

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Nemanja V. Kljajević

Uticaj skladištenja smrznutog kozjeg mleka, gruša i
grude na svojstva sira u salamuri

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Nemanja V. Kljajević

Influence of frozen storage of goat milk, curd and
precheese on brined cheese characteristics

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mentor:

Dr Snežana Jovanović, redovni profesor

Članovi komisije:

Datum odbrane: _____

UTICAJ SKLADIŠTENJA SMRZNUTOG MLEKA, GRUŠA I GRUDE NA SVOJSTVA SIRA U SALAMURI

Doktorska disertacija

Nemanja V. Kljajević, dipl. inž. preh. tehn.

REZIME

Mleko i proizvodi od mleka malih preživara imaju veliki značaj u ekonomiji određenih zemalja. Bez obzira na značajan porast proizvodnje kozjeg mleka i proizvoda, kravlje mleko je i dalje dominantno na tržištu. Značajan porast proizvodnje kozjeg mleka svakako ukazuje na potrebu da se intenziviraju istraživanja u ovoj oblasti.

Dostupnost proizvoda od kozjeg mleka je ograničena u zimskom periodu godine zbog sezonskog karaktera proizvodnje. U praksi su se pojavile razne mogućnosti da se ovo ograničenje prevaziđe. Smrzavanje kozjeg mleka, gruša ili grude je najjednostavniji način da se postigne prisustvo kozjih sireva na tržištu u toku cele godine. Smrzavanje, generalno, može imati negativan uticaj na sve prehrambene proizvode. Tri mehanizma su glavni uzročnici negativnog uticaja: mehanička oštećenja u proizvodu, koja nastaju uvećavanjem kristala leda; denaturacija i agregacija proteina, koja nastaje usled povećanja koncentracije elektrolita tokom smrzavanja; smanjenje sposobnosti reapsorpcije vode nakon odmrzavanja i pojava velike količine izdvojene tečnosti u odmrznutom proizvodu.

Ciljevi ove doktorske disertacije su: ispitivanje i analiziranje sezonskih varijacija sastava i svojstava kozjeg mleka u toku različitih perioda laktacije, ispitivanje uticaja smrzavanja kozjeg mleka na reološke parametre sirišne koagulacije i ispitivanje kozjih sireva u salamuri proizvedenih nakon kratkotrajnog (7 dana) i dugotrajnog (60 dana) skladištenja kozjeg mleka, gruša i grude u smrznutom stanju.

Navedeni ciljevi su sprovedeni kroz četiri serije ogleđa. U prvoj seriji ogleđa su ispitivane sezonske varijacije kozjeg mleka tokom četiri laktacije, kao i uticaj klimatskih

faktora na fizičko-hemijska svojstva mleka. U drugoj seriji ogleđa ispitivani su parametri sirišne koagulacije kozjeg mleka nakon skladištenja u smrznutom stanju. U trećoj seriji ogleđa ispitivan je uticaj kratkotrajnog skladištenja smrznutog mleka i gruša u različitim fazama presovanja na teksturu i fizičko-hemijska svojstva sireva u salamuri. U četvrtoj seriji ogleđa ispitivan je uticaj dugotrajnog skladištenja smrznutog kozjeg mleka, gruša i grude na fizičko-hemijska svojstva, teksturu, proteolizu, mikrostrukturu i senzorna svojstva sireva u salamuri u toku perioda zrenja od 8 nedelja.

Rezultatima ovog rada utvrđene su značajne varijacije u fizičko-hemijskim svojstvima, posebno u sadržaju mlečne masti i proteina kozjeg mleka tokom laktacije, kao i uticaj klimatskih faktora na vrednost ispitivanih svojstava.

Reološki parametri sirišne koagulacije kozjeg mleka, kao što su vreme koagulacije, brzina agregiranja i čvrstina gela, se nisu menjali tokom 60 dana skladištenja u smrznutom stanju na -27°C , ali je utvrđen pad pH vrednosti na kraju perioda skladištenja smrznutog kozjeg mleka.

Pri ispitivanju kratkotrajnog skladištenja u smrznutom stanju utvrđeno je da je sir proizveden od odmrznutog mleka najbližnji kontrolnoj varijanti sira, dok su se od kontrolne varijante najviše razlikovali sirevi proizvedeni od gruša koji je smrznut u ranijim fazama presovanja.

Pri ispitivanju skladištenja kozjeg mleka, gruša i grude u smrznutom stanju, u trajanju od 60 dana, utvrđene su razlike u mikrostrukturi, teksturi i fizičko-hemijskom sastavu kod sireva koji su proizvedeni od odmrznutog gruša i grude, u odnosu na kontrolni sir. Ove promene su rezultovale razaranjem sirne mase tokom zrenja u salamuri, koje je ustanovljeno već 14-g dana zrenja. Utvrđene su i razlike u proteolizi, teksturi, fizičko-hemijskim svojstvima i mikrostrukturi, između kontrolne varijante sira i sira proizvedenog od odmrznutog mleka, tokom 56 dana zrenja. Senzorna analiza od strane potrošača i stručnog panela, pokazala je da postoje određene razlike u svojstvima mirisa i teksture između ove dve varijante sira, ali su i kontrolna varijanta sira i sir proizveden

od odmrznutog kozjeg mleka dobili visoke ocene za ispitivana senzorna svojstva od potrošača i ocenjivača.

Imajući u vidu rezultate ove disertacije, može se zaključiti da se smrznuto mleko može koristiti za proizvodnju sireva u salamuri, u cilju prevazilaženja sezonske proizvodnje kozjeg mleka. Potencijalno se smrzavanje mleka može koristiti i za ujednačavanje kvaliteta sirovog mleka tokom laktacije, s obzirom na ukazane značajne varijacije fizičko-hemijskih svojstava. Moguća je i proizvodnja sireva u salamuri od gruša odmrznutog nakon 7 dana skladištenja. Sirevi proizvedeni od odmrznutog gruša i grude nakon dugotrajnog skladištenja, pokazali su se kao neodrživi tokom perioda zrenja.

Ključne reči: kozje mleko, gruš, gruda, smrzavanje, reološki parametri sirišne koagulacije, sezonske varijacije, sir u salamuri, tekstura, mikrostruktura, proteoliza, senzorna analiza

Naučna oblast: Prehrambena tehnologija

Uža naučna oblast: Nauka o mleku

UDK: 637.12'639:637.33(043.3)

INFLUENCE OF FROZEN STORAGE OF GOAT MILK, CURD AND PRECHEESE ON CHARACTERISTICS OF BRINED CHEESE

Doctoral dissertation

Nemanja V. Kljajević, M.Sci

ABSTRACT

Milk and milk products of small ruminants have great importance in the economy of certain countries. Regardless of the significant growth of goat milk production, dominant presence of cow milk products is decreasing the competitiveness of goat milk products on the market. Significant growth of goat milk production, certainly imply the need for intensive research in that area.

Seasonal production of goat milk is the reason why goat product are not available in the winter. In practice there are several possibilities to overcome this limitation. The freezing of goat milk, curd or precheese is the simplest way, which would make goat milk products available throughout the entire year. Freezing could have negative impact on food products in general. Three mechanisms are the main causes for this negative impact: mechanical breakdown of product structure, caused by large ice crystals; denaturation and aggregation of protein, which happens due to higher concentration of electrolytes during freezing; lesser water holding capacity after thawing and occurrence of great amount of exudate.

The aim of this doctoral dissertation is: to determine the seasonal variation of physico-chemical characteristics of goat milk throughout the lactation, to determine the changes in coagulation properties caused by frozen storage of goat milk, as well to determine the possibility to produce the brined cheese from thawed goat milk, curd and precheese, after short-term (7 days) and long-term (60 days) frozen storage.

The aim of this research is achieved through four sets of experiments. In the first set of experiments, variations of goat milk characteristics throughout the lactation period are

examined, as well as the influence of climatic condition parameters on goat milk characteristics. In second set of experiments, coagulation properties of goat milk are examined after period of frozen storage. The influence of short term frozen storage of goat milk and curd, frozen in various stages of pressing, on textural and physico-chemical characteristics of brined cheese is examined in the third set of experiments. In the fourth set of experiments, the influence of long-term frozen storage of goat milk, curd and preechese on physico-chemical characteristics, texture, proteolysis, microstructure, and sensorial properties of brined cheese is examined throughout the ripening period of 8 weeks.

Results of this research determined significant variations of goat milk composition, mainly in fat and protein content, throughout the lactation, as well as the significant influence of climatic condition parameters on goat milk characteristics.

Coagulation properties of goat milk, such as coagulation time, aggregation rate and curd firmness, were not altered during 60 days of frozen storage on -27°C , while the pH value decreased at the end of the frozen storage period.

Regarding the observation of short-term frozen storage of goat milk and curd frozen in various stages of pressing, results determined that cheese made from thawed milk was the most similar to control cheese, while cheeses made from thawed curds, frozen in earlier stages of pressing, exhibit the greatest difference compared to control cheese.

Examination of long-term frozen storage of goat milk, curd and precheese, which lasted 60 days, showed significant differences regarding microstructure, texture and physico-chemical characteristics in cheeses produced from thawed curd and precheese, in comparison to control cheese. These changes induced the breakdown on cheese mass during ripening in brine, which begun on 14th day of ripening. Changes regarding proteolysis, texture, physico-hemical characteristics and microstructure, were also observed between control cheese and cheese made from thawed milk, during the ripening period of 56 days. Sensory quality judging and consumer sensory testing

showed that there are some differences in texture and odor between these two cheese variants, but both variants received high ratings from both consumers and experts.

All results taken into account, it could be concluded that frozen goat milk can be used for production of brined cheese, in order to overcome the seasonal production of goat milk. Potentially, frozen milk can be used to equalize the goat milk composition throughout the lactation, considering that significant variations of composition were determined. It is also possible to produce brined cheese from curds that were thawed after 7 days of frozen storage. Cheese produced from curd and precheese, thawed after long-term frozen storage, were not sustainable during ripening period.

Key words: goat milk, curd, precheese, freezing, coagulation properties, seasonal variations, brined cheese, texture, microstructure, proteolysis, sensory analysis

Scientific field: Food technology

Specific scientific field: Dairy science

UDK: 637.12'639:637.33(043.3)

SKRAĆENICE:

THI	indeks temperature i vlažnosti
RH	relativna vlažnost
UREA PAGE	urea poliakrilamidna gel elektroforeza
G'	modul elastičnosti
G''	modul viskoziteta
δ	fazni ugao
γ	amplitude oscilovanja
AR	brzina agregiranja
CF	čvrstina gela
CT	vreme koagulacije
MuSM	mast u suvoj materiji
PuSM	proteini u suvoj materiji
VuBMS	voda u bezmasnoj materiji sira
CFR	čvrstoća pri sečenju
FF	čvrstoća pri lomljenju
B	krtost
HC	čvrstoća pri kompresiji

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	5
2.1. Fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka tokom perioda laktacije	5
2.2. Značaj parametara sirišne koagulacije	9
2.3. Tekstura i mikrostruktura sireva	12
2.4. Smrzavanje u prehrambenoj tehnologiji	16
2.4.1 <i>Mehanizam smrzavanja</i>	18
2.4.2 <i>Efekat brzine smrzavanja i staklasto stanje</i>	22
2.4.3 <i>Fizičke promene tokom skladištenja namirnica u smrznutom stanju</i>	26
2.4.4 <i>Hemijske promene tokom skladištenja namirnica u smrznutom stanju</i>	28
2.4.5 <i>Odmrzavanje smrznutih namirnica</i>	31
2.5. Uticaj hlađenja i smrzavanja na komponente mleka	33
2.5.1 <i>Smrzavanje mleka namenjenog proizvodnji sireva</i>	37
2.5.2 <i>Smrzavanje gruša u proizvodnji sireva</i>	39
2.5.3 <i>Smrzavanje sireva</i>	40
3. Ciljevi rada	46
4. Materijal i metode	48
4.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka Sanske rase koza tokom perioda laktacije	48
4.1.1 <i>Uzorkovanje mleka</i>	48
4.1.2 <i>Fizičko-hemijski sastav mleka</i>	48
4.1.3 <i>Klimatski faktori</i>	49
4.1.4 <i>Statistička obrada podataka</i>	49
4.2. Ispitivanje uticaja smrzavanja na parametre sirišne koagulacije mleka Sanske rase koza	50
4.2.1 <i>Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog kozjeg mleka</i>	50
4.2.2 <i>Reološka merenja</i>	50
4.2.3 <i>Statistička obrada podataka</i>	52
4.3. Svojstva sireva od kozjeg mleka i gruša skladištenih 7 dana u smrznutom stanju	53
4.3.1 <i>Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka</i>	53
4.3.2 <i>Smrzavanje i odmrzavanje mleka i gruša</i>	53
4.3.3 <i>Tehnološki postupak proizvodnje kontrolnog sira</i>	54
4.3.4 <i>Tehnološki postupak proizvodnje eksperimentalnih sireva</i>	57
4.3.5 <i>Fizičko-hemijska svojstva sireva</i>	57
4.3.6 <i>Teksturalna svojstva sireva</i>	57
4.3.7 <i>Statistička obrada podataka</i>	59
4.4. Svojstva sireva od kozjeg mleka, gruša i grude skladištenih 60 dana u smrznutom stanju	61
4.4.1 <i>Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka</i>	61
4.4.2 <i>Smrzavanje i odmrzavanje mleka, gruša i grude i postupak proizvodnje sireva</i>	61
4.4.3 <i>Fizičko-hemijska svojstva sireva</i>	62
4.4.4 <i>Teksturalna svojstva sireva</i>	62

4.4.5	<i>Proteolitičke promene tokom zrenja sireva</i>	66
4.4.6	<i>Mikrostruktura sireva</i>	68
4.4.7	<i>Senzorna analiza sireva</i>	68
4.4.8	<i>Statistička obrada podataka</i>	73
5.	Rezultati i diskusija	76
5.1.	Fizičko-hemijska svojstva mleka Sanske rase koza tokom perioda laktacije	76
5.1.1	<i>Fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka</i>	76
5.1.2	<i>Korelacija između fizičko-hemijskih svojstava mleka Sanske rase koza i klimatskih faktora</i>	79
5.2.	Uticaj smrzavanja na parametre sirišne koagulacije mleka Sanske rase koza	82
5.2.1	<i>Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka i promena pH vrednosti tokom skladištenja u smrznutom stanju</i>	82
5.2.2	<i>Reološka merenja</i>	84
5.3.	Svojstva sireva od kozjeg mleka i gruša skladištenih 7 dana u smrznutom stanju	86
5.3.1	<i>Fizičko-hemijski sastav sirovog kozjeg mleka i sireva</i>	86
5.3.2	<i>Teksturalna svojstva sireva</i>	89
5.3.3	<i>Statistička obrada podataka kvadratnim Ioanovićeovim odstojanjem</i>	91
5.4.	Svojstva sireva od kozjeg mleka, gruš a i grude skladištenih 60 dana u smrznutom stanju	93
5.4.1	<i>Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka i sireva</i>	93
5.4.2	<i>Teksturalna svojstva sireva i njihova korelacija sa fizičko-hemijskim svojstvima</i>	98
5.4.3	<i>Proteoliza sireva i korelacija između udela β- i α - kazeina i teksturalnih svojstava</i>	105
5.4.4	<i>Mikrostruktura sireva</i>	108
5.4.5	<i>Senzorna analiza sireva</i>	117
6.	Zaključci	124
7.	Literatura	130

1. Uvod

Mleko i proizvodi od mleka malih preživara imaju veliki značaj u ekonomiji određenih zemalja. Ovi proizvodi su važni i za deo populacije koja nema alternativu u obezbeđivanju nutritivno vredne hrane. Mnogim ljudima, posebno deci, mleko malih preživara je neophodno kao zamena za kravlje mleko, koje može biti izazivač alergijskih reakcija. Sa druge strane, planinski i pustinjski predeli su često nepogodni za gajenje krava, ali mogu biti vrlo pogodni za gajenje koza i ovaca. Ekonomski značaj proizvodnje kozjeg mleka u zemljama u kojima je ova grana poljoprivrede razvijena prikazan je u Tabeli 1. U svetu postoji izražen porast populacije koza. Proteklih decenija povećanje proizvodnje kozjeg mleka prevazilazi povećanje proizvodnje kravljeg mleka, dok je povećanje proizvodnje ovčijeg mleka neznatno (Haenlein, 2001).

Tabela 1. Proizvodnja kozjeg mleka (Haenlein, 2001)

Država	Udeo kozjeg mleka u ukupnoj proizvodnji mleka (%)	Udeo u svetskoj proizvodnji kozjeg mleka (%)
Bangladeš	55	10
Sirija	51	4
Mali	43	2
Indonezija	29	2
Grčka	26	4
Iran	24	9
Sudan	16	6
Alžir	13	1
Španija	7	4
Indija	4	22
Pakistan	4	6
Turska	3	3
Francuska	2	4
Italija	1	1

U periodu od 1991 do 2011. godine, u svetu je došlo do povećanja populacije koza od 55% i porasta proizvodnje kozjeg mleka od 70% (FAOSTAT, 2013). Kozje mleko sadrži niži nivo alergena (Park *i sar.*, 2007) i svarljivije je od kravljeg mleka (Jandal,

1996). Ovo su najznačajni faktori koji su usloveli porast proizvodnje kozjeg mleka. Iako je većini svetske populacije kozje mleko dostupno, u zemljama u razvoju samo se 5% ovog mleka prodaje na formalnom tržištu. Ne postoje tačni statistički podaci o obimu i značaju ovog sektora proizvodnje, jer se veći deo proizvedenog mleka troši u samim domaćinstvima ili se plasira na neformalno tržište. Ovi podaci ukazuju na to da je sektor proizvodnje kozjeg mleka slabo organizovan i kontrolisan (Dubeuf *i sar.*, 2004).

Kraj XX veka postaje veoma povoljan za razvoj kozarstva u svetu. U razvijenim zemljama, posle 100 godina nepravednog zapostavljanja, kozarstvo je ponovo u povoljnoj poziciji. Posle intenzivne industrijalizacije poljoprivrede, kozarstvo je u poziciji da zadovolji zahteve i potrebe potrošača iz urbanih sredina proizvodima sa niskim sadržajem masti koji su svarljiviji i imaju terapeutsko dejstvo, zahvaljujući intenzivnoj proizvodnji kvalitetnog kozjeg mleka (Morand-Fehr *i sar.*, 2004). U prošlosti (do 1970-ih godina) je uglavnom sva literatura bila vezana za uzgajanje i eksploataciju krava, ovaca, konja, svinja, živine. U to vreme nije pridavan značaj adekvatnom uzgajanju koza iz nekoliko razloga:

- oskudna literatura
- poistovećivanje načina ishrane koza sa ishranom drugih preživara
- u nekim zemljama iz kojih potiče tadašnja literatura iz oblasti stočarstva, koze su tretirane kao kućni ljubimci, ili su smatrane za štetočine koje ne zaslužuju pažnju nauke.

Sve do 1970-ih godina ovakav način razmišljanja je bio zastupljen u stručnoj literaturi. Prvi međunarodni kongres o kozarstvu održan je 1964. godine, ali tek na drugom kongresu 1971. godine, stručnjaci su obratili više pažnje na ovu oblast. Na tom kongresu je predloženo da se pre svega, izmeni negativan stav o kozama, a zatim i da se intenzivira izučavanje kozjeg mleka, kao i da se započne unapređivanje industrijske proizvodnje prerađevina od kozjeg mleka. Nešto kasnije, 1980-ih godina prepoznati su: relativno velika mlečnost koza u odnosu na njihovu telesnu masu, problemi vezani za

kozije mleko, a takođe i izvesne prednosti ovog mleka, kao i to da postoji manjak istraživanja za sve prethodno pomenuto. U ovom periodu počinje da se pojavljuje i literatura vezana za male preživare, a 1988. godine pojavljuje se naučni časopis *Small Ruminant Research*, što govori o sve većoj zainteresovanosti naučne javnosti da odgovori na problem malog broja informacija koje se odnose na koze (Haenlein, 2001).

