

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mira M. Radovanović

**UTICAJ SASTAVA I TERMIČKOG TRETMANA
MLEKA NA DISTRIBUCIJU PROTEINA U
PROIZVODNJI KAJMAKA I SVOJSTVA
FORMIRANE POKOŽICE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Mira M. Radovanović

**THE INFLUENCE OF MILK COMPOSITION AND
HEAT TREATMENT ON THE DISTRIBUTION OF
PROTEINS IN KAJMAK PRODUCTION AND
PROPERTIES OF THE FORMED SKIN LAYER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

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

Član komisije: dr Spasenija Milanović, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Član komisije: dr Biljana Vucelić-Radović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Član komisije: dr Jelena Miočinović, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Član komisije: dr Olivera Ećim-Đurić, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Joví,

Za seč anje í zahvalnost za

Bezgranič no poverenje,

Podršku í ljubav

Veliku zahvalnost izražavam mentoru prof. dr Predragu Puđi na pomoći, podršci i korisnim savetima u toku osmišljavanja teme i izrade disertacije, kao i tokom našeg dosadašnjeg rada na problematici kajmaka

Želim da izrazim zahvalnost prof. dr Spaseniji Milanović na podršci i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja ovog rada

Želim da izrazim zahvalnost prof. dr Biljani Vucelić-Radović na korisnim savetima tokom izrade i pisanja ovog rada

Želim da izrazim zahvalnost dr. Jeleni Miočinović na bezgraničnoj i nesebičnoj pomoći tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, kao i tokom našeg dosadašnjeg rada

Želim da izrazim zahvalnost dr. Oliveri Ećim-Đurić na korisnim savetima tokom izrade i pisanja ovog rada.

Prof. dr Vladi Pavlović izrazavam veliku zahvalnost na pomoći prilikom izrade dela eksperimentalnog rada koji obuhvata izučavanje mikrostrukture primenom elektronske mikroskopije

Zahvaljujem se dr. Aleksandri Zeljković i dr. Jeleni Vekić sa Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na pomoći tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada koji obuhvata elektroforetska ispitivanja

Zahvaljujem se mladom kolegi Aleksandru Nedeljkoviću na bezgraničnoj i nesebičnoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije kao i tokom našeg dosadašnjeg zajedničkog rada

Zahvaljujem se Draganu Vukadinoviću, vlasniku mlekare „Granice”, iz Mladenovca, na pomoći u obezbeđivanju sirovima tokom izrade doktorske disertacije

Zahvaljujem se dr. Vesni Matekalo-Sverak, direktoru Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, na humanom gestu, dragocenoj pomoći bez koje ne bi bilo ove doktorske disertacije

Zahvalnost izražavam svim članovima Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda, posebno Odeljenju za Tehnologiju mleka, na pomoći tokom izrade doktorske disertacije

REZIME

Kajmak je srpski autohtoni mlečni proizvod koji se prevashodno izrađuje u domaćoj radinosti. Odlikuje se specifičnim sastavom i senzornim svojstvima, na osnovu kojih se može svrstati u grupu delikatesnih mlečnih proizvoda, koji se nalaze između sireva i maslaca. Međutim, izrazita raznolikost uslova u kojima se proizvodi rezultira u izrazito velikom variranju sastava i kvaliteta kajmaka, koja onemogućavaju njegov organizovan i širi nastup na tržištu. Proces formiranja kajmaka može se podeliti na toplu i hladnu fazu. U toploj fazi, usled površinske aktivnosti masti i proteina, kao i intenzivnog isparavanja vode, dolazi do formiranja početne pokožice, koja predstavlja osnovu i gornji sloj kajmaka, dok u hladnoj fazi dolazi do obogaćivanja pokožice mlečnom mašću, pri čemu se formira donji sloj kajmaka.

Termički tretman mleka zastupljen u proizvodnji kajmaka rezultuje izraženim promenama na proteinskom kompleksu mleka, pri čemu dolazi do denaturacije proteina surutke, stvaranja koagregata proteina mleka kao i reakcije denaturisanih proteina surutke sa proteinima iz adsorpcionog sloja globula mlečne masti (MFGM). Usled površinske aktivnosti masti i proteina vrelog mleka dolazi do njihove difuzije i koncentrisanja u graničnom sloju mleko-vazduh. Kazeini se u mleku nalaze u micelarnoj formi i kao takvi pokazuju mali afinitet prema hidrofobnim površinama. Nativni proteini surutke su globularni i sporije se adsorbuju. Međutim, nakon termičkog tretmana, na temperaturama od 70 do 75°C, proteini surutke denaturišu, pri čemu dolazi do modifikacije sekundarne i tercijarne konformacije molekula ovih proteina. Ove modifikacije uzrokuju promene njihovih funkcionalnih svojstava, koje se ogledaju u povećanoj površinskoj aktivnosti, izmenjenoj međupovršinskoj reologiji, emulzionim i penivim svojstvima i dr.

Ambijentalni uslovi u kojima se izvodi proces formiranja kajmaka predstavljaju značajan faktor u proizvodnji kajmaka. U toku procesa formiranja pokožice i kajmaka mleko se neprekidno hladi i permanentno je u kontaktu sa okolnim vazduhom. U toku procesa hlađenja dolazi do razmene energije, odnosno, procesa predaje toplotnog fluksa sa strane vrelog mleka vazduhu, uz istovremeno isparavanje vode iz mleka.

Istraživanja obuhvaćena ovim radom imaju za cilj detaljnije sagledavanje mehanizama formiranja kajmaka, kao i faktora koji utiču na sastav i svojstva proizvoda, a sve u funkciji stvaranja šire naučne osnove u poznavanju postupka formiranja ovog

specifičnog mlečnog proizvoda. Eksperimentalni rad disertacije je realizovan izvođenjem procesa formiranja kajmaka u toku prvih 60 minuta u ambijentalnim i u kontrolisanim uslovima, a obuhvata proučavanje uticaja sastava i termičkog tretmana mleka, kao i parametara vazduha, na proces početne faze proizvodnje kajmaka u kojoj dolazi do formiranja pokožice, kao osnove strukture budućeg proizvoda. Primenom elektroforetskih tehnika, kako u redukujućim tako i u neredukujućim uslovima, ostvarena je karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre i nakon formiranja pokožica, kao i proizvedenih pokožica. Uticaj termičkog tretmana i sastava mleka na strukturu pokožice sagledan je primenom tehnike skenirajuće elektronske mikroskopije.

Na osnovu analize poređenja koeficijenata varijacije (C_v) rezultata različitih ogleda ustanovljeno je značajno smanjenje varijabilnosti parametara prinosa i sastava uzoraka ogleda izvedenih u uslovima kontrolisanih parametara vazduha u poređenju sa ogledima izvedenih u ambijentalnim tj. nekontrolisanim uslovima.

Uticaj termičkog tretmana na formiranje pokožice je dvojak i može se posmatrati kroz uticaj: (i) na proteinski kompleks mleka i (ii) na visinu početne temperature formiranja kajmaka. Intenzitet termičkog tretmana se reflektuje na ponašanje proteina na graničnoj površini, dok se uticaj početne temperature ogleda kroz intenzitet isparavanja vode iz mleka. Vrednost početne temperature formiranja kajmaka, zahvaljujući specifičnom karakteru uticaja na proteine i masti, predstavlja veoma snažan mehanizam u upravljanju procesom formiranja pokožice. Eksperimentalno je utvrđeno da se snižavanjem početne temperature formiranja kajmaka snižava koncentracija proteina, a povećava koncentracija masti u pokožici.

Ispitivanja uticaja sastava mleka su pokazala da su proteini mleka, i pored relativno male zastupljenosti u kajmaku, daleko najvažniji konstituent, koji predstavlja osnovu za izgradnju strukture pokožice. Karakter i intenzitet uticaja proteina u mleku na sastav pokožica preovlađujuće zavisi od njihove koncentracije u mleku. U slučaju rastućeg sadržaja proteina mleka, pri različitim koncentracijama masti mleka, dolazi do promene karaktera njihovog uticaja. Porast proteina u mleku sa 3,4% na 4,2% favorizuje uticaj masti, tako da je ustanovljeno povećanje količine masti pokožice za oko 20%, a proteina za samo oko 9%. Međutim, daljim povećanjem sadržaja proteina u mleku, sa 4,2% na 5%, dolazi do promene karaktera ponašanja u smislu preovlađujućeg uključivanja proteina u pokožicu, tako da je procenat porasta proteina oko 19%, a masti oko 7%.

Intenzitet preovlađujućeg uticaja proteina je jače izražen kod viših nivoa proteina u mleku, bez obzira na veliko učešće masti u mleku, koje je u našem slučaju iznosilo maksimalno 8%. U okviru proteinskog kompleksa esencijalnu ulogu imaju proteini surutke, čije se funkcionalno delovanje aktivira tokom termičke obrade mleka, tako da denaturisani proteini surutke na neki način predstavljaju cementni materijal u izgradnji pokožice. Funkcionalnost denaturisanih proteina surutke se ispoljava kroz razvijanje snažne emulgujuće funkcije razmotanih proteina surutke. Njihova funkcionalnost, uz promovisanje limitirane fibrozne strukture, posebno dolazi do izražaja u uslovima povećanog sadržaja masti u mleku. Naime, uvećano prisustvo masti dovodi do povećanja sadržaja masti u pokožici, uz istovremeni porast odnosa apsolutnih količina masti i proteina (M/P), što rezultira u povećanju razuđenosti proteinske strukture. Pri analiziranju doprinosa proteina u formiranju pokožice, stiče se utisak da kazeinska komponenta pokožice u većoj meri ima ulogu nosača denaturisanih proteina surutke, kao i gradivnu ulogu pokožice. Indicije ovakvog razmišljanja svoj osnov nalaze u postavci da je kazein u pokožici prisutan u micelarnoj formi, a što je potvrđeno veoma stabilnim međusobnim odnosom kazeinskih frakcija u pokožici. Elektroforetskim razdvajanjem u redukujućim i neredukujućim uslovima je potvrđeno da su proteini surutke, β -laktoglobulin i α -laktalbumin, u pokožici prisutni isključivo u vezanoj formi, pri čemu su preovlađujuće prisutni disulfidno vezani kompleksi. Takođe je pokazano da termički tretman i sastav mleka, kao i parametri vazduha nemaju uticaja na pojavni oblik distribucije ovih proteina surutke.

Masna faza u sastavu pokožice predstavlja najzastupljeniju komponentu. Međutim, naši rezultati su pokazali da mast, i pored najveće zastupljenosti, nema najvažniju ulogu u nastajanju pokožice. Masne globule, zahvaljujući svojoj membrani poseduju daleko najveći kapacitet za snižavanje površinskog napona, pa je u tom smislu i razumljiva koncentracija masti u površinskoj zoni mleka. Međutim, bez obzira na stepen koncentrovanja masti, formiranje pokožice izostaje ukoliko se onemogućiti isparavanje vode iz mleka i spreči dodatno koncentrisanje proteina, koje rezultira njihovom koagulacijom.

Ustanovljen je statistički vrlo značajan uticaj relativne vlažnosti vazduha na prinos i sadržaj masti pokožica. Utvrđeno je da niska relativna vlažnost vazduha (50%) omogućava veliki obim odnošenja vlage, što kao posledicu ima snažno isušivanje

pokožice. Povećana isušenost pokožice usporava dalje agregiranje proteinskog materijala, što u konačnom bilansu umanjuje prinos pokožice. Povećanjem relativne vlažnosti vazduha sa 50% na 70% dolazi do povećanja prinosa za oko 30% (sa 31,33g na 40,67g). Nasuprot tome, visoka relativna vlažnost tj. povećanje relativne vlažnosti sa 70% na 90% usporava gubitak vlage, a time usporava i agregiranje proteina, odnosno usporava formiranje pokožice, što za posledicu ima smanjenje prinosa za oko 9%. Stoga je za optimizaciju procesa formiranja kajmaka potrebno utvrditi optimalnu dinamiku, kako gubitka vlage, tako i agregiranja proteinskog materijala.

Temperatura vazduha, takođe, utiče na dinamiku formiranja pokožice. U našim ogleđima je utvrđeno da porast temperature vazduha ostvaruje dvojni uticaj: povećanje evaporacije vode, što za rezultat ima porast suve materije pokožice i istovremeno, povećanje hidrofobnosti sistema, što za rezultat ima snažnije inkorporiranje masti u pokožicu, tako da se sadržaj masti u suvoj materiji pokožice povećava. Ustanovljeno je da temperatura vazduha ima statistički značajan uticaj na prinos pokožice. Sa porastom temperature vazduha sa 20°C na 30°C dolazi do statistički značajnog porasta prinosa u iznosu od oko 14% (sa 35,67g na 40,67g). Dalji porast temperature vazduha na 40°C dovodi do pada prinosa za oko 5% (sa 40,67g na 38,67g) ali koji nije statistički značajan.

Na osnovu svega izloženog može se konstatovati da je formiranje pokožice veoma kompleksan proces. Naime, mehanizam njenog formiranja u velikoj meri zavisi od svih ispitivanih faktora kao što su: sastav i termički tretman mleka, kao i parametri vazduha. U istraživanjima je ustanovljeno da postoji veoma veliki stepen međusobne zavisnosti navedenih faktora kao i da centralna pozicija u formiranju pokožice pripada proteinima surutke, koji zahvaljujući razmotavanju globularne strukture višestruko uvećavaju svoju funkcionalnost, kako u procesu emulgovanja masti, tako i u procesu gelifikacije pokožice.

Ključne reči: kajmak, pokožica, površinska aktivnost, termički tretman mleka, mlečna mast, proteini, proteini surutke, bilans energije i mase, početna temperatura formiranja kajmaka

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Nauka o mleku

UDK broj: 637.131.3

SUMMARY

Kajmak is a Serbian autochthonous dairy product which is usually manufactured by the traditional production procedure. Kajmak is characterized by specific composition and unique properties and can be classified into the group of delicious dairy products, which takes place between cheese and butter. However, significant differences in the production conditions often result in a very large variations of the kajmak composition and quality, which prevent its widespread and organized appearance on the market. The process of kajmak formation can be divided into hot and cold phases. In the hot phase, due to the surface activity of proteins and fats, as well as the intense water evaporation, the formation of the initial skin layer occurs, which represents the base and the top layer of the final product (kajmak). In the cold phase, initial skin is being enriched by milk fat, resulting in the formation of the lower layer of the kajmak.

Heat treatment of milk, which is present in the kajmak production, results in the significant changes in milk protein complex, such as the denaturation of whey proteins, formation of milk protein coaggregates as well as reaction of denatured whey proteins and milk fat globule membrane (MFGM). Due to the strong surface activity, milk fat globule and proteins diffuse to the top layer of milk and concentrate at the air-milk interface. Casein, due to its micellar form, has minor affinity for hydrophobic surfaces compared with individual components of casein micelles or casein preparations. Native whey proteins are globular and hence shows a little surface activity. However, milk heat treatment at temperatures between 70°C to 75°C cause denaturation of whey proteins as well as modification of their secondary and tertiary structure. These modifications cause changes in their functional properties, which result in the increasing of surface activity, altered interfacial rheology, emulsion and foaming properties and others.

Environmental conditions represent an important factor in the overall kajmak production. During the process of the initial skin and kajmak formation, milk is continuously being cooled and permanently is in contact with the surrounding air. During the cooling process there is high energy exchange, i.e. the process of heat flux exchange from the hot milk to the surrounding air. At same time, there is the evaporation of water from milk.

The aim of this research was detailed investigation of the kajmak forming mechanisms, as well as factors that influence the composition and properties of this

specific dairy product. All of this was done in order to create a wider scientific knowledge and better understanding of kajmak formation process. Experimental work of this dissertation was carried out by performing the kajmak process formation during the first 60 minutes at ambient and controlled environmental conditions. Also, this study included the investigation of the influence of milk composition and heat treatment, as well as air parameters, on the initial phase of kajmak production and the skin layer properties which represent the basis of final product structure. The characterization of protein fractions of milk before and after skin layer formation, as well as initial skin layer formed, was carried out using the electrophoretic techniques, in both, reducing and non-reducing conditions. Also, the influence of milk composition and heat treatment on the structure of the skin formed has been analyzed using scanning electron microscopy.

The comparison of the coefficient of variation (C_V) showed the significant reduction in variability of yield and composition of the skin layer samples produced under controlled compared to the uncontrolled air parameters.

The influence of heat treatment on the skin layer formation can be observed through influence of (i) the milk protein complex and (ii) the initial temperature of the kajmak formation. The intensity of the milk heat treatment influence on the behavior of proteins on the milk surface, while the initial temperature has impact on the intensity of water evaporation from milk. The initial temperature, due to its specific influence on milk fat and proteins, represents very powerful tool for managing the process of the skin layer formation. This study has shown that the lowering of the initial temperature contributes to the decreasing of protein and increasing of milk fat concentrations in the skin layer.

The research of the influence of milk composition on the skin layer formation process has shown that the milk proteins are, despite their relatively small content, the most important constituent, which represents the basis for the skin layer structure. The character and intensity of the milk proteins impact prevailingly depends on their content in milk. In the case of increasing of the milk proteins content at different milk fat contents, the changes of the character of their influence were found. The increase of milk proteins from 3.4% to 4.2% resulted in increasing of fat and proteins content in the skin layer for about 20% and 9%, respectively. However, further increase in the milk protein content from 4.2% to 5%, resulted in the changes of the character due to their greater involvement in skin formed. Hence, the increasing of the proteins and fat in the

skin layer, due to increasing milk proteins content, were about 19% and 7%, respectively. Also, the impact of milk proteins was more pronounced at the higher levels of milk proteins, despite the high fat content which was maximum 8%. Whey proteins have an essential role within milk proteins complex, and their functional activity was expressed during milk heat treatment. So, denatured whey proteins somehow represent building material of the kajmak skin layer. Also, functionality of the denatured whey proteins, especially at high milk fat content, is mostly demonstrated through the development of strong emulsifying function of their unfolded structures as well as with promotion of limited fibrous structure. The increased milk fat content contributed to the increasing of the skin fat content, with the simultaneous rise in the milk fat and proteins ratio (M/P), which results in stretching of proteins matrix. Analysis of the protein contribution have shown that casein component of the skin layer present the carrier of denatured whey proteins, as well as building material of the skin layer. These implications have a basis in the assumption that the casein is present in the skin layer mainly in micellar form, which was confirmed by a stable and constant ratio of individual casein fractions in the skin layer. Electrophoretic analysis, in reducing and non-reducing conditions, confirmed that the whey proteins, β -lactoglobulin and α -lactalbumin, are present in the skin layer mainly as disulfide linked complexes. Also, the significant influence of the milk heat treatment and its composition as well as air parameters on the distribution of whey proteins in the skin was not found.

The most dominant component of the skin layer is fat phase. However, our results have shown that fat, despite their high content, didn't show major role in the skin layer formation. Milk fat globules, owing to its membrane, differ with the greatest capacity for lowering surface tension, what can be explanation for high fat concentration at the milk surface layer. However, the skin formation is impossible, despite the high fat concentration, if evaporation of water from milk is prevented as well as protein concentration and their further coagulation.

The statistical analysis showed highly significant influence of relative air humidity on yield and fat content of the skin layer. It was found that low level of relative air humidity (50%) allows the large amount of moisture removal, which causes the strong drying of the skin layer. Increased dryness of the skin layer slowed down further aggregation process of proteins material, which reduces the yield. Increasing the level of

relative air humidity from 50% to 70%, resulted in increase in yield by about 30% (from 31.33 g to 40.67 g). In contrast, the high relative air humidity (increase in relative air humidity from 70% to 90%) decelerated the moisture loss as well as proteins aggregation and formation of the skin layer, which resulted in reduced yields for about 9%. Therefore, for the optimization of kajmak formation process it is necessary to determine the optimal dynamics of both, moisture loss and the proteins aggregation.

The air temperature also affects on the dynamics of the skin layer formation. Our results have shown that an increase in air temperature achieves a dual effects: stimulates water evaporation (which contribute to dry matter increasing) and the hydrophobicity of the system (which indicates the greater incorporation of milk fat). It was found that air temperature has a significant influence on the yield of the skin layer. Increasing air temperature from 20°C to 30°C resulted in significant increase in yields by about 14% (from 35.67 g to 40.67 g). Further air temperature increasing up to 40°C resulted in the reduction in yield by about 5% (from 40.67 g to 38.67 g) which was not statistically significant.

According to this study, it can be concluded that kajmak skin formation present very complex process which is influenced by all studied factors such as: milk heat treatment and composition and air parameters. Also, very high mutual dependence of these factors was found. Whey proteins have central position in the skin layer formation belongs to whey proteins due to their unfolding of globular structures, which contributes to increasing of their functionality in both, the process of milk fat emulsification as well as gelification process during the skin layer formation.

Key words: kajmak, skin layer, surface activity, milk heat treatment , milk fat, proteins, whey proteins, energy and mass balance, the initial temperature of kajmak formation

Scientific Field: Technological Engineering

Narrow Scientific Field: Dairy Science

UDK number: 637.131.3

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. TRADICIONALNI POSTUPAK PROIZVODNJE KAJMAKA	4
2.1.1. <i>Tehnološki postupak i osnove mehanizama proizvodnje kajmaka</i>	5
2.1.2. <i>Nedostaci tradicionalnog postupka proizvodnje kajmaka</i>	7
2.2. FAKTORI KOJI UTIČU NA PROIZVODNJU KAJMAKA	8
2.2.1 <i>Sastav mleka</i>	10
2.2.1.1 <i>Uticao ishrane na sastav mlečne masti</i>	11
2.2.1.2 <i>Uticao rase i perioda laktacije na sastav mlečne masti</i>	14
2.2.2 <i>Ambijentalni uslovi</i>	15
2.3 UTICAJ TERMIČKOG TRETMANA NA PROTEINE MLEKA I POVRŠINSKE POJAVE	17
2.3.1 <i>Uticao visokih temperatura na kazein</i>	18
2.3.2 <i>Uticao visokih temperatura na proteine surutke</i>	25
2.3.2.1 <i>Uticao visokih temperatura na β-laktoglobulin</i>	26
2.3.2.2 <i>Uticao visokih temperatura na α-laktalbumin</i>	30
2.3.3 <i>Interakcije između kazeina i proteina surutke</i>	32
2.3.4 <i>Interakcije između proteina i MFGM</i>	37
2.3.5 <i>Površinska aktivnost komponenata mleka</i>	42
2.3.5.1 <i>Proteini mleka na međupovršinama</i>	44
2.3.5.1.1 <i>α1- i β-kazein na međupovršinama</i>	50
2.3.5.1.2 <i>β-laktoglobulin na međupovršinama</i>	55
2.3.5.2 <i>Kompetitivna i kooperativna adsorpcija proteina</i>	58
2.4 ZNAČAJ VAZDUHA KAO RADNOG AGENSA U PROCESU FORMIRANJA KAJMAKA	64
2.4.1 <i>Promene stanja vlažnog vazduha u procesu formiranja kajmaka</i>	66
2.4.2 <i>Matematički model razmene energije i mase u procesu formiranja kajmaka u kontrolisanim uslovima</i>	67
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	72
4. MATERIJAL I METOD RADA	74
4.1 EKSPERIMENTALNI RAD	74
4.1.1 <i>Priprema uzoraka za ispitivanje</i>	74
4.1.1.1 <i>Priprema uzoraka pokožica i kajmaka</i>	74

4.1.1.2	<i>Priprema uzoraka mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica</i>	77
4.1.2	<i>Sagledavanje značaja odabranih parametara procesa formiranja kajmaka</i>	77
4.1.2.1	<i>Režim termičkog tretmana mleka</i>	77
4.1.2.1.1	<i>Temperatura i vreme termičkog tretmana mleka</i>	77
4.1.2.1.2	<i>Dinamika termičkog tretmana mleka</i>	78
4.1.2.2	<i>Uslovi i dinamika formiranja kajmaka</i>	79
4.1.2.2.1	<i>Početna temperatura formiranja kajmaka</i>	79
4.1.2.2.2	<i>Vreme formiranja kajmaka</i>	79
4.1.2.3	<i>Sastav mleka</i>	80
4.1.2.3.1	<i>Sadržaj mlečne masti i proteina</i>	80
4.1.2.3.2	<i>Uticaj dodatih proteina surutke</i>	80
4.1.3	<i>Proučavanje uticaja termičkog tretmana mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteiniskih frakcija u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka</i>	80
4.1.4	<i>Proučavanje uticaja sastava mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteiniskih frakcija u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka</i>	81
4.1.5	<i>Proučavanje uticaja parametara vazduha na prinos i sastav pokožica, distribuciju proteinskih frakcija i bilans energije i mase u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka</i>	82
4.2	METODE RADA	82
4.2.1	<i>Analitičke metode ispitivanja</i>	83
4.2.2	<i>Proračun bilansa energije i mase</i>	84
4.2.3	<i>Karakterizacija proteinskih frakcija uzoraka pokožice, mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica</i>	85
4.2.3.1	<i>Priprema uzoraka i izvođenje SDS poliakrilamidne elektroforeze</i>	85
4.2.4	<i>Ispitivanje mikrostrukture pokožica</i>	87
4.2.4.1	<i>Priprema uzoraka i izvođenje skenirajuće elektronske mikroskopije</i>	87
4.2.5	<i>Statistička analiza</i>	88
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	89
5.1	UTICAJ ODABRANIH PARAMETARA PROCESA FORMIRANJA KAJMAKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I KAJMAKA	89
5.1.1	<i>Režim termičkog tretmana mleka</i>	89
5.1.1.1	<i>Temperatura i vreme termičkog tretmana mleka</i>	89
5.1.1.2	<i>Dinamika termičkog tretmana mleka</i>	91

5.1.2 Uslovi i dinamika formiranja kajmaka	94
5.1.2.1 Početna temperatura formiranja kajmaka	94
5.1.2.2 Vreme formiranja kajmaka	97
5.1.3 Sastav mleka	98
5.1.3.1 Sadržaj mlečne masti i proteina	98
5.1.3.2. Sadržaj dodatih proteina surutke	101
5.1.4 Analiza rezultata preliminarnih istraživanja	105
5.2 UTICAJ TERMIČKOG TRETMANA MLEKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA.....	107
5.2.1 Uticaj termičkog tretmana mleka na prinos i sastav pokožica	107
5.2.2 Uticaj termičkog tretmana mleka na distribuciju proteinskih frakcija.....	112
5.2.2.1 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre formiranja pokožica	113
5.2.2.2 Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica	118
5.2.2.3 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka preostalog nakon formiranja pokožica.....	123
5.2.3 Upporedna analiza karakterizacije proteinskih frakcija uzoraka mleka, pre i nakon formiranja pokožica i pokožica u zavisnosti od termičkog tretmana mleka	125
5.3 UTICAJ SASTAVA MLEKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA.....	130
5.3.1 Uticaj sadržaja masti mleka na prinos i sastav pokožica	131
5.3.1.1 Mleko sa 3,4% proteina	131
5.3.1.2 Mleko sa 4,2% proteina	133
5.3.1.3 Mleko sa 5% proteina	135
5.3.2 Uticaj sadržaja proteina mleka na prinos i sastav pokožica	138
5.3.2.1 Mleko sa 4% masti.....	138
5.3.2.2 Mleko sa 6% i 8% masti	139
5.3.3 Uticaj dodatih proteina surutke mleka na prinos i sastav pokožica.....	140
5.3.3.1 Mleko sa 4% masti i 3,4% proteina.....	141
5.3.3.2 Mleko sa 6% masti i 4,2% proteina.....	142
5.3.3.3 Mleko sa 8% masti i 5% proteina.....	143
5.3.4 Upporedna analiza uticaja sadržaja masti i proteina mleka na prinos i sastav pokožica.....	145
5.3.5 Uticaj sastava mleka na distribucija proteinskih frakcija	147
5.3.5.1 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre formiranja pokožica	147

5.3.5.2. <i>Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica</i>	151
5.3.5.3 <i>Karakterizacija proteinskih frakcija mleka preostalog nakon formiranja pokožica</i>	156
5.4 MIKROSTRUKTURA POKOŽICA	160
5.4.1 <i>Uticaj termičkog tretmana i sastava mleka na mikrostrukturu pokožica</i> ..	160
5.5 UTICAJ PARAMETERA VAZDUHA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA, DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA I BILANS ENERGIJE I MASE U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA	170
5.5.1 <i>Uticaj parametara vazduha na prinos i sastav pokožica</i>	170
5.5.1.1 <i>Temperatura vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%</i>	171
5.5.1.2 <i>Relativna vlažnost vazduha pri temperaturi 30°C</i>	173
5.5.2 <i>Uticaj parametara vazduha na distribuciju proteinskih frakcija</i>	174
5.5.2.1 <i>Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica</i>	174
5.5.3 <i>Bilans energije i mase u početnoj fazi formiranja kajmaka</i>	180
5.5.4 <i>Značaj kontrole uslova formiranja kajmaka</i>	185
6. ZAKLJUČCI	188
7. LITERATURA	192
8. PRILOZI	204
BIOGRAFIJA AUTORA	211
IZJAVA O AUTORSTVU	213
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	214
IZJAVA O KORIŠĆENJU	215

1. UVOD

Kajmak je srpski autohtoni mlečni proizvod koji se prevashodno izrađuje u domaćoj radinosti, postupkom koji je prilagođen uslovima proizvodnje u seoskim domaćinstvima. Izrazita raznolikost uslova u kojima se kajmak proizvodi, a koja je uslovljena sezonskim promenama ambijentalnih uslova tokom godine, velikim razlikama u sastavu mleka tokom laktacije, kao i neujednačenim pristupom proizvodnji, rezultiraju u izrazito velikom variranju sastava i kvaliteta kajmaka. Kajmak je proizvod koji ima specifična senzorna svojstva na osnovu kojih se može svrstati u delikatesne mlečne proizvode. Međutim, izražene razlike u sastavu i svojstvima onemogućavaju njegov organizovan nastup na tržištu. Prisustvo mikrobiološke kontaminacije u pojedinim slučajevima, kao posledica uslova i načina proizvodnje u seoskim domaćinstvima predstavlja prepreku za široki i organizovani tržišni nastup. Potpunije upoznavanje procesa prisutnih u postupku proizvodnje kajmaka je jedan od preduslova za postizanje standardizovane proizvodnje kajmaka tradicionalnog, odnosno, prepoznatljivog kvaliteta.

Proces formiranja kajmaka može se podeliti na dve faze: toplu i hladnu. U toploj fazi dolazi do formiranja početne (inicijalne) pokožice koja predstavlja osnovu kajmaka, dok nakon završenog procesa proizvodnje, pokožica predstavlja gornji sloj finalnog proizvoda. Proces formiranja početne pokožice na površini mleka započinje odmah nakon razlivanja kivanog mleka u plitke posude. Formiranje pokožice je rezultat istovremenog uticaja koncentrisanja površinski aktivnih komponenata mleka na graničnoj površini mleko-vazduh i isušivanja putem intenzivnog isparavanja vode. Ovi procesi su isprepletani i međusobno uslovljeni faktorima među kojima poseban značaj imaju sastav mleka, termički tretman i visina temperature mleka na početku formiranja pokožice (početne temperature formiranja kajmaka), kao i parametri vazduha.

Sastav mleka, odnosno sadržaj masti i proteina mleka kao površinski aktivnih komponenata mleka, ima veliki uticaj na sastav i strukturu pokožice i kajmaka. U pogledu uzajamnog uticaja masti i proteina mleka ustanovljen je izvestan kompetitivni odnos.

Mlečna mast, zahvaljujući svom adsorpcionom sloju, maloj zapreminskoj masi i uticaju gravitacije, predstavlja najzastupljeniju komponentu kajmaka. Veliki udeo

mlečne masti u sastavu kajmaka ukazuje na značaj ove komponente za proces formiranja i sastava kajmaka.

Proteini mleka, iako su u pokožici zastupljeni u značajno manjoj meri u odnosu na mlečnu mast, imaju veoma važnu ulogu u njenom formiranju. Proteini mleka su odgovorni za prevođenje površinskog sloja mleka obogaćenog površinski aktivnim materijama, iz tečnog u čvrsto agregatno stanje. Skocentrisani proteini na površini mleka u jednom trenutku gelifikuju, obuhvatajući mlečnu mast izdvojenu na površini. Obrazovani gel, u daljem toku procesa, pod uticajem visoke temperature i intenzivnog isparavanja vode, očvršćava i formira čvrstu i poroznu pokožicu.

Kazein mleka u svojoj micelarnoj formi se odlikuje značajno većom površinskom aktivnošću u odnosu na native proteine surutke ali i istovremeno manjom površinskom aktivnošću u poređenju sa pojedinim kazeinskim frakcijama. Međutim, pod uticajem termičkog tretmana koji predstavlja neizostavnu operaciju u proizvodnji kajmaka, dolazi do niza promena u strukturi i funkcionalnim karakteristikama proteina. Termički denaturisani proteini surutke, β -laktoglobulin (β -LG) i α -laktalbumin (α -LA), pokazuju značajno povećanje površinske aktivnosti na granici vazduh-voda u poređenju sa svojim nativnim formama. Usled termičkog tretmana dolazi do formiranja različitih kompleksa, nastalih pretežno kovalentnim povezivanjem proteinskih frakcija. Najznačajniji za proces formiranja pokožice su kompleksi formirani u interakcijama između denaturisanih proteina surutke i kazeina, kao i između proteina mleka i komponenata adsorpcionog sloja mlečne masti.

U toku procesa formiranja pokožice i kajmaka, mleko se neprekidno hladi i permanentno je u kontaktu sa okolnim vazduhom. U toku procesa hlađenja dolazi do gubitka energije, odnosno, procesa predaje toplotnog fluksa sa strane vrelog mleka okolnom vazduhu uz istovremeno isparavanje vode iz mleka. Mehanizmi razmene energije su konvektivne i evaporativne prirode, međusobno su isprepletani i posebno su dinamični u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka. Isparavanje vode je najintenzivnije na samom početku formiranja kajmaka, a formiranjem pokožice na površini mleka, isparavanje se usporava. Formirana pokožica se u toku posmatranog perioda neprekidno menja u smeru uvećanja mase, očvršćavanja i smanjenja poroznosti i na taj način postaje sve snažnija barijera za isparavanje vode i razmenu energije između mleka i okolnog vazduha.

U toku celokupnog postupka proizvodnje kajmaka okolni vazduh je u kontaktu sa mlekom, a zatim i sa formiranom pokožicom. Smatra se da su parametri vazduha, a posebno temperatura i vlažnost, ključni faktori koji u značajnoj meri determinišu tok procesa formiranja kajmaka, koji bitno utiču na svojstva formirane pokožice i kajmaka u celini.

Iz tog razloga, istraživanja o uticaju parametara vazduha u toku formiranja kajmaka mogu pomoći u sagledavanju uticaja sezonskih varijacija u tradicionalnoj proizvodnji kajmaka, kao i iznalaženju optimalnih parametara proizvodnje u cilju dobijanja proizvoda željenih karakteristika.

Na osnovu svega iznetog, smatramo da je formiranje pokožice i kajmaka u celosti veoma složen proces koji je do danas veoma malo izučavan. S tim u vezi, sagledavanje uticaja sastava mleka i termičkog tretmana, kao i parametara vazduha, na svojstva pokožice, kao osnove strukture proizvoda, u velikoj meri mogu pomoći boljem upoznavanju procesa formiranja kajmaka, što je svakako put ka standardizovanoj proizvodnji i dobijanju proizvoda visokog i ujednačenog kvaliteta.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. TRADICIONALNI POSTUPAK PROIZVODNJE KAJMAKA

Kajmak je mlečni proizvod jedinstvenog hemijskog sastava i specifičnih svojstava. Kajmak se može konzumirati kao mladi kajmak, neposredno nakon proizvodnje, ili kao zreo kajmak, nakon određenog perioda zrenja.

Proizvodnja kajmaka se vezuje za izvesna područja Balkana, jugoistočne Evrope, Male Azije i Bliskog istoka, Avganistana, Irana i Turske. Na teritoriji bivše SFRJ (Socijalističke Federativne Republike Jugoslavije) kajmak se proizvodi na području Crne Gore, Srbije i na širokom području bosansko-hercegovačkih planina, gde se po svom kvalitetu i specifičnostima izrade posebno izdvaja romanijski skorup-kajmak (*Dozet i sar., 1996, 2007, 2011*). U Srbiji proizvodnja i potrošnja ovog specifičnog mlečnog proizvoda ima veoma dugu tradiciju. Kao autohtoni srpski proizvod, kajmak se ubraja u veoma cenjene i ekskluzivne proizvode od mleka i predstavlja jedan od simbola domaće poljoprivrede. Danas, kajmak se pretežno proizvodi u domaćinstvima i malim, zanatskim pogonima. Postupak dobijanja kajmaka je zasnovan na tradicionalnom načinu izrade. Postojeća autohtona proizvodnja kajmaka je veoma usitnjena i neorganizovana. Usled toga, način izrade kajmaka se veoma razlikuje po pojedinim područjima, a proizvod je nestandardnog i neujednačenog kvaliteta sa širokim varijacijama sastava, svojstava i kvaliteta proizvoda (*Pejić, 1956, Dozet i sar., 1996, Puđa i sar., 2005a,b, Đerovski i sar., 2006*). U isto vreme, svaka proizvodnja na određenom području nosi specifičnosti lokaliteta koje se ogledaju u nadmorskoj visini, klimatskim uslovima, strukturi trave na pašnjacima, rasnom sastavu muznih životinja i sl. (*Maćej i sar., 2008*), tako da, na teritoriji Srbije, postoji nekoliko visoko cenjenih kajmaka, nazvanih prema regionu proizvodnje, kao što su: užički, kraljevački, čačanski, zlatiborski, rudnički itd., koji su specifičnog i prepoznatljivog ukusa.

Prema važećoj zakonskoj regulativi, Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura („*Službeni glasnik RS br. 33/2010*“), kajmak-skorup se proizvodi odvajanjem gornjeg sloja termički obrađenog i ohlađenog mleka.

Postupak izrade kajmaka tradicionalnim načinom počinje kuvanjem mleka i razlivanjem, tj. ulivanjem mleka u otvorene plitke posude, tzv. karlice. Neposredno po ulivanju mleka počinje proces formiranja početne pokožice. Razlivanje mleka i dalji tok

izrada kajmaka se dešava u prostorijama, tzv. mlekarima, koje obezbeđuju proces sporog, spontanog hlađenja mleka do temperature u intervalu od oko 10-18°C u toku 12 do 24 sata (*Puđa i sar., 2004, 2006*), a nekad i duže od 1-3 dana (*Dozet i sar., 1996*). U tom periodu dolazi do isplivavanja masti iz dubljih slojeva mleka i inkorporacije u već formiranu pokožicu. Formira se sloj poznat kao kora ili kajmak, u Srbiji, odnosno skorup u Crnoj Gori.

Nakon završenog procesa formiranja, dobijeni kajmak (ili kora na površini mleka) se skida, lagano cedi, slaže u drvene posude (tzv. kačice) i soli. Postupak se nastavlja svaki dan, dok se kačica ne napuni. Nakon toga, kačica se zatvara, lagano opterećuje i ostavlja da zri. U toku zrenja dolazi do izdvajanja seruma koji se odliva pomoću slavine pri dnu kačice. Zrenje traje, u zavisnosti od područja proizvodnje, u proseku od jednog do četiri meseca. Tokom zrenja se odvijaju biohemijski procesi koji kajmaku daju specifičnu aromu i mazivu strukturu (*Dozet i sar., 1996*).

2.1.1. Tehnološki postupak i osnove mehanizama proizvodnje kajmaka

Prema *Pudja i sar. (2008)* svi parametri procesa proizvodnje i zrenja, kao i sastava i svojstava kajmaka su u okviru odgovarajućih parametara srodnih mlečnih proizvoda: sireva i maslaca. Kajmak nastaje kao sloj ili kora koja se formira na površini mleka agregiranjem mlečne masti, uz izraženo učešće proteina. Agregati mlečne masti, odnosno masna faza kajmaka, u izvesnom smislu doprinosi da kajmak poprima određene odlike maslaca, dok prisustvo proteina, kao i specifičan oblik površinske koagulacije kojim su oni zahvaćeni tokom formiranja kajmaka, približavaju kajmak proizvodima iz porodice sireva, kod kojih je kao osnova strukture zastupljen proteinski gel sistem (*Puđa i sar., 2006*).

Kao sirovina za proizvodnju kajmaka, uglavnom se koristi sirovo punomasno kravlje, ovčije ili mešano kravlje i ovčije mleko.

U toku kuvanja mleka u otvorenim emajliranim posudama, mleko se blago meša i temperira se na visokoj temperaturi, u zavisnosti od područja proizvodnje, u proseku od 30 minuta do jednog sata (*Vučić i sar., 2008*). Na ovaj način podstiče se evaporacija vode iz mleka, koja za posledicu ima povećanje suve materije mleka. Prema *Dorđević (1978)* pri kuvanju mleka dolazi do delimične denaturacije proteina i koncentrisanja očvrsljih proteina na površini mleka oko kojih se počinju okupljati i drugi sastojci

mleka, naročito masti. Na osnovu dosadašnjih teorijskih saznanja, može se sa velikom sigurnošću pretpostaviti da tokom ovakvog termičkog tretmana na temperaturama iznad 80°C dolazi do formiranja koagregata proteina mleka (Fox i McSweeney, 1998, Jovanović, 2001, Maćej i sar., 2002, 2007, deAngel i sar., 2006, Donato i Guyomarc'h, 2009). Takođe, obzirom da se termički tretira punomasno mleko, verovatno dolazi i do interakcija proteina surutke i adsorpcionog sloja masnih globula (engl. *milk fat globule membrane*, MFGM) (Houlihan i sar., 1992, Kim i Jimenez-Flores, 1995, Ye i sar., 2004a). Količina proteina surutke vezanih za MFGM kao rezultat termičkog tretmana mleka je zanemarljiva u poređenju sa količinom proteina surutke vezanih za kazein. Prema Corredig i Dalgleish (1996b) kazeinske micelle poseduju znatno veću površinu u odnosu na masne globule. Naime, prečnik kazeinskih micela je oko 50-300 nm, a masnih globula od 0,5-10 μm . Istovremeno, površina micela je podesnija od površine masnih globula za vezivanje proteina surutke. Ukupna količina vezanih proteina surutke za masne globule, kao rezultat termičkog tretmana mleka, čini samo oko 1% ukupno vezanih proteina surutke. Prema rezultatima Ye i sar. (2004a), ova količina iznosi oko 1% ukupnog β -LG i oko 0,8% α -LA.

Razlivanje mleka se vrši u plitkim, otvorenim i najčešće drvenim, a ređe emajliranim ili plastičnim posudama. Kao što smo napomenuli, postupak razlivanja mleka se najčešće vrši u mlekarijama, prostorijama sa posebnim ambijentalnim uslovima. U toku ove faze dolazi do intenzivnog isparavanja vode iz vrućeg mleka i brzog formiranja početne pokožice. Formiranje pokožice na površini mleka se velikim delom bazira na površinskoj aktivnosti kuvanog mleka (Đorđević, 1978). Drvene posude, karlice, su profilisane tako da potenciraju povećanje međupovršine na granici mleko-vazduh. U isto vreme, drvo kao materijal obezbeđuje postepeno hlađenje, što povoljno utiče na spontano isplivavanje masti na površinu mleka, odnosno, na donju površinu formirane pokožice. Zonji (1977) navodi da je količina kajmaka koja se formira u određenom vremenskom intervalu srazmerna sadržaju masti u mleku i površini razlivenog mleka, a obrnuto srazmerna visini sloja mleka i brzini pada temperature. Prema Sarić (1992) pre razlivanja mleka neophodno je zagrejati posude za razlivanje, kako bi se usporilo brzo hlađenje mleka. Mlekari, u kojima se vrši razlivanje mleka i dalji postupak formiranja kajmaka, su tako konstrukcijski rešeni da obezbeđuju blago strujanje vazduha i temperaturu formiranja kajmaka od oko 15-18°C. Takođe, napred

navedenom u prilog ide i činjenica da se razlivanje mleka uobičajeno obavlja u večernjim satima, a proces formiranja kajmaka u toku noći kada su parametri vazduha izmenjeni u smislu sniženja temperature i verovatno povećanja relativne vlažnosti. Sve napred navedeno je u saglasnosti sa odomaćenim stavom da je proizvodnja kvalitetnog kajmaka vezana za brdsko-planinska područja.

Tokom procesa formiranja kajmaka, odnosno, spontanog hlađenja mleka i formiranja pokožice, dolazi do obimnijeg agregiranja mlečne masti u već formiranu pokožicu. Pretpostavlja se da je nastajanje donjeg sloja kajmaka rezultat fenomena hladne aglutinacije, što predstavlja specifično agregiranje masti i u manjoj meri proteina. Ono nastaje verovatno usled imunohemijskih reakcija između komponenata MFGM i imunoglobulina mleka (*Walstra i Jenness, 1984, Jelić, 1989*). Ovo agregiranje, verovatno, u manjoj meri ima oblik koagulacije, a u većoj meri koalescencije i po svojim karakteristikama je blisko agregiranju mlečne masti u prvoj fazi bućkanja pri proizvodnji maslaca. Prema *Dorđević (1978)* sličnost kajmaka i maslaca se ogleda i u tome što je u proizvodnji kajmaka najveći deo masti deemulgovan, odnosno nalazi se u obliku slobodnih masti koje impregniraju ostale sastojke suve materije kajmaka. Prema *Maćej i sar. (2008)* u toku hladnog stasavanja kajmaka dolazi do procesa kristalizacije mlečne masti. Autori smatraju da je optimalno vreme trajanja procesa formiranja kajmaka ono u toku kojeg se formira kajmak na površini i obavi kristalizacija masti, a da pri tome ne dođe do neadekvatnog porasta kiselosti mleka. Autori smatraju da to vreme ima maksimalno trajanje u intervalu od 30-36 sati.

Formirani kajmak se skida sa površine mleka, slojevito slaže i soli u odgovarajućim, najčešće drvenim posudama (*Dozet i sar., 1996.*). Kajmak se može upotrebljavati neposredno nakon proizvodnje, kao mladi kajmak ili se ostavlja na temperaturi 15-18°C tokom minimalno 1-2 meseca, nakon čega se dobija zreo kajmak (*Pejić, 1956, Dozet i sar., 1996.*).

2.1.2. Nedostaci tradicionalnog postupka proizvodnje kajmaka

Postupak proizvodnje kajmaka tradicionalnim načinom sadrži niz pozicija koje predstavljaju ozbiljne rizike po mikrobiološku ispravnost i ukupan kvalitet finalnog proizvoda.

Tradicionalna proizvodnja kajmaka u autohtonim uslovima najčešće se obavlja u oskudnim higijenskim uslovima i kao takva odlikuje se postojanjem niza kritičnih mesta, koja predstavljaju potencijalne rizike, koji često dovode do loše bakteriološke ispravnosti i obimnih kontaminacija proizvoda (*Đerovski i sar., 2006*). Nehigijenska manipulacija sa sirovim mlekom i kajmakom, drveno posuđe i pribor, dužina trajanja procesa izrade predstavljaju samo neke od rizika za bezbednost proizvoda. Dodatno, vazduh koji dolazi u permanentni kontakt sa razlivenim mlekom, se ne prečišćava, te kao takav predstavlja veliki rizik moguće kontaminacije proizvoda. Takođe, u domaćoj radinosti svi postupci izrade i manipulacije sa kajmakom su manuelnog karaktera, što takođe predstavlja potencijalni izvor kontaminacije.

Mleko koje se koristi za izradu kajmaka je promenljivog kvaliteta, a način izrade se odlikuje velikom raznolikošću u pogledu uslova rada i načina izrade, u zavisnosti od regiona i individualnih domaćinstava.

Iz napred navedenih razloga, tradicionalni način proizvodnje kajmaka se odlikuje brojnim nedostacima i veoma je nepodesan za industrijsku primenu. Navedeni nedostaci tradicionalne proizvodnje kajmaka, kao i variranja sastava i svojstava kajmaka različitog porekla, predstavljaju najozbiljniju prepreku boljem plasmanu kajmaka na tržištu.

2.2. FAKTORI KOJI UTIČU NA PROIZVODNJU KAJMAKA

Proces formiranja kajmaka, ne uzimajući u obzir termički tretman mleka pre razlivanja, može se generalno podeliti na dve faze: (i) toplu i (ii) hladnu fazu. U toploj fazi (topla inkubacija) dolazi do formiranja početne pokožice kajmaka, koja predstavlja osnovu i gornji sloj kajmaka. U hladnoj fazi proizvodnje dolazi do obogaćivanja pokožice mlečnom mašću, pri čemu se formira donji sloj kajmaka. Procesi nastajanja gornjeg i donjeg sloja kajmaka su različite prirode, vremenski su razdvojeni, te se mogu posmatrati potpuno odvojeno. Zajedničko za obe faze proizvodnje je neprekidan proces postepenog hlađenja, kao i odsustvo bilo kog vida mehaničkog tretmana mleka na čijoj površini se formira kajmak.

Pokožica kajmaka, koja se formira u toploj fazi, je čvrsta, kompaktna, blago sasušena, sa visokom suvom materijom. Za formiranje pokožice kajmaka dovoljna je relativno mala debljina sloja mleka, jer je ovaj sloj tanak i obuhvata manje od trećine ukupne masti mleka koja se inkorporira u kajmak (*Puđa i sar., 2004*). Mehanizam nastajanja kajmaka vezan je za pojave u površinskoj zoni mleka. Pokožica, odnosno, gornji sloj kajmaka, nastaje kao posledica koncentrisanja površinski aktivnih komponenata u graničnom sloju mleka i vazduha. Drugim rečima, u stacionarnom stanju, usled temperaturskih razlika mleka i okolnog vazduha, dolazi do nagomilavanja površinski aktivnih komponenata u površinskoj zoni mleka i njihove agregacije, pri čemu dolazi do formiranja pokožice. Osnovni nosioci površinske aktivnosti u mleku su mlečna mast, odnosno MFGM, i proteini mleka (*Whitnah, 1959, Dorđević, 1987, Roehl i Jelen, 1988, Kristensen i sar., 1997*).

Prema *Puđa i sar. (2006)* formirana pokožica, odnosno gornji sloj kajmaka, koji nastaje kao rezultat površinske agregacije i koagulacije, sadrži mlečnu mast (50-60%) i proteine mleka (oko 10 %), uz relativno malo učešće vode (oko 30%).

Važni faktori tople faze su temperatura mleka, temperatura i relativna vlažnost vazduha i sastav sirovog mleka kao početne sirovine. *Puđa i sar. (2005b)* navode da intenzivan porast sadržaja masti i proteina mleka dovode do intenzivnog porasta masti, odnosno proteina pokožice dobijene u toku procesa formiranja kajmaka u trajanju od 130 minuta. U pogledu međusobnog uticaja masti i proteina, ustanovljen je veoma značajan uticaj sadržaja proteina mleka na sadržaj masti pokožice, dok s druge strane sadržaj masti u mleku ima zanemarljiv uticaj na sadržaj proteina pokožice (*Puđa i sar., 2005b*).

Nakon formiranja gornjeg sloja kajmaka, nastaje hladna faza, u toku koje dolazi do formiranja donjeg sloja kajmaka, koji je mekan, rastresit, sa delimično uklopljenom tečnom fazom.

Mehanizam formiranja donjeg sloja kajmaka različit je u odnosu na formiranje gornjeg sloja i do sada je veoma slabo izučavan. Važni faktori koji utiču na formiranje donjeg sloja kajmaka su svojstva pokožice formirane u toploj fazi kao i sadržaj i svojstva masti u sloju koji je u neposrednom kontaktu sa formiranom pokožicom. Naime, u toku hladne faze masne globule savlađuju viskozitet mleka, isplivavaju, tj. kreću se ka površini i inkorporiraju se u formiranu pokožicu.

Sumirajući napred navedene faktore i procese u toku celokupnog postupka proizvodnje kajmaka, može se zaključiti da su među bitnim faktorima sledeći: termički tretman mleka kao sirovine, sastav mleka (sadržaj masti i ukupnih proteina), proteinski sastav (odnos kazeina i proteina surutke) i masnokiselinski sastav mlečne masti, temperatura i relativna vlažnost okolnog vazduha, temperaturna razlika između mleka na kome se formira kajmak i okolnog vazduha kao i dinamika promene temperature mleka i temperature vazduha.

2.2.1 Sastav mleka

U analizi tradicionalne proizvodnje *Dozet i sar.* (1996) ukazuju da se prerada mleka u kajmak vrši tokom cele godine. Međutim, u toku godine kvalitet i sastav mleka podležu sezonskim varijacijama, koje su uslovljene, pre svega, načinom ishrane i periodom laktacije muznih grla. U izvesnim područjima Bosne i Hercegovine, individualni proizvođači su uvideli da se kvalitetniji kajmak dobija od mleka u periodu od maja do kraja septembra, a da dužina ovog perioda zavisi od kvaliteta ispaše i vremenskih uslova na brdsko-planinskim područjima (*Dozet i sar., 2011*). Naime, u periodu letnje ispaše muznih grla bogatim aromatičnim travama dobija se mleko koje utiče na kvalitet i posebno formiranje specifičnih senzornih svojstava kajmaka karakterističnih za određeno područje proizvodnje.

Sezonske varijacije sirovog mleka se ogledaju pre svega u izmenama hemijskog sastava mleka i masnokiselinskog profila mlečne masti. Sadržaj mlečne masti u mleku varira u jako širokim granicama, više nego bilo koji drugi sastojak. Prosečan sadržaj mlečne masti kravljeg mleka je oko 3,8% (*Dorđević, 1987*) sa širokim intervalom variranja koji zavisi od ishrane, rase, perioda laktacije, starosti i zdravstvenog stanja životinje, kao i stepena uhranjenosti, intervala između muža itd.

Ove promene imaju veliki uticaj na tehnološki postupak proizvodnje kajmaka, jer dolazi do promena fizičkih karakteristika mlečne masti, među kojima su najznačajnije tačka topljenja, odnosno očvršćavanja, kao i tok kristalizacije.

2.2.1.1 Uticaj ishrane na sastav mlečne masti

Ishranom se može znatno uticati na količinu i sastav masti, posebno na njen masnokiselinski sastav. Faktori ishrane koji utiču na sastav mleka se mogu podeliti na sezonske i regionalne, a reflektuju se kroz sadržaj, sastav i pojavnu formu masti i ulja u osnovnoj ishrani.

Masne kiseline iz hrane predstavljaju jedan od izvora masnih kiselina raspoloživih za sintezu mlečne masti. Masne kiseline poreklom iz hrane, posebno više masne kiseline, najčešće polinezasićene, učestvuju sa oko 18-25% u mlečnoj masti (*Hawke i Taylor, 1983, Dorđević, 1987*).

Sezonski faktor se može sagledati upoređivanjem masnokiselinskog sastava masti mleka u npr. prolećnom periodu, u maju mesecu, i zimskom periodu, u novembru. Uobičajeno je da su u letnjem periodu povećani sadržaji nižih zasićenih kiselina, $C_{4:0}$ i $C_{6:0}$ kao i viših nezasićenih kiselina, $C_{18:1}$ i $C_{18:2}$. S druge strane, u zimskom periodu su, uglavnom, povećani sadržaji viših zasićenih masnih kiselina kao što su: $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ i $C_{16:0}$, kao i nekih kiselina srednjeg lanca $C_{10:0}$ (*Hawke i Taylor, 1983*). Sezonski uticaj je izražen i na sadržaj nutritivno visoko vredne bioaktivne komponente-konjugovane linolne kiseline ($C_{18:2}$ -CLA) (*Chilliard i sar., 2001, Kalač i Samkova, 2010*). Posebno je izraženo povećanje sadržaja CLA kod mleka dobijenog od muznih grla sa ispaše, što se smatra rezultatom konzumiranja trava bogatih linolnom ($C_{18:2}$) i linolenskom ($C_{18:3}$) kiselinom, koje su prekursori u nastanku CLA. Sadržaj CLA u mleku zavisi od vremena koje grla provedu na ispaši, godišnjeg doba i sastava trava. Prelaskom na ispašu utvrđeno je kontinualno povećanje sadržaja CLA u mleku, koje dostiže maksimalnu vrednost od 2,54% dvadeset trećeg dana ispaše (*Khanal i sar., 2003*).

Ustanovljen je uticaj botaničkog sastava trava, kao i vrste silaža, na sastav masnih kiselina u mlečnoj masti. Poznato je da u područjima sa kontinentalnom klimom sveža trava sadrži od 1-3% masnih kiselina sa 18 ugljenikovih atoma (najviše u proleće i jesen), od čega 55-65% čini linolenska kiselina. Najzastupljenije masne kiseline u mleku sa takve ispaše su: miristinska, palmitinska i stearinska kao i mononezasićene masne kiseline u količini od 23 do 32% među kojima je najzastupljenija oleinska. Ispaša na visokoplaninskim pašnjacima sa nadmorskom visinom od 1275-2120 m rezultira značajnim povećanjem sadržaja linolenske i linolne masne kiseline u mleku u odnosu na srednje planinske i nizijske predele (*Collomb i sar., 2002*).

Konzervisanjem sveže trave menja se sastav početnog materijala trave, što za posledicu ima promene masnokiselinskog sastava mlečne masti. Sušenjem trava smanjuje se sadržaj ukupnih masnih kiselina, posebno linolne i linolenske kiseline (*Shingfield i sar., 2005*). U travnim silažama sadržaj masnih kiselina ostaje uglavnom nepromenjen, ili je nešto manji usled naknadne fermentacije. Međutim, usled promena u transferu masnih kiselina u rumenu, ishrana sušenom travom, u odnosu na silažu trave, može dati mleko sa nešto većim sadržajem oleinske kiseline (*Chilliard i sar., 2001*). Silaža kukuruza sa uobičajenim učešćem zrna kukuruza od 30-40%, je bogatija linolnom kiselinom od silaža trave, jer ulje kukuruza, sadrži oko 60% linolne kiseline. U mleku muznih krava, prilikom ishrane kukuruznom silažom dolazi do povećanja učešća zasićenih masnih kiselina $C_{6:0}$ do $C_{12:0}$, kao i nezasićenih $C_{16:1}$ i $C_{18:2}$, a smanjuje se udeo palmitinske, stearinske i trans-mononezasićenih masnih kiselina u odnosu na ishranu travnom silažom (*Chilliard i sar., 2001*). Sezonski uticaj ishrane utiče i na količinu trans masnih kiselina. Ukupna količina trans izomera masne kiseline $C_{18:1}$ u mlečnoj masti iznosi 1,83% kada se krave hrane kabastom hranom iz ambara, a 5,73% kada su na ispaši (*Precht i Molquentin, 1999*). Drugi autori navode u manjoj meri različite podatke, odnosno, da sadržaj trans izomera masne kiseline $C_{18:1}$ u mlečnoj masti iznosi u zimskom 2,84% i 6,12% u letnjem periodu (*Parodi, 1979*).

Dodatak masti u obrok može znatno izmeniti mlečnost i sadržaj masti i proteina u mleku. Hrana utiče na mikrobiološke procese u buragu, koji su u visokoj korelaciji sa sastavom produkovanog mleka. Izmena u procesu bakteriološke biohidrogenizacije nezasićenih masnih kiselina u buragu ključ je manipulacije masnokiselinskim sastavom mleka. Kod preživara masne kiseline kratkog i delimično srednjeg lanca nastaju naknadnom sintezom u mlečnoj žlezdi iz glavnog prekusora sirćetne kiseline i β -hidroksi buterne kiseline. Nasuprot tome, dugolančane i polinezasićene masne kiseline potiču iz hrane ili mobilizovane telesne masti. One cirkulacijom dospevaju u mlečnu žlezdu gde se direktno ugrađuju u mlečnu mast.

Dodatak do 5% masti životinjskog porekla u obrok ima skoro linearan uticaj na udeo masnih kiselina u mleku. U dodatku masti u slobodnom, nezaštićenom obliku, mlečnost i sadržaj ukupnih masti u mleku ostaju nepromenjeni, ali se menja odnos pojedinih masnih kiselina. Ustanovljeno je smanjenje udela nižih i masnih kiselina

srednjeg lanca, kao i linolne kiseline, uz izrazito povećanje oleinske kiseline, dok učešće buterne kiseline je nepromenjeno (*Grummer, 1991*).

Tehnološki napredak je omogućio da se ulja i masti mogu emulgovati ili inkapsulirati i na taj način zaštititi od lipolize i biohidrogenizacije u buragu. Takvim načinom se izbegavaju promene u produkovanju i udelu slobodnih masnih kiselina u buragu, koje linearno utiču na sintezu masti i laktoze u mleku, pri čemu je sastav masnih kiselina mleka direktno vezan za sastav masnih kiselina zaštićene masti. Današnji kvalitet zaštite dozvoljava iskorišćavanje oko 65% od ukupno dodatih ulja i masti, dok ostatak ipak podleže biohidrogenizaciji. Učinak masti u zaštićenom obliku na sastav masnih kiselina u mleku je vrlo sličan učinku mobilizovane masti iz telesnih rezervi. Masti u zaštićenom obliku imaju za posledicu pojačan priliv lipoproteina vrlo male gustine, a pri pojačanoj mobilizaciji masti iz telesnih rezervi dolazi do povećanog priliva neesterifikovanih masnih kiselina u mlečnu žlezdu sa jednakim krajnjim uticajem na sastav masnih kiselina mleka.

Dodatkom ulja morskih životinja (riblje ulje, ulje morskih sisara, planktona i algi) u ishranu muznih životinja značajno se menja sastav mlečne masti. Ova ulja su bogata dugolančanim masnim kiselinama od 20 do 22 ugljenikovih atoma, koje takođe podleže biohidrogenizaciji u buragu, kao i masne kiseline sa 18 ugljenikovih atoma, ali se nikada ne postiže potpuna zasićenost, već se stvaraju brojni međuproizvodi. *Keady i sar. (2000)* su ustanovili da pri dodavanju ribljeg ulja u količini od 450 g dnevno, dolazi do značajnog smanjenja sadržaja mlečne masti u mleku za oko 15 g/kg. Takođe, smanjuje se sadržaj stearinske kiseline uz veoma izražen porast palmitinske, CLA, polinezasićenih masnih kiselina, kao i vakcenske kiseline (*Shingfield i sar. 2003*).

Količina CLA se može povećati modifikacijom ishrane, dodatkom zrna suncokreta koje sadrži velike količine linolne kiseline, budući da postoji visoka korelacija između sadržaja linolne kiseline u hrani i u mleku (*Hawke i Taylor, 1983, Dhiman i sar., 2000*). Autori su ustanovili da dodatkom u ishrani 15% suncokretovog ulja, snižava se sadržaj masti u mleku i menja njen masnokiselinski sastav. Ustanovljeno je smanjenje sadržaja svih zasićenih masnih kiselina i značajno povećanje učešća nezasićenih: C_{16:3} sa 1,7 na 2,8%, C_{18:1} sa 27,4 na 46,6%, C_{18:2} sa 1,9 na 2,9%, C_{18:3} sa 1,1 na 2,9%.

Dodatak samo 4% sojinog ulja u ishrani krava, utiče na smanjenje sadržaja masnih kiselina mlečne masti od C_{4:0} do C_{16:0}, pri čemu se povećavaju sadržaji , C_{18:0}, C_{18:1},

C_{18:2} i C_{18:3} (Hawke i Taylor, 1983). Ispitivanjem uticaja bakra u ishrani i pojave povećanja spontane oksidacije mlečne masti, došlo se do zaključka da hranjenjem krava visokim sadržajem bakra i soje, dolazi do povećanja sadržaja C_{18:2} i C_{18:3} i arome nastale spontanom oksidacijom (Morales-Sol i sar., 2000). Bakar utiče na aktivnost enzima desaturaze, koji konvertuje vakcensku kiselinu, 11t-18:1 u bioaktivnu CLA 9c,11t-18:2. Ulje kanole u ishrani krava ima izražen uticaj na fizičke osobine maslaca. Ulje kanole sadrži oko 58% C_{18:1}, 20% C_{18:2} i 6% C_{16:0}. Preparati kanole redukuju sadržaje masnih kiselina od C_{12:0} do C_{16:0}, a povećavaju sadržaj C_{18:1}. Na taj način preparati na bazi ulja kanole redukuju količinu čvrste masti u maslacu na temperaturi od 30°C (Grummer, 1991, Bayourthe i sar., 2000).

Način ishrane, posebno restriktivna ishrana, značajno utiče na masnokiselinski sastav mlečne masti. Ovaj uticaj se u najvećoj meri odnosi na esterifikaciju trećeg C-atoma glicerola, jer je utvrđeno da se pri nepovoljnom načinu ishrane u mlečnoj masti smanjuje učešće nižih i masnih kiselina srednjeg lanca na račun povećanja oleinske kiseline, koja se esterifikuje na poziciji sn- 3 (Christie, 1983, Bobe i sar., 2003).

2.2.1.2 Uticaj rase i perioda laktacije na sastav mlečne masti

Rasa govoda u velikoj meri utiče na sadržaj mlečne masti u mleku. S tim u vezi, krave rase Džerzej daju mleko sa većim sadržajem masti, prosečno oko 5,14%, u odnosu na krave rase Holštajn/Frizijska. Ipak, važno je istaći da i unutar jedne rase postoje značajne razlike u sastavu mleka dobijenih od individualnih grla krava. Sadržaj mlečne masti se smanjuje u toku nekoliko nedelja posle teljenja i onda raste do kraja laktacije. Takođe, sastav mleka se menja i u toku muže, tako da poslednje izmužene količine imaju znatno veći sadržaj masti. Procentualni sadržaj masti je u suprotnoj korelaciji sa pomuženom količinom mleka. Ukoliko interval između muža nije jednak, mleko dobijeno posle dužeg intervala ima veći sadržaj masti. Sinteza svih sastojaka mleka, pa i masti, se smanjuje za vreme infekcije mastitisom. Takođe, sadržaj masti se lagano smanjuje i sa starošću životinje (Đorđević, 1987).

Mleko u ranoj laktaciji (do 30 dana) sadrži manju količinu masnih kiselina sa C_{4:0} do C_{12:0}, u odnosu na centralni (do 120 dana) i kasni period laktacije, do 210 dana (Jensen, 2002).

Količine triglicerida, koji inače čine 96-98% ukupnih lipida, ne podležu promenama u toku laktacije (*Bitman i Wood, 1990*). Međutim, masnokiselinski sastav triglicerida se menja u toku laktacije. Količine masnih kiselina kratkog lanca se povećavaju, palmitinska C_{16:0} ostaje relativno konstantna, dok se količine stearinske C_{18:0} i oleinske C_{18:1} smanjuju. Male promene u količini su ustanovljene i kod linolne C_{18:2} i linolenske C_{18:3} (*Bitman i Wood, 1990*).

Autori *Graves i sar. (2007)* su ispitivali sadržaj fosfolipida sfingomielina, koji ulazi u sastav MFGM, u mleku rasa Holštajn i Džersez, sa ciljem utvrđivanja mogućnosti poboljšanja njegovog sadržaja putem ishrane muznih grla. Sadržaj sfingomielina u mlečnoj masti mleka Holštajn rase je bio veći i iznosio oko 1,044 µg/g masti u odnosu na njegov sadržaj kod rase Džersez, gde je iznosio 0,839 µg/g masti.

Međutim, upoređujući koncentracije sfingomielina u mleku, nije identifikovana značajna razlika obzirom da mleko rase Džersez ima veći sadržaj mlečne masti. Upoređujući ove dve rase, može se zaključiti da rasa Džersez ima masne globule većih dimenzija. Autori su, takođe, ustanovili da koncentracija sfingomielina u mleku raste sa napredovanjem laktacije, što je posledica povećanja sadržaja masti u mleku sa odmicanjem laktacije (*Dorđević, 1987*). Shodno tome, *Graves i sar. (2007)* su identifikovali najveće koncentracije sfingomielina u mleku kasne laktacije, kada mleko i sadrži najviše masti. Takođe, autori su ustanovili da restriktivna ishrana nije značajnije uticala na sadržaj sfingomielina u mleku, kao ni dodatak sojinog ulja u obrok u količini od 4%. Dodatak ulja nije uticao ni na veličinu masnih globula. Ispitivanjem uticaja sezone, autori su ustanovili da je koncentracija sfingomielina u mlečnoj masti najveća u letnjem periodu, a najmanja u zimskom. Međutim, koncentracija sfingomielina u mleku nije bila pod značajnijim uticajem sezonskih varijacija u ishrani, pa shodno tome autori zaključuju da verovatno nije moguće korigovati koncentraciju sfingomielina u mleku putem ishrane muznih grla.

2.2.2 Ambijentalni uslovi

Ambijentalni uslovi u kojima se izvodi proces formiranja kajmaka predstavljaju značajan faktor u proizvodnji kajmaka (*Puđa i sar., 2004, 2006*). Prema *Radovanović i sar. (2012)* parametri vazduha: temperatura, relativna vlažnost i brzina strujanja vazduha imaju značajan uticaj na difuzione procese prisutne u toku nastajanja početne

pokožice i kajmaka u celini. Autori *Ećim-Đurić i sar. (2012)* su ustanovili da postoji veoma jak uticaj temperature i relativne vlažnosti vazduha na prinos i sastav pokožica.

U tradicionalnoj proizvodnji kajmaka ambijentalni uslovi su determinisani konstrukcijskim rešenjem prostorija u kojima se vrši proces formiranja kajmaka, specijalno konstruisanim kolibama, mlekarama. Prema *Dozet i sar. (2011)* mlekari se grade, u zavisnosti od organizacije sakupljanja mleka i izrade kajmaka, ili uz domaćinstvo ili na letnjim isparištima na planinskim područjima.

Najveći broj mlekara se gradi od drveta na kamenoj podlozi. Za njihovu izradu uobičajeno je da se upotrebljavaju balvani ili drugi drveni materijali, a unutra se oblaže daskama, da bi se obezbedila odgovarajuća temperatura prostorije. Kod starih mlekara, oblik je klasičan-četvrtast, a kod novijih i pravougaoni. Krovovi su visoki, na dve ili na četiri vode, što je neophodno za dovod vazduha i prirodnu ventilaciju sa obavezanim otvorima, tzv. *badžama* raznih oblika i načina postavljanja. Posebna pažnja se posvećuje postavljanju krovova, materijalu i tehnici gradnje. Ranije su krovovi bili od šindre, manje od slame. Danas se, za izgradnju mlekara, upotrebljavaju savremeni materijali (*Dozet i sar., 2011*).

Pod mlekara je obično dobro nabijena zemlja ili drugi materijali kao što su: cigla, beton i sl. U romanijskom kraju, poznatom po proizvodnji čuvenog romanijskog skorupa, tj. kajmaka, koji u svojoj specifičnosti izrade ima i proces dimljenja, u mlekarama su postavljena i ognjišta ili peći za kuvanje mleka. U hladnim danima ognjišta, pored osnovne uloge u kuvanju mleka i dimljenja kajmaka, imaju i funkciju temperiranja prostorije namenjene za proizvodnju kajmaka (*Dozet i sar., 2011*).

Kod izgradnje mlekara veoma je bitno strujanje vazduha i održavanje odgovarajuće temperature, što veoma utiče na formiranje kore kajmaka. Kao što je napomenuto, na krovovima mlekara se najčešće ostavljaju otvori, badže, pomoću kojih se reguliše strujanje vazduha. *Dozet i sar. (1996, 2011)* su istraživanjima na terenu, na području bosansko-hercegovačkih planina, gde se proizvodi čuveni romanijski skorup, zabeležili nekoliko konstrukcijskih rešenja tehnika strujanja vazduha, koje za osnovu imaju poprečno strujanje kroz otvorena vrata mlekara i raznih vidova otvora, badža, na krovu kolibe. Tehnika je jednostavna, ali je veoma dobra za kvalitetnu izmenu vazduha, posebno u toku dimljenja, jer se na taj način reguliše uticaj dima na ukus i miris proizvoda. Zabeleženi su sledeći primeri: badže koje su stalno otvorene, ili se

povremeno zatvaraju, otvori na vrhu krova, kod rogova krova, izgradnja posebnih natkrivenih otvora na stranama krova, otvori na strani krova i iznad vrata kolibe sa mrežama, otvori iznad ognjišta sa postavljenom malom drvenom pločom koja se diže i spušta (*Dozet i sar., 2011*). Ovi otvori su neophodni u celokupnom toku procesa formiranja kajmaka, a dodatno su značajni kod ventilacije dima iz mlekaru kod proizvodnje romanijskog skorupa.

2.3 UTICAJ TERMIČKOG TRETMANA NA PROTEINE MLEKA I POVRŠINSKE POJAVE

Termički tretman mleka koji se u tradicionalnoj proizvodnji sprovodi jednostavnim kuvanjem mleka, uslovljava značajne promene na komponentama mleka. Termički tretman (koji prethodi procesu formiranja kajmaka) dovodi do promene površinskog napona mleka (*Whitnah, 1959, Zayas, 1997*). Usled izražene površinske aktivnosti masti i proteina dolazi do njihove difuzije i koncentrisanja u graničnom sloju mleko-vazduh. Pretpostavlja se da usled izražene površinske aktivnosti komponenta MFGM dolazi do destabilizacije MFGM na međupovršini vazduha i vode, adsorpcije fragmenata MFGM, njihovog koncentrisanja i agregiranja (*Kristensen i sar., 1997*). Stoga, u ovom poglavlju dat je pregled uticaja termičkog tretmana na komponente mleka, prevashodno proteine, što se smatra jednim od najvažnijih faktora u procesu formiranja pokožice odnosno kajmaka.

Strogi režim termičke obrade mleka, kakav je i zastupljen u proizvodnji kajmaka, rezultuje izraženim promenama na proteinskom kompleksu mleka, pri čemu dolazi do denaturacije proteina surutke (*Dorđević, 1987, de Wit i Klarenbeek, 1984, Hong i Creamer 2002, Maćej i sar., 2002, Ye i sar., 2002*), stvaranja koagregata proteina mleka (*Fox i McSweeney, 1998, Jovanović, 2001, Vasbinder i deKruif, 2003, Maćej i sar., 2002, 2007, deAngel i sar., 2006, Donato i Guyomarc'h, 2009*), kao i reakcije denaturisanih proteina surutke sa proteinima iz MFGM (*Houlihan i sar., 1992, Kim i Jimenez-Flores, 1995, Ye i sar., 2004a*).

Navedene termički uslovljene promene imaju za posledicu izmenu funkcionalnih svojstava komponenta mleka (*Singh i Creamer, 1992, Damodaran i Song, 1988,*

Dickinson, 1997, 1998, Raikos, 2010, Tran Le i sar., 2011) koje su, kada je formiranje kajmaka i pokožice u pitanju, uglavnom poželjne.

Kazein je termički stabilan protein, u mleku koaguliše na 100°C tek nakon 12 sati (*Holt i Horne, 1996, Đorđević, 1987*). Za razliku od kazeina, proteini surutke potpuno denaturišu na 90°C u toku 5 minuta (*de Wit i Klarenbaeck, 1984, Đorđević, 1987, Ye i sar., 2002, Maćej i sar., 2002, 2007*). Posledica termičke denaturacije proteina surutke su interakcije sulfhidril-disulfidne izmene (pri temperaturama iznad 75°C i pri normalnom pH mleka) i formiranje kompleksa između β -LG i α -LA i k-kazeina i verovatno α s-kazeina (*Fox i McSweeney, 1998*).

Kazeini i proteini surutke pokazuju različito ponašanje na međupovršini ulje-voda. Kazeini se u mleku nalaze u micelarnoj formi i kao takvi pokazuju mali afinitet prema hidrofobnim površinama. Međutim, kazeinati ili pojedinačeni kazeini, tj. kazeinske frakcije kao što je npr. β -kazein, u odnosu na kazein, imaju veliku površinsku aktivnost i relativno fleksibilne molekule. Nativni proteini surutke su globularni i sporije se adsorbuju. Međutim, nakon termičkog tretmana, na temperaturama od 70 do 75°C, proteini surutke denaturišu. Pod uticajem termičkog tretmana dolazi do modifikacije sekundarne i tercijarne konformacije molekula ovih proteina. Ove modifikacije uzrokuju promene njihovih funkcionalnih svojstava, koje se ogledaju u povećanoj površinskoj aktivnosti, izmenjenoj međupovršinskoj reologiji, emulzionim i penivim svojstvima i dr.

