije značajno uticalo na porast čvrstine gela, izraženo kao modul elastičnosti nakon 60 min merenja (G^*), i u slučaju sirovog i pasterizovanog mleka, dok se sa smanjenjem koncentracije sirila na 1,5 i pogotovo na 1,0 g/l dobijeni gel odlikovao značajno nižim vrednostima G^* . Rezultati sa Slike 13a ilustruju da je porast čvrstine (G^*) sa povećanjem koncentracije sirila, bio oštiji kod gela od pasterizovanog u poređenju sa istim od sirovog mleka. Rezultati dobijeni ovim ogleđom ukazuju da povećanje koncentracije sirila do određene granice značajno utiče na čvrstinu sirišnog gela od kozjeg mleka.

Obzirom da je uloga sirila da izvrši hidrolizu κ -kazeina i oslobodi makropeptid, njegova koncentracija bi trebalo da utiče na čvrstinu sirišnog gela samo ukoliko je sirilo limitirajući faktor, odnosno ukoliko nema dovoljno enzima da obavi hidrolizu. Sirilo prisutno u limitirajućoj količini ograničava formiranje gela jer se može uspostaviti manji broj kalcijumovih mostova između kazeinskih micela i posledično, nastaje daleko mekši i slabiji sirišni gel (Bencini, 2002).

Tabela 16. Uticaj koncentracije sirila na reološke parametre sirišne koagulacije

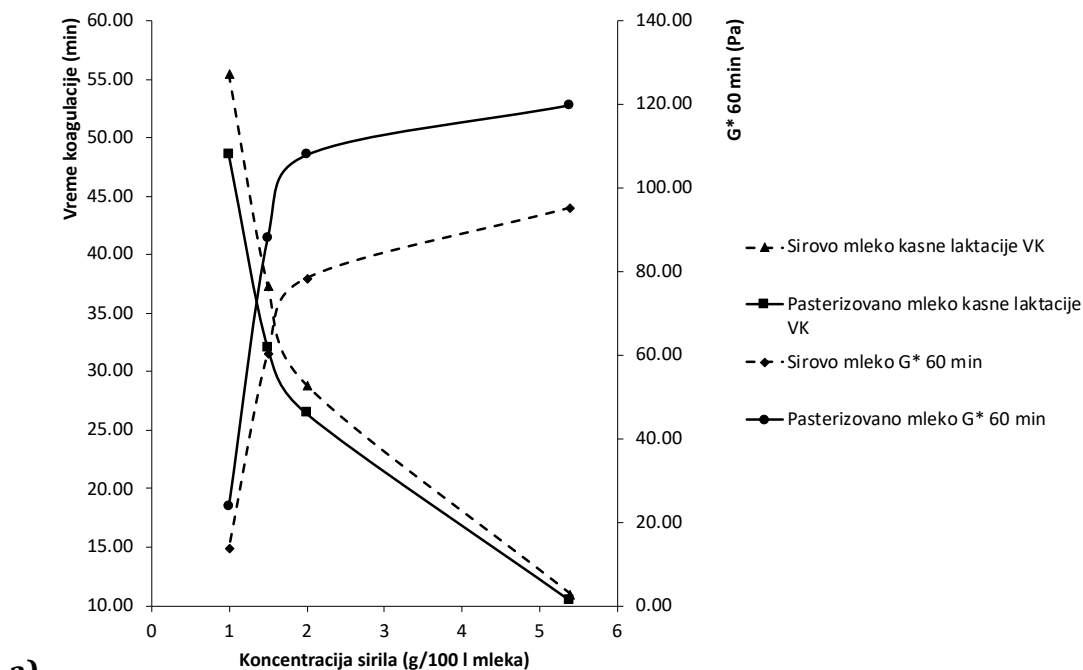
Termički tretman	Koncentracija sirila (g/100 l)	VK (min)	BA (Pa/s)	G* (Pa)
Sirovo mleko	5,4	11±1 ^{aA}	0,11±0,02 ^{aA}	95,2±14 ^{aA}
	2,0	29±1 ^{bA}	0,05±0,01 ^{bA}	78,4±15,4 ^{abA}
	1,5	37±1 ^{cA}	0,04±0,00 ^{bA}	60,4±0,6 ^{bA}
	1,0	55±3 ^{dA}	0,02±0,00 ^{bA}	13,8±4,1 ^{cA}
Pasterizovano mleko	5,4	10,4±0,4 ^{aA}	0,11±0,02 ^{aA}	120±20 ^{aA}
	2,0	26,4±0,1 ^{bA}	0,06±0,00 ^{bA}	107,8±1,7 ^{abA}
	1,5	32±2 ^{cB}	0,05±0,00 ^{bA}	88±11 ^{bA}
	1,0	49±1 ^{dB}	0,03±0,01 ^{bA}	23,8±5,8 ^{cA}

Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim malim slovom u koloni predstavljaju razlike između koncentracija sirila istog mleka, različita velika slova predstavljaju razliku između tretmana mleka. Poređenje sredina je vršeno sa Tukey HSD testom ($p < 0,05$). VK- vreme koagulacije; BA- brzina agregiranja; G*- modul elastičnosti u 60. minutu merenja.

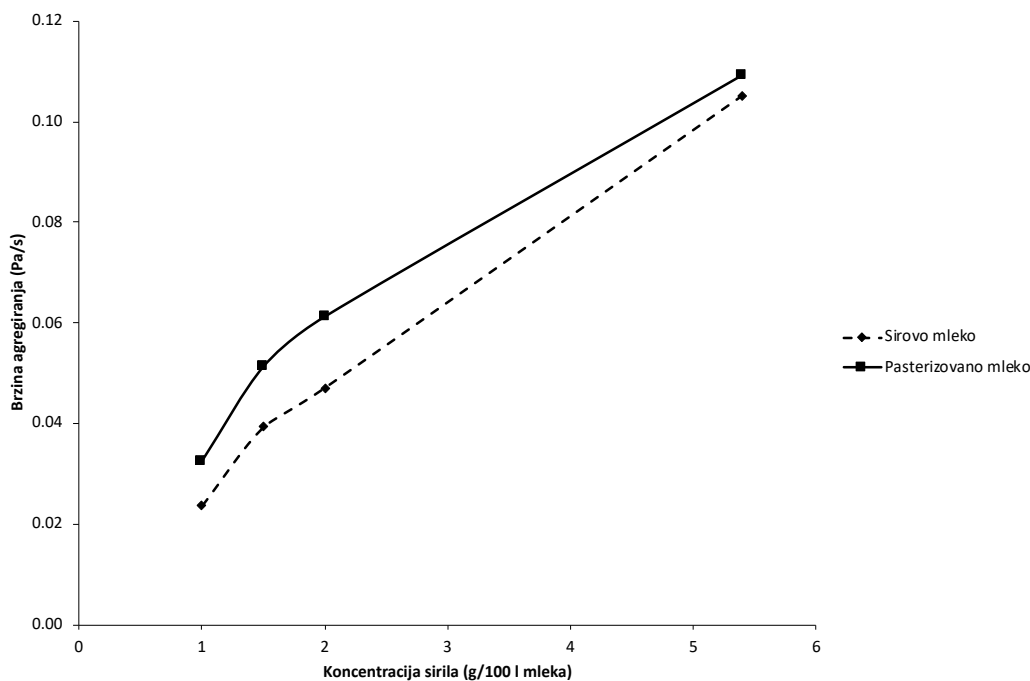
Tabela 16.1. Uticaj pojedinačnih faktora i njihove interakcije

	VK	BA	G*
TTML	< 0,01	< 0,05	< 0,01
Konc. sirila	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Interakcija faktora	< 0,05	nz	nz

Uticaj ispitanih faktora i njihove interakcije na nivou značajnosti < 0,05 i 0,01; nz – nije značajno; TTML- termički tretman mleka; Konc. sirila- koncentracija sirila.



a)



b)

Grafik 13. Uticaj koncentracije sirila na vreme koagulacije (min) i čvrstinu gela nakon 60 minuta (Pa) **(a)** i brzinu agregiranja (Pa/s) **(b)**

Koncentracija sirila je značajno uticala na brzinu agregiranja (BA), tako da su pri nižim koncentracijama sirila zabeležene i manje brzine agregiranja. Utvrđen je značajan uticaj termičkog tretmana mleka ($p < 0,05$; Tabela 16.1.), pri čemu je manja brzina agregiranja zabeležena pri koagulaciji sirovog mleka. U opsegu koncentracija 1,0-2,0 g/100 l, povećanje količine sirila je imalo neznatan uticaj na brzinu agregiranja.

Brzina agregiranja kazeinskih micela zavisi od koncentracije micela u mleku (Payens, 1977) te i taj faktor treba uzeti u obzir prilikom poređenja rezultata brzine agregiranja i brzine stasavanja sirišnog gela od kozjeg mleka sa drugim vrstama mleka. Veća brzina agregiranja ukazuje na brže očvršćavanje (stasavanje) gela mleka. Bencini (2002) je utvrdila da

koncentracija sirila nema značajan uticaj na brzinu očvršćavanja gela od ovčijeg mleka koje odlikuje znatno veći sadržaj kazeinskih micela, dok je taj uticaj bio uočljiv kod kravljeg mleka. Međutim, pri donošenju zaključaka o uticaju određenih faktora na sirišnu koagulaciju različitih vrsta mleka, treba imati u vidu i to da je veliki sadržaj kazeina u ovčijem mleku dominantan faktor koji prevladava nad ostalim parametrima, te da bi drugačija postavka eksperimenta (podešavanje sadržaja kazeina) verovatno dala i drugačije rezultate. Prema drugim autorima, zapažen je progresivan porast brzine očvršćavanja sirišnog gela od kozjeg (Castillo i sar., 2000) i kravljeg mleka (Nájera i sar., 2003) sa povećanjem koncentracije enzima.

5.4.2. Uticaj pH na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Ispitivanje uticaja pH mleka na parametre sirišne koagulacije obavljeno je tokom oktobra 2019. godine. Osnovni pokazatelji fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka koza Alpske rase korišćenog u ovom delu ogleada bili su sledeći: 3,21±0,15 % proteini, 3,64±0,32% mlečna mast, 12,03±0,41% suva materija i pH 6,54±0,04.

Snižavanje pH vrednosti mleka uzrokovalo je značajno skraćenje vremena koagulacije (Tabela 17). Takođe, utvrđena je značajna razlika u VK između sirovog i pasterizovanog mleka pri nižim pH (6,3 i 6,1), pri čemu je kraće vreme zabeleženo kod termički tretiranog mleka. Ovakav efekat pH na VK je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima za kravlje i ovčije mleko, gde su takođe vremena koagulacije bila kraća ukoliko je snižavana pH mleka (Bencini, 2002). Obzirom da je optimalna pH za aktivnost himozina 5,1-5,3 u kravljem mleku (López i sar., 1998), snižavanje pH se povezuje sa postizanjem kraćih vremena koagulacije i boljom konzistencijom sirišnog gela (McMahon i sar., 1984).

Tabela 17. Uticaj pH na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Termički tretman	pH mleka	VK (min)	BA (Pa/s)	G* (Pa)
Sirovo mleko	6,5	11,6±1,2 ^{aA}	0,06±0,00 ^{aA}	57±13 ^{aA}
	6,3	7,4±0,4 ^{bA}	0,10±0,02 ^{bA}	75,8±25,3 ^{aA}
	6,1	5,7±0,3 ^{cA}	0,12±0,01 ^{bA}	83,1±21,6 ^{aA}
Pasterizovano mleko	6,5	9,3±0,8 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	79±13 ^{aA}
	6,3	7,1±0,3 ^{bB}	0,12±0,01 ^{bA}	88±12 ^{aA}
	6,1	5,7±0,0 ^{cB}	0,14±0,03 ^{bA}	95,4±15,7 ^{aA}

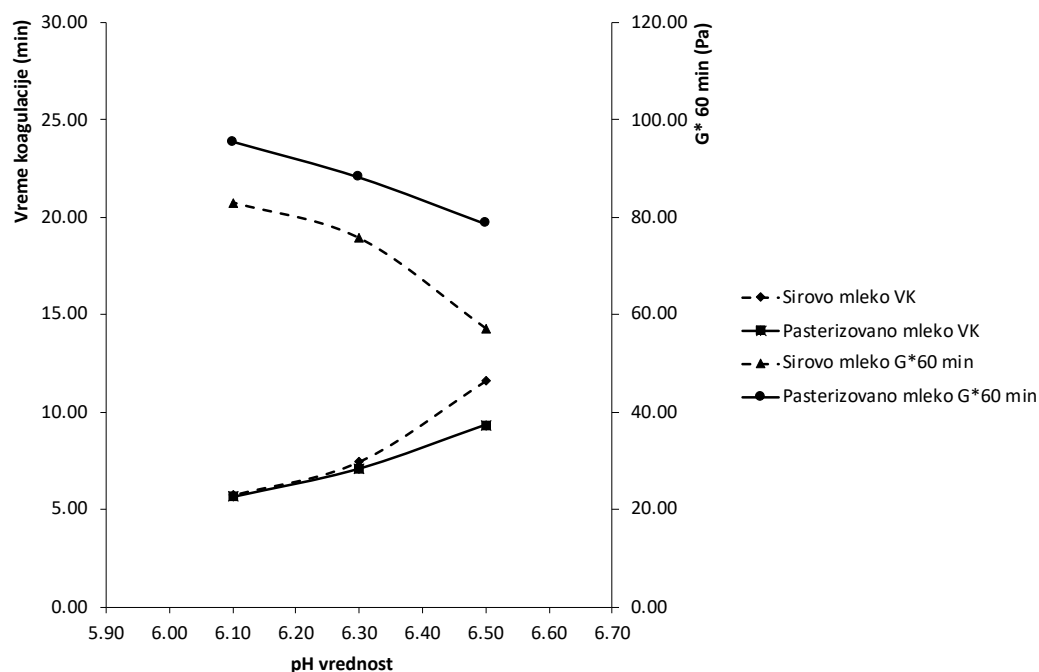
Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim malim slovom u koloni predstavljaju razlike između pH istog mleka, različita velika slova predstavljaju razliku između tretmana mleka. Poređenje sredina je vršeno LSD testom ($p < 0,05$). VK- vreme koagulacije; BA- brzina agregiranja; G*- modul elastičnosti u 60. minutu merenja.