Bez obzira na značajan porast proizvodnje (Haenlein, 2001; Morand-Fehr *i sar.*, 2004), dominantno prisustvo kravljeg mleka i mlečnih proizvoda, smanjuje konkurentnost kozjeg mleka i proizvoda na tržištu (Dubeuf *i sar.*, 2004). Značajan porast proizvodnje kozjeg mleka svakako ukazuje na potrebu da se intenziviraju istraživanja u ovoj oblasti (Boyazoglu *i sar.*, 2005). Ranija istraživanja (Morgan *i sar.*, 2001; Miloradovic *i sar.*, 2015; Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2007; Park, 2007) ukazuju da postoje velike razlike u tehnološkim osobinama kravljeg i kozjeg mleka, iako je njihov hemijski sastav veoma sličan. Uzimajući u obzir trendove u proizvodnji kozjeg mleka prethodnih nekoliko decenija, može se reći da istraživanja u ovoj oblasti svakako imaju perspektivu u budućnosti. Sa druge strane u mnogim zemljama postoji potreba za obogaćivanjem ishrane stanovništva proteinima i kalcijumom iz mlečnih proizvoda (Haenlein, 2001).

U Francuskoj, kozarstvo je vrlo razvijeno i organizovano, a 90% kozjeg mleka u ovoj zemlji se preradi u sir. Postoje dva glavna razloga za to: 1) nacionalno i izvozno tržište za francuske kozje sireve pokazuje uzlazni trend poslednjih 50 godina, da bi se od 1990. godine ono uvećalo 72%; 2) finansijska podrška države u stvaranju nacionalnih profesionalnih organizacija u ovoj oblasti, tehničkih centara, organizacija za veštačku oplodnju i selekciju za koze Sanske i Alpske rase. U ovoj zemlji sektor kozarstva je prisutan u svakom njenom regionu, a vrlo je dinamična i organizovana proizvodnja sireva na samim farmama, te je čak jedna trećina farmi u Francuskoj organizovana na ovaj način. U Holandiji se kozarstvo od 1970-ih razvijalo istovremeno sa kozarstvom u Francuskoj. Primena kvota za kravlje mleko u Holandiji 1984. godine, dovela je do značajnog porasta proizvodnje kozjeg mleka, pojave novih vrsta sireva i značajnog porasta proizvodnje kozjih sireva u tipu Gaude za nacionalno i izvozno tržište. U južnoj

Evropi je situacija nešto drugačija. Iako je 80% proizvodnje kozjeg mleka u Evropi (Italiji, Španiji, Grčkoj, Portugaliji) locirano baš u ovom regionu, gde postoji vekovna tradicija uzgajanja koza, vrlo često su kozje mleko i proizvodi manje cenjeni nego kravljji. Nasleđen negativan stav o proizvodima od kozijeg mleka dovela je do toga da ne postoji jasno definisano tržište za ove proizvode (Dubeuf *i sar.*, 2004).

Tipično istočno-mediteranski predeli koji se odlikuju relativno suvim i toplim letom, nestalnim padavinama i brdovitim reljefom nisu pogodni za gajenje žitarica i razvoj bogatih pašnjaka potrebnih za kvalitetan uzgoj mlečnih krava. Sa druge strane, ekstenzivni ili polu-ekstenzivni način uzgoja koza, koji se oslanja na prirodne pašnjake i rezidue useva, vrlo je primenljiv i pogodan u pomenutim uslovima. Najznačajnija grupa sireva u ovom regionu i okolnim zemljama su beli sirevi u salamuri. Mnogi sirevi iz ove grupe se tradicionalno proizvode od mleka malih preživara, mada se zbog sezonskog karatera proizvodnje ovčijeg i kozjeg mleka često koristi i kravlje mleko (Alichanidis i Polychroniadou, 2008).

U Srbiji je, prema podacima Republičkog zavoda za statistiku, bilo 182 558 koza na kraju 2017-te godine, što je, nažalost za 8,8% manje nego u 2016-oj godini, mada ne postoje zvanični podaci o količini proizvedenog kozjeg mleka. Prema Republičkom zavodu za statistiku, u periodu 2014-2016, postoji porast proizvodnje kravljeg mleka u Srbiji, sa 1492 na 1504 miliona litara godišnje, dok je proizvodnja ovčijeg mleka u opadanju, sa 20 na 17 miliona litara godišnje. Najznačajni deo tržišta sireva zauzimaju beli sirevi u salamuri (~60%), dok samo 1% ukupne proizvodnje zauzimaju sirevi od kozjeg i ovčijeg mleka (Radulović *i sar.*, 2011). Kako bi se kozarstvo u Srbiji u potpunosti razvilo potrebno je primeniti neki od već postojećih modela razvitka ove grane poljoprive, odnosno proširenja tržišta i popularizacije proizvoda od kozjeg mleka, a takođe su potrebna i izvesna ulaganja u naučno-istraživačku delatnost u ovoj oblasti (Žujović *i sar.*, 2005).

2. Pregled literature

2.1. Fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka tokom perioda laktacije

U literaturi postoji relativno veliki broj podataka o fizičko-hemijskom sastavu kozjeg mleka iz raznih krajeva sveta (Brendehaug i Abrahamsen, 1986; Jandal, 1996; Park *i sar.*, 2007; Trancoso *i sar.*, 2010; Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2008; Park, 2006), a takođe i o njegovoj nutritivnoj vrednosti (Haenlein, 2004). Kozje mleko je na drugom mestu po zastupljenosti proizvodnje mleka u svetu, ne računajući kravlje mleko (Faye i Konuspayeva, 2012), pri čemu ne postoji mnogo podataka o fizičko-hemijskom sastavu ove vrste mleka tokom laktacije, kao ni o uticaju klimatskih faktora na varijacije u njegovom sastavu. Ovo je neobičan podatak, s obzirom na to da varijacije fizičko-hemijskog sastava tokom laktacije značajno utiču tehnološke i senzorne osobine kozjeg mleka (Casper *i sar.*, 1998; Siefarth i Buettner, 2014).

U Tabeli 2 prikazan je hemijski sastav različitih rasa koza u nekoliko evropskih zemalja. Park (2006) navodi da je prosečan hemijski sastav kozjeg mleka sledeći: 12,2% suve materije, 3,8% masti, 3,5% proteina, 4,1% laktoze i 0,8% mineralnih materija. Međutim, kao što se može videti iz Tabele 2, hemijski sastav kozjeg mleka u velikoj meri zavisi od rase koza i od podneblja u kojem se one nalaze. Može se uočiti da postoji velika sličnost između prosečnog hemijskog sastava kozjeg i kravljeg mleka, pri čemu je kravlje mleko ispitivano u mnogo većoj meri, te se poistovećivanjem ove dve vrste mleka mogu doneti sasvim pogrešne pretpostavke vezane za kozje mleko (Miloradovic *i sar.*, 2015; Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2007).

Najznačajnije razlike između kravljeg i kozjeg mleka se ogledaju u nekoliko fizičko-hemijskih i tehnoloških karakteristika. Kao jedna od ključnih razlika navodi se drugačija distribucija individualnih frakcija kazeina, koji predstavlja primarnu strukturnu komponentu sira. Kozje mleko ne sadrži α_{s1} -CN frakciju, ili je sadrži u malom procentu, dok je β -kazein najzastupljenija frakcija (Tziboula-Clarke, 2003). Primera radi, kod mleka koje ne sadrži α_{s1} -kazein, kazeinske micelle su veće, koagulacija

je lošija, a sirišno koagulirani gel je mekši (Pirisi *i sar.*, 1994; Clark i Sherbon, 2000; Tziboula-Clarke, 2003), što prouzrokuje da i karakteristike sireva budu specifične. Zbog relativno velikih kazeinskih micela i velikog udela jonskog kalcijuma kozje mleko ima manju koloidnu stabilnost od kravljeg mleka i veoma je osetljivo na termičke tretmane iznad 100°C (Anema i Stanley, 1998; Morgan *i sar.*, 2001; Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2007). Kozje mleko je izrazito bele boje u odnosu na kravlje mleko koje ima svetlo žutu boju

Tabela 2. Hemijski sastav mleka različitih rasa koza (Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2008)

Država	Rasa	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	Proteini (%)	Kazein (%)	Laktoza (%)	Mineralne materije (%)
Velika Britanija	Britanska Sanska	11,6	3,48	2,61	2,30	4,30	0,80
Velika Britanija	Nubijska	-	4,94	3,60	-	4,51	-
Francuska	Alpska / Sanska	-	3,6	3,2	-	-	-
Italija	Sardinijska	-	5,1	3,9	-	-	0,71
Grčka	Autohtona	14,8	5,63	3,77	3,05	4,76	0,73
Kipar	Damask	13,2	4,33	3,75	2,97	-	0,83
Španija	Mursijano-Granadina	-	-	4,09	3,21	-	-

usled prisustva karotena. Karoten se u organizmu koza razlaže i iz tog razloga je kozje mleko bogatiji izvor vitamina A od kravljeg mleka. Specifičan ukus i miris kozjeg mleka potiče od masnih kiselina kratkih lanaca, koje se često oslobađaju tokom transporta, mešanja i drugih operacija. Upravo zbog velikog udela (oko 20%) masnih kiselina kratkih lanaca (C4-C12) kozje mleko ima visoku nutritivnu vrednost. Lipaze često razlažu estarske veze masnih kiselina kratkih lanaca, a masne globule kozjeg

mleka su manje od masnih globula kravljeg mleka, te je njihova ukupna površina veća što takođe olakšava delovanje lipaza i čini da je svarljivost kozjeg mleka nekoliko puta veća od kravljeg mleka (Jooyandeh i Aberoumand, 2010).

Vrlo važna karakteristika kozjeg mleka je sezonski karakter proizvodnje, pa je dostupnost kozjih proizvoda ograničena u zimskom periodu godine (Van Hekken *i sar.*, 2005). U praksi su se pojavile razne mogućnosti da se ovo ograničenje prevaziđe: dva jarenja u toku godine, produžena laktacija, sušenje mleka, smrzavanje mleka koncentrovanog ultrafiltracijom ili evaporacijom i smrzavanjem svežih sireva ili gruša. U Francuskoj je najčešći metod prevazilaženja sezonskog karaktera proizvodnje kozjeg mleka smrzavanje gruša (u oko 65% slučajeva). Ovaj metod se koristi isključivo pri proizvodnji kiselo koagulišućih sireva (Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2011).

Kao što je već pomenuto, podaci o sezonskim varijacijama fizičko-hemijskog sastava kozjeg mleka nedostaju u sadašnjoj literaturi. Mayer i Fiechter (2012) su ispitivali fizičko-hemijske karakteristike mleka 6 rasa koza u toku sezone u Austriji, što je jedina dostupna studija koja se bavi ovom tematikom. Autori su zaključili da ne postoje značajne razlike između 6 ispitivanih rasa koza u pogledu osnovnog hemijskog sastava. Kao objašnjenje za pomenute rezultate navodi se da su sve ispitivane koze držane u istim uslovima i da im je ishrana bila identična. Na sve parametre fizičko-hemijskog sastava postojao je uticaj perioda laktacije. Sadržaji suve materije, mlečne masti, proteina i mineralnih materija smanjivali su se u periodu od marta do avgusta. Nagli porast ovih parametara usledio je krajem septembra, što se objašnjava fiziološkim stanjem životinja u završnom periodu laktacije i promenjenim režimom muže; u periodu do avgusta se muža obavljala dva puta dnevno, a od septembra do kraja laktacije jednom dnevno. Najveća vrednost navedenih parametra hemijskog sastava je zabeležen pred kraj laktacije u oktobru. Sadržaj laktoze se smanjivao tokom celog perioda laktacije, a nije primećen nikakav trend promene tačke smrzavanja mleka (Mayer i Fiechter, 2012).

Klimatski uslovi, poput temperature vazduha, sunčevog zračenja, vazdušnih struja, relativne vlažnosti vazduha i njihovih interakcija značajni su činioci produktivnosti mlečnih životinja. Kvalitet i količina mleka su rezultat složene interakcije različitih činioca koji mogu varirati ili u toku godine, ili razlikom uslova okolne sredine u različitim podnebljima (Milani *i sar.*, 2015). Postoji značajan broj istraživanja o uticaju klimatskih uslova na fizičko-hemijski sastav kravljeg mleka u toku perioda laktacije. Poznato je da postoji sezonsko variranje sadržaja mlečne masti kravljeg mleka, te je vrednost u letnjim za 0,4% manja nego u zimskim mesecima (Jensen *i sar.*, 1991). Takođe, sadržaj proteina u kravljem mleku je značajno veći tokom jeseni i zime u odnosu na proleće i leto (Lindmark-Månsson *i sar.*, 2003; Ng-Kwai-Hang *i sar.*, 1985), a postoji i značajan uticaj perioda laktacije na sadržaj mineralnih materija u mleku (Chen *i sar.*, 2014; Poulsen *i sar.*, 2015). Relativna vlažnost i maksimalne i minimalne temperature vazduha u toku godine su kod životinja vrlo značajni faktori koji utiču na variranje udela komponenti kravljeg mleka i to u rasponu 1-6% (Rodriquez *i sar.*, 1985). Pored pomenutih klimatskih faktora vrlo važan parametar je indeks temperature i relativne vlažnosti vazduha (THI - *Temperature-humidity index*). Ovaj parametar ima široku primenu u predviđanju eventualne pojave stresa izazvanog visokom temperaturom vazduha. U dosadašnjim istraživanjima, samo kod krava je ispitivana korelacija između ovog parametra i pojave stresa, koji dalje prouzrokuje određene mehanizme odbrane organizma životinje, a koji imaju negativne posledice na karakteristike i količinu mleka. Vrednost THI pri kojima ne dolazi do pojave stresa su u intervalu 35-72. Pri vrednostima od 76 i većim, naglo opada proizvodnja, a takođe se menjaju i fizičko-hemijske karakteristike kravljeg mleka (Bouraoui *i sar.*, 2002; Gantner *i sar.*, 2011). Vrlo kritičan i opasan interval vrednosti THI je od 78 do 82 (Brouček *i sar.*, 2006). Do sada u literaturi nije zabeležen podatak o korelaciji THI sa fiziološkim stanjem koza niti fizičko-hemijskim sastavom kozjeg mleka.

2.2. Značaj parametara sirišne koagulacije

Sirišna koagulacija je proces koji se odvija u dve faze. Prva faza, koja se naziva enzimskom fazom, obuhvata brzu hidrolizu približno 90% κ -kazeina (Walstra *i sar.*, 1984). Za odvijanje reakcije između κ -kazeina i himozina postoje odgovarajući uslovi, koji se mogu posmatrati kroz najznačajnije faktore koji deluju na enzimsku fazu koagulacije: pH, temperatura na kojoj se odvija koagulacija, koncentracija enzima. Najintenzivnije delovanje enzima je pri pH vrednosti 6,3-5,3 i temperaturi 38-40°C. Ovako visoke temperature se u sirarstvu ne koriste zbog loših karakteristika dobijenog sirnog gela. Snižavanjem temperature do 32°C (temperatura koja se često koristi u sirarstvu) brzina reakcije između himozina i κ -kazeina se neznatno smanjuje. Himozin se inaktivira na temperaturama višim od 49°C (Puđa, 2009). Nakon hidrolize κ -kazeina, kazeinska micela postaje nestabilna i podložna agregiranju. Agregiranje kazeinskih micela se odvija u drugoj, fizičko-hemijskoj fazi koagulacije (Storry i Ford, 1982; Walstra *i sar.*, 1984). Značaj kalcijumovih jona u ovoj fazi koagulacije je veliki; ukoliko se aktivnost kalcijumovih jona blokira dodavanjem nekih drugih jona (npr. oksalatnih), koagulacija se neće odvijati iako je enzimska faza u potpunosti završena. Niska temperatura (< 15°C) takođe može sprečiti fizičko-hemijsku fazu koagulacije, jer na tim temperaturama dolazi do delimične disocijacije β -kazeina (Puđa, 2009).

Osamdesetih godina dvadesetog veka razvija se klasa dinamičkih reometara koji omogućavaju da se prati tok koagulacije metodom oscilacija, a da se pri tome ne vrši destrukcija gela. Gel se u toku merenja neometano formira, te stoga informacije koje se dobijaju ovakvim merenjem predstavljaju realne promene u sistemu (Puđa, 2009). Najznačajni parametri koji se mere u reološkim ispitivanjima koagulacije su *vreme koagulacije*, *brzina koagulacije* i *čvrstina sirnog gela*.

Vreme koagulacije predstavlja vreme do trenutka kada agregiranje kazeinskih micela dovede do pojave vidljivih flokula. Brzina kojom se formira sirni gel od trenutka kada je koagulacija počela naziva se *brzina koagulacije*. U sirarstvu se teži minimalnom

vremenu koagulacije i maksimalnoj brzini koagulacije s obzirom da su to faktori koji utiču na vreme potrebno za proizvodnju sira. U proizvodnji je vrlo važno dobiti optimalnu čvrstinu sirnog gela, jer je to osnovni parametar koagulacije koji utiče na randman i kvalitet sira, a samim tim i na celokupni ekonomski aspekt proizvodnje. Visoka čvrstina gela utiče na randman sira time što podstiče veće zadržavanje komponenti mleka u siru (Clark i Sherbon, 2000). Na parametre koagulacije, osim parametara kao što su tip starter kulture, vrsta i količina sirila, temperatura koagulacije, utiče i sastav mleka (Okigbo *i sar.*, 1985; Storry i Ford, 1982). Samim tim, svi faktori koji utiču na komponente mleka, utiču i na parametre koagulacije. Na komponente mleka preživara utiču: rasa, starost, period laktacije, ishrana, sredina (klima) i genetski faktori (Storry *i sar.*, 1983). Iako se ne mogu kontrolisati svi pomenuti faktori, adekvatnom selekcijom se na osnovu rase i sastava mleka mogu poboljšati karakteristike kozjeg mleka namenjenog proizvodnji sira (Clark i Sherbon, 2000).

Visok udeo masti i proteina, a posebno kazeina, u mleku doprinosi boljoj koagulaciji mleka i većem randmanu. Istraživanja ukazuju da pri visokom nivou proteina i kazeina u kravljem mleku, vreme koagulacije se smanjuje, a brzina koagulacije i čvrstina sirnog gela se povećavaju (Jen i Ashworth, 1970; Okigbo *i sar.*, 1985; Marziali i Ng-Kwai-Hang, 1986). Ambrosoli *i sar.* (1988) ukazuju na drugačije ponašanje kozjeg mleka pri koagulaciji; pri visokom nivou proteina i/ili kazeina, vrednosti za brzinu koagulacije i čvrstinu sirnog gela su se povećavale, ali se vreme koagulacije produžavalo.