Površinska aktivnost agregiranih denaturisanih proteina surutke je uglavnom nepoznata i zavisi od uslova sredine. Poznato je da nativna forma najzastupljenijeg proteina surutke, β -LG, menja svoju konformaciju nakon adsorpcije i formira relativno elastičan film na međupovršinama (*Shimizu i sar., 1981*). Ove promene imaju izvesne sličnosti sa razmotavanjem usled denaturacije, mada su manjeg obima. Takođe, obzirom da su ovo mehanički indukovane promene, smatra se da su najverovatnije posledica promene tercijarne, pre nego sekundarne strukture.

2.3.1 Uticaj visokih temperatura na kazein

Kazein je najznačajniji i najzastupljeniji protein mleka, koji čini oko 75-80% ukupnih proteina mleka. Kazein je složeni kalcijumfosfoglikoprotein i spada u grupu termostabilnih proteina (*Maćej i sar., 2007*). Sastoji se iz četiri osnovne i međusobno

različite proteinske frakcije označene kao: α 1-, α 2-, β - i k-kazein. Prema *Davies i Law (1980)* procentualno učešće ovih frakcija u ukupnom kazeinu iznosi 38%, 10%, 36% i 13%. Kod drugih autora podaci o učešću pojedinih frakcija u ukupnom kazeinu, u izvesnoj meri variraju. Prema *Fox i McSweeney (2003)* ova učešća iznose 37%, 10%, 35% i 12%, dok prema *Schmidt (1982)* njihov molarni odnos u kazeinu iznosi 3:0,8:3:1. *Swaisgood (1992)* je ustanovio sadržaj α s-, β - i k-kazeina u mleku, koji iznosi 14,5mg/g, 11,5mg/g, odnosno 3mg/g. Pored ovih elektroforetskih komponenata, u ukupnom kazeinu detektovano je i prisustvo nekoliko manje zastupljenih proteina (γ -, R-, S- i TS-kazein), za koje se smatra da su rezultat post-translacionih promena unutar ćelija, kao što su fosforilacija, glikozilacija ili delimična proteoliza (*Swaisgood, 1993*).

Sve elektroforetske frakcije kazeina su fosforilovane na specifičan način i u različitom stepenu. Fosfatne grupe su esterifikovane kao monoestri serina i vezuju polivalentne katjone, prvenstveno jone kalcijuma i u manjoj meri cinka. Kazeinske komponente ispoljavaju mikroheterogenost, koja se ogleda u različitom stepenu fosforilovanja, disulfidnom vezivanju, varijacijama u stepenu glikozilovanja i genetskom polimorfizmu (*Maćej i sar., 2007*).

Od svih frakcija kazeina samo α 2- i k-kazein sadrže cistein, po 2 ostatka po molu, koji učestvuje u formiranju intra i intermolekularnih disulfidnih veza. Odsustvo cisteina ili cistina kod α 1- i β -kazeina povećava fleksibilnost ovih frakcija kazeina.

Sve kazeinske frakcije sadrže značajne količine, oko 35-45%, apolarnih aminokiselinskih ostataka valina (Val), leucina (Leu), izoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), tirozina (Tyr) i prolina (Pro) što utiče na veoma izraženu hidrofobnost kazeina. Zajednička osobina svih kazeinskih frakcija je neravnomerno raspoređena hidrofobnost tj. polarni i apolarni aminokiselinski ostaci nisu ravnomerno raspoređeni duž polipeptidnih lanaca, već se nalaze grupisani u skupine, grozdove, tako da formiraju hidrofobne i hidrofilne regione. Organski fosfat, koji se vezuje za serin, nalazi se u grozdovima i vezan je za jone kalcijuma. Frakcija β -kazein ima najizraženije hidrofobne, a α 2-kazein najizraženije hidrofilne osobine. Takođe, i C-terminalni deo k-kazeina je izrazito hidrofilne prirode (*Fox, 1986, Fox i McSweeney, 1998, 2003*).

Svi kazeini imaju visok sadržaj prolina. Od 199 aminokiselinskih ostataka α 1-kazeina 17 su ostaci prolina. Frakcija α 2-kazein ima 10 ostataka prolina od ukupno 207 jedinica, β -kazein 35 od ukupno 209, dok k-kazein od ukupno 169 ostataka ima čak 20

ostataka prolina. Ovako veliki sadržaj prolina određuje konformaciju kazeina, ometa formiranje sekundarne i tercijarne strukture, uslovljava nizak procenat α -heliks i β -nabrane konformacije. Veliki broj ostataka prolina, koji su prilično uniformno raspoređeni duž polipeptidnih lanaca kazeina, uslovljavaju neorganizovanu konformaciju, koja se u literaturi često označava kao *prelom konformacija*. Upravo takva konformacija kazeina je rezultat slabo izražene sekundarne i tercijarne strukture, što kazein čini termički stabilnim. Ova struktura veoma podseća na strukturu denaturisanih proteina pa se kazein često u literaturi naziva prirodno denaturisani protein (*Swaisgood, 1993*).

Fracija α 1-kazein (α 1-CN) sa 199 aminokiselinskih ostataka i molekulskom masom od 23.615 predstavlja dominantnu kazeinsku frakciju sa učešćem u ukupnom kazeinu od oko 40% (*Farrell i sar., 2004*). U primarnoj strukturi, sadrži 8,5% ostataka prolina, koji su ravnomerno raspoređeni i onemogućavaju formiranje α -heliks i β -nabrane konformacije. U primarnoj strukturi α 1-CN razlikuju se tri bloka, centralni hidrofilni i hidrofobni na krajevima molekula (*Horne, 2002, Euston i Horne, 2005*). U delu molekula koji pripada centralnom bloku, od 43.-80. ostatka, smešteno je sedam od ukupno osam fosfoserinskih ostataka i preovlađujuće je prisutna α -heliks konformacija (*Farrell, 1999*). Hidrofobni segmenti na N terminalnom kraju (od 1.-23.) i C terminalnom kraju (od 136.-196.) su odgovorni za visoku hidrofobnost molekula i za asosovanje, odnosno polimerizaciju na bazi hidrofobnih interakcija (*Malin i sar., 2005*). Asosovanje i polimerizacija α 1-CN su vrlo kompleksni i prevashodno zavise od jonske jačine, pH i prisutne genetske varijante. Segment od 136.-199. ostatka je termički labilan i pri temperaturama od 10-70°C pokazuje konformacione promene koje odgovaraju stanju otopljene globule, svojstvenom globularnim proteinima. Asosovanje i polimerizacija molekula α 1-CN na bazi hidrofobnih interakcija, koje potiču od ovog segmenta, su limitirani malom jonskom jačinom i visokim pH sistema.

Fracija α 2-kazein (α 2-CN) sa 207 aminokiselinskih ostataka i molekulskom masom 25.226 čini oko 10% ukupnog kazeina (*Farrell i sar., 2004*). Ova kazeinska frakcija sadrži 2 ostatka cisteina (Cys) i 10 Pro. U primarnoj strukturi α 2-CN razlikuju se četiri bloka sa različitom hidrofobnošću i naelektrisanjem (*Euston i Horne, 2005*). Ova kazeinska frakcija ima najizraženija hidrofilna svojstva u odnosu na ostale kazeinske frakcije, zahvaljujući prisustvu tri anjonska klastera aminokiselinskih

ostataka poreklom od fosfoseril i glutamil ostataka. Dva od pomenuta tri anjonska klasera se nalaze u hidrofilnom delu, koji je lociran u segmentu od prvih 68 aminokiselinskih ostataka na N-terminalnom kraju (*Farrel, 1999, Farrell i sar., 2004*). Polovina molekula, idući od C-terminalnog dela, ima globularnu strukturu sa vrlo malo α -heliks i β -nabranih konformacija. N-terminalni deo formira neuređeni hidrofilni *rep* sa ukupnim neto naelektrisanjem -21 (*Fox i McSweeney, 1998*). Ova kazeinska frakcija ima sklonost ka asosovanju u zavisnosti od uslova sredine, pre svega jonske jačine. Pri normalnom pH mleka preovlađujuće egzistira kao monomer sa jednom disulfidnom vezom, a stepen asosovanja na bazi elektrostatičkih interakcija se povećava sa povećavanjem jonske jačine sistema, do maksimalno 0,2 (*Farrell, 1999*). U toku termičkog tretmana egzistira kao dimer, a njihovo prisustvo u agregatima, nastalim na bazi disulfidnih veza, je ustanovljeno pri strožijim termičkim tretmanima preko 100°C (*Patel i sar., 2006*).

Frakcija β -kazein (β -CN) sa 209 aminokiselinskih ostataka ima molekulsku masu 23.983 i predstavlja oko 35% ukupnog kazeina (*Farrell i sar., 2004*). β -CN ima najizraženija hidrofobna svojstva u odnosu na ostale kazeinske frakcije, a prema svojoj amfifilnosti podseća na molekul detergenta. Zahvaljujući velikom učešću hidrofobnih rezidua, i visokom učešću neuređene strukture (oko 77%) kao i konformacije β -okreta koji utiču na eksponiranje značajnog broja nepolarnih grupa, postoji veoma izražena tendencija ka hidrofobnim interakcijama (*Farrell, 1999*). U primarnoj strukturi mogu se uočiti dva bloka: visoko hidrofilni blok na N-terminalnom kraju i hidrofobni na C-terminalnom kraju. Segment na N-terminalnom delu od 1.-23. ostatka, koji predstavlja samo oko 10% molekula, sadrži svih pet fosfoserinskih ostataka i 1/3 ukupnog neto naelektrisanja molekula, koje iznosi -11,5. Posebno izražena hidrofobnost molekula je prisutna od 136.-209. ostatka na C-terminalnom delu, pri čemu aminokiselinski ostaci od 190.-209. ostatka nemaju naelektrisanje. U rastvoru na temperaturi od 4°C β -CN egzistira kao monomer, dok sa povećanjem temperature polimerizuje a stepen polimerizacije prevashodno zavisi od koncentracije (*Andrews i sar., 1979, Farrell i sar., 2004*).

Frakcija κ -kazeina (κ -CN) ima ukupno 169 aminokiselinskih ostataka i molekulsku masu 19.037 (*Farrell i sar., 2004*). Za razliku od ostalih elektroforetskih frakcija kazeina, sadrži glikozilovanu komponentu koja može imati jednu ili kombinacije više

jedinica ugljenih hidrata i njihovih derivata kao što su: galaktoza, galaktozamin i N-acetilneuraminska kiselina, tj. sijalna kiselina (Farrell i sar., 2004). Pomenuti oligosaharidi egzistiraju kao trisaharidi i tetrasaharidi, vezani kovalentnim vezama za ostatke treonina na C-terminalnom delu, na pozicijama 131, 133 i 135. Primarna struktura ukazuje na amfiflnost molekula, pri čemu se razlikuju dva bloka: hidrofobni na N-terminalnom kraju i hidrofilni na C-terminalnom kraju molekula. Prisustvo oligosaharida vezanih u C-terminalnom (od 106.-169. aminokiselinskog ostatka) delu k-CN utiče na povećanje stepena hidrofilnosti ovog dela molekula. Nasuprot tome, N-terminalni (od 1.-105. aminokiselinskog ostatka) deo k-CN (para-k-CN) je izrazito hidrofoban (Fox i McSweeney, 1998, Fox i McSweeney, 2003). Prisustvo relativno velikog učešća β -nabrane konformacije (oko 31%) u hidrofobnom delu molekula daje mogućnost asosovanja i formiranja polimera putem inetermolekularnih hidrofobnih interakcija (Loucheux-Lefebvre i sar., 1978). Pored toga, u svojoj primarnoj strukturi β -CN sadrži 2 Cys ostatka po molu, zahvaljujući čemu β -CN polimerizuje i na bazi disulfidnih veza (Farrell, 1999). Stepen asosovanja i polimerizacije preovlađuje zavisnosti od koncentracije molekula, temperature i jonske jačine sistema.

Kazein nema ni tipično globularnu ni fibrilarnu formu, već otvorenu i fleksibilnu strukturu. Holt i Sawyer (1993) su proučavajući primarnu i sekundranu strukturu kazeinskih frakcija, ovaj oblik strukture kazeina nazvali *reomorfan*. Kazein se u mleku nalazi u formi kazeinskih micela, koje su rezultat postojanja kvarterne strukture. U sastav micide ulazi nekoliko stotina do nekoliko hiljada polipeptidnih lanaca, koji, zajedno sa mineralnim kompleksom, obrazuju strukturu kazeinske micide. Oko 94% micela čine proteini i oko 6% niskomolekularna jedinjenja kao što su: koloidni kalcijum fosfat (CCP), jonski kalcijum i fosfor i male količine citrata, magnezijum i dr.

Struktura kazeinske micide je dugi niz godina predmet brojnih istraživanja (Darling i Dickson, 1979a,b, Anema i Klostermeyer, 1996, Holt i Horne, 1996, Dalgleish, 1998, Horne, 2002, DeKruif i Holt, 2003, Fox i McSweeney, 2003, Holt i sar., 2003). U literaturi postoji veći broj predloženih modela i svaki od njih pruža objašnjenje za pojedine osobine kazeina. Može se reći da se najviše pominju sledeća dva: model submicela i model porozne strukture (eng. *hairy layer micelle*). Postavljeni modeli kazeinske strukture se razlikuju u pogledu unutrašnje strukture micide, ali oba modela

podržavaju značajnu cementirajuću ulogu CCP-a, površinsku raspoređenost k-CN i njegovu stabilizujuću ulogu (Fox, 1998, Walstra, 1999, Holt i sar., 2003).

Kazeinske micelle imaju sposobnost da se, u zavisnosti od uslova sredine, agregiraju u agregate, koji se mogu i razlagati pod određenim uslovima. U prisustvu jona kalcijuma dolazi do agregacije micela. U početnoj fazi zagrevanja, kazeinske micelle se agregiraju, da bi u kasnijoj fazi do momenta koagulacije disosovale, kada nastaje brza i intenzivna agregacija micela (Fox, 1986). Visoka termička stabilnost kazeina se bazira na činjenici da hidrofobne interakcije, koje igraju značajnu ulogu u agregiranju kazeina, ne egzistiraju na temperaturama iznad 100°C. Takođe, negativno naelektrisanje fosfatnih grupa kazeina značajno doprinosi visokoj termičkoj stabilnosti kazeina (Fox i McSweeney, 2003, Fox i Morrissey, 1997).

Termička stabilnost kazeina u koloidnom sistemu mleka zavisi od fizičko-hemijskih uslova sredine. Delovanje vrlo visokih temperatura može prouzrokovati različite promene kao što su: delimična proteoliza, defosforilacija, β -eliminacija serina, serin fosfata i ostataka cisteina (posebno pri $\text{pH} > 7$), disocijacija i agregacija micela (Maćej i sar., 2007). Međutim, u industrijskim procesima se uobičajeno ne primenjuju tako strogi termički režimi u obradi mleka. Na termičku stabilnost kazeina najveći uticaj ima pH vrednost. Pri $\text{pH} < 6,4$ kazein pokazuje malu termičku stabilnost. Međutim, u opsegu pH od 6,4-6,7, stabilnost se značajno povećava i dostiže maksimum pri pH 6,7. Pri toj pH vrednosti mleko može biti zagrevano do 140°C u toku 20 minuta pre nego što koaguliše. Pri višim pH vrednostima, minimum termičke stabilnosti postiže se pri pH 6,9, kada počinje da koaguliše već nakon 7 minuta. Povišenjem vrednosti pH iznad 6,9, stabilnost kazeina se ponovo povećava (Fox i Morrissey, 1977, Fox, 1998).

Tokom termičkog tretmana na povišenim temperaturama dolazi do disocijacije svih kazeinskih frakcija iz micela. Anema (1998) je ustanovio da stepen disocijacije primarno zavisi od temperature primenjenog termičkog tretmana, dok veoma malo zavisi od vremena trajanja tretmana. Povećavanje koncentracije koloidnog kalcijum fosfata ima manji stepen uticaja na disocijaciju kazeinskih micela u odnosu na redukovanje njegovog sadržaja, pri čemu dolazi do povećanja obima disocijacije micela (Anema i Li, 2000). Anema i Klostermyer (1997a) ukazuju da se disocijacija micelle može javiti kao posledica promene prirode CCP na različitim pH vrednostima i temperaturama, pri čemu dolazi do formiranja manje stabilne strukture na višim pH

vrednostima. Autori su ustanovili da pH zavisna disocijacija micela može biti indukovana temperaturama nižim od 100°C. Pri pH 6,7 identifikovane su male količine kazeina u serumskoj fazi, bez obzira na visine temperatura. Povećanje nivoa kazeina u serumu se dešava kada pH poraste sa 6,7 na 7,1. Generalno, količina rastvorljivog kazeina, odnosno, serumskog kazeina se povećava sa porastom temperature i dostiže maksimalnu vrednost disocijacije na 70-80°C. Daljim povećanjem temperature disocijacija opada. Disocijativno ponašanje α - i β -CN pri $\text{pH} \geq 6,7$ pokazuje sličnu temperaturnu zavisnost tj. povećanje disocijacije sa povećanjem temperature i maksimumom disocijacije na 70-80°C. Suprotno navedenom, disocijacija k-CN (koja je takođe pH zavisna) se povećava linearno sa povišenjem temperature u celom posmatranom temperaturnom intervalu od 20-120°C (*Anema i Klostermyer 1997b*).

Anema i sar. (2000) pretpostavljaju da hladjenjem mleka, kod koga je došlo do disocijacije frakcija kazeina iz micela, disosovani k-CN stabilizuje disosovane α - i β -kazeinske frakcije koje se izdvajaju u formi malih agregata u serumskoj fazi mleka. Ova pojava je ustanovljena pri termičkim tretmanima nižim od 70°C. Međutim, u situaciji kada se mleko termički tretira na temperaturi iznad 70°C, stanje se menja, jer dolazi do denaturacije proteina surutke i njihove interakcije sa k-CN. Autori pretpostavljaju da na ovaj način dolazi do sprečavanja protektivne uloge k-CN u stabilizaciji disosovanih kazeina iz micela, tako da, hladjenjem takvog mleka, dolazi do asosovanja disosovanih frakcija sa kazeinskom micelom ili formiranja većih agregata.

Ustanovljeno je da postoji jaka zavisnost između stepena disosovanja k-CN i denaturacije proteina surutke u pH intervalu od 6,5-7,1 (*Anema, 2007*). Nivo disosovanog k-CN opada sa smanjenjem sadržaja proteina surutke. Pri temperaturama višim od 60°C, dodavanje β -LG snižava nivo disosovanog α - i β -CN, a povećava nivo disosovanog k-CN. Takođe, blokiranje tiolnih grupa uzrokuje povećanje disocijacije α - i β -CN pri svim temperaturama i snižava nivo disosovanog k-CN pri višim temperaturama.

Gubitak stabilizujuće uloge k-CN dejstvom visokih temperatura se objašnjava intermolekularnom agregiranjem u koje su uključene disulfidne, a verovatno i vodonične i/ili hidrofobne veze. Proučavanjem u model sistemima rastvora k-CN, ustanovljeno je da delovanjem povišenih temperatura dolazi do formiranja visoko molekularnih polimera, pre svega preko sulfidril-disulfidnih interakcija. Dejstvom

visokih temperatura može doći do dekompozicije N-acetil neuraminske kiseline u k-CN, što takođe umanjuje njegovu stabilizujuću sposobnost. Pri 140°C, oko 30% sijalne kiseline k-CN se oslobađa, a peptidi koji nastaju su rastvorljivi u 12% TCA (*Fox i Morrissey, 1977*).

2.3.2 Uticaj visokih temperatura na proteine surutke

Proteini surutke pripadaju grupi globularnih proteina sa izraženom sekundarnom i tercijskom strukturom molekula. Proteini surutke ireverzibilno denaturišu i koagulišu pod dejstvom visokih temperatura. Za razliku od kazeina, proteini surutke potpuno denaturišu na 90°C u toku 5 minuta (*Dorđević, 1987, de Wit i Klarenbaeck, 1984, Ye i sar., 2002, Maćej i sar., 2002, Maćej i sar., 2007*). Međutim, nisu svi proteini surutke podjednako osetljivi na uticaj visokih temperatura. Ako, pored napred pomenutih β -LG i α -LA, uzmemo u obzir i albumin krvnog seruma (BSA), proteozo-peptonsku frakciju (PP) i imunoglobuline (Ig), redosled termičke stabilnosti pojedinih proteina surutke bi bio sledeći PP> α -LA> β -LG>BSA>Ig (*Donovan i Mulvihill, 1987*). Uobičajeno je da se stepen denaturacije proteina surutke uglavnom određuje stepenom denaturacije β -LG, obzirom da je on najzastupljeniji i čini oko 50% ukupnih proteina surutke (*Dorđević, 1987, Mulvihill i Donovan, 1987*). Termički tretman mleka na 90°C u toku 6 minuta, izaziva veoma visok stepen denaturacije β -LG, koji iznosi oko 99% (*Ghosh i sar., 1996*). Prema *Donovan i Mulvihill (1987)* termičkim tretmanom na 60°C u toku 10 minuta denaturiše samo 3% , na 70°C oko 15%, na 80°C denaturiše oko 66%, dok na 90°C oko 85% ukupnih proteina surutke. Takođe, ispitivanjem stepena denaturacije u vremenu tokom zagrevanja, ustanovljeno je da pri termičkom tretmanu na 80°C u trajanju od 2, 3, 5 ili 9 minuta, stepen denaturacije proteina surutke iznosi 20%, 30%, 50% odnosno 80% (*Ghosh i sar., 1996*).

Smatra se da postoje tri temperaturna intervala: 4-60°C, 60-100°C i 100-150°C, koja različito utiču na promene na proteinima surutke (*de Wit i Klarenbaeck, 1984, Maćej i sar., 2007*). Temperature do 60°C izazivaju reverzibilne promene na proteinima surutke (sa porastom temperature pojačavaju se intra i/inter molekularne hidrofobne interakcije, koje uslovljavaju asosovanje i disosovanje). Ove promene se često zovu predenaturacija, izazvane delimično gubitkom trodimenzionalne strukture i promenama njihove

hidratisanosti. Pri temperaturama u intervalu od 60-100°C, dolazi do denaturacije i ireverzibilnih promena strukture.

Delovanje visokih temperatura na proteine surutke se odvija u dve faze. U prvoj fazi, se dešava denaturacija, kao posledica raskidanja nekovalentnih veza, kao što su vodonične, hidrofobne i dr., dok u drugoj fazi, dolazi do agregacije denaturisanih proteina. U ovoj fazi, u zavisnosti od uslova sredine, kao što su pH, jonska jačina i koncentracija proteina, može doći do precipitacije ili gelifikacije (*de Wit i Klarenbaek, 1984, Maćej i sar., 2007*).

2.3.2.1 Uticaj visokih temperatura na β -laktoglobulin

β -LG sa ukupno 162 aminokiselinska ostatka, molekulskom masom monomera 18.277 i sa učešćem od oko 50% u ukupnim proteinima surutke predstavlja najznačajniji protein surutke (*Farrell i sar. 2004*). U svojoj kompaktnoj globularnoj strukturi dominira β -nabrana konformacija koja uz malo učešće α -heliks i veliko učešće neuređenih struktura obrazuje β -bure strukturu (*Sawyer i sar., 1999*). Sredina β -bure strukture je izrazito hidrofobne prirode što utiče na svojstvo vezivanja hidrofobnih i amfifilnih molekula. Zahvaljujući velikom broju ostataka Lys, β -LG može učestvovati u Majardovim (Maillard) reakcijama što je posebno izraženo u proizvodnji i skladištenju koncentrovanih proteinskih preparata (*Morgan i sar., 1998, Le i sar., 2012*).

β -LG sadrži 5 Cys ostataka po monomeru, od kojih četiri učestvuju u formiranju dve disulfidne veze i jednu koja predstavlja slobodnu sulfhidrilnu grupu na poziciji Cys 119 ili 121. Monomer β -LG može da asosuje i da gradi agregate različitih veličina u zavisnosti od pH i temperature (*Farrell i Thompson, 1974, Swaisgood, 1986*). Na sobnoj temperaturi, β -LG se javlja kao dimer pri pH između 5,2 i 7,5 (*Caessens i sar., 1997*). Prema *Farrell i Thompson (1974)*, β -LG egzistira kao monomer jedino pri pH ispod 3,5 i iznad 7,5. Između pH 3,5-5,2 reverzibilno asosuje i formira oktamere/tetramere kod kojih dominiraju hidrofobne interakcije (*Swaisgood, 1986, Caessens i sar., 1997*).

Kalcijum neutrališe neelektrianje β -LG i ima veliki uticaj na stabilnost ovog proteina surutke (*Maćej i sar., 2007*). Autori *de Wit i Klarenbeek (1984)* su ustanovili da se stabilnost denaturisanog β -LG povećava sa porastom pH vrednosti, ali se dodatkom jona kalcijuma na istom pH, smanjuje. Sklonost denaturisanog β -LG ka

agregiranju u prisustvu kalcijumovih jona je veća pri pH 6,5 (u odnosu na pH 5,0-6,0), jer se pri ovoj vrednosti pH povećava reaktivnost eksponiranih sulfhidrilnih grupa β -LG (Mulvihill i Donovan, 1987).

Prilikom termičkog tretmana, na temperaturama od 30-55°C dolazi do disosovanja dimera u monomere, a daljim povećanjem temperature do denaturacije molekula (Farrell, 1999). Prilikom denaturacije ruši se tercijska struktura tj. β -LG gubi globularnu strukturu, polipeptidni lanci se odmotavaju pri čemu dolazi do ekspozicije reaktivnih sulfhidrilnih (tiolnih) grupa iz unutrašnjosti molekula (Đorđević, 1987, Maćej i sar., 2007). Termička denaturacija β -LG se dešava kroz dve grupe različitih reakcija, označenih kao tip I i tip II, odnosno primarna i sekundarna faza, u toku kojih se dešava formiranje malih i velikih agregata (Sawer, 1968, Mulvihill i Donovan, 1987).

Prema Mulvihill i Donovan (1987) dinamička ravnoteža između dimernih i monomernih formi β -LG na nižim temperaturama se pomera prema formiranju monomera. Prema Morr (1985) u primarnoj fazi, nakon formiranja monomera, pod uticajem povišenih temperatura, započinju reverzibilne promene konformacije molekula koje obuhvataju veću ekspoziciju tirozinskih i triptofanskih aminokiselinskih ostataka prema rastvaraču, jonizaciju određenih grupa kao i ekspoziciju tiol grupa iz unutrašnjosti što uslovljava veću dostupnost za reagovanje tj. povećanje reaktivnosti. Sa daljim povećanjem temperature dolazi do raskidanja vodoničnih i hidrofobnih veza, demaskiranja tiol grupa, što uslovljava gubitak sekundarne strukture. Na temperaturama višim od 70°C započinje prva faza agregacije denaturisanih molekula β -LG i obrazovanje primarnih agregata. Prema Fox i McSweeney (1998) primarna faza u kojoj dolazi do maksimuma promena se dešava u temperaturnom rasponu od početne 62°C do 75-85°C. U ovoj fazi dolazi do formiranja malih agregata hemijskim vezivanjem četiri monomera, putem intermolekularnih disulfidnih mostova, oksidacijom tiolnih grupa ili tiol-disulfidnim interakcijama (Sawer, 1968). U sekundarnoj fazi dolazi do reakcija između malih agregata formiranih u prethodnoj fazi i obrazovanja većih agregata.

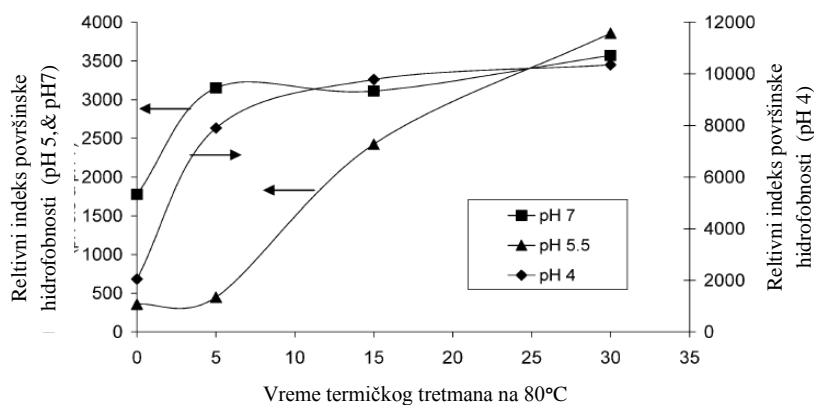
Povećanje koncentracije k-CN inhibira agregiranje proteina surutke u agregate većih dimenzija. Ispitivanjem u model sistemu, ustanovljeno je da i prisustvo drugih kazeinskih frakcija kao što su α - i β -CN utiče, odnosno, sprečava termički izazvanu agregaciju proteina surutke. Naime, tokom termičkog tretmana kazeinske frakcije agregiraju u micelle, koje zatim, prevashodno hidrofobnim interakcijama, reaguju sa

denaturisanim proteinima surutke, formirajući aggregate (*Guyomarc'h i sar. 2003, 2009, Cho i sar., 2003, O'Kennedy, 2006*).

Kim i sar. (2005) su ispitivali uticaj termičkog tretmana na međupovršinske osobine β -LG, odnosno promene konformacije i površinsku hidrofobnost pri različitim termičkim tretmanima (80°C u toku 5, 15 i 30 minuta) i pri vrednosti pH 7; 5,5 i 4, što je prikazano na Slici 1. Kao metod korišćen je kružni dihroizam, CD (eng. *circular dichroism*) i hidrofobno vezivanje boje. Autori su zaključili da termički tretman dovodi do smanjenja sadržaja uređene strukture, prevashodno konformacije α -heliksa, sa odgovarajućim povećanjem neuređene strukture pri svim pH vrednostima. Strukturne promene su bile najizraženije nakon kratkog termičkog tretmana (5 minuta), pri čemu je ustanovljeno smanjenje učešća α -heliksa sa 16% na 12%. U isto vreme došlo je do povećanja učešća neuređene strukture sa 38% na 43%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima *Boyle i sar. (1996)*, koji su ustanovili da prilikom visokog termičkog tretmana dolazi do smanjenja uređene i adekvatnog povećanja neuređene strukture β -LG. Produženo zagrevanje pokazalo je vrlo mali uticaj na promene sekundarne strukture, pri pH 7. Međutim, pri pH 4, tokom termičkog tretmana neprekidno se povećavala hidrofobnost, pri čemu se smanjivalo učešće uređene i povećavalo učešće neuređene strukture. Mereno pri različitim vrednostima pH, i nakon različitih vremena zagrevanja, za razliku od α -helix konformacije, uređena β -nabrana konformacija je imala izuzetno blage promene učešća u odnosu na strukturu nativnih molekula (*Kim i sar., 2005*). Autori smatraju da je povećanje površinske hidrofobnosti, u odnosu na nativno stanje, rezultat parcijalne denaturacije i ekspozicije hidrofobnijih grupa usled delimičnog odmotavanja proteinskog molekula. *Das i Kinsella (1990)* su ustanovili da prilikom termičkog tretmana β -LG, pri pH 6,5, na temperaturama 70°C i 80°C, dolazi do povećanja molekulske hidrofobnosti za 2,5, odnosno 5 puta, u odnosu na nativno stanje. Promene hidrofobnosti su zavisne od: distribucije naelektrisanja unutar molekula proteina (što zavisi od pH) i jonske jačine. Prema *Kim i sar. (2005)* povećanje površinske hidrofobnosti β -LG je više izraženo pri nižim pH vrednostima. Naime, tokom termičkog tretmana, identifikovano je povećanje hidrofobnosti 5 puta pri pH 4, osam puta pri pH 5,5 i 2 puta pri pH 7, mada su apsolutne vrednosti bile najveće pri pH 7 (Slika 1). Površinska hidrofobnost je bila najniža pri izoelektričnoj tački zato što je tada kompaktnija tercijarna struktura molekula.

Kim i sar. (2005) su ustanovili da termički tretman uzrokuje povećanje fleksibilnosti molekula, tako što dolazi do odmotavanja proteinskog molekula. Veće odmotavanje rezultuje u povećanju fleksibilnosti molekula, što za posledicu ima tendenciju formiranja konformacije petlje (eng. *loop formation*), koje veoma utiče na ponašanje adsorbovanih proteina na međupovršinskom sloju. Ovo stanje se oslikava u promeni adsorpcione izoterme na međupovršini vazduh-voda i smanjenja prostora po molekulu usled povećane fleksibilnosti molekula i više izražene konformacije petlje.

Promene sekundarne i tercijarne strukture molekula proteina utiču na promenu reoloških površinskih osobina (Dickinson, 1998, Mellema i Isenbart, 2004). Kim i sar. (2005) su ustanovili da se reološke površinske osobine β -LG reflektuju na poboljšanje sposobnosti za stabilizaciju emulzija i pena. Ovo poboljšanje je zavisno prevashodno od pH vrednosti. Poređenjem stabilnosti emulzija pri različitim vrednosti pH, ustanovljeno je da su emulzije bile najmanje stabilne pri pH 4, a najstabilnije pri pH 7. Takođe, emulzije su pokazale najmanju stabilnost kada su korišćeni nativni molekuli β -LG. Pri pH 7, emulzije su najstabilnije kada su proteini prethodno podvrgnuti termičkom tretmanu na 80°C u trajanju od 15 minuta.



Slika 1. Površinska hidrofobnost rastvora β -LG termički tretiranog na 80°C pri različitim vrednostima pH (Kim i sar., 2005).

Kim i sar. (2005) su ustanovili da termički tretman utiče na povećanje međupovršinske smicajne elastičnosti, G' (eng. *interfacial shear elasticity*) i međupovršinske smicajne viskoznosti, μ_s (eng. *interfacial shear viscosity*) adsorbovanih molekula β -LG i pri pH 5,5 i pri pH 7. Najmanje vrednosti su zabeležene kod nativnih molekula a najveće kod termički tretiranih molekula β -LG. Pri pH 7, najveće vrednosti

G' , μ_s (kao i stabilnosti emulzija stabilizovanih molekulima β -LG i vremena koalescencije) su nađene kod termički tretiranih molekula na 80°C u trajanju od 15 minuta. Pri pH 5,5 iako su utvrđene najveće vrednosti G' , μ_s kao i najduže vreme koalescencije kod termički tretiranih molekula na 80°C u trajanju od 15 minuta, najveća emulziona stabilnost je postignuta kod termičkog tretmana u trajanju od 5 minuta.

2.3.2.2 Uticaj visokih temperatura na α -laktalbumin

α -LA predstavlja drugi značajan protein surutke, koji čini oko 20% ukupnih proteina surutke i 2-5% ukupnog azota mleka (Swaisgood, 1993, Dorđević, 1987, Maćej i sar., 2007). α -LA se karakteriše tipičanom kompaktnom globularnom strukturom, sa ukupno 123 aminokiselinske jedinice i molekulskom masom 14.178 (Farrell i sar., 2004). α -LA ima osobinu da vezuje različite jone, da asosuje i da polimerizuje. Pri normalnom pH mleka, u sekundarnoj strukturi je zastupljeno 26% α -heliksa, 14% β -nabrane konformacije i oko 60% neuređenih struktura (Swaisgood, 1986).

U ranijim radovima izvesnog broja autora izneta su mišljenja da je α -LA termički najnestabilniji protein surutke (Sawer, 1968, Samel i sar., 1971, Bernal i Jelen, 1984) i da njegova denaturacija α -LA počinje već na 62°C i da uklanjanje kalcijuma snižava temperaturu denaturacije. Takođe ustanovljeno je da denaturisani α -LA, nakon hlađenja, ima sposobnost da se renaturiše. Suprotno prethodnim istraživanjima, Mulvhill i Donovan (1987) su, merenjem rastvorljivosti pri pH 4,5, ustanovili da α -LA predstavlja najstabilniji protein surutke. Danas se zna da je α -LA metaloprotein koji vezuje jedan jon Ca^{2+} po molu i to na mestu lanca koji sadrži četiri ostatka asparagina (Asp). Molekul α -LA u kompleksu sa jonima kalcijuma je izuzetno stabilan pri dejstvu temperatura, i predstavlja termički najstabilniji protein surutke. Međutim, pri smanjenju pH rastvora ispod pH 5,0 dolazi do protonovanja ostatka Asp čime α -LA gubi sposobnost vezivanja kalcijuma i tada postaje termički nestabilan, denaturiše i nerenaturiše tokom hlađenja.

Ponašanje α -LA prema dejstvu visokih temperatura uslovljeno je postojanjem parnih, tj. ukupno četiri disulfidna mosta i odsustvom slobodnih tiol grupa u primarnoj strukturi. Pri termičkom tretmanu na 100°C u trajanju od 10-30 minuta, dolazi do raskidanja 12-20% disulfidnih veza i obrazovanja reaktivnih grupa (Swaisgood, 1986). α -LA, na temperaturama od 60 - 80°C pokazuje delimično reverzibilnu denaturaciju (za razliku od β -LG koji denaturiše ireverzibilno).

Denaturacija α -LA se povećava sa temperaturom i povećanjem pH i izraženija je u prisustvu β -LG (*Elfagm i Wheelocok, 1978*). Prilikom termičkog tretmana mleka na 74-96°C dolazi do značajnog smanjenja količine α -LA, za razliku od tretmana na 70°C kada se takva pojava ne dešava. Ovo saznanje navodi na zaključak da je za interakciju denaturisanog α -LA sa β -LG, neophodno da se prethodno obrazuju mali agregati denaturisanih molekula β -LG (*Lyster, 1970*).

Prema *Anema (2007)* za razliku od β -LG, koji prilikom termičkog tretmana na 90°C u toku 20-30 minuta denaturiše bez obzira na vrednosti pH, denaturacija α -LA zavisi od vremena trajanja tretmana i pH vrednosti. Autor je ustanovio da termički tretman na 90°C nakon 20 minuta pri pH 6,5 dovodi do denaturacije oko 90% molekula α -LA, dok je pri pH 6,9 ustanovljena potupuna denaturacija.

α -LA pripada grupi proteina najviše korišćenih kao model proteini za različita ispitivanja globularnih, uvijenih proteinskih lanaca. Mnogi autori su ustanovili da termički tretman poboljšava površinske osobine proteina, pri čemu je taj efekat veoma očigledan kod α -LA. Kod ovog proteina surutke pomenuti efekat se ispoljava kao rezultat formiranja molekulске strukture tzv. stanja otopljene globule tipične za globularne proteine (eng. *molten state globule*) (*Farrell i sar., 2002, Uversky, 2002*). Prema *Farrell i sar. (2002)* stanje otopljene globule predstavlja specifično intermedijarno stanje konformacije molekula između nativnog i potpuno denaturisanog stanja. Ovo stanje odlikuje značajno prisustvo nativne sekundarne strukture i potpuno ili u velikoj meri izraženo odsustvo tercijarne strukture i gustog pakovanja bočnih lanaca. Iako su prisutne praznine u konformaciji i pojačana fleksibilnost bočnih lanaca, stanje otopljene globule se ipak karakteriše kompaktnom strukturom molekula (*Kuwajima, 2002*).

Wijesinha-Bettoni i sar. (2007) su vršili karakterizaciju proteinskih produkata formiranih nakon termičkog tretmana razblaženih rastvora α -LA na temperaturi od 80°C u trajanju od 30, 60 i 120 minuta. Uslovi eksperimenta su tako izabrani da omoguće da α -LA ostane najvećim delom monomer i kao takav pogodan za analiziranje nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR). Autori smatraju da monomeri koji su preostali neagregirani, igraju najznačajniju ulogu na međupovršini. Merenjem površinskog napona, ustanovljeno je da produženo zagrevanje na 80°C, pri pH 7, u odsustvu tiolnih inicijatora, pojačava površinsku aktivnost molekula α -LA na međupovršini vazduh-

voda. Takođe, autori su ustanovili da pri najdužem termičkom tretmanu (120 min.) α -LA, dolazi do hidrolize izvesnih peptidnih veza i pojave izolovanih serija disulfidno-povezanih polipeptidnih lanaca manjih molekulskih masa. Uzorci koji su termički tretirani u trajanju od 30, 60 i 120 min. pokazali su veliku heterogenost u pogledu strukture i površinske aktivnosti. Tokom termičkog tretmana, analizom α -LA monomera, ustanovljeno je permanentno smanjenje učešća native strukture, uz povećanje nepravilno uvijene konformacije i uz neprekidno povećanje hidrofobnosti. *Wijesinha-Bettoni i sar. (2007)* su ustanovili da termički indukovane nepravilno uvijene forme α -LA su ireverzibilno formirane, kao rezultat termički indukovanih disulfidnih veza. Termički indukovano nepravilno uvijanje monomera je bilo karakteristično i u izvesnom stepenu podseća na stanje otopljene globule. Međutim, nepravilno uvijene monomerne strukture su imale manje zastupljenu helikoidnu sekundarnu strukturu i manji broj vodoničnih veza, nego klasično pH 2 stanje otopljene globule α -LA. Analize disulfidnih veza ukazuju da sve nepravilno uvijene monomerne frakcije α -LA (u toku termičkog tretmana od 120 min.) sadrže 61-73 disulfidnu vezu koja se ne nalazi u nativnom monomeru. *Wijesinha-Bettoni i sar. (2007)* smatraju da su upravo ove delimično uvijene formacije povezane disulfidnim vezama odgovorne za izraženo povećanje površinske aktivnosti α -LA prilikom termičkog tretmana.

2.3.3 Interakcije između kazeina i proteina surutke

Termičkim tretmanom mleka na temperaturama višim od 70°C u dužem vremenskom periodu dolazi do interakcija između proteina surutke i kazeina, poznatih pod nazivom koagregati proteina mleka. Ovakvim tretmanom mogu nastati različiti kompleksi: između α -LA i β -LG, α -LA i k-CN, β -LG i k-CN, kao i kompleksi između α -LA, β -LG i k-CN (*Đorđević, 1987, Maćej i sar., 2002, Maćej i sar., 2007*). Prilikom denaturacije β -LG, koji u svojoj primarnoj strukturi ima dva disulfidna mosta i jednu slobodnu tiolnu grupu, dolazi do ekspozicije reaktivnih tiolnih grupa koje mogu reagovati sa disulfidnim vezama i formirati hemijske komplekse sa drugim proteinima u mleku kao što su α -LA, k-CN, BSA i imunoglobulini (*Lyster, 1970, Mulvihill i Donovan, 1987*). Hemijski kompleksi se mogu obrazovati putem tiol-disulfidne izmene, tiol-tiol oksidacije i nekovalentnih interakcija (*Mulvihill i Kinsella, 1987, McSwiney i sar., 1994, Hoffmann i van Mil, 1997*). Međutim, najveći broj autora smatra da se kompleksi obrazuju

prvenstveno između slobodne i reaktivne tiol grupe denaturisanog β -LG i disulfidne veze k-CN (*Kirchmeier i sar., 1985, Haque i Kinsella, 1988, Sawey i sar., 1999*).

Postoje dve teorije o načinu formiranja koagregata mleka. Prema prvoj teoriji, proces formiranja koagregata se dešava u dve faze. U prvoj fazi dolazi do interakcija između proteina surutke, dok u drugoj fazi dolazi do interakcija formiranih kompleksa sa k-CN (*Elfagm i Wheelock, 1978, Corredig i Dalgleish, 1999*). Prema ovoj teoriji, stepen formiranja kompleksa određen je koncentracijom β -LG. Prema drugoj teoriji (*Mottar i sar., 1989*), proces formiranja koagregata se, takođe, dešava u dve faze, pri čemu se u prvoj gradi kompleks između termički denaturisanog β -LG i k-CN, dok u sledećoj fazi dolazi do reakcija između denaturisanog α -LA i vezanog β -LG. Prema ovoj teoriji molekuli denaturisanog β -LG su radijalno raspoređeni i najvećim delom pokrivaju kazeinsku micelu, tako da novonastala površina ima veći broj tankih izbočina koje potiču od vezanog β -LG. Denaturisani α -LA se veže za isturene delove β -LG i na taj način hrapava površina dobija pravilniji sferni izgled. Prilikom formiranja koagregata dolazi do promena fizičko-hemijskih svojstava formiranih kompleksa. Obrazovani kompleksi, nakon hemijskog vezivanja k-CN i β -LG, imaju izražene hidrofobne osobine. Međutim, nakon vezivanja α -LA, karakter se menja i nagrađeni kompleksi imaju jako izražena hidrofilna svojstva (*Maćej i sar., 2007*). Prema *Haque i Kinsella (1988)* termičkim tretmanom na temperaturi od 60-85°C povećava se potencijal za hidrofobne interakcije između β -LG i k-CN. Autori navode da, u ovoj fazi između navedenih proteina, preovlađuju hidrofobne interakcije. Ustanovljeno je da pri oštrijim termičkim režimima (90°C/10 minuta), dolazi do intenzivne denaturacije α -LA, koji takođe može da obrazuje disulfidne intermolekularne veze. Međutim, ustanovljeno je da α -LA ne reaguje sa k-CN bez prisustva denaturisanog β -LG (*Elfagm i Wheelock, 1978*).

Prema *Corredig i Dalgleish (1996a)* stepen reagovanja između proteina surutke i kazeina u mleku se povećava sa povišenjem temperature od 75°C do 90°C i produženjem vremena termičkog tretmana, pri čemu se količina vezanog α -LA značajno povećava u intervalu od 80-110°C.

Kompleksi između k-CN i proteina surutke se u najvećem obimu obrazuju na temperaturi od 85°C, pri čemu je ustanovljeno da se na višim temperaturama koagregati obrazuju, većom brzinom, ali u manjem obimu (*Long i sar., 1963*). Do sličnih

zaključaka su došli i *Hindle i Wheelock (1970)*. Autori su smešu jednakih količina k-CN i β -LG termički tretirali u toku 20 minuta na različitim temperaturama, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C i 99°C i ustanovili da su količine vezanog β -LG iznosile 3,4%, 15,4%, 48,8%, 67,8%, 82,9% odnosno 76,7% u zavisnosti od termičkog režima. Pri temperaturi od 99°C reakcija je bila najbrža, uz manji obim interakcija što je verovatno rezultat degradacije cisteina (*Hindle i Wheelock, 1970*). *Maćej (1989)* je ustanovio da se termičkim tretmanom mleka na 87°C u toku 10 minuta, obrazuje ista količina koagregata proteina mleka kao i pri strožijim režimima kao što su 90°C i 95°C u toku 10 minuta. Prema *Sawyer (1969)* pri termičkom tretmanu u režimu 85°C/20 min. 1 gram k-CN reaguje sa oko 2,2 g β -LG, dok na 99°C približno 1,4 g β -LG reaguje sa istom količinom k-CN. *Oldfield i sar. (1998a,b)* su ustanovili da u temperaturnom opsegu od 80-130°C dolazi do asosovanja kazeinskih micela i uglavnom β -LG. Molekul α -LA se uključuje u kompleks tek nakon dužeg termičkog tretmana i njegov stepen asosovanja zavisi od visine primenjene temperature. Stepenn asosovanja α -LA pri temperaturama od 95-130°C iznosi oko 40%, dok pri temperaturama nižim od 90°C iznosi oko 55%. Autori su ustanovili i da stepen asosovanja β -LG ne zavisi od visine primenjenog temperaturnog režima i da iznosi maksimalno 55%. Takođe, ustanovljeno je da dodatak β -LG obranom mleku pre termičkog tretmana, za razliku od α -LA, ne dovodi do povećanja njegovog procentualnog učešća u formiranim koagregatima, već samo utiče na brzinu formiranja kompleksa sa k-CN (*Corredig i Dalgleish, 1996a*).

Vasbinder i sar. (2003) su ispitivanjem distribucije termički tretiranih proteina u koagregatima, upotrebom kombinovane tehnike enzimskog frakcionisanja i kapilarne elektroforeze, ustanovili da oštiri termički tretman pri normalnom pH mleka, dovodi do većeg stepena denaturacije proteina surutke, pri čemu je odnos njihovog učešća u formiranju koagregata konstantan.

Jovanović i sar. (2007) su ispitivali uticaj različitih režima termičkog tretmana na nivo rastvorljivih proteinskih kompleksa u rekonstituisanom obranom mleku u prahu, korišćenjem tehnike SDS-PAGE. Autori su ustanovili da dolazi do formiranja koagregata između proteina surutke i kazeina, uz visoko učešće α -LA (oko 7,55%), čak i pri blažim termičkim tretmanima kao što je 75°C/20 minuta, a što je verovatno posledica prethodnog režima termičke obrade u postupku proizvodnje obranog mleka u prahu korišćenog u ogledima. Takođe, autori su, na osnovu rezultata elektoroforetskih

ispitivanja u redukujućim i neredukujućim uslovima, zaključili da, pri formiranju koagregata proteina mleka, pored preovlađujuće uloge disulfidnih veza, postoji izvesna verovatnoća učešća i drugih tipova interakcija.

Novija istraživanja ukazuju da, kada je k-CN prisutan u kompleksima, dolazi do prevashodno hidrofobnih interakcija i/ili disulfidnih mostova između kazeinske frakcije i termički denaturisanih, razmotanih proteina surutke (*Mulvihill i Donovan, 1987, Guyomarc'h i sar., 2009*). Vezivanje kazeina hidrofobnim interakcijama prevashodno utiče na formiranje velikih agregata termički denaturisanih proteina surutke. Ustanovljeno je da kazeinske frakcije, $\alpha 1$ - kao i β -CN, iako ne mogu da grade disulfidne veze, inhibiraju formiranje velikih agregata proteina surutke ili drugih globularnih proteina (*O'Kennedy i Mounsey, 2006*). Autori pretpostavljaju da $\alpha 1$ - i β -CN pomoću dominantno prisutnih hidrofobnih interakcija između kazeina i termički denaturisanih i odmotanih globularnih proteina imaju zaštitnu ulogu (engl. *chaperones*). *Raikos 2010* ukazuje da postoji odnos kompeticije između $\alpha 1$ - ili β -CN sa k-CN.

Intenzivnim termičkim tretmanom čistih rastvora β -LG u model sistemu, dolazi do agregiranja i formiranja agregata odgovarajuće veličine, u zavisnosti od koncentracije proteina i od jonske jačine sistema. Veći agregati se formiraju pri većoj jonskoj jačini i vrednostima pH bliskim izoelektričnoj tački. Ustanovljeno je da k-CN inhibira formiranje većih agregata proteina surutke (*Guyomarc'h i sar. 2009*). Autori pretpostavljaju da dodatkom k-CN dolazi do povećanja gustine naelektrisanja i smanjenja veličine formiranih agregata. Takođe, dodavanje natrijum kazeinata rastvoru β -LG dovodi do formiranja manjih agregata nego kada oni reaguju samostalno. Ipak, efekat je manje izražen u odnosu na dodavanje čistog k-CN.

Cho i sar. (2003) su ispitivali interakcije između k-CN i β -LG pri termičkom tretmanu u model sistemima na 80°C i pH 6,7. Autori su ustanovili da k-CN brže reaguje sa termički indukovanim polimerima β -LG, nego sa nativnim β -LG. Termičkim tretmanom smeše β -LG i k-CN, dolazi do ekspaniranja sulfhidrilnih grupa molekula monomera β -LG i njihovih interakcija kako sa drugim monomerima β -LG tako i sa nativnim k-CN. Autori su ustanovili da preovlađujuće učešće interakcija zavisi od relativnih koncentracija proteina (k-CN i β -LG), pri čemu proizvodi njihovih interakcija uključuju: disulfidno vezane komplekse 1:1 (β -LG/k-CN), izvesnu količinu monomera

k-CN i agregate β -LG različitih veličina koji su nastali kako putem disulfidnih veza, tako i putem hidrofobnih interakcija.

Ranije se smatralo da se kompleksi između proteina surutke i kazeina nalaze isključivo na kazeinskoj miceli. Međutim, noviji podaci govore da se pri nižim pH vrednostima ($\text{pH} < 6,6$) većina agregata proteina surutke nalazi na površini kazeinskih micela, dok je pri visokim pH vrednostima ($\text{pH} > 6,6$) većina agregata proteina surutke locirana u serumu, tj. u serumskoj fazi, u formi rastvorljivih agregata (*Anema i Li, 2003, Vasbinder i Kruif, 2003, Donato i sar., 2007, Donato i Guyomarc'h, 2009*). Nastanak rastvorljivih agregata lociranih u serumskoj fazi mleka nije u potpunosti razjašnjen, mada je poznato da frakcije α 1- i β -CN ne učestvuju u obrazovanju ovih kompleksa. *Donato i Guyomarc'h (2009)* su poređenjem kompleksa micelarno vezanih i kompleksa u serumskoj fazi mleka pri pH 6,7 ustanovili da postoje različite vrste kompleksa, pre svega u pogledu njihovog sastava i veličine. Micelarno vezani kompleksi sadrže veći udeo k- i α 2-CN, a manje proteina surutke, u poređenju sa kompleksima lociranim u serumu mleka. Prema *Anema i Li (2003), Anema (2008), Donato i Guyomarc'h (2009)* postoji nekoliko mogućnosti formiranja i lociranja takvih kompleksa u serumu termički tretiranog mleka, koji se svode na moguća dva scenarija: (i) termički tretman dovodi do disocijacije k-CN iz micela u serumsku fazu nakon čega dolazi do njegove interakcije sa denaturisanim proteinima surutke; (ii) formiranjem kompleksa k-CN vezanog za micelu sa pojedinačnim ili agregiranim proteinima surutke i potom potpunim odvajanjem formiranog kompleksa iz micela u serumsku fazu.

Ustanovljeno je da su kompleksi kazeina i proteina surutke, pri pH 6,7 prosečno većeg prečnika (30-100 nm), u odnosu na micelarno vezane komplekse koji su oko 40 nm (*Anema i Li, 2003, Jean i sar., 2006*). S tim u vezi, možemo zaključiti da pH vrednost ima jak uticaj na veličinu i oblik ovih kompleksa. Takođe, utvrđeno je da sa porastom vrednosti pH sa 6,5 na 7,2, dolazi do smanjenja prečnika i promene strukture kompleksa od globularne do izdužene (*Donato i Dalgleish, 2006*).

Poznato je da termički denaturisani proteini surutke imaju veću površinsku hidrofobnost i aktivnost u odnosu na native molekule. Takođe, utvrđeno je i da termički indukovani kompleksi proteina surutke imaju daleko veću površinsku hidrofobnost u odnosu na micela kazeina (*Zayas, 1997, Jean i sar., 2006*). Autori

Guyomarc'h i sar. (2007) su ustanovili da i micelarno vezani kompleksi k-CN i proteina surutke povećavaju površinsku hidrofobnost kazeinskih micela.

Prilikom termičkog tretmana mleka na temperaturama iznad 70°C, dolazi do kontinualnog povećanja količine disosovanog k-CN iz micela i njegove distribucije između serumske i koloidne faze. U isto vreme dolazi do denaturacije proteina surutke i agregiranja sa k-CN, pri čemu dolazi i do distribucije formiranih agregata, između serumske i koloidne faze. *Anema (2007)* je ustanovio da je distribucija denaturisanih proteina surutke između koloidne i serumske faze mleka determinisana disocijacijom k-CN. Disocijacija k-CN se dešava, u izvesnom stepenu, i pri pH vrednosti manjoj od 6,7 (*Anema, 2007*). Povišenjem vrednosti pH dolazi do povećanja disocijacije k-CN, tako npr. pri pH 6,3-6,5 ustanovljeno je oko 10-20% disosovanog k-CN, dok pri pH mleka 6,7, i 7,1, stepen disocijacije iznosi 30-40%, odnosno 60-70%, (*Anema i Klostermeyer 1997a, Anema i Li, 2000*). Obzirom da se povišenjem pH mleka progresivno povećava učešće k-CN u serumskoj fazi, dominantne interakcije denaturisanih proteina surutke dešavaju se sa k-CN u serumskoj fazi. Usled toga, povećanjem vrednosti pH u toku termičkog tretmana rezultira povećanjem učešća kompleksa lociranih u serumskoj fazi mleka, a opada učešće micelarno vezanih. Termičkim tretmanom mleka na temperaturama od 80-120°C, pri pH 6,4-6,5, ustanovljeno je da je oko 60-85% ukupnih proteina surutke locirano na kazeinskoj miceli. Povećanjem pH na 6,6-6,8 učešće proteina surutke se smanjuje i iznosi oko 20-60%, dok pri pH 7,1 iznosi samo 10-15% (*Donato i Dalgleish, 2006, Vasbinder i deKruif, 2003*). Pretpostavlja se da su interakcije između serumskog k-CN i denaturisanih proteina surutke brže, tj. brže se dešavaju disulfidne interakcije, u odnosu na isti tip interakcija sa koloidnim k-CN (*Anema, 2007*).

2.3.4 Interakcije između proteina i MFGM

Proteinski sastav MFGM je vrlo kompleksan. Identifikovano je preko 40 polipeptida sa širokim spektrom molekulskih masa od oko 15.000-240.000, pri čemu najmanje njih osam su glikoproteini. Najviše glikozilovana komponenta MFGM je mucin 1 (MUC 1), čija se molekulska masa kreće u rasponu od oko 160.000-200.000. Pored mucina 1, kao glavni proteini MFGM identifikovani su: ksantin dehidrogenaza/oksidaza (XDH/XO), butirofilin (BTN), PAS 6 i PAS 7, koji imaju sledeće molekulske mase: oko 155.000,

67.000, 50.000, odnosno 49.000 (Mather, 2000). Sadržaj pomenutih komponenata varira značajno sa periodom laktacije. Ustanovljene su veće količine BTN i XDH/XO u ranoj i kasnoj, u odnosu na srednju fazu laktacije (Ye i sar., 2002).

Prilikom termičkog tretmana mleka dolazi do interakcija između proteina surutke i komponenata MFGM. Dosadašnja istraživanja ukazuju da su prilikom termičkog tretmana mleka, u interakcije sa MFGM uključeni proteini surutke, β -LG i α -LA, i u daleko manjoj meri k-CN (Houlihan i sar., 1992, Ye i sar., 2002). Mehanizam ovih interakcija nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da proteini surutke mogu na izvestan način dislocirati komponente membrane, bilo pomoću direktne adsorpcije na membranu, ili adsorpcijom na slobodnu površinu masne globule na mestu gde je MFGM oštećena termičkim tretmanom. Jedan broj autora smatra da su u pitanju isključivo sulfhidril-disulfidne izmene (Dalglish i Banks, 1991, Houlihan i sar., 1992, Sharma i Dalglish, 1994, Ye i sar., 2002), dok pojedini autori (Kim i Jimenz-Flores, 1995) smatraju da disulfidno vezivanje proteina surutke i proteina MFGM ne može u potpunosti objasniti mehanizme njihovih interakcija.

Interakcije između proteina surutke i MFGM su brže i u većem obimu se odigravaju pri višim temperaturama. Međutim, identifikovana je izvesna količina β -LG vezanog za proteine MFGM prilikom tretiranja mleka na nižim temperaturama 60-65°C (Ye i sar., 2004b). Iako su ove temperature nedovoljne za termičku denaturaciju proteina surutke, ipak je detektovana disulfidna priroda ovih veza. Objašnjenje može dati činjenica da izvesni proteini MFGM termički denaturišu i pri relativno niskim temperaturama, kao npr. butirofilin i XDH/XO koji denaturišu već na temperaturi od 58°C i pri tome mogu da grade komplekse putem disulfidnih veza (Ye i sar., 2002). Naime, proteini MFGM sadrže veliki broj disulfidnih i sulfhidrilnih grupa. Na primer, XDH/XO, kao jedna od glavnih proteinskih frakcija MFGM, sadrži 22 disulfidne i 38 sulfhidrilnih grupa, pri čemu su četiri od njih detektovane u nedenaturisanim proteinskim kompleksima. Ova činjenica ukazuje da su slobodne tiolne grupe MFGM na raspolaganju za tiol-disulfidne interakcije sa β -LG. Autori Corredig i Dalglish (1996b) su ustanovili da se interakcija između β -LG i MFGM dešava na temperaturama od 65-75°C, te da se završava pre nego što je kompletirana denaturacija β -LG. Ye i sar. (2004a) pretpostavljaju da se asocijacija β -LG i proteina MFGM, verovatno dešava posle disocijacije dimera β -LG, a pre ekspozicije njegovih tiolnih grupa.

Houlihan i sar. (1992) su ustanovili da se količina vezanih β -LG i α -LA za MFGM povećava sa povećanjem vremena termičkog tretmana pri 80°C sa 2,5 na 20 minuta, kao i da je α -LA u svim ispitivanim uzorcima prisutan u manjoj količini. U isto vreme ustanovljeno je da se količine fosfolipida i triglicerida iz MFGM smanjuju. Autori su ustanovili da pri termičkom tretmanu mleka na 85°C u toku 20 minuta, dolazi do vezivanja nešto manje od oko 1% proteina surutke za MFGM, i to oko 0,7 mg β -LG/g masti i oko 0,22 mg α -LA/g masti. Do sličnih rezultata su došli i *Ye i sar. (2004a)* koji su ustanovili da maksimalna vrednost asosovanog β -LG iznosi oko 1,0 mg/g masti, a α -LA oko 0,2 mg/g masti. Takođe, autori su došli do zaključka da količina asosovanih proteina surutke raste sa porastom temperature do postizanja 80°C, a nakon toga ostaje konstantna.

Corredig i Dalgleish (1996b) su ispitivanjem uticaja dužine vremenskog intervala termičkog tretmana ustanovili da prilikom tretmana na temperaturama od 65-75°C, nema značajnih razlika u stepenu vezivanja β -LG i α -LA sa MFGM u funkciji vremena. Međutim, ustanovljeno je da na temperaturi 85°C količina vezanih β -LG i α -LA se povećava sa produženjem vremena termičkog tretmana.

Kinetika termički izazvanog asosovanja β -LG i α -LA sa MFGM je termički uslovljena, složena i nedovoljno istražena. *Ye i sar. (2004b)*, smatraju da proces asosovanja proteina surutke i MFGM uključuje sledeće moguće korake: denaturaciju proteinskih komponenata prisutnih u MFGM; denaturaciju β -LG i α -LA; asosovanje individualnih polipeptida MFGM; samoagregiranje β -LG i α -LA; udruživanje pojedinačnih kao i kompleksa MFGM proteina sa individualnim proteinima surutke ili njihovim agregatima. Autori su ispitivanjem kinetike asosovanja proteina surutke i MFGM ustanovili da je u pitanju kinetika reakcija prvog reda, pri temperaturama od 65-85°C za β -LG i 70-80°C za α -LA. Međutim, pri višim temperaturama od 85-95°C za β -LG i 80-95°C za α -LA, kinetika interakcija se smatra reakcijom drugog reda.

Ye i sar. (2004b) su ustanovili da se pri maksimalnom nivou denaturacije β -LG i α -LA, postiže i maksimalno asosovanje ovih proteina sa MFGM. Takođe, autori smatraju da agregiranjem proteina surutke dolazi do zaklanjanja reaktivnih grupa koje na taj način postaju nedostupne za dalje učestvovanje u sulfhidril-disulfidnim interakcijama sa proteinima iz MFGM.

Ustanovljeno je da prilikom tretmana mleka na 80°C, prvo dolazi do denaturacije proteina surutke i ekspozicije tiolnih grupa, pa onda do njihove inkorporacije na MFGM (Ye i sar., 2004a). Ispitivanjem uticaja visokih termičkih tretmana mleka na interakcije proteina iz MFGM i proteina surutke iz mlečne plazme, došlo se do rezultata koji potvrđuju da se i β -LG i α -LA asosuju direktno sa proteinima MFGM preko disulfidnih veza. U oba slučaja, ustanovljena je neophodna temperatura od $\geq 65^\circ\text{C}$.

Na MFGM adsorbovana je i mala količina k-CN, koja se povećava sa vremenom tokom termičkog tretmana na 80°C. Pretpostavlja se da k-CN može direktno reagovati sa komponentama MFGM ili indirektno, zajedno sa β -LG preko sulfhidril-disulfidnih interakcija (Houlihan i sar., 1992, Ye i sar., 2002).

Proteinske frakcije MFGM kao što su BTN i XDH/XO pokazuju veliku termičku stabilnost i ostaju u nepromenjenom sadržaju, dok se količine frakcija, PAS 6 i PAS 7 u MFGM, smanjuju prilikom termičkog tretmana mleka na temperaturi od 80°C. Obzirom na činjenicu da su komponente PAS 6/7 termostabilne prilikom termičkog tretmana na 70°C u model sistemima, pretpostavlja se da njihovo smanjenje prilikom termičkog tretmana mleka nastaje usled prisustva proteina surutke, koji izmeštaju ove komponente iz MFGM u serum mleka. Autori pretpostavljaju da dolazi do formiranja proteinskog kompleksa, a zatim do dislociranja PAS 6 i PAS 7 u fazu mlečnog seruma (Houlihan i sar., 1992, Ye i sar., 2002, 2004a,b). Suprotno ovom stanovištu, postoje i mišljenja da ove komponente, pod uticajem termičkog tretmana, mogu biti podeljene na frakcije manje molekulske mase, koje zatim napuštaju membranu (Kim i Jimenz-Flores, 1995).

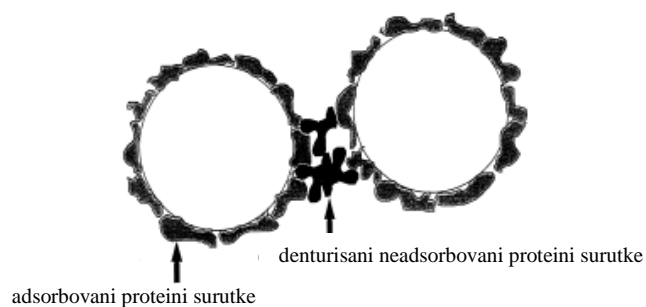
Ye i sar. (2002, 2004a,b) su analizom mleka termički tretiranog na 65°C u toku 30 min. tehnikom SDS PAGE u neredukjućim uslovima identifikovali frakcije jako velikih molekulskih masa koje se nalaze na ulazu u gel za koncentrisanje. Ustanovljeno je da one obuhvataju komplekse tj. polipeptide koji se sastoje od BTN, XDH/XO, PAS 6 i PAS 7. Autori su ustanovili da sa povišenjem temperature tretmana ($>70^\circ\text{C}/10$ min.) dolazi do gubitka komponenti PAS 6 i PAS 7, dok komponente BTN i XDH/XO ostaju u membrani i u potpunosti prelaze u frakcije velikih molekulskih masa. Ustanovljeno je da su u pitanju kompleksi BTN i XDH/XO sa denaturisanim proteinima surutke tipa MFGM- β -LG ili MFGM- α -LA formirani na bazi disulfidnih veza. Autori pretpostavljaju da su prvo formirani kompleksi između BTN i XDH/XO koji zatim reaguju sa denaturisanim proteinima surutke.

Autori *Ye i sar. (2002)* su ispitivali uticaj perioda laktacije i sezone (tri perioda u toku dve godine) na količine asosovanih β -LG i α -LA sa komponentama MFGM u termički tretiranom mleku. Autori su zaključili da su proteini surutke maksimalno asosovani u ranoj (avgust) i srednjoj sezoni (od januara do marta). Takođe, ustanovili su da se sa povećanjem vremena termičkog tretmana mleka, povećava i količina asosovanih proteina surutke, kako β -LG tako i α -LA.

Maćej (1989), Maćej i Jovanović (1998, 2000), Maćej i sar. (2002, 2007, 2008), Jovanović (2001) i Jovanović i sar. (2005) su ustanovili da prilikom izrade sireva od mleka termički tretiranog na 87°C, da dolazi do većeg iskorišćenja proteina i masti u odnosu na tradicionalni način proizvodnje. Iskorišćenje proteina je bilo veće za oko 50%, a masti za više od 60%, što svakako može biti posledica i interakcije između denaturisanih proteina i MFGM (*Maćej i Jovanović, 1998*).

Ispitivanjem model sistema emulzija proizvedenih na bazi proteina mleka pri pH 6,8 ustanovljeno je da se, tokom termičkog tretmana, menja distribucija veličine čestica od ispod 1 μ m pre termičkog tretmana do 1-10 μ m nakon termičkog tretmana na 140°C u toku 80 s (*McSweeney i sar., 2004*). Ovo povećanje distribucije veličine čestica je opisano kao agregiranje masnih globula, što je rezultat interakcija između neadsorbovanih proteinskih molekula u serumu i proteina adsorbovanih na površini masnih globula.

Isti tip protein-protein interakcija je odgovoran za povećanje stepena izdvajanja pavlake kada se emulzije na bazi proteina surutke termički tretiraju (*Euston i sar., 2000*). Autori, smatraju da u ovom slučaju frakcije neadsorbovanih proteina surutke igraju ulogu "lepka", koji povezuje emulgujuće čestice u velike agregate (Slika 2). *Monahan i sar. (1996)* pretpostavljaju da se pomenuta agregacija pojačava termički uslovljenim razmotavanjem, kako neadsorbovanih proteina surutke u kontinualnoj fazi, tako i adsorbovanih proteina na međupovršini ulje-voda, pri temperaturi od 30-90°C u toku 30 minuta. Autori zaključuju da u ovom slučaju, disulfidno uslovljena polimerizacija između proteina mleka utiče na povećanje veličine čestica koja dalje vodi ka flokulaciji.



Slika 2. Šematski prikaz moguće strukture termički uslovljenih agregata masnih globula emulzija na bazi proteina surutke u mleku (*Euston i sar. 2000*)

2.3.5 Površinska aktivnost komponenta mleka

Jedna od osobina tečnosti na granici sa vazduhom je postojanje tačno definisane površine, tzv. granične površine, koja je odvaja od gasne faze parom iste materije. Granični sloj tečnosti na površini razlikuje se po svojim fizičkohemijskim svojstvima od ostalog dela tečnosti. U unutrašnjosti tečnosti svaki molekul je ravnomerno okružen drugim molekulima, pa se dejstvo međumolekulskih privlačnih sila poništava. Međutim, molekuli tečnosti koji se nalaze u graničnom sloju okruženi su drugim molekulima samo sa jedne strane, dok se na drugoj strani nalaze molekuli gasne faze koji se od molekula tečnosti razlikuju po svojim svojstvima i koji su znatno razređeniji nego što su molekuli tečnosti, pa su i sile kojima deluju jako male, te se mogu zanemariti. Iz tog razloga, sile privlačenja molekula u graničnom sloju tečnosti imaju rezultantu u sili koja je usmerena ka unutrašnjosti tečnosti, što utiče da molekuli u površinskom sloju imaju višak potencijalne energije (tzv. površinske energije) u poređenju sa molekulima iz unutrašnjosti. Veličina površinske energije naziva se površinski napon, koji se definiše radom koji treba utrošiti da bi se površina tečnosti povećala za 1m^2 i izražava se u J/m^2 . Ustvari, može se reći da površinski napon predstavlja silu koja dejstvuje na jedinicu dužine u površinskom sloju tečnosti, odnosno energiju po površini faze koja se suprostavlja povećanju njene površine i izražava se u N/m (*Dorđević, 1987, Walstra, 2003, Mukherjee i sar. 2005*).

Površinska energija predstavlja faktor intenziteta privlačnih sila između molekula tečnosti, koji kao rezultat ima obrazovanje sloja molekula na graničnoj površini tečnosti

prema vazduhu, koji je znatno zbijeniji u odnosu na molekule u unutrašnjosti tečnosti i koji zbog toga ima neke posebne karakteristike. Površinski napon zavisi od: temperature, prirode supstance sa kojom se tečnost graniči, a kod rastvora zavisi još i od koncentracije rastvora. Površinski aktivne materije (PAM) imaju osobinu da snižavaju površinski napon, tako što se grupišu na površini tečnosti u kojoj se rastvaraju i tu grade novu površinu. Površinski aktivne materije mleka su: proteini, fosfolipidi i proteinske komponente MFGM kao i slobodne masne kiseline (*Whitnah, 1959, Dorđević, 1987, Roehl i Jelen, 1988, Kristensen i sar., 1997*).

Površinski napon mleka predstavlja prosečno 7% površinskog napona vode (*Petričić, 1984, Mukherjee i sar., 2005*). Vrednosti površinskog napona mleka, u literaturnim podacima, variraju u izvesnim granicama. Međutim, u svim radovima je evidentno da obrano mleko ima veći površinski napon, koji se kreće oko 0,051-0,052 N/m, u odnosu na punomasno mleko gde iznosi oko 0,047 N/m (*Petričić, 1984, Dorđević, 1987, Wood, 1982, Chandan, 1997*). Prema *Chandan (1997) i Mukherjee i sar. (2005)* na vrednosti površinskog napona mleka, pored gore navedenih, utiče i veliki broj faktora, od onih vezanih za rasu, stanje i laktaciju muzne životonje, do faktora vezanih za način merenja i mernu tehniku.

Wood (1982) je ustanovio da, pored proteina, i mlečna mast ima vrlo značajan uticaj na površinski napon i da pavlaka sa 20% mlečne masti ima manji površinski napon od pavlake sa 10% i 22% masti.

Međutim, najveći uticaj na smanjenje površinskog napona mleka ima kazein (*Dorđević, 1987, Dickinson, 1997, 1998, Mukherjee, 2005*). Emulgujuće osobine kazeina su determinisane njegovom molekulskom strukturom, koja je visoko neuređena i u osnovi hidrofobna. Prema starijim literaturnim podacima navedenim kod *Dorđević (1987)* proteini surutke (albumini i globulini) su površinski neaktivni, dok, sastojak sigma-proteoza se odlikuje znatnom površinskom aktivnošću. Međutim, noviji literaturni podaci pokazuju da i proteini surutke, takođe, doprinose smanjenju površinskog napona mleka (*Haque, 1993, Dickinson, 1998, Euston i Hirst, 2000, Walstra 2003, Mukherjee i sar., 2005*), dok laktoza i najveći deo soli povećavaju površinski napon (*Damodaran, 1990, Chandan, 1997*).

Prema *Dorđević (1987)* površinski napon mleka odmah nakon muže je nešto veći nego posle 10-12 sati, kada opada na uobičajene vrednosti. Ova pojava ukazuje da se

površinske materije odmah nakon muže, verovatno nalaze u izvesnoj labilnoj ravnoteži sa ostalim komponentama i da postepeno uspostavljaju ravnotežu, odnosno dolaze u stanje sa najnižom potencijanom energijom. Opadanje površinskog napona sirovog mleka je brže na nižim temperaturama i na temperaturi 8-10°C ravnoteža se postiže nakon dva časa posle muže. Mada, površinski napon mleka i proizvoda od mleka opada sa porastom temperature (*Chandan, 1997, Kristensen i sar. 1997*), pojava opadanja vrednosti površinskog napona sirovog mleka pri nižim temperaturama govori da su se u mleku odigrale određene površinske pojave i da je došlo do stabilizacije sistema mleka. Prema *Dorđević (1987)*, ova pojava, je povezana sa stanjem mlečne masti i pojačanom hidratacijom proteina na nižim temperaturama.

Za površinski napon su vezane tzv. površinske pojave, koje se dešavaju na graničnoj površini mleko-vazduh ili u unutrašnjosti tečnosti na graničnoj površini između faze masti i mlečne plazme, kao što su: obrazovanje emulzije, obrazovanje pene, stvaranje pokožice na mleku, formiranje adsorpcionog sloja mlečne masti itd.

Obzirom da je stvaranje pokožice na mleku jedan od osnovnih procesa u formiranju kajmaka ovo poglavlje obuhvata razmatranje površinski aktivnih komponenata mleka kao i pojava na graničnim površinama.