Tabela 17.1. Uticaj pojedinačnih faktora i njihove interakcije

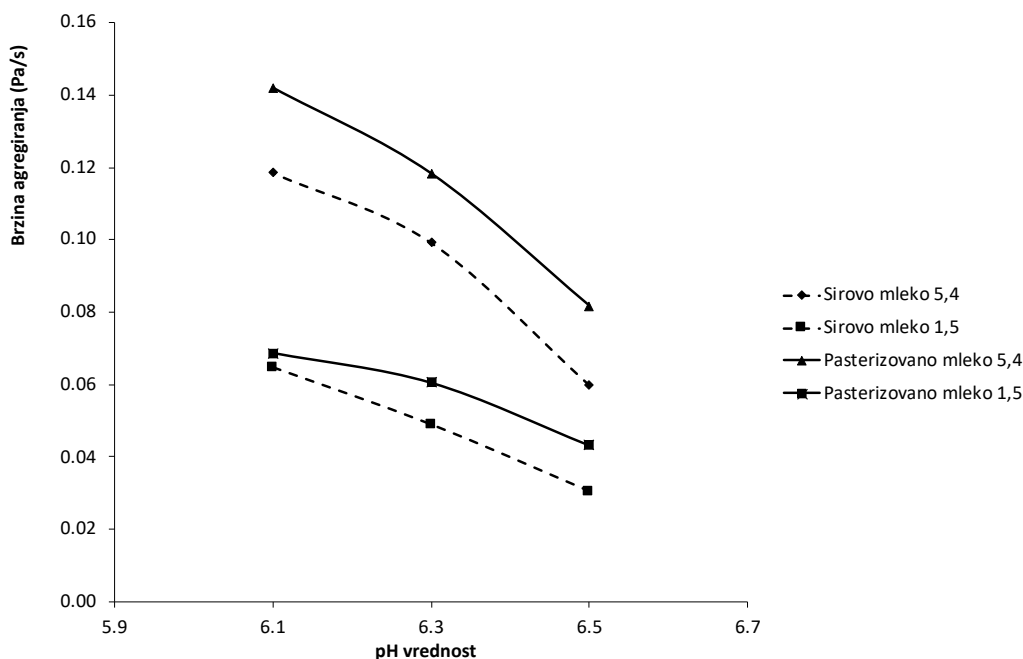
	VK	BA	G*
TTML	< 0,05	< 0,05	nz
pH	< 0,01	< 0,01	nz
Interakcija faktora	< 0,05	nz	nz

Uticaj ispitanih faktora i njihove interakcije na nivou značajnosti < 0,05 i < 0,01; nz – nije značajno; TTML- termički tretman mleka.

Ovim ogledom nije utvrđen značajan uticaj pH na čvrstinu sirišnog gela G* nakon 60 minuta. Razlike nisu evidentne ni između sirovog i termički tretiranog mleka za vrednosti ovog parametra. Slično, Nájera i sar. (2003) takođe nisu utvrdili značajan uticaj pH na čvrstinu sirišnog gela kravljeg mleka.



Grafik 14. Uticaj pH mleka na vreme koagulacije (min) i čvrstinu gela nakon 60 minuta (Pa)



Grafik 15. Uticaj pH i termičkog tretmana mleka pri različitim koncentracijama sirila na brzinu agregiranja (Pa/s) - (koncentracije sirila 1,5 i 5,4 g/100 l mleka)

Brzina agregiranja se značajno povećala prilikom smanjenja pH pri koagulaciji i sirovog i termički tretiranog mleka. Takođe, sa Grafika 15 se može zapaziti da je brzina agregiranja veća pri nižim pH vrednostima i pri većoj koncentraciji sirila. Generalno je zabeležena veća brzina agregiranja pri koagulaciji pasterizovanog kozjeg mleka, mada primenjeni termički tretman nije ostvario statistički značajan efekat na brzinu agregiranja.

Niža pH povećava afinitet između micela smanjenjem njihovog površinskog naelektrisanja i na taj način promoviše proces agregiranja tokom sekundarne faze koagulacije, kako je već pomenuto u poglavlju 2.4.1. ove disertacije (Daviau i sar., 2000). Sa druge strane, Bencini (2002) je utvrdila veoma jak uticaj snižavanja pH na povećanje brzine očvršćavanja gela kod kravljeg mleka, dok u slučaju ovčijeg mleka, pH nije imala efekta na ispitivani parametar.

Nájera i sar. (2003) su ispitivanjem uticaja niza faktora na svojstva sirišne koagulacije kravljeg mleka i multivarijantnom analizom ustanovili da je od svih faktora pH imala najizraženiji uticaj na vreme koagulacije i brzinu očvršćavanja gela. Slično rezultatima ove disertacije Balcones i sar. (1996) su takođe utvrdili da se sa snižavanjem pH ovčijeg mleka skraćuje vreme koagulacije i povećava brzina očvršćavanja sirišnog gela.

5.4.3. Uticaj temperature koagulacije na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Uticaj temperature koagulacije kozjeg mleka na reološka svojstva sirišne koagulacije ispitan je tokom novembra 2019. godine (period kasne laktacije). Osnovni parametri fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka koza Alpske rase korišćenog u ovom delu oglada bili su sledeći: $3,60 \pm 0,17$ % proteini, $4,57 \pm 1,46$ % mlečna mast, $13,27 \pm 2,07$ % suva materija i pH $6,54 \pm 0,02$.

Temperatura koagulacije imala je značajnog efekta na vreme koagulacije i sirovog i pasterizovanog mleka, odnosno sa porastom temperature vreme koagulacije je bilo kraće (Tabela 18). Nisu nađene značajne razlike u VK pri koagulaciji sirovog i pasterizovanog mleka

posmatrano pri istoj temperaturi koagulacije. Takođe nije ustanovljen značajan uticaj kombinacije faktora.

Slično ovim rezultatima, i Bencini (2002) je objavila da je porast temperature koagulacije sa 30 na 38 °C uzrokovao skraćenje vremena koagulacije i kod kravljeg i kod ovčijeg mleka. Takođe, Castillo i sar. (2000) su ispitivanjem faktora koji utiču na koagulaciju kozjeg mleka ustanovili isti trend u pogledu VK, pri porastu temperature koagulacije od 28 do 36 °C.

Na osnovu rezultata u Tabeli 18, može se zaključiti da u ovom ogledu nijedan faktor kao ni njihova interakcija nisu značajno uticali na čvrstinu sirišnog gela nakon 60 min (G^*). Literaturni podaci o efektima koje temperatura koagulacije ima na ovaj parametar su različiti i zavise od vrste mleka na kojoj je ispitivanje obavljeno, kao i od momenta u kome je merena čvrstina gela. Tako je Bencini (2002) istakla da je uticaj temperature koagulacije na konzistenciju sirišnog gela bio značajan samo kod kravljeg mleka pri čemu je rast temperature uzrokovao i veće vrednosti konzistencije, nasuprot ovčijem mleku kod koga je ustanovljeno da temperatura nije imala efekta na ovaj parametar. Nájera i sar. (2003) su multivarijantnom analizom faktora koagulacije kravljeg mleka utvrdili da je temperatura koagulacije imala najveći značaj za predviđanje parametara čvrstine koaguluma kao i gruš. Ovi autori su istakli da je sa povišenjem temperature koagulacije zabeležen progresivan porast čvrstine gruš. Sa druge strane, Storry i Ford (1982) su zabeležili smanjenje čvrstine sirišnog gela sa porastom temperature koagulacije. Obzirom da su ovi autori merili čvrstinu gela 1 h nakon početka koagulacije moguće je da je u tom periodu došlo i do spontanog sinerezisa što je dovelo do nastanka mekšeg gruš.

Tabela 18. Uticaj temperature koagulacije na reološke parametre sirišne koagulacije

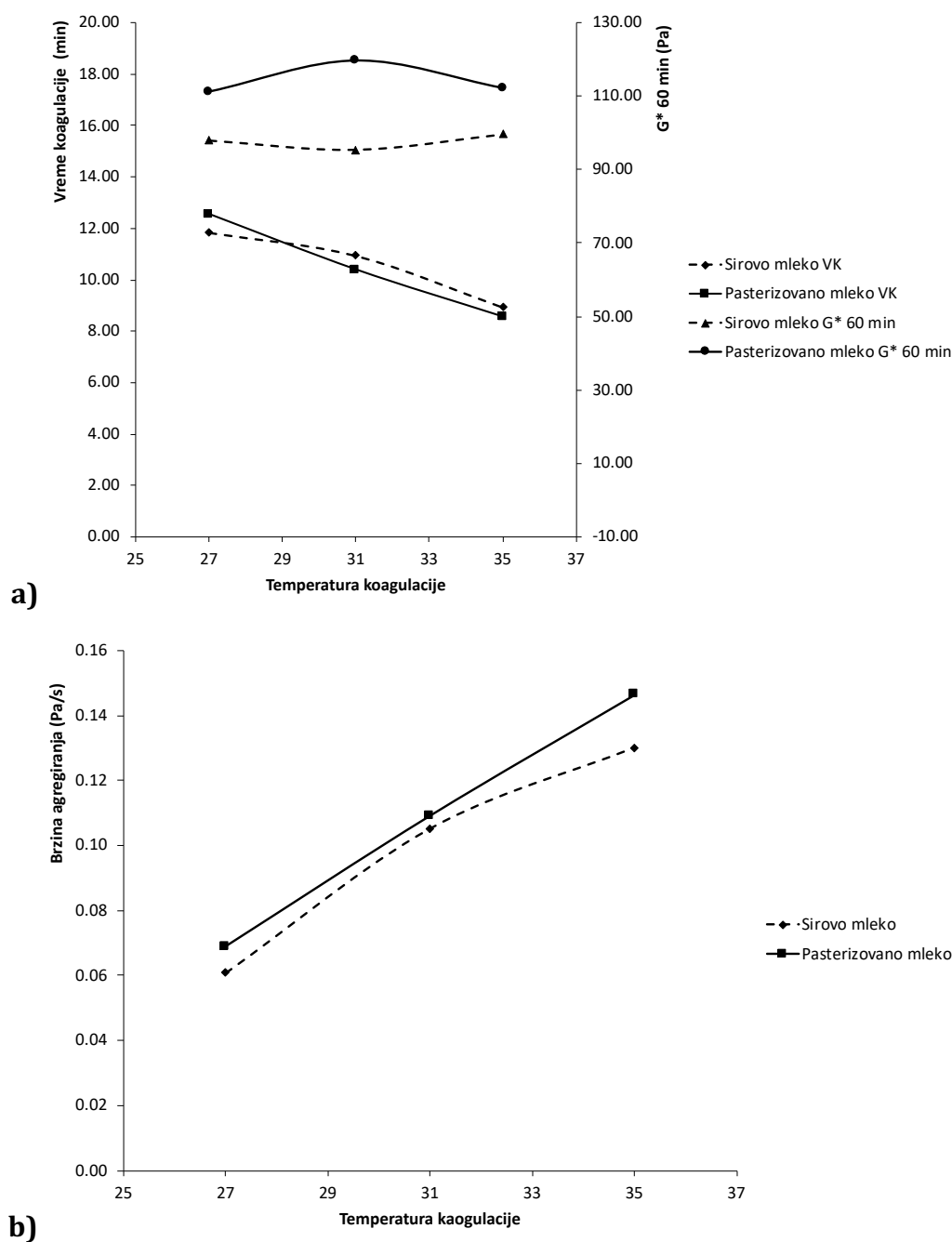
Termički tretman	Temperatura koagulacije (°C)	VK (min)	BA (Pa/s)	G^* (Pa)
Sirovo mleko	27	11,8±0,7 ^{aA}	0,06±0,00 ^{aA}	97,9±13,4 ^{aA}
	31	10,9±0,8 ^{aA}	0,11±0,02 ^{abA}	95±14 ^{aA}
	35	8,9±0,1 ^{bA}	0,13±0,04 ^{bA}	99,7±19,7 ^{aA}
Pasterizovano mleko	27	12,6±0,6 ^{aA}	0,07±0,02 ^{aA}	111±20 ^{aA}
	31	10,4±0,4 ^{bA}	0,11±0,02 ^{abA}	120±20 ^{aA}
	35	8,6±0,5 ^{cA}	0,15±0,02 ^{bA}	112±21 ^{aA}

Prikazane su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim malim slovom u koloni predstavljaju razlike između temperatura istog mleka, različita velika slova predstavljaju razliku između tretmana mleka. Poređenje sredina je vršeno sa Tukey HSD testom ($p < 0,05$). VK- vreme koagulacije; BA- brzina agregiranja; G^* - modul elastičnosti u 60. minutu merenja.