Do 1980-ih godina verovalo se da kozjem mleku nedostaje α_{s1} - kazein (Jenness, 1980), koji predstavlja strukturalnu komponentu kazeinske micelle kod kravljeg mleka i ima snažan uticaj u odvijanju sirišne koagulacije (Walstra *i sar.*, 1984). Danas je poznato da kozje mleko određenih rasa poseduje α_{s1} - kazein, kao i da postoji kozje mleko koje ne sadrži α_{s1} - kazeinsku frakciju (Clark i Sherbon, 2000). Kozje i kravlje mleko imaju sličan udeo κ - kazeina (10-24%) i α_{s2} - kazeina (5-19%). Nasuprot tome, kozje mleko poseduje veći udeo β - kazeina (42 - 64%) od kravljeg mleka (34 - 41%) i manji udeo α_{s1} - kazeina

(4 - 26%) od kravljeg mleka (36 - 40%). S obzirom da α_{s1} - kazein učestvuje u formiranju gela, značajno manji udeo ovog proteina kod kozjeg mleka je razlog za izmenjene vrednosti parametara koagulacije i dobijanje mekšeg sirišno koagulisanog gela, pri istom udelu proteina kao i u kravljem mleku (Storry *i sar.*, 1983). Optimizacija procesa koagulacije, kako bi se dobio čvršći gel, je vrlo važna u sirarstvu da bi se ostvario maksimalni randman (Clark i Sherbon, 2000). Ranija istraživanja pokazuju da kod mleka Sanske i Alpske rase koza postoji korelacija između nivoa α_{s1} - kazeina i ostalih komponenata u mleku, kao i parametara koagulacije. Mleko sa većim nivoom α_{s1} - kazeina imalo je veći sadržaj suve materije, ukupnih proteina, kazeina, fosfora i nižu pH vrednost. Takođe, veći udeo α_{s1} - kazeina uticao je na formiranje čvršćeg gela i produženje vremena koagulacije (Ambrosoli *i sar.*, 1988; Clark i Sherbon, 2000). Tokom koagulacije mostovi između kalcijumfosfata i kazeina prave mrežu u kojoj ostaju zarobljeni mast i ostale komponente suve materije. Samim tim proizilazi da ako postoji više proteina u toku koagulacije, mreža će se formirati brže, zadržavaće se više komponenata u njoj, što će na kraju rezultovati i čvršćim sirnim gelom. Ovo se potvrđuje ustanovljenom pozitivnom korelacijom brzine koagulacije i čvrstine gela sa sadržajem suve materije, suve materije bez masti, proteina i kazeina. Sa druge strane ustanovljeno je da se sa povećanjem suve materije (posebno suve materije baz masti), kasnije počinje koagulacija (duže vreme koagulacije) (Ambrosoli *i sar.*, 1988). Visok nivo proteina produžava vreme koagulacije što se delimično može objasniti visokim nivoom α_{s1} - kazeina i α_{s2} - kazeina. Ove dve frakcije proteina vezuju jone kalcijuma, te samim tim ostaje manje za vezivanje sa κ - kazeinom posle hidrolize (enzimske faze koagulacije) (Ambrosoli *i sar.*, 1988; Clark i Sherbon, 2000). Iako se iz predočenih istraživanja vidi da se pri dužoj koagulaciji dobija čvršći gruša, to nije uvek isključivo pravilo (Clark i Sherbon, 2000), jer, kao što je prethodno i navedeno, na produženje vremena koagulacije, pored sadržaja proteina i suve materije, utiču i drugi faktori.

Već je pomenuto da na sirišnu koagulaciju utiču parametri u pojedinim etapama postupka proizvodnje sira. Već su poznati uticaji starter kultura, vrste i količine sirila,

temperature koagulacije (Storry i Ford, 1982; Okigbo *i sar.*, 1985). U slučaju kravljeg mleka, strogi termički tretman mleka može značajno negativno uticati na sirišnu koagulaciju, odnosno koagulacija mleka može čak i izostati u slučaju temperatura viših od 90°C, dok isti tretman kozjeg i ovčijeg mleka nema negativne posledice po sirišnu koagulaciju, iako postoji uticaj na parametre koagulacije (Miloradović, 2015; Raynal i Remeuf, 1998).

U dosadašnjoj literaturi postoji podatak da se skladištenjem smrznutog ovčijeg mleka u periodu od mesec dana ni na koji način ne utiče na proces koagulacije, ali ne postoji podatak o uticaju smrzavanja kozjeg mleka na parametre sirišne koagulacije (Jooyandeh i Aberoumand, 2010).

2.3. Tekstura i mikrostruktura sireva

Prihvatljivost sireva od strane potrošača direktno zavisi od izgleda, ukusa i teksture – parametara koji su u direktnoj ili indirektnoj zavisnosti od mikrobioloških biohemijskih i tehnoloških parametara u toku procesa izrade sire i u toku zrenja. Tekstura je tesno povezana sa strukturom raznih hemijskih jedinjenja prisutnih u siru. Struktura proteinske mreže i frakcije masti dovodi do manifestacije jedinstvenih osobina sira na makro nivou. Važno je istaći da je sir vrlo kompleksan sistem, pa se ne može u potpunosti sagledati uticaj mikrostrukture na izgled ukus i teksturu (Pereira *i sar.*, 2009).

Makro i mikro struktura sira su najvažniji faktori koji utiču na reološke osobine i teksturu sira. Osnova strukture sirišno koagulišućih sireva je kalcijumfosfatni parakazeinski matriks sačinjen od međusobno povezanih i preklopljenih niti parcijalno spojenih parakazeinskih agregata. Ovu celinu održavaju razne hidrofobne i elektrostatičke veze između i unutar pomenutih agregata. U porama matriksa su zarobljene masne globule, voda, rastvorene supstance (mineralne materije, mlečna kiselina, peptidi i amino kiseline), enzimi (rezidualni himozin i proteinaze starterskih i nestarterskih mikroorganizama). U matriksu sira se još nalaze i mikroorganizmi

(starterski i nestarterski sojevi bakterija, u nekim slučajevima plesni, kvasci) sa svojim već pomenutim proteinazama koje u različitom obimu migriraju iz njihovih ćelija u matriks. Matriks sira je kontinualan i proteže se u svim pravcima, ali u nekim delovima može postojati diskontinuitet na mestima spajanja sirnih zrna (Fox *i sar.*, 2000).

Niz tehnoloških operacija u preradi mleka utiče na mikrostrukturu i teksturu proizvoda. Termički tretman je uobičajena operacija pri preradi mleka, a može biti vrlo različit u zavisnosti od toga kakav treba da bude krajnji proizvod. Koristi se raspon od vrlo blagih termičkih tretmana do vrlo oštih. Vrlo oštri termički tretmani mogu uticati na osobine sirnog gela, a samim tim i na mikrostrukturu sira (Singh i Waungana, 2001). Visok termički tretman dovodi do denaturacije 50 - 70 % proteina surutke u zavisnosti od jačine tretmana, što dovodi do nežnije strukture sire usled većeg kapaciteta vezivanja vode sirnog gela (Hinrichs, 2001). Promene u teksturalnim svojstvima utvrđene su i kod kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima, a uzrok ovih promena na makro nivou su izmenjen oblik i sastav kazeinskih micela u samom mleku, izmenjeni parametri koagulacije, pojedina fizičko-hemijska svojstva sireva i tok proteolitičkih promena (Miloradović, 2015).

Visoki pritisak je novija tehnika, predložena da se koristi kao zamena za termički tretman ili kao dodatak termičkom tretmanu, jer inaktivira nepoželjne mikroorganizme i enzime u mleku. Ova tehnika takođe utiče i na same komponente mleka, a zatim i na finalne karakteristike sira. Najviše promena pod uticajem viskog pritiska dešava se na kazeinu i serum proteinima, jer visoki pritisak utiče na jačanje i slabljenje određenih intramolekulskih veza. Sa gledišta mikrostrukture, tretman visokim pritiskom dovodi do „gusto pakovane“, finije strukture u siru zbog smanjenja prosečne veličine kazeinske micela, što je i potvrđeno elektronskom i optičkom mikroskopijom (Pereira *i sar.*, 2009).

Membranske tehnike su postale veoma popularne u industriji mleka zbog svoje velike prilagodljivosti i energetske efikasnosti. One predstavljaju proces razdvajanja pod dejstvom pritiska, koji je namenjen separaciji ili koncentraciji komponenata. U

zavisnosti od potrebe membranska tehnika može biti izvedena kao jednostavna filtracija ili reverzna osmoza, što zavisi od veličine pora čvrstog medijuma koji služi za razdvajanje komponenata (Pereira *i sar.*, 2009). Glavni cilj ultrafiltracije je da se uveća koncentracija komponenti mleka, posebno masti i proteina, pri čemu se zadržavanjem i proteina surutke poboljšava randman. Takođe se smanjuje koncentracija laktoze i mineralnih materija (Hinrichs, 2001). Postoji nekoliko fizičko-hemijskih parametara mleka koji su značajni za proizvodnju sira od ultrafiltriranog mleka, kao što su: viskozitet, puforni kapacitet i parametri koagulacije. Proteini i soli se koncentrišu tokom ultrafiltracije, čime se povećava puforni kapacitet. Ovo povoljno utiče na metabolizam bakterija mlečne kiseline, pri čemu se vreme koagulacije smanjuje i čvrstina gela povećava (Pereira *i sar.*, 2009). Pored svojih očiglednih pozitivnih efekata, ultrafiltracija se i dalje ne koristi u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva, zbog problema u obradi gruša dobijenog od koncentrovanog mleka, a i izmenjenih karakteristika sireva od UF mleka u odnosu na iste dobijene konvencionalnim postupkom. Visoka sposobnost vezivanja vode, zajedno sa usporenim proteolizom dovodi do stvaranja atipične teksture ovih sireva, koja se opisuje kao zrnasta, suva i veoma čvrsta. Struktura proteinskog matriksa je kompaktna što dovodi do sporijeg omekšavanja tokom zrenja (Fox *i sar.*, 2000). Još uvek ne postoji dovoljno fundamentalnog znanja o tome kako promene na proteinima i mastima tokom ultrafiltracije utiču na osobine sira (Pereira *i sar.*, 2009).

Upotreba enzima kao što je transglutaminaza dovodi do boljeg međusobnog povezivanja kazeinskih micela i stvaranja finije umreženog proteinskog matriksa. Transglutaminaza je transferaza koja formira veze unutar i između proteina preko rezidua glutamina i lizina (Kashiwagi *i sar.*, 2002). Kazein je veoma podložan delovanju ovog enzima s obzirom da ima slabo izraženu tercijarnu strukturu (Huppertz i de Kruif, 2007). Delovanje transglutaminaze utiče na proces formiranja i reološke osobine gela, kao i na parametre koagulacije mleka. Ovaj enzim utiče i na enzimsku i na fizičko-hemijsku fazu koagulacije (Bönisch *i sar.*, 2008). Međusobno povezivanje proteina mleka

dovodi do njihovih boljih emulgujućih osobina što sprečava koalescenciju masnih globula (Hinz *i sar.*, 2007). Cozzolino *i sar.* (2003) su čak predložili tretman transglutaminazom tokom koagulacije, kako bi se u gel inkorporirali proteini surutke, slično kao i primenom ultrafiltracije, što bi, kao što je već poznato, dovelo do boljeg randmana i bolje mikrostrukture gela.

Utvrđeno je da bakterije mlečne kiseline (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*) doprinose mikrostrukтури sira kroz proces proteolize u toku zrenja. Ispitivanjem mikrostrukture pronađeno je da su bakterije inkorporirane u proteinski matriks. Čelije su većinom bile nađene na površini masnih globula ili na graničnoj površini između masti i kazeina (Parker *i sar.*, 1998). Neka istraživanja su pokazala da se bakterije nalaze na graničnoj površini mast – kazein, da su organizovane kao kolonije i da su zarobljene u proteinskom matriksu kao i masne globule (Centeno *i sar.*, 2002; Petersen *i sar.*, 2000; Low *i sar.*, 1998; Lopez *i sar.*, 2006).

Najznačajniji uticaj na mikrostrukturu i teksturu sira imaju promene koje se dešavaju tokom zrenja. Ove promene se dešavaju pod uticajem rezidualnog himozina, mikroorganizama i njihovih enzima i promene u ravnoteži mineralnih materija između vodene faze i parakazeinskog matriksa. Pomenute fizičko-hemijske promene se dešavaju u obimu koji je karakterističan za svaku vrstu sira, a zavise i od hemijskog sastava sira i uslova zrenja. Najvažnije fizičko-hemijske promene koje se odvijaju su sledeće (Fox *i sar.*, 2000):

- Pretvaranje rezidualne laktoze u mlečnu kiselinu i/ili u propionsku i sirćetnu kiselinu.
- Hidroliza kazeina na peptide različitih molekulskih masa i aminokiseline; katabolizam aminokiselina pri čemu se oslobađaju amini, aldehidi, alkoholi i amonijak.
- Hidroliza triglicerida na slobodne masne kiseline, koje se dalje mogu razlagati na ketone i alkohole.

- Povećanje hidratisanosti parakazeina pod uticajem njegove hidrolize, porasta pH vrednosti i rastvaranja kalcijuma vezanog za kazein. Rastvaranje kalcijumovih jona vezanih za kazein se odvija kada se oni zamenjuju natrijumovim jonima, posebno kada su koncentracije i jednih i drugih jona u vodenoj fazi sira male (30g/L za Na⁺ i 4g/L za Ca²⁺). Hidratisanje parakazeina se manifestuje širenjem matriksa koje se jasno može uočiti skenirajućom elektronskom mikroskopijom.
- Tokom zrenja dolazi i do koalescencije masnih globula i smatra se da se ovo u manjoj ili većoj meri događa u svim vrstama sireva. Razlog je upravo prethodno pomenuto širenje matriksa parakazeina usled hidratacije, što rezultuje međusobnim približavanjem masnih globula.

Sir je vrlo složen dinamički biohemijski sistem u kome strukturne komponente prolaze kroz sve prethodno pomenute promene. Ove promene su značajne za transformaciju sirne grude u sir odgovarajuće teksture, ukusa, mirisa i odgovarajućih funkcionalnih svojstava tokom perioda zrenja (Fox *i sar.*, 2000).

2.4. Smrzavanje u prehrambenoj tehnologiji

Voda u prehrambenim proizvodima je neophodna za odvijanje biohemijskih procesa koji izazivaju kvarenje hrane. Namirnice sa manjim sadržajem vode su nepovoljnije za rast neželjenih mikroorganizama, jer se smanjuje dostupnost vode, odnosno njena aktivnost (a_w vrednost). Smrzavanjem se formiraju kristali leda, te se na taj način uklanja voda iz namirnice. U preostaloj, nesmrznutoj vodi rastvorene supstance se koncentrišu i smanjuje se a_w vrednost, pa se može smatrati da je u tom smislu smrzavanje sličan proces sušenju, što je i razlog korišćenja niskih temperatura u produžavanju trajanja prehrambenih proizvoda (Evans, 2008).

U idealnom slučaju ne bi trebalo da postoje nutritivne i senzorne razlike između svežih proizvoda i proizvoda koji su bili smrznuti. Ovaj zahtev kod nekih namirnica nije jednostavno ispuniti, međutim kod nekih osnovnih, svakodnevno korišćenih namirnica, kao što su meso, riba, hleb, neke vrste povrća, zaista ne postoji značajna

razlika između svežih i odmrznutih proizvoda. Postoji tri mehanizma kojima kristali leda mogu umanjiti kvalitet namirnice:

- a) **Mehanička oštećenja u mikrostrukturi proizvoda.** Zapremina leda je za oko 10% veća od zapremine vode, te se širenjem kristala pritiska okolni matriks i oštećuju njegove komponente. Na makro nivou može doći do vidljivih pukotina prilikom smrzavanja.
- b) **Međusobno povezivanje lanaca proteina.** Smanjenjem udela vode i povećanjem koncentracije elektrolita može doći do agregacije i denaturacije proteina (Connell, 1959; Buttkus, 1970).
- c) **Nepotpuna reapsorpcija vode prilikom odmrzavanja.** Ovaj mehanizam je povezan sa prethodnim. Usled oštećenja na proteinima tokom smrzavanja oni gube vodu i stvaraju međusobne veze. Posledica je da prilikom odmrzavanja, zbog novostvorenih veza, proteini ne mogu u potpunosti da reapsorbuju izgublenu vodu, pa dolazi do izdvajanja vodene faze (Mackie, 1993).

Međusobno povezivanje lanaca proteina i nepotpuna reapsorpcija vode prilikom odmrzavanja su glavni uzročnici pogoršanja kvaliteta smrznutih prehrambenih proizvoda, pa se može zaključiti da se ono u većoj meri odvija u toku skladištenja u smrznutom stanju nego u toku samog procesa smrzavanja.

Pogoršanje kvaliteta smrznute namirnice i eventualno smanjenje senzorne prihvatljivosti od strane potrošača zavise od vrste namirnice. Dodavanje krioprotektora može smanjiti negativne posledice smrzavanja i skladištenja (Evans, 2008). Promenu kvaliteta smrznute namirnice moguće je utvrditi bez odmrzavanja pomoću mikrotalasa (Kent *i sar.*, 2001 ; Kent *i sar.*, 2004; Kent *i sar.*, 2005). Ukoliko u određenim situacijama ovu metodu nije moguće primeniti, senzornim ocenjivanjem namirnice posle odmrzavanja procenjuje da li postoje eventualni defekti u izgledu mirisu, ukusu i teksturi proizvoda (Evans, 2008). Takođe, vrlo su značajne metode kojima se utvrđuje da li je neka namirnica bila smrznuta, kako bi se sprečilo da se odmrznute namirnice

prodaju kao sveže (riba na pr.). Pored sporih biohemijskih metoda (Kitamikado *i sar.*, 1990; Salfi *i sar.*, 1986), često se koriste brze fizičke metode, naročito na principu merenja električne provodljivosti, kojima se utvrđuje da li je riba bila prethodno smrznuta (Jason i Richards, 1975; Rehbein, 1992). Još jedan potencijalni zakonski problem predstavlja tzv. glaziranje ribe. Smrznuta riba (ili fileti) se provlače kroz hladnu vodu kako bi se na taj način na površini stvorio tanak sloj leda koji ima ulogu u sprečavanju oksidacije masti. Ovaj postupak se može iskoristiti da se doda više vode nego što je neophodno kako bi se povećala masa ribe koja se prodaje. Zbog ovog problema razvijene su i brze metode određivanja udela dodate vode (Kent *i sar.*, 2001).

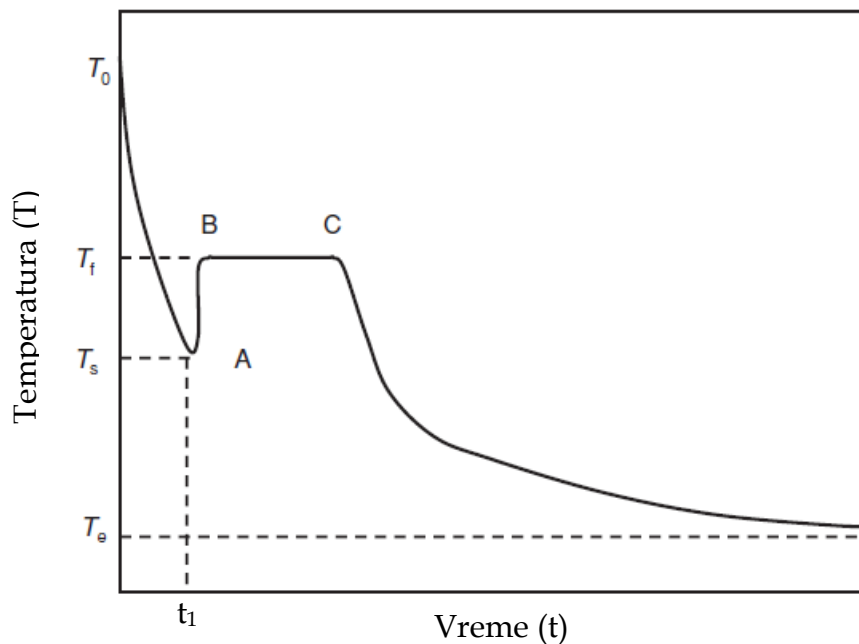
Često pitanje koje se javlja među potrošačima je da li ponovnim zamrzavanjem odmrznute namirnice ona postaje neupotrebljiva. Odgovor je da ako se ponovno zamrzavanje uradi u dobrim higijenskim uslovima, bez rizika od mikrobiološke kontaminacije, efekat ponovnog zamrzavanja (npr. povećanje izdvajanja vodene faze pri odmrzavanju) nije ozbiljan (Oosterhuis, 1981).

Sposobnost vezivanja vode u hrani zavisi od više mehanizama. Voda se može zadržavati u ćelijama, između ćelija, u porama pomoću kapilarnih sila. Takva voda se može izdvojiti apliciranjem pritiska. Voda se vezuje za hidrofilne komponente hrane kao što su proteini, ugljeni hidrati, soli i mikronutrienti pomoću Van der Valsovih i vodoničnih veza. Interakcija masti sa vodom je mala jer su masti hidrofobne. Jačina veza između vode i proteina raste od spoljašnjih ka unutrašnjim hidratacionim slojevima. Najsnažnije vezana voda za proteine se ne može smrznuti. Postoji veoma veliki značaj sposobnosti vezivanja vode u hrani, te stoga postoji niz metoda za određivanje ovog parametra: pomoću pritiska, centrifuglane sile, kapilarne sukcije, filter papira, nuklearne magnetne rezonance (NMR) (Trout, 1988).