2.3.5.1 Proteini mleka na međupovršinama

Proteini su, zbog svoje amfifilne prirode, površinski aktivni i uobičajeno se koriste kao emulgatori i stabilizatori pene u proizvodnji brojnih prehrambenih proizvoda. Emulgujuće i površinske osobine proteina zavise od njihove prirode i definisane su sledećim osobinama: veličina, oblik, neto naelektrisanje i distribucija naelektrisanja, površinska hidrofobnost, stabilnost, fleksibilnost konformacije, aminokiselinski sastav i struktura (*Dickinson, 1991, 1998, Euston i Hirst, 2000*). Može se reći da su površinska funkcionalna svojstva proteina uslovljena njihovom sposobnošću: (i) da se adsorbuju na međupovršini sa ciljem smanjenja površinskog napona; (ii) da se rasporede na međupovršini odmotavanjem konformacije, sa adekvatnom orijentacijom hidrofilnih i hidrofobnih grupa ka vodenoj i nevodenoj fazi; i (iii) da učestvuju u formiranju filma odgovarajućih karakteristika kao posledica interakcija delimično denaturisanih proteina (*Zayas, 1997*). Suštinski, pri adsorpciji globularnih proteina na međupovršini, površinske sile dovode do jednog vida denaturacije tj. strukturnih promena na

molekulima, usled čega globularna forma slabi, a u slučaju većeg intenziteta sila se delimično ili potpuno dezintegriše. Adsorbovani molekuli, međusobno reagujući, grade viskoelastičan sloj, koji obezbeđuje stabilnost emulzije, odnosno pene.

Pojedini proteini pri međupovršinskoj adsorpciji pokazuju razlike u ponašanju. Ustanovljeno je da prilikom adsorpcije proteina na međupovršini dolazi do denaturacije, koja se ogleda u promeni konformacije njihovih molekula (*Graham i Philips, 1979a,b, Walstra, 2003*). Shodno tome, pojedini proteini se mogu klasifikovati kao meki (eng. "soft") (*Arai i Norde, 1990a,b, Walstra, 2003*) kada imaju malu unutrašnju stabilnost i prilikom adsorpcije mogu lako menjati svoju konformaciju. Drugu grupu čine tzv. kruti ("hard") proteini koji imaju veliku unutrašnju stabilnost. *Wang i McGuire (1997)* su ispitivali površinski napon rastvora mutanata T4 lizozima različitih konformacionih stabilnosti, pri čemu su ustanovili da se manje stabilni proteini adsorbuju mnogo zbijenije i zauzimaju veći prostor na međupovršini, u odnosu na stabilnije proteine. Kada su kazeini u pitanju, zahvaljujući njihovoj fleksibilnoj konformaciji, debljina i izgled adsorbovanog sloja se menja u zavisnosti od njihove koncentracije. Pri niskim koncentracijama kazeini su razvučeni po međufaznoj površini, dok pri višim koncentracijama grade kompaktne slojeve veće debljine (*Dickinson, 1997, 1998*).

Proces adsorpcije proteina na međupovršinama može se podeliti na dve faze: u prvoj, inicijalnoj fazi, dolazi do vezivanja molekula za površinu, dok se u toku druge faze dešava reorijentacija i preuređenje molekula adsorbovanih na međupovršini (*Damodaran i Song, 1988, Boerboom, 2000*). Kada su proteini surutke u pitanju, tokom adsorpcije dolazi do delimične denaturacije molekula na međufaznoj površini. Denaturacija je praćena ekspozicijom reaktivnih sulfhidrilnih grupa i daljom polimerizacijom u sloju ili između slojeva. Polimerizacija između adsorbovanih molekula vodi do poželjnog povećanja površinske viskoznosti sloja i jačine površinskog sloja (*Dalgleish, 1996*).

Površinska aktivnost proteina je određena njihovom hidrofobnošću i fleksibilnošću konformacije. Površinska hidrofobnost determiniše sklonost molekula da se adsorbuje na međupovršini, dok fleksibilnost pomaže molekulu da se adsorbuje i ostane kao takav, zato što fleksibilni molekuli prilikom adsorpcije mogu lakše da se razmotaju, reaguju sa drugim adsorbovanim proteinima i tako produže vreme zadržavanja u sloju (*Dickinson,*

1991). Prema *Suttiprasit i sar. (1992)* pored neophodne fleksibilnosti molekula, na efikasnost adsorbovanja površinski aktivnih molekula, značajno utiče i veličina molekula. Autori su poređenjem površinske aktivnosti nativnih molekula α -LA, β -LG i BSA, ustanovili da α -LA, kao najmanji i najmanje stabilan molekul, ima najveću površinsku aktivnost. U isto vreme molekul β -LG, iako je značajno manjih dimenzija u odnosu na BSA, usled dimerne pojavne forme, nema neophodnu fleksibilnost, usled čega pokazuje slično ponašanje u adsorbovanom sloju, u odnosu na BSA.

Graham i Phillips (1979b) su upoređivali tri strukturno vrlo različita proteina: lizozim (globularan i rigidan, krut), BSA (globularan i fleksibilan) i β -CN (neuređena struktura, fleksibilan). Autori su ustanovili da se visoko fleksibilan i odmotan protein kao što je β -CN reorjentiše i adsorbuje mnogo brže, u odnosu na visoko rigidan i kompaktan protein kao što je lizozim. Ispitivanjem stepena razmotanosti molekula β -CN i β -LG, prilikom adsorpcije na međupovršini, ustanovljeno je da su kod β -CN konformacione promene kompletirane za samo 10 s, dok je kod β -LG potrebno daleko više vremena, oko 10^3 s (*Walstra, 2003*).

Kada je u pitanju stepen razmotavanja, odnosno promena konformacije molekula pri adsorpciji, *Damodaran i Song (1988)* su ustanovili da molekul BSA u jednom od svojih strukturnih međustanja zauzima veći prostor na međupovršini, odnosno više je adsorbovan, u odnosu na molekule BSA koji su u potpunosti odmotani, ili onih u kompaktnom nativnom stanju. Obimna denaturacija pri adsorpciji može rezultirati u slabim međupovršinskim mehaničkim osobinama, koje su nepovoljne za dugotrajnu stabilnost emulzija.

Mnogobrojni fizički i hemijski faktori, kao što su: temperatura, hidrostatički pritisak, napon smicanja, ultrazvuk ili hemijski (kao što je pH), utiču na funkcionalna svojstva proteina usled modifikacije njihove strukture (*Kim i sar., 2005*). Mnogi autori su ispitivali adsorpciona svojstva nativnih i hemijski modifikovanih molekula proteina BSA (*Cho i sar., 1996, 1997*). Modifikacija alkilovanjem daje veću površinsku hidrofobnost molekula na međupovršini voda-vazduh (*Kim i sar., 2005*). Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom je ustanovljeno da su molekuli BSA modifikovani alkilovanjem manje stabilni i više odmotani na međupovršini voda-vazduh u odnosu na nativne molekule BSA.

Enzimatske modifikacije mogu takođe da poboljšaju penivost, emulgujuća i druga funkcionalna svojstva molekula proteina (*Hamada i Swanson, 1994*).

Mnogi autori su ustanovili da termički tretmani mogu da se koriste za poboljšanje funkcionalnih svojstava proteina (*Hunt i Dalgleish, 1994a,b, Farrell, 2002, Walstra, 2003, Tran Le i sar., 2011*). Porast temperature tretmana dovodi do slabljenja vodoničnih i elektrostatičkih interakcija i do jačanja hidrofobnih interakcija proteina. Ove promene su izražene pri temperaturama do 60-70°C (*Kim i sar., 2005*). Prilikom termičkog tretmana β -LG ustanovljeno je da termički tretman dovodi do denaturacije, pri čemu dolazi do smanjenja α -heliks i β -nabrane uređene konformacije sa odgovarajućim povećanjem hidrofobnosti i neuređene konformacije molekula (*Boyle, 1996, Qi i sar., 1997, Kim i sar. 2005*). Autori *Millqvist-Fureby i sar. (2001)* su ustanovili da termički tretman rastvora proteina surutke u temperaturnom opsegu 60-90°C u toku 1000 s, izaziva značajan gubitak emulgujućih sposobnosti. Razlog tome je formiranje velikih agregata, koji nisu efikasni u emulgovanju tj. pokrivanju površine masnih čestica. Autori su zaključili da je, u cilju poboljšanja emulgujućih svojstava nativnih proteina surutke, neophodan termički tretman proteina, ali u specifičnim uslovima, obzirom da je emulgujuća sposobnost ovih proteina u tesnoj korelaciji sa stepenom odmotavanja proteinskih lanaca.

Termička denaturacija proteina pre adsorpcije značajno menja odnos Π (površinski pritisak)- Γ (površinska koncentracija). Tipične vrednosti Γ na ulje-voda međupovršini za globularne proteine se kreću u rasponu od 2-4 mg/m². Kod neglobularnih proteina, kao što su kazeini, ove vrednosti se kreću od 3-5 mg/m². Međutim, kod agregiranih proteina (npr. denaturisanih usled termičkog tretmana) vrednosti Γ su daleko veće i kreću se u rasponu od 10-15 mg/m² i više (*Walstra, 2003*).

Ustanovljeno je da tretmani visokim hidrostatičkim pritiscima (HHP) utiču na ponašanje proteina na međupovršinama, odnosno na poboljšanje njihovih funkcionalnih svojstava (*Krešić i sar., 2006*). Prilikom tretmana HHP ne dolazi do kidanja kovalentnih veza i promene primarne strukture proteina. Međutim, dolazi do delimične denaturacije, koja se ogleda u promenama sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture molekula. Priroda i stepen konformacionih promena zavise od primenjenih hidrostatičkih pritisaka. Tretiranje α -LA visokim pritiscima rezultuje u poboljšanju termičke stabilnosti i funkcionalnih svojstava ovog proteina, kao što je povećanje površinske aktivnosti, što je

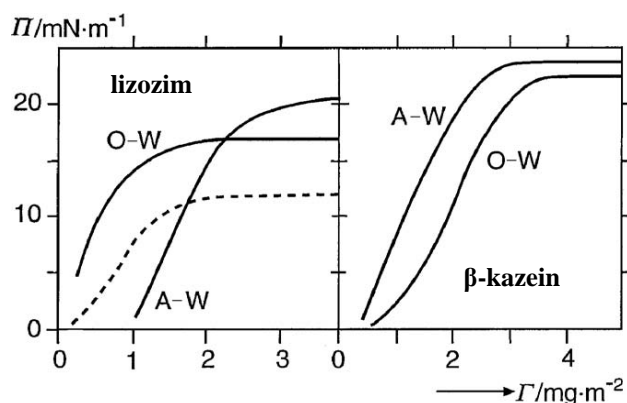
posledica različitih međustanja razmotanosti (stanje otopljene globule) i prateće povećane hidrofobnosti molekula (*Rodiles-Lopez i sar., 2010*). Sličan efekat se dešava i kod β -LG, pri čemu je ustanovljeno da je β -LG manje barometrostabilan u odnosu na α -LA. Naime, već pri pritiscima od oko 100 MPa dolazi do denaturacije β -LG, dok denaturacija α -LA, počinje na pritiscima većim od 400 MPa (*Huppertz i sar., 2004*). S druge strane, visoki pritisci, od 400-600 MPa, utiču na smanjenje površinske hidrofobnosti molekula BSA usled indukovane agregacije (*Galazka i sar., 1997*). Pored toga, povećanje hidrostatičkog pritiska, nije izazvalo značajne promene površinske kod β -CN aktivnosti na vazduh-voda međupovršini (*Dickinson., 1997*).

Ultrazvuk pozitivno utiče na stabilizaciju emulzija proteina. Prilikom tretiranja proteina ultrazvukom dešava se manji obim denaturacije, pri čemu dolazi do fragmentacije lanaca proteina na peptide i lance manjih molekulskih masa. Oni dodatno doprinose sposobnosti proteina u stabilizaciji emulzija, otvaranju proteinskih lanaca i usmeravanju hidrofilnog i hidrofobnog dela na međupovršini (*Damodoran, 1986*). Ispitivanjem uticaja ultrazvuka visokog intenziteta, 20 W/cm^2 , *Güzey i sar. (2006)* su zaključili, na bazi rezultata analize sekundarne strukture, da je povećanje kinetike adsorpcije BSA rezultovalo činjenicom da se proteini podvrgavaju nizu molekularnih reorijentacija, koje vode do formiranja stabilnog strukturnog međuprodukta, tj. međustanja, koje poseduje veću molekularnu fleksibilnost i veću površinsku aktivnost. Slični rezultati su zabeleženi i za α -LA i β -LG. Delovanjem ultrazvuka na α -LA dolazi do prelaza iz nativnog stanja u denaturisano stanje (*Cornec i sar. 2001*), koje je definisano kao ravnotežno stanje između nativnog i razmotanog stanja, odnosno stanja otopljene globule. U ovom stanju proteinski molekul je kompaktan skoro kao u nativnom stanju, ali je slobodnije upakovan (*Vasilenko i Uversky, 2002*).

Postoji razlika u adsorpciji između različitih tipova proteina (globularni i neglobularni) na različitim međupovršinama. Za te svrhe β -CN i lizozim su vrlo podesni za poređenje. Ovi proteini se međusobno ne razlikuju značajno u pogledu molekulske mase i hidrofobnosti molekula. Međutim, postoje razlike u stepenu razmotanosti njihovih nativnih molekula. Prilikom adsorpcije, β -CN se lakše odmotava u odnosu na lizozim, koji je daleko kompaktniji protein. Iz tog razloga β -CN, u odnosu na lizozim, daje veće vrednosti Π za iste vrednosti Γ (*Walstra, 2003*). Poređenjem adsorpcije ovih proteina na međupovršini ulje-voda i vazduh-voda, uočavaju se jasne razlike što je

prikazano na Slici 3 (Graham i Plilips, 1979a). Sa Slike 3 se vidi da je kazein više ekspanđiran na ulje-voda u odnosu na međupovršinu vazduh-voda. Takođe, globularni proteini su više denaturisani na međupovršini ulje-voda nego na međupovršini vazduh-voda.

Emulzije stabilizovane na bazi kazeina su osetljive na prisustvo jona kalcijuma i promene vrednosti pH. Snižavanjem vrednosti pH na izoelektričnu tačku i dodatkom kalcijuma dolazi do destabilizacije i flokulacije, što je posledica smanjenja elektrostatičkih odbojnih sila između emulgovanih čestica i smanjenja sterne stabilizacije zbog smanjenja debljine adsorbovanog kazeinskog sloja (Dalglish, 1998, Dickinson, 1997, 1998).



Slika 3. Odnos površinskog pritiska (Π) i površinske koncentracije (Γ) β -kazeina i lizozima na A-W (vazduh-voda) i O-W (ulje-voda) međupovršini (Graham i Philips, 1979a). Isprekidana linija odnosi se na prethodno denaturisani lizozim adsorbovan na međupovršini vazduh-voda.

Natrijum kazeinat pokazuje daleko veću površinsku aktivnost u odnosu na native proteine mleka. Ovaj emulgator daje veoma stabilne emulzije, posebno prikladne za proizvode kod kojih se primenjuju termički tretmani. Emulzije stabilizovane na bazi proteina surutke su nestabilne prilikom zagrevanja, što je posebno izraženo u slučaju visoke koncentracije elektrolita i proteina. Tom prilikom dolazi do nepoželjnih interakcija susjednih slojeva. Termičkim tretmanom emulzija na bazi ISP (izolata proteina surutke) i KSP (koncentrata proteina surutke) na temperaturama od 70°C u toku nekoliko minuta dolazi do veoma izraženih promena u strukturi adsorpcionog sloja (Dickinson i Parkinson, 2004).

U dosadašnjim literaturnim radovima i ispitivanjima funkcionalnih i površinskih svojstava proteina mleka najviše je pažnje poklonjeno: α s1- i β -CN i β -LG, koji se u

literaturi tretiraju kao tri ključna proteina mleka u pogledu površinske aktivnosti (Dickinson, 1997, 1998, Singh, 2011). Smatra se da β -LG formira stabilnije emulzije u odnosu na ostale proteine surutke. Uloga α -LA nije u potpunosti razjašnjena, iako ovaj protein, zahvaljujući činjenici da pokazuje najkarakterističnije stanje otopljene globule, koje je visoko stabilno, predstavlja omiljeni model za ispitivanje karakteristika globularnih proteina (Web i sar., 2002, Rodiles-Lopez i sar., 2010).

2.3.5.1.1 α 1- i β -kazein na međupovršinama

Kazeinske frakcije α 1- i β -CN čine oko tri četvrtine ukupnog kazeina u mleku. Ove kazeinske frakcije su detaljno opisane u poglavljima 2.3.1 i 2.3.2. Navedeni kazeinski monomeri imaju neto negativno naelektrisanje pri pH svežeg mleka (pH 6,7), oba su po karakteru amfifilni sa obimnim regionima koje odlikuje visoko učešće hidrofobnih bočnih lanaca. Obe proteinske frakcije imaju tendenciju samoasosovanja u rastvorima i imaju osobinu da se adsorbuju, kako na hidrofobnim, tako i na hidrofилnim površinama. Obe frakcije daju nizak međupovršinski napon i odlikuje ih niska površinska smicajna viskoznost na međupovršini ulje-voda. Shodno tome, mogu se koristiti kao efektivni stabilizatori za emulzije tipa ulje-u-vodi. Sastav međupovršinskog sloja na granici faza je determinisan količinom i strukturom prisutnih proteina u momentu formiranja emulzija. Kada je ukupna koncentracija mešavina ovih proteina mala (odnos proteina i ulja oko 1:60) tada se dominantno adsorbuje β -CN. Međutim, kada je ukupna količina proteina u višku u odnosu na neophodnu, tada se prvenstveno adsorbuje α 1-CN u odnosu na druge kazeinske frakcije. Frakcija α 1-CN na međupovršini formira tanji sloj u odnosu na β -CN, koga odlikuje veoma jaka površinska aktivnost na osnovu koje može da izmesti α 1-CN sa površine ulje-voda (Dickinson i sar., 1988). Prema Walstra (2003) obzirom da α 1 i β -CN imaju bliske površinske aktivnosti, u emulzijama stabilizovanim sa jednim od ova dva proteina, nakon dodavanja drugog, dolazi do tzv. reverzibilne adsorpcije, pri kojoj dodati protein menja, tj. zamenjuje postojeći već adsorbovani protein. Fenomen reverzibilne adsorpcije nije moguć kod globularnih proteina kao što je β -LG.

Međutim, pored dosta sličnosti, evidentno je da postoje i izvesne razlike između frakcija α 1- i β -CN. Distribucija hidrofobnih/hidrofobnih segmenata je znatno manje slučajna kod β -CN u odnosu na α 1-CN. Bitna osobina neuniformne distribucije

hidrofobnih ostataka β -CN je prisustvo bloka od oko 50 aminokiselinskih ostataka (1.-50.) na N-terminalnom delu koji je veoma hidrofilan i koji sadrži svih pet fosfoerinskih ostataka. Ostatak sekvence od oko 160 ostataka je preovlađujuće hidrofoban i nema neto naelektrisanje (*Euston i Horne, 2005*). Očigledna amfifilnost β -CN veoma podseća na tipičnu u vodi rastvorljivu PAM male molekulske mase, koja se u literaturi često označava kao surfaktant (*Schmidt, 1982*).

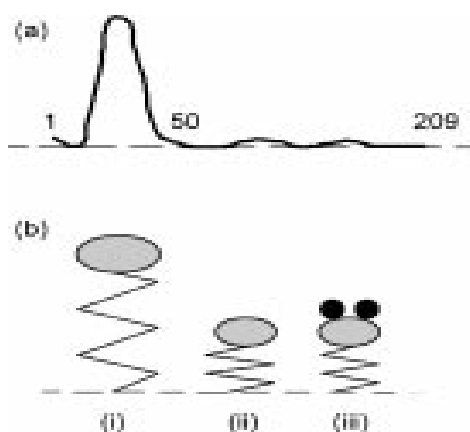
Razdvojenost hidrofилnog i hidrofobnog regiona frakcije α 1-CN je manje uočljiva. Jedan od razloga je veliko učešće i ravnomerna raspoređenost ostataka Pro, kao i velika količina hidrofobnih aminokiselinskih ostataka eksponiranih na površini molekula. U primarnoj strukturi može se razlikovati pet blokova od kojih su tri glavna hidrofobna: počev od N-terminalnog dela, jedan se nalazi u sredini (kod ostataka 90.-110.) i dva su na krajevima (1.-40. i 150.-199.). U okviru hidrofилnog bloka, sekvenca od 43.-80. aminokiselinskog ostatka sadrži sedam od osam fosfoerina i ima neto negativno naelektrisanje (*Farrell, 1999, Farrell i sar., 2004*). Pri neutralnoj vrednosti pH, neto negativno naelektrisanje α 1-CN (oko -22e) je veće u odnosu na naelektrisanje β -CN (oko -15e). Suprotno od sfernih micela β -CN, više naelektrisani α 1-CN, kroz serije uzastopnih stepena asosovanja, formira agregate koji liče na lanac (*Dickinson i sar., 1988, Dickinson, 1998*), pri čemu na uljanu površinu se adsorbuje svojim hidrofobnim krajevima, a centralni deo sa fosfoerinskim ostacima biva izbačen u vodenu fazu.

Ravnotežna slobodna energija adsorbovanih proteina na površini ulje-voda i vazduh-voda je blago veća za α 1-CN u odnosu na β -CN. Ova osobina utiče na prioriternu adsorpciju β -CN u mešovitom kazeinskom sistemu, pri maloj jonskoj jačini. Dostupni eksperimentalni podaci na različitim površinama ukazuju da je α 1-CN uglavnom adsorbovan na manjim površinama i da su njegovi slojevi tanji. Površine prekrivene adsorbovanim α 1-CN su daleko više naelektrisane u odnosu na adsorbovani β -CN. Shodno tome, emulzija stabilizovana sa α 1-CN je značajno osetljivija prema flokulaciji pod uticajem soli. Zaključak je, da β -CN predstavlja bolji sterni stabilizator u poređenju sa α 1-CN, što je verovatno posledica jače izražene amfifilnosti molekula β -CN (*Dickinson i sar., 1987, Dickinson, 1998*).

U pogledu stabilizacije emulzija smatra se da postoje dva osnovna načina njegovog delovanja odnosno elektrostatičkim i sternim repulzivnim silama. Strukture adsorbovanih slojeva α 1-CN i β -CN su ispitivane na različitim površinama i različitim

tehnikama kao što su: spektroskopska elipsometrija, rasejanje X-zraka pod malim uglom, dinamičko rasejanje svetlosti itd. Na osnovu dosadašnjih saznanja mogu se izvesti dva zaključaka: (i) da se molekuli β -CN adsorbuju u mono sloju pri širokom rasponu proteinskih koncentracija u rastvoru; i (ii) da je proteinska distribucija u mono sloju veoma ne-uniformna, sa hidrofobnim regionima vrlo bliskim površini, u gusto pakovanom unutrašnjem sloju i mnogo više naelektrisanim regionima koji se nalaze daleko od površine u mnogo tanjem sloju. Od posebnog značaja je specifična priroda sterne stabilizacije pokretljivosti koja daje β -CN njegovu odličnu emulzionu sposobnost (*Dickinson i sar., 1997a, Dickinson i Parkinson, 2004, Raikos, 2010*)

Pomoću tehnike dinamičkog rasejanja svetlosti (eng. *dynamic light scattering*), dobijene su vrednosti za debljinu hidrodinamičkog sloja adsorbovanih molekula β -CN na polistirenu, koje se nalaze u rasponu od 10-15nm. Na osnovu rezultata analize produkata proteolitičke razgradnje adsorbovanih molekula β -kazeina delovanjem tripsinom, kao i na osnovu prethodnih saznanja *Dalgleish i Leaver (1991)* su predložili tzv. model petlja-voz (eng. *loop-train model*), kao konfiguraciju koja najviše korespondira sa strukturom adsorbovanih molekula β -CN. Ovaj model, koji se odlikuje velikom petljom (eng. *loop*) sa oko 50 ostataka na N-terminalnom kraju, i sa preostalim segmentima koji se uglavnom nalaze vrlo blizu međupovršine, u nizu koji podseća na voz (eng. *train*) ilustrovan je na Slici. 4,(a).

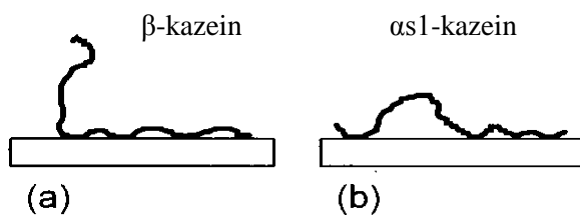


Slika 4. Modeli adsorbovanih molekula β -CN na površini polistirena: (a) Loop-train model, (b) blob-and-spring model, (i) nativni protein pri maloj jonskoj jačini, (ii) defosforilovani protein pri maloj jonskoj jačini ili nativni protein pri velikoj jonskoj jačini, (iii) nativni protein sa vezanim kalcijumovim jonima (*Brooksbank sar., 1993*)

Autori su pretpostavili da je ovaj model verodostojniji od prethodne alternativne konformacije u kojoj je oko 50 ostataka sa N-terminalnog kraja formiralo jedan

njihajući rep. Međutim, autori *Brookbank i sar. (1993)* su, na osnovu ispitivanja elektrostatičkih interakcija adsorbovanih molekula na polistirenu i saznanja da je rep daleko konzistentniji sa velikom debljinom hidrodinamičkog sloja, prihvatili kao reprezentativan model *loop-train*, ali su u isto vreme i predložili dograđenu verziju tzv. grudvica i opruga modela (eng. *blob-and-spring model*), što je prikazano na Slici 4, (b). Kod ovog modela, grudvica (eng. *blob*) predstavlja klaster negativno naelektrisanih ostataka na pozicijama 15-25, koji se odbija od površine pomoću elektrostatičkih sila, ali sa zadržanim kretanjem u rastvoru pomoću rastegnute opruge koja korespondira sa ostatkom petlje. Kada dođe do redukcije efektivnog naelektrisanja grudvice (npr. putem defosforilacije, ili dodatka soli), opruga se opušta unazad, tako da daje tanji sloj. Specifično vezivanje jona kalcijuma za fosfoerinske ostatke, takođe može rezultirati u pomeranju grudvice nazad prema površini, ponovo izazivajući smanjenje adsorbovanog sloja.

Statističko modelovanje polimera sličnih β -CN na hidrofobnim površinama može se izvesti i na osnovu postavki SCF metode (metode samousaglašenog polja, (eng. *self-consistent-field theory*), koja daje model koji je danas najviše u primeni (*Fleer i sar., 1993, Leermarkers i sar., 1996*). Prema ovoj metodi adsorpcija polimernih produkata tipa β -CN u proteinskim rastvorima, dešava se u monosloju i ispod izvesnog kondenzacionog limita. Kondenzacioni prag je redukovan pri nižim koncentracijama proteina, ali sa povećanjem jonske jačine, ili sa smanjenjem pH. Regioni koji se nalaze dalje od površine su sekvence od 40.-50. ostatka na N-terminalnom kraju. Tri četvrtine molekula su vrlo blizu površine u formi vozova ili malih petlji, a ostatak predstavlja visoko naelektrisani rep, koji se jako njiše u vodenoj fazi (Slika 5, a). N-terminalni segmenti su na prosečnoj udaljenosti od oko 5nm od površine, pri pH 7. Međutim, ova udaljenost se redukuje na $3\frac{1}{2}$ sa sniženjem pH na 5,5. Izračunavanje debljine sloja za model hipotetičke varijante molekula sličnog β -CN, kod koga je pet fosfoerinskih ostataka zamenjeno sa polarnim (nenaelektrisanim) aminokiselinskim ostacima, je dalo veće adsorbovane količine, ali i sloj manje debljine, što je verovatno posledica smanjene rastvorljivosti defosforilovanih polimera. Ova pojava potvrđuje značaj fosfoerinskih ostataka β -CN u održavanju debelog sternog stabilizacionog sloja, koji sprečava međupovršinsku proteinsku precipitaciju (tj. formiranje multislojeva).



Slika 5. Šematski prikaz reprezentativnih konformacija adsorbovanih (a) β -CN i (b) α 1-CN (*Dickinson, 1998*)

Ustanovljena je saglasnost između strukture adsorbovanih molekula tipa β -CN projektovanih putem SFC teorije i informacija dobijenih praktičnim putem, odnosno, eksperimentalnim tehnikama. Najsnažnija tehnika za proučavanje međupovršinske strukture je neutronska difrakcija. Dobijeni podaci u dvo-slojnom modelu, koji se sastojao od tankog i gustog, unutrašnjeg sloja i manje gustog spoljašnjeg sloja, ukazuju da pri vrednosti pH u rasponu od 5,5-7,0 na voda-vazduh međupovršini odgovaraju podacima koji ukazuju na postojanje gustog proteinima bogatog unutrašnjeg sloja i više difuznog spoljašnjeg sloja, koji se širi u fazu rastvora. Analize na modelu nezavisnom od navedenog, pokazuju povećanje adsorbovane količine i debljine sloja kada se pH snizi sa 7,0 na 5,5. Takođe, vrlo razblažen region u kome se nalazi rep, predviđen od strane SFC teorije, je u saglasnosti sa podacima velike debljine hidrodinamičkog sloja (10-15 nm) dobijenim metodom dinamičkog rasejanja svetlosti. Utvrđeno je da, defosforilizacija β -CN, vodi ka redukciji debljine hidrodinamičkog sloja praćenog sa marginalnim povećanjem adsorbovane količine, što se ponovo slaže sa postavkama SCF teorije (*Dickinson, 1998*).

Model sloja adsorbovanih molekula α 1-CN je kreiran korišćenjem identičnih parametara kao kod modela strukture β -CN (*Dickinson, 1998*). Dok N-terminalni deo β -CN formira dugačak rep koji se njiše dalje od površine, centralni deo α 1-CN ukazuje na veću sličnost sa konformacijom petlje čiji su krajevi adsorbovani na uljanoj površini pomoću jakih hidrofobnih veza. Na osnovu rezultata infracrvene apsorpcije, na Slici 5, (b) slikovito je prikazana konformacija α 1-CN, koja veoma liči na konformaciju petlje, opisanu za β -CN. Pri neutralnom pH, maksimum prosečne ispruženosti od površine regiona u obliku petlje, kod ostatka oko broja 60, iznosi manje od 3 nm. Pomenuti rezultat ukazuje da je adsorbovani α 1-CN ispružen, u proseku, na manjoj udaljenosti od površine, u odnosu na adsorbovani β -CN. Ovaj zaključak je u skladu sa eksperimentalnim rezultatima debljine hidrodinamičkog sloja α 1-CN. Naime, debljina

sloja α 1-CN predstavlja približno samo polovinu debljine sloja β -CN. Prilikom smanjenja vrednosti pH sa 7 na 5,5, količina adsorbovanog α 1-CN se povećava, ali se ispruženost regiona u obliku petlje, odnosno njena udaljenost od površine redukuje (Dickinson, 1998).

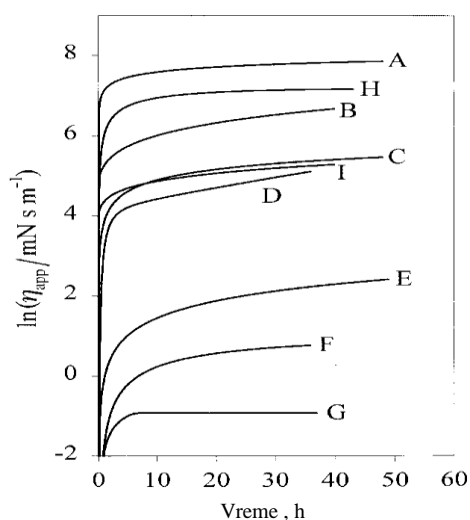
2.3.5.1.2 β -laktoglobulin na međupovršinama

Globularni protein β -LG u rastvorima, pri neutralnom pH, egzistira kao dimer, koji se održava stabilnim pomoću nekovalentnih interakcija. Monomer β -LG, sa molekulskom masom od 18.277 sadrži dve intramolekularne disulfidne veze i jednu slobodnu sakrivenu sulfhidrilnu grupu (Farrell i sar., 2004). Prilikom adsorpcije na međupovršinama vazduh-voda ili ulje-voda, molekuli β -LG, koje odlikuje prilično uređena globularna struktura, podležu izvesnom makromolekularnom preuređivanju i delimičnoj denaturaciji. Struktura adsorbovanih globularnih proteina nalazi se na poziciji između native strukture i strukture potpuno denaturisanog stanja (Dickinson, 1998, Dickinson i Matsumura, 1994). Struktura denaturisanih molekula β -LG veoma liči na strukturu stanja globularnih proteina tzv. stanje otopljene globule, koja ima odmotanu tercijarnu strukturu, ali je zadržala sekundarnu strukturu sličnu nativnoj. Monosloj adsorbovanih molekula β -LG može se smatrati kao pseudo dvodimenzioni sistem od gusto pakovanih čestica, koje su sklone deformaciji i koje međusobno intenzivno reaguju putem kombinacije jonskih, hidrofobnih i vodoničnih veza. Delimično odmotana struktura molekula globularnih proteina je praćena ekspozicijom reaktivnih sulfhidrilnih grupa i sposobnošću adsorpcije, što kao posledicu ima proces polimerizacije adsorbovanih proteina u sloju nastalih putem sulfhidril-disulfidnih reakcija (Kirchmeier i sar., 1985, Haque i Kinsela, 1988, Sawey i sar., 1999).

Iako se ranije smatralo da su proteini surutke, zbog svoje globularne strukture manje površinski aktivni u odnosu na kazeinske frakcije (Kinsella, 1984), brojna istraživanja pokazuju da se oni ipak odlikuju površinskom aktivnošću. Proteini surutke daju guste, kompaktne adsorpcione slojeve, delimično denaturisanih proteina. U novije vreme, pomoću tehnike neutronske difrakcije, dobijene su informacije vezane za adsorpciju β -LG na međupovršinu voda-vazduh, kao i za strukturu adsorbovanih slojeva β -LG, pri vrednosti pH u rasponu od 5,5-7,0. Dobijeni rezultati o debljini monosloja, merenih pod istim uslovima, govore da je debljina monosloja β -LG manja u odnosu na debljinu

monosloja β -CN, i iznosi od 2-3 nm. Ovi podaci su u saglasnosti sa prethodnim rezultatima (Eaglesham i sar., 1992) za još jedan globularni protein mleka, BSA. Bitna razlika između β -LG i β -CN, se odnosi na dinamiku povećanja površinske pokrivenosti i debljine sloja, β -LG, sa vremenom, takođe pokazuje postepeno povećanje površinske pokrivenosti i debljine sloja (oko 25% preko 4-5h). Uočava se evidentna promena strukture sloja, koja nastaje kada se molekuli adsorbovanih proteina postepeno reorganizuju na površini. Stepenn formiranja filma i reorganizovanje se povećava sa redukcijom vrednosti pH, što je posledica promene intramolekularnih interakcija i kinetike površinske denaturacije u uslovima kada se protein približava svojoj izoelektričnoj tački (Dickinson, 1998).

Mehaničke osobine proteinskog filma se izražavaju reološkim parametrima kao što su: napon površine filma (eng. *surface shear*) i promenljivost stepena deformacije (eng. *dilatational deformation*). Velike strukturne razlike između sloja adsorbovanog β -LG i kazeina se u najvećoj meri reflektuju preko reoloških parametara (Murray i Dickinson, 1996). Na Slici 6. je prikazana vremensko-zavisna funkcija viskoziteta uslovljenog tangencijalnim naponom za neke proteine hrane.



Slika 6. Vremenska zavisnost površinske smicajne viskoznosti η_{app} za proteine adsorbovane na međupovršini n-tetradekan-voda, pri koncentraciji proteina u vodenoj fazi 10^{-3} wt.% i pri neutralnom pH: (A) miozin, (B) lizozim, (C) k-CN, (D) želatin, (E) natrijum kazeinat, (F) α s1-CN, (G) β -CN, (H) β -LG, (I) α -LA (Murray i Dickinson, 1996)

Velike vrednosti površinskih reoloških parametara za globularne proteine, kao što su β -LG i lizozim, mogu se objasniti velikom gustom pakovanja i unakrsnim vezama proteina u adsorbovanom sloju, što je posebno izraženo u poređenju sa labilnim, rastresitim pakovanjem neuređenih molekula α 1- i β -CN. Takođe, elastičnost površinskog filma (eng. *surface dilational elasticity* ϵ_d) za adsorbovan β -LG je veći nego za β -CN, ali su ipak ustanovljene razlike male.

Može se napraviti analogija između odmotanih molekula β -LG uzrokovanih adsorpcijom na površini i odmotanih u rastvoru indukovanih npr. termičkim tretmanom. Smatra se da su adsorbovani molekuli na međupovršini ulje-voda odmotani u većem stepenu u odnosu na one odmotane pri termičkom tretmanu (*Lefebvre i Relkin, 1996*). Analogija je i u njihovoj aplikaciji, tj. pretpostavci da se adsorbovani monosloj može smatrati kao vrlo tanak sloj koncentrovanog proteinskog gela.

Ispitivanjem odnosa prostora po molekulu proteina adsorbovanog u toku procesa adsorpcije i razvučenog na međupovršini u vidu monosloja nakon adsorpcije, *Cornec i sar. (1999)* su ustanovili da je prostor po molekulu adsorbovanog β -LG u toku trajanja adsorpcije manji u odnosu na razvučeni monosloj. Ovi rezultati ukazuju da je adsorpcija β -LG vremenski zavisna, pri čemu su molekuli bili manje odmotani u toku adsorpcije u odnosu na molekule α -LA. Međutim, ovo nije slučaj sa α -LA, kod kojeg nije ustanovljena razlika između adsorbovanog i razvučenog sloja molekula na međupovršini. Međutim, prostor po molekulu α -LA je manji nego kod β -LG. Takođe, ustanovljeno je da se pri adsorpciji α -LA odmotava brže nego β -LG, ali u manjem obimu. Ustanovljeno je da izvesna tercijarna struktura ostaje nepromenjena kod adsorbovanih molekula α -LA, ali ne i kod β -LG. Autori su zaključili da se molekuli β -LG više denaturišu pri adsorpciji, u odnosu na molekule α -LA. Takođe, ovi rezultati su u saglasnosti sa *Corredig i Dalgleish, (1995)*, koji su ustanovili da je denaturacija α -LA prilikom adsorpcije na međupovršini ulje-voda reverzibilne prirode, što ukazuje da nije došlo do kidanja disulfidnih veza prilikom adsorpcije. S druge strane, β -LG je pri adsorpciji pokazao najveći stepen denaturacije i konformacionih promena koje su bile ireverzibilne.

2.3.5.2 Kompetitivna i kooperativna adsorpcija proteina

Kod brojnih prehrambenih proizvoda, adsorpcija proteina na međupovršini ulje-voda je stabilizovana pomoću različitih kompetitivnih i/ili kooperativnih interakcija, između proteina i komponenata hrane (*Sharma i Dalgleish, 1993*). Uprkos činjenici da su emulzije osobine individualnih proteina izučavane pretežno u model sistemima dobro poznate, veoma malo se zna o njihovom ponašanju kada se nađu zajedno u realnim sistemima kakvi su prehrambeni proizvodi.

Kompetitivna adsorpcija proteina i PAM je fenomen koji se dešava u postupcima proizvodnje različitih mlečnih proizvoda baziranih na koloidnim sistemima, kao što su sladoledi, različiti penasti proizvodi i sl. Kompetitivna adsorpcija se dešava s ciljem stabilizacije ili destabilizacije emulzija. Kada se posmatra uklanjanje proteina sa čvrstih ili tečnih površina pomoću različitih PAM, mogu se definisati dva ekstremno različita tipa mehanizama: solubilizacioni mehanizam i mehanizam zamene mesta (eng. *replacement*). Kod solubilizacionog mehanizma, desorpcija proteina sa površine dešava se kao rezultat proteinske solubilizacije u vodenoj fazi pomoću PAM rastvorljivih u vodi, koji formiraju protein-PAM kompleks. PAM, kao samostalan, ne može da se adsorbuje na površini, ali mora da ima osobinu da intenzivno reaguje sa adsorbovanim proteinom. Kod mehanizma zamene mesta, kompetitivna zamena adsorbovanih proteina se dešava kada su interakcije PAM-površina jače od interakcije između proteina i površine ili od protein-PAM kompleksa. U stvari, PAM ne reaguje sa proteinom, ali mora da ima veoma izražen afinitet vezivanja za površinu (*Dickinson, 1998*). U praksi, stvarni mehanizmi se dešavaju negde između ova dva ekstremna slučaja. Kompetitivna adsorpcija, koja uključuje jonske PAM, uglavnom se dešava preko solubilizacionog mehanizma, dok se kod nejonskih PAM dešava, uglavnom, putem zamene.

Ustanovljeno je da kompetitivna adsorpcija zavisi od strukture proteina. Starenje, kao i termički tretman emulzija pripremljenih sa npr. β -LG, redukuju sposobnost PAM za izmeštanjem proteina sa međupovršine ulje-voda (*Chen i sar, 1993a,b, Dickinson, 1998*). Pored toga, i priroda uljane faze, posebno njena polarnost, kao i stanje kristalizacije utiču na kompetitivnu adsorpciju proteina (*Dickinson i Tanai, 1992, Chen i Dickinson, 1993, Stevenson i sar., 1997*).

U toku homogenizacije mleka, dešava se kompetitivna adsorpcija između kazeina i proteina surutke, što za rezultat ima fomiranje tankog sloja, od oko 10 nm, koji se sastoji od oba tipa proteina (*Millqvist-Fureby i sar., 2001*). Sposobnost proteina da bude preovlađujuća komponenta na međupovršini ulje-voda u toku emulgovanja uglavnom zavisi od molekulske fleksibilnosti i površinske hidrofobnosti (*Dickinson, 1991*). S tim u vezi, smatra se da je upravo to osnovni razlog što je kazein preovlađujuće adsorbovan na međupovršini mlečnih emulzija. Kazeinska frakcija dominira na međupovršini ulje-voda zbog njegove strukture, odnosno, visokog učešća hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, kao i fleksibilnije, otvorenije molekulske strukture, u poređenju sa proteinima surutke. Fleksibilni i amfifilni kazeini se brzo adsorbuju u toku homogenizacije i snižavaju površinski napon. Međutim, eksperimentalni podaci ukazuju da će se u emulzijama ulje u vodi, proteini adsorbovati na uljanim površinama proporcionalno sa njihovom koncentracijom u vodenoj fazi (*Hunt i Dalgleish, 1994a*). U proteinskim mešavinama kazeinata i proteina surutke, kazeini se adsorbuju prvenstveno na međupovršini ulje-voda pri visokim koncentracijama proteina, dok pri malim koncentracijama (<3%) dominirajući su proteini surutke (*Raikos, 2010*).

Prekrivanjem kontaktne površine ulje-voda hidrolizatima proteina surutke (u odnosu na pojedinačne frakcije hidrolizata proteina surutke) značajno se pojačava površinska aktivnost naknadno dodatih molekula k-CN ili β -LG A na tu međupovršinu (*Haque i sar., 2010*). Autori pretpostavljaju da dolazi do kooperativne adsorpcije na kontaktnoj površini. Međutim, kada su umesto nefrakcionisanih hidrolizata, nanete pojedinačne frakcije, dolazi do smanjenja površinske aktivnosti naknadno nanetih k-CN ili β -LG A jer dolazi do kompeticije i izmeštanja frakcija sa kontaktne površine.

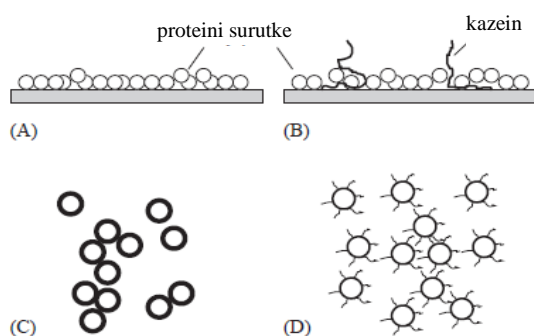
Autori *Dickinson i Matsamura (1994)* su ustanovili da postoji mala verovatnoća izmeštanja adsorbovanog globularnog proteina kao što je β -LG, čak ni u prisustvu veoma fleksibilnih molekula kao što su β -CN i α s1-CN. Prema *Dickinson i sar. (1988, 1993)* izmeštanje adsorbovanih proteina na uljanoj međupovršini ne zavisi samo od njihove relativne molekulske fleksibilnosti, već i od gustine međupovršinskog pakovanja i jačine međupovršinskih protein-protein interakcija između komponenti koje su formirale međupovršinski sloj. U tom smislu, ustanovljeno je da α s1-CN može biti izmešten od strane β -CN. Takođe, u skladu sa napred navedenim, i α -LA može biti

izmešten sa međupovršina od strane β -CN, što je verovatno posledica nemogućnosti α -LA da polimerizuje u sloju putem sulfidrilnih interakcija (*Dickinson i sar., 1989*).

Termički tretman emulzija hrane stabilizovanih sa proteinima mleka može uticati na njenu stabilnost (*Brun i Dalgleish, 1999, Hunt i Dalgleish 1994a, Dalgleish i sar., 2002, Dickinson i Parkinson, 2004*). U toku emulgovanja pre termičkog tretmana, fleksibilni amfifilni kazeini se, u odnosu na proteine surutke, brže i u većoj količini adsorbuju na međupovršini ulje-voda. Termičkim tretmanom emulzija stabilizovanih sa proteinima surutke, u koje su dodati kazeini na temperaturi od 80°C/10 minuta, ne dolazi do promena u adsorbovanom sloju, što se može objasniti formiranim disulfidnim vezama između proteina surutke u sloju (*Hunt i Dalgleish, 1994a*). Kazeini ne mogu izmestiti adsorbovane proteine surutke, već se jedino mogu ko-adsorbovati, ukoliko kontaktna površina nije zasićena, pri čemu u ovom slučaju dolazi do izvesne kompeticije proteina na površini. U suprotnom slučaju, nakon termičkog tretmana na temperaturama od 80-85°C emulzija stabilizovanih sa proteinima mleka, dolazi do promena u sastavu adsorbovnog sloja. Naime, proteini surutke zamenjuju α s1- i β -CN na međupovršini, dok k- i α s2-CN ostaju u sloju, jer zahvaljujući slobodnim sulfidrilnim grupama, sa proteinima surutke grade komplekse pomoću disulfidnih veza (*Brun i Dalgleish, 1999*). U emulzijama proizvedenim sa β -LG, substitucija samo 10% β -LG sa Na-kazeinatom, pre zagrevanja na 90°C, rezultira u stvaranju izuzetne termičke stabilnosti emulzija, čak i u toku produženog vremena termičkog tretmana, kao npr. 10 sati na temperaturi od 90°C (*Dickinson i Parkinson, 2004*). Takođe, autori su ustanovili da supstitucija samo 5% IPS sa Na-kazeinatom, u emulzijama stabilizovanih sa IPS, pre termičkog tretmana, povećava termičku stabilnost emulzije. Autori objašnjenje nalaze u povećanoj sternoj stabilizaciji sloja nastaloj usled adsorbovanih kazeinskih molekula. Pored Na-kazeinata i β -CN, dodat u vrlo malim koncentracijama, pokazuje veoma pozitivan uticaj na povećanje termičke stabilnosti emulzija od proteina surutke, putem sterne stabilizacije, zahvaljujući svom N-terminalnom delu molekula, tzv. *repu* (Slika 7).

Među komercijalnim preparatima proteina mleka najčešće se nalaze sledeći proizvodi: natrijum kazeinat, ukupni proteini mleka i KPS. Strukturno uređeniji agregati proteina mleka, kao što su micelarni kazeinski agregati i OMP (obrano mleko u prahu) su nepodesni za formiranje emulzija, zbog svoje male fleksibilnosti. Struktura micle se održava stabilnom putem kalcijumovih mostova i ne može se brzo razmotati, npr. na

međupovršini ulje-voda (Dalglish, 1993, 1996). Takođe, obzirom na veličinu molekula, odnosno micela, prisutan je manji broj efektivnih proteinskih čestica za adsorpciju u odnosu na situaciju kada su prisutne disosovane kazeinske frakcije. Pored navedenog, kada su agregati u pitanju, hidrofobne grupe su često smeštene u unutrašnjosti, u jezgru, dok je spoljašnja površina manje hidrofobna, što takođe redukuje tendenciju za adsorpcijom na međupovršini ulje-voda (Euston i Hirst, 2000). Kazeini daju stabilnije emulzije u odnosu na proteine surutke. Međutim, ako je kazein u micelarnom ili agregiranom stanju, velika je verovatnoća da proteini surutke daju stabilnije emulzije (Zayas, 1997).



Slika 7. Šematski prikaz uticaja malih količina Na-kazeinata na strukturu adsorpcionog sloja termički tretiranih emulzija od IPS: (A) tanak sloj adsorbovanih proteina surutke na međupovršini ulje-voda; (B) gušći adsorpcioni sloj sa inkorporiranim kazeinskim molekulima; (C) reverzibilna flokulacija termički tretiranih emulzija od IPS; (D) sterno stabilizovana emulzija putem kazeinskih repova (Dickinson i Parkinson, 2004)

Leman i sar. (1988) su upoređivali emulgjuća svojstva komercijalnih preparata proteina mleka kao što su: micelarni kazein, OMP i KPS. Autori su ustanovili da se stabilnost formiranih emulzija, pri neutralnom pH, smanjuje prema sledećem redosledu: micelarni kazein > OMP > KPS, gde se pod emulzionom stabilnošću podrazumeva stabilnost emulzija prema flokulaciji i koalescenciji, pri čemu pomenuta emulgjuća svojstva ne moraju obavezno da budu u korelaciji sa međupovršinskim reološkim osobinama.

U stvarnosti, proteini mleka nisu nađeni kao izolovani u emulzijama u idustriji hrane, već u kombinacijama sa različitim funkcionalim dodacima. Njihove interakcije su jako bitne za stabilnost čitavog sistema finalnog proizvoda. Često se koriste emulgatori malih molekulskih masa i polisaharidi. Poznato je da se površinski aktivne komponente malih molekulskih masa takmiče sa proteinima za prostor na međupovršini i izmeštaju ih sa površine. U ogledima sa model sistemima od čistih individualnih

proteina (*Dickinson i Tanai, 1992*) i komercijalnih preparata proteina mleka (*Euston i sar., 1995, 1996*), ustanovljeno je da su za izmeštanje proteina sa međupovršine ulje-voda emulgatori rastvorljivi u vodi efikasniji nego oni rastvorljivi u uljima. Step en i mehanizam izmešt anja zavisi od tipa proteina, odnosno od njegove strukture (globularna ili neuređena).

Izvesni emulgatori mogu formirati međupovršinske komplekse sa proteinima mleka bez njihovog izmešt anja. Poznato je da polisaharidni stabilizatori reaguju sa adsorbovanim proteinima. Međutim, obzirom da nisu površinski aktivni, ove interakcije su praćene kooperativnom adsorpcijom. Najuobičajeniji tip interakcija je između suprotno naelektrisanih grupa proteina i polisaharida, što skupa vodi poboljšanju stabilnosti emulzije prema koalescenciji (*Euston i Hirst, 2000*).

Na površinsku aktivnost proteina mleka takođe utiču i druge komponente hrane. Tu spadaju šećeri i soli, kao što su fosfati, halogenidi i sl. koji dovode do promene u načinu kojim proteini reaguju na međupovršini ulje-voda. Šećeri u vodenom rastvoru povećavaju uređenu strukturu (pomoću kooperativnog vezivanja vodonika), što rezultuje povećanjem tendencije proteina ka agregiranju na bazi hidrofobnih interakcija. Ranija istraživanja su pokazala da postoji povećanje proteinske površinske aktivnosti u prisustvu šećera, što je potkrepljeno proteinskom pokrivenošću na međupovršini ulje-voda. Postoji i nekoliko kombinacija protein-polisaharid koje su nepoželjne, jer su termodinamički inkompatibilne, (imaju neodrživu entalpiju mešanja). Kod ovih kombinacija dolazi do pada stabilnosti emulzije, spontane flokulacije i seperacije faza (*Dickinson i McClements, 1995*). Soli kao što su fosfati imaju sličan pozitivan efekat kao i šećeri. Druge soli, kao što su hloridi, imaju suprotan efekat, jer oni favorizuju proteinsko razmotavanje (slabe hidrofobne interakcije), što vodi redukciji površinske pokrivenosti (*Damodaran, 1990*).

Međupovršinske reološke osobine i kvalitet formiranog proteinskog filma su veoma važni za kontrolu stabilnosti emulzija. Pomenuti kvalitet proteinskog filma zavisi od stepena u kom proteinski lanci strče u vodenoj fazi, od lateralnih interakcija između proteina kao i od homogenosti formiranog filma (*Mellema i Isenbart, 2004*). Poslednja dva navedena obeležja izražavaju se preko dilatacionog modula elastičnosti površine (eng. *elastic dilational modulus of the interface*), koji predstavlja elastični odgovor međupovršinskog napona prema periodičnim promenama na međupovršini. Povećanje

elektrostatičke i sterne repulzije pojačava stabilnost emulzije i redukuje promene koje vode ka flokulaciji, a koja obično prethodi koalescenciji. Veće vrednosti modula govore da je došlo do povećanja stabilnosti emulzija na pomenutoj površini. OMP daje niži finalni međupovršinski napon u poređenju sa KPS. Međutim, vrednosti finalnih modula za KPS su blago veće u odnosu na OMP. Kod OMP koncentracija uopšte ne utiče na ponašanje modula. Ponašanje je bilo identično čak i kad su koncentracije podešene na 0,7%. Ovo ukazuje da multislojna adsorpcija (ako uopšte postoji) ne utiče na reologiju međupovršinskog filma (*Mellema i Isenbart, 2004*). Međutim, kod visokih koncentracija KPS, dinamika razvoja modula ukazuje na sporije procese. Ovaj rezultat ukazuje da odmah nakon prvog adsorpcionog koraka, preuredjenje ili odmotavanje molekula proteina surutke determiniše razvoj međupovršinske reologije. Ova pojava je dobro poznata kao dvostepeno adsorpciono ponašanje globularnih proteina, kao što je β -LG, pri čemu je bilo izraženije pri visokim koncentracijama proteina (*Boerboom, 2000*).

Mellema i Isenbart (2004) su ispitivali uticaj odabranih komponenata na emulgjujuće osobine komercijalnih preparata proteina mleka kao što su: OMP i KPS. Ispitivanjem uticaja sadržaja kuhinjske soli (NaCl), kalcijuma i laktoze, autori su ustanovili da sva tri dodatka imaju jak uticaj na međupovršinske osobine, pri čemu su uticaji prilično slični za OMP i KPS. Poređani od jakog ka slabijem, redosled uticaja je sledeći: kuhinjska so > kalcijum > laktoza. Uticaj laktoze je bio najmanji i ogleda se samo u uticaju na rastvorljivost proteina. Uticaj kuhinjske soli je vrlo jak i jači je u slučaju KPS, posebno u početnoj fazi, kada površinski napon pada na jako niske vrednosti, bliske nuli. Slično se dešava i sa dodatim CaCl_2 , samo u nešto kasnijoj fazi. Autori su ovakvo ponašanje objasnili na sledeći način: dodavanjem elektrolita kao što je natrijum ili kalcijum hlorid, naelektrisanja proteina su maskirana i proteini postaju više hidrofobni. Kazeinske micele su manje osetljive na dodavanje elektrolita, zato što su stabilne u rastvorima zahvaljujući sternoj repulziji. Proteini surutke se oslanjaju samo na elektrostatičke odbojne sile. Gubitak repulzije vodi ka agregiranju i formiranju međupovršinske strukture filma. Ovakvo ponašanje daje mrežu koja je više krta i obično slabija. Međutim, u isto vreme proteini sa maskiranim naelektrisanjima teže da se jače akumuliraju na hidrofobnim površinama. Shodno tome, dobija se rezultujući neto efekat koji se ogleda u slabljenju proteinskog filma, ali je kompenzovan većom ukupnom koncentracijom proteina u filmu.

2.4 ZNAČAJ VAZDUHA KAO RADNOG AGENSA U PROCESU FORMIRANJA KAJMAKA

Početna faza formiranja kajmaka, koja je praćena formiranjem početne pokožice, nastaje kao rezultat kombinovanog uticaja: (i) površinskih pojava, usled kojih se na graničnoj površini vrelog mleka i vazduha koncentrišu komponente sa izraženom površinskom aktivnošću, i (ii) intenzivnog isparavanja vodene faze, uslovljenog visokom temperaturom mleka. Veoma važni faktori početne, tople faze formiranja kajmaka su temperatura mleka, termodinamički parametri vazduha i sastav početne sirovine. S tim u vezi, u ovom poglavlju dat je kratak pregled procesa formiranja pokožice i uloge vazduha kao radnog agensa u procesu formiranja pokožica i kajmaka.

Spiro i Chong (1997) su ustanovili da se na površini termički tretiranog, a zatim ohlađenog mleka, obrazuje nerastvorljiva pokožica koja sadrži nekoliko puta veću količinu kalcijuma u odnosu na mleko na kom je formirana. Autori su ustanovili da do formiranja pokožice ne dolazi ukoliko u mleku nisu prisutni kalcijumovi joni.

Proteini mleka, iako su u pokožici zastupljeni u značajno manjoj meri u poređenju sa mlečnom mašću, imaju veoma važnu ulogu u njenom nastajanju. Proteini su odgovorni za prevođenje površinskog sloja mleka obogaćenog površinski aktivnim materijama iz tečnog u čvrsto agregatno stanje. Pretpostavlja se da usled izražene površinske aktivnosti komponenata MFGM dolazi do destabilizacije MFGM na međupovršini vazduha i vode, adsorpcije fragmenata MFGM, njihovog koncentrisanja i agregiranja (*Kristensen i sar., 1997*). Isparavanjem vode iz mleka, tokom procesa formiranja kajmaka, dolazi do dodatnog koncentrisanja prisutnih komponenata i gelifikacije proteina u površinskom sloju. Formiranje pokožice, tj. očvršćavanje površinskog sloja vrelog mleka, javlja se u momentu postizanja kritične koncentracije proteina kod koje oni gube svoju rastvorljivost, usled čega gelifikuju (*Nikolai, 2007, Mahmoudi i sar., 2007*), obuhvatajući pri tome mast koncentrisanu u zoni graničnog sloja mleka. Daljim isparavanjem vode dolazi do isušivanja i očvršćavanja formirane pokožice na površini mleka, tako da pokožica uobičajeno sadrži mlečnu mast (50-60%) i proteine mleka (oko 10%), uz relativno malo učešće vode, oko 30% (*Puđa i sar., 2006*). Pokožica formirana u početnoj fazi formiranja kajmaka se u toku trajanja procesa formiranja kajmaka, transformiše, obogaćuje mašću i na taj način formira finalni proizvod, kajmak.

Svi termodinamički procesi koji se dešavaju pri proizvodnji kajmaka, a vezani su za parametre vazduha, dešavaju se na graničnoj površini mleko-vazduh. U toku celokupnog procesa formiranja kajmaka, vazduh u direktnom je kontaktu sa površinom mleka na kome se formira kajmak. Može se reći da je u pitanju jedan interaktivni odnos koji traje u toku celokupnog procesa formiranja kajmaka, a koji ima najdinamičniji karakter u toku formiranja početne pokožice. S tim u vezi, definisanje parametara vazduha kao radnog agensa u procesu formiranja kajmaka predstavlja jedno od centralnih pitanja industrijalizacije proizvodnje kajmaka.

Posmatrajući celokupni proces formiranja pokožice možemo zapaziti tri različite faze procesa:

- U početnoj fazi procesa, vazduh je u kontaktu sa pokožicom obrazovanom na površini vrelog mleka, a zatim sa gornjom površinom kajmaka u stasavanju. Na samom početku formiranja kajmaka, odmah nakon razlivanja vrelog mleka, na međupovršini mleko-vazduh dominantno se dešava proces isparavanja vode iz mleka. Vazduh koji struji preko vrele površine mleka, sa sobom odnosi oslobođenu vodenu paru. U ovoj fazi, vazduh igra ulogu radnog agensa, prevashodno u funkciji eliminisanja vodene pare sa površine vrelog mleka, odnosno, isušivanja, pri čemu količina odnete vlage zavisi od termodinamičkih parametara stanja vazduha (temperature i relativne vlažnosti). Vrlo brzo dolazi do formiranja početne pokožice, koja lagano očvršćava i postaje delimična barijera za dalje intenzivno isparavanje vode iz mleka.
- U prelaznoj fazi, u uslovima formirane pokožice, koja ima karakter poroznog medijuma, na međupovršini se dešavaju procesi koji predstavljaju kombinaciju isparavanja i konvekcije toplote.
- U sledećoj fazi, kada je formirana zbijena i očvrsla pokožica sa izraženijim barijernim svojstvima prema isparavanju vode, na međupovršini pokožica-vazduh se preovlađujuće dešavaju procesi konvekcije toplote, odnosno, konvektivnog hlađenja mehanizmom prolaza toplote.

Sagledavanjem navedenih procesa može se zaključiti da se tokom formiranja pokožice dešavaju vrlo izražene dinamičke promene. *Radovanović i sar. (2012)* su

ustanovili da se najdinamičnije energetske i evaporativne promene u procesu formiranja pokožice dešavaju u toku prvih desetak minuta procesa, a zatim se progresivno usporavaju i praktično su zanemarljive nakon šezdeset minuta procesa formiranja kajmaka. Menja se temperatura mleka i struktura, svojstva i izgled pokožice, a u isto vreme menjaju se i parametri vlažnog vazduha iznad površine mleka na kome se formira pokožica. Tokom formiranja kajmaka menjaju se i parametri vazdušne struje usled razmene materije i energije između mleka i vazduha, odnosno može se reći da se menjaju materijalni i energetski bilansi vlažnog vazduha koji struji preko površine vrelog mleka (*Voronjec i Kozić, 2002*).

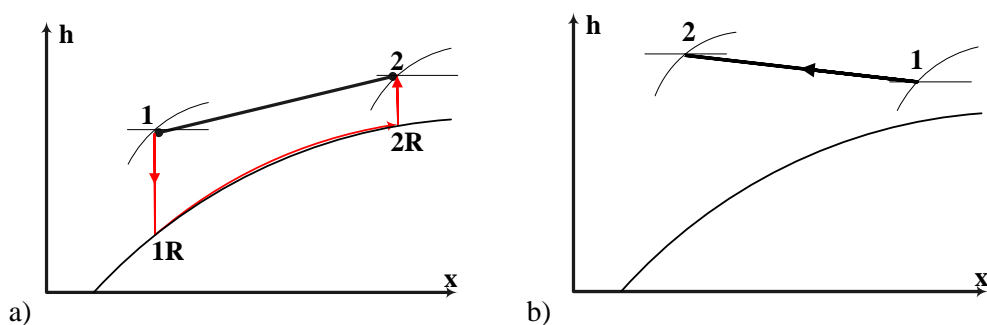
2.4.1 Promene stanja vlažnog vazduha u procesu formiranja kajmaka

Prilikom strujanja vlažnog vazduha preko zagrejanog mleka u posudi mehanizam razmene toplote u sistemu mleko-vazduh, odnosno, mleko-vlažan vazduh je dvojak. Sa jedne strane, usled termičke i koncentracione neravnoteže, dolazi do isparavanja vode sa slobodne površine mleka u smeru površina mleka-vlažan vazduh, a sa druge strane se odvija proces konvektivnog hlađenja mleka direktnim strujanjem vazduha preko slobodne površine mleka i razmene toplote između vazduha i mleka prolazom toplote kroz zidove posude sa mlekom.

Na Slici 8 prikazane su karakteristične promene vlažnog vazduha u toku formiranja pokožice na površini vrelog mleka (*Radovanović i sar., 2012*). Mleko na dovoljnoj udaljenosti od kontaktne površine, predaje toplotni fluks struji vazduha, i postepeno se hladi do trenutka dok se ne formira pokožica. Vazduh, prelazeći preko površine mleka, prima toplotni fluks, i istovremeno mu se povećavaju apsolutna vlažnost i temperatura. Ako bi se proces posmatrao teorijski, mogao bi da se podeli na dva dela. Prvi deo, predstavljen pravcem 1-1R-2R, označava evaporativno hlađenje mleka, tj. gledano sa strane vazduha vlaženje vazduha (Slika 8, a). Količina vlage koju je vazduh u stanju da primi definisana je razlikom apsolutnih vlažnosti stanja 1R i 2R. Posle vlaženja vazduha, vazduh se zagreva do konačnog stanja 2 putem konvektivne razmene toplote.

S obzirom da se posuda sa mlekom nalazi u neposrednom kontaktu sa strujom vazduha preko svih slobodnih površina, mleko se unutar suda dodatno hladi usled prolaza toplote od strane mleka ka vazduhu. Na ovaj način temperatura mleka na dovoljnoj udaljenosti od kontaktne površine dodatno opada, što dovodi do toga da

proces ima karakter spregnutog evaporativnog i konvektivnog hlađenja mleka na kontaktnoj površini.



Slika 8. Promena stanja vlažnog vazduha: a) u slučaju evaporativnog i konvektivnog hlađenja mleka; b) usled prolaza toplote kroz zidove suda sa mlekom i preko formirane površine pokožice (Radovanović i sar., 2012)

Posle formiranja pokožice, koja ima karakter delimične barijere, evaporativni proces počinje da usporava i može se pretpostaviti da je tempo usporavanja evaporacije u određenoj relaciji sa poroznošću nagrađene pokožice i njenom debljinom, dok se režim konvektivnog hlađenja mleka vazduhom nastavlja.

Spregnuti mehanizam evaporativne i konvektivne razmene toplote prisutan je u početnoj formi do trenutka formiranja pokožice na kontaktnoj površini mleka i vazduha. Po formiranju pokožice, evaporativno hlađenje smanjuje svoj udeo u mehanizmu razmene toplote mleka i vazduha, a proces hlađenja mleka se u sve većoj meri odvija prolazom toplote kroz zidove suda i preko pokožice.

Proces predavanja toplote sa strane vazduha u ovom delu procesa prikazan je grafički na Slici 8,(b). Proces zagrevanja vazduha koji prelazi preko posude sa mlekom dat je pravcem 1-2. Usled opstrujavanja vazduha oko zidova posude sa mlekom i preko površine na kojoj se formirao tanak sloj pokožice, vazduh menja svoje stanje od stanja 1 do stanja 2, gde mu se povećava temperatura i smanjuje apsolutna vlažnost.

2.4.2 Matematički model razmene energije i mase u procesu formiranja kajmaka u kontrolisanim uslovima

Model razmene energije i mase na graničnoj površini mleko-vazduh

Matematički model razmene mase i energije u procesu formiranja kajmaka primenili smo kod procesa formiranja kajmaka u kontrolisanim uslovima vazduha. Formiranje

kajmaka je izvedeno opstrujavanjem plitke posude sa mlekom u kanalu instalacije i formiranjem pokožice u toku prvih 60 minuta procesa.

Prema *Ećim-Đurić i sar. (2012)* proces hlađenja mleka, koji sa stanovišta termodinamike, predstavlja suštinu procesa formiranja kajmaka, odnosno, pokožice može se podeliti u dve faze, u zavisnosti od toga koji je fenomen razmene toplote dominantniji. U početnom periodu razmena toplote evaporacijom ima dominantniju ulogu, s obzirom na veliku temperatursku razliku, tj razliku parcijalnih pritisaka pare u vazduhu i na kontaktnoj površini mleko-vlažan vazduh, što prouzrokuje intenzivno isparavanje. Ovaj proces se veoma kratko odvija visokim intenzitetom, jer relativno brzo dolazi do formiranja pokožice na kontaktnoj površini, koja ima formu delimične barijere, čija se debljina vremenom uvećava, a poroznost smanjuje.

Po formiranju pokožice toplotni fluks emitovan evaporativnim hlađenjem se jednokratno i značajno smanjuje, a u daljem toku eksperimenta kontinualno opada malim intenzitetom. Istovremeno, razmena toplote konvekcijom, zbog smanjenja evaporativnog toplotnog fluksa dobija veći značaj.

Bez obzira kakve su temperature vazduha u neporemećenoj struji i mleka na određenoj dubini u posudi, na površini kontakta čestice vazduha i mleka imaju ravnotežnu temperaturu. Na Slici 9 šematski je prikazana kontaktna površina mleko-vazduh, odnosno, mleko-vlažan vazduh, gde su:

a- neporemećena struja vlažnog vazduha koji struji preko mleka

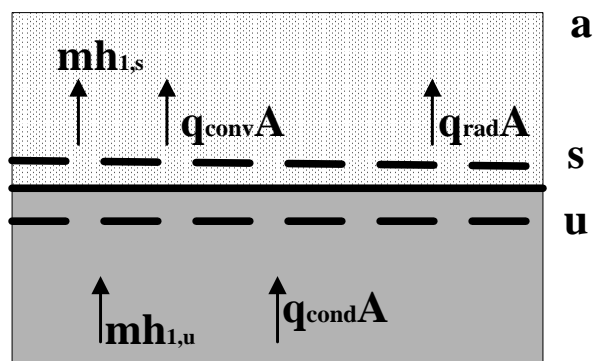
u - zamišljena ravan u blizini kontaktne površine sa strane mleka

s – zamišljena ravan u blizini kontaktne površine sa strane vlažnog vazduha

U praktičnom smislu ravni **u** i **s** su u stvari donja i gornja granična površina pokožice, kroz koju se, tokom vremena, vrši razmena mase i toplote od mleka ka vazdušnoj struji.

Mleko odaje toplotu sa strane kontaktne površine, direktno u struju vlažnog vazduha, kao i prolazom toplote kroz zidove posude. Preko kontaktne površine razmena toplote obavlja se putem istovremenog odavanje mase i toplote vazdušnoj struji. U proizvoljno uočenom vremenskom trenutku bilans energije između površina **u** i **s** može se predstaviti izrazom:

$$\begin{aligned} \dot{m}\Delta h &= \dot{Q} \\ \dot{m}(h_{1,s} - h_{1,u}) &= A(\dot{q}_{cond} - \dot{q}_{conv} - \dot{q}_{rad}) \end{aligned} \quad (3)$$



Slika 9. Šematski prikaz razmene mase i energije na kontaktnoj površini mleko-vazduh (Ećim-Đurić i sar., 2012)

Zračenje sa površine mleka emituje se ispod površine **u**, tj. neposredno ispod realne kontaktne površine. S obzirom na temperaturske profile na kontaktnoj površini i ako se pretpostavi da je površina mleka prozirna, zračenje se može zanemariti, pa se prostiranje toplote kroz **u** ravan može svesti samo na kondukciju. Kroz ravni **u** i **s** prolazi samo komponenta 1, kako je označeno u (3), što je u ovom slučaju voda, koja isparava iz zagrejanog mleka.

Maseni protok vode koja isparava preko površina **u** i **s** u vazдушnu struju može se, prema prvom Fikovom zakonu izraziti:

$$\frac{\dot{m}}{A} \cong j_{1,s} = -\rho D_{12} \frac{dm_1}{dx} = g_{m1} (\omega_{1,s} - \omega_{1,e}) \quad (4)$$

Sređivanjem prethodnih izraza, zajedno sa standardnim jednačinama za određivanje toplotnog fluksa pri razmeni toplote konvekcijom i kondukcijom, dobija se sledeći izraz po kom se može izračunati promena temperature mleka tokom nekog posmatranog vremenskog perioda:

$$-\lambda \frac{\partial T}{\partial y} \Big|_u = \alpha (T_s - T_a) + g_{m1} (\omega_{1,2} - \omega_{1,a}) h_{fg} \quad (5)$$

gde je:

$$h_{fg} = h_{1,s} - h_{1,u}$$

U uobičajenoj praksi, prvi član sa desne strane znaka jednakosti odgovara senzibilnom toplotnom fluksu koji se emituje sa strane mleka prema vazdušnoj struji, a

drugi član je latentni toplotni fluks. Analogno ovom izrazu, količina vode koja ispari iz mleka i apsorbuje se vazдушnom strujom može se odrediti iz:

$$\frac{1}{A} \frac{d\dot{m}}{d\tau} = -\lambda(\phi p_s - p_a) = -D_{12} \quad (6)$$

Razmena mase i toplote može se iskazati sledećim izrazom:

$$\frac{\partial \omega_1}{\partial \tau} + \frac{2D_{12}}{\omega_1 + \omega^0} \left(\frac{\partial \omega_1}{\partial y} \right)^2 - \frac{\partial}{\partial y} \left(D_{12} \frac{\partial \omega_1}{\partial y} \right) = 0 \quad (7)$$

Ova jednačina se numerički istovremeno rešava sa jednačinama (5) i (6) da bi se dobilo rešenje za senzibilni i latentni toplotni fluks u nekom vremenskom trenutku. Granični uslovi koji se primenjuju su:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \omega_1}{\partial y} &= 0, \quad z=0 \\ \frac{d}{d\tau} \int_0^l \rho_1 dz &= -j_{1,s} \\ \rho_1^0 \frac{dl}{d\tau} &= -j_{1,s} \end{aligned} \quad (8)$$

Važnu ulogu u opisu strujnog polja, kao i ukupnog fenomena razmene mase i toplote imaju bezdimenzioni kriterijumi. Obzirom da kondukcija i difuzija podležu Fourier-ovom, odnosno Fick-ovom zakonu, koji imaju identičan matematički oblik, može se uspostaviti odgovarajuća analogija između konvektivne razmene mase i toplote. Shodno tome, za opisivanje fenomena konvektivne razmene mase, Prandtl-ov broj se zamenjuje Schmidt-ovim brojem, a Nusselt-ov broj Sherwood-ovim brojem. Na osnovu iznete analize, za modeliranje fenomena jednovremene razmene mase i toplote može se izvesti:

$$Nu = 0.664 \cdot Re^{1/2} \cdot Pr^{1/3} \quad (9)$$

$$Sh = 0.664 \cdot Re^{1/2} \cdot Sc^{1/3} \quad (10)$$

Prolaz toplote kroz zidove posude

Zbog malih brzina strujanja vazduha, strujno polje u kanalu je na granici prelaznog režima ka turbulentnom režimu strujanja. Prolaskom vazduha oko posude sa mlekom, slobodan prostor za strujanje vazduha sa svih strana posude se smanjuje, čime se

lokalno ubrzava vazдушna struja i prelazi se u turbulentno područje. Koeficijent prelaza toplote sa strane vazduha u turbulentnom graničnom sloju može se predstaviti sledećim izrazom:

$$\alpha_{air} = \frac{Nu \cdot \lambda}{l} \quad (11)$$

Sa strane mleka koeficijent prelaza toplote računa se prema:

$$\alpha_{ml} = \frac{Nu \cdot \lambda}{l} = \left(\frac{\lambda}{l}\right) \cdot 0.5 \cdot (Gr \cdot Pr)_{ml}^{0.25} \cdot \left(\frac{Pr_{wall}}{Pr_{ml}}\right)^{0.25} \quad (12)$$

Sa strane vazduha koeficijent prelaza toplote računa se prema:

$$\alpha_{air} = \frac{Nu \cdot \lambda}{l} = \left(\frac{\lambda}{l}\right) \cdot 0.664 \cdot Re^{1/2} \cdot Pr^{1/3} \quad (13)$$

Ukupan toplotni fluks koji se preda prolazom toplote od mleka ka vazdušnoj struji kroz zidove posude određuje se prema:

$$\dot{q} = k \cdot (t_{ml} - t_{air}) = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{ml}} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_{air}}} \cdot (t_{ml} - t_{air}) \quad (14)$$

U simulaciji tradicionalnog postupka proizvodnje kajmaka, u bilansu energije, jednačina (13) menja se sa jednačinom (12) s obzirom da ne postoji kontrolisano stujanje vazduha oko posude sa mlekom, pa je u razmeni toplote prisutna prirodna konvekcija i sa spoljašnjih strana zidova posude.