Tabela 18.1. Uticaj pojedinačnih faktora i njihove interakcije

	VK	BA	G*
TTML	nz	nz	nz
TK	< 0,01	< 0,01	nz
Interakcija faktora	nz	nz	nz

Uticaj ispitanih faktora i njihove interakcije na nivou značajnosti < 0,05 i < 0,01; nz – nije značajno; TTML- termički tretman mleka; TK- temperatura koagulacije.



Grafik 16. Uticaj temperature koagulacije na vreme koagulacije (min) i čvrstinu gela nakon 60 minuta (Pa) **(a)** i brzinu agregiranja (Pa/s) **(b)**

Temperatura koagulacije je imala značajnog efekta na brzinu agregiranja, pri čemu je rast temperature uzrokovao linearni porast brzine agregiranja. Sa druge strane, uticaj termičkog tretmana mleka kao ni interakcija faktora nisu uticali značajno na brzinu agregiranja.

Sekundarna faza koagulacije se ubrzava 1,3-1,5 puta sa svakim višim stepenom prilikom porasta temperature koagulacije, tako da je efekat povišenja temperature koagulacije mnogo značajniji za fazu agregiranja. Utvrđeno je da kod kravljeg mleka više temperature koagulacije, koje su bliske optimalnim temperaturama aktivnosti himozina, skraćuju vreme koagulacije i povećavaju brzinu formiranja sirišnog gela, odnosno gruš. Posebno je izražen uticaj povišenja temperature u opsegu 30 - 40 °C na porast brzine agregiranja (Kowalchuk i Olson, 1977). Miočinović (2020) navodi da iako su optimalne temperature za dejstvo koagulantata u intervalu 38-40 °C, snižavanje temperature koagulacije do 32 °C neznatno smanjuje brzinu reakcije, dok se na temperaturama ispod 25 °C vreme koagulacije značajno produžava.

Bencini (2002) je ustanovila da se porastom temperature koagulacije (30, 34 i 38 °C) očvršćavanje gela od kravljeg mleka blago ubrzalo, dok praktično nije bilo efekta na brzinu očvršćavanja gela od ovčijeg mleka. Brzina očvršćavanja gela je imala linearan porast sa povišenjem temperature koagulacije kravljeg mleka i prema podacima drugih autora (Nájera i sar., 2003).

5.4.4. Uticaj perioda laktacije na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

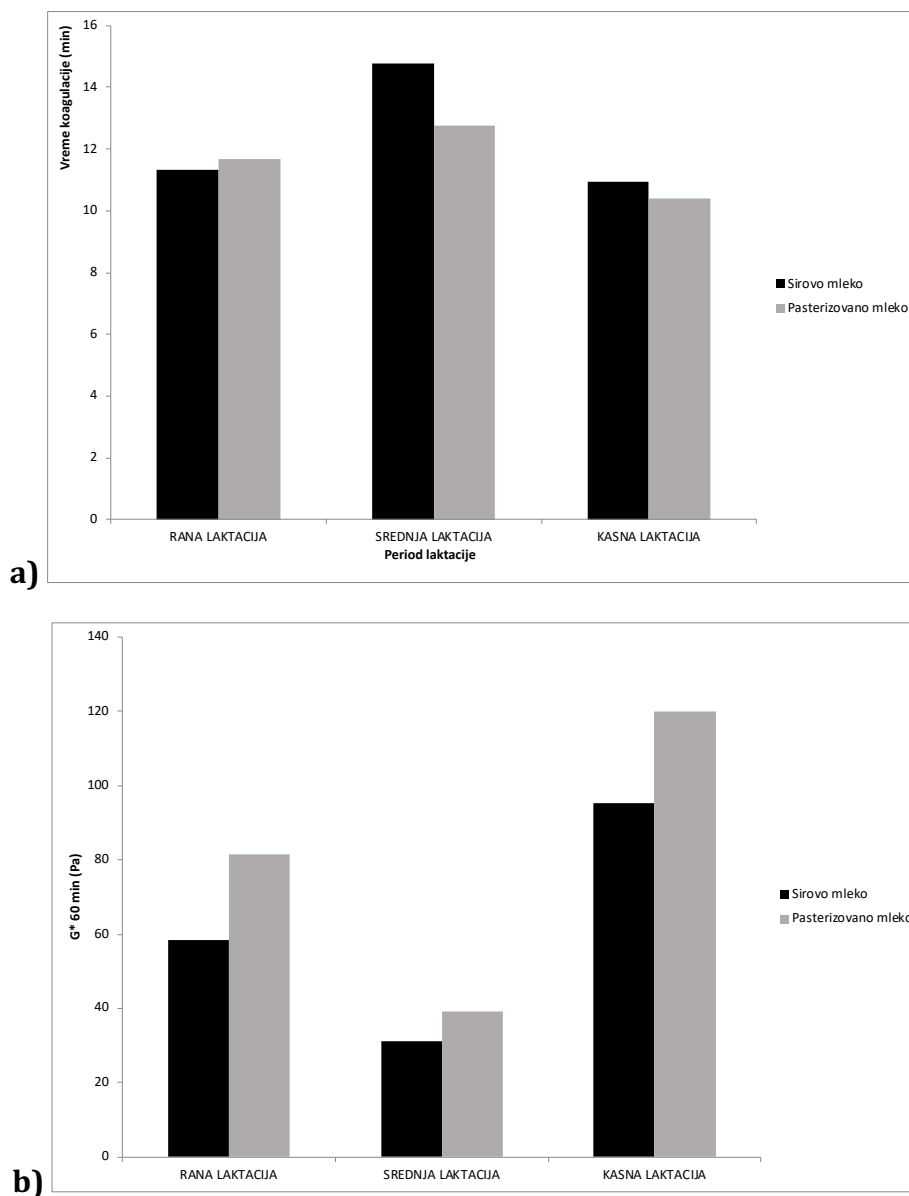
Osnovni parametri fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka koza Alpske rase korišćenog za ispitivanje uticaja perioda laktacije (rani: mart 2020., srednji: jun-jul 2019. i kasni: novembar 2019.) na reološka svojstva sirišne koagulacije prikazani su u Tabeli 19.

Sa Grafika 17a i 17b, može se videti da je najduže vreme koagulacije ustanovljeno pri koagulaciji kozjeg mleka srednje laktacije, kao i najmanja čvrstina gela G*. Poređenjem sa rezultatima fizičko-hemijskog sastava mleka, uviđa se značajno manji sadržaj proteina, suve materije i mlečne masti u srednjoj u odnosu na ranu i kasnu laktaciju.

Tabela 19. Fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka prema periodu laktacije

Parametar	Period laktacije		
	Rani period	Srednji period	Kasni period
Proteini (%)	3,44	2,78	3,60
Mlečna mast (%)	7,00	3,04	4,57
Suva materija (%)	15,50	10,96	13,27
pH	6,55	6,68	6,54

Poznato je da ishrana i godišnje doba (sezona) utiču na sastav mleka. Studije na ovu temu ukazuju da je mleko koza koje su na ispaši superiornije u odnosu na one koje se hrane senom, što se ogleda u većem sadržaju proteina i kazeina. Takođe mleko koza koje pasu na kultivisanim pašnjacima ima veći sadržaj α_{s1} -kazeina i κ -kazeina, dok mleko koza koje pasu na otvorenim pašnjacima ima veći sadržaj β -kazeina (Inglingstad i sar., 2014).



Grafik 17. Uticaj perioda laktacije na vreme koagulacije (min) **(a)** i čvrstinu gela nakon 60 minuta (Pa) **(b)**

Stocco i sar. (2018) su ispitivanjem uticaja sastava na sirišnu koagulaciju kozjeg mleka utvrdili da je mleko sa većim sadržajem masti imalo bolja svojstva koagulacije, kraće vreme koagulacije i brže očvršćavanje gela, uz postizanje veće čvrstine, dok je veći sadržaj proteina uzrokovao produženu koagulaciju. Ustanovljena visoka korelacija sadržaja mlečne masti sa sadržajem kazeina i proteina sugerise da se efekat mlečne masti na proces proizvodnje sira može pripisati i efektima proteina i kazeina. Međutim, veće zabeležene vrednosti kazeinskog broja uticale su na generalno poboljšanje svojstava koagulacije mleka, povećanje čvrstine sirišnog gela, ukazujući na značaj odnosa kazeina/proteina, a ne samo sadržaja proteina, za

svojstva koagulacije. Takođe i drugi autori ističu da su sadržaj masti, proteina i pogotovo kazeina, glavni faktori koji doprinose većem randmanu sira i utiču na koagulaciona svojstva mleka (Cecchinato i Bittante, 2016).

Pozitivan uticaj sadržaja mlečne masti na vreme koagulacije pripisuje se opšte poznatoj činjenici da se tokom flokulacije mleka odvija kolizija i agregiranje masnih globula (Huppertz i Kelly, 2006). Masne globule presvučene kazeinima na površini se donekle ponašaju kao kazeinske micelle, ubrzavajući kinetiku koagulacije, ali ograničavaju kontrakcije unutar kazeinskog matriksa (Fox i sar., 2017).

Sa Grafika 17b se može uočiti da je veći sadržaj proteina zabeležen tokom kasne laktacije (3,66 %), uticao i na formiranje gela najveće čvrstine u poređenju sa gelom dobijenim od mleka u drugim periodima. Nešto niži sadržaj proteina nađen u mleku rane laktacije (3,44 %) pratilo je i smanjenje čvrstine sirišnog gela nakon 60 min. Primetan je drastično veliki sadržaj masti u ovom periodu, koji je takođe možda uticao na smanjenje čvrstine gela. Smatra se da se mlečna mast ponaša kao opstruktivni element kretanja seruma kroz matriks (Puđa, 2009), i obzirom na relativno kratko vreme koagulacije u ovom slučaju, do merenja čvrstine gela nakon 60 min je verovatno došlo do niza procesa reorganizovanja strukture matriksa i raskidanja velikog broja jakih protein-protein veza, uz manji obim formiranja novih usled većeg učešća masti.

5.4.5. Uticaj termičkih tretmana i kalcijum-hlorida na reološke parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka

Značaj primene oštrijih termičkih tretmana kozjeg mleka u proizvodnji sira ogleda se u postizanju većeg randmana inkorporiranjem denaturisanih proteina surutke i boljih senzornih svojstava proizvedenog sira uz minimalan uticaj na svojstva koagulacije (Miloradovic i sar., 2017), dok je sa druge strane kod kravljeg mleka ustanovljen inhibirajući efekat termičkih tretmana (75 °C/25 min, 80 °C/20 min i 85 °C/15 min) na sirišnu koagulaciju (Montilla i sar., 1995).

Za ispitivanje uticaja dodatka kalcijum-hlorida na reološke parametre sirišne koagulacije u ovom delu ogleda korišćeno je mleko Sanske rase koza. Rezultati ovog eksperimenta su predstavljeni u Tabeli 20.

Termički tretman kravljeg mleka dovodi do formiranja kompleksa između κ -kazeina i proteina surutke (koagregata proteina mleka) što utiče na produžetak vremena koagulacije i nastanka slabijeg gruša (Puđa, 1992). U saglasnosti sa prethodno navedenim, analizom rezultata iz Tabele 20, može se uočiti da je i u slučaju kozjeg mleka viši termički tretman uzrokovao značajno smanjenje čvrstine gela (ČG). Uticaj faktora termičkog tretmana mleka na VK, bez obzira na dodatak CaCl_2 , je bio značajan (Tabela 20.1) ($p < 0,05$), pri čemu je prosečno vreme koagulacije produženo sa porastom temperature tretmana od 65 °C/ 30 min do 80 °C/5 min.

Uticaj CaCl_2 je bio značajan za vreme koagulacije i čvrstinu gela (ČG) (Tabela 20.1), pri čemu je prosečno VK bilo nešto kraće, a ČG veća kod uzoraka sa dodatkom kalcijum-hlorida, međutim poređenjem razlika prosečnih vrednosti u Tabeli 20, uticaj ovog faktora između uzoraka sa i bez CaCl_2 u okviru istog termičkog tretmana, ili između različitih tretmana mleka, nije značajan.