2.4.1 *Mehanizam smrzavanja*

U cilju potpunog razumevanja toka smrzavanja, potrebno je ukratko objasniti pojam „pothlađene“ tečnosti. „Pothlađena“ tečnost je tečnost koja je na nižoj

temperaturi od temperature smrzavanja, a da pri tome i dalje nije došlo do faznog prelaza iz tečnosti u čvrsto agregatno stanje. Ovo je metastabilno stanje tečnosti i može trajati relativno dugo, do pojave prvih jezgara kristalizacije. Voda koja u sebi ne sadrži nečistoće se u određenim uslovima može „pothladiti“ do -40°C . Ispod ove temperature dolazi do zamrzavanja, usled pojave jezgara kristalizacije i uvećanja istih. Pothlađivanje je vrlo važna pojava jer je to takođe i jedan od mehanizama kojima biljke i životinje održavaju vodu u tečnom stanju na temperaturama ispod nule kako bi smanjile pojavu kristala leda, a samim tim i oštećenje tkiva (Evans, 2008). Na Slici 1 može se videti tipična kriva promene temperature tokom smrzavanja.



Slika 1. Promena temperature tokom smrzavanja (Evans, 2008)

Površina namirnice se hladi brže nego njena unutrašnjost, jer je potrebno vreme da se toplota kondukcijom prenese do njene unutrašnjosti. Samim tim, na površini može doći do pojave „pothlađivanja“ (tačka A (t_1 , T_s), pre nego što se temperatura skoro trenutno poveća do temperature zamrzavanja T_i . U delu krive B-C, temperatura je konstantna, jer se tada odvija prenos latentne toplote smrzavanja vode (334 kJ/kg za „čistu“ vodu) kroz namirnicu. Prvi kristali leda se formiraju u delu A-B, a nastavljaju

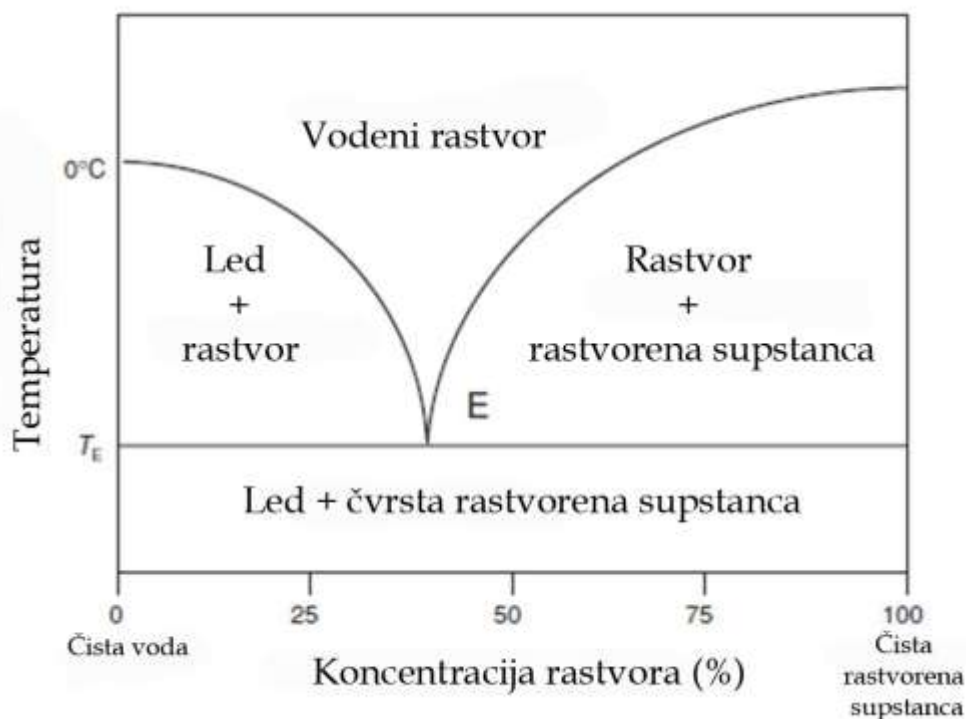
dalje da se formiraju sve do krajnje temperature T_e , odnosno dok se ne postigne ravnoteža između rashladnog medijuma i namirnice koja se hladi. Posle uspostavljanja ravnoteže ne dolazi do značajnog uvećanja broja kristala leda, ali dolazi do uvećanja njihove zapremine. Kristali leda nastaju od jezgara kristalizacije kritične veličine koji se postepeno uvećavaju. Kritična veličina jezgara kristalizacije je veličina pri kojoj dalji rast jezgara izaziva manje povećanje površinske energije (σ) u odnosu na povećanje Džibsove slobodne energije (G) pri povećanju zapremine. Za sferične kristale važi: $\sigma r^2 < Gr^3$ (Evans, 2008). Kristalizacija može biti homogena i heterogena. Homogena kristalizacija se odvija u homogenim tečnostima (u kojima nema čestica neke druge supstance), a sama pojava jezgara kristalizacije nastaje usled slučajnog grupisanja molekula. U namirnicama je kristalizacija heterogena i jezgra kristalizacije se pojavljuju na česticama koje imaju sličnu strukturu kao kristali leda, odnosno imaju kristalnu rešetku slične veličine. Vrlo često su mesta nastanka jezgara kristalizacije na proteinima (Govindarajan i Lindow, 1988).

Voda se smrzava na temperaturi od 0°C (ako izuzmemo fenomen „pothlađivanja“), ali se vodeni rastvori smrzavaju na nižoj temperaturi, prema Raulovim zakonima (Miles *i sar.*, 1997). Ako posmatramo binarni rastvor (Slika 2), ravnoteža između leda nastalog ispod temperature T_f (0°C u ovom slučaju) i preostalog rastvora može postojati samo ako je njihov hemijski potencijal jednak (Pippard, 1961). Ovim se dolazi do veze između a_w vrednosti rastvora i molekularne mase komponenata i/ili njenih frakcija. Iz ovih termodinamičkih relacija se dalje može doći do vrednosti za udeo smrznute vode (leda) na svakoj temperaturi nižoj od T_f (aproksimirajući da je rastvor idealan i da su razlike između temperature T i T_f male) (Miles, 1991):

$$x_i = (x_w - x_u)(1 - T_f/T) \quad (1)$$

gde su T i T_f u stepenima Celzijusa, x_w je ukupan udeo vode u hrani, a x_u je deo vode koji se ne može smrznuti. Uglavnom je u hrani vrednost x_u oko 5% i obuhvata i tzv. vezanu vodu x_b ($x_u > x_b$). Jednačina se može smatrati prihvatljivom za inženjerske potrebe jer je za izračunavanje termalnih osobina smrznute hrane potrebna tačnost

$\pm 10\%$. Jednačina je izvedena samo na osnovu termodinamičkih principa, koji ne uzimaju u obzir činjenicu da se i na konstantnoj temperaturi povećava udeo leda tokom vremena. Zavisnost od vremena je posledica narušavanja kinetičke mobilnosti molekula vode.



Slika 2. Dijagram stanja binarnog rastvora sa prikazom eutektičke tačke (E) takvog sistema (Evans, 2008)

Termin „vezana voda“ se često pogrešno tumači i nije precizno definisan. Fennema (1985) definiše vezanu vodu u praktičnom smislu na sledeći način: *voda koja se nalazi u blizini rastvorenih i drugih supstanci u vodenom rastvoru, pokazuje smanjenu molekularnu mobilnost, značajno su joj izmenjene druge osobine u odnosu na „čistu vodu“ i ne smrzava se na -40°C* . Ova definicija ima dve poželjne osobine. Na osnovu toga se može stvoriti slika o tome šta je vezana voda i ustanoviti realna osnova za merenje vezane vode, jer se voda koja se ne zamrzava na -40°C može na zadovoljavajući način kvantifikovati pomoću metoda kao što su nuklearna magnetna rezonanca (NMR) ili kalorimetrija.

Smrznuta hrana nije sistem koji se nalazi u ravnoteži, iz jednostavnog razloga što se voda koja se nalazi u okolini matriksa, u hrani, može nalaziti u „staklastom“ stanju, a samim tim fazni dijagram binarnog rastvora (Slika 2) postaje komplikovaniji, što je prikazano na Slici 3.

Do sada su detaljno istraženi samo binarni sistemi tipa voda – glukoza.

2.4.2 *Efekat brzine smrzavanja i staklasto stanje*

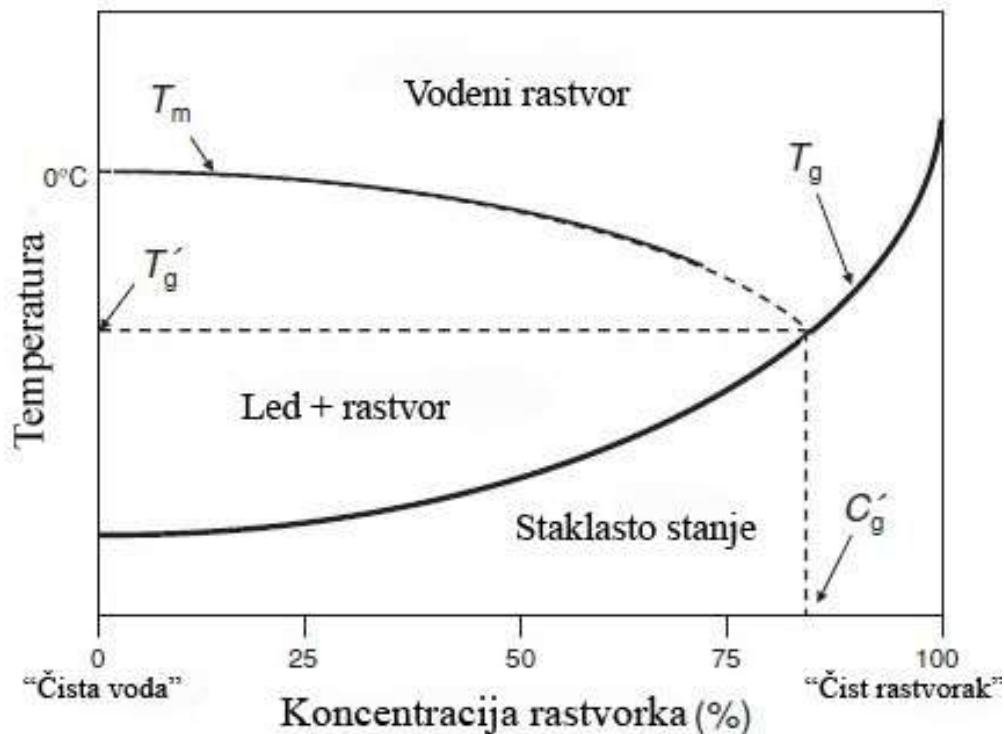
Hayes *i sar.* (1984) definišu brzinu smrzavanja na osnovu brzine kretanja fronta kristalizacije led-voda. Brzina smrzavanja utiče na veličinu, tip i distribuciju formiranih kristala leda. Oni mogu biti intra- ili ekstracelularni, dendritski ili sferični (u brzo smrznutim vodenim rastvorima) i njihov rast i oblik može biti ograničen matriksom u hrani. Korišćenjem veoma velikih brzina smrzavanja (do 10 000°C/min) potpuno se može izbeći formiranje kristala leda i postići vitrifikacija (staklasto stanje). Zbog poteškoća u interpretiranju rezultata merenja formiranja kristala leda u složenim matriksima u hrani, najpouzdanija istraživanja urađena su na jednostavnim sistemima vodenih rastvora (Bald, 1991). Brojne studije o formiranju kristala leda i o prevenciji istog pomoću krioprotektora su urađene u kontekstu aplikacija u medicinske svrhe, sa ciljem održavanja bioloških funkcija smrznutog tkiva (Mazur, 1970; 1984).

Sporim smrzavanjem se dobija manji broj velikih kristala leda, dok brzo smrzavanje dovodi do stvaranja velikog broja malih kristala leda. U zavisnosti od cilja smrzavanja poželjne mogu biti obe vrste kristala. U sladoledu kristali moraju biti što manji kako bi proizvod bio gladak i kremast, međutim, pri koncentrisanju tečnih prehrambenih proizvoda su poželjni veliki kristali jer ih je lakše odvojiti od zamrznutog koncentrata. Pri liofilizaciji je inače poželjno da bude manje velikih kristala leda kako bi se ubrzao proces sublimacije (Fellows, 2000).

Kada započne smrzavanje, voda prisutna u hrani migrira ka rastućim kristalima leda. Kada se tkiva biljaka ili životinja brzo smrzavaju (u laboratorijskim uslovima, u

dovoljno maloj količini, u tankom sloju) voda ne migrira van ćelija i stvaraju se mali, ravnomerno raspoređeni kristali leda unutar ćelija.

Pri komercijalnom smrzavanju, brzine smrzavanja su suviše male da bi se formirali intercelularni kristali leda. U sporo smrzavanoj hrani formiraju se veliki kristali leda ekstracelularno i dovode do dehidracije i razaranja ćelije i tkivnih vlakana. U brzo smrznutoj hrani se stvaraju mali kristali leda, ali se oni tokom vremena uvećavaju kroz proces rekristalizacije, koji je poznat kao Ostwald-ovo zrenje (Smith i Schwartzberg, 1985). Do rekristalizacije u smrznutoj hrani dolazi jer su veći kristali termodinamički stabilniji od manjih, odnosno imaju manju površinsku energiju. Rekristalizaciji potpomažu temperaturni gradijenti tokom smrzavanja ili otapanja, kao i fluktuacije temperature tokom dugotrajnog skladištenja ili distribucije proizvoda u smrznutom stanju. Takođe, kućni zamrzivači prilikom ciklusa otapanja mogu dostići temperature blizu 0°C.



Slika 3. Dopunjeni fazni dijagram realnog vodenog rastvora sa prikazom: linije topljenja T_m , linije staklastog prelaza T_g , koncentracije maksimalno koncentrovanog rastvora C'_g i odgovarajuće temperature staklastog prelaza T'_g (Evans, 2008)

Kada se tečnost hladi dovoljno brzo nema dovoljno vremena da se započne kristalizacija, pa samim tim kako se hlađenje nastavlja, tečnost postaje staklo tokom prelaza drugog reda, tj. nema razmene latentne toplote sa okolinom. Ova pojava se još naziva „staklasti“ prelaz (Wunderlich, 1981; Sperling, 1986). Odvija na temperaturama oko T_g - temperature „staklastog“ prelaza (Slika 3). Ispod ove temperature molekuli tečnosti (stakla) imaju veoma smanjenu mobilnost. Temperatura T_g nije fizička konstanta, kao što je to temperatura topljenja i ona zavisi od brzine smrzavanja (Hsu i sar., 2003). Temperatura „staklastog“ prelaza „čiste vode“ je oko -140°C .

Vrlo je česta zabluda da je „staklo pothlađena tečnost“, ili da je „staklo metastabilna tečnost“. Obe tvrdnje su netačne, jer staklo nije u stanju ravnoteže, iako ima konstantne osobine kada je na konstantnoj temperaturi, ali samo ako se posmatra u određenom (ograničenom) vremenskom periodu. Mobilnost molekula u „staklastom stanju“ je izuzetno mala, te je difuzija molekula u stabilniju (kristalnu) strukturu vrlo ograničena. Samim tim do prelaska iz „staklastog“ u kristalno stanje mogu proći godine, ponekad i hiljade godina (Evans, 2008).

Koncept „staklastog prelaza“ je vrlo razvijen u polju istraživanja o neorganskim staklima, kao i u nauci o polimerima. Slade i Levine (1991) su bili prvi zagovornici korišćenja ovog koncepta pri termičkoj obradi hrane. Ovaj koncept objašnjava mnoge pojave prilikom obrade hrane, kao što je lepljivost praha pri sušenju metodom raspršivanja (eng. „*spray drying*“) i stabilnost iste tokom skladištenja. Značaj „staklastog stanja“ u prehrambenoj tehnologiji se ogleda u tome što je hrana manje podložna promenama ako se skladišti na temperaturama ispod T_g namirnice, a razlog je već pomenuta manja mobilnost molekula u staklastom stanju. U namirnicama sa malim sadržajem vode, na pr. kao što su granule kafe, nes kafa, instant supe, T_g je viša od sobne temperature, pa su one vrlo stabilne na sobnoj temperaturi. Namirnice koje sadrže veliku količinu vode (povrće, meso, riba, mleko i mlečni proizvodi), T_g iznosi oko -28°C .

Temperatura „staklastog prelaza“ je značajna za trajnost namirnice skladištene u smrznutom stanju. Primena sastojaka kao što su krioprotektora mogu smanjiti rast kristala leda i migraciju molekula vode iz proteina. T_g može biti koristan indikator efektivnosti krioprotektora. Krioprotektori mogu biti: monosaharidi, disaharidi, glicerol, sorbitol, soli fosfata, askorbinska kiselina, karboksimetil celuloza, trehaloza (Anese i Gormley, 1996; Love, 1966; Krivchenia i Fennema, 1988).

Mackie (1993) opisuje sledeće moguće mehanizme krioprotekcije u hrani bogatoj proteinima:

- a) Prisustvo krioprotektora povećava hemijski potencijal i proteina i krioprotektora. Rezultat toga je veća stabilnost proteina prema disocijaciji i denaturaciji, što smanjuje termodinamički nepovoljan površinski kontakt proteina i krioprotektora;
- b) Dolazi do hidratacije proteina preko -OH ili jonskih grupa, pri čemu se manje vode uklanja iz proteina prilikom smrzavanja;
- c) Smanjuje se mobilnost molekula u nesmrznutoj fazi oko proteina, zbog povećanog viskoziteta i formiranja „staklastog stanja“.

Levine i Slade (1988) su postavili hipotezu da bi se dodatkom krioprotektora u idealnom slučaju T_g povećala iznad temperature skladištenja namirnice u smrznutom stanju. Ovo bi dovelo da smanjivanja procesa nepoželjnih promena u toku skladištenja na minimum. Čak i bez upotrebe krioprotektora, T_g namirnice može pružiti informaciju za optimalnu temperaturu skladištenja u smrznutom stanju. U Japanu se temperatura od -60°C koristi za skladištenje osetljivih i visoko vrednih namirnica, kao što je tuna koja se koristi za pripremu sušija ili sašimija (Evans, 2008).

Za razliku od medicine, u prehrambenoj tehnologiji je mnogo komplikovanija upotreba krioprotektora, jer je obim industrijske proizvodnje hrane veliki, potrebna je velika količina krioprotektora, a vrlo često je potrebna i neka modifikacija procesa proizvodnje kako bi se krioprotektor inkorporirao u namirnicu. Takođe, obzirom da je

većina krioprotektora slatkog ukusa, nije moguće upotrebiti ih u hrani koja nije slatka sama po sebi (Evans, 2008).

Većina prehrambenih proizvoda su višefazni sistemi, sa vrlo komplikovanom strukturom, pa je i istraživanje i interpretacija „staklastog prelaza“ otežana (Roos, 1995). „Staklasti prelaz“ se može detektovati preko promena različitih fizičkih (dielektričnih, mehaničkih i termodinamičkih) osobina povezanih sa promenama u viskozitetu i mobilnosti molekula (Sperling, 1986). Jedna od metoda za detekciju „staklastog prelaza“ je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, a posebno diferencijalna brzoklenirajuća kalorimetrija, koja detektuje promenu toplotnog kapaciteta, koja se odvija u temperaturnom intervalu prelaza (Saunders *i sar.*, 2004).

2.4.3 Fizičke promene tokom skladištenja namirnica u smrznutom stanju

Glavne fizičke promene koje se dešavaju tokom skladištenja u smrznutom stanju su migracija vode i rekristalizacija. Oba procesa su povezana sa stabilnošću smrznute vode u unutrašnjosti i na površini namirnice (Fennema *i sar.*, 1973; Zaritzky, 2000).