Iz svega napred izloženog može se zaključiti da proces formiranja pokožice i kajmaka u celosti predstavlja vrlo složen difuzioni proces koji zavisi od brojnih parametara. Usled toga, deo ekeperimentalnog rada ove doktorske disertacije, pionirskim koracima je usmeren na sagledavanju bilansa energije i mase tokom proizvodnje pokožica u zavisnosti od procesnih parametara, temperature i relativne vlažnosti vazduha.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kajmak je naš delikatesni mlečni proizvod koji bi po svojim senzornim svojstvima, kao i po ugledu koji ga prati u porodici tradicionalnih prehrambenih proizvoda, mogao imati poziciju jednog od vodećih brendova srpske poljoprivrede. Međutim, zbog neujednačene i nedovoljno bezbedne proizvodnje na individualnim gazdinstvima, kao i odsustva jedinstvenog stručnog pristupa u naporima za njegovu industrijsku proizvodnju, kajmak se i dalje nalazi na marginama trgovinskih bilansa poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda.

Istraživanja obuhvaćena ovim radom imaju kao jednu od postavki detaljnije sagledavanje mehanizama formiranja kajmaka, kao i faktora koji utiču na sastav i svojstva proizvoda, a sve u cilju stvaranja šire naučne osnove u poznavanju procesa formiranja ovog specifičnog mlečnog proizvoda. Eksperimentalni rad ove doktorske disertacije obuhvata proučavanje uticaja sastava i termičkog tretmana mleka, kao i uslova vazduha, na proces početne faze formiranja kajmaka u kojoj dolazi do formiranja pokožice kao osnove strukture budućeg proizvoda.

Istraživanja imaju za cilj da detaljno prouče ulogu komponenata mleka, posebno proteina i masti, na tok formiranja i svojstva pokožice. S tim u vezi, poseban osvrt je dat na ispitivanje uloge termički tretiranih proteina mleka, prevashodno termolabilnih proteina surutke u procesu formiranja kajmaka. Primenom elektroforetskih tehnika, kako u redukujućim tako i u neredukujućim uslovima, izvršena je detaljna karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre i nakon formiranja pokožica, kao i proizvedenih pokožica. Na taj način moguće je otvoriti nove puteve u upoznavanju mehanizama zastupljenih u nastajanju pokožice, kao i uloge proteina u tom procesu. Uticaj termičkog tretmana i sastava mleka na strukturu pokožice su vršena primenom tehnike skenirajuće elektronske mikroskopije. Ove savremene tehnike u velikoj meri doprinose upoznavanju osnovnih faktora koji utiču na svojstva pokožice kao osnove strukture budućeg kajmaka.

Jedan od veoma važnih parametara postupka proizvodnje kao i kvaliteta kajmaka su uslovi u kojima se sprovodi proces formiranja kajmaka. S tim u vezi, set ogleda koji je baziran na kontroli odnosno variranju parametara temperature i relativne vlažnosti vazduha, omogućava sagledavanje značaja ovih parametara, a takođe ukazuje na složenost difuzionih procesa koji se odigravaju tokom postupka formiranja kajmaka.

Razmatranje bilansa mase i energije tokom procesa formiranja pokožice omogućava stvaranje osnove za postavljanje numeričkog modela procesa formiranja kajmaka što bi značajno pomoglo u iznalaženju optimalnih parametara standardizovane proizvodnje kajmaka.

Rezultati rada koji proizilaze iz ove doktorske disertacije bi trebalo da omoguće sagledavanje suštinskih uzroka velikog variranja sastava i kvaliteta kajmaka, kao i boljem poznavanju prisutnih mehanizama. Takođe, rezultati ovog rada, kao pionirski koraci u detaljnijem izučavanju kajmaka, u velikoj meri mogu da doprinesu kreiranju savremene i potencijalne industrijske proizvodnje kajmaka, koja bi svakako doprinela dobijanju proizvoda ujednačenog i visokog kvaliteta, kao i bezbednosti sa velikim potencijalima kako za domaće tako i za inostrano tržište prehrambenih proizvoda.

4. MATERIJAL I METOD RADA

4.1 EKSPERIMENTALNI RAD

Izrada i laboratorijska ispitivanja uzoraka pokožica i kajmaka su realizovani u laboratoriji Odeljenja za Tehnologiju mleka i u laboratoriji za Termodinamiku i termotehniku Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni rad je realizovan izvođenjem procesa formiranja kajmaka u:

- *AMBIJENTALNIM USLOVIMA*, tradicionalnim postupkom proizvodnje kajmaka. Ovaj set ogleda sadrži sledeće celine:
 - Preliminarna istraživanja u cilju sagledavanja uticaja i intervala variranja, odnosno, definisanja referentnih parametara za dalja istraživanja;
 - Ispitivanje uticaja termičkog tretmana mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteinskih frakcija;
 - Ispitivanje uticaja sastava mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteinskih frakcija.
- *KONTROLISANIM USLOVIMA*, koji simuliraju tradicionalni postupak proizvodnje u potencijalno industrijskim uslovima, izvedenim u kanalu tehnološke instalacije za proizvodnju kajmaka. Ovaj set ogleda se odnosi na:
 - Ispitivanje uticaja parametara vazduha na prinos, sastav i distribuciju proteinskih frakcija pokožica kao i bilans energije i mase procesa formiranja pokožica.

4.1.1 Priprema uzoraka za ispitivanje

4.1.1.1 Priprema uzoraka pokožica i kajmaka

Sirovine i priprema mleka za izradu kajmaka

U postupku podešavanja željenog sastava mleka, prevashodno u pogledu sadržaja mlečne masti, proteina, kao i proteina surutke, korišćene su sledeće sirovine:

- Sirovo mleko („Granice”, Mladenovac), kao osnovna sirovina;
- Pasterizovana nehomogenizovana pavlaka („PIK Zemun”, Zemun), za standardizaciju sadržaja mlečne masti mleka;

- Koncentrat proteina mleka u prahu Promilk 852 A2 (Ingredia, Francuska), za standardizaciju sadržaja ukupnih proteina mleka;
- Koncentrat proteina surutke u prahu, Textrion Progel 800 (DMV International, Holandija), za korigovanje sadržaja proteina surutke mleka.

Priprema pojedinih uzoraka mleka, je obuhvatila standardizaciju u cilju postizanja odgovarajućeg sastava, a u skladu sa planom pojedinih ispitivanja.

Standardizacija sastava mleka zahteva proračun pojedinih sirovina, kao i njihovu pripremu. Proračun potrebnih količina pojedinih sirovina za određeni sastav mleka se dobija na osnovu sastava sirovina koje se koriste u postupku standardizacije. Za podešavanje željenog sastava mleka sa različitim koncentracijama ukupnih proteina i masti izračunavanje procentualnih učešća svake sirovine (sirovo mleko, Promilk 852 A2 i pavlaka) je izvedeno postavljanjem tri jednačine sa tri nepoznate kao što je prikazano u Tabeli 1. Nepoznate su označene sa x, y, z i predstavljaju udele količina navedenih sirovina.

Tabela 1. Primer izračunavanja potrebnih količina sirovina za pripremu mleka (ogled B5, količina mleka 3 kg, mleko sa 6% mlečne masti i 4,2% proteina)

Sirovina	Hemijski sastav, %		Izračunato učešće sirovine, %	Izračunata količina sirovine, g
	Mlečna mast	Proteini		
Sirovo mleko	3,65	3,35	91,20	2736,00
Pavlaka	35,40	1,86	7,51	225,30
Promilk 852 A2	1,00	78,00	1,29	38,70
Izračunavanje potrebnih količina sirovina:				
$3,65x + 35,4y + 1z = 6,00$ $3,35x + 1,86y + 78z = 4,20$ $x + y + z = 1,00$ X (sirovo mleko) = 0,9120 Y (pavlaka) = 0,0751 Z (Promilk 852 A2) = 0,0129				

Količina potrebnog koncentrata proteina surutke u prahu, izračunava se na osnovu željenog sadržaja ovih proteina, koja se dodaje u mleko i njihovog sadržaja u koncentratu Textrion Progel 800.

Nakon proračuna pojedinih sirovina potrebnih za standardizaciju željenog sastava mleka vrši se njihova priprema, koja obuhvata rekonstituciju i hidrataciju sirovina u prahu (Promilk 852 A2 i Textrion Progel 800) u sirovom mleku. Miksiranje visokoproteinskih prahova u sirovom mleku je izvršeno do njihovog potpunog rastvaranja, a potom se hidratacija obavila na temperaturi od 4-8°C u toku 90 minuta. Nakon završene hidratacije, u rekonstituisano mleko se dodaje odgovarajuća količina pavlake, čime je završen postupak standardizacije mleka za izradu kajmaka. Tako pripremljeno, odnosno, standardizovano mleko se potom termički tretiralo izabranim režimom, u zavisnosti od ogleda koji se izvodi.

Proizvodnja pokožica i kajmaka

Uzorci mleka za izradu pokožica i kajmaka tj. mleka standardizovanog sastava (koje ćemo u daljem tekstu, zvati mleko) su termički tretirani, šaržnim postupkom, uz mehanički tretman mešanjem pri čemu su dinamika zagrevanja, visine i intervali održavanja postignutih temperatura realizovani u skladu sa planom ogleda odgovarajućih ispitivanja. Količina mleka je u svim izvedenim ogledima bila konstantna i iznosila 3 kg, sa visinom sloja mleka od 7 cm. Površina mleka na granici mleko-vazduh kod svih izvedenih ogleda je bila 0,045m².

Početa temperatura formiranja kajmaka predstavlja temperaturu na kojoj prestaje termički i mehanički tretman mleka i započinje proces formiranja pokožica i/ili kajmaka izlaganjem posude sa mlekom ambijentalnim uslovima, odnosno kontrolisanim uslovima vazduha, u stanju mirovanja. Početna temperatura formiranja kajmaka je varirala u skladu sa planom ogleda u okviru pojedinih ispitivanja. Proces formiranja kajmaka je u svim ogledima realizovan tradicionalnim postupkom proizvodnje kajmaka, spontanom hlađenjem pripremljenih uzoraka u ambijentalnim uslovima, osim za uzorke u okviru ispitivanja uticaja parametara vazduha, gde je hlađenje mleka vršeno u kontrolisanim uslovima, strujanjem kondicioniranog vazduha preko površine mleka na kome se formira kajmak. U ogledima u kojima je cilj bio dobijanje uzoraka kajmaka, proces formiranja kajmaka je trajao 17 sati, dok je u ogledima kod kojih je cilj bio dobijanje pokožica, proces je prekidan posle odgovarajućeg perioda formiranja kajmaka, i u skladu sa planom ogleda pojedinih ispitivanja. Po okončanom procesu formiranja

kajmaka, uzorci kajmaka, odnosno pokožice, su sakupljeni sa površine mleka i drenirani u toku 5 minuta.

4.1.1.2 Priprema uzoraka mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica

Uzorci mleka standardizovanog sastava su termički tretirani, šaržnim postupkom, kao što je navedeno u prethodnom odeljku. Uzorci mleka pre formiranja pokožica su uzimani iz središnjeg dela termički tretiranog mleka u momentu neposredno pre započinjanja procesa formiranja kajmaka, na postignutoj početnoj temperaturi formiranja kajmaka.

Uzorci mleka preostalog nakon formiranja pokožica (u toku prvih 60 minuta procesa formiranja), su uzimani nakon izuzimanja pokožica. Pre uzimanja uzoraka, celokupna masa mleka je dobro izmešana u cilju ujednačavanja i dobijanja reprezentativnog uzorka za analizu.

Svi uzorci mleka su uzimani kivetama sa drškom u količini od oko 10 g. Nakon uzorkovanja mleka, kivete su zatvarane i odmah hladene uz intenzivno mešanje kako bi se sprečilo formiranje pokožice na površini. Ohlađeni uzorci su odmah ispitivani.

4.1.2 Sagledavanje značaja odabranih parametara procesa formiranja kajmaka

Preliminarna istraživanja imaju za cilj da sagledaju mogućnosti variranja pojedinih parametara tokom formiranja kajmaka na osnovu čega su definisane vrednosti parametara koje su u daljem toku istraživanja korišćene kao referentne. Istraživanja ovih ogleda su obuhvatila ispitivanja uticaja režima termičke obrade mleka, uslova i dinamike formiranja kajmaka, kao i sastava mleka, na prinos i sastav kajmaka i pokožica.

4.1.2.1 Režim termičkog tretmana mleka

4.1.2.1.1 Temperatura i vreme termičkog tretmana mleka

Ispitivanja uticaja režima termičkog tretmana mleka na prinos i sastav pokožica i kajmaka realizovano je u toku različitih vremena procesa formiranja kajmaka od 15, 30, 60, 180, 300 i 1020 minuta, izvođenjem sledećih ogleda:

- **Ogled I:** termički tretman pri 85°C u toku 10 minuta,
- **Ogled II:** termički tretman pri 95°C u toku 10 minuta,
- **Ogled III:** termički tretman pri 99°C u toku 20 minuta.

Kod svih oglada, početna temperatura formiranja kajmaka je bila na temperaturi termičkog tretmana.

4.1.2.1.2 Dinamika termičkog tretmana mleka

Sagledavanje dinamike termičkog tretmana mleka tj. postizanja početne temperature formiranja kajmaka se vršilo izvođenjem oglada koji su obuhvatili:

- brzu dinamiku termičkog tretmana (D1–D4), koja je podrazumevala zagrevanje mleka od 1°C u toku 1 minuta i
- sporu (D5) dinamiku termičkog tretmana, koja je podrazumevala zagrevanje mleka od 1°C u toku 2 minuta.

Mleko korišćeno u ovim ogledima je sadržalo 4% masti i 3,4% proteina, a proces formiranja kajmaka je praćen u toku prvih 60 minuta procesa. Izvedeni ogledi su bili sledeći:

- **Ogled D1:** termički tretman mleka brzom dinamikom zagrevanja do postizanja 95°C i održavanje temperature 10 minuta;
- **Ogled D2:** termički tretman mleka brzom dinamikom zagrevanja do postizanja 95°C i održavanje temperature 20 minuta;
- **Ogled D3:** termički tretman mleka brzom dinamikom zagrevanja do postizanja 85°C i održavanje temperature u toku 10 minuta;
- **Ogled D4:** termički tretman mleka brzom dinamikom zagrevanja do postizanja 85°C i održavanje temperature u toku 10 minuta, a zatim termički tretman brzim zagrevanjem do postizanja 95°C uz održavanje temperature 10 minuta;
- **Ogled D5:** termički tretman mleka sporom dinamikom zagrevanja do postizanja temperature od 95°C i održavanje temperature u trajanju 10 minuta.

Kod svih oglada, početna temperatura formiranja kajmaka je bila temperatura mleka po završenom termičkom tretmanu.

4.1.2.2 Uslovi i dinamika formiranja kajmaka

4.1.2.2.1 Početna temperatura formiranja kajmaka

Ispitivanje uticaja početne temperature formiranja kajmaka na prinos i sastav pokožica, realizovano je setom oglada koji su obuhvatili termički tretman mleka brzom dinamikom do 95°C i održavanjem na toj temperaturi u toku 10 minuta, hlađenjem uz neprekidno mešanje do željene početne temperature i formiranjem pokožica u toku prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka. Ispitivanja su izvedena upotrebom mleka sa 4% masti i 3,4% proteina (T1, T2, T3 i T4) i mleka istog sastava kome su dodati proteini surutke u količini od 0,6% (T1/SP, T2/SP, T3/SP i T4/SP). Izvedeni ogladi su označeni kao sledeći:

- **Ogled T1:** početna temperatura formiranja kajmaka 65°C;
- **Ogled T2:** početna temperatura formiranja kajmaka 77°C;
- **Ogled T3:** početna temperatura formiranja kajmaka 85°C;
- **Ogled T4:** početna temperatura formiranja kajmaka 95°C;
- **Ogled T1/SP:** početna temperatura formiranja kajmaka 65°C; 0,6% dodatih proteina surutke;
- **Ogled T2/SP:** početna temperatura formiranja kajmaka 77°C; 0,6% dodatih proteina surutke;
- **Ogled T3/SP:** početna temperatura formiranja kajmaka 85°C; 0,6% dodatih proteina surutke;
- **Ogled T4/SP:** početna temperatura formiranja kajmaka 95°C; 0,6% dodatih proteina surutke.

4.1.2.2.2 Vreme formiranja kajmaka

Ispitivanje uticaja vremena formiranja kajmaka na prinos i sastav pokožica i kajmaka dobijenih od mleka sa 4% masti i 3,4% proteina, termički tretiranog brzom dinamikom do 95°C/10 min. i početnom temperaturom formiranja kajmaka 95°C, je vršeno u toku 15; 30; 60; 180; 300 i 1020 minuta procesa formiranja kajmaka.

4.1.2.3 Sastav mleka

4.1.2.3.1 *Sadržaj mlečne masti i proteina*

Set oglada označenih od M0 do M5, kreiran je sa ciljem ispitivanja uticaja sastava mleka na prinos i sastav pokožica. Ova ispitivanja su izvedena od mleka tretiranog brzom dinamikom termičkog tretmana do postizanja 95°C i vremenom održavanja postignute temperature u toku 10 minuta, u toku prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka. Izvedeni ogledi u zavisnosti od sastava mleka su sledeći:

- **Ogled M0:** mleko sa 4% masti i 3,4% proteina (kontrolni ogled);
- **Ogled M1:** mleko sa 6% masti i 3,4% proteina;
- **Ogled M2:** mleko sa 8% masti i 3,4% proteina
- **Ogled M3:** mleko sa 4% masti i 6% proteina;
- **Ogled M4:** mleko sa 8% masti i 6% proteina;
- **Ogled M5:** mleko sa 8% masti i 3,4% proteina i 0,6% dodatih proteina surutke.

4.1.2.3.2 *Uticaj dodatih proteina surutke*

Set ispitivanja uticaja dodatih proteina surutke na prinos i sastav pokožica i kajmaka realizovan je korišćenjem mleka (4% masti i 3,4% proteina) bez i sa dodatim proteinima surutke koja su termički tretirana brzom dinamikom do postizanja 95°C i vremenom održavanja 10 minuta. Ogledi su obuhvatili vreme formiranja kajmaka od 60, 180 i 1020 minuta, a označeni su kao:

- **Ogled S0:** mleko bez dodatih proteina surutke;
- **Ogled S1:** mleko sa 0,15% dodatih proteina surutke;
- **Ogled S2:** mleko sa 0,6% dodatih proteina surutke.

4.1.3 *Proučavanje uticaja termičkog tretmana mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteiniskih frakcija u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka*

Ispitivanja uticaja režima termičkog tretmana mleka na sastav i svojstva pokožica formiranih nakon prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka, realizovana su u okviru serije oglada označenih oznakom A, koja je obuhvatila sledeće ogleda:

- **Ogled A1:** termički tretman mleka na 85°C u toku 10 minuta, početna temperatura formiranja kajmaka 85°C;
- **Ogled A2:** termički tretman mleka na 85°C u toku 10 minuta i 95°C u toku 10 minuta, početna temperatura formiranja kajmaka 95°C;
- **Ogled A3:** termički tretman mleka na 85°C u toku 10 minuta i 95°C u toku 10 minuta, hlađenje, početna temperatura formiranja kajmaka 85°C;
- **Ogled A4:** termički tretman na 95°C, bez održavanja temperature, početna temperatura formiranja kajmaka 95°C.

U svim oglecima serije A korišćeno je mleko sa 4% masti i 3,4% proteina, termički tretirano brzom dinamikom termičkog tretmana (1min./1°C) i vremenom formiranja kajmaka od prvih 60 minuta. Uzorak A2 (sa navedenim sastavom i odabranim režimom termičkog tretmana mleka) je definisan kao referentni, kako za seriju ogleada A, tako i za seriju ogleada B.

4.1.4 Proučavanje uticaja sastava mleka na prinos, sastav i mikrostrukturu pokožica i distribuciju proteiniskih frakcija u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka

Ispitivanja uticaja sastava mleka na sastav i svojstva pokožica realizovana su u okviru serije ogleada označenih oznakom B. Ogledi su izvedeni sa mlekom različitog sastava, odnosno sadržaja masti i proteina, kao i dodatih proteina surutke, a pokožice su dobijene nakon prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka. Ispitivanja u okviru ove serije obuhvatila su sledeće oglede:

- **Ogled B1,** mleko sa 6% masti i 3,4% proteina;
- **Ogled B2,** mleko sa 8% masti i 3,4% proteina;
- **Ogled B3,** mleko sa 4% masti i 4,2% proteina;
- **Ogled B4,** mleko sa 4% masti i 5,0% proteina;
- **Ogled B5,** mleko sa 6% masti i 4,2% proteina;
- **Ogled B6,** mleko sa 8% masti i 5,0% proteina;
- **Ogled B7,** mleko sa 4% masti i 3,4% proteina i 0,6% dodatih proteina surutke;
- **Ogled B8,** mleko sa 6% masti i 4,2% proteina i 0,6% dodatih proteina surutke;
- **Ogled B9,** mleko sa 8% masti i 5,0% proteina i 0,6% dodatih proteina surutke.

Režim termičke obrade mleka i vreme formiranja pokožica svih uzoraka serije B su identični sa režimom termičke obrade i vremenom formiranja pokožica koji su primenjeni kod referentnog uzorka A2 (85°C u toku 10 minuta i 95°C u toku 10 minuta, početna temperatura formiranja kajmaka je 95°C)

4.1.5 Proučavanje uticaja parametara vazduha na prinos i sastav pokožica, distribuciju proteinskih frakcija i bilans energije i mase u početnoj fazi procesa formiranja kajmaka

Ispitivanja uticaja parametara vazduha na prinos i sastav pokožica, distribuciju proteinskih frakcija i bilans energije i mase realizovana su u okviru serije ogleada označenih oznakom C. Sastav i termički tretman mleka, kao i početna temperatura formiranja kajmaka, uzoraka serije C su identični kao kod uzorka A2 (sastav mleka: 4% masti i 3,4% proteina; termički tretman mleka 85°C u toku 10 minuta i 95°C u toku 10 minuta, početna temperatura formiranja kajmaka: 95°C).

Ispitivanja uticaja parametara vazduha su vršena u kanalu tehnološke linije za proizvodnju kajmaka (Termoklima, Beograd) koja obezbeđuje kontrolisane uslove parametara ulaznog vazduha koji opstrujava posudu sa mlekom i realizovana u toku prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka. Brzina strujanja ulaznog vazduha je održavana konstantnom pri 0,7 m/s što je rezultiralo konstantnim protokom od 0,04 m³/s, a temperatura i relativna vlažnost variraju u zavisnosti od ogleada prema sledećem:

- **Ogled C1**, vazduh temperature 30°C i relativne vlažnosti 50%;
- **Ogled C2**, vazduh temperature 30°C i relativne vlažnosti 70%;
- **Ogled C3**, vazduh temperature 30°C i relativne vlažnosti 90%;
- **Ogled C4**, vazduh temperature 40°C i relativne vlažnosti 70%;
- **Ogled C5**, vazduh temperature 20°C i relativne vlažnosti 70%.

U okviru serije C, uzorak C2 ima status referentnog uzorka.

4.2 METODE RADA

Ispitivanja su obuhvatila analitička određivanja sastava uzoraka, karakterizaciju proteinskih frakcija uzoraka sirovog mleka, mleka pre formiranja pokožica, mleka preostalog nakon formiranja pokožica i pokožica, kao i određivanje mikrostrukture odabranih pokožica.

4.2.1 Analitičke metode ispitivanja

Za analiziranje sirovina za standardizaciju mleka, standardizovanog mleka, mleka pre formiranja pokožica, kao i mleka preostalog nakon formiranja pokožica, korišćene su sledeće metode:

- Određivanje sadržaja mlečne masti mleka, standardnom metodom po Gerber-u (IDF standard 105:1981); koncentrata proteina mleka u prahu i pavlake, acidobutiometrijskom, odnosno butiometrijskom metodom (Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka, *Sl. list SFRJ, br. 32/83*).
- Određivanje sadržaja ukupnog azota po metodi Kjeldahl-a pomoću Kjeltec aparata (Tecator 1002, Švedska); sadržaj proteina se izračunava množenjem sadržaja ukupnog azota sa faktorom 6,38 (IDF standard 20-1:2002).

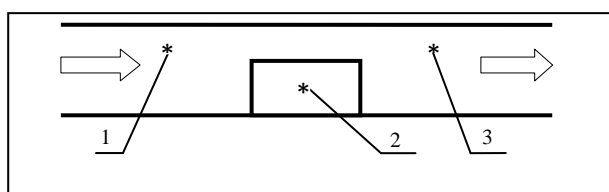
Za analiziranje uzoraka kajmaka i pokožica korišćene su sledeće metode:

- Određivanje sadržaja suve materije, (SM) standardnom metodom sušenja na $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ (IDF standard 4A:1982);
- Određivanje sadržaja mlečne masti butiometrijskom metodom po Van Guliku (*Carić i sar. 2000.*; IDF 5B:1986);
- Određivanje sadržaja ukupnog azota po metodi Kjeldahl-a pomoću Kjeltec aparata (Tecator 1002, Švedska); sadržaj proteina se izračunava množenjem sadržaja ukupnog azota sa faktorom 6,38 (IDF standard 20-1:2002);
- Određivanje sadržaja proteina u suvoj materiji, (PuSM) računskim putem;
- Određivanje sadržaja masti u suvoj materiji, (MuSM) računskim putem;
- Određivanje prinosa pokožica i kajmaka merenjem na vagi (Shimadzu, Japan);
- Određivanje apsolutnih vrednosti sadržaja komponenata sastava, izraženih u gramima, računskim putem;
- Određivanje sadržaja masti u vodenoj fazi, računskim putem, izračunava se iz apsolutnih sadržaja masti i vode na sledeći način: $\text{mast} \times 100 / (\text{mast} + \text{voda})$;
- Određivanje sadržaja proteina u vodenoj fazi, računskim putem, izračunava se iz apsolutnih sadržaja proteina i vode na sledeći način: $\text{proteini} \times 100 / (\text{proteini} + \text{voda})$;

- Određivanje distribucije masti (M/m^2) i proteina po jedinici površine (P/m^2) računskim putem, deljenjem apsolutnih sadržaja masti, odnosno, proteina sa površinom mleka koja iznosi $0,045m^2$;
- Određivanje odnosa apsolutnih količina masti i proteina (M/P), računskim putem;
- Određivanje indeksa S_{100} , računskim putem, koji predstavlja zbir sadržaja masti i proteina;
- Određivanje indeksa masti S_m , računskim putem, koji predstavlja procentualno učešće sadržaja masti u indeksu S_{100} ;
- Određivanje indeksa proteina S_p , računskim putem, koji predstavlja procentualno učešće sadržaja proteina u indeksu S_{100} ;
- Određivanje indeksa IPS računskim putem, koji predstavlja indeks povećanja, odnosno smanjenja procentualnog učešća pojedine i -te komponente u materijalu 1 ($\%i_1$) u odnosu na njeno učešće u materijalu 2 ($\%i_2$). Predstavljen je količnikom $(\%i_1) \times 100 / (\%i_2)$.

4.2.2. Proračun bilansa energije i mase

Za analizu uticaja parametara vazduha, koji opstrujava posudu sa mlekom, obavljena su ispitivanja u kontrolisanim uslovima formiranja kajmaka, u kanalu tehnološke linije za proizvodnju kajmaka koja se sastoji iz sledećih jedinica: regulator protoka ulaznog vazduha; zagrejač vazduha i ovlaživač vazduha; set mernih instrumenata za merenje temperature mleka i zidova posude sa mlekom, kao i temperature, relativne vlažnosti i brzine strujanja ulaznog i izlaznog vazduha. Tokom eksperimenata, merenja su se sprovodila na mernim pozicijama, kao što je prikazano na Slici 10.



Slika 10. Šematski prikaz posude sa mlekom u kanalu tehnološke linije za proizvodnju kajmaka sa prikazanim pozicijama mernih tačaka: 1-temperatura i relativna vlažnost ulaznog vazduha, 2-temperatura mleka u posudi, 3-temperatura i relativna vlažnost vazduha na izlazu.

Analiziranje parametara vazduha izvršeno je proračunavanjem energetskih i masenih bilanasa vlažnog vazduha na osnovu:

- Određivanja razmenjenog toplotnog fluksa, računskim putem, na bazi izvršenih merenja.
- Određivanja količine vlage uklonjene sa površine mleka, računskim putem, na bazi izvršenih merenja (Mathcad 13, Mathsoft Engineering & Education);

4.2.3 Karakterizacija proteinskih frakcija uzoraka pokožice, mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica

Karakterizacija proteinskih frakcija uzoraka pokožica, kao i mleka pre formiranja pokožica i preostalog nakon formiranja pokožica, je realizovana primenom SDS poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS PAGE) po metodi *Laemmli-ja (1970)*. SDS PAG elektroforeza je izvršena u redukujućim i neredukujućim uslovima, što je omogućilo karakterizaciju proteinskih komponenata uzoraka bez i sa formiranim kompleksima proteina mleka formiranih na bazi disulfidnih veza. Rezultati elektroforetskih ispitivanja su obrađeni denzitometrijskom analizom.

4.2.3.1 Pripema uzoraka i izvođenje SDS poliakrilamidne elektroforeze

Za SDS PAG elektroforezu u redukujućim uslovima, priprema uzoraka pokožica je obuhvatila sledeću proceduru: 1,0 g homogenizovanog uzorka pokožice je rastvoreno u 5 ml Tris-HCl pufera pH 8,00 sa dodatim 2-merkaptetanolom (Merck, Nemačka). Zagrevanje sadržaja je vršeno do ključanja, uz povremeno mešanje Vortex mešalicom do potpunog rastvaranja uzoraka pokožice. Zatim je izvršeno centrifugiranje na sobnoj temperaturi sa ciljem obezmašćivanja uzoraka. 100 µl dobijenog supernatanta odpipetirano i mešano sa proračunatom količinom 0,055 mol/dm³ Tris-HCl pufera pH 6,80; sa 4% SDS; 2% 2-merkaptetanola (Merck, Nemačka); 10% glicerola i 0,003% boje bromfenolplavo. Dodavanjem proračunate količine pufera izvršeno je podešavanje koncentracije proteina tako da su, na ovaj način, pripremljeni ekstrakti pokožica sadržavali proteine u koncentraciji 3 µg proteina/µl ekstrakta. Uzorci su nakon toga zamrznuti, a neposredno pred elektroforezu je izvršeno odmrzavanje i temperiranje uzoraka na sobnu temperaturu. Na gel je nanošeno po 5µl pripremljenog ekstrakta uzoraka pokožica.

Za SDS PAG elektroforezu u redukujućim uslovima, priprema uzoraka mleka (sirovog mleka, mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica) je obuhvatila sledeću proceduru: 5 g mleka je centrifugirano na sobnoj temperaturi na 3000 o/min u toku 15 minuta sa ciljem izdvajanja sloja masti na površini. 100 μ l dobijenog supernatanta je odpipetirano i mešano sa proračunatom količinom 0,055 mol/dm³ Tris-HCl pufera pH 6,80; sa 4% SDS; 2–merkaptetanola (Merck, Nemačka); 10% glicerola i 0,003% boje bromfenolplavo. Pripremljeni uzorci su termički tretirani na ključalom vodenom kupatilu u toku 5 minuta. Dodavanjem proračunate količine pufera izvršeno je podešavanje koncentracije proteina tako da su, na ovaj način, pripremljeni ekstrakti uzoraka mleka sadržavali proteine u koncentraciji 3 μ g proteina/ μ l ekstrakta. Uzorci su zamrznuti, a neposredno pred elektroforezu je izvršeno odmrzavanje i temperiranje uzoraka na sobnu temperaturu. Na gel je nanošeno po 5 μ l pripremljenog ekstrakta uzoraka pokožica.

Za SDS PAG elektroforezu u neredukujućim uslovima, priprema uzoraka pokožica i mleka se realizovala na napred navedeni način uz izuzimanje 2–merkaptetanola.

Elektroforetska analiza obavljena je na poliakrilamidnim gel pločama dimenzija 10 x 20 x 1 mm. Kao gel za koncentrisanje korišćen je 4% gel (3,90 % akrilamida i 0,1 % bis akrilamida) pripremljen u 0,125 mol/dm³ Tris-HCl puferu pH 6,80 i sa 0,1% SDS.

Kao gel za razdvajanje korišćen je 15% gel (14,62% akrilamida i 0,38% bis akrilamida) pripremljen u 0,375 mol/dm³ Tris-HCl puferu pH 8,85 i sa 0,1% SDS.

Neposredno pre izlivanja, izvršena je polimerizacija, tako što je u napred navedene rastvore gelova dodavano: 0,2% (v/v) Temed-a (Merck, Nemačka) i 1% (v/v) sveže pripremljenog 10% rastvora amonijum persulfata.

Kao radni pufer korišćen je Tris–glicinski pufer pH 8,30 (0,025 mol/dm³ Tris; 0,192 mol/dm³ glicin; 0,1% SDS).

Za razdvajanje je korišćena vertikalna elektroforetska jedinica tipa EV 220 (Consort, Belgija), termostatirana sa rashladnim uređajem Multitemp II i povezana sa izvorom napona MacroDrive, istog proizvođača.

Kao kontrola za identifikaciju pojedinih dominantnih proteina korišćeni su: α_s –, β – i k-kazein (Sigma, USA). Za određivanje molekulskih masa detektovanih podjedinica korišćen je standard molekulskih masa (Sigma, USA) koji se sastojao od sledećih proteina sa sledećim molekulskim masama: albumin krvnog seruma, BSA (66.000);

ovalbumin (45.000); gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (36.000); karbonska anhidraza, goveđa (29.000); tripsinogen (24.000); tripsin inhibitor (20.000); i α -laktoalbumin (14.200).

SDS poliakrilamidna gel elektroforeza izvedena je pod sledećim uslovima:

- I const.=80 mA / Umax. 300V / t=12°C,
- Vreme trajanja elektroforeze je bilo od 1 – 1,5h.
- Gelovi su bojani 0,21% rastvorom Coomassie Blue R-250, koji je istovremeno sadržao 3,9% TCA, 6% sirćetne kiseline i 17% metanola, u toku 90 minuta.
- Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru sa 18% metanola i 8% sirćetne kiseline, a za čuvanje je korišćen rastvor sa 5% sirćetne kiseline i 5% glicerina.
- Odbojeni gelovi su skenirani na skeneru Epson Expression 10000XL (Epson, Japan) i denzitometrijski analizirani softverom *ImageQuant* (ver. 5.2; 1999 Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech., Vienna, Austrija). Za karakterizaciju proteinskih frakcija, denzitometrijskom analizom koncentracija svake proteinske frakcije je izražena kao procenat od ukupno detektovanih proteinskih frakcija.

4.2.4 Ispitivanje mikrostrukture pokožica

Ispitivanje mikrostrukture uzoraka pokožice kajmaka je izvršeno tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije (eng. *scanning electron microscopy, SEM*).

4.2.4.1 Priprema uzoraka i izvođenje skenirajuće elektronske mikroskopije

Skenirajuća elektron mikroskopija je vršena kod uzoraka pokožica proizvedenih od mleka sa različitim sastavom i tretiranih različitim termičkim tretmanom označenih kao: A1, A2, B2, B4, B7 i B9.

Priprema uzoraka pokožica za ispitivanje mikrostrukture je obuhvatila uzorkovanje i fiksaciju, dehidraciju, obezmaščivanje i operacije finalne pripreme, što je opisano u daljem tekstu.

- *Uzorkovanje i fiksacija*: komad pokožice, dimenzija oko 2x2x10 mm, se isecao iz unutrašnjosti pokožice, koji se potom stavljao na fiksaciju u 2,8% rastvor glutaraldehida u fosfatnom puferu (0,05M, pH 6,0) u toku 48 h, pri temperaturi oko 5°C.
- *Dehidratacija*: dehidratacija fiksiranih uzoraka pokožice se obavljala sukcesivnim potapanjem uzoraka u seriju rastvora alkohola različitih koncentracija, sledećim redosledom: 30, 50, 70, 90 i 100% alkohola. Dehidratacija u svakoj koncentraciji alkohola se obavljala u trajanju od 60 minuta.
- *Obezmaščivanje uzoraka pokožica*: dehidratirani uzorci su se u cilju obezmaščivanja držali u hloroformu u trajanju od 60 minuta, a potom u apsolutnom alkoholu gde su čuvani do vršenja dalje analize.
- *Finalna priprema uzoraka pokožica*: pripremljeni uzorci pokožica, nakon isecanja na manje komade, su sušeni na kritičnoj tački pomoću tečnog CO₂ pomoću sušača na kritičnoj tački (Critical Point Dryer, CPD 030, BAL-TEC, Scan, Germany), čime je kompletirana priprema uzoraka. Neposredno nakon sušenja, uzorci su presvlačeni zlatom na uređaju za uparavanje (SCD 005 sputter coater, BAL-TEC).
- Skenirajuća elektron mikroskopija je vršena na aparatu JEOL JSM-6390 LV, pri 13 kV, pri magnifikacijama 2000x, 5000x, i 10000x.

4.2.5 Statistička analiza

Statističkom analizom su ispitivani uticaj termičkog tretmana i sastava mleka kao i parametara vazduha na sastav pokožica (uzorci iz ogleda serija A, B i C) i distribuciju proteinskih frakcija (uzorci iz ogleda serije C). Svaki eksperiment je realizovan u tri ponavljanja. U istraživanju je realizovan jednofaktorijalni eksperiment. Analiza varijanse (ANOVA) je vršena programom STATISTICA 6,0 (StatSoft, USA). Razlika između srednjih vrednosti je poređena na nivou 5%, a u pojedinačnim slučajevima i na nivou 1% statističke značajnosti, korišćenjem LSD testa.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1 UTICAJ ODABRANIH PARAMETARA PROCESA FORMIRANJA KAJMAKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I KAJMAKA

Eksperimentalni rad na proučavanju pojedinih faza u postupku izrade kajmaka zahteva definisanje parametara, kao i njihove intervale, koji imaju poseban značaj za proces formiranja kajmaka. U tom smislu, u ovom poglavlju su, na osnovu seta preliminarnih istraživanja odabrani parametri kao i njihov uticaj na sastav i svojstva pokožica i kajmaka, a sve sa ciljem određivanja njihovih vrednosti koje su korišćenje u daljim ispitivanjima.

5.1.1 Režim termičkog tretmana mleka

5.1.1.1 *Temperatura i vreme termičkog tretmana mleka*

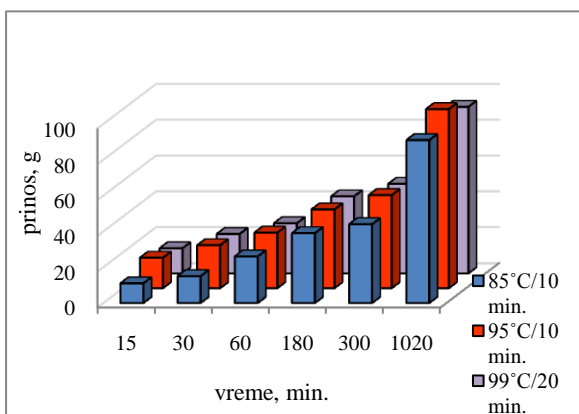
Prinosi pokožica, odnosno kajmaka, dobijenih u toku različitog vremena formiranja kajmaka, u zavisnosti od režima termičkog tretmana mleka prikazani su na Grafikonu 1, dok su vrednosti sadržaja masti i proteina prikazani u Tabeli 2, a njihove apsolutne vrednosti (apsolutni sadržaji) na Grafikonu 2.

Na osnovu rezultata prikazanih na Grafikonu 1 uočava se da je tretman mleka 95°C/10 min., dao najveći prinos pri svim posmatranim periodima formiranja kajmaka. Najmanji prinos je dobijen od mleka termički tretiranog na najnižoj posmatranoj temperaturi od 85°C, dok je nešto veći zabeležen pri temperaturi od 99°C. Analizom podataka iz Tabele 2 uočava se da bez obzira na primenjeni termički tretman sadržaj masti raste sa vremenom, dok sadržaj proteina opada.

Apsolutne vrednosti sadržaja masti i proteina (Grafikon 2) permanento rastu sa vremenom, što je rezultiralo u rastu prinosa u svim ogledima. Ukoliko zbirni sadržaj masti i proteina predstavimo indeksom S_{100} , a parcijalna učešća masti, odnosno proteina predstavimo odgovarajućim indeksima: S_m (masti) i S_p (proteina), uočava se da S_m pokazuje trend porasta, a S_p trend opadanja (Grafikon 3). Ukoliko razmatramo pojedinačne vrednosti, može se uočiti blago kolebanje vrednosti učešća masti i proteina

u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka, dok se u narednom periodu naznačeni trend jasno uočava.

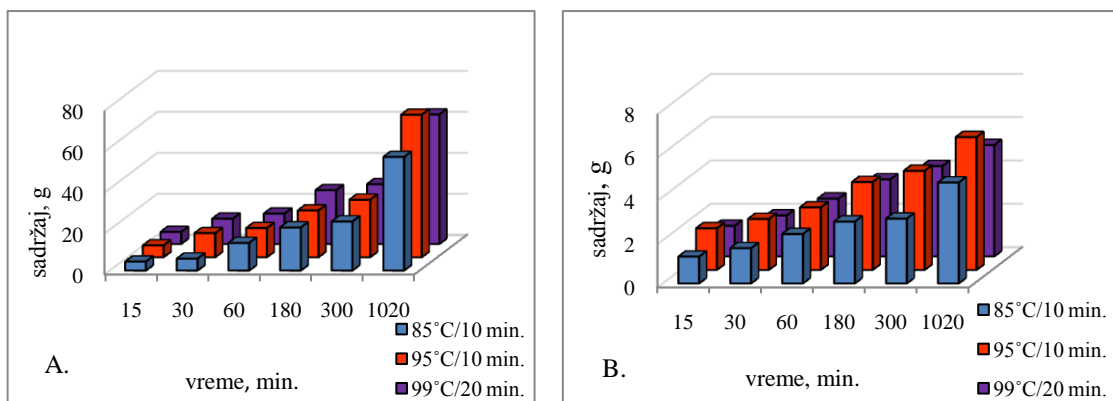
U celini posmatrano, uočava se da posmatrani termički tretmani pokazuju najmanje razlike u sastavu kajmaka na kraju, odnosno posle 1020 minuta, a da se najveće razlike uočavaju u samom početku procesa formiranja kajmaka. Najveće razlike sastava se odvijaju u periodu sa najvećim učešćem proteina (početni period formiranja kajmaka), dok se ujednačavanje sastava javlja u uslovima dominacije masti. Ovakva analiza ukazuje da su razlike značajnije ukoliko je veće učešće proteina u pokožici, odnosno kajmaku, što sugerise da proteini imaju veoma važnu ulogu u procesu formiranja kajmaka.



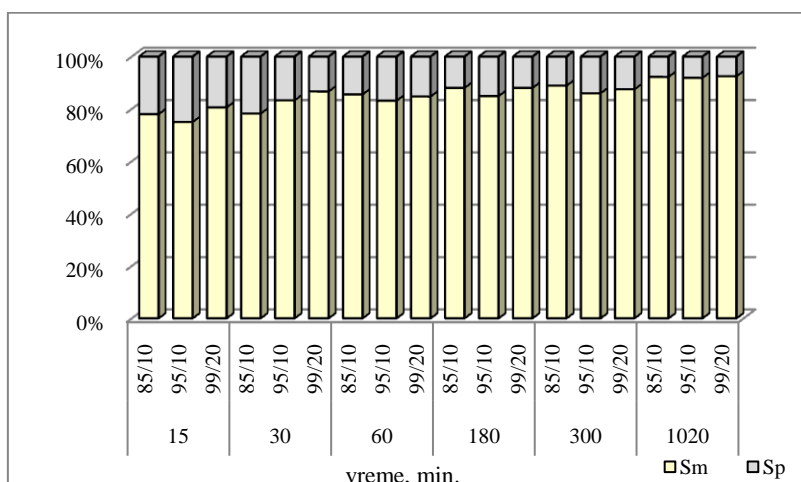
Grafikon 1. Dinamika prinosa tokom formiranja kajmaka uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Tabela 2. Sadržaji masti i proteina uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Vreme, min.	Ogled I		Ogled II		Ogled III	
	85°C/10 min.		95°C/10 min.		99°C/20 min.	
	Mast, %	Proteini, %	Mast, %	Proteini, %	Mast, %	Proteini, %
15	40,00	11,25	34,00	11,32	42,00	10,11
30	39,00	10,86	49,00	9,82	56,00	8,61
60	52,00	8,78	46,00	9,32	53,00	9,54
180	54,00	7,34	52,00	9,24	61,00	8,29
300	54,50	6,81	54,00	8,81	58,50	8,35
1020	61,00	5,13	59,50	5,25	68,00	5,54



Grafikon 2. Apsolutni sadržaji masti (A) i proteina (B) uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka



Grafikon 3. Indeksi masti i proteina uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

5.1.1.2. *Dinamika termičkog tretmana mleka*

Prinosi pokožica u zavisnosti od dinamike termičkog tretmana mleka, tj. postizanja početne temperature formiranja kajmaka, prikazani su na Grafikonu 4, dok su vrednosti sadržaja masti i proteina prikazani na Grafikonu 5, a njihovi udeli u suvoj materiji na Grafikonu 6. Apsolutni sadržaji komponenata pokožice prikazani su na Grafikonu 7.

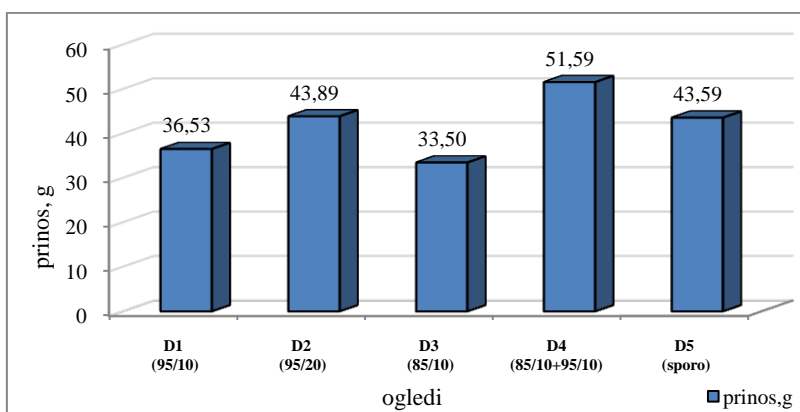
Analiza podataka prikazanih na Grafikonu 4 ukazuje da je tretman mleka D4, kod kojeg je primenjen kaskadni način zagrevanja dao najveći prinos, dok su tretmani D2 i D5 i pored snažnog termičkog tretmana rezultirali nešto manjim, ali međusobno

ujednačenim prinosima. Tretman D1 kojeg odlikuje manje intenzivan tretman (kraće vreme održavanja na 95°C) je imao dodatni pad prinosa, dok je tretman D3 koji se odlikovao najslabijim režimom termičke obrade rezultirao najmanjim prinosom. Najveći prinos, ustanovljen kod uzorka sa kaskadnim načinom zagrevanja (D4), ukazuje da relaksacija u porastu temperature mleka proizvodi suštinski efekat na tok formiranja kajmaka. Ovo dalje upućuje na pretpostavku da kaskadni porast temperature mleka sa pauzom na 85°C verovatno omogućava specifičan tok odvijanja reakcija na proteinima mleka, koje u krajnjem efektu bi mogle stimulatивно uticati na prinos pokožice.

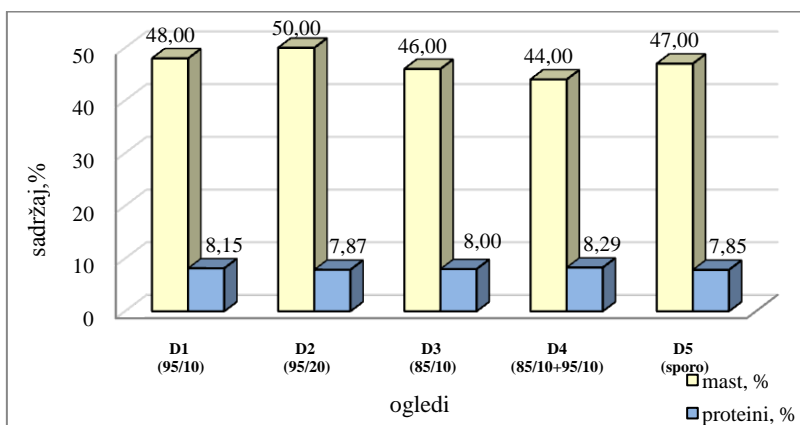
Kada se posmatraju sadržaji masti i proteina, kao i sadržaji MuSM i PuSM (Grafikoni 5 i 6) uočava se da sadržaj proteina varira u užim granicama (od 7,85% do 8,29%) u odnosu na sadržaj masti (od 44% do 50%).

Kada se posmatraju apsolutne vrednosti sadržaja masti i proteina (Grafikon 7), uočava se da su najmanje vrednosti oba parametra prisutne kod ogleda D3 koji ima i najniži prinos, dok ogled D4, kojeg odlikuje najveći prinos ima i najveće apsolutne sadržaje masti i proteina.

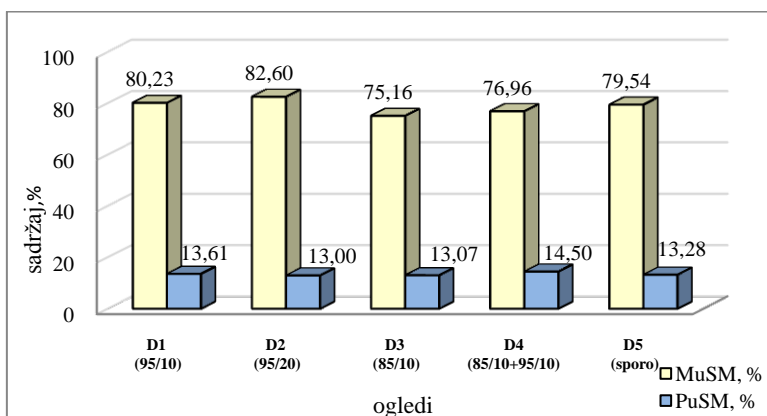
Kada posmatramo indekse masti i proteina, S_m , odnosno S_p , uočava se da posmatrane vrednosti variraju u uskim intervalima (Grafikon 8). Ogled D3 odlikuju vrednosti bliske sredini intervala. Ogled D2, sa najvišom temperaturom i najdužim temperiranjem na postignutoj temperaturi, rezultira dobijanjem uzoraka sa najvećim učešćem masti i najmanje proteina, dok ogled D4, sa kaskadnim zagrevanjem, doprinosi najvećem učešću proteina i najmanje masti u ispitivanim uzorcima pokožica.



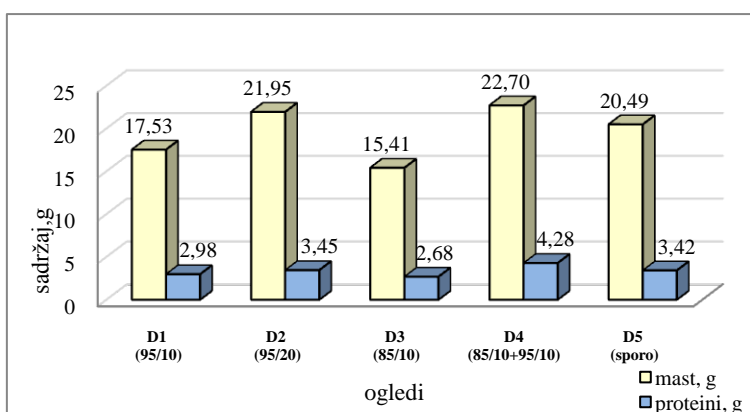
Grafikon 4. Prinosi uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti dinamike termičkog tretmana mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su date vrednosti visine temperature (°C) i vremena održavanja (min.), a kod ogleda D5 dinamika zagrevanja)



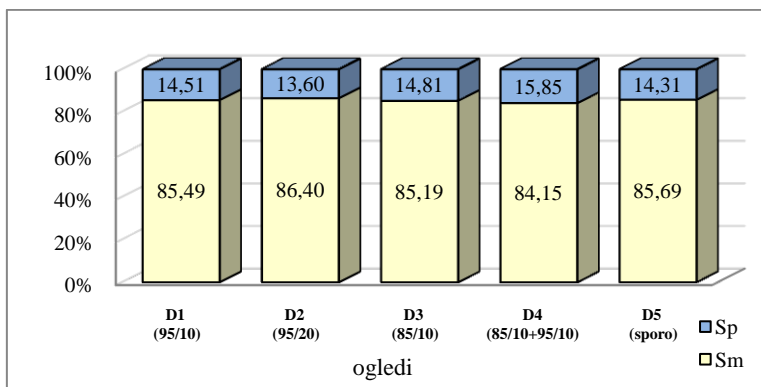
Grafikon 5. Sadržaji masti i proteina u uzorcima pokožica dobijenih toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od dinamike termičkog tretmana mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su date vrednosti visine temperature (°C) i vremena održavanja (min.), a kod ogleda D5 dinamika zagrevanja)



Grafikon 6. Sadržaji masti i proteina u suvoj materiji uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od dinamike termičkog tretmana mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su date vrednosti visine temperature (°C) i vremena održavanja (min.), a kod ogleda D5 dinamika zagrevanja)



Grafikon 7. Apsolutni sadržaji masti i proteina uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od dinamike termičkog tretmana mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su date vrednosti visine temperature (°C) i vremena održavanja (min.), a kod ogleda D5 dinamika zagrevanja)



Grafikon 8. Indeksi masti i proteina uzoraka pokožica, dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od dinamike termičkog tretmana mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su date vrednosti visine temperature(°C) i vremena održavanja (min.), a kod ogleda D5 dinamika zagrevanja)

Na osnovu ovih ogleda može se izvesti zaključak da se sa povećanjem visine temperature promoviše povećanje sadržaja proteina, dok se produžavanjem vremena temperiranja na visokoj temperaturi promoviše inkorporiranje masti u pokožicu.

5.1.2 Uslovi i dinamika formiranja kajmaka

5.1.2.1 Početna temperatura formiranja kajmaka

Prinosi pokožica u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka prikazani su u Tabeli 3, dok su vrednosti sadržaja masti i proteina prikazani u Tabeli 4, a njihove apsolutne vrednosti u Tabeli 6.

Analizom rezultata ustanovili smo da se prinos pokožica smanjuje sa sniženjem početne temperature formiranja kajmaka (Tabela 3). S tim u vezi, sniženjem temperature sa 95°C na 85°C ostvaruje se veoma veliki pad prinosa (oko 45%), dok se njenim daljim sniženjem uočava znatno umereniji pad prinosa. Snižavanjem temperature se, takođe, indukuje i smanjenje sadržaja proteina, kao i povećanje sadržaja masti i suve materije pokožice. Smanjenje učešća proteina u pokožici je očekivano, jer se u uslovima niže temperature mleka smanjuje intenzitet isparavanja vode, a time se umanjuje težnja denaturisanih proteina ka precipitaciji i inkorporiranju u pokožicu. Snižavanjem početne temperature formiranja kajmaka dolazi do povećanja sadržaja MuSM, odnosno do smanjenja sadržaja PuSM (Tabela 4). Posmatranjem podataka o koncentraciji masti, odnosno proteina u vodenoj fazi pokožice, može se zaključiti da je na višim temperaturama jači uticaj inkorporiranja proteina nego masti (Tabela 6).

Pomenute razlike su vrlo izražene na višim temperaturama mleka (85 i 95°C) dok su na nižim temperaturama skoro neprimetne (Tabela 6).

Kada se posmatraju apsolutne vrednosti sadržaja pojedinih komponenta pokožice, može se videti da sa snižavanjem temperature mleka, zahvaljujući opadanju prinosa, opadaju vrednosti svih komponenta sastava (Tabela 5). Isti trend imaju i vrednosti distribucije apsolutnih količina masti i proteina po jedinici površine (M/m^2 , P/m^2), pri čemu je indeks pada veći kod apsolutnih količina proteina (Tabela 6). Shodno tome, snižavanjem temperature, odnos apsolutnih količina masti i proteina, (M/P), prikazanih u Tabeli 6, raste. Ovi rezultati mogu ukazivati da u procesu formiranja kajmaka početna temperatura formiranja kajmaka ima jak uticaj na dinamiku isparavanja vode. Viša temperatura stimuliše gubitak vode, dok niža temperatura smanjuje intenzitet gubitka vode.

Posebno je interesantno posmatrati uticaj početne temperature formiranja kajmaka od uzoraka mleka kojima su pre termičke obrade dodati proteini surutke u količini od 0,60% (Grafikon 9). Povećano prisustvo proteina surutke pri visokim početnim temperaturama formiranja kajmaka intenzivira uključivanje proteina, što za rezultat ima dodatno povećanje prinosa, kao i povećano učešće proteina i vode, a smanjenje učešća masti u pokožici. Poređenjem uzoraka sa i bez dodatih proteina surutke se uočava da se na svim ispitivanim temperaturama javlja isti opisani trend porasta sadržaja učešća proteina i vode, odnosno smanjenje učešća masti (Tabela 5, Grafikon 9). Međutim, poređenjem uzoraka sa i bez dodatih proteina surutke (Tabela 5) se vidi da se dodatkom proteina surutke povećavaju apsolutne vrednosti i masti i proteina ali sa različitim dinamikom. Kod svih uzoraka sa dodatim proteinima surutke, u odnosu na one bez dodatih proteina surutke, zabeležene su veće apsolutne vrednosti i masti i proteina pokožice.

Tabela 3. Prinosi uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. formiranja kajmaka u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka

Ogled	Temperatura na početku procesa formiranja kajmaka, °C	Prinos pokožice, g
T1	65	20,59
T2	77	26,84
T3	85	30,47
T4	95	55,70

Tabela 4. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. formiranja kajmaka u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka

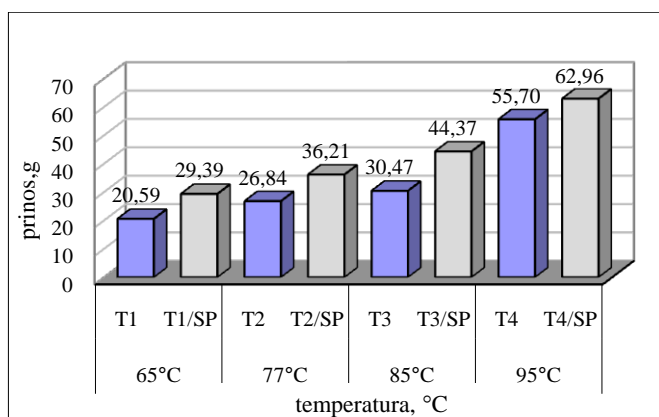
Ogled	Sadržaj, %				
	Mast	Proteini	SM	MuSM	PuSM
T1	56,50	7,43	65,15	86,72	11,40
T2	54,00	7,54	62,59	86,28	12,05
T3	53,00	8,22	61,66	85,96	13,33
T4	48,00	9,51	59,89	80,15	15,88

Tabela 5. Apsolutni sadržaji masti i proteina uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. formiranja kajmaka u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka

Ogled		Apsolutni sadržaj, g			
		Mast	Proteini	SM	Voda
Mleko bez dodatih proteina surutke	T1	11,63	1,53	13,41	7,18
	T2	14,49	2,02	16,80	10,04
	T3	16,15	2,50	18,79	11,68
	T4	26,74	5,30	33,36	22,34
Mleko sa dodatim proteinima surutke	T1/SP	15,87	2,27	18,38	11,01
	T2/SP	19,92	2,98	23,39	12,82
	T3/SP	24,18	3,69	28,01	16,36
	T4/SP	27,07	6,35	34,75	28,21

Tabela 6. Odabrani parametri uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. formiranja kajmaka u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka

Ogled	Mast/proteini, (M/P)	Mast/površina, (M/m ²) g/m ²	Proteini/površina, (P/m ²) g/m ²	Mast u vodenoj fazi, %	Proteini u vodenoj fazi, %
T1	7,60	258,44	34,00	61,83	17,57
T2	7,17	322,00	44,89	59,07	16,75
T3	6,46	358,89	55,56	58,02	17,63
T4	5,05	594,22	117,77	54,48	19,17



Grafikon 9. Uporedni prikaz prinosa uzoraka pokožica bez i sa dodatim proteinima surutke dobijenih u toku prvih 60 min. formiranja kajmaka u zavisnosti od početne temperature formiranja kajmaka (ogledi označeni sa T1, T2, T3 i T4 su bez dodatih proteina surutke, a ogledi označeni T1/SP, T2/SP, T3/SP i T4/SP su sa dodatim proteinima surutke u količini 0,60%).

5.1.2.2 Vreme formiranja kajmaka

Prinosi, sadržaji masti i proteina pokožica u zavisnosti od vremena formiranja kajmaka prikazani su u Tabeli 7, dok su apsolutne vrednosti komponenata sastava prikazane u Tabeli 8.

Tabela 7. Prinosi i sastav uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih u tokom procesa formiranja kajmaka

Vreme, min.	Prinos, g	Mast, %	Proteini, %
15	17,06±1,75	33,33±2,08	10,93±1,07
30	25,49±3,79	42,33±5,97	10,30±8,84
60	29,47±2,83	44,33±1,76	9,51±0,66
180	42,09±3,00	49,33±3,06	8,97±0,82
300	47,19±8,19	54,17±6,25	8,32±0,44
1020	89,96±24,25	55,67±3,40	6,26±0,95

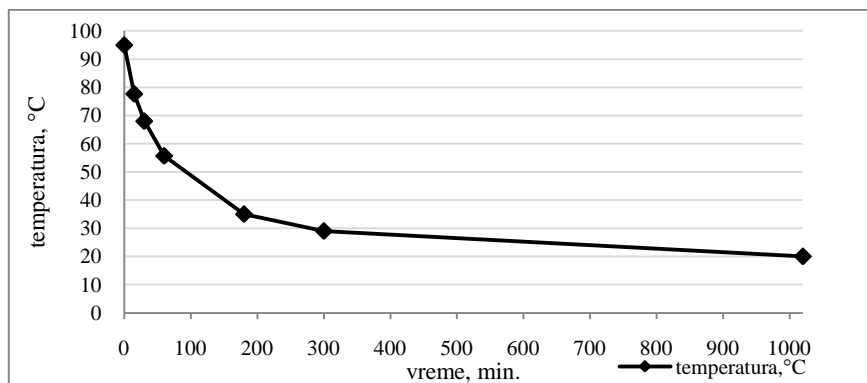
* vrednosti su prikazane kao prosečna vrednost ± standardna devijacija

Tabela 8. Apsolutne količine i odabrani parametri uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka

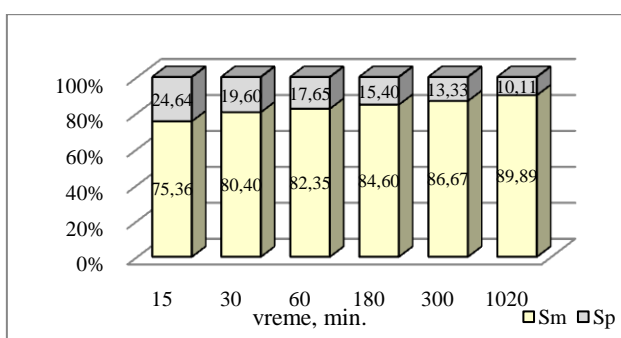
Vreme, min.	Mast, g	Proteini, g	M/m ²	P/m ²	M/P
15	5,69±0,92	1,86±0,06	126,44±20,38	41,33±1,39	3,06±0,48
30	10,79±1,97	2,63±0,28	239,78±43,82	58,44±6,31	4,10±0,83
60	13,06±1,31	2,80±0,11	290,22±29,14	62,22±2,34	4,66±0,30
180	20,76±1,78	3,78±0,59	461,33±39,54	84,00±13,18	5,49±0,69
300	25,56±2,65	3,93±0,82	568,00±58,80	87,33±18,32	6,50±0,92
1020	50,08±15,37	5,63±0,65	1112,89±341,57	125,11±14,35	8,89±1,67

* vrednosti su prikazane kao prosečna vrednost ± standardna devijacija

Upoređujući parametre u različitim fazama formiranja kajmaka može se zaključiti da sa povećanjem vremena formiranja kajmaka, raste prinos kao i sadržaj masti, dok učešće proteina opada (Tabela 7). Međutim, apsolutne vrednosti i masti i proteina, kao i njihova distribucija na površini, rastu sa vremenom formiranja kajmaka, ali sa različitim dinamikom (Tabela 8). Takođe, odmicanjem vremena formiranja kajmaka raste i odnos M/P. Ovakvi rezultati su i očekivani obzirom da sa vremenom formiranja kajmaka, spontano opada temperatura mleka (Grafikon 10), pri čemu dolazi do više izraženog isplivavanja masti na površinu i sve jačeg njenog inkorporiranja u već formiranu pokožicu (*Puđa i sar. 2005b, 2006*). Indeksi masti i proteina sa vremenom se menjaju, tako što indeks masti prati povećanje a indeks proteina smanjenje (Grafikon 11).



Grafikon 10. Dinamika promene temperature mleka tokom procesa formiranja kajmaka

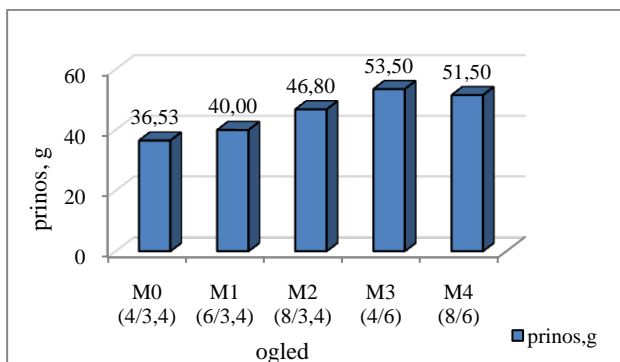


Grafikon 11. Indeksi masti i proteina uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka

5.1.3 Sastav mleka

5.1.3.1 Sadržaj mlečne masti i proteina

Prinosi pokožica u zavisnosti od sadržaja masti i proteina mleka prikazani su na Grafikonu 12, dok su vrednosti sadržaja masti i proteina prikazani u Tabeli 9, a njihove apsolutne vrednosti u Tabeli 10. Distribucija masti i proteina po površini pokožice, kao i međusobni odnos masti i proteina, M/P, prikazani su u Tabeli 11.



Grafikon 12. Prinosi uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od sastava mleka (u zagradama, pored oznake ogleda su dati sadržaji masti i proteina u mleku za izradu pokožica)

Tabela 9. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	Sadržaj, %				
	Mast	Proteini	SM	MuSM	PuSM
M0	48,00	8,15	59,83	80,23	13,62
M1	58,00	7,27	66,48	87,24	10,94
M2	61,00	6,32	69,94	87,22	9,04
M3	53,50	8,02	62,82	85,16	12,77
M4	64,00	6,51	71,72	89,24	9,08

Tabela 10. Apsolutne vrednosti komponenata sastava uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	Apsolutni sadržaj, g			
	Mast	Proteini	SM	Voda
M0	17,53	2,98	21,86	14,67
M1	23,20	2,91	26,59	13,41
M2	28,55	2,96	32,73	14,07
M3	28,62	4,29	33,61	19,89
M4	32,96	3,35	36,94	14,56

Tabela 11. Odabrani parametri uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	M/P	M/m ²	P/m ²
M0	5,89	389,55	66,22
M1	7,98	515,56	64,67
M2	9,65	634,44	65,78
M3	6,67	636,00	95,33
M4	9,83	732,44	74,44

Posmatranjem podataka iz Grafikona 12 i Tabela 9, 10 i 11 možemo uočiti da sa povećanjem sadržaja masti sa 4% na 6%, odnosno 8%, pri nepromenjenom sadržaju proteina (3,4%), dolazi do ujednačenog porasta prinosa. Takođe, ukupna masa proteina

pokožice se održava na nivou oko 3 g, dok odnosi M/P imaju vrednosti 5,89; 7,98 i 9,65. Povećanje sadržaja proteina sa 3,4% na 6%, pri nepromenjenom sadržaju masti (4%), dovodi do značajnog porasta prinosa sa 36,5g na 53,5g, ukupna masa proteina pokožice se povećava sa oko 3g na oko 4,3 g, dok odnos M/P ima vrednosti 5,89 i 6,67

Povećanje sadržaja masti na 8% i proteina na 6% rezultira prinosom od 51,5g, masom proteina pokožice od 3,35 g dok odnos M/P ima vrednost 9,83.

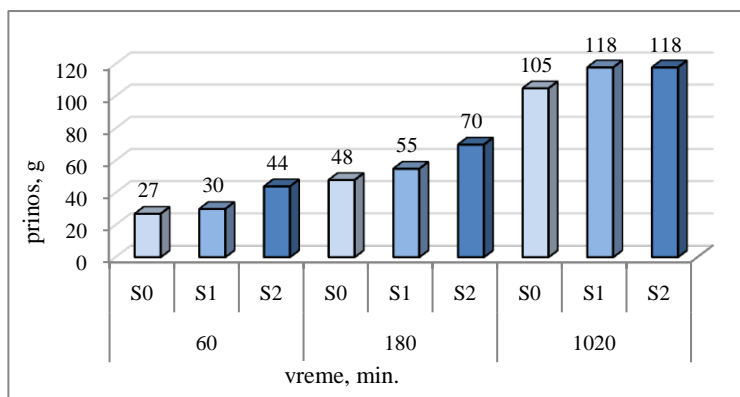
Iz analiziranih podataka se uočava da sastav mleka ima snažan uticaj, kako na prinos, tako i na sadržaj proteina i masti pokožice. Analizirani ogledi su obuhvatili samo prvi sat nastajanja kajmaka, te je u ovoj fazi od posebnog značaja evidentirati mehanizme koji mogu rezultirati povećanjem ukupnih količina proteina koji se inkorporiraju u pokožicu.

Prema rezultatima (Tabela 9) može se pretpostaviti da je nivo proteina od 3,4% suviše nizak da bi mogao da utiče na dominantan uticaj povećanih količina masti u mleku na kome se formira pokožica. Ova pretpostavka je ilustrovana poređenjem ogleda M0 i M2 (mast se menja sa 4,0 na 8,0% pri sadržaju proteina od 3,4%) sa ogledima M3 i M4 (ista promena masti pri višem nivou proteina od 6,0%). Naime, povećanjem sadržaja masti sa 4,0 na 8,0% (pri nižem nivou proteina od 3,4%) dolazi do povećanja sadržaja masti pokožice za oko 27%, dok isto povećanje sadržaja masti pri nivou proteina od 6,0% proizvodi povećanje sadržaja masti pokožice za oko 19%. Razlike među pomenutim ogledima su još izraženije kada se posmatraju apsolutne vrednosti sadržaja masti i proteina (Tabela 10).

Povećanje sadržaja proteina u mleku sa 3,4 na 6,0% pri sadržaju masti od 4,0% dovodi do povećanja sadržaja masti pokožice od oko 11% i blagog smanjenja sadržaja proteina, ali i veoma izraženog povećanja apsolutnog sadržaja proteina od oko 44%. Međutim, isto povećanje sadržaja proteina mleka pri sadržaju masti od 8,0% dovodi do povećanja sadržaja masti pokožice za samo oko 5% i blagog povećanja sadržaja proteina i manje izraženog povećanja apsolutnog sadržaja proteina, oko 13%. Kada se posmatraju apsolutne vrednosti masti, na osnovu, datih ogleda, može se zaključiti da se u oba slučaja vrednosti sadržaja masti povećavaju (Tabela 10).

5.1.3.2. Sadržaj dodatih proteina surutke

Prinosi pokožica u zavisnosti od sadržaja proteina surutke prikazani su na Grafikonu 13, dok su vrednosti sadržaja masti i proteina prikazani u Tabeli 12 a njihove apsolutne vrednosti u Tabeli 13.



Grafikon 13. Prinosi uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled S0; sa 0,15% dodatih proteina surutke, ogled S1; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled S2).

Tabela 12. Sastav uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke

Vreme, min.	Ogled	Sadržaj, %				
		Mast	Proteini	SM	MuSM	PuSM
60	S0	44,00	10,17	60,29	72,98	16,87
	S1	51,00	10,08	67,03	76,09	15,04
	S2	50,00	9,74	62,96	79,42	15,47
180	S0	56,12	8,05	67,79	82,79	11,87
	S1	55,50	8,42	67,35	82,41	12,50
	S2	56,50	8,00	68,82	82,10	11,62
1020	S0	58,00	5,76	66,75	86,89	8,63
	S1	55,50	6,10	66,16	83,89	9,22
	S2	56,50	6,59	68,30	82,72	9,65

Tabela 13. Apsolutni sadržaji komponenata sastava uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke

Vreme, min.	Ogled	Apsolutni sadržaj, g			
		Mast	Proteini	SM	Voda
60	S0	11,88	2,75	16,28	10,72
	S1	15,30	3,02	20,11	9,89
	S2	22,00	4,29	27,70	16,30
180	S0	26,94	3,86	32,54	15,46
	S1	30,53	4,63	37,04	17,96
	S2	39,55	5,60	48,17	21,83
1020	S0	60,90	6,05	70,09	34,91
	S1	65,49	7,20	78,07	39,93
	S2	66,67	7,78	80,59	37,41

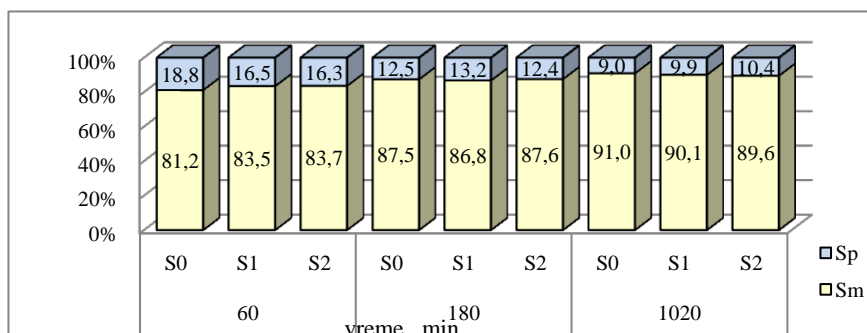
Tabela 14. Odabrani parametri uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke

Vreme, min.	Ogled	M/P	M/m ²	P/m ²
60	S0	4,33	264,00	61,11
	S1	5,07	340,00	67,11
	S2	5,13	488,89	95,33
180	S0	6,98	598,67	85,78
	S1	6,59	678,44	102,89
	S2	7,06	878,89	124,44
1020	S0	10,07	1.353,33	134,44
	S1	9,10	1.455,33	160,00
	S2	8,57	1.481,56	172,89

Dodatak proteina surutke u mleko u izvesnoj meri menja tok procesa formiranja kajmaka, pri čemu su promene u većoj meri izražene u početnoj fazi procesa. Dodatak 0,15% proteina surutke, što predstavlja približni ekvivalent četvtine celokupnih proteina surutke u mleku, dovodi do blagog povećanja prinosa, koji se održava tokom celokupnog posmatranog perioda. Međutim, dodavanje proteina surutke u mleko u količini od 0,60%, što je približni ekvivalent dupliranja njihove koncentracije, dovodi do veoma izraženog povećanja prinosa u toku prvog sata, koji se vremenom smanjuje, tako da se prinos posle 17 h izjednačava sa uzorkom S1 (0,15% dodatih proteina surutke).

Kada posmatramo indekse masti i proteina u pokožicama (Grafikon 14), odnosno kajmaku, možemo zapaziti da indeksi S_m i S_p u uzorcima pokožica, tj. kajmaka sa dodatim proteinima surutke ostaju skoro nepromenjeni kada se porede sa uzorcima bez

dotatih proteina surutke. Pomenuti odnosi ostaju stabilni čak i u uslovima sa duplo većim količinama dodatih proteina surutke (Grafikon 14).