Tabela 20. Uticaj kalcijum-hlorida i termičkih tretmana kozjeg mleka na reološke parametre sirišne koagulacije

Termički tretman	200 mg/l CaCl ₂	VK (min)	BA (Pa/s)	ČG (Pa)
65 °C/30 min	sa	23,8±0,6 ^{aA}	0,0332±0,0062 ^{aA}	48,5±10,1 ^{aA}
	bez	27,3±2,9 ^{aA}	0,0264±0,0044 ^{aA}	38,9±7,2 ^{aA}
80 °C/5 min	sa	27,6±3,7 ^{aA}	0,0125±0,0035 ^{aB}	27,2±10,7 ^{aB}
	bez	30,6±1,4 ^{aA}	0,0111±0,0012 ^{aB}	19,1±2,7 ^{aB}
90 °C/5 min	sa	25,1±0,8 ^{aA}	0,0119±0,0009 ^{aB}	25,8±4,8 ^{aB}
	bez	26,8±0,9 ^{aA}	0,0105±0,0006 ^{aB}	20,7±1,5 ^{aB}

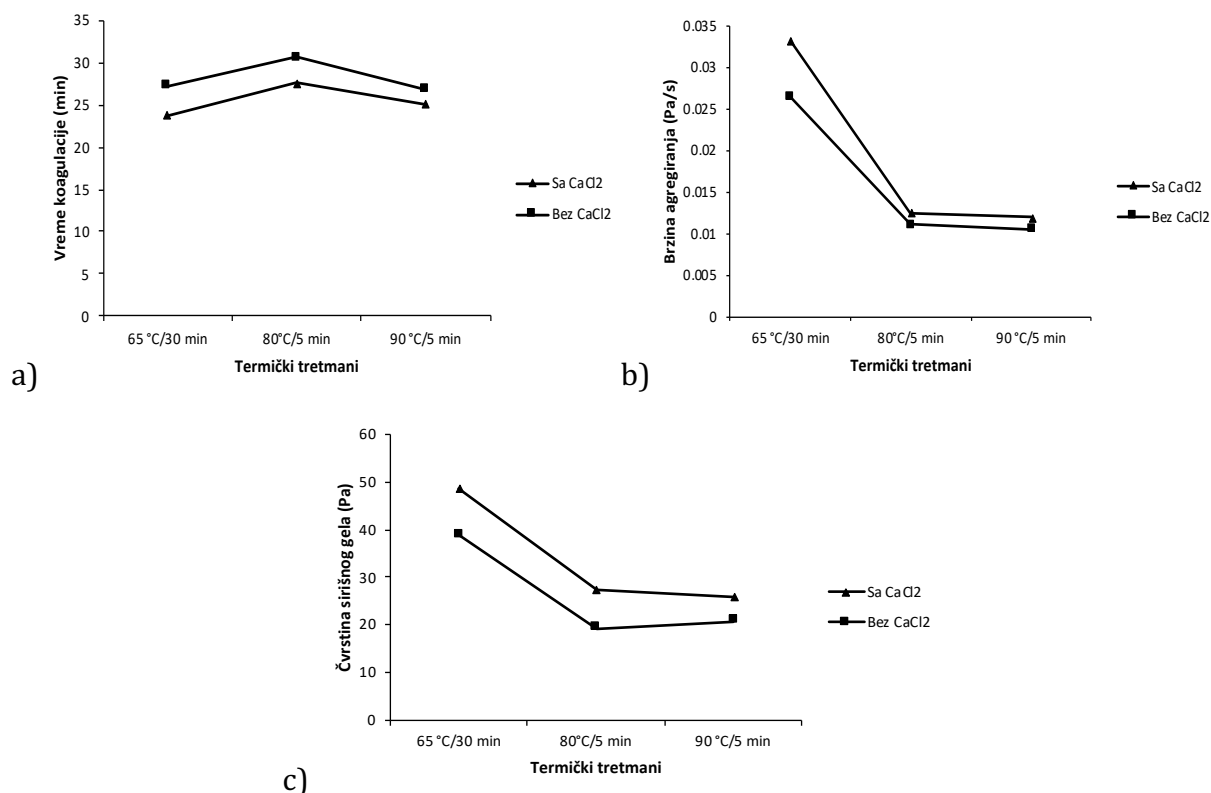
Vrednosti u tabeli su srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija; Vrednosti sa različitim malim slovom u istoj koloni ukazuju na značajnu razliku kada se posmatra dodatak CaCl₂ u okviru istog termičkog tretmana, različita velika slova u koloni ukazuju na značajnu razliku između termičkih tretmana za isti nivo CaCl₂ (p < 0.05). VK – vreme koagulacije; BA- brzina agregiranja; ČG - čvrstina gela.

Tabela 20.1. Uticaj pojedinačnih faktora i njihove interakcije

	VK	BA	ČG
CaCl ₂	< 0,05	nz	< 0,05
TTML	< 0,05	< 0,01	< 0,01
Interakcija faktora	nz	nz	nz

Uticaj ispitanih faktora i njihove interakcije na nivou značajnosti < 0,05 i < 0,01; nz – nije značajno; TTML- termički tretman mleka.

Rezultati ovog oglada su u saglasnosti i sa Miloradovic i sar. (2020) i Miloradović (2015) koji su ispitivanjem uticaja termičkih tretmana na parametre sirišne koagulacije kozjeg mleka Sanske rase koza utvrdili da se sa povećanjem termičkog tretmana brzina agregiranja smanjuje i formirani gel ima manju čvrstinu. Dodatno, uticaj termičkih tretmana na vreme koagulacije u ovom ogledu takođe je imao istovetan trend, pri čemu se VK produžilo sa porastom temperature od 65 °C/ 30 min do 80 °C/5 min (Grafik 18), dok je oštiji tretman skratio vreme koagulacije, mada poređenjem razlika sredina u Tabeli 20, ove razlike nisu bile statistički značajne.



Grafik 18. Uticaj termičkih tretmana i dodatka CaCl₂ na parametre sirišne koagulacije: vreme koagulacije (VK) a), brzinu agregiranja (BA) b) i čvrstinu gela (ČG) c)

Decenijama unazad ispitivan je značaj dodavanja kalcijum-hlorida u proizvodnji sira od mleka malih preživara, zbog poznate činjenice da njihovo mleko prirodno sadrži više kalcijuma u poređenju sa kravljim. Tako se u literaturi mogu pronaći podaci da dodavanje CaCl₂ nema uticaja na svojstva sirišne koagulacije ovčijeg mleka (Balcones i sar., 1996) i ima minimalan efekat na kozje mleko (Montilla i sar., 1995). Sa druge strane, Castillo i sar. (2002) su utvrdili da povećanje koncentracije kalcijuma ubrzava koagulaciju kozjeg mleka i skraćuje se vreme postizanja gotovosti gela. Različiti zaključci verovatno su posledica različitih metoda primenjenih za praćenje procesa koagulacije.

Prirodna koncentracija kalcijuma u mleku, kao i pH mleka su veoma važni za predviđanje efekata dodavanja CaCl₂ na svojstva koagulacije mleka. Tako su Nájera i sar., (2003) utvrdili da se brzina očvršćavanja sirišnog gela kravljeg mleka nije promenila značajno sa povećanjem koncentracije kalcijuma (10 – 18 mM), dok je u kombinaciji sa visokom pH vrednošću povećanje sadržaja kalcijuma imalo značaja. Drugi autori su zabeležili porast brzine očvršćavanja sirišnog gela sa dodavanjem kalcijuma samo do određene granice (do 10 mM) kod ovčijeg mleka (Balcones i sar., 1996).

Korelacija

Kada se posmatra korelacija ispitivanih parametara uočava se veliki koficijent korelacije između vremena koagulacije i brzine agregiranja. Naime, negativna korelacija ukazuje da povećanje VK doprinosi manjoj brzini agregiranja. Negativna korelacija postoji i između vremena koagulacije i G' nakon 60 min, odnosno pri dužoj koagulaciji čvrstina gela izmerena u 60. min je manja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa Nájera i sar. (2003).

Može se zapaziti i jaka pozitivna korelacija između čvrstine gela (ČG) – mereno testom variranja opsega frekvencija nakon koagulacije, i G' nakon 60 min (G*), što je i očekivano

obzirom da se merilo isto svojstvo samo sa malim vremenskim razmakom. Umerena i pozitivna korelacija postoji između brzine agregiranja i čvrstine gela nakon 60 min (G^*), što znači da veća brzina agregiranja doprinosi većoj čvrstini sirišnog gela mereno u ovom momentu.

Tabela 21. Koeficijenti korelacije između ispitivanih parametara sirišne koagulacije

	<i>VK</i> (vreme do $G' \geq 1\text{Pa}$) (min)	<i>BA</i> (brzina agregiranja) (Pa/s)	<i>ČG</i> (čvrstina gela)(Pa)	<i>G'</i> nakon 60 min merenja (Pa)
<i>VK</i> (vreme do $G' \geq 1\text{Pa}$) (min)	1			
<i>BA</i> (brzina agregiranja)(Pa/s)	-0,804	1,000		
<i>ČG</i> (čvrstina gela) (Pa)	-0,693	0,665	1,000	
<i>G'</i> nakon 60 min merenja(Pa)	-0,733	0,699	0,993	1,000

5.5. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva sireva od kozjeg mleka

U narednim poglavljima predstavljeni su rezultati ispitivanja uticaja dodatka kalcijum-hlorida na promenu osnovnih parametara kvaliteta kozjih sireva u salamuri i sireva za grilovanje tokom zrenja. Takođe cilj je bio ispitati i uticaj kalcijuma i perioda zrenja na parametre teksture ovih sireva.

5.5.1. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva kozjeg sira u salamuri

Sirevi u salamuri su najzastupljenija grupa sireva u našoj zemlji. Specifičnost u njihovoj proizvodnji jeste zrenje i čuvanje u rastvoru određene koncentracije soli, odnosno salamuri. Najčešće pripadaju grupi mekih sireva, što ukazuje da se u postupku njihove izrade primenjuje blaga obrada gruša (Miočinović, 2020).

U ovom ogledu proizvedeni su sirevi u salamuri od kozjeg mleka sa i bez dodatka standardne količine kalcijum-hlorida (200 mg/l) u cilju ispitivanja efekta ovog dodatka na osnovne parametre kvaliteta i teksturu sira tokom perioda zrenja od 10 dana.

Na osnovu rezultata iz Tabele 22, može se zaključiti da dodatak CaCl_2 nije imao uticaja na osnovne parametre sastava sireva. Zrenje je uticalo na određeni nivo proteolitičkih promena usled čega je utvrđen i veći nivo azotnih materija, što je zabeleženo kao blagi porast sadržaja ukupnih proteina. pH vrednost sireva nakon 10 dana je bila karakteristična za grupu sireva u salamuri kod kojih se uobičajeno kreće u opsegu 4,5-4,8 (Miočinović, 2020).

Tabela 22. Uticaj CaCl₂ i perioda zrenja na osnovne parametre kvaliteta kozjih sireva u salamuri

Period zrenja	Parametar	Sirevi	
		DM	DMCa
1 Dan	SM (%)	44,14±0,18	41,14±1,30
	MM (%)	21,37±0,88	20,63±0,88
	MuSM (%)	48,41	50,15
	UP (%)	16,68±1,03	16,50±2,51
	VuBMS (%)	71,04	74,16
	pH	5,14±0,04	5,10±0,10
10 Dana	SM (%)	45,58±1,08	45,87±0,18
	MM (%)	24,75±0,71	25,25±0,35
	MuSM (%)	54,3	55,04
	UP (%)	17,74±1,69	17,52±2,43
	VuBMS (%)	72,31	72,41
	pH	4,83±0,11	4,89±0,01

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja ± standardna devijacija. DM- sir bez dodatka CaCl₂; DMCa- sir sa dodatkom CaCl₂

Na osnovu sadržaja masti u suvoj materiji (MuSM) ovi sirevi se mogu klasifikovati kao punomasni (> 45% MuSM) i prema sadržaju vode u bezmasnoj suvoj materiji (VuBSM) se mogu svrstati u meke sireve (> 67% VuBSM) prema zahtevima Pravilnika (Službeni glasnik RS, 2014).

Analizom rezultata iz Tabele 23, uočava se da je zrenje doprinelo povećanju čvrstoće uzoraka pri kompresiji, pri čemu je taj trend bio izraženiji kod uzorka sa dodatkom kalcijum-hlorida. Takođe uočava se i porast vrednosti parametara žvkljivosti i gumastosti kod oba uzorka. Obzirom da je žvkljivost proizvod čvrstoće, kohezivnosti i elastičnosti, a gumastost je proizvod čvrstoće i kohezivnosti, razumljivo je da ovi parametri imaju isti trend kao i čvrstoća (Pons i Fiszman, 1996).

Nagli porast čvrstoće pri kompresiji uzoraka kozjih sireva u salamuri nakon 10 dana, takođe je zabeležen i kod Miloradović (2015). Smatra se da je ovo posledica pada pH vrednosti u ovom vremenskom intervalu.