Migracija vode se može dogoditi pri sporom smrzavanju tkiva, gde se iz unutrašnjosti ćelije voda pomera ka smrznutoj intercelularnoj masi, što dalje dovodi do deformacije i razaranja ćelija, promene teksture u toj namirnici kao i do pojave velike količine izdvojene tečnosti pri odmrzavanju, a samim tim i do gubitka određenog dela nutrijenata. Tokom skladištenja postoje temperaturni gradijenti u proizvodu zbog kojih nastaje određeni profil napona pare u namirnici. Zbog ovih razlika u naponu pare dolazi do migracije vode iz unutrašnjosti namirnice, kao i sa površine namirnice u okolnu sredinu. Temperaturna variranja tokom skladištenja dovode do migracije vode na površinu smrznute namirnice ili na unutrašnju stranu pakovanja. Kada se temperatura snižava, voda sa površine isparava (sublimacija) i difunduje do unutrašnje površine pakovanja. Kada se temperatura povećava led koji je na unutrašnjoj površini pakovanja ima tendenciju da se vrati u namirnicu. Međutim reapsorbcija vode na početnu poziciju je nemoguća u ovom slučaju, te neminovno dolazi do gubitka u masi,

koje se naziva kalo. Migracija vode se može smanjiti ako se smanje variranja u temperaturi tokom skladištenja, a s obzirom da kalo ima značajan ekonomski efekat, potrebno je koristiti ambalažu koja ima vrlo nisku propustljivost za vodenu paru (Evans, 2008).

Prilikom smrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju može doći i do isušivanja površine namirnica, pa i do pojave tzv. opekotina u ekstremnim slučajevima. Ovo se dešava ukoliko ne postoji neka vrsta nepropusne barijere za vlagu na površini namirnice. Takođe, isušivanje dovodi i do pojačavanja oksidativnih procesa, što dalje dovodi do ireverzibilnih promena boje, ukusa i teksture (Evans, 2008).

Rekristalizacija je proces povećavanja prosečne veličine kristala leda tokom vremena. Već je pomenuto da se brzim zamrzavanjem dobija veliki broj manjih kristala leda, što se povoljnije odražava na osobine kasnije odmrznute namirnice. Nasuprot tome, tokom skladištenja se događa proces rekristalizacije koji u određenoj meri anulira efekat brzog zamrzavanja. Manji kristali leda su termodinamički nestabilni jer imaju visok odnos površine i zapremine, a samim tim i veliku površinsku energiju. Težnja sistema ka nižoj energiji u ovom slučaju rezultuje smanjenjem broja kristala leda i uvećavanjem njihovog prečnika. Mali kristali leda nestaju ili se spajaju sa većim, što u velikoj meri utiče na konačan kvalitet odmrznutog proizvoda, jer veliki kristali oštećuju komponente u namirnici. Važno je napomenuti da ako se temperatura skladištenja u smrznutom stanju uvećava, brzina rekristalizacije se takođe uvećava (Evans, 2008). U literaturi je opisano više tipova rekristalizacije (Fennema *i sar.*, 1973; Hartel, 2001; Zaritzky, 2006):

- a) *Površinska rekristalizacija pri konstantnoj masi* – u ove promene spada promena oblika ili unutrašnje strukture kristala usled težnje ka minimalnoj energiji, a da masa kristala ostane konstantna. Pretpostavka je da ovaj proces odvija pod uticajem površinskog difundovanja molekula vode. Kristali nepravilnog oblika, sa velikim odnosom između površine i zapremine se transformišu u

kompaktniju strukturu sa manjim, prethodno pomenutim, odnosom, a samim tim i manjom površinskom energijom.

- b) *Migratorna rekristalizacija* – predstavlja težnju velikih kristala leda da se uvećavaju na račun manjih kristala. Mehanizmi kao što su topljenje-difuzija-ponovno smrzavanje i sublimacija-difuzija-kondenzacija dovode do povećanja prosečne veličine kristala, smanjenja broja kristala i smanjenja površinske energije kompletne kristalne faze. Pri konstantnoj temperaturi i pritisku, migratorna rekristalizacija je rezultat različite površinske energije malih i velikih kristala. Manji kristali ne mogu snažno da vezuju površinske molekule, kao što to mogu veliki i samim tim imaju i nižu tačku topljenja. Iz toga sledi da pri topljenju mali kristali nestaju, dok se pri ponovnom smrzavanju veliki kristali uvećavaju.
- c) *Rekristalizacija agregacijom kristala* – nastaje kada se kristali koji se dodiruju spoje, uvećavajući veličinu čime se takođe smanjuje broj kristala i površinska energija kristalne faze. Pretpostavlja se da je za ovu pojavu odgovorna površinska difuzija. Gradijent koncentracije između dva kristala koja su blizu jedan drugog je veliki, samim tim „materijal“ između kristala se transportuje do tačke kontakta između kristala i na taj način se formira „vrat“ kojim se kristali dodiruju.
- d) *Rekristalizacija indukovana pritiskom* – pri dejstvu jake sile na grupu kristala, pravac njihove bazalne ravni se pomera ka pravcu delovanja sile. Ovaj tip rekristalizacije se retko pojavljuje u hrani.
- e) *Devitrifikacija* – tokom veoma brzog smrzavanja, vodeni rastvori se mogu naći u potpunom ili delimičnom stanju stakla. Pri zagrevanju na određenu kritičnu temperaturu dolazi do naglog prelaza iz stanja stakla u kristalno stanje.

2.4.4 *Hemijske promene tokom skladištenja namirnica u smrznutom stanju*

Tokom smrzavanja voda se pretvara u kristale leda, a rastvorena supstanca se koncentriše u nesmrznutom delu matriksa (rastvora). Sporo smrzavanje rezultuje maksimalno čistim kristalima i maksimalnoj koncentraciju u nesmrznutom matriksu

(Fennema *i sar.*, 1973). Brzim smrzavanjem dolazi do značajnog zarobljavanja rastvorenih supstanci u kristalima leda i smanjenja koncentracije rastvorenih supstanci u nesmrzutoj fazi. Povećanje koncentracije rastvorenih supstanci u nesmrzutoj fazi povećava jonsku jačinu i može izazvati značajne promene u strukturi biopolimera. U tom slučaju struktura vode i interakcije između vode i rastvorenih supstanci se menjaju i mogu se pojaviti interakcije između makromolekula kao što su proteini. Formiranjem kristala leda, mogu se osloboditi materije iz tkiva i ćelija (npr. enzimi) i samim tim može doći do reakcija koje se inače ne bi odvijale u netaknutim ćelijama. Pomenute reakcije su među glavnim uzročnicima pogoršanja kvaliteta u smrznutim namirnicama. Većina enzima zadržava značajan deo svoje aktivnosti i na temperaturama smrzavanja i skladištenja smrznutih proizvoda. Smrzavanje može da ima naizgled nelogičan uticaj na hemijske reakcije; temperature i koncentracija reaktanata su najznačajni faktori brzine hemijskih reakcija u smrznutim proizvodima. U mnogim smrznutim sistemima brzina reakcije može doći do svog maksimuma na temperaturama nešto nižim od tačke smrzavanja. Ovo je posledica suprotstavljenih faktora: niske temperature koja smanjuje brzinu reakcije i povećane koncentracije reaktanata u nesmrzutoj fazi što dovodi do ubrzavanja reakcije. Na pr. oksidacija mioglobina (pigment mesa) se ubrzava na temperaturama od -5°C (Lanari *i sar.*, 1990; Lanari i Zaritzky, 1991). Najznačajnije hemijske reakcije koje se mogu odvijati tokom smrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju su (Zaritzky, 2006):

- a) *Enzimske reakcije* – skladištenje na niskim temperaturama u smrznutom stanju, usporava aktivnost enzima, ali je ne zaustavlja u potpunosti. Hidrolitički enzimi kao što su lipaze, fosfolipaze, proteaze mogu ostati aktivni tokom skladištenja u smrznutom stanju. Hidrolitički enzimi mogu izazvati pogoršanje kvaliteta namirnice tokom skladištenja u smrznutom stanju. Lipaze i fosfolipaze hidrolizuju estarske veze u trigliceridima, odnosno fosfolipidima, pri čemu hidroliza lipida može da dovede do veoma jakih neželjenih posledica na ukus i teksturu proizvoda, a povećava se koncentracija slobodnih masnih

kiselina. Neke lipaze su aktivne čak i na temperaturama od -29°C . Tokom skladištenja na niskim temperaturama, akumulacija masnih kiselina kratkih lanaca dovodi do pojave hidrolitičke užeglosti, neželjenih promena ukusa, a pomenute kiseline mogu stvarati komplekse sa proteinima koje mogu uticati na teksturu proizvoda. Postoji niz promena koje u različitim namirnicama izazivaju lipaze, proteaze, kao i drugi hidrolitički enzimi.

- b) *Denaturacija proteina* – glavni uzroci oštećene strukture proteina tokom smrzavanja su: formiranje kristala leda, rekristalizacija, dehidratacija, koncentracija soli, oksidacija, promene na lipidima i oslobađanje celularnih metabolita. Promene na proteinima usled smrzavanja i gubitak njihove funkcionalnosti najčešće su posmatrani u smrznutom mesu, ribi, proizvodima od jaja i testu. Tokom smrzavanja proteini su izloženi povećanoj koncentraciji soli u nesmrznutoj fazi; jaka jonska jačina može da prouzrokuje kompeticiju sa već postojećim elektrostatičkim silama, modifikujući na taj način nativnu proteinsku strukturu. Gubici u funkcionalnosti se najčešće ogledaju izmenjenim (lošijim) sledećim osobinama proteina: sposobnost vezivanja vode, viskozitet, gelirajuća svojstva, emulgujuća svojstva, peniva svojstva. Smanjenjem sposobnosti vezivanja vode, smanjuje se i rastvorljivost proteina. Ovo se odvija jer se veze protein-voda zamenjuju vezama protein-protein ili nekim drugim interakcijama. U biološkim sistemima, površina proteinskog molekula je hidrofilna (polarana), a unutrašnjost je hidrofobna. Migracija vode tokom smrzavanja dovodi do dehidratiranog stanja i ometa interakciju između proteina i rastvarača (vode). Proteinima koji su u manje polarnoj sredini više je izložen unutrašnji (nepolarni) deo molekula koji sadrži hidrofobne lance. Kako bi se zadržao minimum energije tokom smrzavanja, dolazi do interakcije protein-protein preko hidrofobnih i jonskih interakcija, što rezultuje denaturacijom proteina i formiranjem agregata. Treba napomenuti da i oksidativni procesi mogu doprineti denaturaciji proteina, jer može doći do interakcije proteina sa agensima oksidacije kao što su enzimi i metali.

c) *Oksidacija lipida* – ova reakcija ozbiljno ograničava rok trajanja proizvoda u smrznutom stanju i dovodi do pogoršanja kvaliteta (ukusa, izgleda, nutritivne vrednosti i funkcionalnosti proteina). Oksidacija lipida je kompleksan proces koji se zasniva na reakciji između slobodnih radikala. Tokom faze inicijacije, atom vodonika se odvoji od masne kiseline, ostavljajući slobodan alkil radikal koji se u prisustvu kiseonika transformiše u peroksil radikal. U sledećem koraku peroksil radikal oduzima vodonik od susedne masne kiseline formirajući u toj reakciji hidroperoksid i novi alkil radikal. Dalje razlaganje hidroperoksida je odgovorno za dalju propagaciju slobodnih radikala. Dekompozicija hidroperoksida na aldehide i ketone dovodi do karakterističnog užeglog ukusa. Redoks aktivni prelazni metali su glavni faktori koji katališu reakciju oksidacije u biološkim sistemima, a jedan od najzastupljenijih je gvožđe. Putevi inicijacije oksidacije mogu biti kako enzimatski, tako i neenzimatski. Jedan od važnih enzima za oksidaciju je lipoksigenaza, koja je prisutna i u biljnim i u animalnim tkivima. Degradacija pigmenata i gubitak boje se takođe dovode u vezu sa oksidacijom lipida.

2.4.5 *Odmrzavanje smrznutih namirnica*

Pojednostavljena definicija odmrzavanja je da je to proces obrnut od smrzavanja, koji predstavlja topljenje kristala leda dovođenjem odgovarajuće količine energije (toplote). Odmrzavanje je, međutim, proces koji je mnogo komplikovaniji od smrzavanja, a vrlo često je ostavljeno krajnjem potrošaču da obavlja ovaj postupak. Postoje tri razloga zbog kojih se odmrzavanje može smatrati komplikovanim procesom:

- odmrzavanjem se stvara region u namirnici u kojem je manja toplotna provodljivost nego u još uvek zamrznutom delu namirnice, pa se time remeti protok toplote kroz namirnicu

- ne sme se koristiti medijum koji će praviti veliku temperaturnu razliku pri odmrzavanju, što je moguće kod smrzavanja, jer može doći do promena na namirnici, koje nastaju pri procesu kuvanja
- Tokom odmrzavanja postoji mnogo veći rizik od povećanog rasta mikroorganizama zbog odgovarajućeg režima temperature i vremena odmrzavanja (Evans, 2008).

Novim metodama odmrzavanja, pomoću visokog pritiska (200 - 400 MPa), namirnice se mogu odmrzavati i na temperaturama ispod - 15°C, čime se može postignuti da se iz već navedenih razloga namirnice ne izlažu temperaturama iznad 0°C (Cheftel *i sar.*, 2002).

Odmrzavanje na industrijskom nivou predstavlja u suštini proces pripreme za dalju preradu određenog poluproizvoda. Međutim, smrznuti gotovi proizvodi se većinom odmrzavaju u kući krajnjeg kupca, što znači da je upravo na krajnjem kupcu da obavi proces odmrzavanja, pa se time praktično negira striktna kontrola bezbednosti i kvaliteta tokom proizvodnje. Smrzavanjem se ne uništavaju mikroorganizmi, pa je vrlo praktično pravilo da se odmrzavanje vrši na niskim temperaturama (temperatura frižidera) kako bi se izbegla proliferacija mikroorganizama (Evans, 2008).

Prilikom spremanja, odnosno kuvanja hrane, otapanje se može vršiti zagrevanjem u rerni (konvencionalnoj ili mikrotalasnoj) ako se spreči isušivanje površine. Vrlo je poželjno usitnjavanje smrznute namirnice, ako je moguće, jer se prenos toplote povećava 4 puta, ako se odmrzavana namirnica prepolovi (Evans, 2008).

Odmrzavanje pomoću mikrotalasa ima nedostatak što se mikrotalasi više apsorbuju na već odmrznutom delu namirnice, što znači da može doći do pregrevanja odmrznutog dela, a da se smrznuti deo ne odmrzne. Odmrzavanje pomoću ultrazvuka je u principu bolji metod, jer se ultrazvuk apsorbuje jednako i na smrznutom delu namirnice. U Japanu su čak i napravljeni kućni uređaji za odmrzavanje na principu ultrazvuka (Miles *i sar.*, 1999). Nedostatak ove metode je što se mora osigurati kontakt

namirnice sa ultrazvukom potapanjem namirnice u vodu, te nije pogodno za namirnice koje nemaju definisan oblik ili moraju ostati u suvom stanju. Ovaj nedostatak takođe postoji i kod odmrzavanja pomoću električne struje (Evans, 2008).

2.5. Uticaj hlađenja i smrzavanja na komponente mleka

Uopšteno, snižavanje temperature ima više značajnih efekata na osobine različitih vrsta materijala (Walstra, 2003):

- usporavaju se hemijske reakcije;
- pomera se hemijska ravnoteža;
- smanjuje se jačina hidrofobnih interakcija, što dovodi do disocijacije proteina;
- globularni proteini mogu denaturisati na niskim temperaturama usled smanjenja hidrofobnih interakcija i ova denaturacija je reverzibilna, ali enzimi su neaktivni u ovom stanju;
- većina mikroorganizama ne raste na temperaturama ispod 0°C, iako se na ovim temperaturama može nastaviti proces fermentacije u veoma malom obimu.

Hlađenje mleka izaziva više pojava, od kojih su najznačajnije (Walstra *i sar.*, 2006):

- slabiji rast mikroorganizama, usled čega se smanjuju i promene koje se dešavaju usled njihovog metabolizma;
- skoro sve hemijske i enzimske reakcije se zaustavljaju;
- pojačava se autooksidacija lipida pod uticajem svetlosti ili jona Cu^{2+} , verovatno zbog smanjenja aktivnosti enzima superoksid dismutaze;
- događa se promena u rastvorljivosti i asocijaciji soli, smanjuje se količina micelnog kalcijumfosfata, povećava se pH vrednost;
- povećava se voluminoznost kazeinskih micela, a deo kazeina (naročito β -kazein) disosuje, što rezultira povećanim viskozitetom i kazein postaje podložniji dejstvu plazmina;

- membrana masnih globula gubi deo svojih komponenti što dovodi do promene njene strukture (ove promene su ireverzibilne);
- dolazi do hladne aglutinacije masnih globula i pojačava se sposobnost izdvajanja pavlake;
- trigliceridi unutar masnih globula delimično kristalizuju.

Pri hlađenju mleka, ono počinje da se zamrzava na temperaturi od oko $-0,54^{\circ}\text{C}$. Formiraju se kristali leda, a u preostalom nesmrznutom delu raste koncentracija sastojaka mleka, čime se dalje snižava tačka mržnjenja. Što je temperatura niža, veći udeo vode je smrznut.

Temperatura od $-0,75^{\circ}\text{C}$, pri koncentraciji vodnog rastvora laktoze od 12%, predstavlja eutektičku tačku tog rastvora, pri kojoj počinje kristalizacija. Međutim, pojava jezgara kristalizacije i rast kristala laktoze su spori procesi, tako da pri brzom smrzavanju, kristalizacija laktoze može izostati. Ova činjenica je vrlo bitna jer izostankom kristalizacije, laktoza u smrznutom mleku deluje krioprotektivno. Krioprotektivni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Dolazi do efekta manjeg obima smrzavanja vode i samim tim do slabijeg porasta jonske jačine i aktivnosti Ca^{2+} jona u nesmrznutom delu mleka. U slučaju kristalizacije laktoze, nakon otapanja mleka dolazi do agregacije kazeinskih micela, verovatno zbog pojačane koncentracije soli i deponovanja kalcijumfosfata u miceli. Ako se agregacija nije dogodila u prevelikom obimu, sistem se može vratiti u prethodno stanje mešanjem mleka na temperaturama oko 5°C . Međutim, pri dužem skladištenju na temperaturama oko -18°C , agregacija nakon otapanja je ireverzibilna. Ako pri brzom smrzavanju izostane kristalizacija laktoze, agregacija kazeina takođe izostaje (Walstra *i sar.*, 2006). Dovoljno je da kristalizuje 40% laktoze da bi se prouzrokovala destabilizacija kazeina. Tokom smrzavanja dolazi do precipitacije kalcijumfosfata, verovatno zbog smanjenja aktivnosti jona pri velikim koncentracijama, čime dolazi do smanjenja pH vrednosti od 6,7 do 6,0 (Goff i Sahagian, 1996).

Smrzavanje i otapanje punomasnog mleka, a naročito pavlake, dovodi do delimične koalescencije masnih globula, jer ih pritiskaju rastući kristali leda. Ova pojava se može sprečiti prethodnom homogenizacijom i/ili brzim postupkom smrzavanja. Brzo smrzavanje se može izvesti u izmenjivaču toplote u kom se posebnim noževima struže nastali led sa unutrašnjih zidova i meša se sa koncentrovanim mlekom, međutim ovaj postupak je veoma skup (Walstra *i sar.*, 2006).

Smrzavanjem se pojačava koncentracija svih supstanci koje se nalaze u onom delu medijuma gde voda i dalje nije smrznuta. Ovo dovodi do pojačavanja svih koligativnih svojstava takvog sistema. S obzirom da napon pare čiste vode i leda zavisi samo od temperature pri konstantnom pritisku i aktivnost vode delimično smrznutog sistema će zavisi od temperature. Veoma niske temperature smrzavanja (niže od -40°C) su potrebne kako bi se snizila a_w vrednost na manje od 0,7. Pri smrzavanju se pojačava jonska jačina rastvora. Važna posledica ovoga je da izaziva smanjenje rastvorljivosti proteina u takvom sistemu, odnosno denaturaciju. Dubljim smrzavanjem se snižavaju koeficijenti jonske aktivnosti tako da joni asociraju, što dovodi do smanjenja jonske jačine. Smrzavanjem se povećava viskozitet sistema čime se, pored menjanja konzistencije, smanjuju brzine reakcije u sistemu ili se potpuno zaustavljaju.