Grafikon 14. Indeksi masti i proteina uzoraka pokožica i kajmaka dobijenih tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled S0; sa 0,15% dodatih proteina surutke, ogled S1; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled S2).

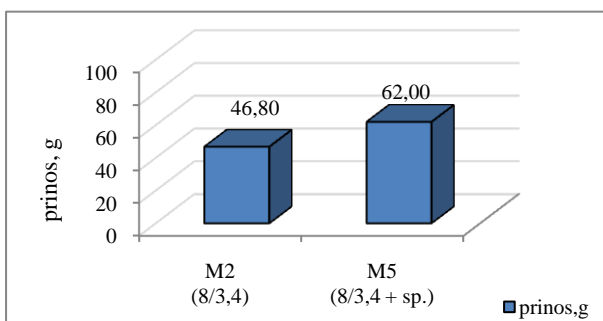
Prema literaturnim podacima, dodatak β -LG obranom mleku pre termičkog tretmana, ne dovodi do povećanja njegovog procentualnog učešća u formiranim koagratima sa kazeinom, već samo utiče na brzinu formiranja kompleksa sa k-CN (*Corredig i Dalgleish, 1996a, Vasbinder i sar. 2003*). Naši rezultati potkrepljuju stanovište da proteini surutke na izvestan način imaju ulogu katalizatora procesa formiranja kajmaka, pri čemu ne dolazi do narušavanja međusobnog odnosa komponenata pokožice. Dodatna potvrda stabilnosti međusobnih odnosa pojedinih komponenata pokožice dobija se uvidom u sastav pokožice dobijene od mleka sa približno dupliranom količinom proteina surutke i masti (ogled M5, Tabela 16). Podaci prikazani u Grafikonu 15 ukazuju da se sa značajnim povećanjem sadržaja proteina surutke i masti značajno povećava prinos pokožice, ali da struktura suve materije pokožice ostaje prilično konstantna. Ovo upućuje na zaključak da povećanje sadržaja pojedinih komponenata sastava mleka utiče na kvantitet formirane pokožice, ali ne i na suštinu mehanizma stvaranja kajmaka.

Tabela 15. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled M2; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled M5).

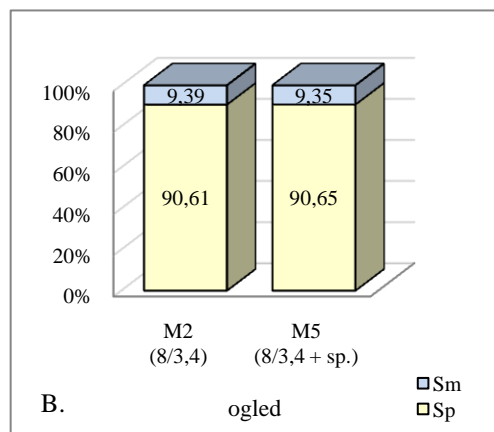
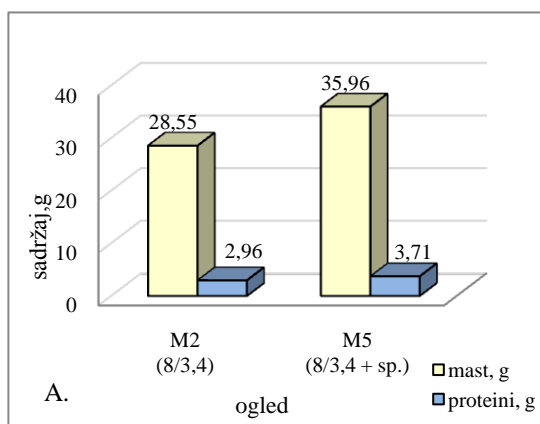
Ogled	Sadržaj, %					Apsolutni sadržaj, g			
	Mast	Proteini	SM	MuSM	PuSM	Mast	Proteini	SM	Voda
M2	61,00	6,32	69,94	87,22	9,04	28,55	2,96	32,73	14,07
M5	58,00	5,98	66,90	86,70	8,93	35,96	3,71	41,48	20,52

Tabela 16. Odabrani parametri uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled M2; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled M5).

Ogled	M/P	M/m ²	P/m ²
M2	9,65	634,44	65,78
M5	9,69	799,11	82,44



Grafikon 15. Prinosi uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled M2; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled M5. U zagradama, pored oznake ogleda su dati sadržaji masti i proteina u mleku za izradu pokožica, kao i dodatni proteini surutke označeni kao sp.)



Grafikon 16. Sadržaj masti i proteina (A) i indeksi masti i proteina (B) uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od količine dodatih proteina surutke (bez dodatih proteina surutke, ogled M2; sa 0,60% dodatih proteina surutke, ogled M5. U zagradama, pored oznake ogleda su dati sadržaji masti i proteina u mleku za izradu pokožica, kao i dodatni proteini surutke označeni kao sp.)

5.1.4 Analiza rezultata preliminarnih istraživanja

Na osnovu rezultata prethodno analiziranih oglada želeli smo da ustanovimo moguće intervale variranja parametara, njihove uticaje na proces formiranja i svojstva pokožice odnosno kajmaka, kao i da definišemo njihove referentne vrednosti za dalja istraživanja.

Na osnovu rezultata oglada uticaja režima termičkog tretmana uočava se da je tretman mleka 95°C/10 minuta, dao najveći prinos pri svim posmatranim periodima formiranja kajmaka. Pomenuti tretman klasifikovan je kao najbolji. Najmanji prinos je dobijen korišćenjem mleka termički tretiranog na najnižoj posmatranoj temperaturi od 85°C, dok je nešto veći zabeležen kod temperature od 99°C.

Analizom podataka uticaja vremena formiranja kajmaka i različitih termičkih tretmana, smo ustanovili da se najdinamičnije promene dešavaju u prvih šezdeset minuta procesa formiranja kajmaka. Iz tog razloga smo se opredelili da se u narednim ispitivanjima proces formiranja kajmaka prekida posle 60 minuta, odnosno kada je na mleku formirana pokožica. U tom smislu u daljem radu se neće koristiti termin kajmak, već će se u analizi koristiti termin pokožica. Obzirom na činjenicu da je pokožica preteča kajmaka, termin formiranje kajmaka predstavlja sinonim kako za proces formiranja kajmaka, tako i za proces formiranja pokožica.

Upoređujući parametre u različitim fazama formiranja kajmaka može se zaključiti da sa povećanjem vremena formiranja kajmaka raste i prinos, kao i procentualni sadržaj masti, dok procentualno učešće proteina opada. Međutim, apsolutne vrednosti i masti i proteina rastu sa vremenom formiranja kajmaka, ali sa različitom dinamikom.

Analizom uticaja početne temperature formiranja kajmaka, ustanovili smo da se prinos pokožica smanjuje sa snižavanjem početne temperature formiranja kajmaka, pri čemu se sniženjem temperature sa 95°C na 85°C ostvaruje veoma veliki pad prinosa (oko 45%), dok se daljim sniženjem temperature uočava znatno umereniji pad prinosa. Snižavanjem temperature se indukuje i smanjenje procentualnog učešća proteina, kao i povećanje sadržaja masti i suve materije pokožice. Smanjenje učešća proteina u pokožici je očekivano, jer se u uslovima niže temperature mleka smanjuje intenzitet isparavanja vode, a time se umanjuje težnja denaturisanih proteina ka precipitaciji.

Na osnovu rezultata iz seta oglada, ispitivanja dinamike zagrevanja, kao referentni tretman u daljim ispitivanjima izabrali smo ogled D4 sa dinamikom brzog zagrevanja

koji ima zadržavanje u toku 10 minuta na dve temperature od 85 i 95°C. Ogled D4 je rezultirao najvećim prinosom kao i najvećim apsolutnim sadržajem masti i proteina. Takođe, ovaj ogled u velikoj meri simulira postupak proizvodnje kajmaka u domaćoj radinosti, što dodatno opredeljuje ovaj režim (D4) kao referentni u daljim ispitivanjima.

Iz analiziranih podataka se uočava da sastav mleka ima snažan uticaj kako na prinos, tako i na sadržaj proteina i masti pokožice. Kao referentni uzorak za dalje oglede izabrali smo mleko sa 4,0% masti i 3,4% proteina.

Dodatak proteina surutke u mleko u izvesnoj meri menja tok formiranja kajmaka, pri čemu su promene u većoj meri izražene u početnoj fazi procesa. Dodatak 0,15% proteina surutke, dovodi do blagog povećanja prinosa, koji se održava tokom celokupnog posmatranog perioda. Međutim, dodavanje proteina surutke u mleko za formiranje kajmaka u količini od 0,60%, što je približni ekvivalent dupliranja njihove koncentracije u mleku, dovodi do veoma izraženog povećanja prinosa u toku prvog sata formiranja kajmaka, koji se vremenom smanjuje tako da se posle 17 h izjednačava sa uzorkom kajmaka koji je dobijen kada je u mleko za formiranje kajmaka dodato 0,15% proteina surutke. Radi jasnijeg sagledavanja uticaja proteina surutke, u daljim eksperimentima smo definisali dodavanje proteina surutke u količini od 0,60%.

5.2 UTICAJ TERMIČKOG TRETMANA MLEKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA

5.2.1 Uticaj termičkog tretmana mleka na prinos i sastav pokožica

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od termičkog tretmana mleka, prikazani su u Tabeli 17, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 18.

Tabela 17. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Ogled	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A1	50,83±2,02 a	8,34±0,40 ac	60,81±2,21 a	83,59±0,28 a	13,74±1,11 a
A2	58,50±5,41 a	7,97±0,07 a	70,50±4,62 a	83,43±3,13 a	11,42±0,84 b
A3	63,33±2,47 a	6,72±0,29 b	71,51±2,26 a	88,57±1,99 a	9,40±0,50 c
A4	56,00±7,86 a	8,71±0,17 c	67,62±5,94 a	82,56±4,37 a	12,95±1,34 ab

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Tabela 18. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Ogled	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A1	38,33±4,93 a	19,44±1,97	3,20±0,57 a	23,26±2,39	15,07±2,66 a	6,11±0,50 a
A2	32,28±2,01 a	18,95±2,88	2,57±0,14 bc	22,67±2,82	9,61±0,87 b	7,34±0,73 a
A3	29,50±3,50 a	18,73±2,80	1,98±0,26 b	21,15±3,17	8,35±0,33 b	9,44±0,69 b
A4	34,00±1,00 a	19,06±2,88	2,96±0,06 ac	23,00±2,27	11,00±1,94 b	6,45±1,02 a

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu uporedjivati (F -količnik <1);

Kada posmatramo uticaj termičkog tretmana mleka na procentualni i apsolutni sadržaj proteina u pokožici (Tabele 17 i 18) možemo zaključiti da postoje statistički značajne razlike između pojedinih uzoraka, što upućuje na zaključak da termički tretman ima značajan uticaj na inkorporiranje proteina u sastav pokožice. Kada posmatramo procentualna učešća proteina (Prilog, Tabela 1), uzorci A2, A3 i A4 međusobno se statistički značajno razlikuju, (tj. vrlo značajno $p<0,01$), dok uzorak A1 pokazuje sličnost sa uzorcima A2 i A4 (nema statistički značajne razlike, $p>0,05$). Mehanizam inkorporiranja proteina u pokožicu nije do sada detaljno proučavan. Međutim, na osnovu dosadašnjih saznanja iz ove oblasti može se pretpostaviti da je mehanizam transformacije proteina iz rastvorljivog stanja prisutnog u mleku u stanje

gela rezultat porasta koncentracije termički tretiranih proteina do granice njihove rastvorljivosti, odnosno do momenta gelifikacije. S tim u vezi, smatra se da je porast koncentracije proteina rezultat jednovremenog delovanja: a) površinskih pojava, usled kojih se masti i proteini koncentrišu na granici faza i time istiskuju vodu iz zone graničnog sloja i b) isparavanja vode zbog visoke temperature mleka. Najmanji procentualni sadržaj proteina u pokožici imao je uzorak A3, a najveći uzorak A4, dok su uzorci A1 i A2 imali relativno bliske vrednosti, pozicionirane između uzoraka A3 i A4.

Analiza uticaja termičkog tretmana na uključivanje proteina u pokožicu mogla bi da se posmatra iz dva ugla i to: a) da početna temperatura formiranja kajmaka ima snažan uticaj na intenzitet isparavanja, pa tako viša temperatura stimuliše isparavanje, dok niža temperatura smanjuje intenzitet isparavanja vode iz mleka i b) kroz uticaj temperature mleka na povećanje površinske aktivnosti proteina i njihove sposobnosti da i u manjoj koncentraciji ostvaruju efekat smanjenja površinskog napona. Može se pretpostaviti da je, u slučaju manje efektivnog delovanja proteina na smanjenje površinskog napona, potrebno više proteina da bi se postigao isti efekat u sniženju površinskog napona kakav bi se postigla niža koncentracija proteina sa izraženijom površinskom aktivnošću.

Imajući u vidu napred iznete teze, interesantno je sagledati međusobne odnose pojedinih termičkih tretmana. Uzorci A1 i A3 su proizvedeni pri jednakim početnim temperaturama formiranja kajmaka (85°C), ali se odlikuju značajno različitim sadržajem proteina (8,34%, odnosno 6,72%), što na prvi pogled ukazuje na nekonzistentnost stava da početna temperatura formiranja kajmaka ima snažan uticaj na sadržaj proteina u pokožici. Međutim, naznačeni uzorci su bili izloženi različitim termičkim tretmanima. Uzorak A1 je imao blaži termički tretman (tretiran do 85°C), dok je uzorak A3 imao snažniji termički tretman (tretiran do 95°C), pa je pre procesa formiranja kajmaka ohlađen do 85°C. Iz toga proizilazi da je kod uzorka A3 termički tretman imao snažan uticaj na svojstva proteina, što je verovatno rezultovalo obimnijom denaturacijom proteina surutke i njihovim naknadnim uključivanjem u sastav pokožice. Iz literature je poznato da globularni proteini snažno povećavaju površinsku aktivnost u slučaju odmotavanja globularne strukture prilikom termičkog tretmana (*Hunt i Dalglish, 1994a,b, Farrell, 2002, Walstra, 2003, Tran Le i sar., 2011*). Drugim rečima, proteini uzorka A3 su termičkim tretmanom stekli veću površinsku aktivnost, što je u punoj saglasnosti sa prethodno iznetom tezom da proteini

koji se odlikuju jačom površinskom aktivnošću i u manjoj koncentraciji ostvaruju efekat sniženja površinskog napona. Sličan zaključak se može izvesti analiziranjem uzoraka A2 i A4. Naime, uzorak A2 je imao snažniji termički tretman u poređenju sa uzorkom A4. Na osnovu literaturnih podataka (*Hindle i Wheelock, 1970, Maćej, 1989*) možemo pretpostaviti da je termički tretman zastupljen kod uzorka oglada A4 proizveo donekle manji obim interakcija između kazeina i proteina surutke, u odnosu na termički tretman zastupljen kod uzorka oglada A2. Kako je kod ovih oglada, početna temperatura formiranja kajmaka identična, to se jasno uočava da slabiji termički tretman (kod oglada A4) indukuje porast proteina u pokožici.

Uticao početne temperature formiranja kajmaka se veoma jasno sagledava pri poređenju uzoraka A2 i A3, gde su uzorci pokožice dobijeni od mleka izloženih identičnim termičkim tretmanima, ali različitim početnim temperaturama formiranja kajmaka. Iz rezultata se jasno vidi da se sa snižavanjem početne temperature formiranja kajmaka značajno snižava koncentracija proteina u pokožici, što se može direktno dovesti u vezu sa intenzitetom isparavanja vode.

Napred izneta razmišljanja i pretpostavke o uključivanju proteina u pokožicu su u saglasnosti sa podacima apsolutnih sadržaja proteina, kao i njihovih distribucija na graničnoj površini mleko-vazduh. Najmanji sadržaj proteina ima uzorak pokožice A4, a najveći uzorak A1 za koga se pretpostavlja da je imao najslabije izraženu aktivnost proteina. Strukturno uređeniji agregati proteina mleka, kao što su agregati kazeinskih micela i OMP su nepodesni za formiranje emulzija zbog svoje male fleksibilnosti (*Euston i Hirts, 2000*). Prema *Dalgleish (1996)* struktura micela se održava stabilnom putem kalcijumovih mostova i kao takva ne može se brzo razmotati, npr. na međupovršini ulje-voda. Takođe, obzirom na veličinu molekula, odnosno micela, prisutan je manji broj efektivnih proteinskih čestica za adsorpciju u odnosu na situaciju kada su prisutne disocirane kazeinske frakcije. Pored navedenog, kada su agregati u pitanju, hidrofobne grupe su često smeštene u unutrašnjosti, u jezgru, dok je spoljašnja površina manje hidrofobna, što takođe redukuje tendenciju ovakvih proteina za adsorpcijom na međupovršini ulje-voda (*Euston i Hirst, 2000*).

Kada je u pitanju sadržaj masti u pokožici, termički tretman mleka nema statistički značajan uticaj (Tabela 17). Uočene razlike između uzoraka sa različitim početnim temperaturama formiranja kajmaka A2 i A3, nisu statistički značajne, mada se uzorak sa

nižom temperaturom formiranja kajmaka odlikuje većim sadržajem masti. Za razliku od uticaja na proteine, početna temperatura formiranja kajmaka nije pokazala značajan uticaj na sadržaj masti pokožice (Prilog, Tabela 1). Ovakav rezultat se može smatrati očekivanim, jer isparavanje vode, koje je visoko zavisno od temperature formiranja kajmaka ne utiče na agregiranje masti, pošto masna faza, za razliku od proteinske, ne podleže strukturnim promenama uslovljenim isparavanjem vode.

Različiti karakter uticaja početne temperature formiranja kajmaka na proteinsku, odnosno na masnu fazu, ukazuje da ona može predstavljati veoma snažan mehanizam u upravljanju procesom formiranja kajmaka i u regulaciji učešća pojedinih komponenata u sastavu kajmaka.

U razmatranju međusobnog uticaja sadržaja proteina i masti u pokožici posebno se uočava uzorak A3, koji se odlikuje najmanjim sadržajem proteina, a istovremeno najvećim sadržajem masti. Analizom ovog uzorka se mogu izvesti dva zaključka: 1) da su proteini u uzorku A3 imali izuzetno veliki kapacitet površinske aktivnosti; i 2) da je snižavanje temperature produžilo vremenski period u kojem proteinska faza gelifikuje, putem usporavanja isparavanja vode, što je omogućilo da mast u većem obimu ispliva na površinu i utisne se u strukturu pokožice. Iz ovoga se takođe može zaključiti da se u uslovima bržeg stvaranja pokožice povećava udeo proteina u pokožici, jer za akumuliranje masti vremenska dimenzija ima važnu ulogu. Takođe se veoma jasno može zaključiti da se suštinska kontrola procesa formiranja kajmaka, posebno u početnom periodu, ostvaruje kontrolom dešavanja u okviru proteinske faze. Analizom rezultata proteina i masti u vodenoj fazi pokožice, možemo zaključiti da nivo primenjenog termičkog tretmana mleka ne utiče statistički značajno na vrednosti pomenutih veličina (Prilog, Tabela 1).

Analizom podataka za sadržaj SM (Prilog, Tabela 1) može se uočiti da, statistički posmatrano, termički tretman mleka nije pokazao značajan uticaj na sadržaj SM pokožice. Osnovni razlog ovakve situacije je velika varijabilnost sadržaja suve materije unutar pojedinih uzoraka. Naime, uzorci mleka su standardizovani i u tom smislu bi se moglo očekivati da se dobiju homogeni rezultati. Međutim, uočena varijabilnost ukazuje da na sadržaj suve materije pokožice veoma utiču i drugi, nekontrolisani faktori. U tom smislu smatramo da uticaj ambijentalnih uslova ima poseban značaj. Napominjemo da su pri izvođenju oglada ambijentalni uslovi bili ujednačeni u meri koliko se to moglo

postići uticajem sobne temperature i standardizovanom udaljenošću uzoraka mleka u toku procesa formiranja kajmaka od otvorenog prozora. Međutim, činjenica da su spoljašnji uslovi varirali u pogledu temperature, relativne vlažnosti i brzine strujanja vazduha jasno ukazuje da se u ovim ogledima spoljašnji uslovi ne mogu smatrati konstantnim. Ovakva situacija je u potpunoj saglasnosti sa izraženim varijacijama u sastavu kajmaka proizvedenog kod različitih individualnih proizvođača (*Puđa i sar. 2005a*), kao i kod određenih proizvođača u različitim periodima godine. Imajući u vidu ovako veliki uticaj spoljašnje sredine, jedan od važnijih zaključaka ovog dela rada bi mogao da bude upravo zahtev da se u proučavanju formiranja kajmaka značajna pažnja posveti kontroli ambijentalnih uslova u kojima se proces formiranja kajmaka dešava.

Podaci o vrlo značajnom variranju sadržaja proteina, i sadržaja masti (koje nije statistički značajno), trebalo bi da rezultiraju i u relativno značajnom variranju sadržaja suve materije. Međutim, podaci o sadržaju suve materije ukazuju da se ne uočavaju značajne razlike, iako komponente koje čine suhu materiju variraju. Ova na prvi pogled izražena nelogičnost može se objasniti poznatom činjenicom da povećani sadržaj proteina promovise povećano prisustvo vode, dok povećani sadržaj masti promovise smanjivanje sadržaja vode (*Puđa, 2009*). Drugim rečima, variranje u komponentama suve materije ne mora ultimativno da utiče na variranje ukupne suve materije, jer međusobno suprotstavljeni uticaji pojedinih komponenata na afinitet vezivanja vode mogu dovesti do izraženijih variranja u nivou SM čime se, zahvaljujući povećanom variranju unutar istog uzorka, praktično anuliraju razlike između uzoraka, tako da njihove razlike izlaze iz okvira statističke značajnosti. Ovu pretpostavku potkrepljuju i podaci vezani za apsolutni sadržaj masti i SM. Naime, statističkom analizom varijanse ustanovljeno je da je varijabilnost unutar grupa veća od variranja između grupa (F-količnik je manji od jedinice). Na osnovu ovog podatka jedino se može zaključiti da se promene sadržaja SM ne mogu koristiti za statističku analizu, jer suprotstavljeni trendovi promena sadržaja masti i proteina svojom komplementarnošću proizvode izuzetno visok stepen variranja unutar serija, u poređenju sa variranjem između serija.

U celini posmatrano, razmatranjem standardnih devijacija, odnosno koeficijenata varijacije (Prilog, Tabela 12), unutar ponavljanja istog ogleada, uočava se znatno manji stepen variranja sadržaja proteina u poređenju sa variranjem sadržaja suve materije i mlečne masti. S tim u vezi, možemo izneti mišljenje da su nestandardni ambijentalni

uslovi u kojima je izvođen ogled imali znatno manji uticaj na sadržaj proteina u pokožici u odnosu na njihov uticaj na sadržaj SM i masti.

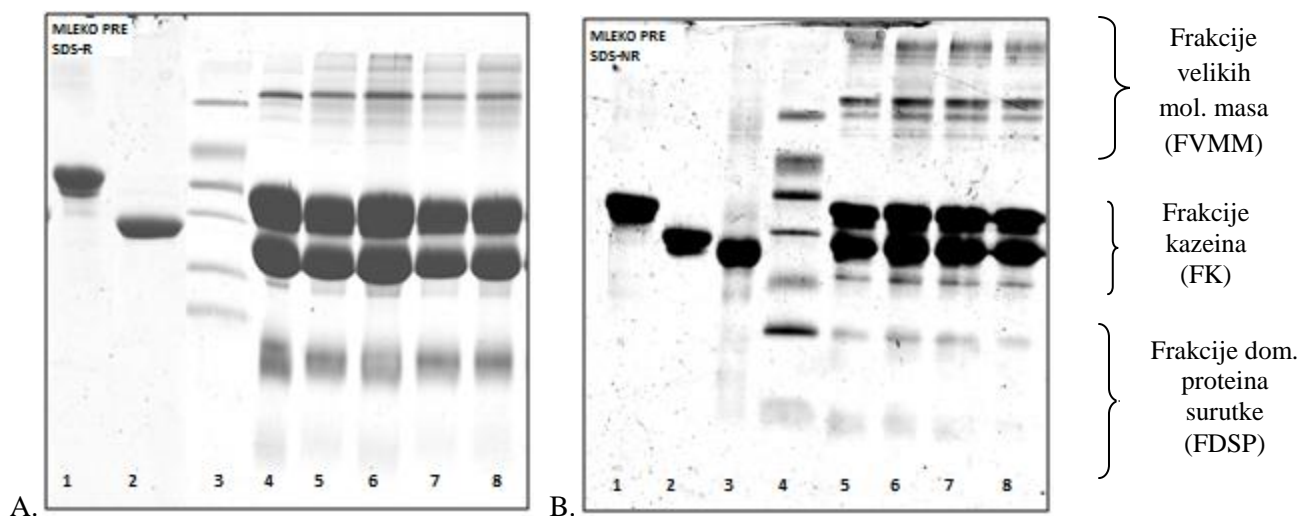
Analiziranjem podataka prinosa pokožica vidi se da među uzorcima ne postoji statistički značajna razlika, iako se srednje vrednosti na prvi pogled međusobno razlikuju. Takvi rezultati se, takođe, mogu objasniti značajnim uticajem nekontrolisanih faktora, na prvom mestu ambijentalnih uslova, što je analizirano i pri razmatranju sadržaja SM uzoraka pokožica. Međutim, važno je istaći da podaci o prinosu nemaju posebnog značaja, jer je tokom ovih ogleda ispitivana samo prva faza procesa formiranja kajmaka, koja nema odlučujući uticaj na prinos kajmaka u celosti. Podaci o prinosu, budući da oslikavaju masene udele, mogu biti korisno upotrebljeni u funkciji sagledavanja količina pojedinih komponenata u sastavu pokožice, na prvom mestu proteina, koji se inkorporiraju tokom formiranja pokožice. Ovaj stav potenciramo iz razloga što je upravo prva faza formiranja kajmaka karakteristična po obimnijem inkorporiranju proteina u sastav kajmaka u celini (*Puđa i sar., 2005a,b, 2006*).

5.2.2 Uticaj termičkog tretmana mleka na distribuciju proteinskih frakcija

Uticaj termičkog tretmana na distribuciju proteinskih frakcija je sagledan karakterizacijom proteinskih frakcija mleka pre formiranja pokožica, formiranih pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica. Karakterizacija proteinskih frakcija vršena je elektroforetskim razdvajanjem pomoću SDS PAGE u redukujućim i u neredukujućim uslovima. Suštinska razlika primene redukujućih, odnosno neredukujućih uslova pri elektroforetskom razdvajanju proteina, je u tome što se korišćenjem 2-merkaptoetanol (2-ME) obezbeđuje raskidanje disulfidnih veza proteina, koje su eventualno prisutne unutar izvorne proteinske strukture, kao i one nastale kao posledica primenjenog termičkog tretmana mleka. Drugim rečima, korišćenjem redukujućih uslova pri elektroforetskom razdvajanju proteini surutke se izdvajaju kao zasebna frakcija, nezavisno od toga da li su prethodno, zbog termičkog tretmana, bili asosovani u veće komplekse. Nasuprot tome, PAGE u neredukujućim uslovima omogućava da obim izdvajanja proteina surutke u posebnu frakciju odgovara stanju slobodnih proteina surutke.

5.2.2.1 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre formiranja pokožica

Elektroforegrami uzoraka mleka pre formiranja pokožica, analizirani SDS PAG elektroforezom, prikazani su na Slici 11. Karakterizacija proteinskih frakcija, denzitometrijskom analizom je izražena kao procenat svake proteinske frakcije od ukupno detektovanih proteinskih frakcija. Kod analiziranih uzoraka mleka pre formiranja pokožica ustanovljen je veliki broj frakcija, pri čemu kod pojedinih uzoraka uočava različit broj diferenciranih frakcija proteina (od 7 do 11). S tim u vezi, radi jednostavnijeg i preglednijeg prikazivanja, mi smo se pri analizi rezultata, identifikovane proteinske frakcije koncentrisali, odnosno, grupisali u sledeće kategorije: (i) grupa frakcija velikih molekulskih masa (koja obuhvata proteinske frakcije koje imaju manju pokretljivost od kazeina i na gelu se nalaze iznad kazeinskih frakcija, označene su u daljem tekstu FVMM); (ii) grupa frakcija kazeina (koja obuhvata α - , β - i κ -CN, označene kao FK) i (iii) grupa frakcija dominirajućih proteina surutke (koja obuhvata α -LA i β -LG, označene kao FDSP).



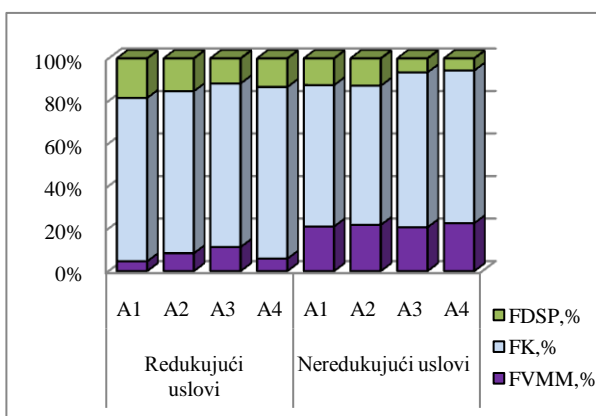
Slika 11. SDS elektroforegrami uzoraka mleka pre formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka : A-redukujući i B-neredujući uslovi.

Slika A: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4. Sirovo mleko; 5-8. Uzorci mleka pre formiranja pokožica ogleđa A1, A2, A3 i A4. Slika B: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard κ -CN; 4. Standard mol. mase 14.200-66.000; 5-8. Uzorci mleka pre formiranja pokožica ogleđa A1, A2, A3 i A4.

Distribucija grupa proteinskih frakcija u uzorcima mleka pre formiranja pokožica u zavisnosti od termičkog tretmana mleka prikazani su na Grafikonu 17, distribucija

frakcija kazeina u ukupnim kazeinima u Tabeli 19, dok su njihovi međusobni odnosi, kao i odnosi između pojedinih FDSP prikazani u Tabeli 20.

Posmatrajući rezultate denzitometrijske analize uzoraka mleka pre formiranja pokožica PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima (Grafikon 17) uočava se značajno smanjenje učešća dominirajućih proteina surutke u neredukujućim uslovima, što je i očekivano s obzirom da usled termičkog tretmana ovi proteini surutke denaturišu i u velikoj meri agregiraju, odnosno, reaguju sa k-CN, sa proteinima MFGM, kao i međusobno, gradeći pri tome komplekse sa širokim rasponom molekulskih masa (*Dalgleish i sar., 1997a, Ye i sar., 2004a, Chevalier i sar., 2009, 2010*). Pomenuti agregati velikih molekulskih masa se formiraju u interakcijama k-CN, β -LG, α -LA i drugih proteina mleka koji sadrže slobodne sulfhidrilne grupe. *Patel i sar. (2006)* su ustanovili da disulfidno vezani agregati uključuju skoro sve proteine surutke, k-CN i veliko učešće α 2-CN. Istovremeno, analiza pri neredukujućim uslovima ukazuje da se deo dominirajućih proteina surutke izdvojio u formi zasebnih frakcija, ukazujući da nisu svi proteini surutke uključeni u komplekse koji se formiraju uz učešće disulfidnih veza.



Grafikon 17. Distribucija grupa proteinskih frakcija uzoraka mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka
Podaci su dobijeni denzitometrijskom analizom elektroforegrama SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima, kao procenat od ukupno detektovanih proteinskih frakcija.

Prema *Dalgleish i sar. (1997b)* ne postoji stehiometrijski odnos reakcije između najzastupljenijih proteina surutke u mleku, β -LG i α -LA. Priroda njihovog agregiranja kao i dobijenih produkata veoma zavise od masenog odnosa između β -LG i α -LA, pri čemu intermedijarni produkti agregiranja (molekulske mase oko 100.000) nastaju samo u slučaju kada su maseni odnosi ovih proteina približni. U slučaju preovlađujućeg

učesća β -LG, pri termičkim tretmanima iznad 75°C, dolazi do brzog procesa kopolimerizacije, pri čemu mogu biti formirani produkti velikih molekulskih masa do 300.000, bez prisustva intermedijarnih stanja (*Matsudomi i sar., 1992, Dalgleish i sar., 1997,b*). BSA pripada grupi proteina surutke i u mleku se nalazi u značajno manjoj količini u odnosu na α -LA i β -LG, čineći samo 0,7-1,3% ukupnih proteina obranog mleka (*Maćej i sar., 2007*). *Chevalier i sar. (2009)* su elektroforetskom analizom mleka u neredukujućim uslovima ustanovili da, prilikom termičkog tretmana na 90°C, dolazi do obimne denaturacije BSA i formiranja termički indukovanih kompleksa velikih molekulskih masa na bazi disulfidnih veza, što rezultuje potpunim nestankom frakcije slobodnog BSA. Takođe, autori su identifikovali da BSA u toku termičkog tretmana asosuje sa kazeinskom micelom, tako da se nakon tretmana nalazi u micelarnoj frakciji. Takođe, poznato je da u toku termičkog tretmana na 80°C BSA reaguje i sa α -LA, putem disulfidnih veza, gradeći komplekse velikih molekulskih masa (*Matsudomi i sar., 1993*).

Denzitometrijska analiza, uzoraka mleka pre formiranja pokožica, PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima je pokazala da velike frakcije u neredukujućim uslovima sadrže frakcije kompleksa daleko većih molekulskih masa, koje se kreću u rasponu od oko 60.000 do 160.000, kod uzoraka ogleđa A1-A3, odnosno oko 180.000 kod uzorka ogleđa A4. U redukujućim uslovima molekulske mase velikih frakcija se kreću u rasponu od oko 48.000 do oko 80.000 (ogledi A1,A2 i A3), odnosno 98.000 kod ogleđa A4.

U neredukujućim uslovima, pri samom ulazu u gel za koncentrisanje, mogu se uočiti blago izražene frakcije najvećih molekulskih masa. Prema *Patel i sar. (2006)*, ove frakcije obuhvataju komplekse k-CN, α s2-CN i proteina surutke i veoma su izražene pri termičkim tretmanima iznad 100°C. Takođe, među frakcijama velikih molekulskih masa, može se uočiti različit intenzitet pojedinih frakcija koje, prema literaturnim podacima, mogu odgovarati homopolimerima k-CN, dimeru α s2-CN, molekulu IgG (*Oh i Richardson, 1991, Patel i sar.,2006, Chevalier i sar., 2009, Chevalier i Kelly, 2010*). U redukujućim uslovima, prema literaturnim podacima, među velikim frakcijama se nalazi manji deo proteina surutke i to: laktoferin (76.000-93.000), BSA (oko 66.300) i teški lanci imunoglobulina IgG, molekulske mase oko 52.000-69.000 (*Havea i sar., 1998, Bash i sar., 1985, Patel i sar., 2006*).

Posmatranjem proporcije velikih frakcija u disocijativnim uslovima, odnosno u prisustvu 2-ME, teoretski posmatrano, moglo bi se očekivati veoma mali udeo ovih frakcija. Međutim, u našim rezultatima identifikovali smo da FVMM čine od 4,5-11% u odnosu na ukupno identifikovane frakcije. Jedno od potencijalnih objašnjenja je mogućnost postojanja skrivenih disulfidnih veza. *Chevalier i sar. (2009)* su ispitivanjem mleka termički tretiranog na 90°C, kombinacijom 2DE u redukujućim uslovima, identifikovali kompleks koji sadrži i α 1-CN. Pomenuti heteropolimer predstavlja mešavinu α 1-/ α 2-/k-CN. Ispitivanjem sirovog mleka istom tehnikom identifikovano je prisustvo ovog kompleksa. Autori su pretpostavili da je ovaj kompleks delimično, zbog skrivenih disulfidnih veza koje ostaju zaštićene, rezistentan na delovanje redukujućih agenasa kao što je 2-ME. Takođe, ustanovljeno je da visoke temperature mogu da pojačaju neenzimatske reakcije između proteina i laktoze i formiranje kovalentno vezanih kompleksa rezistentnih na redukujuće agense. Proteini bez prisutnih ostataka cisteina (β -CN i α 1-CN) mogu biti uključeni u ove komplekse (*Chevalier i sar., 2001*).

Kada posmatramo distribuciju pojedinih frakcija kazeina u ukupnim kazeinima, kao i njihove međusobne odnose (Tabele 19 i 20), možemo zaključiti da njihovi sadržaji variraju u vrlo uskim granicama i imaju stabilne međusobne odnose, kako u redukujućim, tako i u neredukujućim uslovima.

Tabela 19. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima sirovog mleka i uzoraka mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	Zastupljenost u ukupnim kazeinima	
		α s-CN, %	(β +k)-CN, %
Redukujući uslovi	Sirovo mleko	50,28	49,72
	A1	50,67	49,33
	A2	53,16	46,84
	A3	51,99	48,01
	A4	53,76	46,24
Neredukujući uslovi	Sirovo mleko	50,57	49,43
	A1	48,97	51,02
	A2	48,67	51,33
	A3	47,65	52,36
	A4	44,39	55,61

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Posmatrano u redukujućim uslovima, odnos između kazeinskih frakcija α s/(β +k) mleka pre formiranja pokožica, vrlo malo varira i ima vrednost približno kao u sirovom mleka (Tabela 20). U neredukujućim uslovima pomenuti odnos između kazeinskih

frakcija zadržava stabilne vrednosti, ali u nešto nižim apsolutnim iznosima. Stabilni odnosi između kazeinskih frakcija u redukujućim i neredukujućim uslovima mogu biti objašnjeni stabilnošću kazeinske micelle, odnosno, veoma slabo izraženom disocijacijom kazeinskih frakcija iz micelle pri normalnom pH mleka. Takođe, važno je istaći da elektroforetska analiza ne predstavlja dovoljno precizan alat za kvantifikaciju pomenutih odnosa. Naime, poznato je da pod uticajem vrednosti pH i temperature dolazi do disocijacije kazeinske micelle i oslobađanja frakcija u serumsku fazu mleka. Međutim, pri normalnoj vrednosti pH mleka (pH 6,7) identifikovane su male količine kazeina u serumskoj fazi, bez obzira na visine temperatura primenjenih termičkih tretmana (*Dalgleish i sar., 1997a,b, Anema, 2000*). Takođe, *Anema (2007)*, je ustanovio da je pri vrednosti pH 6,7 veličina kazeinskih micela termički tretiranog mleka na 90°C slična kao kod termički netretiranog mleka.

Kada posmatramo odnose između dominirajućih frakcija proteina surutke, β -LG i α -LA, (Tabela 20) možemo videti da se njihov odnos pod uticajem termičkog tretmana mleka, pri neredukujućim uslovima, menja u pravcu smanjenja učešća β -LG, pri čemu se uočavaju manje razlike uslovljene primenjenim režimom termičkog tretmana mleka.

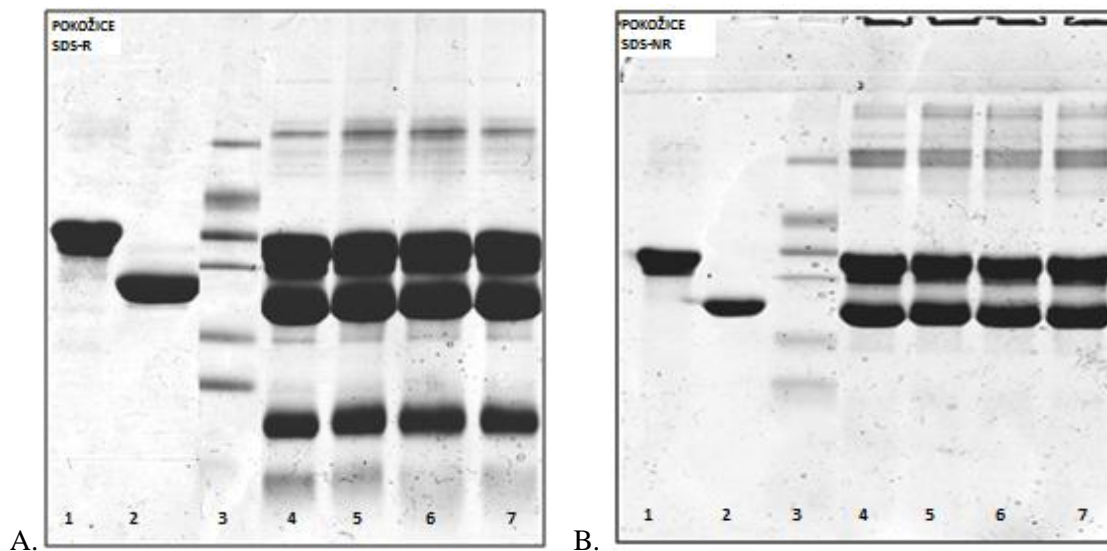
Tabela 20. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke sirovog mleku i uzoraka mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	α s-CN/(β +k)-CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	Sirovo mleko	1,01	5,19
	A1	1,03	5,05
	A2	1,14	5,37
	A3	1,08	6,85
	A4	1,16	6,07
Neredukujući uslovi	Sirovo mleko	1,02	2,31
	A1	0,96	0,68
	A2	0,95	0,92
	A3	0,91	1,24
	A4	0,80	1,03

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

5.2.2.2 *Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica*

SDS elektroforegrami uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka prikazani su na Slici 12, dok je distribucija grupa detektovanih proteinskih frakcija kao i njihovih odnosa prikazana na Grafikonu 18.



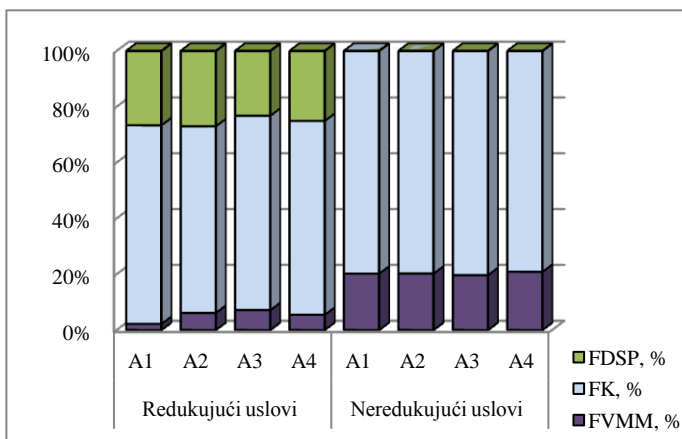
Slika 12. SDS elektroforegrami uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka : A-redukujući uslovi i B-neredujući uslovi: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4-7. Uzorci pokožica ogleđa A1, A2, A3 i A4.

Kada se posmatra distribucija grupa proteinskih frakcija u uzorcima pokožica u zavisnosti od termičkog tretmana mleka (ogledi A1-A4, Grafikon 18) u redukujućim uslovima uočava se kod svih uzoraka značajno prisustvo FDSP, koje se kreće od 23,18% kod uzorka A3 do 26,97% kod uzorka A2. Istovremeno se uočava relativno malo prisustvo FVMM, koje je ima najmanju vrednosti kod najslabijeg termičkog tretmana (A1–2,23%), dok se kod ostala tri termička tretmana kreće u intervalu od 5,48 do 7,16%. Zastupljenost FK malo varira između pojedinih uzoraka pokožica i kreće se od 66,87% do 71,16%.

Razmatranje rezultata denzitometrijske analize uzoraka pokožica A1-A4 u neredujućim uslovima je pokazalo da se na elektroforegramu ne izdvajaju FDSP kao zasebna frakcija, već da su proteini surutke, (β -LG i α -LA), kompletno vezani u velike agregatne forme u okviru kojih disulfidne veze verovatno imaju esencijalni značaj. S tim u vezi, kod svih uzoraka je uočen značajan porast FVMM, koje su zahvatale približno 20% od ukupno detektovanih proteina pokožice. Na elektroforegramima su se, pored FVMM, izdvojile samo FK. Takođe, interesantno je zapaziti da se kod

neredukujućih uslova, kada se posmatra distribucija grupa frakcija, praktično ne vide razlike između primenjenih termičkih tretmana mleka.

Poređenjem rezultata redukujućih i neredukujućih uslova, uočava se da je količina FDSP, koja se izdvojila kod svih uzoraka analiziranih u redukujućim uslovima (od 23,18% do 26,97%), veća od ukupne količine izdvojenih proteina označenih kao frakcije velikih molekulskih masa pri neredukujućim uslovima (od 19,69 do 20,9%).



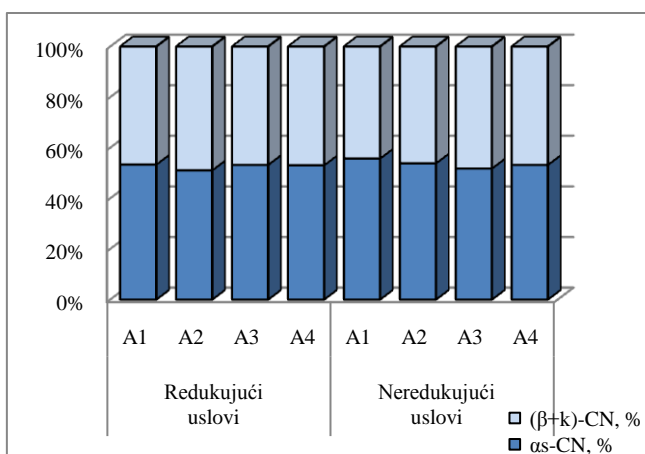
Grafikon 18. Distribucija proteinskih frakcija uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka.

Podaci su dobijeni denzitometrijskom analizom elektroforegrama SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima, kao procenat od ukupno detektovanih proteinskih frakcija

Možemo pretpostaviti da je u frakcijama velikih molekulskih masa detektovanih u neredukujućim uslovima prisutna i izvesna količina kazeina koji reaguje sa proteinima surutke gradeći disulfidno vezane komplekse vrlo velikih molekulskih masa, koje ostaju zarobljene u gelu za koncentrisanje (Patel i sar., 2006, Chevalier i sar., 2010). Prisustvo kazeina u frakcijama velikih molekulskih masa dodatno umanjuje prostor za participiranje proteina surutke u frakcijama velikih molekulskih masa. Ovakav ishod upućuje na razmišljanje da se u neredukujućim uslovima verovatno jedan deo proteina surutke izgubio, odnosno zbog velikih molekulskih masa agregata nije ušao u gel za razdvajanje, već je zadržan u gelu za koncentrisanje. Potvrdu za ovakvu tezu nalazimo i kroz analiziranja učešća kazeina u ukupnim proteinima. Naime, relativno učešće kazeinskih frakcija se sa približno 70% u redukujućim uslovima povećalo na približno 80% u neredukujućim uslovima, pri čemu se može očekivati da je i deo kazeina ugrađen u krupne agregate, što dodatno povećava učešće kazeina. Povećano procentualno učešće kazeina može se ostvariti samo ukoliko je došlo do značajnijeg odliva proteina surutke

iz ukupnih proteina, što takođe upućuje na gubitak proteina surutke u neredukujućim uslovima razdvajanja.

Kada posmatramo distribuciju kazeinskih frakcija u ukupno izdvojenim kazeinima (Grafikon 19, Tabela 21) uočava se da je odnos između pojedinih kazeinskih frakcija veoma stabilan, kako u redukujućim, tako i u neredukujućim uslovima. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da proces formiranja pokožice praktično ne utiče na međusobne odnose pojedinih kazeinskih frakcija u sastavu pokožice. Daljom analizom podataka o distribuciji kazeinskih frakcija može se pretpostaviti da se kazein u pokožicu preovlađujuće uključuje u micelarnoj formi, čime se praktično omogućava zadržavanje stabilnih međusobnih odnosa pojedinih kazeinskih frakcija. U novijoj literaturi (*Anema, 2000, 2007*) postoje brojni podaci koji ukazuju da se pri visokom termičkom tretmanu mleka javlja delimična disocijacija micela kazeina. S tim u vezi, može se postaviti pitanje da li se ovako disosovane kazeinske frakcije mogu uključiti u strukturu pokožice. Iz naših rezultata se ne može dobiti direktan odgovor na ovo pitanje. Međutim, naši podaci potvrđuju stabilan međusobni odnos kazeinskih frakcija, sugerišući da ukoliko se disosovane kazeinske frakcije uključuju u pokožicu, njihovo uključivanje nema selektivni karakter. Međutim, kada posmatramo odnose između, β -LG i α -LA, u redukujućim uslovima, (Tabela 21) možemo videti da se njihov odnos menja pod uticajem termičkog tretmana mleka. Najmanja vrednost pomenutog odnosa je nađena kod najblažeg termičkog tretmana A1 (3,32) a najveća vrednost kod ogleda A3 (9,79).



Grafikon 19. Distribucija kazeinskih frakcija u ukupnim kazeinima uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka, analiziranih SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Denzitometrijska analiza elektroforegrama posmatranih uzoraka u redukujućim uslovima je u grupi FVMM identifikovala frakcije čije se molekulske mase kreću u rasponu od oko 50.000 do oko 76.000. Kod svih oglada preovlađujuće učešće ima frakcija od oko 68.000-72.000 (učešće se kreće u intervalu 1–4,4%), pri čemu se, kod uzoraka A2 i A3, sa vidljivim učešćem (1–1,5%) javlja i frakcija nešto veće molekulske mase.

Tabela 21. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka, analiziranih SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	α S-CN/(β +k)-CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	A1	1,14	3,32
	A2	1,04	4,38
	A3	1,14	9,79
	A4	1,13	5,76
Neredukujući uslovi	A1	1,26	/
	A2	1,17	/
	A3	1,07	/
	A4	1,14	/

Posmatrano kod svih oglada iz ove grupe, denzitometrijska analiza u neredukujućim uslovima je pokazala da grupa FVMM u odnosu na redukujuće, sadrži nekoliko frakcija kompleksa većih molekulskih masa, koje se kreću u rasponu od oko 53.000 do 100.000. Kod svih uzoraka su identifikovane identične frakcije, pri čemu dominirajuće učešće, sa više od 50% zastupljenosti, u svim uzorcima zauzima frakcija molekulske mase od oko 72.000. Takođe, kod svih uzoraka, na samom ulazu u gel za razdvajanje, izdvaja se frakcija molekulske mase od oko 100.000 sa učešćem od 1,6-2,4% u ukupno identifikovanim frakcijama, pri čemu najmanji sadržaj ove frakcije ima uzorak A1, a najveći uzorak A2.

U neredukujućim uslovima, slično kao kod uzoraka termički tretiranih mleka, pri samom ulazu u gel za koncentrisanje mogu se jasno uočiti frakcije najvećih molekulskih masa. Za razliku od prethodno opisanih uzoraka mleka pre formiranja pokožica (odjeljak 5.2.2.1), ove frakcije u uzorcima pokožica A su vizuelno daleko jače izražene na elektroforegramima.

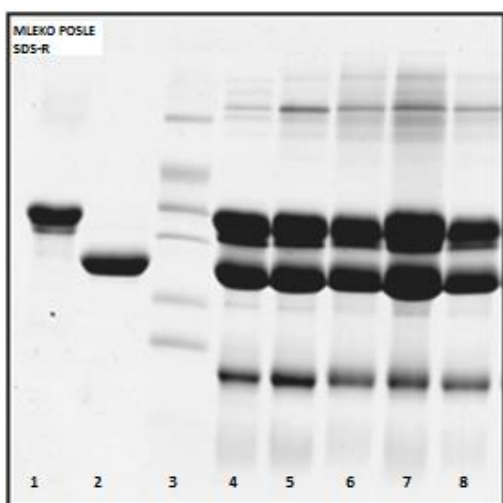
Prema literaturnim podacima u okviru frakcija veoma velikih molekulskih masa zarobljenih na poziciji ulaza u gel za koncentrisanje, mogu se naći, kako disulfidno vezani kompleksi kazeinskih frakcija i proteina surutke (*Patel i sar., 2006, Chevalier i*

sar., 2010) tako i kompleksi formirani disulfidnim povezivanjem FDSP (prvenstveno β -LG), u manjoj meri k-CN sa proteinskim komponentama iz MFGM (Houlihan i sar., 1992, Kim i Jimenez-Flores, 1995, Ye i sar., 2002, 2004a,b). Mehanizmi ovih interakcija još uvek nisu konačno definisani, ali je evidentno da već pri termičkom tretmanu od 60-65°C dolazi do formiranja disulfidno vezanih agregata (Dalglish i Banks, 1991, Houlihan i sar., 1992, Corredig i Dalglish, 1996b). Od proteinskih komponenta MFGM u pomenutim interakcijama najviše su zastupljene komponente ksantin oksidaza (mol. mase oko 155.000) i butirofilin (mol. mase od oko 67.000) (Mather, 2000, Ye i sar., 2002), kao najzastupljenije frakcije MFGM. Pored pomenutih interakcija, prilikom termičkog tretmana mleka dolazi do izmeštanja komponenta PAS 6 (mol. mase oko 50.900) i PAS 7 (mol. mase 47.200) iz MFGM u serumsku fazu mleka (Ye i sar., 2002).

Na osnovu napred navedenog i na osnovu činjenice da prilikom formiranja pokožice dolazi do koncentrisanja mlečne masti, moglo bi se očekivati da su pomenuti kompleksi i pojedinačne komponente vidljive na gelu. Prema Ye i sar. (2002) proteinske komponente MFGM čine oko 0,03-0,04% proteina mleka. Obzirom da se prilikom formiranja pokožice kajmaka sadržaj masti mleka povećava za oko petnaest puta, moglo bi se očekivati da sadržaj proteinskih komponenta MFGM u pokožici iznosi oko 0,45-0,6%, što predstavlja oko 5-7% ukupno prisutnih proteina pokožice. Pored toga, moramo uzeti u obzir činjenicu da je proteinski sastav MFGM vrlo kompleksan, koga čini preko 40 polipeptida sa širokim spektrom molekulskih masa od 15.000-240.000. Ako uzmemo u obzir i činjenicu da butirofilin predstavlja dominantnu komponentu koja čini maksimalno oko 40% svih frakcija MFGM, moglo bi se očekivati njegovo učešće u pokožici od oko 2-3% od ukupno identifikovanih proteinskih frakcija. Međutim, postoji verovatnoća odsustva proporcionalnosti u sadržajima komponenti mleka i pokožice, odnosno, moguće je da komponente MFGM, kao površinski vrlo aktivne, dezintegrišu membranu i fragmentno ili samostalno se inkorporiraju u pokožicu (Kristensen i sar., 1997). Na osnovu navedenog moglo bi se očekivati da u SDS PAGE redukujućim uslovima frakcija butirofilina može da ima učešće minimalno od oko 3% od ukupno identifikovanih proteina, što načelno pruža mogućnost kvalitativne i kvantitativne analize. U tom smislu, u budućim istraživanjima ovom pitanju bi trebalo posvetiti odgovarajuću pažnju.

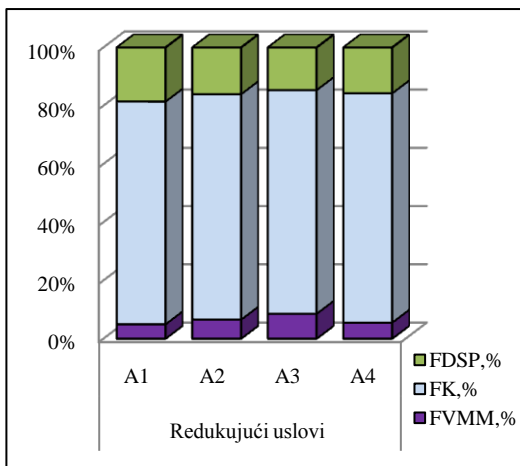
5.2.2.3 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka preostalog nakon formiranja pokožica

Elektroforegram uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica analiziranih SDS PAG elektroforezom prikazan je na Slici 13. Analogijom, kao kod denzitometrijske analize mleka pre formiranja pokožica, odnosno analize pokožica, i ovde su sve identifikovane proteinske frakcije klasifikovane u identične grupe: FVMM, FK i FDSP.



Slika 13. SDS elektroforegram uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka, analiziranih u redukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4. Sirovo mleko; 5-8. Uzorci mleka preostalog nakon formiranja pokožica ogleđa A1, A2, A3 i A4.

Distribucija grupa detektovanih proteinskih frakcija prikazani su na Grafikonu 20 i u Tabeli 22. Posmatrajući podatke učešća pojedinih frakcija (Grafikon 20) može se zaključiti da su zastupljenosti FVMM, FK i FDSP prilično ujednačene kod svih ogleđa. Ispitivani termički tretmani nisu bitnije uticali na distribuciju grupa frakcija kod mleka preostalog nakon formiranja pokožica. Posmatrajući uporedne rezultate denzitometrijske analize uzoraka elektroforegrama dobijenih u redukujućim uslovima uzoraka termički tretiranog mleka nakon i pre formiranja pokožica (Tabela 22), uočava se izražena sličnost u procentualnim sadržajima i proporcionalnosti učešća grupa frakcija.



Grafikon 20. Distribucija proteinskih frakcija uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka.

Podaci su dobijeni denzitometrijskom analizom elektroforegrama SDS-PAGE u redukujućim uslovima, kao procenat od ukupno detektovanih proteinskih frakcija

Tabela 22. Uporedni prikaz distribucije grupa frakcija uzoraka mleka pre i nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana

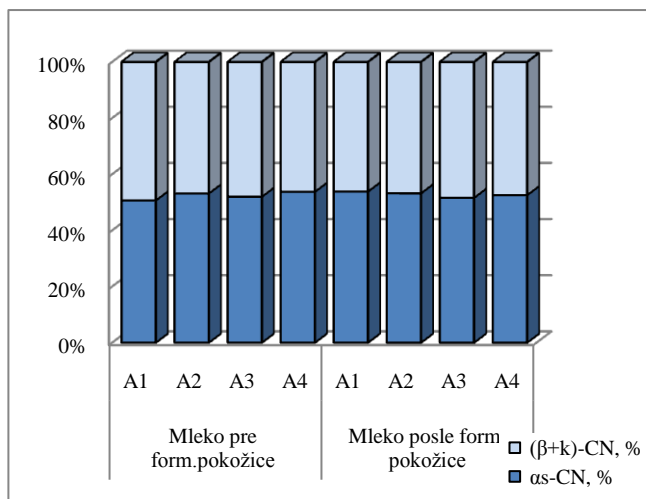
SDS PAGE u red. uslovima	Ogled	Učešće frakcija		
		FVMM,%	FK,%	FDSP,%
Mleko pre form. pokožice	A1	4,59	76,88	18,54
	A2	8,41	76,21	15,38
	A3	11,32	76,94	11,74
	A4	5,83	80,76	13,41
Mleko posle form. pokožice	A1	4,97	76,48	18,55
	A2	6,55	77,43	16,02
	A3	8,58	76,82	14,60
	A4	5,53	78,75	15,72

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

Kada posmatramo distribuciju pojedinih frakcija kazeina u ukupnim kazeinima, kao i njihove međusobne odnose (Grafikon 21 i Tabela 23) možemo zaključiti da njihovi sadržaji variraju u uskim granicama. U poređenju sa podacima termički tretiranog mleka pre formiranja pokožica, možemo zaključiti da praktično nema promena u sadržajima, odnosno da proces formiranja pokožica nije vidljivije narušio sadržaje i odnose koji su postojali u mleku pre formiranja pokožica i u pokožicama. Ovaj zaključak potkrepljuje i činjenica da masa formirane pokožice predstavlja samo oko 1% mase termički tretiranog mleka pre formiranja pokožica (Puđa i Radovanović, neobjavljeni podaci).

Kada posmatramo odnose između dominirajućih frakcija proteina surutke, β -LG i α -LA, (Tabela 23) možemo videti da se njihov odnos pod uticajem termičke obrade mleka

i procesa formiranja pokožice blago menja, pri čemu uzorak A1 ima najnižu vrednost pomenutog odnosa (4,93), a ogled A4 najvišu (5,99). Upoređujući odnos β -LG/ α -LA sa napred analiziranim podacima mleka pre formiranja pokožica i pokožica u redukujućim uslovima, možemo zaključiti da su vrednosti količnika proporcionalne i prilično ujednačene.



Grafikon 21. Uporedni prikaz distribucije kazeinskih frakcija u ukupnim kazeinima uzoraka mleka pre i nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

Tabela 23. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	α s-CN/(β +k)-CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	A1	1,17	4,93
	A2	1,14	5,43
	A3	1,07	5,09
	A4	1,11	5,99

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

5.2.3 Uporedna analiza karakterizacije proteinskih frakcija uzoraka mleka, pre i nakon formiranja pokožica i pokožica u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Ako uporedimo proteinske frakcije mleka pre formiranja pokožica sa odgovarajućim frakcijama u pokožici (Tabela 24) u redukujućim uslovima uočava se značajno povećanje učešća frakcija FDSP kod uzoraka pokožice u odnosu na uzorke mleka, dok

se istovremeno uočava blago smanjenje učešća FK. Kada posmatramo situaciju u neredukujućim uslovima, uočavamo potpuno odsustvo slobodnih FDSP kod uzoraka pokožica, dok su u mleku bili zastupljeni u solidnom obimu. Ovakva distribucija frakcija ukazuje na prisustvo selektivnih mehanizama u procesu nastajanja pokožice. Naime, odsustvo slobodnih FDSP u pokožici, uz njihovo istovremeno veoma obimno prisustvo u formi vezanoj za kazein, ukazuje da se FDSP u pokožicu praktično uključuju isključivo u formi agregata, među kojima su agregati sa kazeinskim micelama verovatno preovlađujući. Uključivanje FDSP isključivo u formi agregata ima svoju direktnu potvrdu i u veoma stabilnom međusobnom odnosu pojedinih kazeinskih frakcija. Analiza načina uključivanja FDSP direktno ukazuje na značaj operacije termičke obrade u formi kuvanja mleka u autohtonj proizvodnji kajmaka, koja predstavlja neophodan korak, bez kojeg nema proizvodnje kajmaka.

Tabela 24. Uporedni prikaz distribucije grupa frakcija uzoraka mleka pre formiranja pokožica i pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	FVMM, %			FK, %			FDSP, %		
		Mleko*	Pokožica	IPS**, %	Mleko	Pokožica	IPS, %	Mleko	Pokožica	IPS, %
Redukujući uslovi	A1	4,59	2,23	48,58	76,88	71,16	92,56	18,54	26,62	143,58
	A2	8,41	6,16	73,25	76,21	66,87	87,74	15,38	26,97	175,36
	A3	11,32	7,16	63,25	76,94	69,66	90,54	11,74	23,18	197,44
	A4	5,83	5,48	94,00	80,76	69,46	86,01	13,41	25,06	186,87
Neredukujući uslovi	A1	20,97	20,23	96,47	66,50	79,77	119,95	12,52	0,00	0,00
	A2	21,72	20,26	93,28	65,47	79,75	121,81	12,82	0,00	0,00
	A3	20,61	19,69	95,54	72,85	80,31	110,24	6,54	0,00	0,00
	A4	22,53	20,90	92,76	71,82	79,10	110,14	5,65	0,00	0,00

Uzorci su analizirani denzitometrijskom analizom elektrogoregrama SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

**Mleko pre formiranja pokožica*

***IPS predstavlja indeks povećanja, odnosno smanjenja procentualnog učešća frakcija pokožice u odnosu na procentualno učešće u mleku pre formiranja pokožica (vrednosti $IPS < 100$, označavaju da je došlo do smanjenja, a vrednosti $IPS > 100$, da je došlo do povećanja učešća)*

Analizom frakcija unutar FVMM, interesantno je zapaziti da se frakcija od oko 72.000 (72.000 ± 4.000) javlja i u redukujućim i u neredukujućim uslovima u uzorcima pokožica, pri čemu se relativno učešće pomenute frakcije višestruko uvećava u neredukujućim uslovima. Ovakav rezultat otvara pitanje da li pomenuta frakcija ima poseban značaj u nastajanju pokožica. Stoga su na Slici 14 prikazani rezultati denzitometrijske analize uzoraka referentnog ogleda A2, a u Tabeli 25 su prikazani uporedni podaci učešća frakcije molekulske mase od 72.000 ± 4.000 u mleku pre i nakon formiranja pokožica i u uzorcima pokožica kako u redukujućim, tako i u neredukujućim

uslovima. Analizom podataka iz Tabele 25 se vidi da su koncentracije pomenute frakcije u pokožicama u neredukujućim uslovima višestruko uvećane (sa vrednostima od 12,72-14,89%) u odnosu na njihove koncentracije u redukujućim uslovima (1,83-4,38%). Takođe, koncentracije ove frakcije u pokožicama u neredukujućim uslovima su u značajnoj meri uvećane u odnosu na njihove koncentracije u uzorcima mleka pre formiranja pokožica (6,46-10,26%) posmatrano u istim uslovima. Porast udela ove frakcije ukazuje da je u procesu formiranja pokožica zastupljen selektivni mehanizam koncentrovanja pomenute proteinske frakcije. Kako učešće ove frakcije značajno prevazilazi koncentraciju prirodnih proteinskih frakcija mleka sa sličnim molekulskim masama, to se nameće zaključak da ova frakcija ima karakter proteinskog kompleksa koji je verovatno rezultat primenjenog visokog termičkog tretmana mleka. Takođe, zastupljenost pomenute frakcije, koja se kreće u intervalu od 12–14% od ukupnih proteina sugerise da u strukturi ovog kompleksa mora biti prisutna i neka od kazeinskih frakcija, jer jedino kazeinske frakcije svojom zastupljenošću mogu da obezbede toliko obiman udeo u ukupnim proteinima.

Tabela 25. Učešće frakcije molekulske mase od oko 72.000±4.000 u ukupnim proteinskim frakcijama uzoraka mleka pre i nakon formiranja pokožica i pokožica dobijenih u zavisnosti od termičkog tretmana mleka

Ogled	Učešće frakcije mol.mase 72.000±4.000 u ukupno detektovanim frakcijama, %				
	Mleko pre formiranja pokožica		Pokožica		Mleko nakon formiranja pokožica
	SDS-R	SDS-NR	SDS-R	SDS-NR	SDS-R
A1	4,04	6,55	1,83	14,89	4,00
A2	3,50*	6,46*	3,46*	13,18*	2,94*
A3	4,37	7,29	4,38	12,72	3,25
A4	3,18	10,26	2,43	14,40	3,16
Mol. masa	75.000	73.000-79.000	68.000-76.000	68.000-72.000	71.000-75.000

Uzorci su analizirani denzitometrijskom analizom elektroforegrama SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

** analiza mleka pre formiranja pokožica- frakcija br. 3 (Slika 14, 1R i 1NR)*

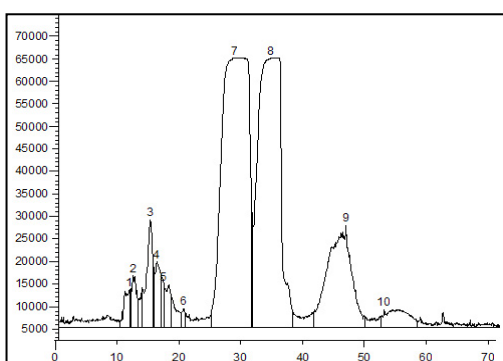
analiza pokožica- frakcija br. 3 (Slika 14, 2R) i frakcija br. 4 (Slika 14, 2NR)

analiza mleka preostalog nakon formiranja pokožica- frakcija br. 2 (Slika 14, 3R)

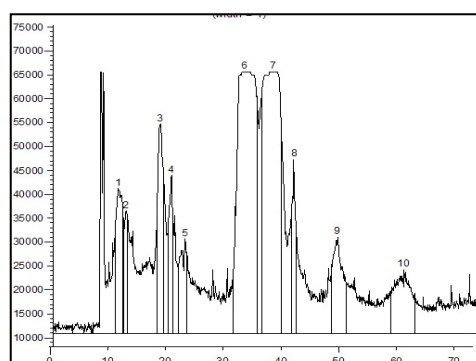
Prisustvo frakcije molekulske mase od oko 72.000±4.000 i u uzorcima pokožica u redukujućim uslovima otvara pitanje da li je ova frakcija homogena, ili je kod neredukujućih uslova došlo do nakupljanja više frakcija sličnih molekulskih masa (Slika 14). Takođe, jedna od mogućnosti koja se navodi i u literaturi (*Chevalier i sar., 2001, Chevalier i sar., 2009.*) bi mogla da bude i prisustvo kompleksa rezistentnijih na

disocijativne agense, kao i eventualno prisustvo skrivenih disulfidnih veza. Ovakva mogućnost kod uzoraka pokožice može biti realna, jer se pretpostavlja da se u procesu formiranja pokožica javljaju veoma snažne sile praćene intenzivnim gubitkom vode kao disperzne sredine, a koje dovode do izraženog sabijanja materijala ugrađenog u pokožicu, što može uzrokovati obimnije međusobno reagovanje komponenata u dodiru.

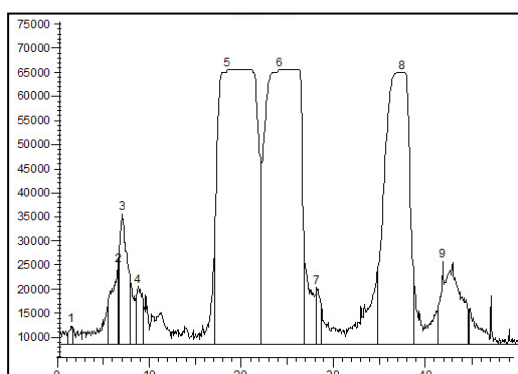
U neredukujućim uslovima, kod pokožica, slično kao kod uzoraka mleka pre formiranja pokožica, pri samom ulazu u gel za koncentrisanje mogu se jasno uočiti frakcije veoma velikih molekulskih masa. Za razliku od uzoraka mleka, ove frakcije su, vizuelno posmatrano, daleko jače izražene kod pokožica. Obzirom da se posmatrani uzorci pokožica (posebno izraženo u neredukujućim uslovima) razlikuju prema sadržaju najvećih identifikovanih frakcija (mol. mase od oko 100.000), postoji teoretska mogućnost da se posmatrani uzorci pokožica međusobno razlikuju i u odnosu na strukturu neidentifikovanih velikih kompleksa koji se nalaze na samom ulazu u gel za koncentrisanje.



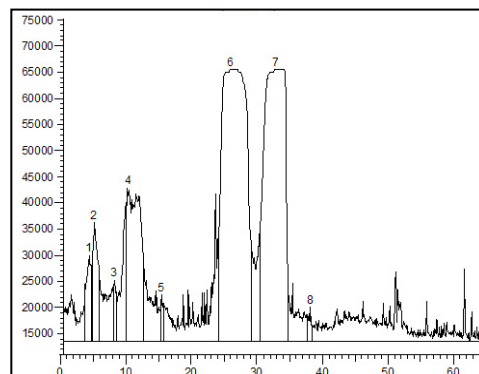
1R: Mleko pre formiranja pokožica uzorka ogleđa A2, SDS-R



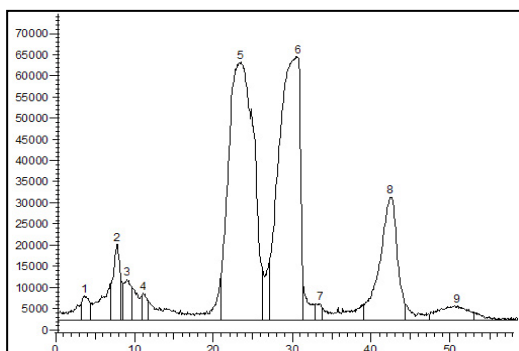
1NR: Mleko pre formiranja pokožica uzorka ogleđa A2, SDS-NR



2R: Pokožica uzorka ogleđa A2, SDS-R



2NR: Pokožica uzorka ogleđa A2, SDS-NR



3R: Mleko preostalo nakon formiranja pokožica uzorka ogleđa A2, SDS-R

Slika 14. Densitogrami elektroforegrama uzoraka mleka pre i nakon formiranja pokožica; i pokožica referentnog ogleđa A2.

Uzorci mleka pre formiranja pokožica (1R, 1NR) i uzorci pokožica (2R, 2NR) su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i u neredukujućim uslovima, dok su uzorci mleka preostalog nakon formiranja pokožica (3R) analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

5.3 UTICAJ SASTAVA MLEKA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA I DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u toku prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sastava mleka (ogledi od B1-B9) prikazan je u Tabeli 26, a prinosi i apsolutne vrednosti sadržaja komponenata sastava pokožica u Tabeli 27. Odabrani parametri pokožica su prikazani u Tabeli 28.

Tabela 26. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	Procentualno učešće				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
B1	62,83±4,65	6,49±0,65	73,34±2,21	85,61±3,77	8,87±1,14
B2	70,67±4,65	5,55±0,42	78,86±3,01	89,54±2,55	7,05±0,80
B3	62,83±1,76	7,72±0,19	73,76±2,12	85,19±1,41	10,47±0,20
B4	60,33±4,93	8,25±0,96	70,84±2,11	85,30±8,65	11,63±1,11
B5	65,50±2,78	7,24±0,17	74,02±2,04	88,47±1,82	9,78±0,21
B6	61,83±2,02	8,02±0,44	74,75±1,96	82,71±1,15	10,74±0,76
B7	58,67±2,02	7,90±0,22	68,10±4,05	86,24±2,20	11,62±0,65
B8	60,67±1,76	7,91±0,49	72,34±1,98	83,86±1,13	10,95±0,81
B9	58,50±4,36	9,04±0,60	70,07±4,96	83,48±1,23	12,98±1,76

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija

Tabela 27. Prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g
B1	38,74±3,40	24,26±1,44	2,52±0,43	28,38±2,11	10,36±1,54
B2	40,67±1,53	28,70±1,05	2,26±0,25	32,04±0,68	8,62±1,52
B3	36,35±1,36	22,84±0,95	2,81±0,12	26,80±0,69	9,55±1,04
B4	40,61±3,40	24,50±2,85	3,36±0,55	28,80±3,16	11,81±0,61
B5	46,91±0,87	30,72±1,17	3,40±0,10	34,71±0,62	12,20±1,13
B6	53,40±4,81	33,02±3,14	4,27±0,31	39,89±3,28	13,51±1,89
B7	46,77±8,20	27,33±3,82	3,69±0,59	31,64±3,66	15,13±4,57
B8	44,33±5,94	26,84±3,09	3,53±0,68	32,04±4,09	12,29±2,11
B9	51,61±6,94	30,00±2,04	4,69±0,93	35,93±2,31	15,67±4,71

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija

Tabela 28. Odabrani parametri uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Ogled	M/P	M/m ²	P/m ²	Proteini u vodenoj fazi, %	Mast u vodenoj fazi, %
B1	9,81±1,77	539,13±31,93	56,07±9,56	19,55±0,40	70,15±3,24
B2	12,83±1,78	637,67±23,38	50,20±5,61	20,87±1,16	76,93±3,71
B3	8,14±0,04	507,53±21,09	62,38±2,69	22,81±1,82	70,55±2,20
B4	7,43±1,52	544,52±63,36	74,56±12,32	22,10±3,14	67,39±1,57
B5	9,04±0,21	682,64±25,98	75,47±2,30	21,86±1,67	71,59±2,43
B6	7,73±0,64	733,70±69,86	94,97±6,80	24,14±1,41	71,01±2,24
B7	7,43±0,25	607,32±84,78	81,96±13,08	19,99±2,17	64,83±3,68
B8	7,69±0,67	596,46±68,71	78,37±15,02	22,27±1,38	68,69±2,10
B9	6,51±0,88	666,65±45,27	104,23±20,58	23,36±1,83	66,18±5,36

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

Imajući u vidu da su ogledi grupe B međusobno veoma raznorodni, jer obuhvataju uticaj masti, proteina, proteina surutke, kao i njihove međusobne interakcije, to su u cilju preglednijeg analiziranja uticaja pojedinih faktora, podaci grupisani na odgovarajući način i poređeni sa podacima uzorka referentnog oglada (ogled A2).