Tabela 23. Uticaj CaCl₂ i zrenja na teksturalna svojstva kozjih sireva u salamuri

Period zrenja	Parametar	Sirevi	
		DM	DMCa
1 Dan	Čvrstoća	534±80 ^{aA}	490±87 ^{aA}
	Adhezivnost	1,18±0,29 ^{aA}	1,24±0,24 ^{aA}
	Elastičnost	0,94±0,15 ^{aA}	0,90±0,04 ^{aA}
	Kohezivnost	0,78±0,04 ^{aA}	0,77±0,05 ^{aA}
	Gumastost	381±72 ^{aA}	415±176 ^{aA}
	Žvkljivost	373±70 ^{aA}	386±80 ^{aA}
	Fleksibilnost	0,47±0,05 ^{aA}	0,45±0,07 ^{bA}
10 Dana	Čvrstoća	1472±247 ^{aB}	1605±216 ^{aB}
	Adhezivnost	1,15±0,23 ^{aA}	1,33±0,23 ^{aA}
	Elastičnost	0,91±0,03 ^{aA}	0,88±0,03 ^{aA}
	Kohezivnost	0,72±0,04 ^{aB}	0,69±0,04 ^{bB}
	Gumastost	1047±166 ^{aB}	1035±178 ^{aB}
	Žvkljivost	1042±212 ^{aB}	903±156 ^{bB}
	Fleksibilnost	0,32±0,03 ^{aB}	0,31±0,03 ^{aB}

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja ± standardna devijacija. Različita mala slova u redu ukazuju na značajnu razliku između uzoraka sa i bez CaCl₂, različita velika slova u koloni ukazuju na značajne razlike između mladih i zrelih sireva (p<0,05). DM- sir bez dodatka CaCl₂; DMCa- sir sa dodatkom CaCl₂

Može se primetiti i trend porasta adhezivnosti za uzorak sira sa kalcijumom nakon 10 dana, mada nije statistički značajan zbog velike varijabilnosti na nivou uzoraka. Adhezivnost je parametar teksture koji se odnosi na površinska svojstva proizvoda. Definisan je kao sila potrebna da se alat za ispitivanje teksture izvuče iz uzorka. Opisuje se još i kao „rad potreban za savladavanje privlačnih sila između površine hrane i površine drugih materijala sa kojima je hrana u kontaktu, kao što su jezik, zubi, nepce i td.“ (Pons i Fiszman, 1996). Na osnovu toga, moglo bi se reći da je kod uzoraka sira sa kalcijumom površina postala „lepljivija“ odnosno, adhezivnija, nakon 10 dana.

Koca i sar., (2011) su istakli da na strukturu sira utiče niz faktora kao što su: sastav, proteoliza, veličina masnih kapi i njihova distribucija, interakcije kazein-kazein, kazein-voda i kazein-mlečna mast, stanje u kome se nalazi voda, pH i oblik u kome se nalazi kalcijum (jonski ili vezan za kazeinski matriks). Takođe, navode da struktura formirane proteinske mreže sira određuje njegovu teksturu. Sa tim u vezi, jaka korelacija je uočena između promena u mikrostrukturi i teksturi kod belih sireva u salamuri u pomenutoj studiji. Pored toga, zaključeno je da na teksturu belog sira značajno utiče period zrenja, pri čemu je čvrstoća sira značajno porasla, dok su kohezivnost i elastičnost smanjene, u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije.

Tokom zrenja odvijaju se brojne promene kao što su proteoliza, glikoliza i lipoliza, variranje pH sira i rastvaranje rezidualnog kalcijum-fosfata što sve utiče na promene teksturalnih svojstava sira (Lucey i sar., 2003).

5.5.2. Uticaj kalcijum-hlorida na svojstva kozjeg sira za grilovanje

U ovom ogledu je proizveden sir od kozjeg mleka za grilovanje, u tipu Halumi (Halloumi), najpoznatijeg kiparskog sira sa oznakom geografskog porekla. Halumi se proizvodi kao zreo i svež sir i odlikuje ga zrenje u salamuri. Proizvodi se od mešanog ovčijeg i kozjeg mleka sa udelom 51% i kravljeg mleka koje učestvuje sa 49%. Specifičnost u izradi ovog sira je kuvanje kriški u deproteinizovanoj surutki na 90 °C u trajanju od 30 min. Ovaj korak je važan u proizvodnji, jer određuje teksturu sira. U našoj zemlji se ovaj tip sira proizvodi u zanatskim pogonima, posebno od kozjeg mleka (Miočinović, 2020).

Tabela 24. Uticaj CaCl_2 i perioda zrenja na osnovne parametre kvaliteta kozjih sireva za grilovanje

Period zrenja	Parametar	Sirevi	
		P	PCa
3 Dana	pH	6,56±0,00	6,48±0,14
	SM (%)	49,9±1,69	52,11±1,29
	MuSM (%)	48,0±5,45	48,61±5,25
	UP (%)	20,05±0,48	20,80±0,97
	VuBMS (%)	63,19±0,9	62,09±1,08
40 Dana	pH	5,47±0,31	6,05±0,26
	SM (%)	47,8±0,57	55,69±12,57
	MuSM (%)	47,11±2,77	45,66±1,13
	UP (%)	20,09±2,58	19,55±0,10
	VuBMS (%)	69,13±0,24	58,31±0,89

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja ± standardna devijacija. P- sir bez dodatka CaCl_2 ; PCa- sir sa dodatkom CaCl_2

Na osnovu Tabele 24 može se zapaziti pad pH vrednosti tokom zrenja. Kako neki autori ističu, dodavanje kalcijuma dovodi do brže sirišne koagulacije zbog kombinovanog uticaja povećane aktivnosti jona kalcijuma, ali i do sniženja pH mleka, što utiče na svojstva sira (Ong i sar., 2015). Može se uočiti da u poređenju sa pH kontrolnog sira kalcijum nije uzrokovao značajnije nižu pH tri dana nakon proizvodnje. Utvrđeni značajni pad pH sireva nakon 40 dana zrenja je u suprotnosti sa rezultatima zabeleženim za Halumi sir (Ayyash i Shah, 2010) međutim, ispitivanjem Nabulsi sira (Ayyash i Shah, 2011), koji se takođe odlikuje sličnim tehnološkim postupkom proizvodnje kao i Halumi, utvrđen je pad pH tokom skladištenja sira. Ovi autori smatraju da se objašnjenje za ovakav trend pH tokom skladištenja može pronaći u rastu mikroorganizama, pogotovo nestarterske mikrobiote bakterija mlečne kiseline, koje fermentišu laktozu i proizvode organske kiseline.

Prema sadržaju MuSM ovi sirevi se svrstavaju u grupu punomasnih sireva, jer im je MuSM > 45%, dok su prema sadržaju VuBMS u grupi polutvrdih sireva (54-69% VuBMS) na osnovu zahteva Pravilnika (Službeni glasnik RS, 2014). Parametar hemijskog sastava VuBMS se koristi za klasifikaciju sireva prema reološkim svojstvima sirnog testa. Variranje njegove vrednosti ukazuje na promenu odnosa između vode i proteina, što dovodi i do drugačijih teksturalnih svojstava sireva (Tunick i sar., 1993).

Povećanje vrednosti parametara VuBMS nakon perioda zrenja kontrolne varijante sira, ukazuje na omekšavanje sirnog testa u nekoj meri, dok smanjenje sadržaja MuSM odražava gubitak mlečne masti u surutki. Instrumentalnim ispitivanjem teksture su zabeležene manje vrednosti čvrstoće kod kontrolnog sira što takođe potvrđuje da je došlo do omekšavanja sira nakon zrenja. Smatra se da veći sadržaj vlage ukazuje na porozniju strukturu sira (Melilli i sar., 2003). Sa druge strane, Ayyash i Shah (2010) zabeležili su smanjenje sadržaja vlage i proteina u Halumi siru tokom skladištenja, što je u saglasnosti sa rezultatima eksperimentalne varijante sira (PCa) u ovom ogledu. Prema Guinee i Fox (1993), do smanjenja sadržaja vlage u siru dolazi usled migracije vode iz kriški sira.

Na osnovu rezultata analize teksture iz Tabele 25, uočava se da su nakon tri dana zrenja kozji sirevi za grilovanje proizvedeni sa dodatkom kalcijum-hlorida imali veću čvrstoću i manju fleksibilnost. Rezultati teksture ovog sira ukazuju na izražen uticaj dodatka kalcijuma na povećanje vrednosti čvrstoće, gumastosti i žvackljivosti u poređenju sa kontrolnom varijantom sira. Značajno smanjenje čvrstoće sireva nakon 40 dana ukazuje da je tokom zrenja verovatno došlo do proteolitičkih promena i razgradnje α_s -kazeina što je doprinelo omekšavanju sirnog testa.

Takođe, može se zapaziti da je adhezivnost opala u manjoj meri kod varijante sira sa kalcijumom nakon 40 dana, što ukazuje da je ovaj sir bio „lepljiviji“ u poređenju sa kontrolnom varijantom. Gumastost je sa druge strane, drastično smanjena nakon zrenja kod eksperimentalnog sira, dok je ovaj pad bio izražen u manjoj meri kod kontrolnog sira.

Generalno, parene sirne grude imaju veće vrednosti tvrdoće u poređenju sa neparenom grudom zbog njihovog nižeg sadržaja vode. Ispitivanje dužine trajanja parenja (potapanja sirne grude u surutki) od 60 i 30 minuta na svojstva sireva za grilovanje, utvrđeno je da su najveće vrednosti tvrdoće imali uzorci grude parene 60 minuta. Takođe gruda koja je parena 60 minuta imala je mnogo tamniji presek nego ona koja je parena 30 minuta. Zaključeno je da je najefikasnije vreme parenja grude 30 minuta, tokom kog su pasterizacija i higijena osigurane, pošto dodatnih 30 minuta parenja dovodi do gubitka isparljivih jedinjenja, nastanka tvrde grude i formiranja jedinjenja koja potamnjuju boju sirne grude i narušavaju organoleptička svojstva (Kaminarides i sar., 2015).

Tabela 25. Uticaj CaCl₂ i zrenja na teksturalna svojstva kozjih sireva za grilovanje

Period zrenja	Parametar	Sirevi	
		P	PCa
3 Dana	Čvrstoća	1554±168 ^{aA}	2190±166 ^{bA}
	Adhezivnost	1,02±0,24 ^{aA}	0,98±0,19 ^{aA}
	Elastičnost	0,98±0,02 ^{aA}	0,95±0,04 ^{aA}
	Kohezivnost	0,87±0,01 ^{aA}	0,87±0,02 ^{aA}
	Gumastost	1387±158 ^{aA}	1975±177 ^{bA}
	Žvkljivost	1354±156 ^{aA}	1841±153 ^{bA}
	Fleksibilnost	0,56±0,02 ^{aA}	0,54±0,03 ^{bA}
40 Dana	Čvrstoća	1293±223 ^{aB}	1500±209 ^{aB}
	Adhezivnost	0,40±0,09 ^{aB}	0,66±0,05 ^{bB}
	Elastičnost	0,97±0,02 ^{aA}	1,00±0,14 ^{aA}
	Kohezivnost	0,86±0,01 ^{aB}	0,87±0,01 ^{aA}
	Gumastost	1222±252 ^{aA}	1297±180 ^{aB}
	Žvkljivost	1227±289 ^{aA}	1266±161 ^{aB}
	Fleksibilnost	0,49±0,01 ^{aB}	0,49±0,02 ^{aB}

Rezultati u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja ± standardna devijacija. Različita mala slova u redu ukazuju na značajnu razliku između uzoraka sa i bez CaCl₂, različita velika slova u koloni ukazuju na značajne razlike između mladih i zrelih sireva (p<0,05). P- sir bez dodatka CaCl₂; PCa- sir sa dodatkom CaCl₂

U saglasnosti sa rezultatima ovog oglada, ispitivanjem teksture Nabulsi sira takođe je zabeleženo smanjenje čvrstoće tokom skladištenja (Ayyash i Shah, 2011). Smatra se da ovo može biti posledica povećane proteolitičke aktivnosti. Pored toga, smanjenje sadržaja Ca ili P tokom skladištenja može dovesti do manjeg stepena umreženosti kazeina što dodatno rezultuje očitavanjem manjih vrednosti čvrstoće sira (Guinee i sar., 2002; Joshi i sar., 2003).