Smrzavanjem vode se povećava njena zapremina. Imajući to u vidu, kristali leda koji se formiraju u disperznom sistemu lokalno povećavaju pritisak i dovode do mehaničkih oštećenja. Ova pojava je zastupljena u emulzijama tipa ulje u vodi nakon sporog smrzavanja. Držanjem na niskim temperaturama, ulje kristalizuje, što znači da dolazi do delimične koalescencije kada su masne globule pritisnute jedna uz drugu. Ovo se manifestuje prilikom otapanja, pojavom vidljivih kapljica masti (Walstra, 2003).

Čuvanje mleka postupkom zamrzavanja je predmet istraživanja još od sredine 1930-tih godina (Muir, 1984), kada su ova istraživanja bila fokusirana na razvijanje metoda kojima bi se mleko i koncentrovano mleko čuvalo duži vremenski period, a da se ne naruši stabilnost i kvalitet. Smrzavanje može imati negativan uticaj na mlečnu

mast, jer dovodi do razaranja masnih globula i izdvajanja slobodnih masti (Muir, 1984), a kako navodi Needs (1992), smrzavanjem se takođe podstiče oksidacija mlečne masti. Dalje promene masnih kiselina nakon smrzavanja i otapanja mleka dešavaju se pri postupku pravljenja sira (Ha i sar., 1989; Shantha i sar., 1992; Garcia-Lopez i sar., 1994). Ukus mlečnih proizvoda posle odmrzavanja je u većini slučajeva uporediv sa svežim proizvodima, pri čemu je najčešći problem oksidacija masti. Defekti u teksturi mogu biti vrlo uočljivi posle odmrzavanja, ali ukus ostaje na prihvatljivom nivou. Sa druge strane mane ukusa se teško mogu popraviti, ali teksturalni defekti ne ostavljaju velike posledice ako se posle odmrzavanja odvijaju procesi pasterizacije i homogenizacije, jer ovi procesi mogu da resuspenduju kazein i mast (Goff i Sahagian, 1996).

Postoji više tehnoloških problema pri smrzavanju mleka: koagulacija proteina, separacija masti i autooksidacija masti. Tokom smrzavanja homogenizovanog mleka dolazi do separacije masne faze u velikom obimu, ali ovaj problem se može prevazići intenzivnim mešanjem nakon odmrzavanja. Pri skladištenju mleka u periodu od 2 meseca na temperaturi od -10°C dolazi do značajnih teksturalnih promena. Značajno bolja tekstura postiže se skladištenjem na -18°C za isti vremenski period. Stabilnost mleka se može povećati uklanjanjem kalcijuma elektrodijalizom, što uslovljava disocijaciju micelnog kazeina. Uklanjanjem 40% ukupnog kalcijuma dobija se stabilnost kazeina duža od 17 nedelja na temperaturi od -8°C . Pasterizacijom koja se može primeniti pre smrzavanja da bi se rastvorili kristali laktoze, ili uklanjanjem 70% kalcijuma se produžava stabilnost u toku skladištenja od jedne godine, na istoj temperaturi. Postoje i druge tehnike za održavanje stabilnosti smrznutog mleka u toku skladištenja, kao što su: kristalizacija i uklanjanje laktoze pre smrzavanja; dodavanje hidrokoloida kako bi se povećao viskozitet i sprečila kristalizacija laktoze; dodavanje šećera da bi se sprečila kristalizacija laktoze; termički tretmani, koji rastvaraju jezgra kristalizacije laktoze; enzimaska hidroliza laktoze primenom β -galaktozidaze, koja rezultuje nešto slađim ukusom rekonstituisanog mleka (Goff i Sahagian, 1996).

2.5.1 Smrzavanje mleka namenjenog proizvodnji sireva

U literaturi postoji jako malo podataka o smrzavanju kozjeg mleka, u cilju prevazilaženja sezonskog karaktera proizvodnje. Većina postojećih literaturnih podataka o smrzavanju tiče se ovčijeg mleka.

Ispitivanjem ovčijeg mleka, utvrđeno je da se količina suve materije, kazeina, neproteinskog azota i laktoze ne menja na temperaturama -15°C i -25°C u toku skladištenja 1-6 meseci. Tokom 6 meseci skladištenja na -25°C mleko poseduje zadovoljavajuću stabilnost, dok na temperaturi -15°C posle 3 meseca dolazi do flokulacije proteina. Nakon odmrzavanja mleka homogenost se uspostavlja pasterizacijom ($65^{\circ}\text{C}/30$ min). Udeo mlečne masti se smanjuje tokom skladištenja, pri čemu je ova pojava izraženija ukoliko je mleko bilo skladišteno na temperaturi -15°C . Razlozi za smanjivanje udela mlečne masti nisu u potpunosti objašnjeni. Kristali leda koji se formiraju oštećuju membranu masnih globula. S obzirom na destrukciju membrane masnih globula, mast je podložnija lipolizi, što može biti razlog smanjivanja udela mlečne masti tokom skladištenja smrznutog mleka (Zhang *i sar.*, 2006). Mlečna mast je stabilizovana membranom koja se sastoji od fosfolipida i proteina (Muir, 1984; Keenan i Mather, 2003). Tokom smrzavanja, kristali leda prouzrokuju oslobađanje lipoproteina iz membrane masnih globula, što dovodi do koalescencije globula prilikom otapanja (Fennema *i sar.*, 1973). Kristali koji se formiraju na -15°C su veći i prave veća oštećenja na masnim globulama, za razliku od onih koji se formiraju na -27°C (Koschak *i sar.*, 1981; Needs, 1992). Ustanovljeno je da se količina slobodnih masnih kiselina povećava tokom skladištenja (Needs, 1992; Wendorff, 2001).

Prema Zhang *i sar.* (2006), temperature skladištenja smrznutog mleka od -15°C i -25°C ne utiču na randman sireva od ovčijeg mleka. Vreme skladištenja do 2 meseca takođe nije uticalo na randman. U periodu od trećeg do petog meseca skladištenja smanjenje randmana je bilo umereno, a značajno smanjenje randmana od 8% primećeno je posle 6 meseci skladištenja. Podešeni randman (eng. *adjusted cheese yield* – koji je računat kao masa dobijenog sira sa 37% vode na 100g mleka) se nije menjao u toku

skladištenja od 6 meseci. Dobijeni podaci ukazuju na smanjenje kapaciteta vezivanja vode sira kao rezultat smrzavanja mleka, što je u skladu sa povećanjem količine izdvojene surutke od smrznutog mleka skladištenog 6 meseci, u odnosu na kontrolni uzorak. Na količinu izdvojene surutke ne utiče temperatura skladištenja, međutim sa povećanjem vremena skladištenja povećava se njena količina (Zhang *i sar.*, 2006). Smrzavanje menja proteinsku strukturu mleka raskidanjem vodoničnih veza između polipeptidnih lanaca. Na taj način se smanjuje kapacitet vezivanja vode (Fontecha *i sar.*, 1993). Kako bi se smanjio štetan efekat smrzavanja na randman, preporučeno je da se mleko skladišti na temperaturi -27°C (Wendorff, 2001). Osim toga, primećen je porast sadržaja suve materije sira sa povećanjem vremena skladištenja smrznutog mleka, što se može objasniti odsustvom razlika u gore pomenutim podešenim randmanima sireva dobijenih od smrznutog mleka skladištenog u različitim vremenskim periodima. Sa vremenom skladištenja mleka smanjuje se sadržaj suve materije i masti u surutki. Više masti zaostaje u surutki ukoliko je mleko skladišteno na temperaturi -25°C nego na -15°C . Kod svih uzoraka, surutka dobijena u procesu proizvodnje sira imala je manje od 1% masti, što ukazuje na efikasno zadržavanje masti u siru od smrznutog mleka (Zhang *i sar.*, 2006). Kako bi se od smrznutog ovčijeg mleka dobili proizvodi zadovoljavajućeg kvaliteta preporučuje se smrzavanje i skladištenje na temperaturi -27°C i nižoj. Na temperaturi od -12°C skladištenje ne bi trebalo da traje duže od 3 meseca (Wendorff, 2001).

Gomes *i sar.* (1997) su utvrdili da smrzavanje kozjeg mleka pasterizovanog pri režimu $63^{\circ}\text{C}/30$ minuta i skladištenjem 90 dana na -18°C ne dovodi do fizičko-hemijskih promena, što je jedini poznati literaturni podatak koji govori o smrzavanju ove vrste mleka. Posle otapanja kozjeg mleka dolazi do izvesnih negativnih promena na senzornim karakteristikama, koje bi se mogle preduprediti homogenizacijom pre termičkog tretmana (Calvo, 2000).

2.5.2 Smrzavanje gruš u proizvodnji sireva

Jedan od načina prevazilaženja sezonskog karaktera proizvodnje kozjeg mleka, pri proizvodnji sireva, takođe je i smrzavanje gruš. Sirevi dobijeni od ovakvog gruš su, generalno, manje prihvatljivog ukusa od sireva dobijenih od svežeg mleka (Park i Guo, 2006). Najčešće je gruš smrzavan na -18°C u periodu od nekoliko meseci. Utvrđeno je da ovakva praksa može dovesti do stvaranja mrvljive teksture, promena u starterskoj mikroflori, oksidaciji masti i gubljenju karakterističnog kozjeg ukusa (Calvo, 2000).

U Francuskoj postoji praksa smrzavanja gruš pri proizvodnji kiselo koagulišućih kozjih sireva, pri čemu se smrznut gruš posle otapanja meša sa svežim (Raynal-Ljutovac *i sar.*, 2011).

Pri smrzavanju gruš od kozjeg mleka ustanovljeno je da je poželjno smrzavati gruš u tankim slojevima ili blokovima debljine do 10 cm, pažljivo umotanim kako bi se izbegao dodir sa kiseonikom. Potrebne su temperature niže od -20°C . Odmrzavanje treba vršiti na 4°C , 24-48 časova, pre zagrevanja gruš na 22°C , kada se nastavljaju dalje operacije inokulacije, kalupljenja, zrenja. Mogu se pojaviti razni defekti pri proizvodnji sira od smrznutog gruš: oksidacija masti i mrvljiva, zrnasta struktura. Broj bakterija mlečne kiseline se smanjuje tokom smrzavanja na jednu desetinu, dok su kvasci i koliformne bakterije skoro potpuno uništeni. Promene na bakterijama mlečne kiseline utiču na proces zrenja. So izaziva pojavu oksidacije pri smrzavanju, pa se preporučuje smrzavanje neusoljenog gruš. Tokom zrenja sireva od smrznutog gruš, pronađeno je znatno više nekazeinskog azota, verovatno zbog veće podložnosti kazeinskih frakcija degradaciji. Nedostatak karakterističnog ukusa može se dogoditi zbog degradacije karbonilnih jedinjenja tokom skladištenja smrznutog gruš (Goff i Sahagian, 1996).

Seçkin *i sar.* (2011) su ispitali uticaj skladištenja smrznutog kozjeg gruš u periodu od 6 meseci, pri temperaturi od -18°C , na količinu organskih kiselina kao što su: limunska, mlečna, jabučna, mravlja, sirćetna, pirogroždana i propionska. Tokom

skladištenja sireva u periodu od 12 nedelja na 4°C, najveći udeo je bio udeo mlečne kiseline, a najmanji pirogroždane. Utvrđen je statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) procesa zamrzavanja na koncentraciju pomenutih organskih kiselina.

Pri proizvodnji „Hispánico“ sira (polutvrđi sir od mešavine ovčijeg i kravljeg mleka – Španija), nisu primećene velike razlike, ukoliko je sir pravljn tako što se kravljji gruš mešao sa prethodno smrznutim ovčijim grušem (4 meseca). Nisu postojale razlike u sadržaju suve materije, broju bakterija mlečne kiseline, teksturi, aromi, količini hidrofobnih i hidrofilnih peptida i količini 45 od 65 lako isparljivih jedinjenja. Izvesne razlike su postojale u aminopeptidaznoj aktivnosti, proteolizi, pH vrednosti, količini ukupnih slobodnih aminokiselina, količini slobodnih masnih kiselina i ostalih 20 lako isparljivih jedinjenja (Picon *i sar.*, 2010a). Ispitivan je i uticaj različitog vremena presovanja pre smrzavanja (15, 60 i 120 minuta). Nisu nađene razlike u broju BMK, sadržaju suve materije, u količini 47 od 68 volatilnih jedinjenja, količini hidrofobnih peptida, teksturi i senzornim karakteristikama. Nasuprot tome postoje razlike u pH vrednosti, aminopeptidaznoj aktivnosti, proteolizi, količini hidrofobnih peptida, aminokiselina, masnih kiselina i preostalih 21 lako isparljivih jedinjenja. Ove razlike nisu mogle biti pripisane ni smrzavanju ni različitom vremenu presovanja (Picon *i sar.*, 2010b).

2.5.3 Smrzavanje sireva

Treći način da se prevaziđe sezonski karakter proizvodnje je smrzavanje sireva. Pri smrzavanju sireva, ukus uglavnom ostaje prihvatljiv, ukoliko ne dođe do oksidacije masti. Međutim, tekstura postaje mrvljiva i brašnjava posle otapanja. U smrznutom siru se primećuje povećanje neuređene strukture kazeina, što rezultuje oštećenjima u mikrostrukturi koja se mogu videti skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Pored toga, dolazi i do pojačane proteolize (Goff i Sahagian, 1996). Kod sireva smrznutih brzim postupkom, koji smanjuje obim stvaranja kristala leda, manje je izražen štetan efekat smrzavanja, dok se kod smrzavanja, u trajanju od 1-2 meseca, mekih sireva tipa Camembert i Brie javljaju veliki defekti u ukusu i strukturi (Luck, 1977).

Smrzavanje zrelih polutvrđih ovčijih sireva i skladištenje na temperaturi od -20°C u toku 6 meseci, dalo je zadovoljavajući rezultat. U toku ovog perioda skladištenja nije bila primećena nikakva razlika između i smrznutih sireva u pogledu hemijskog sastava (sadržaj vode, masti, proteina, mineralnih materija, soli). Takođe, nije bilo razlike između a_w vrednosti i količine rastvorljivog i neproteinskog azota. Značajne razlike u odnosu na kontrolne uzorke pojavile su se posle 9 meseci skladištenja. Razlike su se manifestovale kroz povećanje količine neproteinskog azota i aminokiselina, što je uzrokovalo nešto veću pH vrednost. Ova činjenica govori da su bakterijske proteinaze nastavile svoju aktivnost u nekom malom obimu, a do povećanja pH vrednosti je došlo, jer se broj mikroorganizama u toku skladištenja smanjivao, pa se stvorene aminokiseline i neproteinski azot nisu trošili za porast broja mikroorganizama. Zaključeno je da brzina smrzavanja kao što je brzo smrzavanje na -82°C , i sporo na -20°C , nije uticala na mikrobiološke i hemijske karakteristike sireva (Tejada *i sar.*, 2002).

Kod sira Port Salut Argentino vremenski period smrzavanja od 2 meseca takođe nije uticao na pojavu negativnih efekata na proteolizu i teksturu. U toku 60 dana skladištenja indeks zrenja se nije menjao kod ovog sira, ali se menjao kada je odmrznut sir skladišten u frižideru na temperaturi 4°C u periodu od 30 dana (Verdini i Rubiolo, 2002b; a). Smrzavanje je imalo efekat na proteolizu kada su ovi sirevi smrznuti pre zrenja i skladišteni 30 dana. Bila je povećana hidroliza α_{s1} -kazein i α_{s1} -I-kazein, što ukazuje na određene promene u konformaciji ovih frakcija tokom smrzavanja, te one postaju podložnije hidrolizi himozinom. Povećana je hidroliza peptida rastvorljivih u vodi, posebno α_{s1} -kazein (f1-23), a prerana pojava slobodnih aminokiselina je verovatno rezultat povećane količine enzima usled razaranja ćelija mikroorganizama kristalima leda. Iz ovih činjenica se zaključuje da smrzavanje utiče na brzinu proteolize, dok se njen tok ne menja (Verdini *i sar.*, 2005).

Sirevi se mogu smrznuti pre, u toku, i nakon perioda zrenja. Ispitivanja su vršena kod polutvrđih ovčijih sireva („Serpa“ – Portugal). Kod sireva koji su smrznuti u toku perioda zrenja, proces zrenja je dovršen nakon odmrzavanja. Nije bilo značajne razlike

u udelu u vodi rastvorljivog azota, odnosno širini zrenja između smrznutih i nesmrznutih uzoraka. Kod sireva smrznutih u najranijoj fazi zrenja (28-og dana, od ukupnih 42 dana zrenja) primarna proteoliza se već odigrala u velikom obimu, pa se može zaključiti da smrzavanje na ovaj način ne menja obim primarne proteolize. Generalno, smrznuti uzorci su imali veći udeo neproteinskog azota, veću tvrdoću i bili su sjajnije površine. Razlog za veći udeo neproteinskog azota je formiranje kristala leda koji razaraju kazein, a takođe i ćelije starter kultura čime se oslobađaju proteolitički enzimi. Ovaj efekat je bio manje izražen kod uzoraka smrznutih nakon završetka zrenja i skladištenih na nižoj temperaturi (-20°C) od uzoraka smrznutih u toku perioda zrenja i skladištenih na višoj temperaturi (-10°C). Brzina smrzavanja nije uticala na hemijski sastav, reološke karakteristike i boju sireva (Alvarenga *i sar.*, 2011). Pri ispitivanju uticaja smrzavanja pre zrenja, pokazalo se da rastu viskozna svojstva kravljeg sira sa niskim sadržajem masti u toku zrenja, kao i da raste indeks zrenja koji je računat kao sadržaj rastvorljivih azotnih materija u vodi, u odnosu na ukupan azot (Meza *i sar.*, 2011).

Ispitivanjem sireva u tipu Mozzarella, rezultati ukazuju da se najprihvatljivija moguća topivost i rastezanje dobija smrzavanjem u periodu od 4 nedelje, ako je pre smrzavanja sir bio na zrenju nedelju dana na temperaturi 7°C, i ako je posle otapanja temperiran u frižideru nedelju dana pre upotrebe (Kuo i Gunasekaran, 2003). Najbolja topivost dobijena je kada je Mozzarella smrzavana u blokovima, sporim postupkom, dok se najbolja rastegljivost dobija brzim postupkom smrzavanja isečenog sira. Zaključeno je da je kritična temperaturna zona pri smrzavanju od -1,1 do -6,7°C, pa je potrebno proći što brže kroz ovaj interval kako bi se struktura što manje oštetila (Oberg *i sar.*, 1992).

Ispitivanjem uticaja zamrzavanja u periodu od 13 meseci, na temperaturi -25°C, na kvalitet travničkog i livanjskog sira došlo se do zaključka na nije bilo značajnih promena u hemijskom sastavu sireva. Senzorni kvalitet sireva čuvanih na temperaturama ispod 0°C je bio zadovoljavajući, nije bio lošiji od sireva čuvanih u

normalnim uslovima. Rezultati takođe ukazuju da tvrdi sirevi u tipu livanjskog sira dobro podnose zamrzavanje, dok kod belih sireva (travnički sir u salamuri) rađenih autohtonom tehnologijom posle odmrzavanja dolazi do lomljenja sirnog testa. Sirevi u tipu travničkog sira sa nižim sadržajem vode dobro podnose skladištenje na temperaturama dubokog zamrzavanja (Dozet *i sar.*, 1982).