5.3.1 Uticaj sadržaja masti mleka na prinos i sastav pokožica

U okviru analize uticaja sadržaja masti mleka, ogleda smo klasifikovali u tri grupe, na osnovu sadržaja proteina u mleku od 3,4; 4,2 i 5%.

5.3.1.1 Mleko sa 3,4% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sadržaja masti mleka, pri 3,4% proteina mleka, prikazani su u Tabeli 29, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 30.

Tabela 29. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 3,4% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A2 (4/3,4)	58,50±5,41 a	7,97±0,07 a	70,50±4,62 a	83,43±3,13 a	11,42±0,84 a
B1 (6/3,4)	62,83±4,65 a	6,49±0,65 b	73,34±2,21 a	85,61±3,77 a	8,87±1,14 b
B2 (8/3,4)	70,67±4,65 a	5,55±0,42 c	78,86±3,01 a	89,54±2,55 a	7,05±0,80 b

* (%m/%p), označava procentualne sadržaje masti i proteina u mleku za izradu pokožica

**Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

***Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

Tabela 30. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 3,4% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A2 (4/3,4)	32,28±2,01 a	18,95±2,88 a	2,57±0,14	22,67±2,82 a	9,61±0,87 a	7,34±0,73 a
B1 (6/3,4)	38,74±3,40 b	24,26±1,44 b	2,52±0,43	28,38±2,11 b	10,36±1,54 a	9,81±1,77 b
B2 (8/3,4)	40,67±1,53 b	28,70±1,05 c	2,26±0,25	32,04±0,68 b	8,62±1,52 a	12,83±1,78 b

*Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik < 1);

Ako analiziramo podatke iz Tabele 29, uočava se da se sa variranjem sadržaja masti u mleku, uz konstantnu vrednost proteina mleka (3,4%), sastav nastalih pokožica odlikuje statistički vrlo značajnim razlikama u sadržaju proteina, dok razlike u sadržaju masti pokožica nisu statistički značajne. Posebno bi trebalo istaći da su poređenjem sadržaja proteina pokožica ogleda A2, B1 i B2, ustanovljene statistički veoma značajne razlike ($p < 0,01$) između ogleda A2 i B1, odnosno ogleda A2 i B2 (Prilog, Tabela 2).

Interesantno je zapaziti da su razlike između vrednosti sadržaja masti pokožica na prvi pogled velike. Međutim, i pored vizuelno izraženih razlika, vrednost F količnika pri grupnom testiranju sva tri ogleda sa različitim nivoima sadržaja masti mleka nije pokazala statistički značajne razlike, ali je bila vrlo blizu granične vrednosti za nivo značajnosti od 5%. Stoga je za vrednosti sadržaja masti pokožica urađeno poređenje grupnim testom između dve grupe. Ovakav oblik statističke analize je pokazao da se poređenjem jedino u slučaju uzoraka ogleda A2 i B2 (Prilog, Tabela 6) može ustanoviti statistički značajan uticaj sadržaja masti mleka na sadržaj masti pokožice. Odsustvo statistički značajnih razlika između vrednosti sadržaja masti pokožica dobijenih grupnim poređenjem tri ogleda (A2, B1 i B2) pokazuje da su kod ovih ogleda veoma izražene varijacije unutar samih serija.

Međutim, kod parametra pokožice kao što su: sadržaj suve materije, MuSM i apsolutni sadržaj vode, grupnim poređenjem posmatranih ogleda, može se zaključiti da analizirani sadržaji masti u mleku ne utiču statistički značajno na pomenute parametre sastava pokožice (Prilog, Tabela 2).

Kad su proteini u pitanju, testirani ogledi su pokazali daleko veću homogenost unutar pojedinih grupa u odnosu na međusobne razlike srednjih vrednosti između grupa,

tako da se može reći da posmatrani sadržaji masti mleka (pri 3,4% proteina) imaju statistički vrlo značajan uticaj na sadržaj proteina pokožice.

Ako posmatramo prinos pokožica i posebno apsolutno učešće pojedinih komponenata u prinosu, uočava se da porast sadržaja masti mleka dovodi do statistički značajnog povećanja prinosa, i posebno statistički vrlo značajnog povećanja apsolutnog sadržaja masti u pokožici (Prilog, Tabela 2). S druge strane, apsolutni sadržaj proteina pokazuje tako veliki obim variranja da se nije mogla vršiti obrada ovih podataka.

Kada analiziramo komentarisane podatke u celini, možemo uočiti izvesne pravilnosti. Porast sadržaja masti mleka, pri 3,4% proteina, dovodi do obimnijeg uključivanja masti u pokožicu i istovremeno do opadanja učešća proteina u pokožici. Na ovaj način se značajno menja međusobni odnos masti i proteina, koji se sa 7,34 kod ogleđa A2 povećava na 9,81 kod ogleđa B1, odnosno 12,83 kod ogleđa B2 (Tabela 30). Porast sadržaja masti je generalno praćen izvesnim porastom hidrofobnosti sistema, što za rezultat ima smanjenje učešća vode i povećanje učešća suve materije u pokožici, koja se sa 70,5% povećava na 73,3%, odnosno na 78,9%.

Povećavanje prinosa pokožice, uz istovremeno opadanje učešća proteina, je rezultiralo u velikom rasipanju podataka za apsolutni sadržaj proteina, te se na taj način sadržaj proteina, koji je kod analize sastava pokazao statistički veoma značajne razlike, kod analize prinosa odlikovao takvim obimom rasipanja podataka da ih nije bilo moguće statistički obrađivati. Ovakav obrt u statističkoj značajnosti jednog parametra ukazuje na veoma veliku međusobnu uslovljenost parametara, koja je u slučaju proteina rezultirala suprotstavljenim trendovima u promenama procentualnog sadržaja proteina i prinosa pokožice, te su veoma značajne razlike iskazane u sadržaju proteina u velikoj meri anulirane kada se isti parametar posmatra kroz prizmu prinosa, odnosno njegovog apsolutnog sadržaja.

5.3.1.2 Mleko sa 4,2% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sadržaja masti mleka, pri 4,2% proteina mleka, prikazani su u Tabeli 31, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 32.

Tabela 31. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 4,2% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A2 (4/3,4)	58,50±5,41 a	7,97±0,07 a	70,50±4,62 a	83,43±3,13 a	11,42±0,84 a
B3 (4/4,2)	62,83±1,76 a	7,72±0,19 a	73,76±2,12 a	85,19±1,41 a	10,47±0,20 ab
B5 (6/4,2)	65,50±2,78 a	7,24±0,17 b	74,02±2,04 a	88,47±1,82 a	9,78±0,21 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Tabela 32. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 4,2% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A2 (4/3,4)	32,28±2,01 a	18,95±2,88 a	2,57±0,14 a	22,67±2,82 a	9,61±0,87 a	7,34±0,73 a
B3 (4/4,2)	36,35±1,36 b	22,84±0,95 b	2,81±0,12 a	26,80±0,69 b	9,55±1,04 a	8,14±0,04 a
B5 (6/4,2)	46,91±0,87 c	30,72±1,17 c	3,40±0,10 b	34,71±0,62 c	12,20±1,13 b	9,04±0,21 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Analiziranjem podataka prikazanih u Tabelama 31 i 32, generalno se može zaključiti da porast sadržaja masti u mleku, kod kojeg je nivo proteina standardizovan na 4,2% utiče na sadržaj masti pokožica i pokazuje blagi porast, ali bez statističke značajnosti, dok sadržaj proteina pokožica opada, pri čemu u slučaju uzorka B5 ovaj pad ima statističku značajnost. Istovremeno, prinos pokožica se statistički vrlo značajno povećavao (Prilog, Tabela 3). Porast prinosa je veoma uočljiv, pri čemu se uočava statistički veoma značajni porast apsolutnog sadržaja masti uzorka B5 u odnosu na uzorak B3, kao i u odnosu na referentni uzorak A2, dok je porast apsolutnog sadržaja masti uzorka B3 u odnosu na standardni uzorak A2 statistički značajan ($p<0,05$).

Interesantno je zapaziti da se apsolutna količina proteina u pokožici povećava, uprkos smanjenju procentualnog učešća proteina u pokožici. U tom smislu, posebno je indikativno poređenje parametara za proteine pokožica uzorka B3 i B5, kod kojih je sadržaj proteina u mleku bio identičan (4,2%), a sadržaj masti u mleku varirao (4 i 6%). Sadržaj proteina pokožice je sa 7,72% pao na 7,24%, a da je pri tome došlo do porasta apsolutne količine proteina, koja se sa 2,81 g kod uzorka B3 povećala na 3,40 g kod uzorka B5. Porast apsolutne količine proteina pokožice, uprkos smanjenju njegovog procentualnog učešća, se može objasniti značajnim porastom apsolutnog sadržaja masti pokožice koja je svojim uključenjem u pokožicu vezala za sebe i uvećanu količinu proteina.

Ako poredimo uticaj rastućeg sadržaja masti na sastav pokožica u funkciji porasta sadržaja proteina mleka sa 3,4% na 4,2%, možemo zaključiti da pri nižem sadržaju proteina mleka porast sadržaja masti u mleku ima daleko veći uticaj na obim uključivanja proteina u pokožicu. U tom smislu porast sadržaja masti u uslovima nižeg nivoa proteina mleka snažno favorizuje uklapanje masti u pokožicu, čime se postiže jasna dominacija masti nad proteinima u pokožici, što se najbolje sagledava kroz međusobni odnos masti i proteina (M/P) pokožice koji se kod nivoa proteina mleka od 3,4% i masti 8% (ogled B2) povećava na 12,83 (Tabela 30). Nasuprot tome, porast sadržaja masti u uslovima povišenog nivoa proteina (4,2%) značajno umanjuje dominaciju masti, tako da se dobijaju ujednačene vrednosti sadržaja masti pokožice, uprkos rastućem sadržaju masti u mleku. Istovremeno, uključivanje proteina, uprkos uočljivom padu njihovog procentualnog učešća u pokožici, demonstrira jasan trend porasta njihove apsolutne količine u pokožici. Drugim rečima, porast sadržaja proteina u mleku značajno utiče na tok formiranja pokožice i efekat proizašao iz izražene površinske aktivnosti emulgovane masne faze biva delimično potiskivan proteinskim uticajem, odnosno više ispoljenom tendencijom proteina ka agregiranju. Ovakva tendencija je vrlo realna, jer porast koncentracije proteina u mleku sa 3,4 na 4,2% predstavlja porast proteina za 23,5%. Iz literature je poznato da koncentracija proteina, kada je sirišna koagulacija u pitanju, predstavlja najznačajniji pojedinačni faktor koagulacije (Puđa, 2009). U tom smislu, može se opravdano pretpostaviti da će i u agregiranju proteina, karakterističnom za početnu fazu procesa formiranja kajmaka, koncentracija proteina imati važnu ulogu, što naši rezultati i potvrđuju.

5.3.1.3 Mleko sa 5% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sadržaja masti mleka, pri 5% proteina mleka, prikazani su u Tabeli 33, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 34.

Na osnovu podataka prikazanih u Tabelama 33 i 34 odnosno, grupnim poređenjem referentnog ogleđa (4% masti i 3,4% proteina) i onih sa različitim nivoima masti u mleku pri 5% proteina, može se zaključiti da se podaci vezani za prinos veoma razlikuju i da su kod većine parametara prinosa ustanovljene statistički značajne razlike (Prilog,

Tabela 4). Istovremeno, podaci o sastavu pokožica imaju relativno bliske vrednosti, uz istovremeno izraženo variranje unutar pojedinih grupa, što kod većine parametara praktično onemogućava poređenje.

Tabela 33. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 5% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A2 (4/3,4)	58,50±5,41	7,97±0,07	70,50±4,62 a	83,43±3,13	11,42±0,84
B4 (4/5)	60,33±4,93	8,25±0,96	70,84±2,11 a	85,30±8,65	11,63±1,11
B6 (8/5)	61,83±2,02	8,02±0,44	74,75±1,96 a	82,71±1,15	10,74±0,76

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik <1)

Tabela 34. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja masti mleka pri 5% proteina mleka

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A2 (4/3,4)	32,28±2,01 a	18,95±2,88 a	2,57±0,14 a	22,67±2,82 a	9,61±0,87 a	7,34±0,73
B4 (4/5)	40,61±3,40 b	24,50±2,85 a	3,36±0,55 b	28,80±3,16 a	11,81±0,61 ab	7,43±1,52
B6 (8/5)	53,40±4,81 c	33,02±3,14 b	4,27±0,31 c	39,89±3,28 b	13,51±1,89 b	7,73±0,64

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik <1)

Na osnovu podataka prikazanih u Tabelama 33 i 34 odnosno, grupnim poređenjem referentnog ogleda (4% masti i 3,4% proteina) i onih sa različitim nivoima masti u mleku pri 5% proteina, može se zaključiti da se podaci vezani za prinos veoma razlikuju i da su kod većine parametara prinosa ustanovljene statistički značajne razlike (Prilog, Tabela 4). Istovremeno, podaci o sastavu pokožica imaju relativno bliske vrednosti, uz istovremeno izraženo variranje unutar pojedinih grupa, što kod većine parametara praktično onemogućava poređenje.

Upoređivanjem tabelarnih vrednosti ogleda B4 i B6 (Tabele 33 i 34) možemo uočiti da povećanje sadržaja masti u mleku sa 4 na 8% (pri sadržaju proteina od 5%) dovodi do povećanja prinosa za oko 31%, apsolutnog sadržaja masti i proteina za oko 35%, odnosno za oko 27%.

Poređenjem ogleda B6 sa standardnim ogledom A2 (Prilog, Tabela 4), možemo zaključiti da postoje statistički vrlo značajne razlike u pogledu prinosa pokožica,

apsolutnih sadržaja suve materije, proteina i masti ($p < 0,01$), dok poređenjem ogleda B4 sa standardnim ogledom A2, možemo zaključiti da postoje statističke značajne razlike u pogledu prinosa pokožica i apsolutnog sadržaja proteina ($p < 0,05$). Kod apsolutnog sadržaja masti ustanovljene razlike između vrednosti kod posmatranih ogleda (A2, B4) nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

Poređenjem ogleda B4 i B6 možemo zaključiti da povećanje sadržaja masti u mleku, pri 5% proteina, dovodi do statistički vrlo značajnih razlika vrednosti prinosa i apsolutnog sadržaja suve materije pokožice ($p < 0,01$), kao i statistički značajnih razlika ($p < 0,05$) apsolutnih sadržaja masti i proteina pokožice (Prilog, Tabela 4).

Ako zbirno posmatramo oglede B serije i to uzorke od B1-B6, u kojima je posmatrano variranje sadržaja masti mleka pri različitim nivoima proteina mleka, kao i njihovo poređenje sa referentnim uzorkom A2, možemo uočiti veoma izražene pravilnosti. Već smo komentarisali pri poređenju grupa uzoraka sa nivoima proteina od 3,4%, odnosno 4,2% (poglavlja 5.3.1.1 i 5.3.1.2), da se sa porastom sadržaja proteina mleka umanjuje uticaj rastućeg sadržaja masti. Uključivanjem u analizu i uzoraka B4 i B6, kod kojih je sadržaj proteina mleka 5% jasno se uočava nastavak prethodno opisanog trenda. Naime, porastom sadržaja proteina mleka na 5% uočava se dodatno slabljenje uticaja sadržaja masti mleka na sastav pokožica, što se u slučaju pomenutih uzoraka demonstrira nemogućnošću poređenja podataka. Kada celovito analiziramo podatke sastava vidimo da se pri 3,4% proteina javljaju izražene razlike u sastavu, da su pri 4,2% proteina razlike neznatne (prisutne samo u slučaju jednog parametra), dok su u slučaju 5% proteina međusobne razlike između uzoraka toliko male i da su unutar grupne razlike uslovljene uticajem nekontrolisanih faktora (verovatno ambijentalnih uslova) praktično onemogućile poređenje uzoraka. Međutim, kada analiziramo parametre apsolutnog sadržaja proteina, situacija je potpuno suprotna. Pri 3,4% proteina mleka parametre apsolutnog sadržaja proteina je zbog bliskosti srednjih vrednosti bilo nemoguće analizirati; pri 4,2% proteina se pokazuju izvesne statistički značajne razlike između pojedinih parametara, dok se u slučaju 5% proteina uočava veoma jasna i statistički značajna, a u pojedinim slučajevima i vrlo značajna razlika između ispitivanih parametara pokožica.

5.3.2 Uticaj sadržaja proteina mleka na prinos i sastav pokožica

U okviru analize uticaja sadržaja proteina mleka na sastav i prinos pokožica, ogledi su klasifikovani u tri grupe, u zavisnosti od sadržaja masti mleka od 4; 6 i 8%.

5.3.2.1 Mleko sa 4% masti

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sadržaja proteina mleka, pri 4% masti mleka, prikazani su u Tabeli 35, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 36.

Tabela 35. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja proteina mleka pri 4% masti mleka

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A2 (4/3,4)	58,50±5,41	7,97±0,07	70,50±4,62 a	83,43±3,13	11,42±0,84 a
B3 (4/4,2)	62,83±1,76	7,72±0,19	73,76±2,12 a	85,19±1,41	10,47±0,20 a
B4 (4/5)	60,33±4,93	8,25±0,96	70,84±2,11 a	85,30±8,65	11,63±1,11 a

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik <1);

Tabela 36. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja proteina mleka pri 4% masti mleka

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A2 (4/3,4)	32,28±2,01 a	18,95±2,88 a	2,57±0,14 a	22,67±2,82 a	9,61±0,87 a	7,34±0,73
B3 (4/4,2)	36,35±1,36 ab	22,84±0,95 a	2,81±0,12 a	26,80±0,69 a	9,55±1,04 a	8,14±0,04
B4 (4/5)	40,61±3,40 b	24,50±2,85 a	3,36±0,55 a	28,80±3,16 a	11,81±0,61 b	7,43±1,52

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik <1);

Analizom podataka iz Tabela 35 i 36 možemo zapaziti da variranjem sadržaja proteina u mleku sa 3,4 na 5%, pri konstantnoj vrednosti sadržaja masti od 4%, dolazi do variranja sadržaja masti i proteina u uskim, skoro identičnim intervalima variranja. Apsolutne količine masti i proteina variraju u sličnim, mada širim intervalima, pri čemu razlike variranja ovih parametara nisu statistički značajne.

Povećanjem sadržaja proteina u mleku sa 3,4 na 5% pri 4% masti dolazi do povećanja prinosa za oko 26%. Grupnim poređenjem posmatranih ogleda (A2, B3, B4), uočava se da sadržaj proteina u mleku ima statistički značajan uticaj na prinos i sadržaj vode u pokožici (Prilog, Tabela 5). Poređenjem prinosa ogleda A2, B3 i B4,

ustanovljene su statistički veoma značajne razlike između oglada A2 i B4 ($p < 0,01$), dok razlike prosečnih vrednosti prinosa oglada A2 i B3, kao i oglada B3 i B4 statistički nisu značajne (Prilog, Tabela 5).

Poređenjem oglada sa graničnim, tj. najmanjim i najvećim sadržajem proteina (A2 i B4) možemo videti da su indeksi povećanja (*IPS*), apsolutnog sadržaja masti, odnosno proteina, kod uzorka oglada B4 u odnosu na uzorak A2, skoro identični i iznose oko 30%. S tim u vezi, interesantno je sagledati dinamiku indeksa povećanja apsolutnih količina masti i proteina pokožice kroz uticaj rastućih sadržaja proteina mleka. Tako, poređenjem oglada A2, B3 i B4 možemo ustanoviti da porast proteina sa 3,4% na 4,2% favorizuje uticaj masti, koji se oglada u povećanju apsolutne količine masti za oko 20%, dok je porast proteina bio za samo oko 9%. Međutim, daljim povećanjem sadržaja proteina u mleku, sa 4,2 na 5% dolazi do promene ponašanja u smislu preovlađujućeg uključivanja proteina u pokožicu, tako da je indeks porasta apsolutne količine proteina oko 19%, a masti oko 7%. Navedeni podaci su u saglasnosti sa ranije ustanovljenim stanovištem da pri nižem sadržaju proteina u mleku, rastući sadržaj masti ima dominantan uticaj na obim uključivanja i masti i proteina u pokožicu.

5.3.2.2 *Mleko sa 6% i 8% masti*

Prinosi, sastav i apsolutni sadržaji komponenata sastava uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od sadržaja proteina mleka, pri 6 i 8% masti mleka prikazani su u Tabeli 37.

Tabela 37. Prinosi, sastav, apsolutne količine i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sadržaja proteina mleka pri 6 i 8% masti mleka

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Sadržaj, %		Apsolutni sadržaj, g		M/P
		Mast, %	Proteini, %	Mast, g	Proteini, g	
B1 (6/3,4)	38,74±3,40 a	62,83±4,65	6,49±0,65 a	24,26±1,44 a	2,52±0,43 a	9,81±1,77
B5 (6/4,2)	46,91±0,87 b	65,50±2,78	7,24±0,17 a	30,72±1,17 b	3,40±0,10 b	9,04±0,21
B2 (8/3,4)	40,67±1,53 a	70,67±4,65 a	5,55±0,42 a	28,70±1,05 a	2,26±0,25 a	12,83±1,78 a
B6 (8/5)	53,40±4,81 b	61,83±2,02 b	8,02±0,44 b	33,02±3,14 a	4,27±0,31 b	7,73±0,64 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F -količnik < 1)

Analiziranjem podataka statističke analize posmatranih grupa možemo uočiti izražen uticaj povećanja sadržaja proteina u mleku na sastav pokožice, pri čemu je izraženiji pri većim sadržajem masti (Tabela 37). Poređenjem oglada B2 i B6

ustanovljen je vrlo značajan uticaj proteina mleka ($p < 0,01$) na procentualno i apsolutno učešće proteina u pokožici, kao i na odnos masti i proteina u pokožici (Prilog, Tabela 7). U isto vreme porast sadržaja proteina mleka sa 3,4% na 5% ima značajan uticaj na procentualno učešće masti u pokožici ($p < 0,05$).

Analiziranjem grupnih poređenja ogleda B1 i B5, odnosno ogleda B2 i B6, (Prilog, Tabela 7), možemo zaključiti da porast proteina i pri 6% i 8% masti mleka ima statistički značajan uticaj na povećanje prinosa pokožica, koje iznosi 21% odnosno 31% (Tabela 37). Interesantno je zapaziti da indeksu povećanja prinosa kod ogleda sa većim sadržajem masti dominantno doprinose proteini. Naime, kod ogleda sa 8% masti (B2 i B6) može se ustanoviti da masti, iako su značajno uvećane, gube primat nad proteinima, tako da procentualno učešće masti ima pad za oko 12,5%, dok učešće proteina beleži porast od oko 44,5%. U isto vreme, apsolutne vrednosti masti se povećavaju za samo 15,1%, dok proteini rastu za čak 88,9%.

Posmatranjem ogleda sa manjim sadržajem masti uočava se drugačija situacija, odnosno, više ujednačen uticaj povećanih sadržaja proteina mleka u odnosu na prethodnu grupu ogleda. Naime, povećanjem sadržaja proteina u mleku, dolazi do povećanja svih komponenata pokožice, pri čemu je porast procentualnog učešća proteina dvostruko veći od porasta procentualnog sadržaja masti. Takođe, i porast apsolutnih količina proteina je za oko 30% veći od porasta apsolutne količine masti u pokožici.

Na osnovu ovih ogleda moglo bi se zaključiti da, i pored povećanog učešća masti u mleku, pojačan sadržaj proteina od 4,2, i posebno od 5%, ima dominantan uticaj na sastav pokožica. Preovlađujući uticaj proteina je više izražen kod višeg nivoa proteina u mleku, bez obzira na veliko učešće masti u mleku, koje je u našem slučaju iznosilo 8%.

5.3.3 Uticaj dodatih proteina surutke mleka na prinos i sastav pokožica

U okviru analize uticaja dodatih proteina surutke u mleko za formiranje kajmaka, na sastav i prinos pokožica, ogledi su, na osnovu sastava mleka, grupisani u tri grupe, i to prema sledećem: 4% masti i 3,4% proteina; 6% masti i 4,2% proteina; i 8% masti i 5% proteina. Proteini surutke su dodavani u količini od 0,6%.

5.3.3.1 Mleko sa 4% masti i 3,4% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka od mleka sa 4% masti i 3,4% proteina, bez i sa dodatim proteinima surutke, prikazani su u Tabeli 38, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 39.

Tabela 38. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 4% masti i 3,4% proteina

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
A2 (4/3,4)	58,50±5,41	7,97±0,07	70,50±4,62	83,43±3,13 a	11,42±0,84
B7 (A2 + sp.)	58,67±2,02	7,90±0,22	68,10±4,05	86,24±2,20 a	11,62±0,65

*U zagradama su dati sadržaji masti/proteina u mleku, dodatni proteini surutke su označeni sa (sp)

**Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

***Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

****Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F-količnik < 1);

Tabela 39. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 4% masti i 3,4% proteina

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
A2 (4/3,4)	32,28±2,01 a	18,95±2,88 a	2,57±0,14 a	22,67±2,82 a	9,61±0,87 a	7,34±0,73
B7(A2 + sp.)	46,77±8,20 b	27,33±3,82 b	3,69±0,59 b	31,64±3,66 b	15,13±4,57 a	7,43±0,25

*Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F-količnik < 1).

Iz podataka prikazanih u Tabelama 38 i 39, odnosno grupnim poređenjem parametara ogleda B7 i standardnog ogleda A2, može se uočiti da dodatak proteina surutke u količini od 0,6% u mleko sastava 4% masti i 3,4% proteina dovodi do promena u prinosu i sastavu pokožica. Kada posmatramo brojčane vrednosti parametara ovih ogleda (Tabele 38 i 39), možemo videti da dodatkom proteina surutke procentualno učešće masti i proteina ostaje skoro nepromenjeno. Međutim, dodatak proteina surutke dovodi do značajnog skoro podjednagog porasta apsolutnih količina i masti i proteina u pokožici za oko 44%, kao i prinosa za oko 45%. U tom smislu, kada posmatramo statističku analizu prinosa i apsolutnih vrednosti parametara sastava (Prilog, Tabela 8) možemo izvesti zaključak da dodatak proteina surutke, ima statistički značajan uticaj na prinos i na sadržaje komponenti sastava pokožice ($p < 0,05$), dok u isto vreme, procentualna učešća masti i proteina se ne mogu upoređivati jer dolazi do veoma

velikih varijacija unutar grupe (koje su veće od varijacija između grupa). Ovakvi podaci ukazuju da proteini surutke svojim prisustvom značajno doprinose obimnijem uključivanju, kako proteina, tako i masti u sastav pokožica i kajmaka.

5.3.3.2 Mleko sa 6% masti i 4,2% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka od mleka sa 6% masti i 4,2% proteina, bez i sa dodatim proteinima surutke, prikazani su u Tabeli 40, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 41.

Tabela 40. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 6% masti i 4,2% proteina

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
B5 (6/4,2)	65,50±2,78 a	7,24±0,17 a	74,02±2,04 a	88,47±1,82 a	9,78±0,21 a
B8 (B5 + sp.)	60,67±1,76 a	7,91±0,49 a	72,34±1,98 a	83,86±1,13 b	10,95±0,81 a

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Tabela 41. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 6% masti i 4,2% proteina

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
B5 (6/4,2)	46,91±0,87	30,72±1,17 a	3,40±0,10	34,71±0,62 a	12,20±1,13	9,04±0,21 a
B8 (B5 + sp.)	44,33±5,94	26,84±3,09 b	3,53±0,68	32,04±4,09 a	12,29±2,11	7,69±0,67 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F-količnik <1);

Iz podataka prikazanih u Tabelama 40 i 41, odnosno grupnim poređenjem parametara ogleda B5 i ogleda B8, u kome su dodati proteini surutke, može se uočiti razlika u odnosu na prethodnu grupu poređenja (mleko standardnog sastava kome su dodati proteini surutke). Na prvi pogled, izgleda da dodatak proteina surutke u količini od 0,6% u mleko fortifikovanog sadržaja i masti i proteina (6% masti i 4,2% proteina), ne dovodi do značajnih promena u ponašanju komponenata mleka. Grupnim poređenjem ova dva ogleda (Prilog, Tabela 8), može se zaključiti da dodatak proteina surutke nema značajan uticaj na procentualne i apsolutne sadržaje komponenata sastava ($p>0,05$), dok prinosi i apsolutni sadržaji proteina, dodatkom proteina surutke,

pokazuju veoma velike varijacije unutar grupe, većih od varijacija između grupa, te se stoga ovi parametri ne mogu upoređivati (Prilog, Tabela 8). Kada posmatramo brojčane vrednosti parametara masti i proteina pokožice (Tabele 40 i 41), možemo videti da dodatkom proteina surutke dolazi do blagog pada procentualnog (sa 65,5% na 60,67%) i apsolutnog učešća masti sa 30,72g na 26,84g. Istovremeno dolazi do blagog povećanja procentualnog (sa 7,24% na 7,91%) i apsolutnog učešća proteina sa 3,40g na 3,53g. Međutim, prinosi beleže pad vrednosti sa izraženim variranjima unutar uzorka, pri čemu je koeficijent varijacije, (Prilog, Tabela 12), izraženiji kod oglada B8 (13,41%) u odnosu na prinos oglada B5 (1,85%).

Ako detaljnije analiziramo uticaj dodatih proteina surutke na proces formiranja pokožica možemo zapaziti da je dodatak proteina surutke doprineo porastu značaja proteina u procesu formiranja pokožice. Naime, analiziranjem prethodnih oglada je ustanovljeno da porast sadržaja ukupnih proteina mleka dovodi do izraženije uloge proteina u procesu nastajanja pokožice, pri čemu se smanjuje vrednost odnosa M/P, dok prinos raste. Dodatkom proteina surutke se dodatno pojačava opisani trend, pa tako pokožica formirana na mleku sa 4,2% proteina i 6% masti, u slučaju dodavanja proteina surutke, pokazuje dodatno smanjenje apsolutne količine masti (za oko 12,6%), uz istovremeno dodatno povećanje apsolutne količine proteina (za oko 3,8%), što rezultira u smanjenju odnosa M/P sa 9,04 na 7,69 (Tabela 41). Napred navedeno smanjenje apsolutne količine masti uz istovremeno povećanje apsolutne količine proteina, za posledicu je imalo blago smanjenje prinosa.

5.3.3.3 Mleko sa 8% masti i 5% proteina

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka od mleka sa 8% masti i 5% proteina, bez i sa dodatim proteinima surutke, prikazani su u Tabeli 42, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 43.

Iz podataka prikazanih u Tabelama 42 i 43, odnosno grupnim poređenjem parametara oglada B6 sa ogledom B9 kome su dodati proteini surutke, može se uočiti sličnost u odnosu na prethodnu grupu poređenja (mleko pojačanog sastava kome su dodati proteini surutke). I kod ovog seta oglada može se izvesti zaključak da dodatak

proteina surutke u količini od 0,6% u mleko izrazito pojačanog sadržaja i masti i proteina (8% masti i 5% proteina), ne dovodi do značajnih promena u ponašanju komponenata mleka, koje bi se reflektovale na sastav pokožica (Prilog, Tabela 8).

Tabela 42. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 8% masti i 5% proteina

Ogled (%m/%p)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
B6 (8/5)	61,83±2,02 a	8,02±0,44 a	74,75±1,96 a	82,71±1,15	10,74±0,76 a
B9 (B6 + sp.)	58,50±4,36 a	9,04±0,60 a	70,07±4,96 a	83,48±1,23	12,98±1,76 a

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F-količnik <1);

Tabela 43. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od dodatih proteina surutke u mleko sa 8% masti i 5% proteina

Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
B6 (8/5)	53,40±4,81	33,02±3,14 a	4,27±0,31	39,89±3,28 a	13,51±1,89	7,73±0,64 a
B9 (B6 + sp.)	51,61±6,94	30,00±2,04 a	4,69±0,93	35,93±2,31 a	15,67±4,71	6,51±0,88 a

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati grupnim poređenjem (F-količnik <1);

Grupnim poređenjem ova dva oglada može se zaključiti da dodatak proteina surutke nema značajan uticaj na procentualne i apsolutne sadržaje komponenata sastava ($p>0,05$), dok se apsolutne količine proteina i prinosa ne mogu vršiti poređenja. Kada posmatramo brojčane vrednosti parametara masti i proteina pokožica (Tabele 42 i 43), možemo ustanoviti slične trendove kao kod prethodnog oglada. Dodatkom proteina surutke dolazi do blagog pada procentualnog (sa 61,83% na 58,50%) i apsolutnog sadržaja masti sa 33,02g na 30,00g. U isto vreme dolazi do blagog povećanja procentualnog (sa 8,02% na 9,04%) i apsolutnog sadržaja proteina sa 4,27g na 4,69g. Međutim, količine prinosa beleže pad vrednosti sa izraženim variranjima unutar uzorka (Tabela 43).

Komentarisani rezultati su u potpunoj saglasnosti sa prethodno opisanim podacima u odeljcima 5.3.1 i 5.3.2. Detaljnijim analiziranjem se uočava da dodatak proteina surutke indukuje dodatno pojačavanje uticaja proteina na proces formiranja pokožice, što se jasno sagledava kroz indeksno posmatranje parametara sastava (indeks pada učešća masti u pokožici iznosi 5,4, dok indeks porasta učešća proteina iznosi 12,7%).

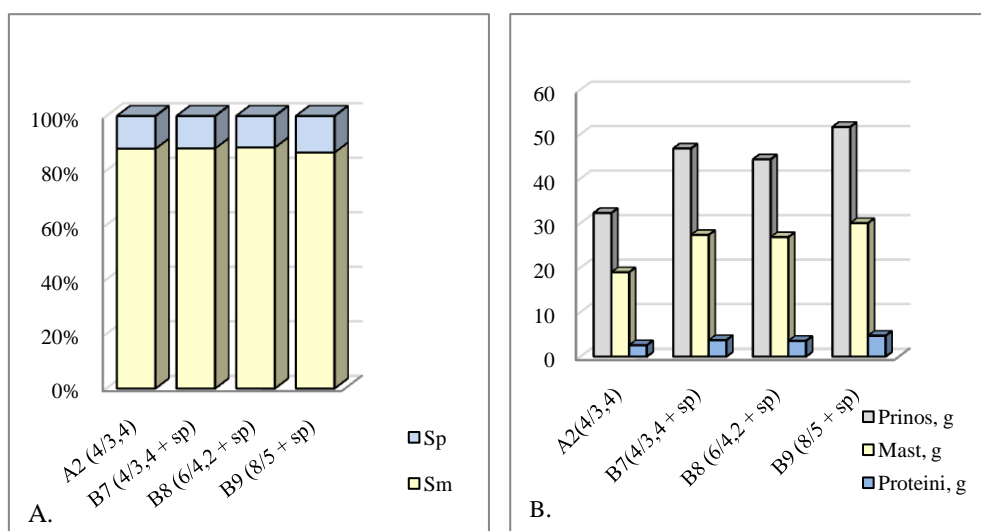
5.3.4 Uporedna analiza uticaja sadržaja masti i proteina mleka na prinos i sastav pokožica

Pri analiziranju sastava pokožica uzoraka B1-B6 možemo uočiti izvesne pravilnosti u uticaju sadržaja masti, odnosno, proteina u mleku na sadržaj masti i proteina u pokožici. Generalno, možemo zaključiti da se sa porastom sadržaja proteina u mleku umanjuje uticaj rastućeg sadržaja masti u mleku. Karakter i intenzitet uticaja proteina u mleku preovlađujuće zavisi od njihove koncentracije u mleku. Na osnovu rezultata ovog seta oglada možemo pretpostaviti da u slučaju rastućeg sadržaja proteina mleka, pri različitim koncentracijama masti mleka, u jednom momentu, odnosno pri određenoj koncentraciji proteina u mleku, dolazi do promene karaktera njihovog uticaja. Tako npr. kod mleka sa 4% masti, porast proteina u mleku sa 3,4% na 4,2% favorizuje uticaj masti, što rezultira povećanjem količine masti pokožice za oko 20%, a proteina za samo oko 9%. Međutim, daljim povećanjem sadržaja proteina u mleku, sa 4,2% na 5%, dolazi do promene karaktera ponašanja u smislu preovlađujućeg uključivanja proteina u pokožicu, tako da je indeks porasta proteina oko 19%, a masti oko 7%. Intenzitet preovlađujućeg uticaja proteina je jače izražen pri višem nivou proteina u mleku, bez obzira na veliko učešće masti u mleku, koje je iznosilo 8%. Tako, pri višem nivou proteina u mleku (5%), povećanje sadržaja masti sa 4 na 8% dovodi do povećanja sadržaja masti pokožice za samo 2,5%. Međutim, pri nižem nivou proteina u mleku (3,4%), uticaj proteina je daleko manji, tako da povećanjem sadržaja masti u mleku sa 4 na 8% dolazi do skoka sadržaja masti pokožice za oko 20%.

Pri analiziranju sastava pokožica uzoraka B7-B9 sagledava se uticaj dodatih proteina surutke na sadržaj masti i proteina pokožica. Dodatak proteina surutke doprinosi povećanju značaja proteina u procesu formiranja pokožice. Naime, analiziranjem ovih oglada je ustanovljeno da porast sadržaja ukupnih proteina mleka dovodi do pojačane uloge proteina u procesu nastajanja pokožice, pri čemu se smanjuje brojna vrednost odnosa M/P, dok vrednost prinosa raste.

Na osnovu poređenja rezultata referentnog oglada (A2) sa ogledima izvedenim uz dodatanje proteina surutke (B7, B8 i B9), možemo zaključiti da proteini surutke svojim prisustvom doprinose značajnom povećanju uključivanja većih količina i proteina i masti u pokožicu, pri čemu njihovi indeksi (S_m i S_p) variraju u uskim granicama. Zanimljivo je zapaziti da indeksi masti i proteina ostaju prilično stabilni čak

i u uslovima kada je u velikoj meri izmenjen inicijalni sastav mleka kome su dodati proteini surutke (Grafikon 22). Naime, kada posmatramo podatke sastava pokožica ogleda sa dodatim proteinima surutke B7, B8, B9 i referentnog ogleda A2 (Tabela 44) možemo uočiti da sadržaji masti uzoraka pokožica imaju vrlo bliske vrednosti, pri čemu ogled B9 i referentni ogled imaju identične vrednosti (58,5%). Sadržaj proteina varira u uskim granicama, izuzev ogleda sa najvećim sadržajem ukupnih proteina,(B9). Međutim, kada posmatramo apsolutne količine komponenata sastava pokožica B7, B8 i B9, možemo konstatovati izrazit porast apsolutnog sadržaja masti za oko 44,2%; 41,6% i 58,3%, odnosno proteina za 43,6%; 37,4% i 82,5% u odnosu na uzorak A2. Kao rezultat navedenog imamo povećanje prinosa pokožica za 44,9% kod ogleda B7; 37,3% kod ogleda B8 i čak 59,9% kod ogleda B9.



Grafikon 22. Indeksi masti i proteina (A) i uporedni prikaz prinosa i apsolutnih sadržaja masti i proteina (B) uzoraka pokožica referentnog ogleda A2; i ogleda sa dodatim proteinima surutke B7, B8 i B9

U zagradama su dati sadržaji masti/proteina u mleku, dodati proteini surutke su označeni sa (sp)

Tabela 44. Uporedni prikaz prinosa, procentualnih i apsolutnih sadržaja masti i proteina u uzorcima pokožica

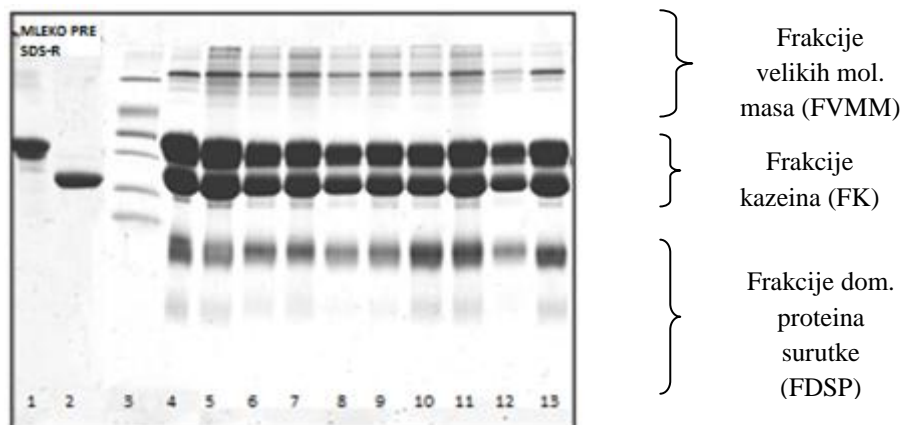
Ogled (%m/%p)	Prinos, g	Mast, %	Proteini, %	Mast, g	Proteini, g
A2 (4/3,4)	32,28	58,50	7,97	18,95	2,57
B7 (4/3,4 + sp)	46,77	58,67	7,90	27,33	3,69
B8 (6/4,2 + sp)	44,33	60,67	7,91	26,84	3,53
B9 (8/5 + sp)	51,61	58,50	9,04	30,00	4,69

5.3.5 Uticaj sastava mleka na distribucija proteinskih frakcija

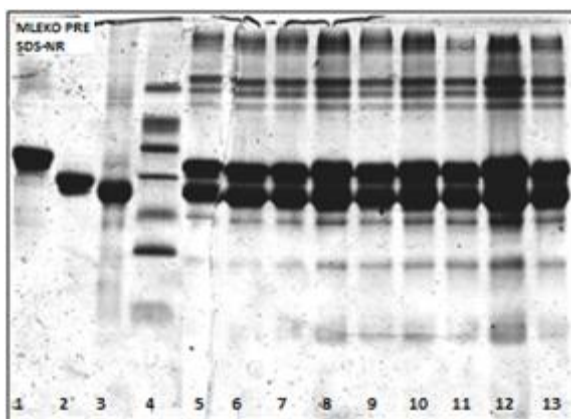
Uticaj sastava mleka na distribuciju proteinskih frakcija je sagledan karakterizacijom proteinskih frakcija mleka pre i preostalog nakon formiranja pokožica, i formiranih pokožica.

5.3.5.1 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka pre formiranja pokožica

Elektroforegrami uzoraka mleka pre formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analizirani SDS PAG elektroforezom u redukujućim i neredukujućim uslovima prikazani su na Slikama 15 i 16. Densitometrijskom analizom ustanovljeno je od 7-11 frakcija, koje smo radi jednostavnijeg i preglednijeg prikazivanja, grupisali kao u odeljku 5.2.2.1.



Slika 15. SDS elektroforegram uzoraka mleka pre formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih u redukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4. Sirovo mleko; 5-13. Uzorci mleka pre formiranja pokožica oglada B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 i B9.

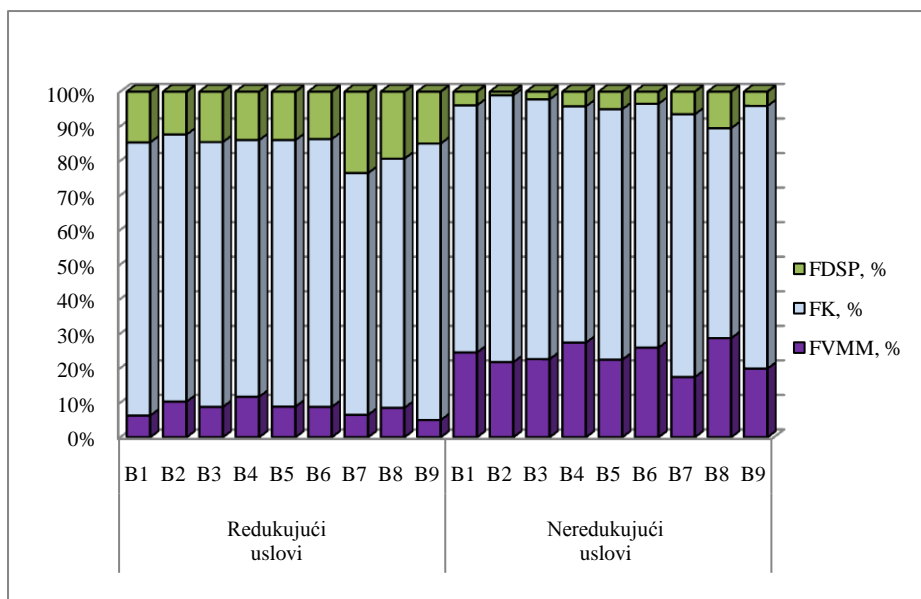


Slika 16. SDS elektroforegram uzoraka mleka pre formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih u neredukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard κ -CN; 4. Standard mol. mase 14.200-66.000; 5-13. Uzorci mleka pre formiranja pokožica oglada B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 i B9.

Distribucija grupa proteinskih frakcija u uzorcima mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, prikazana je na Grafikonu 23, distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima na Grafikonu 24, dok su njihovi međusobni odnosi kao i odnosi između FDSP prikazani u Tabeli 45.

Kada posmatramo rezultate denzitometrijske analize uzoraka mleka pre formiranja pokožica (Grafikon 23) uočava se izraženo smanjenje učešća FDSP i povećanje frakcija FVMM u neredukujućim uslovima u odnosu na iste u redukujućim uslovima. U okviru ogleđa u neredukujućim uslovima, učešće FVMM u uzorcima ogleđa B1-B6 pokazuje manji obim variranja, u rasponu od oko 21,5% do 27%, dok uzorci ogleđa B7-B9, kod kojih su dodati proteini surutke pokazuju nešto izraženije variranje (17-28%). U redukujućim uslovima je znatno manji udeo frakcija FVMM, što je i očekivano. Molekulske mase frakcija grupe FVMM u neredukujućim uslovima se kreću u rasponu od oko 68.000 do 115.000, dok su u redukujućim uslovima prisutne frakcije manjih molekulskih masa, iz grupe FVMM, koje se kreću u rasponu od oko 50.000 do oko 98.000.

Poređenjem frakcija FVMM u redukujućim uslovima uzoraka proizvedenih u ogleđima serija B (uticaj sastava mleka) i A (uticaj termičkog tretmana mleka) možemo zapaziti da su one zastupljene u sličnom ukupnom iznosu, kao i da su u njima prisutne frakcije sličnih molekulskih masa, pri čemu, kod obe serije ogleđa, dominira frakcija molekulske mase od oko 68.000. Međutim, kada uporedimo proteinske frakcije identifikovane u neredukujućim uslovima iz grupe FVMM ogleđa serije B i A, možemo uočiti da su kod ogleđa iz serije B identifikovane frakcije većih molekulskih masa, koje su istovremeno zastupljene i u većem ukupnom procentualnom iznosu. Frakcije najvećih molekulskih masa su identifikovane analizom mleka pre formiranja pokožica, ogleđa B6, koje se odlikuje najvećim sadržajem i masti (8%) i proteina (5%). Interesantno je zapaziti da uzorak B9 sa identičnim sastavom mleka kao uzorak B6, uz dodatak proteina surutke, ima unutar grupe FVMM frakcije sa manjim molekulskim masama. Moguće objašnjenje može biti gubitak frakcija veoma velikih molekulskih masa, koje su verovatno zaostale na ulazu u gel za koncentrisanje, a što je posebno uočljivo kod elektroforegrama uzoraka ogleđa B serije.

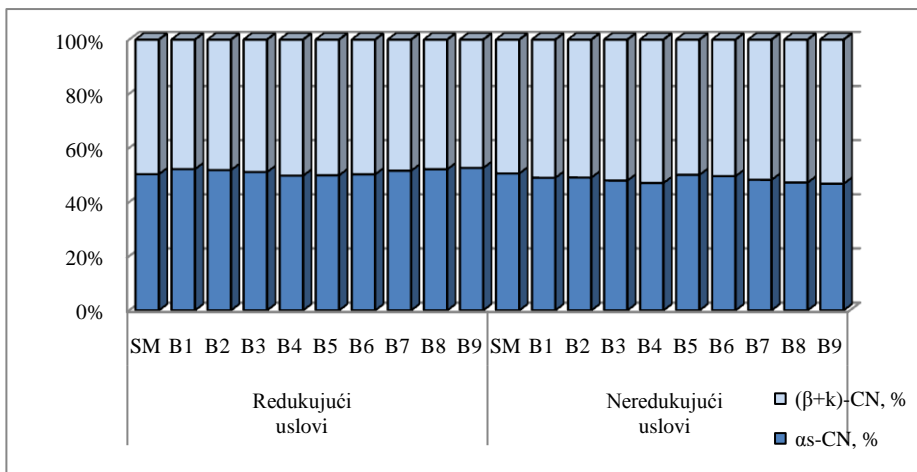


Grafikon 23. Distribucija proteinskih frakcija uzoraka mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Kada posmatramo učešće kazeinskih frakcija u ukupnim kazeinima u uzorcima mleka pre formiranja pokožica ogleda serije B, kao i njihov međusobni odnos (Grafikon 24, Tabela 45) možemo uočiti da sadržaji α -CN, s jedne strane, i β i k-CN, s druge strane, variraju u uskim granicama i imaju bliske vrednosti u poređenju sa sirovim mlekom. Međusobni odnos između kazeinskih frakcija $\alpha/(\beta+k)$ je stabilan i u redukujućim i u neredukujućim uslovima, čak i u uzorcima sa dodatim proteinima surutke (Grafikon 24, Tabela 45). Stabilnost posmatranih odnosa između kazeinskih frakcija je ustanovljena i kod uzoraka ogleda serije A (odjeljak 5.2.2.1). Stabilni odnos između kazeinskih frakcija, kao i njihove sličnosti sa uzorcima sirovog mleka smo objasnili stabilnošću kazeinske micelle. Rezultatima ogleda serije B možemo potvrditi iznetu pretpostavku o stabilnosti tj. slabo izraženoj disocijaciji kazeinske micelle pri normalnoj vrednosti pH mleka.

Kada posmatramo odnose između, FDSP možemo zapaziti da se u neredukujućim uslovima njihov odnos menja u pravcu izraženog smanjenja učešća β -LG.



Grafikon 24. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima sirovog mleka i uzoraka mleka pre formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujucim i neredukujucim uslovima

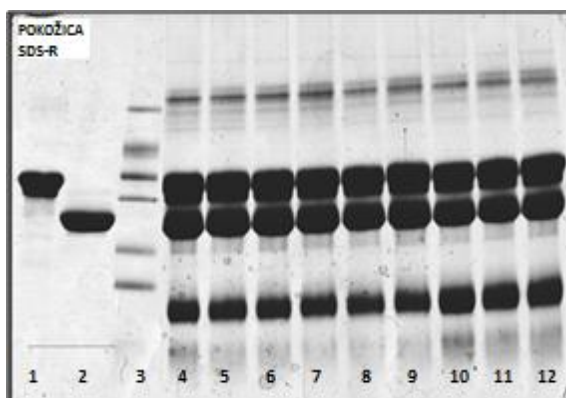
Tabela 45. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke sirovog mleka i uzoraka mleka pre formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	$\alpha_s\text{-CN}/(\beta+k)\text{-CN}$	$\beta\text{-LG}/\alpha\text{-LA}$
Redukujući uslovi	Sirovo mleko	1,00	4,98
	B1	1,09	5,28
	B2	1,07	4,25
	B3	1,04	6,93
	B4	0,99	6,22
	B5	1,00	7,77
	B6	1,01	8,26
	B7	1,06	6,87
	B8	1,09	6,60
	B9	1,11	8,70
Neredukujući uslovi	Sirovo mleko	0,98	2,30
	B1	0,96	0,84
	B2	0,96	/
	B3	0,92	0,61
	B4	0,89	0,46
	B5	1,00	1,25
	B6	0,98	0,74
	B7	0,93	0,83
	B8	0,89	0,92
	B9	0,88	2,23

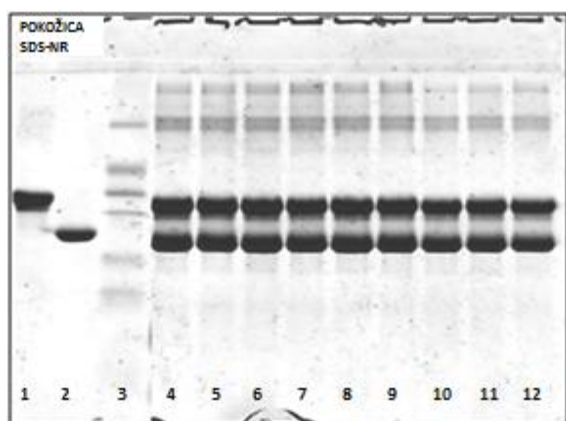
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujucim i neredukujucim uslovima

5.3.5.2. Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica

Elektroforegrami uzoraka pokožica, u zavisnosti od sastava mleka, analizirani SDS PAG elektroforezom u redukujućim i neredukujućim uslovima prikazani su na Slikama 17 i 18. Distribucija grupa proteinskih frakcija kao i njihovi međusobni odnosi prikazani su u Tabeli 46 i Grafikonu 25. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima prikazana je na Grafikonu 26, a njihovi međusobni odnosi kao i odnosi između FDSP prikazani su u Tabeli 47.



Slika 17. SDS elektroforegram uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih u redukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4-12. Uzorci pokožica ogleđa B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 i B9.

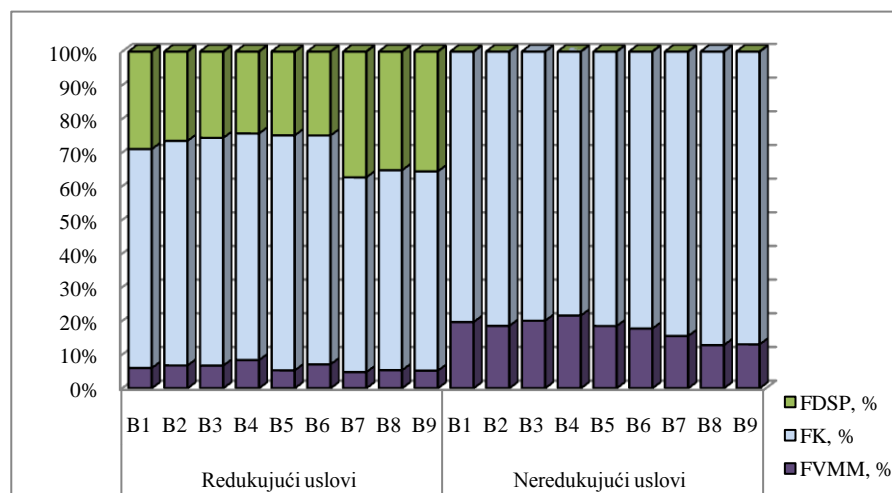


Slika 18. SDS elektroforegram uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih u neredukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4-12. Uzorci pokožica ogleđa B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 i B9.

Tabela 46. Distribucija grupa proteinskih frakcija i odnos FDSP/FK uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	Učešće frakcija, %			Odnos frakcija
		FVMM	FK	FDSP	%FDSP/%FK
Redukujući uslovi	B1	6,02	65,03	28,95	0,44
	B2	6,78	66,73	26,50	0,40
	B3	6,74	67,65	25,61	0,39
	B4	8,36	67,32	24,32	0,36
	B5	5,33	69,81	24,86	0,36
	B6	7,11	67,98	24,91	0,37
	B7	4,80	57,85	37,35	0,65
	B8	5,38	59,41	35,21	0,59
	B9	5,22	59,21	35,57	0,60
Neredukujući uslovi	B1	19,69	80,31	0	0
	B2	18,54	81,46	0	0
	B3	20,06	79,94	0	0
	B4	21,62	78,39	0	0
	B5	18,50	81,50	0	0
	B6	17,74	82,26	0	0
	B7	15,52	84,48	0	0
	B8	12,83	87,17	0	0
	B9	13,05	86,95	0	0

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujícím i neredukujícím uslovima



Grafikon 25. Distribucija proteinskih frakcija uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujícím i neredukujícím uslovima

Analizom rezultata denzitometrijske analize uzoraka pokožica u redukujícím uslovima se uočava da se kod uzoraka B1-B6 učešće FK u ukupnim proteinima kreće u intervalu od 65,03% do 69,81%, učešće FDSP u intervalu od 24,86% do 28,95%, dok je

zastupljenost FVMM u intervalu od 5,33% do 8,36%. Poređenjem distribucije proteinskih frakcija pokožica sa njihovom distribucijom u mleku pre formiranja pokožica (odjeljak 5.3.5.1), uočava se značajan pad učešća kazeinskih frakcija i istovremeni značajan porast učešća FDSP. Ovakva kretanja su rezultirala da se međusobni odnos FK/FDSP, koji se u mleku nalazi u uskom intervalu, prosečno oko 0,18, povećao i u pokožici iznosi prosečno oko 0,39 (od 0,36 do 0,44). Promena odnosa FK/FDSP jasno ukazuje da je u nastanku pokožice prisutan selektivni mehanizam uključivanja pojedinih proteinskih frakcija mleka, koji favorizuje uključivanje proteina surutke, a umanjuje učešće kazeina. Istovremeno, promena sastava mleka nije značajno uticala na afinitet ni proteina surutke, ni kazeina ka uključivanju u pokožicu.

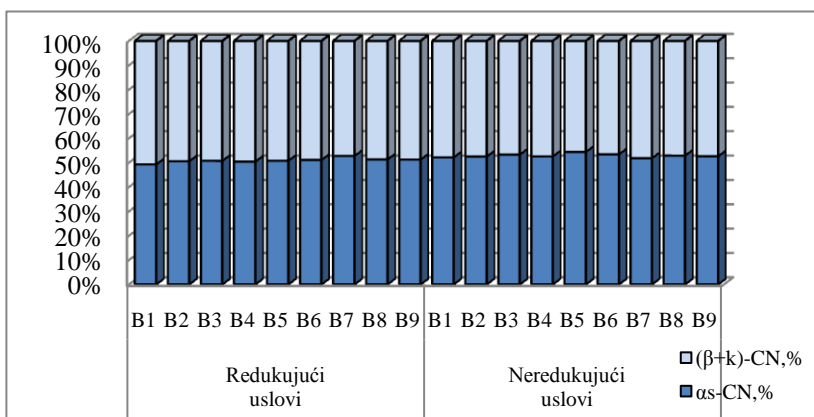
Analizom uzoraka, u redukujućim uslovima, kod kojih su dodati proteini surutke (uzorci B7-B9) jasno se vidi da se učešće proteina surutke u ukupnim proteinima pokožice dodatno povećalo i kretalo se u intervalu od 35,21% do 37,35%, a da se učešće kazeinskih frakcija dodatno smanjilo i kretalo se u intervalu od 57,85% do 59,41%, što je rezultovalo da se međusobni odnos FDSP/FK povećao i kretao se u intervalu 0,60 do 0,65 (Tabela 46). Vrlo je interesantno uporediti odnos FDSP/FK uzoraka termički tretiranog mleka i pokožica ogleđa B7-B9 (odjeljak 5.3.5.1). Naime, pri analizi uzoraka ogleđa B7-B9 uočen je sukcesivni porast nivoa proteina u mleku sa 3,4% na 4,2%, odnosno 5%, što je imalo za posledicu da se kod pomenutih uzoraka mleka odnos FDSP/FK smanjuje sa 0,34 na 0,27, odnosno 0,19. Međutim, odnos FDSP/FK uzoraka pokožica je bio prilično stabilan. Konstantnost odnosa FDSP/FK uzoraka pokožice, uprkos njihovom opadajućem odnosu u mleku ukazuje da uticaj koji proizilazi iz dodatka proteina surutke u mleko ima znatno snažniji efekat na tok formiranja pokožice od efekta porasta koncentracije ukupnih proteina mleka. Iz pomenute analize se može zaključiti da su proteini surutke značajniji faktor formiranja pokožice od kazeina. Imajući u vidu da smo u prethodnim analizama istakli da je uloga proteina mleka u nastanku pokožice daleko snažnija od uloge masti, to se kao celoviti zaključak može istaći da na formiranje pokožice najsnažniji uticaj imaju proteini surutke, nešto slabiji uticaj ima kazein, dok mlečna mast ima najmanje snažan uticaj na tok formiranja pokožice.

Poređenjem grupa frakcija pokožica u redukujućim i neredukujućim uslovima možemo uočiti potpuni izostanak frakcija FDSP u neredukujućim uslovima, na osnovu

čega možemo zaključiti da su svi proteini surutke u pokožici prisutni u formi disulfidno vezanih kompleksa. Pomenuto smanjenje, tj. potpuni nestanak FDSP u neredukujućim u odnosu na redukujuće uslove (gde je iznosilo od 24,32-37,35%), je veće od povećanja učešća FVMM u neredukujućim uslovima sa iznosom od 12,83-21,62%. U isto vreme FK su se znatno povećale i imaju vrednosti iznad uobičajenih za sastav mleka (78,39-87,17%). Ovo zapažanje navodi na zaključak da je jedan deo proteina surutke praktično izgubljen za analizu. Postojanje izražene količine proteinskog materijala zarobljenog na ulazu u gel za koncentrisanje daje osnovu za pretpostavku da su u pitanju frakcije veoma velikih molekulskih masa, koje u svom sastavu verovatno u značajnoj meri sadrže frakcije iz grupe FDSP.

Kada posmatramo distribuciju tj. učešće pojedinih kazeinskih frakcija u ukupno izdvojenim kazeinima (Grafikon 26), uočava se da je odnos između pojedinih kazeinskih frakcija sličan kao kod sirovog mleka, odnosno kod mleka pre formiranja pokožica (odjeljak 5.3.5.1) i da ga odlikuju bliske vrednosti, koje su veoma stabilane, kako u redukujućim, tako i u neredukujućim uslovima. Ovakav rezultat potvrđuje već iznetu pretpostavku da proces formiranja pokožice praktično ne utiče na međusobne odnose između pojedinih kazeinskih frakcija u sastavu pokožice. Takođe, može se pretpostaviti da se kazein u pokožicu preovlađujuće uključuje u micelarnoj formi, čime se praktično omogućava zadržavanje stabilnih međusobnih odnosa pojedinih kazeinskih frakcija. Pomenuti odnosi kazeinskih frakcija u pokožici su stabilni, čak i kad je sastav mleka prilično izmenjen u odnosu na tipični. Možemo zaključiti da sastav mleka, pa čak ni dodatak proteina surutke (u približno dvostrukoj količini od tipično prisutne u mleku) ne utiču na međusobni odnos kazeinskih frakcija koje se uključuju u pokožicu. Međutim, kada posmatramo odnose između, β -LG i α -LA, u redukujućim uslovima (Tabela 46) možemo videti da se njihov odnos menja pod uticajem hemijskog sastava mleka. Međutim, iz raspoloživih podataka nije moguće sagledati pravilnosti u uočenim promenama. Najmanje vrednosti pomenutog odnosa su ustanovljene kod oglada B7, B8 i B9 kod kojih su dodati proteini surutke, bez obzira na sadržaj ukupnih proteina u mleku. Značajna disperzija vrednosti međusobnog odnosa proteina surutke u uzorcima pokožica ukazuje da je ovom pitanju potrebno u budućim istraživanjima posvetiti veću pažnju.

Denzitometrijskom analizom elektroforegrama pokožica dobijenih u redukujućim uslovima u grupi FVMM identifikovane su frakcije čije se molekulske mase kreću u rasponu od oko 53.000 do oko 86.000. Kod svih oglada preovlađujuće učešće imaju tri frakcije, čije su molekulske mase od oko 68.000-72.000, odnosno 76.000 i 82.000.



Grafikon 26. Distribucija kazeinskih frakcija u ukupnim kazeinima uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Tabela 47. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

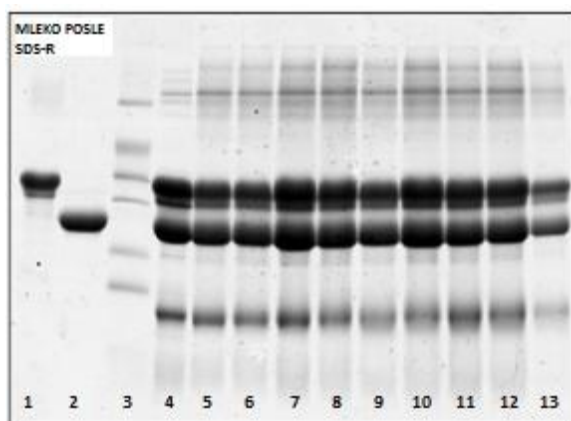
Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	α_s -CN/ $(\beta+k)$ -CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	B1	0,97	3,38
	B2	1,02	5,09
	B3	1,03	5,08
	B4	1,02	8,65
	B5	1,03	8,71
	B6	1,05	6,48
	B7	1,12	2,56
	B8	1,06	3,34
	B9	1,05	3,75
Neredukujući uslovi	B1	1,09	/
	B2	1,11	/
	B3	1,14	/
	B4	1,11	/
	B5	1,19	/
	B6	1,15	/
	B7	1,08	/
	B8	1,12	/
	B9	1,11	/

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Posmatrano kod svih oglada iz ove grupe, denzitometrijska analiza u neredukujućim uslovima je pokazala da grupa FVMM u neredukujućim uslovima u odnosu na redukujuće, sadrži nekoliko frakcija kompleksa većih molekulskih masa, koje se kreću u rasponu od oko 53.000 do 100.000. Kod svih uzoraka su identifikovane identične frakcije, pri čemu preovlađujuće učešće u FVMM, sa više od 50% u svim uzorcima zauzima frakcija molekulske mase od oko 68.000-72.000. Takođe, kod svih uzoraka na samom ulazu u gel za razdvajanje izdvaja se frakcija molekulske mase od oko 100.000, sa učešćem od 1,5-3,2% u ukupno identifikovanim frakcijama, pri čemu najmanji sadržaj ove frakcije ima uzorak B2, a najveći uzorak B4.

5.3.5.3 Karakterizacija proteinskih frakcija mleka preostalog nakon formiranja pokožica

Elektroforegram uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih SDS PAG elektroforezom u redukujućim uslovima prikazan je na Slici 19. Slično kao kod dosadašnjeg razmatranja denzitometrijske analize uzoraka mleka i pokožica (odeljci 5.2.2 i 5.3.5) i ovde smo sve identifikovane proteinske frakcije klasifikovali u sledeće grupe: FVMM, FK i FDSP.



Slika 19. SDS elektroforegram uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka, analiziranih u redukujućim uslovima: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard mol. mase 14.200-66.000; 4. Sirovo mleko; 5-13. Uzorci mleka preostalog nakon formiranja pokožica oglada B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 i B9.

Distribucija grupa proteinskih frakcija u uzorcima mleka preostalog nakon formiranja pokožica, u zavisnosti od sastava mleka, prikazana je u Tabeli 48 i na Grafikonu 27. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima je prikazana na Grafikonu 28, a odnos između frakcija kazeina i frakcija proteina surutke u Tabeli 49.

Kada posmatramo procentualno učešće detektovanih grupa frakcija (Grafikon 27, Tabela 48) možemo uočiti sličnost u zastupljenosti i međusobnim odnosima koje smo utvrdili analiziranjem mleka pre formiranja pokožica (odjeljak 5.3.5.1).

Tabela 48. Uporedni prikaz distribucije grupa frakcija uzoraka mleka pre formiranja pokožica i mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

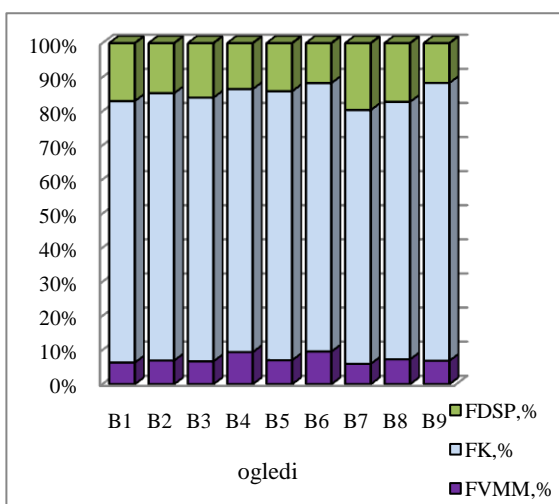
SDS PAGE u redukujućim uslovima	Ogled	Učešće frakcija, %		
		FVMM	FK	FDSP
Mleko pre form. pokožice	B1	6,28	79,07	14,65
	B2	10,38	77,68	12,44
	B3	8,80	76,64	14,56
	B4	11,73	74,29	13,98
	B5	8,88	77,13	13,99
	B6	8,79	77,51	13,70
	B7	6,50	69,96	23,54
	B8	8,53	72,09	19,38
	B9	4,99	80,02	14,99
Mleko nakon form. pokožice	B1	6,33	76,70	16,97
	B2	6,94	78,39	14,67
	B3	6,70	77,34	15,96
	B4	9,41	77,15	13,45
	B5	7,03	78,87	14,10
	B6	9,58	78,73	11,69
	B7	5,97	74,42	19,60
	B8	7,29	75,51	17,20
	B9	6,88	81,47	11,65

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

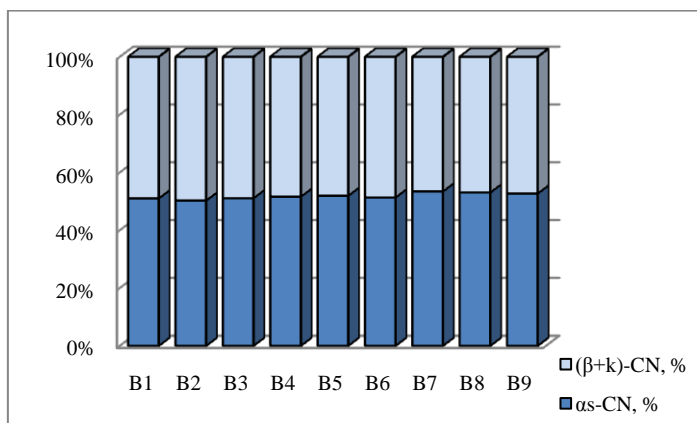
Kada posmatramo učešće pojedinih frakcija kazeina, kao i njihove međusobne odnose (Grafikon 28 i Tabela 49), možemo zaključiti da njihovi sadržaji variraju u uskim granicama. U poređenju sa podacima mleka pre formiranja pokožica možemo zaključiti da praktično nema promena u sadržajima, odnosno, da proces formiranja pokožice nije vidljivije narušio sadržaje i odnose koji su postojali u mleku pre formiranja pokožice. Ovi rezultati su podudarni sa rezultatima denzitometrijske analize mleka nakon formiranja pokožica ogleda iz serije A (odjeljak 5.2.2.3).

Kada posmatramo odnose između dominirajućih frakcija proteina surutke, β -LG i α -LA, (Tabela 49) možemo videti da se njihov odnos pod uticajem sastava mleka i procesa formiranja pokožice blago menja. Upoređujući količnik β -LG/ α -LA sa napred

anliziranim podacima mleka pre formiranja pokožice i sa podacima pokožice u redukujućim uslovima, možemo zaključiti da su vrednosti količnika proporcionalne i prilično ujednačene, što je takođe u saglasnosti sa rezultatima denzitometrijske analize ogleda serije A (odjeljak 5.2.2.3).



Grafikon 27. Distribucija grupa proteinskih frakcija uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima



Grafikon 28. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica, dobijenih u zavisnosti od sastava mleka
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima

Tabela 49. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke uzoraka mleka preostalog nakon formiranja pokožica dobijenih u zavisnosti od sastava mleka

SDS PAGE	Ogled	α s-CN/(β +k)-CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	B1	1,04	5,87
	B2	1,01	6,56
	B3	1,04	4,93
	B4	1,07	7,46
	B5	1,08	5,68
	B6	1,06	9,72
	B7	1,15	7,45
	B8	1,13	6,41
	B9	1,11	/

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujucim uslovima

5.4 MIKROSTRUKTURA POKOŽICA

5.4.1 Uticaj termičkog tretmana i sastava mleka na mikrostrukturu pokožica

U ovom segmentu rada prikazani su rezultati dobijeni skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) pokožica proizvedenih u okviru setova ogleđa A i B. Na Slikama od 20 do 31 su prikazane odabrane mikrostrukture pokožica, pri različitim uvećanjima. Radi boljeg sagledavanja mikrostrukture pokožica i poroznosti proteinskog matriksa, merene su dimenzije praznina unutar strukture matriksa, kao i zidova proteinskog matriksa, pri uvećanju 2000x, 5000x i 10000x. Kod praznina, koje su uglavnom nepravilnog kružnog oblika, meren je prečnik između najudaljenijih tačaka praznina.

Na mikrostrukturama pri uvećanju 2000x, uočava se da se pokožice generalno odlikuju prisustvom praznina sa manje ili više gusto isprepletanim proteinskim lancima. Izuzetak predstavlja pokožica ogleđa A1, čija se mikrostruktura razlikuje od svih ostalih analiziranih pokožica (Slike 20 i 21). Prema *Joshi i sar. (2004)* međuprostori, odnosno praznine u proteinskom matriksu sira, su mesta serumske faze i uklopljene masti. Kod kajmaka sadržaj proteina je u odnosu na sir višestruko manji i kreće se u intervalu od 6-7%, dok preostali udeo sastava čini mast sa 50-60% i voda sa 30-40% zastupljenosti (*Puđa i sar., 2004*). Slično tome, u hemijskom sastavu pokožica, proteini participiraju sa oko 10%, a masti oko 50-60% (*Puđa i sar., 2006*). S tim u vezi, na mikrostrukturi kajmaka, odnosno pokožica, može se očekivati znatno veća zastupljenost praznina unutar proteinskog matriksa, slično kao kod maslaca, koje su nastale eliminacijom vode (kao kontinualne faze) i masti (obuhvaćene proteinskim matriksom) iz uzoraka. Mlečna mast u kajmaku participira jednim delom u emulgovanom, a verovatno većim delom u deemulgovanom stanju. Prema *Dorđević (1978)* sličnost kajmaka i maslaca se ogleđa upravo u prisustvu masti najvećim delom u deemulgovanom obliku, odnosno u obliku slobodnih masti koje impregniraju ostale sastojke suve materije. Takođe, tokom dosadašnjeg rada na polju kajmaka, koji je prethodio izradi ove doktorske disertacije, došlo se do saznanja o postojanju deemulgovanih masti tokom procesa formiranja kajmaka. Naime, ustanovili smo da se mleko preostalo nakon formiranja i izuzimanja kajmaka otežano separira u separatoru, što bi bila uobičajena praksa u industrijskim uslovima, jer dolazi do veoma izraženog agregiranja masti i formiranja maslaca (*Puđa i Radovanović, neobjavljeni podaci*).

Uticaj termičkog tretmana mleka na strukturu pokožice analiziran je poređenjem mikrostrukture uzorka A1 i referentnog uzorka A2 (Slike 20-23). Uzorci pokožica A1 i A2 su dobijeni od mleka identičnog sastava, tretiranih različitim termičkim tretmanima. Uzorak pokožice A1 je u pripremi mleka imao, u odnosu na uzorak A2, slabiji termički tretman (85°C/10 minuta). Ovakav režim termičke obrade je bitno uticao na mikrostrukturu pokožice A1. Naime, na mikrostrukturama uzorka A1 se uočava izražena uniformnost proteinske strukture, kod koje dominiraju zaobljeni oblici, za koje možemo pretpostaviti da su rezultat postepenog umrežavanja proteinske faze mleka, koja je ravnomerno obuhvatala masne globule, kao dominantnu fazu u sastavu pokožice. Izgled proteinske strukture pokožice uzorka A1 bi se mogao uporediti sa izgledom pčelinjeg saća. Dimenzije praznina, pretežno sfernih oblika, u kojima je verovatno bila obuhvaćena masna faza pokožice, su od 1,5 do 5,9 μm , dok je debljina proteinskog materijala na pozicijama dostupnim za merenje u intervalu od 0,81 μm do 1,41 μm .