Utvrđeno je da su čvrstoća i gumastost Nabulsi sira u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem Ca, dok su kohezivnost i adhezivnost parametri teksture u negativnoj korelaciji sa sadržajem ovog minerala, odnosno zaključeno je da smanjenje sadržaja kalcijuma u siru pospešuje omekšavanje sirnog testa (Ayyash i Shah, 2011). Obzirom da rezultati ove disertacije ukazuju da je sir kome je dodat CaCl₂ omekšao u većoj meri u poređenju sa kontrolnom varijantom, kao i da je bio adhezivniji, pri čemu je i velika standardna devijacija pridružena vrednostima merenja pojedinih parametara, može se pretpostaviti da kontradiktornost proizilazi iz varijabilnosti na nivou uzorkovanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Obogaćivanje mleka dodatkom izolata proteina mleka značajno je poboljšalo reološka i teksturalna svojstva jogurta od kozjeg mleka, i po svojstvima približilo ovaj proizvod čvrstom tipu jogurta od kravljeg mleka. S tim u vezi, modul elastičnosti G' pri pH 4,6 gela od obogaćenog kozjeg mleka je približno isti (112 Pa) modulu gela od kravljeg mleka (124 Pa). Vrednosti čvrstine jogurta od obogaćenog kozjeg mleka i kravljeg mleka nakon hlađenja su iznosile 234 g i 329 g što ukazuje da je i pored obogaćivanja sa izolatom proteina mleka kozji jogurt inferiorniji u pogledu čvrstine u odnosu na proizvod od kravljeg mleka.
2. Termički tretman mleka i dodatak enzima transglutaminaze su značajno uticali na reološka svojstva kiselih gelova od kozjeg mleka. Vreme geliranja je bilo značajno duže prilikom kisele koagulacije kozjeg mleka tretiranog blažim režimom pasterizacije i bez i sa dodatkom enzima. Modul elastičnosti G' pri pH 4,6 je značajno veći kod gela dobijenog od kozjeg mleka tretiranog strožim režimom i sa dodatkom enzima, a značajno manji kod gelova od kozjeg mleka tretiranog blažim režimom sa i bez dodatog enzima. Dodavanje enzima transglutaminaza je povećalo čvrstinu jogurta od mleka tretiranog visokim termičkim tretmanom, neposredno nakon proizvodnje kao i nakon perioda od 15 dana hladnog skladištenja u poređenju sa kontrolnim jogurtom bez enzima. Termički tretman 90 °C/5 min je podesniji u proizvodnji jogurta od kozjeg mleka, jer se na taj način postižu bolja reološka svojstva kao i tekstura, i obezbeđuju se bolji uslovi za aktivnost enzima u mleku. mTG enzim je ispoljio stabilizujući uticaj na preživljavanje starter kulture u jogurtu tokom skladištenja. U pogledu senzorno ocenjenog kvaliteta jogurta, nije zapažen bilo kakav negativan efekat dodavanja ovog enzima. Termički tretman mleka je značajno uticao na senzornu ocenu teksture jogurta, tako da su uzorci G90 i G90TG neposredno nakon proizvodnje, kao i tokom skladištenja, ocenjeni značajno većim ocenama u poređenju sa uzorcima od mleka tretiranog blažim termičkim tretmanom.
3. Poređenjem uticaja dodavanja enzima transglutaminaza na tok fermentacije i svojstva jogurta od kozjeg i kravljeg mleka tretiranog različitim režimima pasterizacije (72 °C/30 s i 90 °C/5 min) ustanovljen je značajan uticaj na reološka i teksturalna svojstva proizvoda. Jogurt proizveden od kravljeg mleka tretiranog strogim režimom termičke obrade je pokazao značajno veće vrednosti modula elastičnosti G' pri pH 4,6 i posebno nakon hlađenja u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Takođe, teksturalna svojstva jogurta od kravljeg mleka tretiranog strogim režimom pasterizacije su bila superiornija od jogurta dobijenog od iste vrste mleka tretiranog blažim režimom i posebno proizvoda od kozjeg mleka, čak iako je primenjen strogi režim pasterizacije. Ovaj rezultat ukazuje da bez obzira na primenjene tretmane jogurt od kozjeg mleka ima značajno slabija teksturalna svojstva u poređenju sa proizvodima od kravljeg mleka.
4. Različiti termički tretmani kozjeg mleka značajno utiču na reološka i teksturalna svojstva gelova odnosno jogurta. Kiseli gel i jogurt od mleka tretiranog na 85 °C/5 min imali su bolja reološka i teksturalna svojstva u poređenju sa umerenijim i intenzivnijim termičkim tretmanom. Takođe, srednja vrednost prečnika kazeinskih micela kozjeg mleka je nakon pomenutog tretmana bila najveća, dok sa druge strane, ima indicija da je viši režim pasterizacije, neočekivano, uzrokovao smanjenje prosečnog prečnika micela. Ipak, u cilju detaljnijeg sagledavanja promena veličine kazeinske micela u intervalu između primenjenih termičkih tretmana potrebna su dodatna istraživanja. Može se

pretpostaviti da primenom oštrijeg termičkog režima (95 °C/5 min) kozjeg mleka (uprkos većem obimu denaturacije proteina surutke) nastupaju strukturne promene u samoj miceli i dolazi do oslobađanja agregata proteina u serumsku fazu, usled čega je izmenjen proces kisele koagulacije kao i svojstva gela od ovakvog mleka.

5. Uticaj koncentracije sirila je bio značajan na vreme sirišne koagulacije (VK) sirovog i pasterizovanog kozjeg mleka. Smanjenje koncentracije sirila značajno je produžilo vreme koagulacije (prosečno pet puta) kada se porede prosečne vrednosti VK između sva četiri ispitana nivoa ovog faktora. Takođe, značajna razlika od 10–20 % u vremenu koagulacije ustanovljena je između sirovog i pasterizovanog mleka (65 °C/30 min) pri nižoj koncentraciji sirila (1,0 i 1,5 g/100 l), tako da se može zaključiti da vreme koagulacije zavisi od količine sirila. Utvrđeno je i da drastično povećanje koncentracije sirila (sa 2,0 na 5,4 g/100 l) nije značajno uticalo na porast čvrstine gela nakon 60 minuta merenja. Koncentracija sirila je značajno uticala na brzinu agregiranja (BA), tako da su pri nižim koncentracijama sirila zabeležene manje brzine koje su se kretale u intervalu od 0,02 Pa/s do 0,05 Pa/s. U opsegu koncentracija 1,0-2,0 g/100 l, povećanje količine sirila je imalo neznatan uticaj na brzinu agregiranja.
6. Snižavanje pH vrednosti mleka uzrokovalo je značajno skraćanje vremena koagulacije, pri čemu je pad pH od 6,5 do 6,1 doprineo dva puta kraćem vremenu koagulacije. Takođe, utvrđena je značajna razlika u VK između sirovog i pasterizovanog mleka pri nižim pH (6,3 i 6,1), pri čemu je kraće vreme zabeleženo kod termički tretiranog mleka. Ovim ogledom nije utvrđen značajan uticaj pH na čvrstinu sirišnog gela nakon 60 minuta. Brzina agregiranja se značajno povećala prilikom smanjenja pH pri koagulaciji i sirovog i termički tretiranog mleka pri čemu je pad pH od 6,5 do 6,1 doprineo dva puta većoj brzini agregiranja. Ovi rezultati ukazuju da se u proizvodnji može vršiti smanjenje pH vrednosti mleka koje bi doprinelo skraćanju vremena koagulacije odnosno povećanju brzine agregiranja ali bez urušavanja čvrstine gela.
7. Temperatura koagulacije ostvarila je značajan efekat na vreme koagulacije sirovog i pasterizovanog mleka, odnosno sa povišenjem temperature vreme koagulacije je bilo kraće. Porast temperature koagulacije sa 27°C na 35°C je doprineo skraćanju vremena koagulacije pasterizovanog mleka sa 12,6 minuta do 8,6 minuta. Temperatura i termički tretman mleka, kao i njihova interakcija nisu značajno uticali na čvrstinu sirišnog gela nakon 60 minuta. Temperatura koagulacije je imala značajan uticaj na brzinu agregiranja, pri čemu je rast temperature uzrokovao linearni porast brzine agregiranja. Ovi rezultati su od značaja za primenu u praksi, jer ukazuju da je moguće koristiti više temperature koagulacije koje ubrzavaju proces, ali ne dovode do narušavanja čvrstine, odnosno reoloških svojstava sirišnokoagulisanog gela, koji predstavlja strukturu budućeg sira.
8. Ispitivanjem uticaja laktacionog perioda ustanovljeno je najduže vreme koagulacije pri sirišnoj koagulaciji kozjeg mleka srednje laktacije koje je iznosilo 15 minuta za sirovo mleko i 13 minuta za pasterizovano mleko. Utvrđeno je da je kozje mleko srednje laktacije imalo dva i tri puta manju čvrstinu gela nakon 60 minuta koagulacije u odnosu na gel dobijen od kozjeg mleka rane odnosno kasne laktacije. Poređenjem sa rezultatima fizičko-hemijskog sastava mleka, uviđa se značajno manji sadržaj proteina, suve materije i mlečne masti u srednjoj u odnosu na ranu i kasnu laktaciju, što objašnjava uočeni trend. Ovi rezultati su značajni jer u zavisnosti od perioda laktacije i sastava mleka, neophodno je vršiti modifikacije tehnološkog postupka proizvodnje, kako bi se

postigla ujednačenost svojstava gotovih proizvoda, kao i da bi se proizvodnja obavljala na adekvatan način sa ekonomskog stanovišta.

9. Strožiji termički tretman kozjeg mleka (80 °C/5 min i 90 °C/5 min) je uzrokovao značajno smanjenje čvrstine sirišnog gela (ČG) u odnosu na vrednosti gela dobijenog od kozjeg mleka tretiranog blažim režimom (65 °C/ 30 minuta). Uticaj faktora termičkog tretmana mleka na vreme koagulacije je bio značajan, pri čemu je prosečno vreme koagulacije produženo sa porastom temperature tretmana od 65 °C/ 30 min do 80 °C/5 min i nije se promenilo značajno nakon tretmana na 90 °C/5 minuta. Takođe, sa povećanjem termičkog tretmana, brzina agregiranja se dva puta smanjila. Uticaj dodatka CaCl_2 nije bio značajan za ispitivane parametre koagulacije kozjeg mleka podvrgnutog istom režimu termičkog tretmana, što ukazuje da u proizvodnji kozjih sireva od pasterizovanog mleka nije neophodno koristiti ovaj dodatak koji je uobičajen u proizvodnji sireva od termički tretiranog kravljeg mleka.
10. Dodavanje kalcijum-hlorida u proizvodnji sireva u salamuri nije značajno uticao na sastav kao i teksturalna svojstva ovih sireva neposredno nakon proizvodnje. Takođe, nakon 10 dana zrenja nije ustanovljena statistički značajna razlika u većini teksturalnih svojstava (osim adhezivnosti) sireva u salamuri proizvedenih sa i bez dodavanja kalcijum-hlorida. U navedenom periodu zrenja ustanovljen je porast čvrstoće pri kompresiji uzoraka kozjih sireva, što je verovatno posledica pada pH vrednosti u ovom vremenskom intervalu. Nasuprot značajnom uticaju koji je zrenje imalo, CaCl_2 nije uticao na parametre teksture ispitivanih sireva te se ovaj dodatak može izostaviti u proizvodnji belih sireva u salamuri od pasterizovanog kozjeg mleka. U pogledu sastava, sirevi u salamuri bez i sa CaCl_2 se nisu razlikovali.
11. Dodavanje kalcijum-hlorida u proizvodnji sireva za grilovanje nije pokazalo značajn uticaj na sastav ovih sireva nakon proizvodnje. Neposredno nakon proizvodnje čvrstoća, žvakljivost i fleksibilnost kao teksturalna svojstva su se razlikovala kod sireva za grilovanje proizvedenih sa i bez kalcijum-hlorida. Međutim, nakon perioda zrenja od 40 dana razlika između ispitivanih varijanti sireva nije bila značajna, osim u adhezivnosti, što je pokazano i pri ispitivanju sireva u salamuri. Objašnjenje za ovu pojavu zahteva dodatna istraživanja. Tokom zrenja sireva za grilovanje ustanovljeno je smanjenje čvrstine verovatno kao posledica proteolitičkih promena i razgradnje α_s - kazeina što je doprinelo omekšavanju sirnog testa.
12. Na osnovu različitih zaključaka o uticaju CaCl_2 na parametre teksture belih sireva u salamuri i sireva za grilovanje, može se zaključiti da ovaj dodatak različito utiče u zavisnosti od vrste sira koja se proizvodi. Kod većine sireva od pasterizovanog kozjeg mleka, posebno onih sa određenim periodom zrenja, ovaj dodatak nije neophodan u proizvodnji za razliku od sireva od kravljeg mleka.