Novija istraživanja pokazuju da je skladištenje smrznutih mekih sireva i sireva tipa Monterey Jack moguće u periodu od 6 meseci bez značajnih uticaja na senzorni kvalitet. Koncentracija nekih organskih kiselina je izmenjena ovakvim načinom skladištenja, ali u periodu od tri meseca skladištenja nije primećen negativan uticaj na senzorne karakteristike. Navedena činjenica predstavlja veliku mogućnost primene ovakve tehnologije, kako bi se prevazišao sezonski karakter proizvodnje kozjeg mleka i proširilo tržište proizvoda od kozjeg mleka (Park i Guo, 2006). Ispitivan je i uticaj skladištenja na senzorne karakteristike kozjih sireva Monterey Jack u periodu od 5 godina na temperaturi -20°C . Senzorni atributi kao što su ukus na mlečnu mast, sladak ukus, ukus na kuvano mleko su značajno slabiji kod sireva koji su bili smrznuti. Senzorni profil sireva se ne menja tokom skladištenja u periodu od 28 dana u frižideru, posle odmrzavanja. Intenzitet karakterističnog „kozjeg ukusa“ se smanjuje u periodu od prvih 6 meseci, ali na kraju skladištenja posle 5 godina ostaje na istom nivou kao na početku skladištenja. Razlog za povećanje intenziteta ovog atributa na kraju perioda skladištenja nije poznat. Tekstura je posle 5 godina izmenjena i opisana je kao zrnasta i nalik testu. Ostali ispitivani senzorni atributi nisu se značajno razlikovali, što govori da su posle 5 godina skladištenja sirevi dovoljno prihvatljivi za tržište (Park, 2013). Smrzavanje u periodu od samo jednog dana kod mekih belih kozjih sireva i sireva Monterey Jack ne utiče na indeks lipolize i senzornu ocenu kasnije u toku skladištenja od 28 dana na temperaturi od 4°C , ali utiče na promenu u količini određenih organskih kiselina (Park i Lee, 2006). Generalno je zaključak da smrzavanje kozjih sireva Monterey Jack ne utiče značajno na njihova senzorna svojstva. Takođe smrzavanje mekih kozjih sireva nema uticaj na ukus i održivost na temperaturama frižidera, pa se može zaključiti

da skladištenje ovih sireva u smrznutom stanju predstavlja jednu od mogućnosti da se ovi sirevi obezbede na tržištu u toku cele godine (Park *i sar.*, 2006).

Smrzavanje svežih mekih kozjih sireva na -20°C i skladištenje u periodu od 3 meseca nije uticalo na ukupni senzorni kvalitet, ali su se loše senzorne karakteristike pojavile u toku skladištenja od 4 nedelje u frižideru (4°C), posle odmrzavanja. Značajne razlike u odnosu na kontrolne uzorke sireva pojavile su se u količini određenih organskih kiselina. Kod smrznutih sireva došlo je do statistički značajnog povećanja količine mravlje kiseline, a smanjenja količine vinske kiseline, dok kod sireva od kravljeg mleka u tipu Mozzarella nije primećena razlika u količini organskih kiselina između smrznutih i nesmrzavanih uzoraka sira (Park i Drake, 2005).

Ispitivanjem teksture i reoloških karakteristika mekih kozjih sireva, dobijeni su podaci da se ove karakteristike ne menjaju značajno smrzavanjem u periodu do 6 meseci. Kada su efekti smrzavanja ocenjivani posle jednog dana držanja na temperaturi 4°C , uzorci koji su bili smrznuti samo 2 dana imalu su manju žvackljivost i bili su mekši od sireva smrznutih u periodu od 3 i 6 meseci. Sirevi skladišteni 6 meseci imali su najviše vrednosti za žvackljivost i kohezivnost posle jednog dana držanja na temperaturi od 4°C . Posle 28 dana skladištenja na temperaturi 4°C sirevi koji su bili smrznuti 2 dana približno su dostigli vrednosti ostalih uzoraka za merene parametre teksture. Kontrolni uzorci sireva (nesmrzavani) i sirevi smrznuti 3 i 6 meseci, nisu pokazali značajne promene u teksturi tokom ovog skladištenja na temperaturi frižidera u periodu od 28 dana. Pokazalo se da smrzavanje mekih sireva nežne strukture nema velikog uticaja na promenu reoloških karakteristika ovih sireva. Takođe, pokazalo se da efekat smrzavanja na proteolizu ovih sireva ne postoji (Van Hekken *i sar.*, 2005). Prema nekim autorima, smrzavanje i skladištenje kozjih sireva u toku jedne godine, sa prethodnim periodom zrenja od 10 dana, ne menja osobine u poređenju sa svežim sirevima (Calvo, 2000).

Može se zaključiti da postoji veliki broj podataka o smrzavanju vrlo različitih tipova sireva od kravljeg, ovčijeg i kozjeg mleka. Značajno veći broj podataka o smrzavanju sira, u odnosu na količinu podataka o smrzavanju mleka i gruša je razumljiv, s obzirom da je u praksi jednostavnija manipulacija smrznutim sirom od smrznutog gruša, a pogotovo mleka. Vrlo je jasno da smrzavanje ima snažan uticaj na osobine sira, ali se taj uticaj očigledno razlikuje pre svega u zavisnosti od vrste mleka i tehnologije proizvodnje sira, a zatim i od vremena skladištenja u smrznutom stanju, temperature skladištenja i brzine smrzavanja. Važno je napomenuti da se u dosadašnjoj literaturi ne mogu naći podaci o smrzavanju sirne grude.

3. Ciljevi rada

Cilj ovog istraživanja je da se ispituju mogućnosti prevazilaženja sezonskog karaktera proizvodnje kozjeg mleka skladištenjem mleka, gruša ili grude u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana, radi potencijalnog uvećanja dostupnosti kozjih sireva na tržištu u zimskom periodu. S tim u vezi, ovo istraživanje se bazira na ispitivanju karakteristika belih sireva u salamuri proizvedenih od kozjeg mleka, gruša i grude, prethodno skladištenih u smrznutom stanju. Detaljna ispitivanja svojstava eksperimentalnih sireva, opisanih u programu ove disertacije, otvorila bi mogućnost za proizvodnju kozjih sireva van perioda laktacije.

Cilj istraživanja varijacija fizičko-hemijskih karakteristika kozjeg mleka tokom laktacije se sastoji u utvrđivanju njihovog obima, kao i u utvrđivanju uticaja klimatskih faktora na pomenute varijacije. Prema podacima iz literature, variranje fizičko-hemijskih karakteristika kozjeg mleka tokom sezone značajno je veće nego u slučaju kravljeg mleka. Imajući to u vidu, jedan od ciljeva je da se ukaže na mogućnost korišćenja smrznutog kozjeg mleka za standardizaciju u toku laktacije kada su variranja parametara fizičko-hemijskog sastava izražena u značajnoj meri.

Sirišna koagulacija predstavlja važnu fazu postupka proizvodnje sirišno koagulišućih sireva, u koje se ubrajaju i sirevi u salamuri. S obzirom na veoma oskudne podatke u literaturi, jedan od ciljeva ove disertacije je ispitivanje uticaja skladištenja kozjeg mleka u smrznutom stanju tokom 60 dana na parametre sirišne koagulacije. Ispitivani reološki parametri koji obuhvataju vreme koagulacije, brzinu koagulacije i čvrstinu gela, u velikoj meri mogu uticati i na svojstva finalnog proizvoda.

Proizvodnja sira od gruša smrzanog u različitim fazama presovanja i skladištenog u takvom stanju ima za cilj utvrđivanje najpogodnijeg načina smrzavanja gruša, koje je dalje primenjen u sledećoj fazi istraživanja. Takođe je cilj da se utvrdi optimalan način zagrevanja odmrznutih gruševa na temperaturu presovanja.

Proizvodnja i analiza sireva ima za cilj utvrđivanje uticaja skladištenja kozjeg mleka, gruša i grude u smrznutom stanju na tok promena fizičko-hemijskih

karakteristika, teksture, mikrostrukture, kao i na tok i obim proteolitičkih promena tokom 8 nedelja zrenja. Uz pomoć stručnog panela i potrošača, ispitivano je na koji način skladištenje kozjeg mleka, grušā ili grude u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana značajno utiče na senzorni kvalitet i prihvatljivost sireva nakon perioda zrenja od 2 i 8 nedelja.

4. Materijal i metode

4.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka Sanske rase koza tokom perioda laktacije

4.1.1 Uzorkovanje mleka

Kozje mleko je uzorkovano sa farme koza u Kukujevcima i ispitivano u laboratoriji mlekare „Beocapra“, u periodu od 2012 – 2015. godine. Svaka laktacija je podeljena na rani, srednji i kasni period. Rani period obuhvatao je uzorke prikupljene od marta do maja; srednji period od juna do avgusta; kasni period od septembra do polovine decembra. Za svaki period laktacije je prikupljeno 45 uzoraka, te je tokom svake godine (laktacije), koja je uključena u ispitivanje, prikupljeno i analizirano ukupno 135 grupnih uzoraka. Grupni uzorak se sastojao od mešavina večernje i jutarnje muže približno 250 muznih koza. Uzorak se uzimao i analizirao odmah po prijemu mleka u mlekaru. Tokom laktacije, ishrana stada se nije menjala, a uključivala je u najvećoj meri kukuruznu silažu, detelinu sa 14-16% proteina i koncentrat od 14% proteina.

4.1.2 Fizičko-hemijski sastav mleka

Fizičko-hemijski sastav mleka je analiziran pomoću uređaja Lactoscan SA60 Milk analyzer (Milcotronic, Bugarska). Ispitivani su sledeći parametri: sadržaj mlečne masti (%), sadržaj proteina (%), sadržaj laktoze (%), sadržaj suve materije bez masti - SMBM (%), sadržaj mineralnih materija (%), gustina (g/cm^3) i tačka mržnjenja ($^{\circ}\text{C}$). Svaki uzorak je ispitan u tri ponavljanja. Prema uputstvu za rad, Lactoscan je kalibrisan svakih 7 dana. Kalibracija je vršena merenjem 5 nezavisnih uzoraka pomoću Lactoscan-a i merenjem mlečne masti istih uzoraka referentnom metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981). Korekcija Lactoscan-a vršena je upoređivanjem dobijenih srednjih vrednosti sadržaja mlečne masti.

Titraciona kiselost mleka ispitivana je titracijom 0,1M rastvora NaOH, u prisustvu fenolftaleina kao indikatora. Vrednost pH merena je digitalnim pH metrom (Testo, Nemačka). Titraciona kiselost i pH vrednost mereni su u dva ponavljanja.

4.1.3 Klimatski faktori

Podaci o klimatskim faktorima u periodu od 2012-2015. godine preuzeti su iz Meteorološkog godišnjaka, Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije. Korišćeni su podaci zabeleženi u hidrometeorološkoj stanici Sremska Mitrovica, koja je najbliža hidrometeorološka stanica u okolini farme (približno 20 km). Sledeći klimatski parametri su posmatrani u ovom istraživanju: prosečna mesečna temperatura (°C), mesečni period insolacije (h) i prosečna mesečna relativna vlažnost vazduha (%). Pomoću prosečne mesečne temperature i prosečne mesečne relativne vlažnosti računat je mesečni indeks temperature i vlažnosti prema sledećoj jednačini:

$$THI=1,8T -(1-RH)(T-14,3)+32 \quad (2)$$

gde je THI - mesečni indeks temperature i vlažnosti, T - prosečna mesečna temperatura (°C), RH - prosečna mesečna relativna vlažnost (%) (Gantner *i sar.*, 2011).

4.1.4 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćena je dvofaktorska analiza varijanse po potpuno slučajnom planu, kako bi se utvrdio efekat perioda laktacije (fiksni faktor), godine (slučajni faktor), kao i efekat njihove međusobne interakcije na varijacije pomenutih parametara fizičko-hemijskog sastava kozjeg mleka. Faktor perioda laktacije posmatran je na tri nivoa: rani, srednji i kasni period. Faktor godine posmatran je na 4 nivoa pri čemu nivo ovog faktora odgovara posmatranoj godini. Za poređenje aritmetičkih sredina korišćen je Duncan-ov test, u slučajevima gde se pokazalo da efekat perioda laktacije statistički značajno utiče na parametar fizičko-hemijskog sastava mleka. Kako su faktor godine i interakcija faktora slučajne veličine, nakon utvrđivanja statističke značajnosti efekta ovog faktora/interakcije računat je koeficijent interklasne

korelacije (ρ), kao mera učestvovanja faktora/interakcije u ukupnoj varijaciji ispitivane karakteristike fizičko-hemijskog sastava.

Za utvrđivanje korelacije između fizičko-hemijskih karakteristika kozjeg mleka i klimatskih faktora korišćen je Pirsonov koeficijent korelacije.

Statistička obrada podataka u programu SPSS verzija 21 (IBM corporation, Čikago, Illinois, SAD).

4.2. Ispitivanje uticaja smrzavanja na parametre sirišne koagulacije mleka Sanske rase koza

4.2.1 Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog kozjeg mleka

Uzorci sirovog mleka prikupljeni su u maju 2014. godine jednom sedmično, tokom tri uzastopne sedmice. Uzorci su prikupljeni sa farme Sanskih koza u Kukujevcima. Mleko je transportovano na 4°C, vozilom sa ugrađenim rashladnim sistemom. Sastav uzoraka sirovog mleka određivan je u laboratoriji za Tehnologiju mleka na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu. Ispitivani su sledeći parametri: sadržaj suve materije – standardnom metodom sušenja na $102 \pm 2^\circ\text{C}$ (FIL-IDF, 1987); sadržaj mlečne masti – metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981); sadržaj proteina metodom po Kjeldalu (AOAC, 1990). Vrednost pH merena je digitalnim pH metrom (Consort, Belgija). Svako merenje je vršeno u tri ponavljanja.

4.2.2 Reološka merenja

Uzorci sirovog kozjeg mleka su zamrzavani u tankom sloju debljine približno 1 cm, u plastičnim kesama i skladišteni na temperaturi od -27°C u toku 60 dana. Uzorci su odmrzavani 15-og, 30-og, 45-og i 60-og dana na temperaturi u intervalu od 4 - 7°C . Odmrzavanje je trajalo 36 - 48h. Posle odmrzavanja uzorci su pasterizovani na 65°C u trajanju od 30 minuta. Neposredno pre reoloških merenja uzorcima je izmerena pH

vrednost. Kao kontrolni uzorak ispitivano je pasterizovano nesmrznuto kozje mleko iste šarže, kao i eksperimentalni uzorci koji su smrzavani.

Reološka merenja su izvršena Kinexus Pro reometrom (Malver Instruments Ltd., Velika Britanija), koji je opremljen „Vane“ geometrijom. Primenjena su oscilatorna reološka merenja sa malom amplitudom (eng. SAOR – Small Amplitude Oscillatory Rheometry). Uzorci su zagrejani na 31°C i dodato je 0,2 % (w/v) CaCl₂ i 0,02% (w/v) telećeg sirila koji sadrži 96% himozina i 4% pepsina (Caglifacio Clerici, Italija). Reološka merenja su započeta 4 min nakon dodavanja sirila unošenjem uzorka u donji deo „Vane“ geometrije koji je prethodno temperiran na 31°C. Isparavanje i isušivanje površine tokom reoloških merenja sprečeno je stavljanjem plastičnog poklopca preko površine uzoraka.

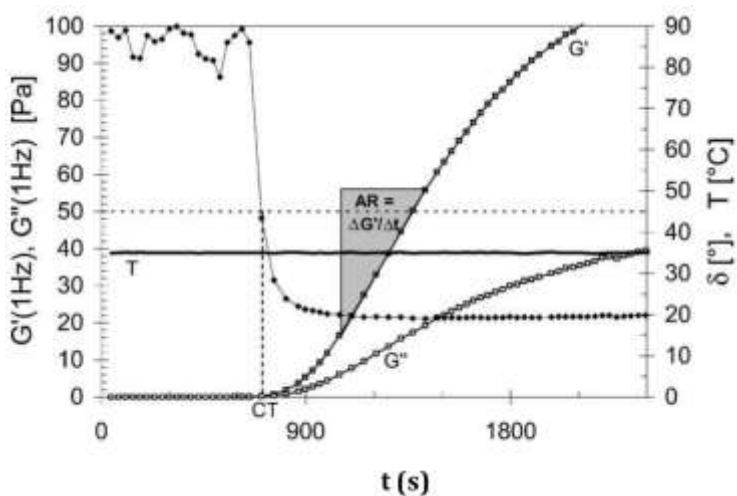
Formiranje sirišno koagulisanog gela praćeno je na temperaturi od 31°C, merenjem modula elastičnosti G' i modula viskoziteta G'' , kao i merenjem faznog ugla $\delta = \arctang(G''/G')$. Merenja su vršena pri fiksnoj frekvenciji od 1 Hz i amplitudi oscilovanja $\gamma = 0,01$ (1%) i trajala su 64 minuta od momenta dodavanja sirila i CaCl₂ oscilovanja.

Odmah po završetku prethodnog testa, pokrenut je test u kome je izvršeno variranje frekvencije oscilovanja u intervalu od 0,02 – 20Hz, sa amplitudom od $\gamma = 0,01$, na temperaturi od 31°C.

Na osnovu krivih koje su dobijene reološkim merenjima računati su sledeći parametri: vreme koagulacije (CT), brzina agregiranja (AR) i čvrstina gela (CF).

Vreme koagulacije (s) je mereno u momentu kada fazni ugao dostiže $\delta(1\text{Hz}) = 45^\circ$ (Slika 4). Brzina agregiranja (Pa/s) je okarakterisana nagibom tangente pri maksimalnom povećanju $G'(t)$ prema Steffl *i sar.* (1999) i Dimassi *i sar.* (2005), odnosno, definisana je kao nagib tangente u prevojnoj tački krive zavisnosti modula viskoznosti od vremena [Pa/s], a računata je kao maksimum prvog izvoda navedene funkcije (Slika

4). Čvrstina gela dobijena je testom variranja frekvencije oscilovanja i očitana je kao vrednost modula elastičnosti na frekvenciji od 1Hz.



Slika 4. Parametri reoloških merenja tokom sirišne koagulacije mleka (Dimassi i sar., 2005)

Parametri koagulacije su izračunati pomoću programa Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, SAD), od podataka dobijenih u toku reoloških merenja. Svako merenje je vršeno u dva ponavljanja.

4.2.3 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu rezultata merenja korišćena je jednofaktorska analiza varijanse po potpuno slučajnom planu, kako bi se ispitaio uticaj dužine skladištenja mleka u smrznutom stanju (nezavisna promenljiva - fiksni faktor) na parametre sirišne koagulacije i pH vrednost (zavisne promenljive). Za poređenje aritmetičkih sredina korišćen je Tukey-ev test, u slučajevima gde se pokazalo da efekat dužine skladištenja ima statistički značajan uticaj na parametre koagulacije i pH vrednosti.

Metodom linearne regresije utvrđeni su koeficijenti korelacije i regresioni koeficijenti između nezavisne i pomenutih zavisnih promenljivih.

Statistička obrada podataka izvršena je u programu SPSS verzija 21 (IBM corporation, Čikago, Illinois, SAD).

4.3. Svojstva sireva od kozjeg mleka i gruša skladištenih 7 dana u smrznutom stanju

4.3.1 Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka

Tri partije sirovog kozjeg mleka zapremine po 30 litara transportovane su tokom septembra 2014. godine sa farme Sanskih koza „Beocapra“ u Kukujevcima. Mleko je transportovano na 4°C, vozilom sa ugrađenim rashladnim sistemom. Svaka partija mleka podeljena je na 6 delova kako bi se napravili uzorci kontrolnog sira i 5 varijanti eksperimentalnih sireva.

Fizičko-hemijska svojstva sirovog mleka određena su u laboratoriji za tehnologiju mleka na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu prema sledećim metodama: sadržaj suve materija prema standardnoj metodi sušenja na temperaturi 102±2°C (FIL-IDF, 1987), sadržaj mlečne masti metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981), sadržaj ukupnih azotnih materija metodom po Kjeldalu (AOAC, 1990). Sadržaj proteina računat je množenjem sadržaja ukupnih azotnih materija faktorom 6,38. Vrednost pH merena je digitalnim pH - metrom (Consort, Belgija). Svaka od pomenutih analiza izvršena je u tri ponavljanja.

4.3.2 Smrzavanje i odmrzavanje mleka i gruša

Od svake partije sirovog mleka 5 litara je korišćeno za izradu kontrolnog sira, a 5 litara je razliveno u plastične kese u tankom sloju (≈1 cm) i smrznuto na -27°C. Gruš dobijen od preostalih 20 litara mleka je smrzavan u dve faze tehnološkog postupka proizvodnje sira: posle samopresovanja i posle prve faze presovanja. Skladištenje smrznutog mleka i 2 varijante smrznutog gruša trajalo je 7 dana na temperaturi od -27°C (Koschak *i sar.*, 1981; Wendorff, 2001).

Odmrzavanje mleka i gruša vršeno je na temperaturi od 4°C u trajanju od 36-48 sati. Nakon odmrzavanja mleka započet je proces proizvodnje sira, dok se u slučaju odmrznutog gruša pristupilo dogrevanju gruša na temperaturu presovanja (≈25°C).