Nasuprot relativno uniformnoj strukturi zastupljenoj kod uzorka A1, struktura uzorka A2 se odlikuje značajnom zastupljenošću končastih segmenata, koji verovatno potiču od snažnije inkorporiranih denaturisanih proteina surutke, obzirom da je uzorak A2 proizveden od mleka sa strožijim termičkim tretmanom. Na mikrostrukturama uzorka A2, jasno se uočava značajno povećanje površine proteinskog matriksa, koji je verovatno imao značajnu ulogu u povezivanju masnih globula u zoni pokožice, kao i ulogu barijerne zone između vodene i masne faze pokožice. Veličine praznina su bile od 0,81 μm do 4,92 μm , dok je debljina proteinskog materijala merena na dostupnim pozicijama između praznina bila u intervalu od 1,62 μm do 2,62 μm . Končaste forme proteina surutke ostvaruju ulogu dopunskog vezivnog materijala između većih proteinskih agregata, tako da se stiče utisak da šupljine u strukturi uzorka A2, u odnosu na uzorak A1, imaju u većoj meri, izgled međusobno povezanih oblika. Generalno, struktura pokožice A2 deluje manje uređeno. Istovremeno, stiče se utisak većeg stepena razgranatosti proteinskog matriksa pokožice A2.

Analizom mikrostrukture uzoraka pokožica dobijenih od mleka različitog sastava, može se uočiti da sastav mleka ima veoma značajan uticaj na njihovu strukturu (Slike od 22-31). Kod uzorka B2 (Slike 24 i 25) se uočava izuzetno veliki obim prisustva filamentarne strukture. Pomenuti uzorak potiče od mleka sa standardnim sadržajem

proteina (3,4%) i značajno uvećanim sadržajem masti (8%). Ovakva forma mikrostrukture obezbeđuje izuzetno veliko povećanje površine kontakta proteinske faze sa preostale dve faze pokožice (masne i vodene faze). Naime, pokožica uzorka B2 sadrži čak 70,67% masti i samo 5,55% proteina, što čini da se odnos M/P povećao na čak 12,83. Takav odnos masti i proteina je moguć samo ukoliko proteinski matriks ima izuzetno veliku razućenost. Istovremeno, veoma malo nominalno ućešće proteina u pokožici, u uslovima ekstremne razućenosti matriksa, uslovljava da proteinski matriks bude izgrađen od znatno tanjih proteinskih agregata. Potvrda ovakvog stava proizilazi iz analize dimenzija pojedinih strukturnih elemenata mikrografa uzorka B2. Prećnici praznina, kod uzorka B2, se kreću u rasponu od 1,2 μm -3,34 μm , a debljina proteinskog matriksa od 0,40 μm -0,85 μm .

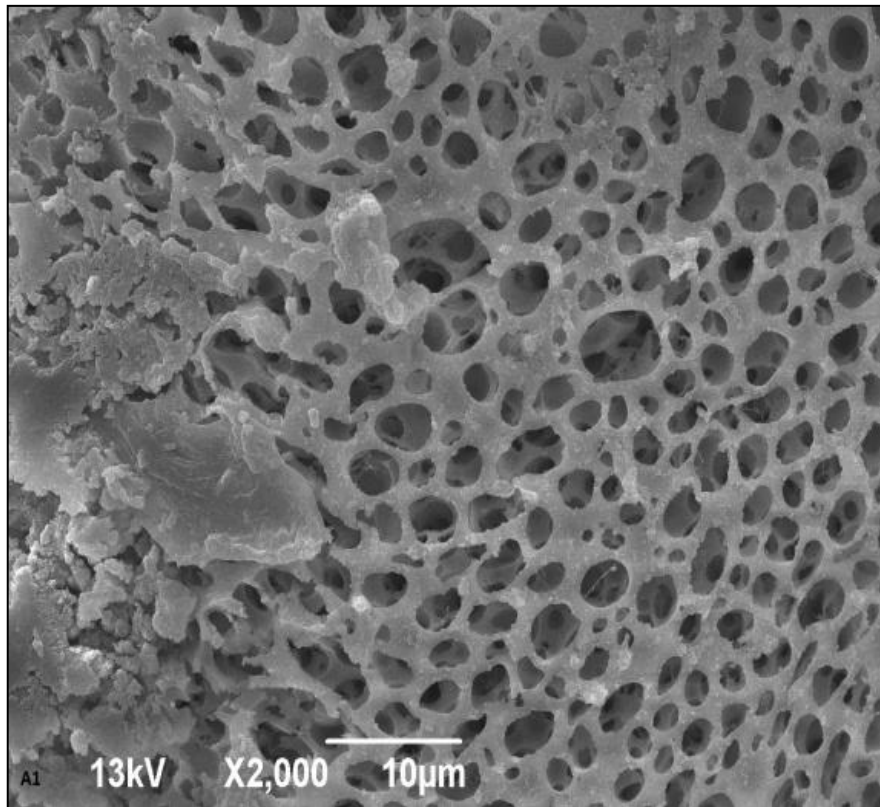
Nasuprot uzorku B2, uzorak B4 potiće od mleka sa standardnim sadržajem masti (4%) i značajno uvećanim sadržajem proteina (5%). Mikrostruktura uzorka B4 sugeriše na dominaciju zbijenije strukture proteinskog matriksa, koja bi se mogla opisati kao ljuspasta struktura (Slike 26 i 27). Pokožica uzorka B4 sadrži 60,33% masti i 8,25% proteina, što rezultira odnosom M/P od 7,43. Veoma veliko smanjenje odnosa M/P, u poređenju sa uzorkom B2 (42,1%, odnosno sa 12,83 na 7,43), za rezultat ima manje razućenu strukturu proteinskog matriksa, što se jasno vidi na mikrostrukturama. Analizom dimenzija strukturnih elemenata mikrostrukture uzorka B4 mogu se uočiti kratke zbijene lanćane forme proteinskog matriksa, koje spajaju praznine ćija se velićina prećnika kreće u rasponu od 1,89-4,27 μm . Ovakva mikrostruktura ukazuje da su dimenzije proteinskog matriksa samo delimićno povećane, sugerišući da je veoma velika kolićina proteina prisutna u uzorku B4, skoro za 50% veća u odnosu na uzorak B2, omogućila da se ljuspasto orijentisanim proteinskim matriksom može obezbediti dovoljan obim kontakta između masne i vodene faze pokožice. Ovim se može objasniti izostanak većeg obima filamentarnih elemenata strukture uzorka B4 i pojavu kratkih proteinskih lanćanih formi. Posmatranjem mikrostrukture uzorka B4 pri uvećanju 10 000x (Slika 27, b) mogu se jasno videti kazeinske micelle i zbijeni klasteri nagrađenih proteinskih agregata.

Dodatkom proteina surutke u mleko standardnog sastava (uzorak B7) mikrostruktura formirane pokožice ne pokazuje bitnije promene u odnosu na uzorak A2 koji se od B7 razlikuje samo u pogledu dodatih proteina surutke (Slike 28 i 29).

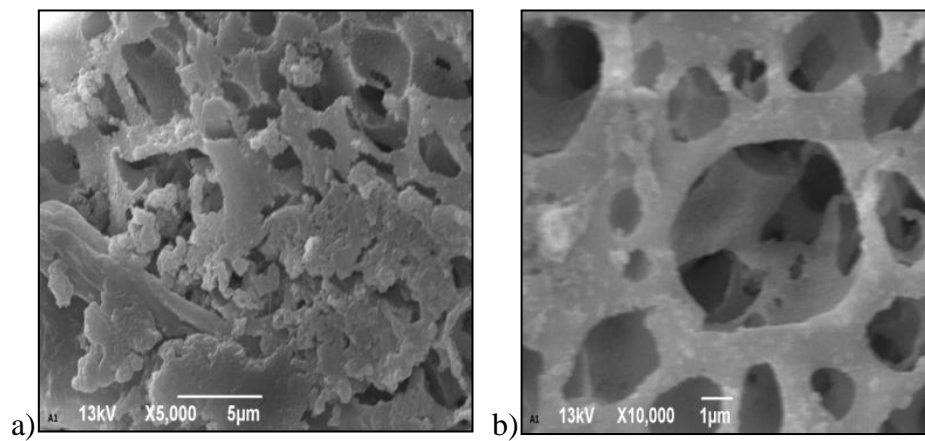
Strukturne elemente matriksa odlikuju vrednosti prečnika praznina od 1,06 μm -4,31 μm , koji su sličnih dimenzija u poređenju sa uzorkom A2. Međutim, kada posmatramo ostale elemente strukture matriksa kod ogleđa B7, za razliku od uzorka A2, može se uočiti da su u velikoj meri zastupljeni razvučeni proteinski lanci dimenzija od oko 0,3 μm , koji poput mostova spajaju formirane šupljine.

U slučaju mleka sa veoma velikim sadržajem masti i proteina, dodatak proteina surutke (uzorak B9) je u pogledu strukture doveo do nastanka veoma velikog prisustva filamentarnih elemenata matriksa prosečne debljine oko 0,2 μm -0,3 μm , što ukazuje na sličnost sa uzorkom B2, kod kojeg je visok nivo masti, ali bez prisustva proteina surutke, uslovio nastanak filamentarne strukture (Slike 30 i 31). Istovremeno, kod pokožice uzorka B9 se uočava sličnost sa uzorkom B4, jer je kod oba uzorka prisutna ljustasta struktura sa prisutnim prazninama, nešto manjih prečnika (1,0 μm -3,81 μm). Poređenje uzoraka B4 i B9 se može vršiti zbog činjenice da su dobijeni od mleka sa 5% proteina, kao i zbog činjenice da odnosi masti i proteina imaju bliske vrednosti. Naime, uzorak B9 ima vrednost M/P 6,51, što je veoma slično uzorcima B4 i B6 kod kojih indeks M/P ima vrednosti 7,43, odnosno 7,73, a koji su takođe dobijeni od mleka sa 5% proteina (Tabela 28) .

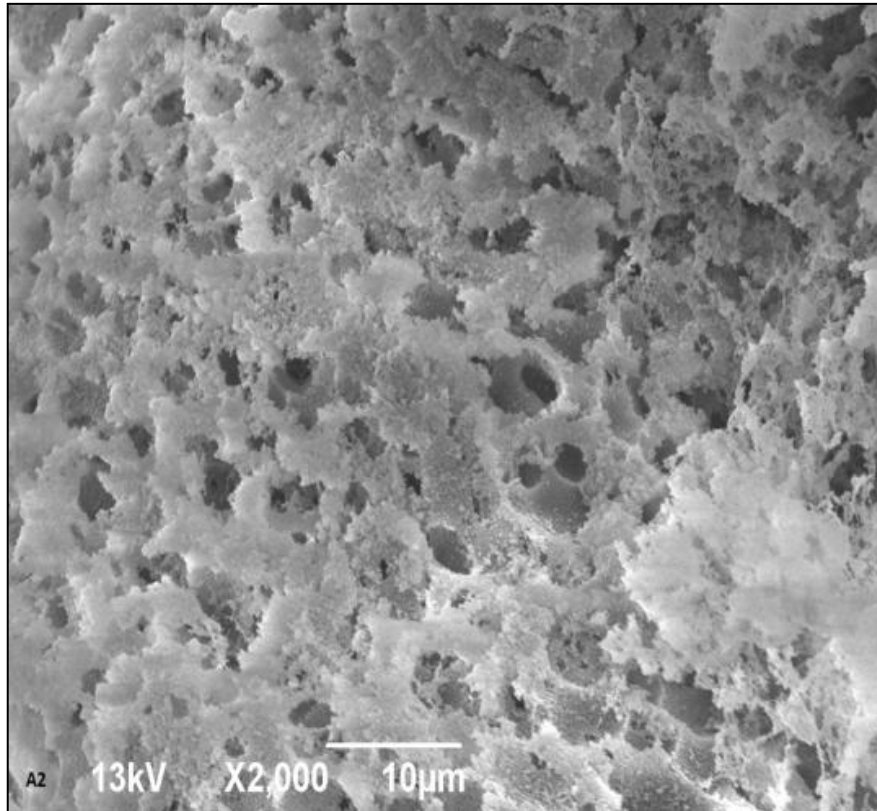
Posmatrajući mikrostrukture pokožica u celini, generalno se može zaključiti da je razuđenost strukture proteinskog matriksa usaglašena sa obimom prisustva obuhvaćene masne faze. S tim u vezi, ukoliko imamo standardni sastav mleka i uobičajen postupak proizvodnje kajmaka (uzorak A2), odnos M/P ima vrednosti oko 7. Ukoliko se javljaju promene u sastavu mleka ili u režimu termičke obrade, uočavaju se dramatične promene u strukturi pokožica. Povećanje vrednosti M/P uslovljava nastanak izrazito filamentarne strukture, uz istovremeno smanjenje debljine proteinskih lanaca, dok smanjenje indeksa M/P vodi ka ljustastoj strukturi i udebljanju proteinskih lanaca. Primena blažeg termičkog tretmana vodi ka znatno uniformnijoj strukturi, jasno sugerišući izostanak snažnijeg uticaja denaturisanih proteina surutke.



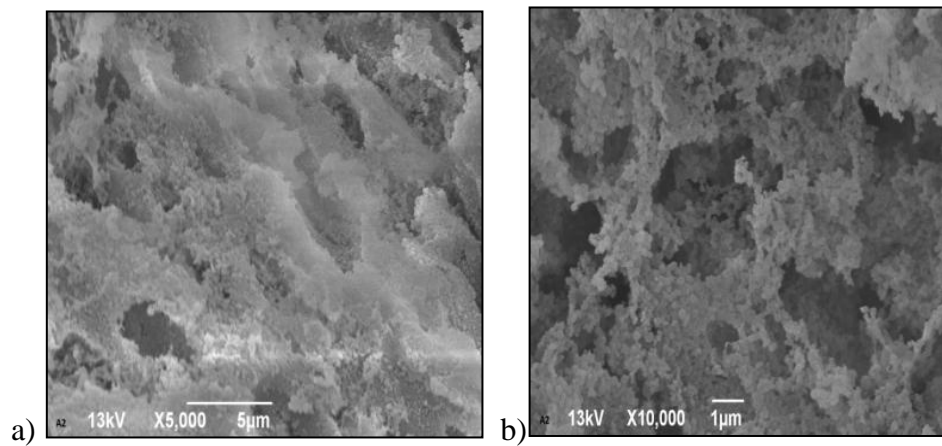
Slika 20. SEM mikrostruktura pokožice A1, uvećanje 2000x



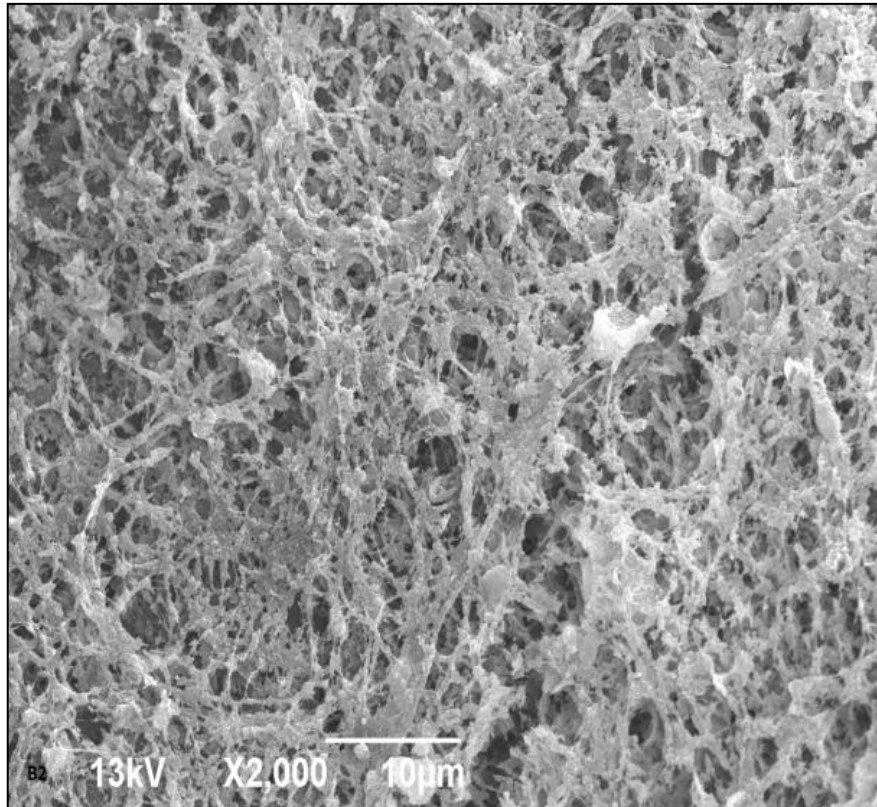
Slika 21. SEM mikrostruktura pokožice A1, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x



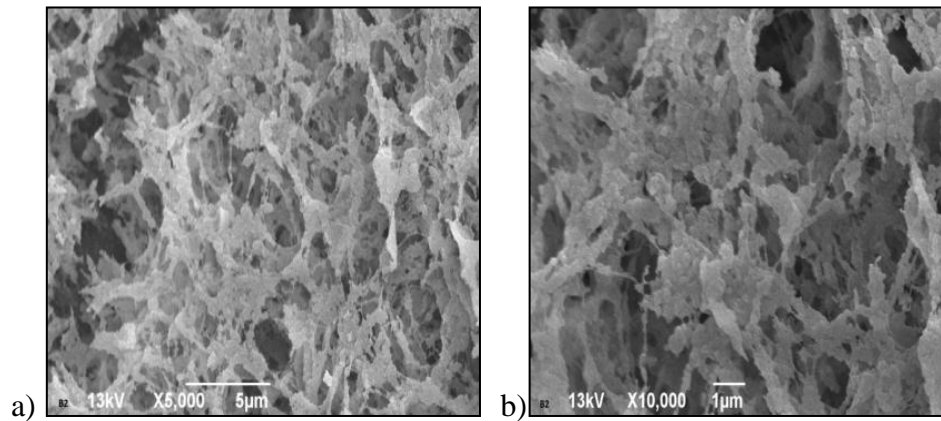
Slika 22. SEM mikrostruktura pokožice A2, uvećanje 2000x



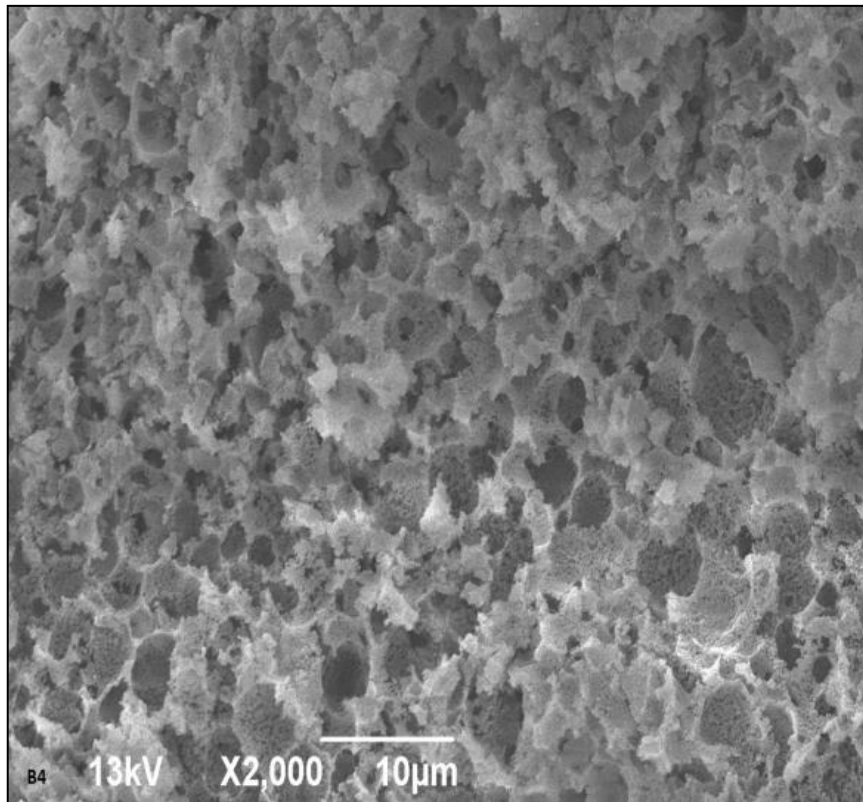
Slika 23. SEM mikrostruktura pokožice A2, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x



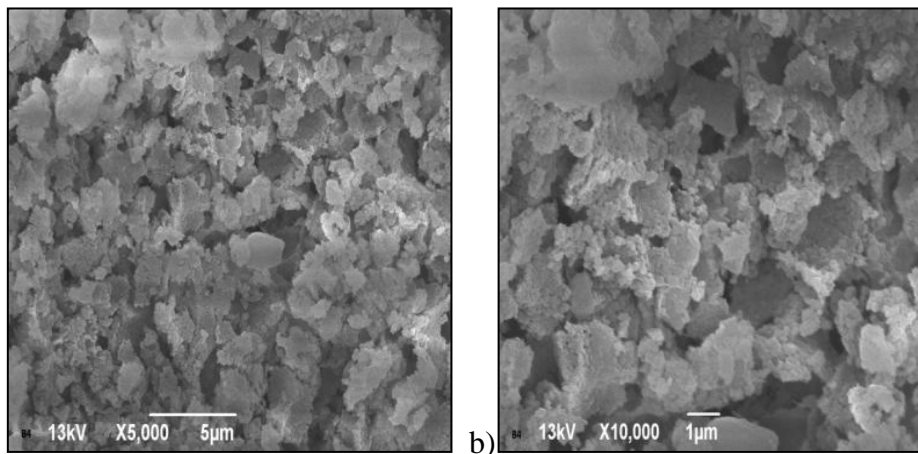
Slika 24. SEM mikrostruktura pokožice B2, uvećanje 2000x



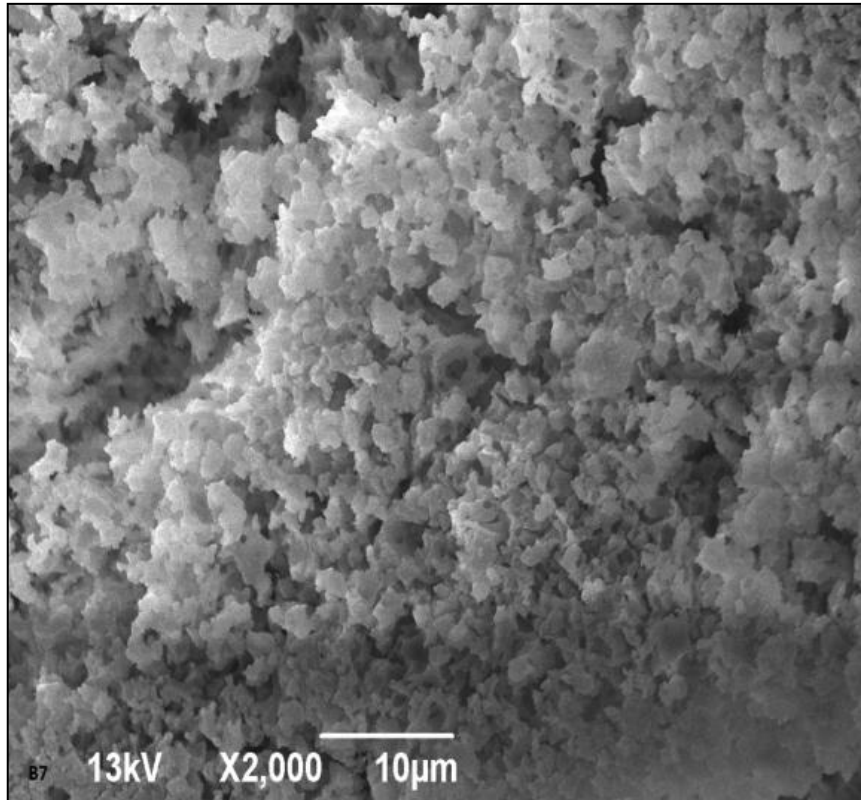
Slika 25. SEM mikrostruktura pokožice B2, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x



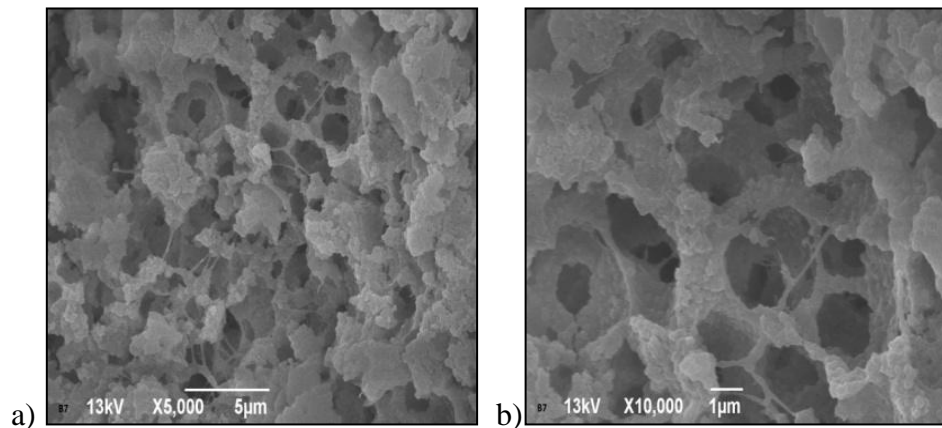
Slika 26. SEM mikrostruktura pokožice B4, uvećanje 2000x



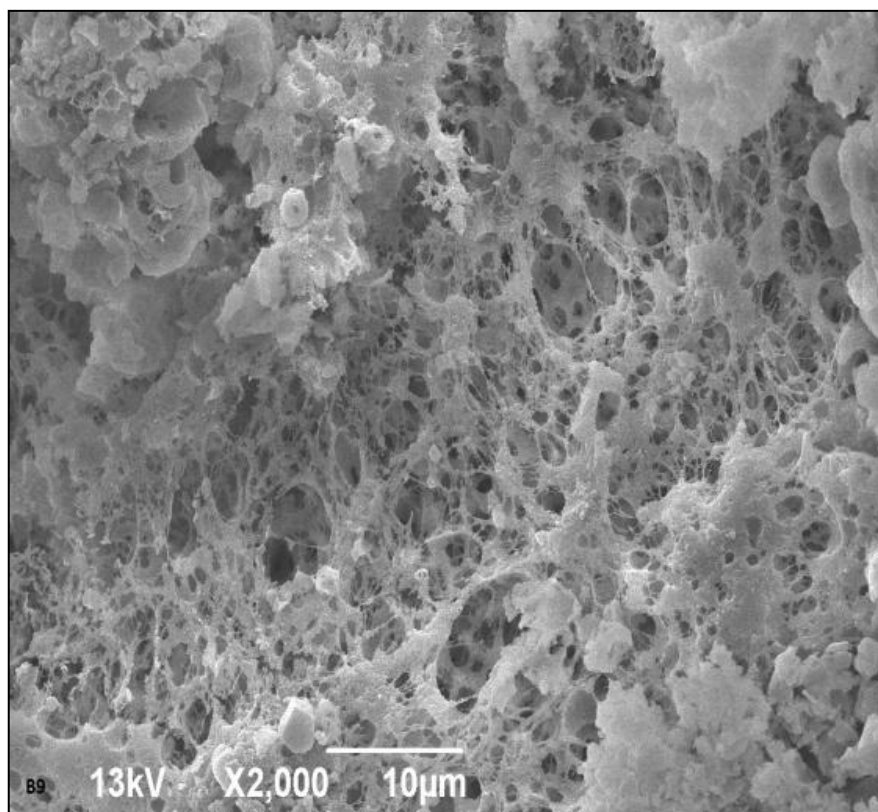
a) b) Slika 27. SEM mikrostruktura pokožice B4, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x



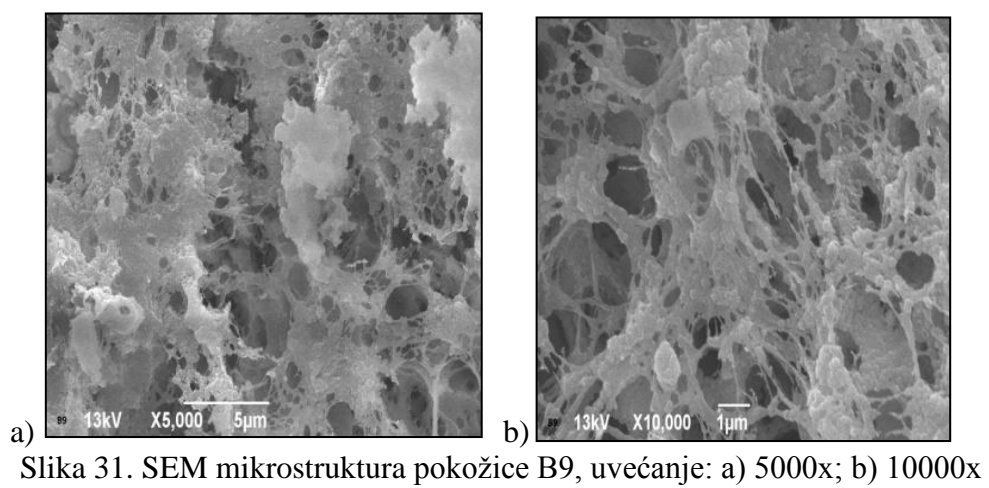
Slika 28. SEM mikrostruktura pokožice B7, uvećanje 2000x



a) Slika 29. SEM mikrostruktura pokožice B7, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x



Slika 30. SEM mikrostruktura pokožice B9, uvećanje 2000x



a) b) Slika 31. SEM mikrostruktura pokožice B9, uvećanje: a) 5000x; b) 10000x

5.5 UTICAJ PARAMETERA VAZDUHA NA PRINOS I SASTAV POKOŽICA, DISTRIBUCIJU PROTEINSKIH FRAKCIJA I BILANS ENERGIJE I MASE U POČETNOJ FAZI FORMIRANJA KAJMAKA

5.5.1 Uticaj parametara vazduha na prinos i sastav pokožica

Sastav uzoraka pokožica, iz ogleda označenih sa C1-C5, dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od parametara vazduha prikazani su u Tabeli 50, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 51. Odabrani parametri uzoraka pokožica prikazani su u Tabeli 52

Tabela 50. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha

Ogled	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
C1	61,33±1,76	7,50±0,50	72,62±2,26	84,46±0,36	10,35±0,98
C2	55,00±0,50	8,31±0,62	67,64±0,79	81,31±0,67	12,29±1,04
C3	55,00±0,87	8,93±0,65	64,38±0,14	85,43±1,40	13,88±1,01
C4	58,67±1,15	8,58±0,21	70,08±0,47	83,71±1,35	12,24±0,22
C5	51,00±0,50	9,09±0,02	63,91±0,30	79,80±0,43	14,22±0,08

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

Tabela 51. Prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha

Ogled	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g
C1	31,33±1,15	19,22±0,87	2,35±0,22	22,76±1,13	8,58±0,78
C2	40,67±2,52	22,36±1,18	3,38±0,37	27,50±1,47	13,17±1,08
C3	37,00±1,00	20,35±0,64	3,31±0,27	23,82±0,59	13,18±0,41
C4	38,67±2,08	22,67±0,96	3,31±0,10	27,09±1,27	11,58±0,81
C5	35,67±0,58	18,19±0,46	3,24±0,05	22,80±0,47	12,87±0,11

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

Tabela 52. Odabrani parametri uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha

Ogled	M/P	M/m ²	P/m ²	Proteini u vodenoj fazi, %	Mast u vodenoj fazi, %
C1	8,21±0,73	427,04±19,30	52,29±4,84	21,53±0,86	69,15±2,37
C2	6,64±0,50	496,85±26,32	75,18±8,26	20,42±0,90	62,96±0,74
C3	6,18±0,53	452,22±14,24	73,47±5,99	20,04±1,16	60,69±0,37
C4	6,84±0,11	503,85±21,37	73,63±2,15	22,28±0,69	66,22±0,71
C5	5,61±0,06	404,26±10,14	72,05±1,10	20,12±0,13	58,56±0,44

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

Imajući u vidu da su ogledi grupe C međusobno raznorodni, jer obuhvataju uticaj temperature i relativne vlažnosti vazduha, na prinos i sastav pokožica, to su u cilju preglednijeg analiziranja uticaja navedenih faktora podaci grupisani u dve grupe, i upoređivani sa podacima uzorka referentnog ogleđa, C2.

Grupnim poređenjem uzoraka ogleđa C1-C5 ustanovili smo da posmatrani parametri vazduha imaju statistički značajan uticaj na sadržaj proteina i masti u pokožici (Prilog, Tabela 9), stoga su u daljem tekstu prezentirani pojedinačni uticaji temperature i relativne vlažnosti vazduha na prinos i sastav pokožica.

5.5.1.1 Temperatura vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od temperature vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%, prikazani su u Tabeli 53, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani su u Tabeli 54.

Tabela 53. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od temperature vazduha

Ogled (t, °C/φ, %)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
C5 (20/70)	51,00±0,50 a	9,09±0,02 a	63,91±0,30 a	79,80±0,43 a	14,22±0,08 a
C2 (30/70)	55,00±0,50 b	8,31±0,62 a	67,64±0,79 b	81,31±0,67 a	12,29±1,04 b
C4 (40/70)	58,67±1,15 c	8,58±0,21 a	70,08±0,47 c	83,71±1,35 b	12,24±0,22 b

* (t, °C/φ, %) označava temperaturu i relativnu vlažnost vazduha koji obstrujava površinu mleka tj. pokožice

**Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

***Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

Tabela 54. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od temperature vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%

Ogled (t, °C/φ, %)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
C5 (20/70)	35,67±0,58 a	18,19±0,46 a	3,24±0,05	22,80±0,47 a	12,87±0,11 a	5,61±0,06 a
C2 (30/70)	40,67±2,52 b	22,36±1,18 b	3,38±0,37	27,50±1,47 b	13,17±1,08 a	6,64±0,50 b
C4 (40/70)	38,67±2,08 ab	22,67±0,96 b	3,31±0,10	27,09±1,27 b	11,58±0,81 a	6,84±0,11 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik < 1);

Analizom parametara ogleđa prikazanih u tabelama 53 i 54 uočava se da temperatura vazduha ima vrlo značajan uticaj na sadržaj masti i SM pokožice (Prilog,

Tabela 10). Promena temperature vazduha sa 20°C na 30°C, odnosno na 40°C, dovodi do porasta sadržaja masti pokožice sa 51% na 55%, odnosno na 58,67%, i SM sa 63,91% na 67,64%, odnosno na 70,08%. Istovremeno, temperatura vazduha nema statistički značajan uticaj na sadržaj proteina pokožice.

Porast sadržaja masti pokožice usled povišenja temperature vazduha je verovatno rezultat istovremenog uticaja (i) gubitka vlage, zbog pojačanog isparavanja vode i (ii) povećanog afiniteta masti za uključivanje u zonu graničnog sloja. Uticaj isparavanja vode se jasno sagledava analiziranjem podataka sadržaja SM, koji pokazuju statistički značajan porast, dok se povećanje težnje masti za uključivanje u pokožicu može uočiti kroz analizu vrednosti MuSM, kod kojih se zapaža porast sa 79,80% na 81,31%, odnosno na 83,71%. Porast sadržaja MuSM sa porastom temperature vazduha se može dovesti u vezu sa dinamikom hlađenja mleka, odnosno sa stanjem hidrofobnosti sistema. Naime, poznato je da viša temperatura uslovljava veću hidrofobnost sistema i jača hidrofobne interakcije (*Schellman, 1997*). Stoga je očekivano da u uslovima povećane hidrofobnosti, dolazi do povećanog uključivanja lipidne faze, koja je u sistemu pokožice nosilac hidrofobnosti.

Temperatura vazduha, pri relativnoj vlažnosti 70%, pokazuje statistički značajan uticaj na prinos pokožice. Sa porastom temperature vazduha sa 20°C na 30°C dolazi do statistički značajnog porasta prinosa (sa 35,67g na 40,67g). Dalji porast temperature vazduha na 40°C dovodi do pada prinosa (sa 40,67g na 38,67g), koji, međutim, statistički nije značajan. U analizu prinosa, u zavisnosti od parametara vazduha u kanalu, bi trebalo uključiti i informacije u vezi karaktera pokožice. U našem radu nismo imali mogućnosti određivanja reoloških parametara pokožice, te ćemo u ovoj analizi koristiti parametre sastava, koji će nam, u određenoj meri, omogućiti da izvedemo zaključke u vezi sa karakterom formirane pokožice. Kada podatke o prinosu analiziramo zajedno sa podacima sadržaja SM, vidimo da skok SM sa 63,91% na 67,64% rezultira statistički značajnim porastom prinosa, dok je dalji porast SM na 70,08% doveo do pada prinosa. Ovakvo kretanje prinosa se verovatno može dovesti u vezu sa stanjem isušenosti pokožice, gde ograničena isušenost promovise intenzivno narastanje pokožice, dok prevelika isušenost umanjuje mogućnost njenog daljeg narastanja.

5.5.1.2 Relativna vlažnost vazduha pri temperaturi 30°C

Sastav uzoraka pokožica dobijenih u prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha prikazani su u Tabeli 55, dok su prinosi i apsolutni sadržaji komponenata sastava pokožica prikazani u Tabeli 56.

Tabela 55. Sastav uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha pri temperaturi 30°C

Ogled (t,°C/φ,%)	Sadržaj, %				
	Mast, %	Proteini, %	SM, %	MuSM, %	PuSM, %
C1 (30/50)	61,33±1,76 a	7,50±0,50 a	72,62±2,26 a	84,46±0,36 a	10,35±0,98 a
C2 (30/70)	55,00±0,50 b	8,31±0,62 a	67,64±0,79 b	81,31±0,67 b	12,29±1,04 ab
C3 (30/90)	55,00±0,87 b	8,93±0,65 a	64,38±0,14 c	85,43±1,40 a	13,88±1,01 b

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Tabela 56. Prinosi, apsolutni sadržaji i odnos M/P uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha pri temperaturi 30°C

Ogled (t,°C/φ,%)	Prinos, g	Mast, g	Proteini, g	SM, g	Voda, g	M/P
C1 (30/50)	31,33±1,15 a	19,22±0,87 a	2,35±0,22 a	22,76±1,13 a	8,58±0,78 a	8,21±0,73 a
C2 (30/70)	40,67±2,52 b	22,36±1,18 b	3,38±0,37 b	27,50±1,47 b	13,17±1,08 b	6,64±0,50 b
C3 (30/90)	37,00±1,00 c	20,35±0,64 a	3,31±0,27 b	23,82±0,59 a	13,18±0,41 b	6,18±0,53 b

*Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p>0,05$;

Iz podataka u Tabelama 55 i 56 se uočava da promena relativne vlažnosti vazduha ostvaruje najveći uticaj na SM i prinos pokožice. Povećanjem relativne vlažnosti vazduha kapacitet vazduha za odnošenje vlage se smanjuje, pa je pad SM očekivan. Porast sadržaja vode pokožice uslovljava pad sadržaja masti i porast sadržaja proteina, pri čemu je statističkom analizom ustanovljen statistički vrlo značajan uticaj relativne vlažnosti vazduha na sadržaj masti (Prilog, Tabela 11). Ovakvo kretanje parametara sastava je rezultiralo snažnim porastom prinosa, pri skoku relativne vlažnosti sa 50% na 70% (sa 31,33g na 40,67g), a takođe i izraženim padom prinosa pri daljem porastu relativne vlažnosti sa 70% na 90% (sa 40,67g na 37g). Uticaj relativne vlažnosti vazduha na prinos pokožica je statistički vrlo značajan (Prilog, Tabela 11).

Na osnovu napred analiziranih uticaja parametara vazduha, kao i poređenjem parametara sastava uzoraka ogleđa C1-C5 sa uzorkom referentnog ogleđa A2 (Tabele 17 i 50) možemo sagledati i značaj uniformne brzine strujanja vazduha. Poređenjem

parametara vazduha oglada A2 i C5, možemo uočiti da je ogled C5 u odnosu na ogled A2, izveden sa nižom temperaturom vazduha (20°C) i bliskim vrednostima relativne vlažnosti, što sve skupa daje osnove za pretpostavku da bi se podešavanjem parametara vazduha koji opstrujava vrelo mleko, a zatim i pokožicu, mogao u izvesnoj meri kontrolisati tok agregiranja proteinskog materijala, odnosno, dinamika formiranja pokožice. S druge strane, na osnovu prethodno iznete pretpostavke da se u uslovima bržeg stvaranja pokožice povećava udeo proteina u pokožici (obzirom da je za akumuliranje masti neophodna vremenska dimenzija), možemo zaključiti da je uzorak oglada C5, koji ima najveći sadržaj proteina (9,09%), verovatno imao najbrži tok formiranja pokožice.

5.5.2 Uticaj parametara vazduha na distribuciju proteinskih frakcija

Distribucija proteinskih frakcija u zavisnosti od parametara vazduha izvršena je karakterizacijom proteinskih frakcija pokožica izrađenih u seriji oglada C tehnikom elektroforetskog razdvajanja SDS PAGE u redukujućim i u neredukujućim uslovima.

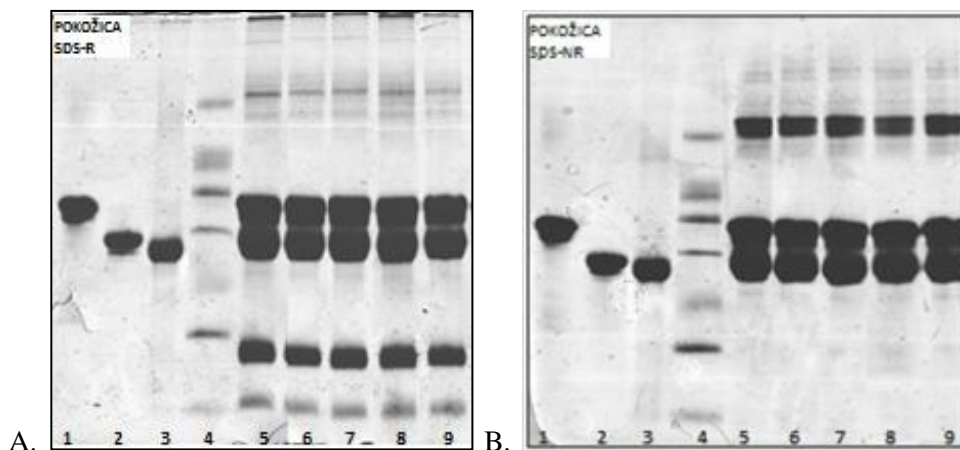
5.5.2.1 Karakterizacija proteinskih frakcija pokožica

Elektroforegrami uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha, analiziranih SDS PAG elektroforezom u redukujućim i neredukujućim uslovima, prikazani su na Slici 32, dok su distribucija grupa proteinskih frakcija, kao i njihovi međusobni odnosi prikazani na Grafikonu 29 i u Tabeli 57. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima je prikazana na Grafikonu 30, dok su međusobni odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke prikazani u Tabeli 60. Statistička analiza uticaja parametara vazduha na učešće grupa frakcija prikazana je u Tabelama 58 i 59.

Kao i kod napred analiziranih oglada, i ovde su identifikovane proteinske frakcije klasifikovane u tri grupe: FDSP, FK i FVMM.

Kada posmatramo učešće pojedinih grupa frakcija (Grafikon 29, Tabela 57) pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha, oglada od C1-C5, u redukujućim uslovima, možemo uočiti značajno učešće FDSP, koje se kreće u intervalu od 29,87% do 31,40%. Istovremeno, može se uočiti i uvećano učešće FVMM, koje se

kreće u intervalu od 8,47% do 10,63%. Zastupljenost FK varira u intervalu od 58,85% do 60,89%. Kada navedene rezultate uporedimo sa ogledom A2, kod kojeg je proces formiranja pokožice ostvarivan na mleku istog sastava, ali u ambijentalnim, nekontrolisanim, uslovima možemo uočiti da pokožice oglada C1-C5 imaju značajno veće sadržaje FVMM (više od 30%), dok je sadržaj FDSP blago uvećan, a FK blago umanjen.



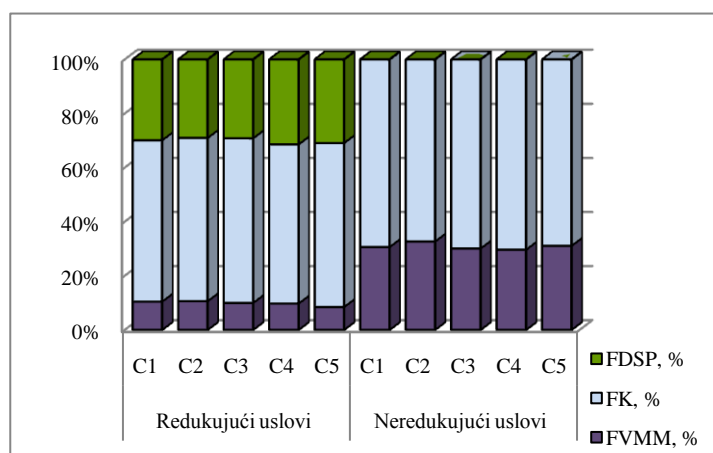
Slika 32. SDS elektroforegrami uzoraka pokožica, dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha: (A) redukujući i (B) neredukujući uslovi: 1. Standard α -CN; 2. Standard β -CN; 3. Standard κ -CN; 4. Standard mol. mase 14.200-66.000; 5-9. Uzorci pokožica oglada C1, C2, C3, C4 i C5.

Kada posmatramo učešće pojedinih grupa frakcija pokožica od C1-C5 u neredukujućim uslovima, možemo uočiti potpuni izostanak FDSP. Istovremeno, u odnosu na redukujuće uslove, mogu se uočiti uvećane količine FVMM, koje se kreću u intervalu od 29,66% do 32,70%.

Zastupljenost FK varira u granicama od 67,30% do 70,34%. Poređenjem zastupljenosti grupa frakcija, posmatrano kod svih uzoraka u neredukujućim u odnosu na redukujuće uslove, možemo uočiti trostruko veće učešće FVMM i za oko 10-20% veće učešća FK. Poređenjem, ovih rezultata sa rezultatima oglada A i B (odjeljak 5.2.2.2 i 5.3.5.2) možemo uočiti razliku. Naime, ustanovili smo da gotovo svi uzorci iz oglada serija A i B, analiziranih u neredukujućim uslovima, pokazuju uočljiv gubitak proteina surutke, u odnosu na ispitivanja u redukujućim uslovima. Pomenuti gubitak smo objasnili velikim frakcijama zarobljenim u gelu za koncentrisanje. Takođe, i na elektroforegramima uzoraka oglada C uočavaju se frakcije na ulazu u gel za koncentrisanje koje su praktično izgubljene za analizu. Međutim, na osnovu podataka iz

Tabele 26, možemo uočiti da postoji manji gubitak proteina surutke u odnosu na ogleda A i B. Ova činjenica navodi na zaključak da su u setu ogleda C, u odnosu na ogleda A i B, u manjoj meri zastupljene frakcije veoma velikih molekularnih masa FVMM.

Kada rezultate učešća grupa frakcija ogleda C u neredukujućim uslovima uporedimo sa ogledom A2, možemo uočiti da pokožice ogleda C1-C5 imaju značajno veće sadržaje FVMM (za više od 50%) i manje sadržaje FK (za oko 10-15%). Sadržaji FVMM uzoraka ogleda C (koji iznose od 29,66%-32,70%) su značajno veći, čak i u odnosu na uzorke ogleda B (gde iznose od 12,83%-21,62%) za oko 50%.



Grafikon 29. Distribucija grupa proteinskih frakcija uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredujućim uslovima

Odnosi procentualnih sadržaja FDSP/FK uzoraka ogleda A2 iznosi 0,4, dok uzorci ogleda C imaju veće vrednosti koje se kreću u intervalu od 0,48 do 0,51. Najveću vrednost od 0,51 ima ogled C5, izveden sa najnižom temperaturom vazduha (20°C) i relativnom vlažnošću od 70%. Vrednosti parametra FDSP/FK ukazuju da su proteini surutke uzoraka ogleda C u većoj meri uključeni u pokožicu u odnosu na uzorke ogleda serije A. Ove vrednosti su veće i u odnosu na vrednosti pokožica dobijenih u seriji ogleda B, koji su izvedeni sa mlekom izmenjenog, odnosno pojačanog sastava. Na osnovu napred rečenog može se izvesti zaključak da pod uticajem parametara vazduha koji opstrujava površinu mleka, tj. ekstremnih vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha u toku prvih 60 minuta formiranja kajmaka, dolazi do snažnije selektivnosti u toku proteinskog agregiranja pri nastajanju pokožice, što za rezultat ima obimnije prisustvo kovalentno vezanih kompleksa molekularnih masa od oko 68.000-

70.000, kao i kompleksa molekulske mase oko 100.000, sa većim učešćem proteina surutke. Može se takođe pretpostaviti da su, u pomenutim uslovima, u pokožicama manje zastupljeni agregati veoma velikih molekulskih masa.

Tabela 57. Distribucija grupa proteinskih frakcija i odnos FDSP/FK uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	Učešće frakcija, %			Odnos frakcija
		FVMM	FK	FDSP	FDSP,%/ FK,%
Redukujući uslovi	C1	10,47	59,66	29,87	0,50
	C2	10,63	60,38	29,00	0,48
	C3	9,97	60,89	29,14	0,48
	C4	9,76	58,85	31,40	0,53
	C5	8,47	60,64	30,89	0,51
Neredukujući uslovi	C1	30,65	69,35	0,00	/
	C2	32,70	67,30	0,00	/
	C3	30,10	69,90	0,00	/
	C4	29,66	70,34	0,00	/
	C5	31,09	68,91	0,00	/

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Statistička analiza (Tabele 58 i 59) uticaja temperature i relativne vlažnosti vazduha na učešće grupa frakcija, u redukujućim i neredukujućim uslovima, je pokazala da jedino postoji statistički značajan uticaj temperature vazduha na učešće FDSP u redukujućim uslovima. Ispitivanja uticaja temperature na FK i relativne vlažnosti na FVMM, u redukujućim uslovima, su izazvali veliku varijabilnost unutar uzoraka, tako da se pomenuti parametri nisu mogli adekvatno statistički analizirati.

Denzitometrijskom analizom elektroforegrama uzoraka ogleda C dobijenih u redukujućim uslovima, u okviru FVMM, identifikovano je 6-7 frakcija molekulskih masa od oko 58.000-120.000. Frakcija molekulske mase od oko 68.000 je dominantna sa učešćem, u ukupno identifikovanim proteinskim frakcijama, od minimalno 2,5% (uzorak C2) do maksimalno 3,4% (uzorak C1). Pored navedene, izdvaja se i frakcija molekulske mase od oko 115.000-120.000, sa prosečnim učešćem od minimalno 1,3% do maksimalno 2,5%, koliko je identifikovano analiziranjem uzorka C1.

U neredukujućim uslovima, denzitometrijskom analizom uzoraka C1-C5, identifikovano je 6-7 frakcija, pri čemu se sa preovlađujućim učešćem izdvaja frakcija molekulske mase oko 70.000 (od 70.000-73.000). Učešće ove frakcije u FVMM, posmatrano kod svih ogleda, je variralo u veoma uskim granicama od 21-23%, što čini

više od 60% FVMM. U nešto manjem iznosu unutar FVMM prisutne su i frakcije većih molekularskih masa od oko 95.000 i 105.000, sa ukupnim učešćem od oko 3-3,5%. Ove frakcije su najmanje zastupljene kod ogleda C1 i C2, a najviše kod ogleda C4.

Tabela 58. Distribucija grupa proteinskih frakcija uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od temperature vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%

Ogled (t, °C/φ%)	Učešće frakcija u red. uslovima			Učešće frakcija u nered.uslovima	
	FVMM,%	FK,%	FDSP,%	FVMM,%	FK,%
C5 (20/70)	8,47 a	60,64	30,89 a	31,09 a	68,91 a
C2 (30/70)	10,63 a	60,38	29,00 b	32,70 a	67,30 a
C4 (40/70)	9,76 a	58,85	31,40 a	29,66 a	70,34 a

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

* Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik < 1)

Tabela 59. Distribucija grupa proteinskih frakcija uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha pri temperaturi vazduha 30°C

Ogled (t, °C/φ,%)	Učešće frakcija u red. uslovima			Učešće frakcija u nered.uslovima	
	FVMM,%	FK,%	FDSP,%	FVMM,%	FK,%
C1 (30/50)	10,47	59,66 a	29,87 a	30,65 a	69,35 a
C2 (30/70)	10,63	60,38 a	29,00 a	32,70 a	67,30 a
C3 (30/90)	9,97	60,89 a	29,14 a	30,10 a	69,90 a

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

*Prikazane vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija;

**Vrednosti sa istovetnim malim slovom po koloni se ne razlikuju na statistički značajnom nivou $p > 0,05$;

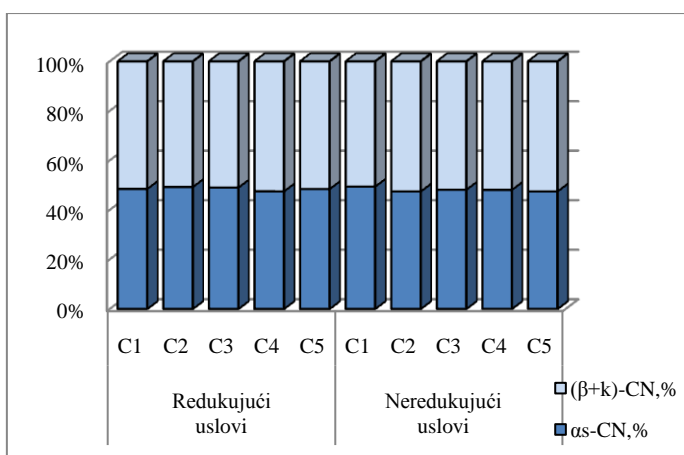
***Vrednosti bez slovnih oznaka po koloni se ne mogu upoređivati lsd testom (F -količnik < 1)

Kada posmatramo distribuciju pojedinih frakcija kazeina u ukupnim kazeinima, kao i njihov međusobni odnos (Grafikon 30, Tabela 60), možemo zaključiti da odnos α -CN/(β +k)-CN uzoraka ogleda C1-C5 varira u uskim granicama i ima slične vrednosti, kako u redukujućim, tako i u neredukujućim uslovima. Možemo zaključiti da je odnos između pojedinih kazeinskih frakcija vrlo stabilan i da ne podleže uticaju parametara vazduha, kako u redukujućim, tako i u neredukujućim uslovima.

Kada uporedimo vrednosti pomenutog odnosa ovih ogleda sa ogledima A (uticaj termičkog tretmana mleka) i B (uticaj sastava mleka) prikazanih u odeljcima 5.2.2.2 i 5.3.5.2, možemo zaključiti da su kod svih ogleda odnosi stabilni. S tim u vezi, vrednosti odnosa α -CN/(β +k)-CN iznose iznad jedan (ogledi A i B), izuzev ogleda C gde su vrednosti u intervalu od 0,90-0,98. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da su

parametri vazduha, u odnosu na termički tretman i sastav mleka, pokazali najjači uticaj ili pak možda uticaj različitog karaktera na uključivanje kazeinskih frakcija u pokožicu.

Kada posmatramo odnos između β -LG i α -LA u redukujućim uslovima (Tabela 60), možemo zaključiti da se njihov odnos menja pod uticajem parametara vazduha i varira u intervalu od 1,99 do 2,75. Najmanja vrednost odnosa je ustanovljena razmatranjem uzoraka ogleđa C4, a najveća uzoraka C1. U poređenju sa prethodnim ogleđima (ogleđi A i B) odnos β -LG/ α -LA uzoraka ogleđa C1-C5 ima značajno manje vrednosti.



Grafikon 30. Distribucija frakcija kazeina u ukupnim kazeinima uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha
Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

Tabela 60. Odnosi između frakcija kazeina i proteina surutke uzoraka pokožica dobijenih u zavisnosti od parametara vazduha

Način pripreme uzoraka za SDS PAGE	Ogled	α s-CN/(β +k)-CN	β -LG/ α -LA
Redukujući uslovi	C1	0,94	2,78
	C2	0,97	2,46
	C3	0,96	2,75
	C4	0,91	1,99
	C5	0,94	2,22
Neredukujući uslovi	C1	0,98	/
	C2	0,90	/
	C3	0,93	/
	C4	0,93	/
	C5	0,91	/

Uzorci su analizirani SDS-PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima

5.5.3 Bilans energije i mase u početnoj fazi formiranja kajmaka

Toplotni gubici sa strane mleka, tj. ukupni toplotni fluks (u daljem tekstu toplotni fluks) razmenjen u toku formiranja kajmaka, odnosno, koji napušta mleko putem evaporacije i prolaza toplote kroz pokožicu i zidove posude, tokom prvih 60 minuta procesa formiranja kajmaka, u zavisnosti od parametara vazduha (ogledi C1-C5) prikazan je u Tabeli 61, dok je količina isparene vode iz mleka prikazana u Tabeli 62. Dinamika toplotnog fluksa prikazana je na Grafikonu 31, a dinamika isparavanja vode na Grafikonu 32.

Tabela 61. Vrednosti razmenjenog toplotnog fluksa u toku procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od parametara vazduha

Vreme, s	Toplotni fluks, kW/s				
	C1	C2	C3	C4	C5
0	0	0	0	0	0
120	0,0942	0,1674	0,2616	0,2930	0,4639
300	0,3523	0,3395	0,3465	0,2279	0,3046
600	0,1465	0,2777	0,2274	0,2009	0,2526
1200	0,1277	0,1235	0,1605	0,1472	0,1898
1800	0,1162	0,1095	0,1249	0,1026	0,1179
2400	0,0827	0,0893	0,0837	0,0802	0,1207
3000	0,1057	0,0656	0,0823	0,0684	0,1005
3600	0,0303	0,0865	0,0551	0,0621	0,0802
Ukupno, kW:	1,0556	1,2591	1,3421	1,1823	1,6302

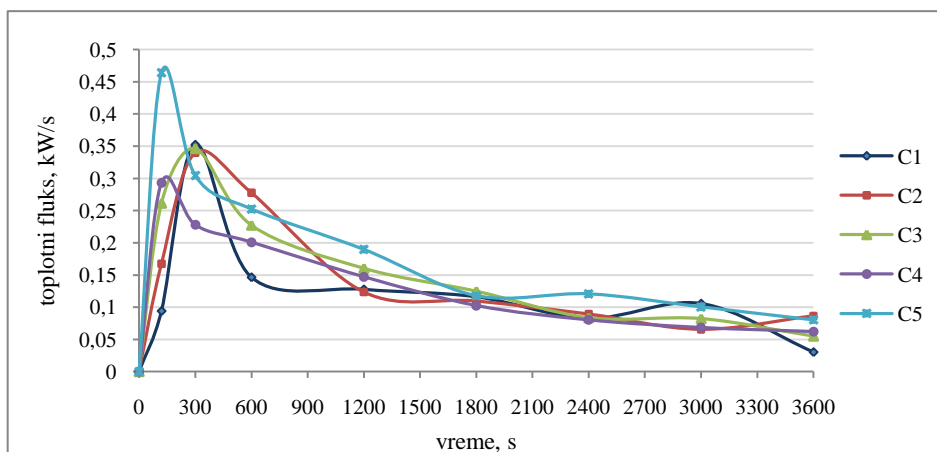
Tabela 62. Količina isparene vode iz mleka tokom procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od parametara vazduha

Vreme, min.	Isparena voda, kg/min.				
	C1	C2	C3	C4	C5
0	0,00271	0,00352	0,00530	0,00324	0,01017
2	0,00226	0,00244	0,00264	0,00185	0,00235
5	0,00109	0,00118	0,00120	0,00117	0,00122
10	0,00076	0,00060	0,00068	0,00070	0,00066
20	0,00046	0,00038	0,00037	0,00039	0,00033
30	0,00031	0,00026	0,00024	0,00027	0,00023
40	0,00024	0,00020	0,00018	0,00021	0,00016
50	0,00017	0,00016	0,00014	0,00016	0,00012
60	0,00016	0,00012	0,00012	0,00013	0,00009
Ukupno, kg:	0,00815	0,00886	0,01087	0,00812	0,01532

Na osnovu podataka iz Tabele 61 možemo zapaziti da toplotni fluks koji se, posle posmatranog perioda od 60 minuta, odvede od mleka, kreće u rasponu od 1,0556 kW (ogled C1) do 1,6302 kW (ogled C5). Ako pogledamo vrednosti sastava uzorka C1 i C5 (Tabela 50), možemo zaključiti da je najmanja vrednost toplotnog fluksa ustanovljena kod uzorka sa najvećim sadržajem SM (C1; 72,62%), a najveća kod uzorka

sa najmanjom suvom materijom (C5; 63,91%). Posmatranjem podataka iz Tabele 62 možemo uočiti da je uzorak pokožice C5 imao i najveću količinu isparene vode (0,01532 kg). Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da u ukupnoj potrošnji energije, tj. toplotnog fluksa najvećim delom participira evaporativno hlađenje mleka, kao i da struktura formirane pokožice, pre svega njena poroznost, igraju veoma važnu ulogu u tom procesu.

Posmatranjem dinamike odvedenog toplotnog fluksa u jedinici vremena (Grafikon 31) u toku posmatranog perioda, možemo uočiti, kod svih uzoraka, vrlo nestabilno ukupno odavanje toplote od strane mleka vazduhu u početnom vremenskom trenutku, što se može objasniti trenutno promenljivim parametrima stanja vazduha, kao i variranjem lokalne brzine strujanja vazduha oko posude sa mlekom. Po formiranju sloja pokožice, kada proces razmene toplote sa strane mleka dobije preovlađujuće konvektivni karakter, razmena energije postaje znatno stabilnija (Radovanović i sar., 2012). Od tog momenta, kod svih uzoraka uspostavlja se približno isti karakter promena toplotnog fluksa, odnosno, uspostavlja se stacionarni proces konvektivnog odavanja toplote. Sa Grafikona 31 možemo videti da pomenuti period stabilnije razmene toplote nastupa nakon 1800 s od početka izlaganja posude sa mlekom struji vazduha.

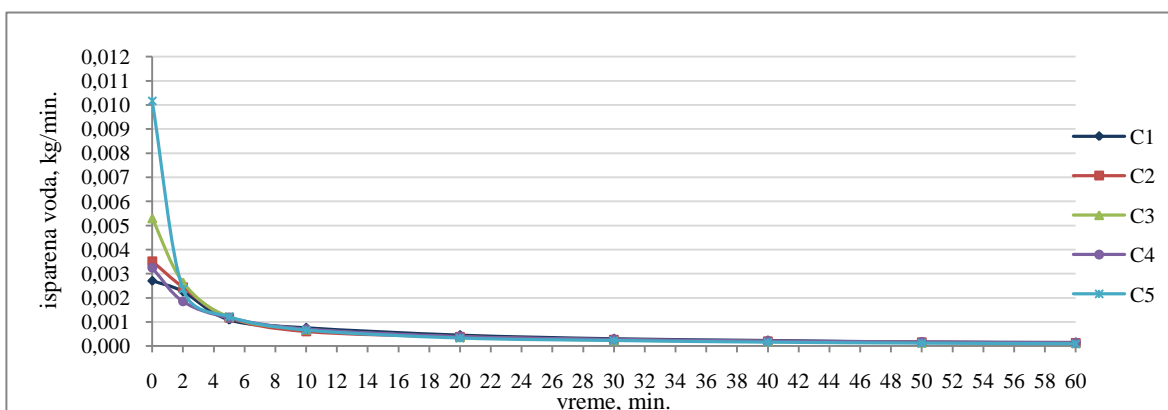


Grafikon 31. Dinamika razmenjenog toplotnog fluksa u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od parametara vazduha

Ovi podaci ukazuju da nakon isteka prvih 30 minuta procesa formiranja kajmaka tj. pokožice, parametri vazduha imaju sličan uticaj na ukupno odavanje toplote mleka. Drugim rečima, može se reći da u toku ovog vremenskog intervala, posmatrane

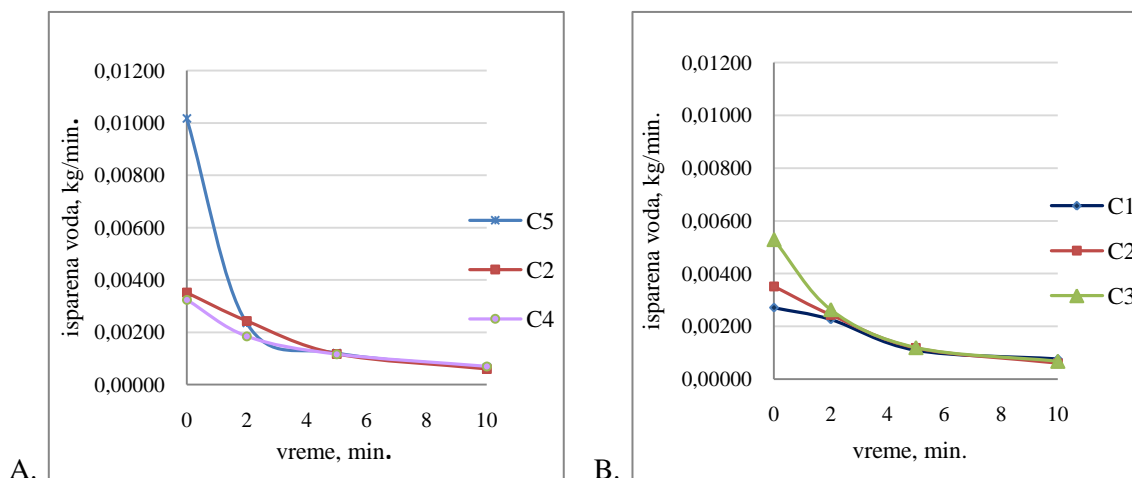
vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha, iako su međusobno različite, ne utiču značajno na karakter hlađenja mleka.

Dinamika isparavanja vode pri različitim parametrima vazduha je prikazana na Grafikonu 32. Uočava se da je tok procesa isparavanja u početnom periodu formiranja pokožica kod svih uzoraka veoma intenzivan. Sa Grafikona 32 se vidi da taj period traje oko 5 minuta od početka unošenja posude sa mlekom u struju vazduha. U toku prvih 5 minuta procesa krive brzine isparavanja vode kod posmatranih uzoraka mleka se međusobno veoma razlikuju, a nakon isteka naznačenog perioda imaju bliske vrednosti. U daljem toku procesa formiranja pokožice dolazi do izraženog smanjenja brzine isparavanja, što je rezultat kombinovanog delovanja nastajanja pokožice i hlađenja mleka usled odavanja toplote sa strane mleka. U odmakloj fazi procesa uočava se stabilizacija procesa isparavanja, kao rezultat uspostavljanja stabilnijeg prenosa mase vode kroz formiranu pokožicu.



Grafikon 32. Dinamika isparavanja vode iz mleka u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od parametara vazduha

Apsolutne količine isparene vode posmatranih ogleda se razlikuju u zavisnosti od parametara vazduha koji struji preko površine mleka u kanalu (Tabela 62). Na Grafikonu 33, (A) je prikazan uticaj temperature vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%, na brzinu isparavanja vode, a na Grafikonu 33, (B) uticaj relativne vlažnosti vazduha pri temperaturi 30°C, na dinamiku isparavanja vode u toku početnih 10 minuta procesa. U analizi smo se fokusirali na period od 10 minuta obzirom da se u toku prve polovine tog perioda dešavaju intenzivne promene, dok se u drugoj polovini posmatranog intervala uspostavlja stabilniji, prilično ujednačen proces isparavanja vode.



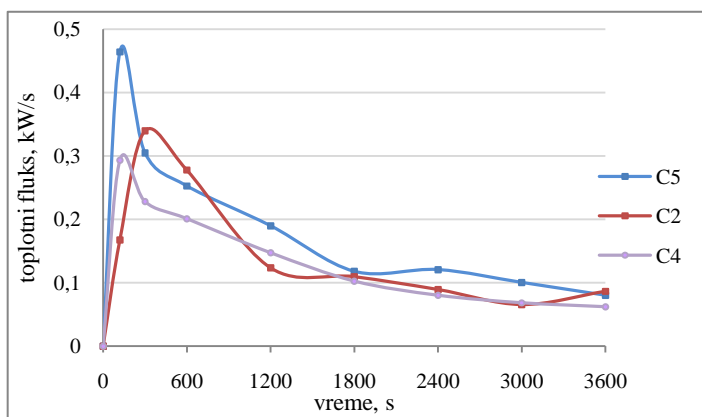
Grafikon 33. Dinamika isparavanja vode iz mleka u toku prvih 10 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od parametara vazduha: (A) temperature pri relativnoj vlažnosti 70% i (B) relativne vlažnosti pri temperaturi 30°C

Sa Grafikona 33, (A) možemo videti da sa snižavanjem temperature vazduha dolazi do drastičnog povećanja brzine isparavanja, pri čemu su razlike između posmatranih ogleda najizraženije u toku prva 2 minuta procesa, kada tek počinje da se formira pokožica. U posmatranom periodu od 10 minuta, najveća količina isparene vode je odneta u ogledu C5 (0,01440 kg), pri temperaturi vazduha od 20°C, a najmanja kod ogleda C4 (0,00696 kg), pri temperaturi vazduha 40°C. U toku prva 2 minuta procesa, posmatrano kod svih ogleda, u odnosu na ukupne vrednosti gubitka vode, ispari najveća količina vode. Tako npr. kod ogleda C5 količina isparene vode u prva 2 minuta (0,01252 kg) predstavlja oko 82% ukupno isparene vode u toku 60 minuta procesa formiranja pokožica, odnosno oko 87% od ukupno isparene vode u toku prvih 10 minuta procesa. Sa povišenjem temperature vazduha smanjuju se ukupne količine isparene vode, kao i učešće količine isparene vode u prva 2 minuta, u odnosu na ukupnu količinu isparene vode u toku procesa od prvih 10 minuta, odnosno 60 minuta.

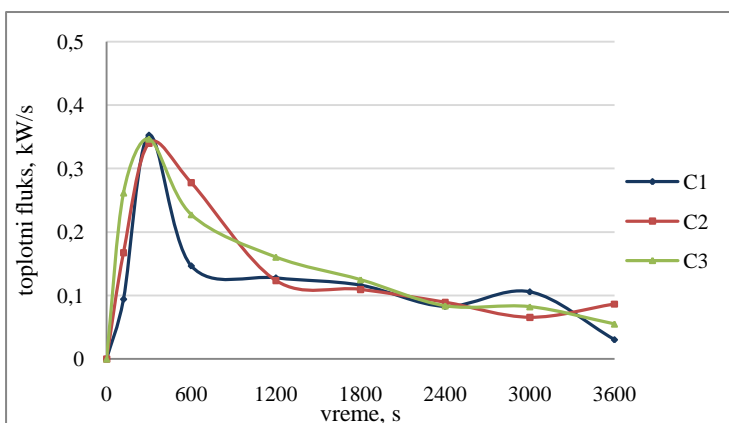
Smanjenjem relativne vlažnosti vazduha povećava se sposobnost vazduha da apsorbuje vlagu. Međutim, u našim ogledima, pri temperaturi vazduha od 30°C, sa variranjem vrednosti relativne vlažnosti od 50-90%, ustanovili smo da vrednosti količina isparene vode se kreću od 0,00682 kg do 0,00983 kg, posmatrano u periodu od prvih 10 minuta trajanja procesa. Najveće vrednosti količine isparene vode ustanovljene su kod ogleda C3 sa najvećom vrednošću relativne vlažnosti (Grafikon 33, B). Slični

rezultati su ustanovljeni posmatranjem procesa tokom 60 minuta (Tabela 62). Razlog za ovakvo ponašanje može biti niža suva materija pokožice C3 (64,38%), u odnosu na pokožice C1 (72,62%) i C2 (67,64%) i s tim u vezi njena veća poroznost (Tabela 55). Takođe, razlog može biti jak uticaj temperature vazduha koja favorizuje hlađenje, tj. intenzivno isparavanje, pri čemu doprinos navedenom stavu daje i činjenica, da bez obzira na visoku ulaznu vlažnost, u toku izvođenja ogleda nije došlo do zasićenja vazduha nakon opstrujavanja površine mleka.

Kada posmatramo uticaje temperature i relativne vlažnosti vazduha na energetske bilanse, tj. na ukupno razmenjen toplotni fluks uzoraka C1-C5, možemo izvesti slične zaključke (Tabela 61, Grafikoni 34 i 35).



Grafikon 34. Dinamika razmenjenog toplotnog fluksa u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od temperature vazduha pri relativnoj vlažnosti 70%



Grafikon 35. Dinamika razmenjenog toplotnog fluksa u toku prvih 60 min. procesa formiranja kajmaka u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha pri temperaturi 30°C

Temperatura vazduha ima najviše izražen uticaj na ukupne energetske promene u toku posmatranog perioda formiranja pokožica. Najmanja vrednost razmenjenog toplotnog fluksa, u iznosu od 1,1823 kW, ustanovljena je kod ogleđa sa najvišom posmatranom temperaturom (40°C), a najveća (1,6302 kW) kod ogleđa sa najnižom temperaturom vazduha (20°C).

Poređenjem ova dva ekstremna slučaja možemo zaključiti da sniženjem temperature sa 40°C na 20°C dolazi do povećanja ukupno razmenjene energije za oko 38%. U poređenju sa rezultatima analize bilansa mase tj. količinom isparene vode možemo uočiti konzistentnost podataka i izvesti zaključak da u toku posmatranog perioda formiranja pokožica preovlađuje evaporativno hlađenje mleka. Kada posmatramo uticaj relativne vlažnosti vazduha (pri temperaturi od 30°C) na energetske bilanse (Tabela 61, Grafikon 35), možemo ustanoviti da je najveća količina odvedenog fluksa ustanovljena kod ogleđa C3 sa najvišom relativnom vlažnošću i iznosi 1,3421kW, dok je najmanja količina odvedenog toplotnog fluksa nađena kod ogleđa sa najnižom relativnom vlagom vazduha (C1) i iznosi 1,0556 kW. Ovi podaci su u saglasnosti sa podacima bilansa mase i mogu biti objašnjeni strukturnim karakteristikama pokožica. Na osnovu analize uticaja relativne vlažnosti vazduha nameću se sledeći zaključci: (i) kod razmatranja uticaja relativne vlažnosti vazduha na ukupne bilanse (i energije i mase) neophodno je uzeti u obzir pripadajući uticaj temperature posmatranog vazduha i (ii) prisustvo uzročno-posledične međuzavisnosti između poroznosti formirane pokožice i parametara vazduha u procesu njenog formiranja.

Na osnovu razmatranja analize bilansa energije i mase ogleđa C1-C5, možemo pretpostaviti da postoji i indirektan uticaj parametara vazduha na strukturu i prinos formiranih pokožica. Stoga, možemo izvesti zaključak da korigovanjem parametara stanja vazduha možemo direktno uticati i kontrolisati energetske i materijalne bilanse tokom formiranja pokožica, a takođe i strukturu, sastav i prinos pokožica kao i kajmaka u celosti.

5.5.4 Značaj kontrole uslova formiranja kajmaka

Analiziranjem vrednosti koeficijenata varijacije (C_v) parametara prinosa i sastava ogleđa serija A, B i C (Prilog, Tabela 12), jasno se uočava različitost između ogleđa serija A i B sa jedne i ogleđa serije C, s druge strane, što upućuje na zaključak da uslovi

u kojima se obavlja formiranje kajmaka tj. parametri vazduha predstavljaju jedan od veoma bitnih faktora u procesu formiranja pokožice, kao i kajmaka u celosti (Prilog, Tabela 12). Poređenjem vrednosti Cv rezultata različitih oglada možemo ustanoviti značajno smanjenje varijabilnosti parametara prinosa i sastava uzoraka oglada izvedenih u kontrolisanim uslovima parametara vazduha (ogledi C) u poređenju sa ogledima izvedenim u ambijentalnim tj. prirodnim, nekontrolisanim uslovima (ogledi A i B).