7. LITERATURA

- Abdulqadr, A. T., Sebo, N. H., & Mahmood, K. T. (2014). Effect of microbial transglutaminase addition on some physical, chemical and sensory properties of goat's milk yogurt. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*, 27(1), 19–30.
- Amatayakul, T., Sherkat, F., & Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocolloids*, 20(2), 314–324.
- Ambrosoli, R., di Stasio, L., & Mazzocco, P. (1988). Content of α s1-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 71(1), 24–28.
- And, J. L., & Guo, M. (2006). Effects of polymerized whey proteins on consistency and water-holding properties of goat's milk yogurt. *Journal of Food Science*, 71(1), C34–C38.
- Anema, S. G. (2008a). Heat and/or high-pressure treatment of skim milk: changes to the casein micelle size, whey proteins and the acid gelation properties of the milk. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 245–252.
- Anema, S. G. (2008b). On heating milk, the dissociation of κ -casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 75(4), 415–421.
- Anema, S. G., Kim Lee, S., & Klostermeyer, H. (2007). Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 99–106.
- Anema, S. G., & Klostermeyer, H. (1997). Heat-Induced, pH-Dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperatures below 100 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1108–1115.
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 73–83.
- Anema, S. G., & Stanley, D. J. (1998). Heat-induced, pH-dependent behaviour of protein in caprine milk. *International Dairy Journal*, 8(10–11), 917–923.
- Antunac, N., Havranek, J. L., & Samarzija, D. (2001). Effect of breed on chemical composition of goat milk. *Czech Journal of Animal Science-UZPI (Czech Republic)*.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Ardelean, A. I., Jaros, D., & Rohm, H. (2013). Influence of microbial transglutaminase cross-linking on gelation kinetics and texture of acid gels made from whole goats and cows milk. *Dairy Science & Technology*, 93(1), 63–71.
- Ardelean, A. I., Otto, C., Jaros, D., & Rohm, H. (2012). Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk. *Small Ruminant Research*, 106(1),

47–53.

Ardö, Y., & Polychroniadou, A. (1999). *Laboratory manual for chemical analysis of cheese: improvement of the quality of the production of raw milk cheeses*. Publications Office.

Atanasova, J., & Ivanova, I. (2010). Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2), 1799–1803.

Ayyash, M. M., & Shah, N. P. (2010). Effect of partial substitution of NaCl with KCl on Halloumi cheese during storage: Chemical composition, lactic bacterial count, and organic acids production. *Journal of Food Science*, 75(6), C525–C529.

Ayyash, M. M., & Shah, N. P. (2011). The effect of substituting NaCl with KCl on Nabulsi cheese: Chemical composition, total viable count, and texture profile. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2741–2751.

Balcones, E., Olano, A., & Calvo, M. M. (1996). Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1993–1996.

Beliciu, C. M., & Moraru, C. I. (2009). Effect of solvent and temperature on the size distribution of casein micelles measured by dynamic light scattering. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 1829–1839.

Bencini, R. (2002). Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 705–719.

Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6), 41–55.

Bogdanović, V., Đorđević, I., & Đurđević, I. (2008). Osobine mlečnosti balkanske koze u poluekstenzivnim uslovima gajenja. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 24(1–2), 59–67.

Bönisch, M. P., Huss, M., Weitzl, K., & Kulozik, U. (2007). Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal*, 17(11), 1360–1371.

Bouhallab, S., Leconte, N., Le Graet, Y., & Garem, A. (2002). Heat-induced coagulation of goat milk: modification of the environment of the casein micelles by membrane processes. *Le Lait*, 82(6), 673–681.

Božanić, R., Tratnik, L., & Drgalić, I. (2002). Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo*, 52(3), 207–237.

Casper, J. L., Wendorff, W. L., & 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.

Castillo, M., Payne, F., Hicks, C., & Lopez, M. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10(8), 551–562.

Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J., & López, M. B. (2002). Effect of calcium and

enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal*, 12(12), 1019–1023.

- Cecchinato, A., & Bittante, G. (2016). Genetic and environmental relationships of different measures of individual cheese yield and curd nutrients recovery with coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1975–1989.
- Chianese, L., Garro, G., Nicolai, M. A., Mauriello, R., Ferranti, P., Pizzano, R., Cappuccio, U., Laezza, P., Addeo, F., & Ramunno, L. (1993). The nature of β -casein in heterogeneity in caprine milk. *Le Lait*, 73(5–6), 533–547.
- Clark, S., & Sherbon, J. W. (2000). Alpha s1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, 38(2), 123–134.
- Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1996). The binding of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin to casein micelles in milk treated by different heating systems. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- Dalgleish, D. G., & Law, A. J. R. (1989). pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal of Dairy Research*, 56(5), 727–735.
- Dannenberg, F., & Kessler, H. (1988a). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53(1), 258–263.
- Dannenberg, F., & Kessler, H. G. (1988b). Effect of denaturation of β -lactoglobulin on texture properties of set-style nonfat yoghurt. 1. Syneresis. *Milchwissenschaft*, 43(10), 632–635.
- Daviau, C., Famelart, M. H., Pierre, A., Goudédranche, H., & Maubois, J. L. (2000). Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait*, 80(4), 397–415.
- Day, L., Williams, R. P. W., Otter, D., & Augustin, M. A. (2015). Casein polymorphism heterogeneity influences casein micelle size in milk of individual cows. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3633–3644.
- Devold, T. G., Brovold, M. J., Langsrud, T., & 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.
- Dimassi, O., Neidhart, S., Carle, R., Mertz, L., Migliore, G., Mané-Bielfeldt, A., & Zárata, 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.
- Domagała, J., Sady, M., Grega, T., & Najgebauer-Lejko, D. (2007). Changes in texture of yogurt from goat's milk modified by transglutaminase depending on pH of the milk. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23(5-6-2), 171–178.
- Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A. Y., & Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type

- goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112(1–3), 154–161.
- Dube, M., Schäfer, C., Neidhart, S., & Carle, R. (2007). Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. *European Food Research and Technology*, 225(2), 287–299.
- Farnsworth, J. P., Li, J., Hendricks, G. M., & Guo, M. R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65(1–2), 113–121.
- FIL-IDF. (1981). *Determination of fat content. Gerber butyrometers. Milk*. International Dairy Federation.
- FIL-IDF. (1982). *Determination of the total solids content. Cheese and processed cheese*. International Dairy Federation.
- FIL-IDF. (1986). *Determination of fat content. Cheese and processed cheese products*. International Dairy Federation.
- FIL-IDF. (1987). *Determination of total solids content. Milk, cream and evaporated milk*. International Dairy Federation.
- Foltmann, B. (1959). On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. *15th International Dairy Congress*, 2, 655.
- Fox, P. F. (1981). Heat-induced changes in milk preceding coagulation. *Journal of Dairy Science*, 64(11), 2127–2137.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of cheese science*. Springer.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(14), 5479–5485.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I., & López, M. B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 691–707.
- Glantz, M., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Lindmark Månsson, H., Stålhammar, H., & Paulsson, M. (2010). Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1444–1451.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Miralles, B., Agüera, P., & Amigo, L. (2004). Quantitative determination of α s2- and α s1-casein in goat's milk with different genotypes by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 279–284.
- Grosclaude, F., Mahé, M. F., Brignon, G., Di Stasio, L., & Jeunet, R. (1987). A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α s1-casein. *Genetics Selection*

Evolution, 19(4), 399.

- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., & Eberhard, P. (2009). Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19(2), 107–115.
- Guinee, T. P., Feeney, E. P., Auty, M. A. E., & Fox, P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1655–1669.
- Guinee, T. P., & Fox, P. F. (1993). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 257–302). Springer.
- Gunasekaran, S., & Mehmet Ak, M. (2003). *Cheese rheology and texture*. CRC Press LLC, Florida (p 41).
- Gunasekaran, Sundaram, & Ay, C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering*, 19(1), 63–73.
- 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), 3–6.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A., & Shalabi, S. I. (1996). Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 79(12), 2098–2103.
- Herrero, A. M., & Requena, T. (2006). The effect of supplementing goats milk with whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 87–92.
- Holter, H. (1932). On the activity of rennet. *Biochemische Zeitschrift*, 255, 164–174.
- Horne, D. S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 261–268.
- Horne, D. S. (2003). Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2–3), 255–263.
- Horne, D. S. (2020). Casein micelle structure and stability. In *Milk Proteins* (pp. 213–250). Elsevier.
- Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2017). Rennet-induced coagulation of milk. In *Cheese* (pp. 115–143). Elsevier.
- Huppertz, T., & Kelly, A. L. (2006). Physical chemistry of milk fat globules. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 173–212). Springer US.

- Iličić, M. D., Milanović, S. D., Carić, M. D., Vukić, V. R., Kanurić, K. G., Ranogajec, M. I., & Hrnjez, D. V. (2013). The Effect of Transglutaminase on Rheology and Texture of Fermented Milk Products. *Journal of Texture Studies*, *44*(2), 160–168.
- Inglingstad, R. A., Steinshamn, H., Dagnachew, B. S., Valenti, B., Criscione, A., Rukke, E. O., Devold, T. G., Skeie, S. B., & Vegarud, G. E. (2014). Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, *97*(6), 3800–3814.
- Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006a). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, *37*(2), 113–155.
- Jaros, D., Pätzold, J., Schwarzenbolz, U., & Rohm, H. (2006b). Small and large deformation rheology of acid gels from transglutaminase treated milks. *Food Biophysics*, *1*(3), 124–132.
- Jenness, R. (1980). Composition and characteristics of goat milk: Review 1968–1979. *Journal of Dairy Science*, *63*(10), 1605–1630.
- Jeurnink, T. J. M., & De Kruif, K. G. (1993). Changes in milk on heating: viscosity measurements. *Journal of Dairy Research*, *60*(2), 139–150.
- Joshi, N. S., Muthukumarappan, K., & Dave, R. I. (2003). Understanding the role of calcium in functionality of part skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, *86*(6), 1918–1926.
- Jumah, R. Y., Shaker, R. R., & Abu-Jdayil, B. (2001). Effect of milk source on the rheological properties of yogurt during the gelation process. *International Journal of Dairy Technology*, *54*(3), 89–93.
- Kaminarides, S., Litos, I., Massouras, T., & Georgala, A. (2015). The effect of cooking time on curd composition and textural properties of sheep Halloumi cheese. *Small Ruminant Research*, *125*, 106–114.
- Karam, M. C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., & Scher, J. (2013). Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: A review. *Journal of Dairy Research*, *80*(4), 400–409.
- Keogh, M. K., & O’Kennedy, B. T. (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science*, *63*(1), 108–112.
- Kljajevic, N. V., Jovanovic, S. T., Miloradovic, Z. N., Macej, O. D., Vucic, T. R., & Zdravkovic, I. R. (2016). Influence of the frozen storage period on the coagulation properties of caprine milk. *International Dairy Journal*, *58*, 36–38.
- Kljajevic, N. V., Tomasevic, I. B., Miloradovic, Z. N., Nedeljkovic, A., Miocinovic, J. B., & Jovanovic, S. T. (2018). Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(1), 299–303.
- Koca, N., Balasubramaniam, V. M., & Harper, W. J. (2011). High-pressure effects on the microstructure, texture, and color of White-brined cheese. *Journal of Food Science*, *76*(5), E399–E404.

- Koca, N., & Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(4), 365–373.
- Kowalchuk, A. W., & Olson, N. F. (1977). Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *Journal of Dairy Science*, 60(8), 1256–1259.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lam, E., McKinnon, I., Marchesseau, S., Otter, D., Zhou, P., & Hemar, Y. (2018). The effect of transglutaminase on reconstituted skim milks at alkaline pH. *Food Hydrocolloids*, 85, 10–20.
- Lam, E., Otter, D., Huppertz, T., Zhou, P., & Hemar, Y. (2019). Effect of transglutaminase and acidification temperature on the gelation of reconstituted skim milk. *International Dairy Journal*, 92, 59–68.
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2003). Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34(5–6), 515–536.
- Lopes da Silva, J. A., & Rao, M. A. (1999). Rheological behavior of food gel systems. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods Principles and Applications*, 319–368.
- López, M., Lomholt, S., & Qvist, K. (1998). Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 8(4), 289–293.
- Lorenzen, P. C., & Neve, H. (2003). Enzymatic crosslinking of proteins in the manufacture of fermented milk. *International Dairy Federation Special Issue*, 1, 241–249.
- Lorenzen, P. C., Neve, H., Mautner, A., & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 152–157.
- Lucey, J. A. (2001). The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 603–608.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281–294.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725–2743.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1998a). Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, 63(4), 660–664.
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998b). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555–567.

- Lucey, J. A., Van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P. (1997b). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties. *International Dairy Journal*, 7(6-7), 381-388.
- Lucey, J. A., & Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1714-1724.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 275-279.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542.
- Lucey, J. A., Teo, C. T. E. T., Munro, P. A., & Singh, H. (1997a). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64(4), 591-600.
- Lucey, J. A. (2004). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 77-84.
- Lucey, J. A. (2016). Acid coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 309-328). Springer New York.
- Marletta, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Guastella, A. M., & D'Urso, G. (2007). Casein polymorphism in goat's milk. *Dairy Science and Technology*, 87(6), 491-504.
- Martin-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 827-833.
- Martín-Diana, A., Fraga, M., & Fontecha, J. (2002). Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, 214(4), 282-286.
- Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L., & Leroux, C. (2002). The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*, 42(5), 433-459.
- McMahon, D. J., Brown, R. J., Richardson, G. H., & Ernstrom, C. A. (1984). Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 930-938.
- Medina, M., & Nuñez, M. (2004). Cheeses made from ewes' and goats' milk. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 2, pp. 279-299). Elsevier.
- Melilli, C., Barbano, D. M., Licitra, G., Tumino, G., Farina, G., & Carpino, S. (2003). Influence of presalting and brine concentration on salt uptake by Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1083-1100.
- Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J. H., & van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid*

and *Interface Science*, 98(1), 25–50.