U tom smislu, uočava se da Cv prinosa i parametara sastava oglada serije A i B variraju u intervalima od 1,85-17,54% (Prilog, Tabela 12). Najširi interval variranja Cv ustanovljen je kod prinosa, dok je najuži interval variranja (2,74-8,78%) ustanovljen za parametar sadržaj SM.

Suprotno tome, intervali variranja Cv oglada serije C, su značajno uži. Vrednosti Cv parametara sastava pokožica dobijenih u ovim ogledima se kreću u intervalu od 0,22-9,47%. Najmanja variranja su uočena pri analizi sadržaja masti (0,91-2,86%), a najširi interval variranja je ustanovljen razmatranjem sadržaja proteina (0,19-7,49%) i PuSM (0,56-9,47%). Vrednosti Cv parametara sastava ovih oglada su velikim delom i očekivane, obzirom na činjenicu da je pri izvođenju oglada serije C kontrolisan veći broj faktora koji utiču na proces formiranja pokožica, prevažodno temperatura i relativna vlažnost vazduha. Međutim, poređenje Cv oglada A2 i oglada C1-C5 nas upućuje na mogućnost postojanja izvesnih uticaja, manjeg intenziteta, koji nisu bili pod kontrolom. Naime, kod oglada A2, u odnosu na pojedine ogledne serije C, Cv su imali veće vrednosti pri analizi prinosa i svih parametara sastava izuzev sadržaja proteina i PuSM. Detaljnim sagledavanjem potencijalnih faktora uticaja u seriji oglada C, kao nekontrolisane, možemo uzeti u obzir tehnički faktor, odnosno ograničenja korišćene tehnološke instalacije za proizvodnju kajmaka. Naime, takvi faktori su vezani za brzinu odziva pojedinih radnih segmenata navedene linije, koja zbog poluautomatskog režima rada, nema mogućnost brze promene parametara vazduha.

Potvrda značaja kontrole uslova u kojima se obavlja proces formiranja kajmaka proizilazi i iz rezultata statističke analize. Naime, razmatranjem rezultata oglada serije C grupnim poređenjem (Prilog, Tabela 9), samo u jednom slučaju je ustanovljeno da je varijabilnost unutar grupa bila veća od varijabilnosti između grupa, dok je sličnih situacija kod serija oglada A i B, bilo znatno više.

Rezultati dobijeni razmatranjem značaja uslova na tok formiranja i svojstva pokožice su u saglasnosti sa podacima drugih autora, koji ukazuju na postojanje izraženih variranja sastava kajmaka u uslovima nekontrolisane proizvodnje (*Puđa i sar., 2004, 2005a, 2005b*). Na osnovu izvedenih ogleda i njihove analize uzroci variranja su bliže upoznati, pa bi se u budućim istraživanjima moglo očekivati da rezultati ovog rada pomognu u prevazilaženju veoma prisutne varijabilnosti sastava i kvaliteta kajmaka, a takođe i omoguće iznalaženje optimalnih parametara vazduha za proizvodnju kajmaka u industrijskim uslovima u cilju standardizacije proizvodnje ovog cenjenog mlečnog proizvoda.

6. ZAKLJUČCI

- Kajmak je mlečni proizvod specifičnog sastava i svojstava sa dugom tradicijom proizvodnje i potrošnje na području Balkana, Male Azije i Bliskog istoka. Današnja proizvodnja kajmaka je zasnovana uglavnom, na tradicionalnim postupkom proizvodnje. Mehanizmi kao i faktori koji utiču na tok procesa formiranja kajmaka su do danas veoma malo izučavani, a posebno malo definisani, te su stoga literaturni podaci veoma oskudni.
- Proces formiranja kajmaka, može se podeliti na dve faze: toplu i hladnu. U toploj fazi dolazi do formiranja početne pokožice, koja predstavlja gornji sloj kajmaka. Nastanak početne pokožice je rezultat kombinovanog uticaja (i) površinskih pojava, usled kojih se na površini vrelog mleka koncentrišu komponente sa izraženom površinskom aktivnošću i (ii) intenzivnog isparavanja vodene faze uslovljene visokom temperaturom mleka.
- Na proces formiranja pokožice/kajmaka utiče veliki broj faktora od kojih se kao najznačajniji smatraju termički tretman i sastav mleka, kao i parametri ambijentalne sredine u kojoj se vrši proces formiranja pokožice i kajmaka u celosti.
- Ustanovljeno je da termički tretman mleka ima statistički značajan uticaj na sadržaj proteina, dok uticaj na sadržaj masti pokožice nije bio statistički značajan.
- Na osnovu rezultata pretpostavili smo da je uticaj termičkog tretmana na formiranje pokožice dvojak i da se može posmatrati kroz uticaj (i) na proteinski kompleks mleka i (ii) na visinu početne temperature formiranja pokožice. Intenzitet termičkog tretmana se reflektuje u ponašanju proteina na graničnoj površini, dok se uticaj početne temperature ogleda kroz intenzitet isparavanja vode iz mleka.
- Vrednost početne temperature formiranja kajmaka, zahvaljujući specifičnom karakteru uticaja na proteine i masti, predstavlja veoma snažan mehanizam u upravljanju procesom formiranja pokožice. Snižavanje početne temperature formiranja kajmaka za posledicu je imalo snižavanje koncentracije proteina, a povećanje koncentracije masti u pokožici. Različitost karaktera uticaja

početne temperature formiranja kajmaka na proteinsku, odnosno na masnu fazu, predstavlja veoma snažan mehanizam u upravljanju procesom formiranja kajmaka i u regulaciji učešća pojedinih komponenata u sastavu kajmaka.

- Pri nižim koncentracijama proteina u mleku rastući sadržaj masti mleka je doprineo snažnijem uključenju masti u pokožicu, u odnosu na uključivanje proteina. Međutim, u uslovima značajno povišene koncentracije proteina u mleku, porast sadržaja masti u mleku rezultirao je u promeni karaktera uticaja u pogledu uključivanja komponenata mleka u pokožicu, tako da je porast uključivanja proteina postao izraženiji od porasta uključivanja masti.
- Porast sadržaja ukupnih proteina mleka je rezultirao u izraženoj ulozi proteina u procesu formiranja pokožice, pri čemu je uočeno smanjenje vrednosti odnosa M/P u pokožici, porast prinosa, kao i promena proteinske strukture ka ljuspastom karakteru sa značajno udebljanim proteinskim lancima. Suprotno tome, porast sadržaja masti u mleku uslovio je povećanje vrednosti M/P, kao i nastanak izrazito filamentarne strukture, uz istovremeno smanjenje debljine proteinskih lanaca.
- Dodatak proteina surutke u mleko doprineo je povećanju značaja proteina u procesu formiranja pokožice, pri čemu, kada su bili dodati pri nižem nivou proteina mleka, doveli su do porasta sadržaja, kako masti, tako i proteina pokožice, uz značajan porast prinosa. Međutim, kada su proteini surutke dodati u mleko fortifikovanog sadržaja proteina uslovili su porast sadržaja proteina pokožice uz istovremeno smanjenje sadržaja masti što je kao rezultatni efekat uticalo na pad prinosa pokožice.
- SDS PAGE analizom u redukujućim i neredukujućim uslovima ustanovljeno je prisustvo kompleksa rezistentnih na disocijativne agense. Takođe, uočena je frakcija molekulske mase od oko 72.000 ± 4.000 , koja je u svim uzorcima bila dominantna u neredukujućim uslovima, a takođe je bila zastupljena i u redukujućim uslovima.
- Analizom SDS PAGE pokožica u redukujućim uslovima, je pokazala da odnos FDSP/FK ostaje relativno u konstantnim okvirima i u slučaju rastućeg sadržaja ukupnih proteina. Dodatak proteina surutke takođe nije uticao na promenu odnosa FDSP/FK.

- Poređenjem rezultata SDS PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima ustanovljeno je da su odnosi između kazeinskih frakcija prisutnih u pokožicama stabilni. Takvi rezultati su ukazali da proces formiranja pokožice ne utiče na međusobne odnose između kazeinskih frakcija u sastavu pokožice i potvrdili iznetu pretpostavku da se kazein u pokožicu preovlađujuće uključuje u micelarnoj formi. Odnosi između kazeinskih frakcija su bili stabilni čak i kada je hemijski sastav mleka bio prilično izmenjen u odnosu na tipični, pa čak i kada su bili dodati proteini surutke u dvostruko većoj količini od tipično prisutne u mleku.
- Uslovi u kojima se izvodi formiranje kajmaka imaju veliki uticaj na hemijski sastav i prinos pokožica. Ustanovljeno je da parametri vazduha imaju statistički vrlo značajan uticaj na sadržaj masti i proteina pokožice.
- Povišenje temperature vazduha je dovelo do povećane evaporacije vode i porasta SM pokožice. Istovremeno, porast temperature povećava hidrofobnost sistema, što je za rezultat imalo statistički veoma značajno povećanje uključivanja masti u pokožicu. Dinamika odnošenja vlage sa površine mleka, odnosno sa formirane pokožice, imala je statistički vrlo značajan uticaj na prinos pokožice.
- Niska vlažnost vazduha omogućava veliki obim odnošenja vlage, što je za posledicu imalo snažno isušivanje pokožice, pa tako veoma isušena pokožica je usporila dalje agregiranje proteinskog materijala, što je u konačnom bilansu umanjilo prinos pokožice. Nasuprot tome, visoka vlažnost koja usporava gubitak vlage, a samim tim usporava i agregiranje proteina, takođe je za rezultantu imala smanjenje prinosa pokožica.
- Ustanovljeno je da su proteini surutke, β -LG i α -LA, u pokožici prisutni isključivo u vezanoj formi, pri čemu su preovlađujuće prisutni disulfidno vezani kompleksi. Termički tretman mleka, sastav mleka i parametri vazduha nisu imali uticaja na pojavni oblik distribucije FDSP. Mehanizam uključivanja proteina surutke u pokožicu imao je delimično selektivni karakter, što je doprinelo promeni odnosa proteina u pokožici u poređenju sa njihovim odnosom u termički tretiranom mleku pre formiranja pokožice, pri čemu su kompleksi sa kazeinskom micelom preovlađujuće bili prisutni u pokožici.

- Suštinska kontrola procesa formiranja kajmaka ostvaruje se kontrolom dešavanja u okviru proteinske faze. Ustanovljeno je, u uslovima bržeg stvaranja pokožice, povećanje udela proteina u pokožici, jer je za akumuliranje masti neophodna vremenska dimenzija.
- Na osnovu svega izloženog može se konstatovati da je formiranje pokožice veoma kompleksan proces, da je u mehanizmu njenog nastajanja izuzetno značajna uloga svih ispitivanih faktora: termičke obrade mleka; sastava mleka, i parametara vazduha, i da postoji veoma visok stepen međusobne zavisnosti navedenih faktora. Takođe, na osnovu rezultata može se konstatovati da centralna pozicija u procesu formiranja pokožice pripada proteinima surutke, koji zahvaljujući razmotavanju globularne strukture, tokom termičkog tretmana, višestruko uvećavaju svoju funkcionalnost, kako u procesu emulgovanja masti, tako i u procesu gelifikacije pokožice.

7. LITERATURA

1. **Anema, S.G.** (1998): Effect of Milk Concentration on Heated-Induced, pH-Dependent Dissociation of Casein from Micelles in Reconstituted Skim Milk at Temperatures between 20 and 120°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2299-2305.
2. **Anema, S.G.** (2007): Role of k-casein in association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3635-3642.
3. **Anema, S.G.** (2008): On heating milk, the dissociation of kappa-casein from casein micelles can precede interactions with denatured whey protein. *Journal of Dairy Research*, 75, 415-421
4. **Anema, S.G., Klostermeyer, A.** (1996): ζ -potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120°C, *International Dairy Journal*, 6, 673-687.
5. **Anema, S.G., Klostermeyer, H.** (1997a): 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, 1108-1115.
6. **Anema, S.G., Klostermeyer, A.** (1997b): The effect of pH and heat treatment on the kappa-casein content and the ζ -potential of the particles in reconstituted skim milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 52, 217-223.
7. **Anema, S.G., Li, J.** (2000): Further studies on the heat-induced, pH-dependent, dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk, *Lebensm. Wiss. u –Technol.*, 33:335-343
8. **Anema, S.G., Li, J.** (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, 73-83.
9. **Andrews, A.L., Atkinson, D., Evans, M.T.A., Finer, E.G., Green, J.P., Phillips, M.C., Robertson, R.N.** (1979): The conformation and aggregation of bovine β -casein A.I. Molecular aspects of thermal aggregation. *Biopolymers* 18, 1105-1121.
10. **Arai, T., Norde, W.** (1990a): The behavior of some model proteins at solid-liquid interface 1. Adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surface B* 51:1-15
11. **Arai, T., Norde, W.** (1990b): The behavior of some model proteins at solid-liquid interface 2. Sequential and competitive adsorption. *Colloids and Surface B* 51:17-28.
12. **Bash, J.J., Douglas, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Farrell, H.M, JR.** (1985): Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure. *Journal of Dairy Science*, 68: 23-31.
13. **Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R.** (2000): Effects of different forms of canola oil fatty acids plus canola meal on milk composition and physical properties of butter. *Journal of Dairy Science*, 83: 690-696.
14. **Bernal, V., Jelen, P.** (1984): Effect of Calcium Binding on Thermal Denaturation of Bovine α -Lactalbumin. *Journal of Dairy Science* 67 (10), 2452-2454.
15. **Bitman, J., Wood, D.L.** (1990): Changes in milk fat phospholipids during lactation. *Journal of Dairy Science*, 73: 1208-1216.
16. **Bohe, G., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Lindberg, G.L., Beitz, D.C.** (2003): Texture of butter from cows with different milk fat acid compositions. *Journal of Dairy Science*, 86: 3122-3127.
17. **Boerboom, F. J. G.** (2000): Proteins and protein/surfactant mixtures at interfaces in motion. Ph.D. dissertation, Wageningen University, The Netherlands.
18. **Boyle, J.I., Ismail, A.A., Alili, I.** (1996): Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research* 63:97-109.
19. **Brooksbank, D.V., Davidson, C.M., Horne, D.S., Leaver, J.** (1993): Influence of electrostatic interactions on β -casein layers adsorbed on polystyrene latices. *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions* 89:3419-3425.

20. **Brun, J., Dalgleish, D.G.** (1999): Some effects of heat on the competitive adsorption of caseins and whey proteins in oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 9, 323-327.
21. **Caessens, P.W.J.R., Visser, S., Gruppen, H.** (1997): Method for the isolation of bovine β -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. *International Dairy Journal* 7 (4), 229-235.
22. **Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D.** (2000): Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Tehnološki fakultet, Novi Sad
23. **Chandan, R.** (1997): Dairy Based Ingredients: Practical Guides for the Food Industry, Eagen Press Handbook Series, USA.
24. **Chen, J., Dickinson, E.** (1993): Time-dependent competitive adsorption of milk proteins and surfactants in oil-in-water emulsions. *Journal of Dairy Science of Food and Agriculture* 62:283-289.
25. **Chen, J., Iveson, G., Dickinson, E.** (1993a): Surfactant-Protein Competitive Adsorption and Electrophoretic Mobility of Oil-in-water Emulsions, in Food Macromolecules and Colloids, ed. Dickinson and Lorien, D. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 256-260.
26. **Chen, J., Dickinson, E., Iveson, G.** (1993b): Interfacial interactions competitive adsorption and emulsion stability. *Food Structure* 12, 135-146.
27. **Chevalier, F., Hirts, C., Sommerer, N., Kelly, A.** (2001): Use of Reducing/Nonreducing Two-Dimensional Electrophoresis for the Study of Disulfide-Mediated Interaction between Proteins in Raw and Heated Bovine Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5948-5955.
28. **Chevalier, F., Chobert, J.M., Molle, D., Haertle, T.** (2009): Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait*, 81: 655-666.
29. **Chevalier, F., Kelly, A.L.** (2010): Proteomic Quantification of Disulfide-Linked Polymers in Raw and Heated Bovine Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7437-7444.
30. **Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M.** (2001): Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*, 70, 31-48.
31. **Cho, D., Narsimhan, G., Franses, E.I.** (1996): Adsorption Dynamics of Native and Alkylated Derivates of Bovine Serum Albumin at Air-Water Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 178:348-357.
32. **Cho, D., Narsimhan, G., Franses, E.I.** (1997): Adsorption Dynamics of Native and Pentylated Bovine Serum Albumin at Air-Water Interfaces: Surface Concentration/Surface Pressure Measurements. *Journal of Colloid and Interface Science* 191:312-325.
33. **Cho, Y., Singh, H., Creamer, L.K.** (2003): Heat-induced interactions of β -lactoglobulin A i k-kazein B in a model system. *Journal of Dairy Research*, 70, 61-71.
34. **Christie, W.W.** (1983): The composition and structure of milk fat lipids. In: *Development in dairy chemistry-2, Lipids*, Ed. Fox, P.F., Applied Sci. 80: 2607-2619.
35. **Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J.O.** (2002): Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands. Mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal* 12: 649-659.
36. **Cornec, M., D. Cho., Narsimhan, G.** (1999): Adsorption Dynamics of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin at Air-Water Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 214. 129-142.
37. **Cornec, M., Kim, D.A., Narsimhan, G.** (2001): Adsorption dynamics and interfacial properties of α -Lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interfaces. *Food Hydrocolloids* 15:303-313.
38. **Corredig, M., Dalgleish, D.G.** (1995): A differential microcalorimetric study of whey proteins and their behavior in oil-in-water emulsions. *Colloids and Surface:B* 4:411-422.
39. **Corredig, M., Dalgleish, D.G.** (1996a): The binding of α -lactalbumin and β -lactoglobulin to casein micelles in milk treated by different heating systems. *Milchwissenschaft*, 51, 123-126.

40. **Corredig, M., Dalgleish, D.G.** (1996b): Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research*, 63 (3), 441-449.
41. **Corredig, M., Dalgleish, D.G.** (1999): The mechanisms of heat-induced interactions of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, 9:233-236.
42. **Dalgleish, D.G.** (1993): The size and conformations of the proteins in adsorbed layers of individual caseins on latices and in oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1:1-8.
43. **Dalgleish, D.G.** (1996): Conformations and structures of milk proteins adsorbed to oil-water interfaces. *Food Research International*, 29, 541-547.
44. **Dalgleish, D. G.** (1998): Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities, *Journal of Dairy Science*, 81, 11: 3013-3018.
45. **Dalgleish, D.G., Banks, J.M.** (1991): The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft* 46 (2), 75-78.
46. **Dalgleish, D.G., Leaver, J.** (1991): The possible conformations of milk proteins adsorbed on oil-water interfaces. *Journal of Colloid Interface Science* 141:288-294.
47. **Dalgleish, D.G., van Mourik, L., Corredig, M.** (1997a): Heat-Induced Interactions of Whey Proteins and Casein Micelles with Different Concentrations of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4806-4813.
48. **Dalgleish, D.G., Senaratne, V., Francois, S.** (1997b): Interaction between α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in the Early Stages of Heat Denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3459-3464.
49. **Dalgleish, D.G., Goff, H. D., Brun, J. M., Luan, B. B.** (2002): Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion systems-Overall aspects of the reaction. *Food Hydrocolloids*. 16:303-311.
50. **Damodaran, S.** (1986): Amino acids, peptides and proteins. In Food Chemistry, ed. Fennema, O.R., Marcel Dekker, New York, p.321-430.
51. **Damodaran, S.** (1990): Interfaces, protein films and foams. In Adnd Nutrition Research, ed. Kinsella, J.E., San Diego:Academic Press p.1-79.
52. **Damodaran, S., Song, K.** (1988): Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 954:253-264.
53. **Darling, D.F., Dickson, J** (1979a): Electrophoretic mobility of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 46:441-451.
54. **Darling, D.F., Dickson, J** (1979b): The determination of the zeta potential of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 46:329-332.
55. **Das, K.P., Kinsella, J.E.** (1990): Effect of heat denaturation on the adsorption of β -lactoglobulin at the oil/water interface and on coalescence stability of emulsions. *Journal of Colloid Interface Science*, 139:551-560.
56. **Davies, D.T., Law, A.J.R.** (1980): Content and composition of protein in creamery milks in South-West Scotland. *Journal of Dairy Research*, 47, 83-90.
57. **deKruif, C.G., Holt, C.** (2003): Casein micelle structure, functions and interactions in Advanced Dairy Chemistry, Vol.1, Proteins, Third edition, Part A, ed. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. New York.
58. **delAngel, C.R., Dalgleish, D.G.** (2006): Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder. *Food Research International*, 39, 472-479.
59. **deWit, J.N., Klarenbeek, G.** (1984): Effects of various heat treatment on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 67 (11), 2701-2710.
60. **Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K., Tolosa, M.X.** (2000): Conjugated Linoleic Acid (CLA) content of Milk from Cows Offered Diets Rich in Linoleic and Linolenic Acid. *Journal of Dairy Science* 83, 1016-1027.

61. **Dickinson, E.** (1991): Adsorbed protein layers in food emulsions. In Sjöblom, J. (ed.), *Emulsions – a fundamental and practical approach* (p.25), Dordrecht, The Netherlands:Kluwer
62. **Dickinson, E.** (1997): Properties of Emulsions Stabilized with Milk Proteins: Overview of Some Recent Developments. *Journal of Dairy Science* 80:2607-2619.
63. **Dickinson, E.** (1998): Proteins at interfaces and in emulsions: stability, rheology and interactions. *Journal Chemistry. Soc., Faraday Trans.*, 94(12), 1657-1669.
64. **Dickinson, E., Whyman, R.H., Dalgleish, D.G.** (1987): Colloidal Properties of Model Oil-in-Water Food Emulsions Stabilized Separately by α 1-Casein, β -Casein and k-Casein. in *Food Emulsions and Foams*, ed. E. Dickinson, Royal Society of Chemistry, London, 1987, 40-51.
65. **Dickinson, E., Rolfe, S.E., Dalgleish, D.G.** (1988): Competitive adsorption of α 1-casein and β -casein in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2, 397-405.
66. **Dickinson, E., Mauffret, A., Rolfe, S., Woskett, C.M.** (1989): Adsorption at interfaces in dairy systems. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42, 18-22.
67. **Dickinson, E., Tanai, S.** (1992): Temperature dependence of the competitive displacement of protein from the emulsion droplet surface by surfactants. *Food Hydrocolloids* 6: 163-171.
68. **Dickinson, E., Horne, D.S., Richardson, R.M.** (1993): Neutron reflectivity of the competitive adsorption of β -casein and water-soluble surfactant at the planar air-water interface. *Food Hydrocolloids* 7:497-505.
69. **Dickinson, E., Matsumura, Y.** (1994): Proteins at liquid interfaces: Role of the molten globule state. *Colloids and Surface:B* 3:1-17.
70. **Dickinson, E., McClements, D.J.** (1995): *Advances in Food Colloids*, London:Blackie Academic and Professional, London. P.81-144.
71. **Dickinson, E., Parkinson, E.I.** (2004): Heat-induced aggregation of milk protein-stabilized emulsions: sensitivity to processing and composition. *International Dairy Journal*, 14, 635-645
72. **Đerovski, J., Radulović, Z., Radin, D., Radovanović, M., Puđa, P.**, (2006): Ispitivanje kvaliteta kajmaka: hemijski, senzorni i mikrobiološki aspekt, *Prehrambena industrija*, 17, 1–2, 25–29.
73. **Đorđević, J.** (1978): Kajmak-pitanje klasifikacije i propisa o kvalitetu. *Mljekarstvo*, 28/6.
74. **Đorđević, J.** (1987): *Mleko, fizika i hemija mleka*. Naučna knjiga, Beograd.
75. **Donato, L., Dalgleish, D.G.** (2006): Effect of the pH of heating on the qualitative and quantitative compositions of the sera of reconstituted skim milks and on the mechanisms of formation of soluble aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7804-7811.
76. **Donato, L., Guyomarc'h, F., Amiot, S., Dalgleish, D.G.** (2007): Formation of whey protein/k-casein complexes in heated skim milk: Preferential reaction of whey protein with k-casein in the casein micelles. *International Dairy Journal*, 17, 1161-1167.
77. **Donato, L., Guyomarc'h, F.** (2009): Formation and properties of the whey protein/k-casein complexes in heated skim milk-A review. *Dairy Science and Technology*, 89, 3-29.
78. **Donovan, M., Mulvihill, D.M.** (1987): Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science Technology*, 11, 87-100.
79. **Dozet, N., Adžić, N., Stanišić, M., Živić, N.** (1996): *Autohtoni mlječni proizvodi*. Poljoprivredni Institut, Podgorica.
80. **Dozet, N., Pandurević, S., Borovčanin, T., Petrović, D.** (2007): Kvalitet Romanijskog skorupa-kajmaka, "Masnog" sira i zajednice-autohtonih proizvoda. *Zbornik radova Simpozijuma "Mleko i proizvodi od mleka"*, Kladovo, 93-100.
81. **Dozet, N., Pandurević, S., Jovanović, S., Borovčanin, T.** (2011): *Romanijski skorup-kajmak*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Istočnom Sarajevu.
82. **Eaglesham, A., Herrington, T.M., Penfold, J.** (1992): A neutron reflectivity study of a spread monolayer of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces* 65:9-16.
83. **Ećim-Đurić, O., Radovanović, M., Nedeljković, A., Miočinović, J., Puđa, P.** (2012): Uticaj parametara radnog agensa na bilans razmene energije i svojstva pokožice tokom početne faze formiranja kajmaka. *KGH časopis (rad u štampi)*.
84. **Elfagm, A.A., Wheelock, J.V.** (1978): Interaction of Bovine α -Lactalbumin and β -Lacoglobulin during Heating. *Journal of Dairy Science* 61 (1), 28-32.

85. **Euston, S.R., Hirst, R.L.** (2000): The emulsifying properties of commercial milk protein products in simple oil-in-water emulsions and in a model food system. *Journal of Food Chemistry and Toxicology* 65: 934-940.
86. **Euston, S.R., Horne, D.S.** (2005): Simulating the self-association of caseins. *Food Hydrocolloids* 19, 379-386.
87. **Euston, S.R., Finnigan, S.R., Hirst, R.L.** (2000): Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids* 14, 155-161.
88. **Euston, S.E., Singh, H., Munro, P.A., Dalgleish, D.G.** (1995): Competitive adsorption between sodium caseinate and oil-soluble and water-soluble surfactants in oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science*. 60: 1124-1131.
89. **Euston, S.E., Singh, H., Munro, P.A., Dalgleish, D.G.** (1996): Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate or whey protein isolate as influenced by glycerol monostearate. *Journal of Food Science*, 61: 916-920.
90. **Farrell, H.M., Thompson, M.P.** (1974): "Physical Equilibria: Proteins" in *Fundamentals of Dairy Chemistry*, ed. Webb, B.H., Johnson, A.H., Alford, J.A. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 442-473.
91. **Farrell, H.M.** (1999): "Physical Equilibria: Proteins" in *Fundamentals of Dairy Chemistry*, third edition. Ed. Wong, N.P. A Chapman & Hall/Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, 461-510.
92. **Farrell, H.M., Qi, P.X., Brown, E.M., Cooke, P.H., Turnick, M.H., Wickam, E.D., Unruh, J.J.** (2002): Molten globule structures in milk proteins: implications for potential new structure-function relationships, *Journal of Dairy Science* 85:459-471.
93. **Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E.** (2004): Nomenclature of the Protein of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* 87:1641-1674.
94. **Fleer, G.J., Cohen Stuart, M.A., Scheutjens, J.M.H.M., Cosgrove, T., Vincent, B.** (1993): *Polymers at Interfaces*, Chapman and Hall, London.
95. **Fox, P.F.** (1986): Heat-induced coagulation of milk in *Developments of Dairy chemistry-1*. Chapter 6. Ed. Fox, P.F. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London and New York, 189-228.
96. **Fox, P.F., Morrissey, P.A.** (1997): Reviews of the progress of Dairy Science: heat stability of milk. *Journal of Dairy Research*. 44 (3), 627-646.
97. **Fox, P.F., McSweeney, P.L.H.** (1998): Milk proteins. In *Dairy Chemistry and biochemistry*, Blackie Academic and Professional London, 146-237.
98. **Fox, P.F., McSweeney, P.L.H.** (2003): *Advanced dairy chemistry, Vol.1, Proteins*, third edition, Part A, New York.
99. **Galazka, V.B., Ledward, D.A., Sumner, I.G., Dickinson, E.** (1997): Influence of High Pressure on Bovine Albumin and Its Complex with Dextran Sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3465-3471.
100. **Ghosh, B.C., Steffl, A., Kessler, H.G.** (1996): Rennetability of milk containing different heat-denatured whey protein. *Milchwissenschaft* 51 (1), 28-31.
101. **Graham, D.E., Philips, M.C.** (1979a): Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70:403-415.
102. **Graham, D.E., Philips, M.C.** (1979b): Proteins at liquid interfaces: III. Molecular structure of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70:427-439.
103. **Graves, E.L.F., Beaulieu, A.D., Drackley, J.K.** (2007): Factors Affecting the Concentration of Sphingomyelin in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 706-715.
104. **Grummer, R.R.** (1991): Effects of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74, 3244-3257.
105. **Guyomarc'h, F., Law, A.J.R., Dalgleish, D.G.** (2003): Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4652-4660.

106. **Guyomarc'h, F., Renan, M., Chatriot, M., Gamberre, V., Famelart, M.H.** (2007): Acid gelation properties of heated skim milk as a result of enzymatically induced changes in the micelle/serum distribution of the whey protein/kappa-casein aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10896-10993.
107. **Guyomarc'h, F., Nono, M., Nicolai, T., Durand, D.** (2009): Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of k-casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23, 1103-1110.
108. **Güzey, D., Gülseren, I., Bruce, B., Weiss, J.** (2006): Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids* 20:669-677.
109. **Hamada, J.S., Swanson, B.** (1994): Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34:283-292.
110. **Haque, Z.U.** (1993): Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: a review. *Journal of Dairy Science* 76:311-320.
111. **Haque, Z.U., Bohoua, G.L., Williams, J.B., Mikel, W.B.** (2010): Influence of whey peptides on the surface activity of k-casein and β -lactoglobulin A. *International Journal of Dairy Technology*. Vol 63, No 2, 190-196.
112. **Haque, Z., Kinsella, J.E.** (1988): Interaction between heated k-casein and beta lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *Journal of Dairy Research*, 55 (1), 67-80.
113. **Havea, P., Singh, H., Creamer, L.K., Campanella, O.H.** (1998): Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65: 79-91.
114. **Hawke, J.C., Taylor, M.W.** (1983): Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. In: *Development in dairy chemistry-2, Lipids*, Ed. Fox, P.F., Applied Sci. 80: 37-81.
115. **Hindle, E.J., Wheelock, J.V.** (1970): The release of peptides and glycopeptides by action of heat on cow's milk. *Journal of Dairy Research*, 37 (3), 397-405.
116. **Hoffmann, M.A.M., van Mil, P.J.J.M.** (1997): Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2942-2948
117. **Holt, C., Sawyer, L.** (1993): Caseins as reomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α 1-, β - i k-caseins. *Jornal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, Issue 15, 89, 2683-2692.
118. **Holt, C., Horne, D.S.** (1996): The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netheland Milk Dairy Journal*, 50 (2):85-111.
119. **Holt, C., DeKruif, C.G., Tuinier, R., Timmins, P.A.** (2003): Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 213, 275-284.
120. **Hong, Y.-H. and L. K. Creamer** (2002). Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal* 12(4): 345-359.
121. **Horne, D.S., Atkinson, P.J., Dickinson, e., Pinfield, V.J., Richardson, R.M.** (1998): Neutron reflectivity study of competitive adsorption of β -lactoglobulin and nonionic surfactant at the air-water interface. *International Dairy Journal* 8:73-77.
122. **Horne, D.S.** (2002): Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid Interface Science*, 7:456-461.
123. **Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottingham, S.M., Kitchen, B.J., Masters, C.J.** (1992): Interaction between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk, *Journal of Dairy Research*, 59: 187-195.
124. **Hunt, J.A., Dalgleish, D.G.** (1994a): Adsorption behavior of whey protein isolate and caseinate in soya oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 8, 175-187.

125. **Hunt, J.A., Dalgleish, D.G.** (1994b): Effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:2131-2135.
126. **Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L.** (2004): High pressure treatment of bovine milk: Effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research* 71:97-106.
127. **Jean, K., Renan, M., Famelart, M.H., Guyomarc'h, F.** (2006): Structure and surface properties of the serum heat-induced protein aggregates isolated from heated skim milk. *International Dairy Journal*, 16, 303-315.
128. **Jelić, S.** (1989): Neki aspekti krioglobulina i njihovog kliničkog značaja. *Doktorska disertacija*. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.
129. **Jensen, R. G.** (2002): The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85: 295 – 350.
130. **Joshi, N.S., Muthukumarappan, K., Dave, R.I.** (2004): Effect of Calcium on Microstructure and Meltability of Part Skim Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 1975-1985.
131. **Jovanović, S.** (2001): Uticaj obrazovanja koagregata proteina mleka na veće iskorišćenje ukupnih proteina pri proizvodnji polutvrdih sireva. *Doktorska disertacija*, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
132. **Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O., Denin Djurdjević, J** (2005): Page analysis of milk proteins altered by high thermal treatment. *Acta Alimentaria*, 34, 105-112.
133. **Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O., Vučić, T., Lacnjevac, Č.** (2007): SDS-Page Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments. *Sensors*, 7:371-383.
134. **Kalač, P., Samkova, E.** (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55 (12), 521-537
135. **Keady, T.W.J., Mayne, C.S., Fitzpatrick, D.A.** (2000); Effects of supplementation of dairy cattle with fish oil on silage intake, milk yield and milk composition. *Journal of Dairy Research*, 67, 137-153.
136. **Khanal, R.C., Dhiman, T.R., Boman, R.L.** (2003): Influence of turning cows out to pasture on fatty acid profile in milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 356.
137. **Kim, H.H.Y., Jimenez-Flores, R.** (1995): Heat induced interactions between the proteins of milk fat globules membrane and skim milk. *Journal of Dairy Science* 78 (1), 24-35.
138. **Kim, D. A., M. Cornec., Narsimhan, G.** (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 285. 100-109.
139. **Kinsella, J.E.** (1984): Milk proteins: physicochemical and functional properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 155-203.
140. **Kirchmeier, O., Kamal, N.M., Klostermeyer, H.** (1985): Heat treatment of milk and development of SH groups. II *Milchweissenschaft* 40 (12), 722-723.
141. **Krešić, G., Lelas, V., Herceg, Z., Režak, A** (2006): Effects of high pressure on functionality of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Lait* 86:303-315.
142. **Kristensen, D., Jensen, P.Y., Madsen, F., Birdi, K.S.** (1997): Rheology and Surface Tension of Selected Processed Dairy Fluids: Influence of Temperature. *Journal of Dairy Science*, 80:2282-2290.
143. **Kuwajima, K.** (2002): The role of the molten globule state in protein folding: the search for a universal view of folding. *PINSA*, (4), 333-340.
144. **Le, T.T., Deeth, H.C., Bhandari, B., Alewood, P.F., Holland, J.W.** (2012): A proteomic approach to detect lactosylation and other Chemical changes in stored milk protein concentrate. *Food Chemistry*, 132: 655-662.
145. **Leermakers, F.A.M., Atkinson, P.J., Dickinson, E., Horne, D.S.** (1996): Self-Consistent-Field Modeling of Adsorbed β -casein: Effects of pH and Ionic Strength on Surface Coverage and Density Profile. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178, 681-693.
146. **Lefebvre, J., Relkin, P.** (1996): Denaturation of Globular Proteins in Relation to Their Functional Properties, in *Surface Activity of Proteins*, ed. Magdassi, S., Marcel Dekker, New York, p. 181-237.

147. **Leman, J., Haque, Z., Kinsella, J.E.** (1988): Creaming stability of fluid emulsions containing different milk protein preparations. *Milchwissenschaft* 43:286-289.
148. **Long, J.E., van Winkle, Q., Gould, I.A.** (1963): Heat induce interaction between crude k-casein and β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 46, (12), 1329-1334.
149. **Loucheux-Lefebvre, M.H., Aubert, J.R., Jollés, P.** (1978); Prediction of the conformation of the cow and sheep kappa-caseins. *Biophysical Journal*. 23, 323-336.
150. **Lyster, R.L.J.** (1970): The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *Journal of Dairy Research* 37 (2), 233-243.
151. **Maćej, O.** (1989): Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi koagregata belančevina mleka. *Doktorska disertacija*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
152. **Maćej, O., Jovanović, S.** (1998): Uticaj različitih režima termičke obrade na iskorišćenje suve materije mleka. *Prehrambena Industrija*, 46-51.
153. **Maćej, O., Jovanović, S.** (2000): Obrazovanje kompleksa između kazeina i serum proteina mleka u termički tretiranom mleku, *Acta Periodica Tehnologica*, 31 (A), 83-93.
154. **Maćej, O., Barać, M., Denin-Đurđević, J.** (2002): The influence of high temperatures on milk proteins. *Hemijska industrija*. 56 (3) 123-132.
155. **Maćej, O., Jovanović, S., Barać, M.** (2007): Proteini mleka. *Monografija*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
156. **Maćej, O., Jovanović, S., Vučić, T, Seratlić, S., Barać, M., Trifunović, G., Vučković, S., Obradović, D., Jovanović, Z., Glavinić, V., Kostadinović, M.** (2008): *Elaborat o zaštiti imena porekla proizvoda "Užički kajmak"*. Okružni savez zemljoradničkih zadruga Užice i "Zlatibor K d.o.o", Šljivovica. Zavod za intelektualnu svojinu, reg. br. 2/2008, Beograd.
157. **Mahmoudi, N., Mahalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., Riaublanc, A.** (2007): Light scattering study of the structure of aggregates and gels formed by heat-denatured whey protein isolate and β -lactoglobulin at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3104-3111.
158. **Malin, E.L., Brown, E.M., Wickham, E.D., Farrell, H.M.Jr.**(2005): Contribution of Terminal Peptides to the Associative Behavior of α_{s1} -Casein. *Journal of Dairy Science*: 88,2318-2328.
159. **Mather, I.H.** (2000): A review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane, *Journal of Dairy Science*: 83,203-247.
160. **Matsudomi, N., Oshita, T., Sasaki, E., Kobayashi, K.** (1992): Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 1697-1700.
161. **Matsudomi, N., Oshita, T., Kobayashi, K., Kinsella, J.E.** (1993): Alpha-lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1053-1057.
162. **McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O., Creamer, L.K.** (1994): Thermal gelation and denaturation of bovine beta-lactoglobulin-A and beta-lactoglobulin-B. *Journal of Dairy Research*, 61, 221-232.
163. **McSweeney, S.L., Mulvihill, D.M., O'Callaghan, D.M.** (2004): The influence of pH on the heat-induced aggregation of model milk protein ingredient systems and model infant formula emulsions stabilized by milk protein ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18, 109-125.
164. **Mellema, M., Isenbart, J.G.** (2004): Effect of Acidification and Heating on the Rheological Properties of Oil-Water Interfaces with Adsorbed Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*. 87:2769-2778.
165. **Millqvist-Fureby, A.M., Elofson, U., Bergenstal, B.** (2001): Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 21, 47-58.
166. **Monahan, F.J., McClements, D.J., German, J.B.** (1996): Disulfide-mediated polymerization reactions and physical properties of heated WPI-stabilised emulsions. *Journal of Food Science* 61 (3), 504-509.
167. **Morr, C.V.** (1985): Functionality of heated milk proteins in dairy and related foods. *Journal of Dairy Science* 68 (10), 2773-2781.

168. **Morales-Sol, M., Palmquist, D.L., Weiss, W.P.** (2000): Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. 83: 2105-2111.
169. **Morgan, F., Souhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubis, J-L., Léonil, J.** (1998): Lactolation of β -Lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *International Dairy Journal*, 8, 95-98.
170. **Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., Baert, J.** (1989): Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science* 72, (9), 2247-2256.
171. **Mukherjee, N., Bansal, B., Dong Chen, X.** (2005): Measurement of Surface Tension of Homogenised Milks. *International Journal of Food Engineering*, 1:1-6.
172. **Mulvihill, D.M., Donovan, M.** (1987): Whey proteins and their thermal denaturation-a review, *Irish Journal of Food Science Technology*, 11 (1), 43-75.
173. **Mulvihill, D.M., Kinsela, J.E.** (1987): Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technology*, 41, 102-111.
174. **Murrey, B.S., Dickinson, E.** (1996): Interfacial Rheology and Dynamic Properties of Adsorbed Films of Food Proteins and Surfactants. *Food Science and Technology International (Jpn.)*, 2:131-145.
175. **Nikolai, T.** (2007): Structure of Self-Assembled Globular Proteins. In "Food Colloids, Self-Assembly and Material Science". Ed.by Dickinson, E., Leser, M.E. Royal Society of Chemistry
176. **O'Kennedy, B.T., Mounsey, J.S.** (2006): Control of heat-induced aggregation of whey proteins using casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 779-893.
177. **Oldfield, D.J., Singh, H., Taylor, M.W.** (1998a): Association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelles in skim milk heated in a ultra-high temperature plant. *International Dairy Journal*, 8 (9), 765-770.
178. **Oldfield, D.J., Singh, H., Taylor, M.W., Pearce, K.N.** (1998b): Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant. *International Dairy Journal*, 8, 311-318.
179. **Oh, S., Richardson, T.** (1991): Heat-induced interactions of bovine serum albumine and immunoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 74: 1786-1790.
180. **Parodi, P.W.** (1979): Stereospecific distribution on fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *Journal of Dairy Research*, 46: 75-81.
181. **Patel, H.A., Singh, H., Anema, S.G., Creamer, L.K.** (2006): Effect of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3409-3420.
182. **Pejić, O.** (1956): *Tehnologija mleka II deo*. Naučna knjiga, Beograd.
183. **Petričić, A.** (1984): Konzumno i fermentirano mleko, SOUR Vjesnik, Zagreb.
184. **Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura**, *Službeni glasnik RS br. 33/2010 od 18. 5. 2010.*
185. **Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka**, *Službeni list SFRJ br. 32/83.*
186. **Precht, D., Molkentin, J.** (1999): Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further *cis/trans*-isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat. *Kieler Milchwirtshch. Forschungsber.* 51:63-78.
187. **Puđa, P., Radovanović, M., Starčević, V.** (2004): Postupak proizvodnje kajmaka tradicionalnog kvaliteta u uslovima industrijskog načina rada, *Prehrambena industrija*, 15, 1-2, 15-20.
188. **Puđa, P., Radovanović, M., Starčević V., Miočinović J.** (2005a): Sastav i karakteristike kajmaka. I. Uticaj sastava mleka na formiranje pokožice, *Časopis za unapređenje stočarstva, Biotehnologija u stočarstvu*, UDC 636, ISSN 1450-9156, 175-187.
189. **Puđa, P., Radovanović, M., Đerovski, J.** (2005b): Prilog proučavanju i klasifikaciji kajmaka, *Prehrambena industrija*, 16, 1-2, 55-60.

190. **Puđa, P., Radovanović, M., Đerovski, J.** (2006): Proizvodnja i svojstva kajmaka. *Mljekarstvo*, 56 (4), 221-232.
191. **Pudja, P., Djerovski, J., Radovanovic, M.** (2008): An autochthonous Serbian product-Kajmak Characteristics and production procedures. *Dairy Science Technology* 88, 163-172.
192. **Puđa, P.** (2009): *Tehnologija Mleka 1, Sirarstvo Opšti deo*, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
193. **Qi, X.L., Holt, C., McNulty, D., Clark, D.T., Brownlow, S., Jones, G.R.** (1997): Effect of temperature on the secondary structure of beta-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemistry Journal* 324:341-346
194. **Radovanović, M., Ećim-Đurić, O, Nedeljković, A., Miočinović, J., Pudja, P.** (2012): Aanalysis of mass and energy balance in the initial stage of kajmak production. Proceeding of Papers of 6th Central European Congress on Food, CEFood, Novi Sad, May23-26. 1313-1318.
195. **Raikos, V.** (2010): Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interface. A review. *Food Hydrocolloids* 24:295-265.
196. **Rodiles-Lopez, J.O., Arroyo-Maya, I.J., Jaramillo-Flores, M.E., Gutierrez-Lopez, G.F., Hernandez-Arana, A., Barbosa-Canovas, G.V., Nirjanjan, K., Hernandez-Sanchez, H.** (2010): Effects of high hydrostatic pressure on the structue of bovine α -lactalbumin. *Journal of Dairy Science* 93:1420-1428.
197. **Roehl, D., Jelen, P.** (1988): Surface Tension of Whey and Whey Derivates. *Journal of Dairy Science*, 71:3167-3172.
198. **Samel, R., Weaver, R.W.V., Gammack, D.B.** (1971): Exchanges on storage in milk processed by ultra-high-temperature sterilization. *Journal of Dairy Research* 38 (3), 323-332.
199. **Sarić, Z.** (1992): Uticaj fizičkih osobina i količine mlečne masti na kvalitet kajmaka. *Magistarski rad*. Poljoprivredni fakultet, Sarajevo.
200. **Sawyer, W.H.** (1968): Heated denaturation of bovine β -lactoglobulins and relevance of disulfide aggregation. *Journal of Dairy Science*, 51 (3), 323-329.
201. **Sawyer, W.H.** (1969): Complex Between β -lactoglobulin and k-casein. A Review. *Journal of Dairy Science*, 52 (9), 1347-1355.
202. **Sawyer, L., Kontopidis, G., Wu, S.Y.** (1999): β -lactoglobulin-a three-dimensional perspective. *International Journal of Food Science Technology*. 34, 409-418.
203. **Schellman, J.A.** (1997): Temperature, stability and hydrophobic interaction. *Biophysical Journal* 73 (6), 2960-2964.
204. **Schmidt, D.G.** (1982): Association of casins and caseins micelle structure, in: Fox, P.F. (ed.), Development in Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins, Applied Science Publishers, London, UK, 61-86.
205. **Sharma, S. K., Dagleish, D. G.**(1993): Interactions between milk serum-proteins and synthethic fat globule-membrane during heating of homogenized whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1407-1412.
206. **Sharma, S.K., Dagleish, D.G.** (1994): Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into the fat globule membrane of homogenized milk. *Journal of Dairy Research*, 61, 375-384.
207. **Shingfield, K.J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Ärölä, A., Nurmela, K.V.V., Huhtanen, P., Griinari, J.M.** (2003): Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77; 165-179
208. **Shingfield, K.J., Salo-Väänänen, P., Pahkala, E., Tojvonen, V., Jaakkola, S., Piironen, V., Huhtanen, P.** (2005): Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 349-361.
209. **Singh, H., Creamer, L.K.** (1992): Heat stability of milk. In Advanced Dairy Chemistry, ed. Fox, P.F. Vol.1, London Applied Science, 621-656.
210. **Singh, A.** (2011): Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 1-7.
211. **Shimizu, M. T., Kamiya, T., Yamauchi, K.** (1981): The adsorption of whey proteins on the surface of emulsified fat. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45:2491-2498.

212. **Spiro, M., Chong, Y.Y.** (1997): Surface films formed by milk in hard water. *Food Chemistry*, 59, 237-245.
213. **Stevenson, E.M., Horne, D.S., Leaver, J.** (1997): Displacement of native and thiolated β -casein from oil-water interfaces-effect of heating, ageing and oil phase. *Food Hydrocolloids* 11:3-6.
214. **Suttiprasit, P., Krisdhasima, V., McGuire, J.** (1992): The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin: I. Surface tension measurement with single component and mixed solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 154, 316-326.
215. **Swaisgood, H.E.** (1986): Chemistry of milk protein. In *Developments in Dairy Chemistry-1*. Chapter 1. Ed. Fox, P.F. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London and New York, 1-60
216. **Swaisgood, H.E.** (1992): Chemistry of caseins. In *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. Ed. Fox, P.F. Elsevier Applied Science, UK, 63-110.
217. **Swaisgood, H.E.** (1993): Review and Update of Casein Chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76 (10):3054-3061.
218. **Tran Le, T., Sabatino, P., Heyman, B., Kasinos, M., Hoang Dinh, H., Dewettinck, K., Martins, J., Van der Meeren, P.** (2011): Improved heat stability by whey protein-surfactant interaction. *Food Hydrocolloids*, 25, 594-603.
219. **Uversky, V.N.** (2002): Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 11, 739-756.
220. **Vasbinder, A.J., de Kruif, C.G.** (2003): Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International Dairy Journal*, 13, 669-677.
221. **Vasbinder, A.J., Alting, A., Kees, G., de Kruif, K.B.** (2003): Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 31:115-123.
222. **Vasienko, K.S., Uversky, V.N.** (2002): Native-like secondary structure of molten globules. *Biochimica Biophysica Acta* 1594:168-177.
223. **Voronjec, D., Kozić, Đ.** (2002): Vlažan vazduh, SMEITS.
224. **Vučić, T., Jovanović, S., Maćej, O., Barać, M., Seratlić, S., Jovanović, Z.** (2008): Tehnologija i kvalitet užičkog kajmaka. *Biotehnologija u stočarstvu*. V Simpozijum Mleko i proizvodi od mleka, 267-277.
225. **Walstra, P., Jenness, R.** (1984): Dairy chemistry and physics. Ed. J. Wiley & Sons, New York
226. **Walstra, P.** (1999): Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9:189-192
227. **Walstra, P.** (2003): Physical Chemistry of Foods, Marcel Dekker. Inc. New York.
228. **Wang, J., McGuire, J.** (1997): Surface Tension Kinetics of the Wild Type and Four Synthetic Stability Mutants of T4 Phage Lysozyme at the Air-Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185:317-323.
229. **Wijesinha-Bettoni, R., Gao, C., Jenkins J.A., Mackie A. R., Wilde P J., Mills E.N.C., Smith L.J.** (2007): Heat Treatment of Bovine α -Lactalbumin Results in Partially Folded, Disulfide Bond Shuffled States with Enhanced Surface Activity, *Biochemistry*, 46, 9774-9784.
230. **Web, M.F., Maaem, H.A., Schmidt, K.A.** (2002): Food protein functionality in a liquid system. *Journal of Dairy Science* 67:2896-2902.
231. **Whitnah, C.H.** (1959): The Surface Tension of Milk. A review. *Journal of Dairy Science*, 42:1437-1449.
232. **Wood, P.W.** (1982): Physical Properties of Dairy Products, Ministry of Agriculture and Fisheries (MAF), New Zealand.
233. **Ye, A., Singh, H., Oldfield, D.J., Anema, S.** (2002): Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*. 12, 393-402.
234. **Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S.** (2004a): Interaction of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of milk. *Le Lait*, 84:269-283.
235. **Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S.** (2004b): Kinetics of heat-induced association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *International Dairy Journal*, 14, 5, 375-465.

236. **Zayas, J.F.** (1997): *Functionality of Proteins in Food*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany.
237. **Zonji, Đ.** (1977): Neka razmatranja u vezi stvaranja kajmaka. *Mljekarstvo*, 27/9.

8. PRILOZI

Tabela 1. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja termičkog tretmana na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=7,59$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=5,41$		UTICAJ TERMIČKOG TRETMANA (A1, A2, A3, A4)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $l_{sd}=t_{0,005;\gamma_2} \times S\bar{d}$ $\alpha=0,05$; $l_{sd}=t_{0,025;\gamma_2} \times S\bar{d}$
Mast, %	3,21 nz	/			/
Proteini, %	32,66**	$\bar{X}_{A1/A2}=0,37nz$	$\bar{X}_{A1/A3}=1,62**$	$\bar{X}_{A1/A4}=0,37nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=0,716$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=0,492$
SM, %	4,04 nz	/	/	/	/
Mast u vod.fazi, %	3,54 nz	/	/	/	/
Proteini u vod. fazi, %	2,43 nz	/	/	/	/
Proteini, g	8,14**	$\bar{X}_{A1/A2}=0,69*$	$\bar{X}_{A1/A3}=1,28**$	$\bar{X}_{A1/A4}=0,30nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=0,888$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=0,610$
SM, g	0,37	/	/	/	/

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 2. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja sadržaja masti mleka (pri 3,4% proteina) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=5,14$		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja masti pri 3,4% proteina (A2, B1, B2)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $l_{sd}=t_{0,005;\gamma_2} \times S\bar{d}$ $\alpha=0,05$; $l_{sd}=t_{0,025;\gamma_2} \times S\bar{d}$
Mast, %	4,73 nz	/			/
Proteini, %	22,47**	$\bar{X}_{A2/B1}=1,49**$	$\bar{X}_{A2/B2}=2,42**$	$\bar{X}_{B1/B2}=0,93*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=1,35$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=0,89$
SM, %	5,06 nz	/	/	/	/
MuSM, %	2,83 nz	/	/	/	/
Prinos, g	9,67*	$\bar{X}_{A2/B1}=6,46*$	$\bar{X}_{A2/B2}=8,39**$	$\bar{X}_{B1/B2}=1,93nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=7,41$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=4,89$
Mast, g	18,70**	$\bar{X}_{A2/B1}=5,31*$	$\bar{X}_{A2/B2}=9,75**$	$\bar{X}_{B1/B2}=4,44**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=5,91$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=3,90$
SM, g	15,61**	$\bar{X}_{A2/B1}=5,71*$	$\bar{X}_{A2/B2}=9,37**$	$\bar{X}_{B1/B2}=3,66nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=6,27$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=4,14$
Voda, g	1,25 nz	/	/	/	/

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 3. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja sadržaja masti mleka (pri 4,2% proteina) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=5,14$		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja masti pri 4,2 % proteina (A2, B3, B5)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $l_{sd}=t_{0,005;\gamma_2} \times S\bar{d}$ $\alpha=0,05$; $l_{sd}=t_{0,025;\gamma_2} \times S\bar{d}$
Mast, %	4,73 nz	/			/
Proteini, %	18,83**	$\bar{X}_{A2/B3}=0,25nz$	$\bar{X}_{A2/B5}=0,73**$	$\bar{X}_{B3/B5}=0,48**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=0,46$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=0,30$
SM, %	1,48 nz	/	/	/	/
MuSM, %	3,89 nz	/	/	/	/
Prinos, g	77,19**	$\bar{X}_{A2/B3}=4,07*$	$\bar{X}_{A2/B5}=14,63**$	$\bar{X}_{B3/B5}=10,56**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=4,51$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=2,97$
Mast, g	30,68**	$\bar{X}_{A2/B3}=3,89*$	$\bar{X}_{A2/B5}=11,77**$	$\bar{X}_{B3/B5}=7,88**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=5,67$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=3,74$
Proteini, g	34,99**	$\bar{X}_{A2/B3}=0,24nz$	$\bar{X}_{A2/B5}=0,83**$	$\bar{X}_{B3/B5}=0,59**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=0,37$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=0,25$
SM, g	38,16**	$\bar{X}_{A2/B3}=4,13*$	$\bar{X}_{A2/B5}=12,04**$	$\bar{X}_{B3/B5}=7,91**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=5,19$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=3,43$
Voda, g	6,57*	$\bar{X}_{A2/B3}=0,06nz$	$\bar{X}_{A2/B5}=2,59*$	$\bar{X}_{B3/B5}=2,65*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=3,09$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=2,04$

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 4. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja sadržaja masti mleka (pri 5% proteina) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=5,14$		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja masti pri 5% proteina (A2, B4, B6)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $lsd=t_{0,005;\gamma_2} \times S\bar{D}$ $\alpha=0,05$; $lsd=t_{0,025;\gamma_2} \times S\bar{D}$
Mast, %	0,44	/			/
Proteini, %	0,18	/			/
SM, %	1,93 nz	/			/
Prinos, g	26,32**	$\bar{X}_{A2/B4}=8,33^*$	$\bar{X}_{A2/B6}=21,12^{**}$	$\bar{X}_{B4/B6}=12,79^{**}$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=10,87$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=7,18$
Mast, g	17,18**	$\bar{X}_{A2/B4}=5,44nz$	$\bar{X}_{A2/B6}=14,07^{**}$	$\bar{X}_{B4/B6}=8,52^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=8,96$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=5,91$
Proteini, g	15,47**	$\bar{X}_{A2/B4}=0,78^*$	$\bar{X}_{A2/B6}=1,70^{**}$	$\bar{X}_{B4/B6}=0,92^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=1,13$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=0,75$
SM, g	23,90**	$\bar{X}_{A2/B4}=6,13nz$	$\bar{X}_{A2/B6}=17,22^{**}$	$\bar{X}_{B4/B6}=11,09^{**}$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=9,36$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=6,18$
Voda, g	7,33*	$\bar{X}_{A2/B4}=2,20nz$	$\bar{X}_{A2/B6}=3,90^{**}$	$\bar{X}_{B4/B6}=1,70nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=3,79$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=2,50$

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 5. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja sadržaja proteina mleka (pri 4% masti) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=5,14$		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja proteina pri 4% masti (A2, B3, B4)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $lsd=t_{0,005;\gamma_2} \times S\bar{D}$ $\alpha=0,05$; $lsd=t_{0,025;\gamma_2} \times S\bar{D}$
Prinos, g	8,95*	$\bar{X}_{A2/B3}=4,07nz$	$\bar{X}_{A2/B4}=8,33^{**}$	$\bar{X}_{B3/B4}=4,26nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=7,30$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=4,82$
Voda, g	6,67*	$\bar{X}_{A2/B3}=0,06nz$	$\bar{X}_{A2/B4}=2,20^*$	$\bar{X}_{B3/B4}=2,26^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=2,61$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=1,72$

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 6. Vrednosti grupnog testiranja uticaja sadržaja masti mleka (pri 3,4% proteina) na sadržaj masti pokožica

UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja masti pri 3,4% proteina (A2,B2)	
F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=7,71$	
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka
Mast, %	8,74*

Legenda: *statistički značajan uticaj ($p<0,05$);

Tabela 7. Vrednosti grupnog testiranja uticaja sadržaja proteina mleka (pri 6% i 8% masti mleka) na parametre pokožica

UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja proteina mleka pri 6% masti (B1, B5)		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj sadržaja proteina mleka pri 8% masti (B2, B6)	
F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=7,71$		F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;\gamma_1;\gamma_2}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;\gamma_1;\gamma_2}=7,71$	
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka
Mast, %	0,73	Mast, %	9,12*
Proteini, %	3,79*	Proteini, %	49,70**
Prinos, g	16,25*	Prinos, g	19,13*
Mast, g	36,47**	Mast, g	5,10nz
Proteini, g	11,67*	Proteini, g	77,38**
M/P	0,55	M/P	21,90**

Legenda: nz-nije statistički značajan uticaj ($p>0,05$); *statistički značajan uticaj ($p<0,05$); **statistički vrlo značajan uticaj ($p<0,01$).

Tabela 8. Vrednosti grupnog testiranja uticaja sadržaja dodatih proteina surutke na parametre pokožica

UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj dodatih proteina surutke u mleko sa 4% masti i 3,4% proteina (A2,B7)		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj dodatih proteina surutke u mleko sa 6% masti i 4,2% proteina (B5,B8)		UTICAJ SASTAVA MLEKA-uticaj dodatih proteina surutke u mleko sa 8% masti i 5% proteina (B6,B9)	
F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=7,71$		F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=7,71$		F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=21,20$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=7,71$	
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka
Mast, %	0,002	Mast, %	6,47nz	Mast, %	1,44nz
Proteini, %	0,30	Proteini, %	4,98nz	Proteini, %	5,55nz
MuSM, %	1,61nz	MuSM, %	13,87*	MuSM, %	0,62
PuSM, %	0,11	PuSM, %	5,81nz	PuSM, %	4,10nz
Prinos, g	8,83*	Prinos, g	0,55	Prinos, g	0,14
Mast, g	9,22*	Mast, g	4,13nz	Mast, g	1,95nz
Proteini, g	10,16*	Proteini, g	0,11	Proteini, g	0,55
M/P	0,04	M/P	10,98*	M/P	3,82nz

Legenda: nz-nije statistički značajan uticaj ($p>0,05$); *statistički značajan uticaj ($p<0,05$); **statistički vrlo značajan uticaj ($p<0,01$).

Tabela 9. Vrednosti grupnog testiranja uticaja parametara vazduha na parametre pokožica

UTICAJ PARAMETARA VAZDUHA (C1, C2, C3, C4, C5)	
F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=5,99$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=3,48$	
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka
Mast, %	41,26**
Proteini, %	5,33*
SM, %	34,28**
MuSM, %	17,81**
PuSM, %	11,48**
Prinos, g	13,94**
Mast, g	15,36**
Proteini, g	10,33*
SM, g	14,45**
M/P	13,01**

Legenda: nz-nije statistički značajan uticaj ($p>0,05$); *statistički značajan uticaj ($p<0,05$); **statistički vrlo značajan uticaj ($p<0,01$).

Tabela 10. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja temperature vazduha (pri $\phi 70\%$) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=5,14$		UTICAJ PARAMETARA VAZDUHA-uticaj temperature vazduha pri $\phi 70\%$ (C5, C2, C4)			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	LSD TEST			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $l_{sd}=t_{0,005;72} \times S\bar{d}$ $\alpha=0,05$; $l_{sd}=t_{0,025;72} \times S\bar{d}$
		Izračunate vrednosti uzorka			
Mast, %	72,18**	$\bar{X}_{C5/C2}=4,00**$	$\bar{X}_{C5/C4}=7,67**$	$\bar{X}_{C2/C4}=3,67**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=2,37$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=1,56$
Proteini, %	3,28nz	/			/
SM, %	92,35**	$\bar{X}_{C5/C2}=6,09**$	$\bar{X}_{C5/C4}=3,73**$	$\bar{X}_{C2/C4}=2,36**$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=1,69$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=1,12$
MuSM, %	14,30**	$\bar{X}_{C5/C2}=1,51nz$	$\bar{X}_{C5/C4}=3,91**$	$\bar{X}_{C2/C4}=2,40*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=2,73$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=1,80$
Prinos, g	5,18*	$\bar{X}_{C5/C2}=5,00*$	$\bar{X}_{C5/C4}=3,00nz$	$\bar{X}_{C2/C4}=2,00nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=5,80$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=3,83$
Mast, g	22,21**	$\bar{X}_{C5/C2}=4,17**$	$\bar{X}_{C5/C4}=4,48**$	$\bar{X}_{C2/C4}=0,31nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=2,78$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=1,84$
Proteini, g	0,30	/			/
SM, g	15,26**	$\bar{X}_{C5/C2}=4,70**$	$\bar{X}_{C5/C4}=4,29**$	$\bar{X}_{C2/C4}=0,41nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $l_{sd_{0,005}}=3,50$; Za nivo $\alpha=0,05$; $l_{sd_{0,025}}=2,31$
Voda, g	3,54nz	/			/

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 11. Vrednosti grupnog i pojedinačnog testiranja uticaja rel. vlažnosti vazduha (pri temperaturi 30°C) na parametre pokožica

F-TEST (tablične vrednosti) Za nivo $\alpha=0,01$; $F_{0,01;71;72}=10,92$ Za nivo $\alpha=0,05$; $F_{0,05;71;72}=5,14$		UTICAJ PARAMETARA VAZDUHA-uticaj rel. vlažnosti vazduha pri 30°C (C1, C2, C3)			
		LSD TEST			
Posmatrani parametri pokožica	Izračunate vrednosti, F količnik uzoraka	Izračunate vrednosti uzorka			Granične vrednosti: $\alpha=0,01$; $lsd=t_{0,005;72} \times S\bar{d}$ $\alpha=0,05$; $lsd=t_{0,025;72} \times S\bar{d}$
Mast, %	29,47**	$\bar{X}_{C1/C2}=6,33^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=6,33^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=0,00nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=3,53$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=2,33$
Proteini, %	4,36nz	/			/
SM, %	27,02**	$\bar{X}_{C1/C2}=4,98^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=8,24^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=3,26^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=4,19$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=2,76$
MuSM, %	16,39**	$\bar{X}_{C1/C2}=3,15^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=0,97nz$	$\bar{X}_{C2/C3}=4,12^{**}$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=2,78$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=1,84$
Prinos, g	22,96**	$\bar{X}_{C1/C2}=9,34^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=5,67^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=3,67^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=5,14$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=3,40$
Mast, g	8,87*	$\bar{X}_{C1/C2}=3,14^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=1,13nz$	$\bar{X}_{C2/C3}=2,01^*$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=2,80$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=1,85$
Proteini, g	11,47*	$\bar{X}_{C1/C2}=1,03^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=0,96^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=0,07nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=0,89$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=0,59$
SM, g	14,75**	$\bar{X}_{C1/C2}=1,06nz$	$\bar{X}_{C1/C3}=4,74^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=3,68^{**}$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=3,40$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=2,24$
Voda, g	32,83**	$\bar{X}_{C1/C2}=4,59^{**}$	$\bar{X}_{C1/C3}=4,60^{**}$	$\bar{X}_{C2/C3}=0,01nz$	Za nivo $\alpha=0,01$; $lsd_{0,005}=2,43$; Za nivo $\alpha=0,05$; $lsd_{0,025}=1,60$

Legenda: nz-nije statistički značajno ($p>0,05$); *statistički značajno ($p<0,05$); **statistički vrlo značajno ($p<0,01$).

Tabela 12. Prosečne vrednosti koeficijenta varijacije (Cv) parametara sastava pokožica iz oglada serije A, B i C izvedenih u tri ponavljanja

Ogled	Prosečan hemijski sastav, %					Prosečan hemijski sastav, g				Prinos, g
	Mast	Proteini	SM	MuSM	PuSM	Mast	Proteini	SM	Voda	
A1	3,98	4,75	3,63	0,34	8,05	10,12	17,86	10,29	17,66	12,87
A2	9,25	0,84	6,59	3,76	7,39	15,17	5,63	12,45	9,06	6,24
A3	3,89	4,26	3,16	2,25	5,28	14,97	13,09	14,99	3,98	11,86
A4	14,03	2,00	8,78	5,30	10,31	15,11	2,05	9,89	17,65	2,94
B1	7,39	10,00	3,01	4,41	12,84	5,92	17,06	7,42	14,90	8,78
B2	6,57	7,53	3,82	2,84	11,35	3,67	11,18	2,12	17,64	3,76
B3	2,79	2,42	2,87	1,65	1,94	4,16	4,31	2,57	10,93	3,73
B4	8,18	11,63	2,98	10,14	9,55	11,64	16,52	10,97	5,21	8,37
B5	4,25	2,40	2,76	2,05	2,15	3,81	3,05	1,80	9,26	1,85
B6	3,27	5,50	2,62	1,39	7,10	9,52	7,16	8,21	13,99	9,00
B7	3,44	2,74	5,95	2,55	5,60	13,96	15,96	11,58	30,19	17,54
B8	2,89	6,21	2,74	1,35	7,39	11,52	19,17	12,77	17,18	13,41
B9	7,45	6,69	7,08	1,47	13,56	6,79	19,74	6,44	30,06	13,44
C1	2,86	6,67	3,11	0,43	9,47	4,52	9,25	4,95	9,06	3,69
C2	0,91	7,49	1,17	0,82	8,50	5,30	10,98	5,34	8,18	6,19
C3	1,57	7,28	0,22	1,64	7,26	3,15	8,16	2,49	3,10	5,81
C4	1,97	2,43	0,67	1,61	1,78	4,24	2,92	4,70	6,98	3,08
C5	0,98	0,19	0,47	0,54	0,56	2,51	1,53	2,08	0,83	0,64

Tabela 13. Lista skraćenica i simbola

Skraćenica, simbol	Značenje
α -LA	α -laktalbumin
α s-CN	α s-kazein
α s1-CN	α s1-kazein
α s2-CN	α s2-kazein
Asp	asparagin
β -CN	β kazein
β -LG	β -laktoglobulin
β -LG A	β -laktoglobulin genetska varijanta A
BSA	albumin krvnog seruma
BTN	butirofilin
CLA	konjugovana linolna kiselina
CCP	koloidni kalcijum fosfat
Cv	koeficijent varijacije
CD	kružni dihiroizam
Cys	cistein
FDSP	frakcije dominirajućih proteina surutke
FK	frakcije kazeina
FVMM	frakcije velikih molekulskih masa
G´	površinska smicajna elastičnost
HHP	visoki hidrostatički pritisak
Ig	imunoglobulini
Ile	izoleucin
IPS	izolati proteina surutke
k-CN	k-kazein
KPS	koncentrati proteina surutke
Leu	leucin
MM	mlečna mast
MFGM	adsorpcioni sloj masnih globula
MuSM	mast u suvoj materiji
PuSM	proteini u suvoj materiji
2DE	2D elektroforeza
2ME	2-merkaptetanol (β -merkaptetanol)
M/P	odnos apsolutnih količina masti/proteina, [kg/kg]
M/m ²	distribucija apsolutnih količina masti po jedinici površine, [kg/m ²]
MUC 1	mucin 1
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
OMP	obrano mleko u prahu
P/m ²	distribucija apsolutnih količina proteina po jedinici površine, [kg/m ²]
PAM	površinski aktivne materije
PAS 6	komponenta MFGM
PAS 7	komponenta MFGM
Phe	fenilalanin
PP	proteozo- peptonska frakcija
Pro	prolin
SM	suva materija
S ₁₀₀	indeks koji predstavlja zbir sadržaja masti i proteina
S _m	indeks masti (procentualno učešće masti u indeksu S ₁₀₀)

S_p	indeks proteina (procentualno učešće proteina u indeksu S_{100})
(% m/% p)	označava sadržaj masti i proteina u mleku za izradu pokožica tj. kajmaka
sp	označava dodate proteine surutke u mleko za izradu pokožica tj. kajmaka
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SDS PAGE (SDS PAG elektroforeza)	natrijum dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza
SDS-R	natrijum dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza u redukujućim uslovima
SDS-NR	natrijum dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza u neredujućim uslovima
SCF	metoda samousaglašenog polja
TCA	trihlorsirćetna kiselina
Tyr	tirozin
Val	valin
VuBMS	voda u bezmasnoj materiji sira
XDH/XO	ksantin dehidrogenaza/oksidaza
A	površina kontaktne ravni mleko – vazduh, [m ²]
D_{12}	binarni koeficijent difuzije, [m ² /s]
Nu	Nuselt-ov broj, [-]
Pr	Prandtl-ov broj, [-]
Re	Reynolds-ov broj, [-]
Sc	Schmidt-ov broj, [-]
Sh	Sherwood-ov broj, [-]
T	temperatura, [K]
T_a	temperatura pare u neporemećenoj struji vazduha, [K]
T_s	temperatura pare neposredno iznad površine mleka, [K]
a	zamišljena kontaktna ravan mleko – vazduh
g_{ml}	koeficijent masene provodljivosti, [kg/m ² s]
h	entalpija vazduha, [kJ/kg _{sv}]
j_1	difuzioni maseni fluks pare, tj. komponente 1, [kg/m ² s]
k	koeficijent prolaza toplote, [W/m ² K]
k_m	maseni koeficijent prelaza vode u vazduh u ravni iznad kontaktne površine, [kg/m ² sPa]
l	karakteristična dužina površine koja je u kontaktu sa vazduhom, [m]
\dot{m}	maseni protok vazduha, [kg/s]
\dot{Q}	ukupan toplotni fluks, [kW]
\dot{q}	specifični toplotni fluks koji mleko preda vazduhu, [kW/m ²]
\dot{q}_{cond}	specifični toplotni fluks kondukcijom koji se predaje sa strane mleka vazduhu, [kW/m ²]
\dot{q}_{conv}	specifični toplotni fluks konvekcijom koji se predaje sa strane mleka vazduhu, [kW/m ²]
\dot{q}_{rad}	specifični toplotni fluks zračenjem koji se predaje sa strane mleka vazduhu, [kW/m ²]
s	zamišljena površina neposredno iznad kontaktne površine
u	zamišljena površina neposredno ispod kontaktne površine
Grčki simboli	
$\mu_s(\eta)$	površinska smicajna viskoznost, [Ns/m]
A	koeficijent prelaza toplote, [W/m ² K]
Λ	toplotna provodnost, [W/mK]
ρ	gustina, [kg/m ³]
T	vreme
Ω	maseni udeo vode
ϕ	koeficijent aktivnosti koji za vodu ima konstantnu vrednost
Δ	debljina, [m]

Φ	relativna vlažnost vazduha, [%]
Subskripti	
Air	vazduh
Cond	kondukcija
Conv	konvekcija
Da	suv vazduh (dry air)
Ml	mleko
Rad	zračenje
Wall	zid posude

BIOGRAFIJA AUTORA

Mira Radovanović je rođena 22.10.1967. godine u Ubu. Srednju hemijsku školu je završila u Beogradu 1986. godine. Odsek za Prehrambenu tehnologiju, grupa Tehnologija stočnih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu je upisala školske 1986/87. godine. Diplomirala je 1990. godine sa prosečnom ocenom 8,81 i ocenom 10 na diplomskom radu na temu "Hrana za specijalne namene na bazi UF mleka", čime je stekla zvanje diplomiranog inženjera poljoprivrede za tehnologiju stočnih proizvoda.

Poslediplomske studije, smer prehrambena tehnologija, grupa tehnologija animalnih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1991/92. godine, a na doktorske studije, studijski program prehrambena tehnologija je prešla školske 2007/08. godine, u skladu sa Bolonjskom konvencijom i Statutom Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Zvanje istraživač saradnik za užu naučnu oblast "Nauka o mleku" stekla je školske 2008. godine.

U periodu od 1998. do 2000. godine radila je na Odeljenju za tehnologiju mleka, Poljoprivrenog fakulteta u Zemunu kao saradnik na projektu "Fundamentalna istraživanja u prehrambrnoj tehnologiji" koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i razvoj. U periodu od 2000. do 2001. godine radila je kao saradnik u istom Odeljenju na realizaciji studentskih vežbi iz oblasti tehnologije mleka. Od 2001. godine započela je svoje radno angažovanje u kompaniji "Polimark" doo. u Beogradu, gde je u periodu do 2006. godine radila kao saradnik na projektu "Industrijska proizvodnja kajmaka". U istoj kompaniji učestvovala je i u timu za projektovanje mlekare, a od 2006. godine je angažovana na radom mestu šefa proizvodnje u mlekari, a zatim od 2009. godine na poziciji menadžera proizvodnje i kvaliteta. Od 2011. godine je angažovana u "Institutu za higijenu i tehnologiju mesa" u Beogradu kao istraživač saradnik na projektu pod nazivom "Unapređenje i razvoj novih tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica animalnog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu", br. 46009, koji se finansira od strane Ministarstva za prosvetu i nauku.

Do sada je u zajednici objavila ukupno 31 naučnih radova, prototip, patent i tehničko rešenje od čega su dva objavljena u međunarodnim časopisima sa Sci. liste. Kao istraživač učestvovala je na dva završena i u jednom tekućem projektu finansiranom od strane Ministarstva za nauku.

IZJAVA O AUTORSTVU

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Mira M. Radovanović

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije Broj indeksa: 07/46

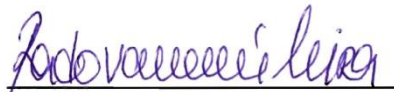
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Uticaj sastava i termičkog tretmana mleka na distribuciju
proteina u proizvodnji kajmaka i svojstva formirane pokožice

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 31. 10. 2012.

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Mira M. Radovanović

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije Broj indeksa: 07/46

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije Uticaj sastava i termičkog tretmana mleka na
distribuciju proteina u proizvodnji kajmaka i
svojstva formirane pokožice

Mentor Prof. dr Predrag Puđa

Potpisani/a Mira M. Radovanović

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 31. 10. 2012.

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj sastava i termičkog tretmana mleka na distribuciju proteina u proizvodnji kajmaka i svojstva formirane pokožice

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 31. 10. 2012.



1. **Autorstvo** – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo** – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo** – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo** – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo** – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo** – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.