- Milanović, S., Iličić, M., Carić, M. (2017). *Fermentisani mlečni proizvodi*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, (p. 242).
- Miloradović, Z. (2015). *Karakteristike belih sireva u salamuri proizvedenih od kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima*. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Miloradovic, Z., Kljajevic, N., Jovanovic, S., Vucic, T., & Macej, O. (2015). The effect of heat treatment and skimming on precipitate formation in caprine and bovine milks. *Journal of Dairy Research*, 82(1), 22–28.
- Miloradovic, Z., Kljajevic, N., Miocinovic, J., Levic, S., Pavlovic, V. B., Blažić, M., & Pudja, P. (2020). Rheology and microstructures of rennet gels from differently heated goat milk. *Foods*, 9(3), 283.
- Miloradovic, Z., Kljajevic, N., Miocinovic, J., Tomic, N., Smiljanic, J., & Macej, O. (2017). High heat treatment of goat cheese milk. The effect on yield, composition, proteolysis, texture and sensory quality of cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 68, 1–8.
- Miloradovic, Z., Miocinovic, J., Kljajevic, N., Tomasevic, I., & Pudja, P. (2018). The influence of milk heat treatment on composition, texture, colour and sensory characteristics of cows' and goats' Quark-type cheeses. *Small Ruminant Research*, 169, 154–159.
- Miočinović, J. (2020). *Tehnologija mleka II Posebno sirarstvo*. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Miocinovic, J., Miloradovic, Z., Josipovic, M., Nedeljkovic, A., Radovanovic, M., & Pudja, P. (2016). Rheological and textural properties of goat and cow milk set type yoghurts. *International Dairy Journal*, 58, 43–45.
- Mistry, V. V. & Hassan, H. N. (1992). Manufacture of nonfat yogurt from a high milk protein powder. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 947–957.
- Moatsou, G., Vamvakaki, A. N., Mollé, D., Anifantakis, E., & Léonil, J. (2006). Protein composition and polymorphism in the milk of Skopelos goats. *Le Lait*, 86(5), 345–357.
- Modler, H. W., Larmond, M. E., Lin, C. S., Froehlich, D., & Emmons, D. B. (1983). Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(3), 422–429.
- Moioli, B., Pilla, F., & Tripaldi, C. (1998). Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, 27(3), 185–195.
- Montilla, A., Balcones, E., Olano, A., & 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.
- Morgan, F., Micault, S., & 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.
- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., & Rezaei, K. (2006). Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 59(1), 8–11.
- Mulvihill, D., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation—a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 43–75.
- Nájera, A. I., de Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345–352.
- Neve, H., Lorenzen, P. C., Mautner, A., Schlimme, E., & Heller, K. J. (2001). Effects of transglutaminase treatment on the production of set skim milk yoghurt: Microbiological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53(4), 347–361.
- Nguyen, H. T. H., Afsar, S., & Day, L. (2018). Differences in the microstructure and rheological properties of low-fat yoghurts from goat, sheep and cow milk. *Food Research International*, 108, 423–429.
- Nicolau i Villellas, N. (2015). *Influence of high pressure treatments on goat's milk cheese for the improvement of its sensory and commercial characteristics*.
- Nishinari, K., Fang, Y., & Rosenthal, A. (2019). Human oral processing and texture profile analysis parameters: Bridging the gap between the sensory evaluation and the instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*, 50(5), 369–380.
- O'Connor, P., & Fox, P. F. (1977). The proteins and salts of some non-bovine milks. *Journal of Dairy Research*, 44(3), 607–609.
- Oliveira, M., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11(11–12), 935–942.
- Ong, L., Soodam, K., Kentish, S. E., Powell, I. B., & Gras, S. L. (2015). The addition of calcium chloride in combination with a lower draining pH to change the microstructure and improve fat retention in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 46, 53–62.
- Ozer, B., Kirmaci, H. A., Oztekin, S., Hayaloglu, A., & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17(3), 199–207.
- Pal, M., Dudhrejiya, T. P., Pinto, S., Brahamani, D., Vijayageetha, V., Reddy, Y. K., Roy, P., Chhetri, A., Sarkar, S., & Kate, P. (2017). Goat milk products and their significance. *Beverage & Food World*, 44(7), 21–25.

- Panthi, R. R., Kelly, A. L., Sheehan, J. J., Bulbul, K., Vollmer, A. H., & McMahon, D. J. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 177–189.
- Park, Y. W. (2010). *Improving Goat Milk. In: Improving the Safety and Quality of Milk. Vol. 2. Improving quality in milk products. Mansel Griffiths, Ed. Woodhead Publishing, Cambridge, England. Chapter 12, (pp. 304-346).*
- Park, Y. W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, *14*(2), 151–159.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1–2), 88–113.
- Park, Y. W., & Haenlein, G. F. W. (2008). Handbook of milk of non-bovine mammals. In: *Handbook of milk of non-bovine mammals.*
- Park, Y. W., Haenlein, G. F. W., & Wendorff, W. L. (2006). Overview of milk of non-bovine mammals. *Handbook of milk of non-bovine mammals*, 3-9.
- Payens, T. A. J. (1977). On enzymatic clotting processes. *Biophysical Chemistry*, *6*(3), 263–270.
- Peleg, M. (2019). The instrumental texture profile analysis revisited. *Journal of Texture Studies*, *50*(5), 362–368.
- Peng, Y., Serra, M., Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2009). Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, *74*(9), C666–C673.
- Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., & 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), 77–86.
- Pierre, A., Michel, F., Le Graët, Y., & Zahoute, L. (1998). Casein micelle size in relation with casein composition and α s1 , α s2 , β and K casein contents in goat milk. *Le Lait*, *78*(6), 591–605.
- Pons, M., & Fiszman, S. M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, *27*(6), 597–624.
- Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura. (2014). *Službeni Glasnik Republike Srbije. Br. 33, 2010; Br. 69, 2010; Br.43, 2013 i Br. 34, 2014.*
- Puđa, P. (1992). *Karakteristike tvrdih sireva izradenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termicke obrade mleka.* Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Puđa, P. (2009). *Tehnologija mleka 1, Sirarstvo-opšti deo.* Beograd: Poljoprivredni Fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L., Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm

structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729.

- Puvanenthiran, A., Williams, R. P., & Augustin, M. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12(4), 383–391.
- Ramunno, L., Pauciullo, A., Mancusi, A., Cosenza, G., Mariani, P., & Malacarne, M. (2007). Influence of genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins on structural and nutritional characteristics and on the dairy aptitude and hypoallergenic properties of goat milk. *Scienza E Tecnica Lattiero Casearia*, 58(4), 257.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 207–220.
- Raynal-Ljutovac, Ketsia, Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1), 57–72.
- Raynal, K., & 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.
- Remeuf, F. (1992). Physico-chemical properties of goat milk in relation to processing characteristics. *Proceedings of the National Symposium on Dairy Goat Production and Marketing Oklahoma City OK*, 98–110.
- Remeuf, F., & Lenoir, J. (1986). Relationship between the physico-chemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Bulletin-Fédération Internationale de Laiterie*, 202, 68–72.
- Republički zavod za statistiku. (2020). *Stočarska proizvodnja – mleko, jaja, med, vuna*. Beograd: Republički Zavod za Statistiku. Dostupno na: <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130202010402?languageCode=sr-Cyrl>
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2010). A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks. *Food Chemistry*, 119(3), 1108–1113.
- Robinson, R. K., Lucey, J. A., & Tamime, A. Y. (2006). Manufacture of yoghurt. In *Fermented Milks* (pp. 53–75). Blackwell Publishing Ltd.
- Robinson, R. K., & Tamime, A. Y. (1993). Manufacture of yoghurt and other fermented milks. In *Modern Dairy Technology* (pp. 1–48). Springer (US).
- Rodriguez-Nogales, J. M. (2006). Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, 16(1), 26–32.
- Roefs, S. P. F. M., De Groot-Mostert, A. E. A., & Van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 1. Formation and model of gel network. *Colloids and Surfaces*, 50, 141–159.

- Roefs, S. P. F. M., & van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. *Colloids and Surfaces*, *50*, 161–175.
- Rönnegård, E., & Dejmek, P. (1993). Development and breakdown of structure in yoghurt studied by oscillatory rheological measurements. *Le Lait*, *73*(4), 371–379.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, *56*(2), 76–85.
- Rysstad, G., Knutsen, W. J., & Abrahamsen, R. K. (1990). Effect of threonine and glycine on acetaldehyde formation in goats' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*, *57*(3), 401–411.
- Salaün, F., Mietton, B., & Gaucheron, F. (2005). Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, *15*(2), 95–109.
- Sandra, S., Cooper, C., Alexander, M., & Corredig, M. (2011). Coagulation properties of ultrafiltered milk retentates measured using rheology and diffusing wave spectroscopy. *Food Research International*, *44*(4), 951–956.
- Schorsch, C., Carrie, H., Clark, A. H., & Norton, I. T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *International Dairy Journal*, *10*(8), 519–528.
- Scintu, M. F., & Piredda, G. (2007). Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research*, *68*(1–2), 221–231.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & 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., & 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.
- Skapetas, B., & Bampidis, V. (2016). Goat production in the World: present situation and trends. *Livest Res Rural Dev*, *28*(11), 200.
- Stocco, G., Pazzola, M., Dettori, M. L., Paschino, P., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2018). Effect of composition on coagulation, curd firming, and syneresis of goat milk. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 9693–9702.
- Stokes, J. R., Boehm, M. W., & Baier, S. K. (2013). Oral processing, texture and mouthfeel: From rheology to tribology and beyond. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *18*(4), 349–359.
- Storry, J. E., & Ford, G. D. (1982). Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *Journal of Dairy Research*, *49*(3), 469–477.
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: science and technology*. Woodhead Publishing.
- Tscharnutter, W. (2000). Photon correlation spectroscopy in particle sizing. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 5469–5485). John Wiley & Sons.

- Tunick, M. H., Mackey, K. L., Shieh, J. J., Smith, P. W., Cooke, P., & Malin, E. L. (1993). Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 3(7), 649–662.
- van Vliet, T., van Dijk, H. J. M., Zoon, P., & Walstra, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science*, 269(6), 620–627.
- van Vliet, T., Lakemond, C. M. M., & Visschers, R. W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 298–304.
- Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2008). Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 18(12), 1146–1152.
- Vasbinder, A. J., Alting, A. C., & de Kruif, K. G. (2003). Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1–4), 115–123.
- Vegarud, G., Devold, T., Opheim, R., Loeding, E., Svenning, C., Abrahamsen, R., Lien, S., & Langsrud, T. (1999). Genetic variants of Norwegian goats milk composition, micellar size and renneting properties. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 367–368.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry & physics*. John Wiley & Sons.
- Zhao, L., Zhang, S., Uluko, H., Liu, L., Lu, J., Xue, H., Kong, F., & Lv, J. (2014). Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk. *Food Chemistry*, 165, 167–174.
- Žujović, M., Memiši, N., & Ivanović, S. (2011). Present status, possibilities and perspective of development of goat production in Republic of Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(3), 431–443.

Biografija

Marina Hovjecki je rođena 26.07.1988. godine u Gornjem Milanovcu. Osnovnu školu je završila u Ljigu, a zatim i gimnaziju (opšti smer) u istom mestu. Osnovne akademske studije upisala je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu školske 2007/08 godine i završila ih je 2011. godine sa opštim uspehom 9,00. Master akademske studije je upisala školske 2011/12 godine takođe na Poljoprivrednom fakultetu (smer Prehrambena tehnologija), a završila ih je 2012. godine sa opštim uspehom 9,86 (devet osamdeset šest). Zvanje master inženjer tehnologije stekla je nakon odbrane master rada „Tok zrenja autohtonog sira u salamuri sa područja Ljiga“. Doktorske akademske studije – studijski program Prehrambena tehnologija, upisala je školske 2013/14. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položila je sve ispite predviđene programom na ovom stepenu studija, sa prosečnom ocenom 9,00. Bila je stipendista Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja.

Trenutno je zaposlena na Poljoprivrednom fakultetu kao istraživač pripravnik, gde obavlja poslove vezane za naučnoistraživački rad Odeljenja za tehnologiju mleka i pruža pomoć u izvođenju eksperimentalnih vežbi. U saradnji sa kolegama objavila je više bibliografskih jedinica, od toga u kategoriji M20: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марина Ховјецки

Број индекса ТХ 13/17

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

”Утицај одабраних фактора на ток киселе и сиришне коагулације козјег млека и квалитет јогурта и сирева”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марина Ховјецки**

Број индекса **ТХ 13/17**

Студијски програм **Прехрамбена технологија**

Наслов рада **„Утицај одабраних фактора на ток киселе и сиришне коагулације козијег млека и квалитет јогурта и сирева”**

Ментор **др Јелена Миочиновић, редовни професор**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

“Утицај одабраних фактора на ток киселе и сиришне коагулације козјег млека и квалитет јогурта и сирева”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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.