Svaka od 2 varijante smrznutog gruša je posle odmrzavanja dogrevana na dva načina: direktnim kontaktom sa surutkom i indirektnim kontaktom sa vodom. Nakon dogrevanja nastavljeno je presovanje i dalji postupak proizvodnje sira koji će biti opisan u sledećim poglavljima. Ukupno je napravljeno 6 varijanti sira od svake partije mleka:

C - kontrolni sir

F - sir od odmrznutog mleka

SV - sir od samopresovanog odmrznutog gruša dogrevanog indirektnim kontaktom sa vodom

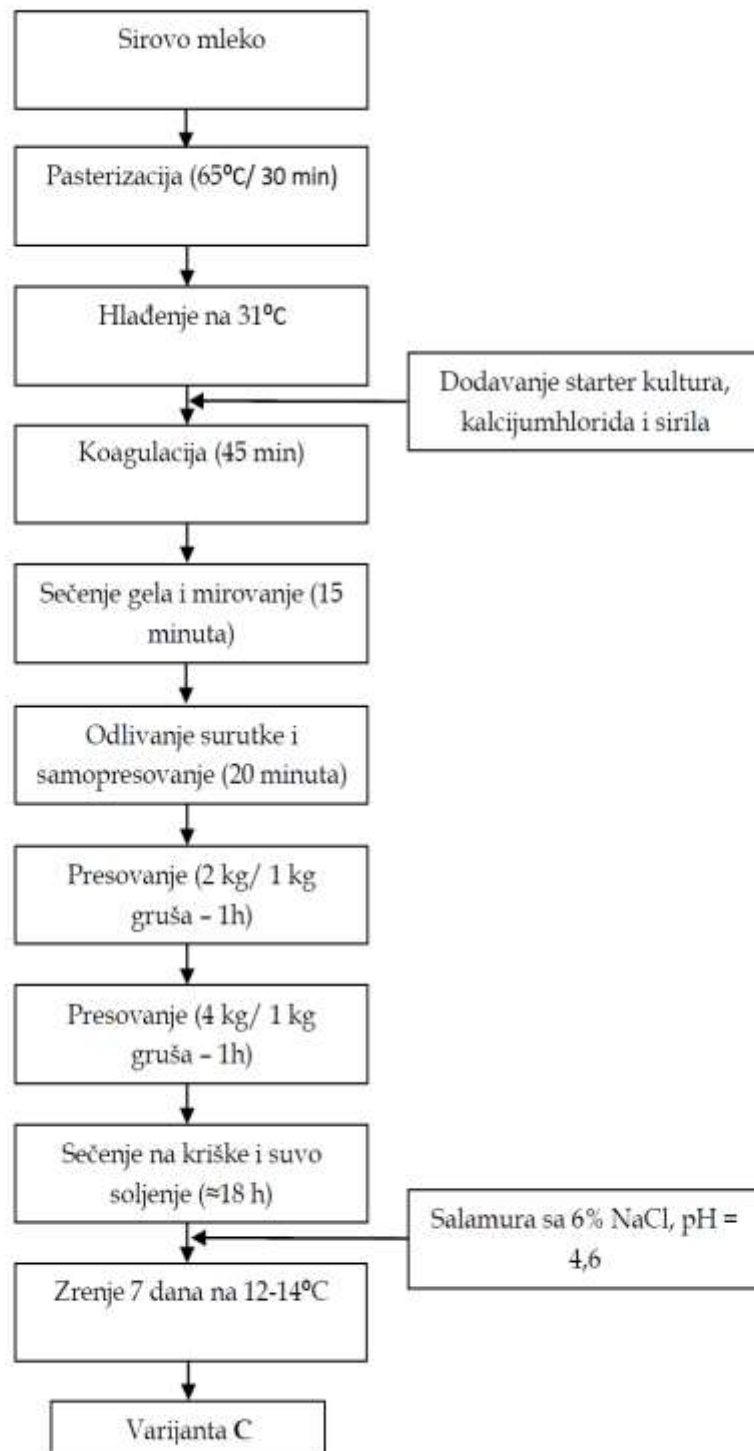
PV - sir od presovanog odmrznutog gruša dogrevanog indirektnim kontaktom sa vodom

SS - sir od samopresovanog odmrznutog gruša dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom

PS - sir od presovanog odmrznutog gruša dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom

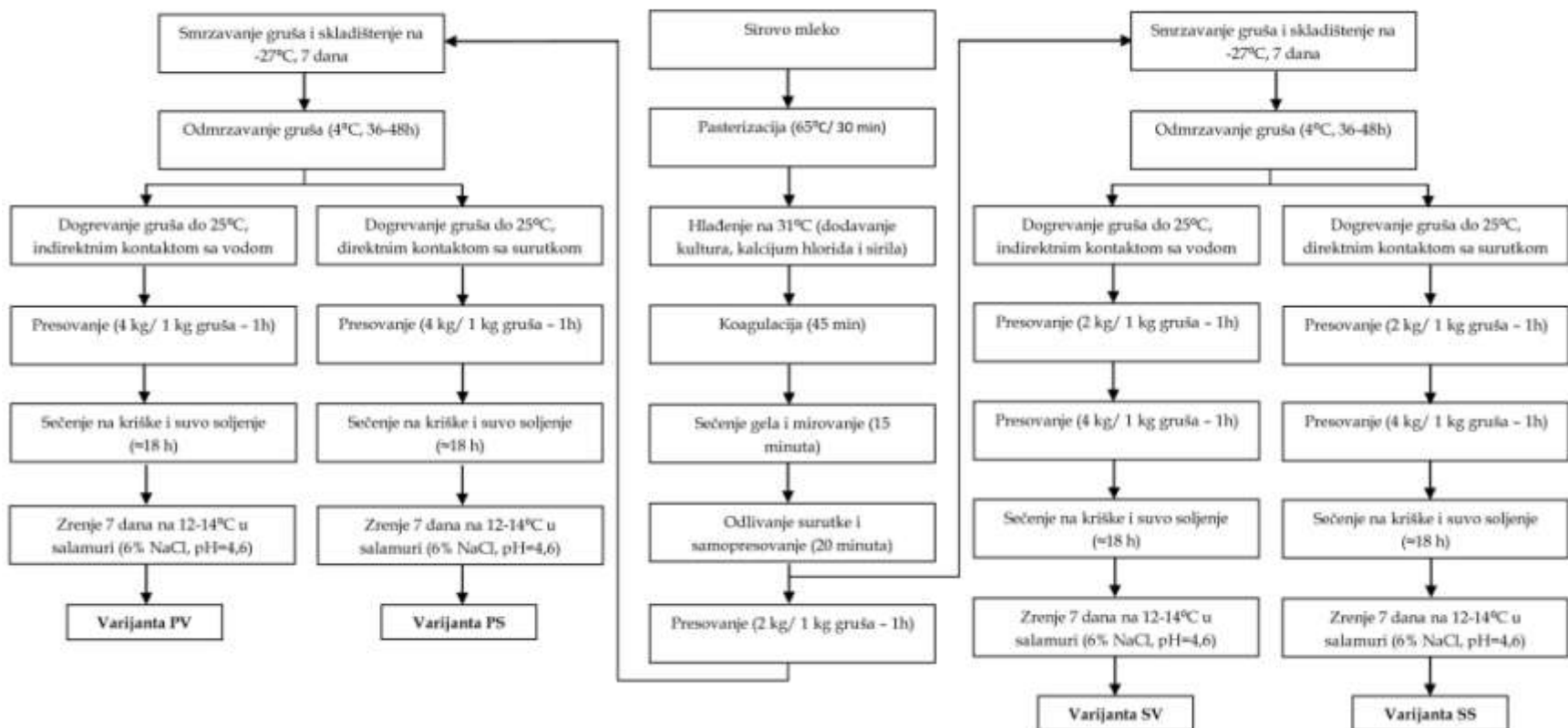
4.3.3 Tehnološki postupak proizvodnje kontrolnog sira

Na Slici 5 je prikazan tehnološki postupak izrade kontrolnog sira. U proizvodnji je korišćena komercijalna starter kultura MFC - 4 (Biochem s.r.l., Italija), kalcijumhlorid (0,2 g/L). Mleko je podsireno sa 0,02 g/L prirodnog telećeg sirila (96% himozin i 4% pepsin - Clerici-Sacco Group, Italija). Nakon koagulacije gel je isečen na kocke veličine ≈ 5 cm, a zatim ostavljen da miruje još 15 minuta. Masa gruša pažljivo prebačena u kalup i ostavljena da se samopresuje 20 minuta. Gruš je presovan u dve faze (kao što je prikazano na Slici 5) na temperaturi $\approx 25^{\circ}\text{C}$. Nakon presovanja gruda je isečena na kriške, usoljena suvim postupkom i ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Sutradan je pripremljena salamura sa 6% NaCl, a pH vrednost je podešena na 4,6 pomoću 80%-tne mlečne kiseline (Sigma Aldrich, Nemačka).



Slika 5. Šematski prikaz tehnološkog postupka izrade kontrolnog sira (C)

Zrenje u salamuri je trajalo 7 dana, što je minimalni period zrenja za meke sireve u salamuri prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Službeni glasnik RS, 33/2010, 69/2010, 43/2013 - dr. pravilnik i 34/2014).



Slika 6. Šematski prikaz tehnološkog postupka proizvodnje sireva od odmrznutog gruša

4.3.4 Tehnološki postupak proizvodnje eksperimentalnih sireva

Pod eksperimentalnim sirevima, u ovom delu oglada, podrazumevaju se sir od odmrznutog mleka (F) i sirevi dobijeni od odmrznutog gruša.

Smrznuto mleko je nakon odmrzavanja obrađeno istim tehnološkim postupkom koji je prikazan na Slici 5.

Proces proizvodnje četiri varijante sira od odmrznutog gruša (PV, PS, SV i SS) je šematski prikazan na Slici 6. Kao što se sa šematskog prikaza može videti, pomenute varijante se razlikuju u momentu smrzavanja gruša, kao i u načinu dogrevanja gruša nakon odmrzavanja.

4.3.5 Fizičko-hemijska svojstava sireva

Fizičko-hemijske karakteristike sireva su ispitivane prema sledećim metodama: sadržaj suve materije standardnom metodom sušenja na $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ (FIL-IDF, 1982), sadržaj mlečne masti (FIL-IDF, 1986), sadržaj ukupnih azotnih materija metodom po Kjeldalu (AOAC, 1990). Sadržaj proteina računat je množenjem sadržaja ukupnih azotnih materija sa faktorom 6,38. Na osnovu ovih analiza računati su sledeći parametri: sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira (VuBMS), mast u suvoj materiji (MuSM) i proteini u suvoj materiji (PuSM). Vrednost pH merena je digitalnim pH metrom (Consort, Belgija) u smesi 10g sira i 20 g destilovane (Ardö i Polychroniadou, 1999).

4.3.6 Teksturalna svojstva sireva

Tekstura je ispitivana pomoću uređaja TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija) sa ćelijom kapaciteta 5 kg. Ispitivanja svih sireva su vršena posle zrenja u salamuri u trajanju od 7 dana, a neposredno pre ispitivanja uzorci su držani na sobnoj temperaturi jedan čas. Svojstva teksture su ispitivana pomoću 3 metode:

- 1) Metod sečenja žicom (eng. *Wire Cutter Test*) (Gunasekaran i Mehmet Ak, 2003) - Analizirano je pet uzoraka svake varijante sira dimenzija 15 x 7 x 2 cm, na kojima je izvršena analiza teksture metodom sečenja uz pomoć žice debljine 0,3 mm. Sečenje uzoraka je izvršeno do dubine od 15 mm, brzinom od 2 mm/s, pri čemu je sila aktivacije odgovarala masi od 50 g. Ovom metodom se merila čvrstoća pri sečenju **CFR** (g). Penetracija ovog alata kroz sir odvijala se normalno na površinu 15 x 7 cm.
- 2) Metod preloma klinom (eng. *Fracture Wedge Test*) (Vincent i sar., 1991) - Analiza teksture metodom preloma klinom izvršena je na po pet uzoraka svake varijante sira, dimenzija 3 x 2 x 2 cm. Prelom uzoraka klinom vršen je do dubine od 10 mm računajući ukupno dubinu do koje je penetrirao gornji i donji klin. Brzina penertacije klina bila je 2 mm/s, a sila aktivacije odgovarala je masi od 5 g. Ovom metodom izmeren je parametar tvrdoća pri lomljenju **FF** (g) i krtost **B** koja je izražena u mm i predstavlja dubinu penetracije klina do lomljenja uzorka. Maksimalna penetracija bez lomljenja uzorka je 10 mm. Penetracija klinom odvijala se normalno na površinu 3 x 2 cm.
- 3) Metod penetracije sferičnom sondom (eng. *Spherical Probe Test*) (Buňka i sar., 2013) - Izvršena je analiza teksture na po pet uzoraka svake varijante sira, dimenzija 3 x 2 x 2 cm. Prečnik sferične sonde iznosio je 2,54 cm. Vršena je kompresija od 25% od početne visine uzorka (5 mm), brzinom od 2 mm/s, pri čemu je sila aktivacije odgovarala masi od 2,5 g. Ovom metodom meren je parametar čvrstoća pri kompresiji **HC** (g). Penetracija sfreične sonde odvijala se normalno na površinu 15 x 7 cm.

Nakon merenja teksture izvršenih pomenutim metodama, izračunavanje vrednosti parametara teksture sa dobijenih grafika vršeni su kompjuterskim programom EXPONENT (Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija) specijalno dizajniranim za navedeni analizator teksture.

4.3.7 Statistička obrada podataka

Kako bi se ispitivani sirevi rangirali prema sličnosti sa kontrolnim sirom u pogledu fizičko-hemijskih i teksturalnih karakteristika korišćeno je kvadratno Ivanovićevo odstojanje. Ključni argument za korišćenje ove metode statističke obrade podataka je mogućnost Ivanovićevo (kao i kvadratnog Ivanovićevo) odstojanja da integriše veliki broj promenljivih u jednu veličinu (Jeremic, 2012). Konstrukcija kvadratnog Ivanovićevo odstojanja je iterativna. Izračunava se vrednost diskriminišućeg efekta promenljive X_1 , koja predstavlja najznačajniju promenljivu (ili onu koja nosi najviše informacija o entitetima koji se rangiraju) prema kojoj se razdvajaju entiteti, u ovom slučaju varijante sireva. Zatim se izračunava i dodaje onaj deo razdvajajućeg efekta sledeće promenljive X_2 koji nije sadržan u promenljivoj X_1 . Nakon toga se izračunava i dodaje razdvajajući efekat promenljive X_3 koji nije sadržan u promenljivim X_1 i X_2 . Procedura se na opisan način primenjuje za sve promenljive uključene u analizu dok se ne dobije kompletni razdvajajući efekat za svaki entitet koji je potrebno rangirati (Ivanovic, 1977; Jeremic *i sar.*, 2011). Redosled dodavanja razdvajajućeg efekta promenljivih se određuje na osnovu koeficijenata parcijalne korelacije sa najznačajnijom promenljivom X_1 . Dodaje se prvo razdvajajući efekat one promenljive koja ima najveći koeficijent parcijalne korelacije, a zatim redom prema opadajućim vrednostima koeficijenata parcijalne korelacije. Imajući u vidu karakteristike ovog odstojanja, ono može imati primenu kada postoji potreba da se poredi više eksperimentalnih entiteta sa kontrolnim ili fiktivnim entitetom, a da pri tome postoji više promenljivih koje ih opisuju. Ovakav pristup rezultuje time da je svaki entitet opisan samo jednim brojem koji određuje odstojanje tog entiteta od kontrolnim ili fiktivnim entitetom. Prema tom odstojanju se entiteti rangiraju u odnosu na sličnost (ili razliku) sa kontrolnim ili fiktivnim entitetom (Jeremic *i sar.*, 2011). U ovom istraživanju je korišćeno kvadratno Ivanovićevo odstojanje koje može imati prednost u odnosu na obično Ivanovićevo odstojanje kada se javljaju negativni koeficijenti parcijalne korelacije između promenljivih, a nije moguće postignuti istosmernost

njihovom transformacijom, pri čemu kvadratno Ivanovićevo odstojanje zahteva i manji broj operacija, te je i jednostavnije za upotrebu (Jeremic, 2012).

Kvadratno Ivanovićevo odstojanje je u ovom istraživanju korišćeno za rangiranje eksperimentalnih sireva prema sličnosti sa kontrolnom varijantom sira. Ukupno 8 ispitivanih obeležja je uzeto u obzir: fizičko-hemijska svojstva - VuBMS, MuSM, PuSM, pH; teksturalna svojstva - CF, FF, B, HC. Za najvažnije (primarno) obeležje je izabran sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira (VuBMS), znajući da varijacije u sadržaju VuBMS (koji predstavlja odnos između vode i proteina) dovode do razlika u teksturi, pa ovo obeležje inače i služi za klasifikaciju sireva u smislu teksture (Tunick *i sar.*, 1993). Odstojanje je računato prema sledećoj jednačini (Jeremic *i sar.*, 2011):

$$D^2(r,s) = \sum_{i=1}^k \frac{d_i^2(r,s)}{\sigma_i^2} \prod_{j=1}^{i-1} (1 - r_{j_i, 12 \dots j-1}^2) \quad (1)$$

gde je d_i rastojanje između kontrolnog i eksperimentalnog sira za promenljivu X_i , σ_i je standardna devijacija promenljive X_i , a $r_{j_i, 12 \dots j-1}$ koeficijent parcijalne korelacije između obeležja X_i i X_j ($j < i$). Koeficijenti parcijalne korelacije između pomenutih 8 obeležja izračunati su pomoću programa SPSS verzija 21 (IBM corporation, Čikago, Illinois, SAD). Microsoft Excel je korišćen pri izračunavanju vrednosti kvadratnog Ivanovićeovog odstojanja.

Pored kvadratnog Ivanovićeovog odstojanja korišćena je i jednofaktorska analiza varijanse sa ciljem da se ispita da li postoji statistički značajan uticaj faktora smrzavanja/odmrzavanja na fizičko-hemijske i teksturalne karakteristike eksperimentalnih sireva i kontrolnog sira. Ogled je postavljen prema potpuno slučajnom planu pri čemu je ispitivani faktor (uticaj smrzavanja/odmrzavanja) fiksiran. Poređenja sredina u slučajevima gde je postojao statistički značajan uticaj vršena su Duncan-ovim testom. Analiza varijanse izvršena je pomoću programa SPSS verzija 21 (IBM corporation, Čikago, Illinois, SAD).

4.4. Svojstva sireva od kozjeg mleka, gruša i grude skladištenih 60 dana u smrznutom stanju

4.4.1 Uzorkovanje i ispitivanje fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka

Tri partije sirovog kozjeg mleka zapremine po 40 litara transportovane su sa farme Sanskih koza „Beocapra“ u Kukujevcima tokom novembra 2015. – te godine. Mleko je transportovano na temperaturi 4°C, vozilom sa ugrađenim rashladnim sistemom.

Fizičko-hemijska svojstva sirovog mleka određena su prema sledećim metodama: sadržaj suve materije prema standardnoj metodi sušenja na temperaturi 102±2°C (FIL-IDF, 1987), sadržaj mlečne masti metodom po Gerberu (FIL-IDF, 1981), sadržaj ukupnih azotnih materija metodom po Kjeldalu (AOAC, 1990). Sadržaj proteina računat je množenjem sadržaja ukupnih azotnih materija sa faktorom 6,38. Vrednost pH merena je digitalnim pH – metrom (Consort, Belgija). Titraciona kiselost (°SH) određivana je tiracijom sa 0,1 M NaOH u prisustvu fenolftaleina kao indikatora (Carić *i sar.*, 2000). Svaka od pomenutih analiza izvršena je u tri ponavljanja.

4.4.2 Smrzavanje i odmrzavanje mleka, gruša i grude i postupak proizvodnje sireva

Odmah nakon transporta mleka, 10 litara je razliveno u plastične kese u tankom sloju (≈1 cm) i smrznuto na -27°C. Preostalih 30 litara podeljeni su na tri jednaka dela od kojih su napravljeni: kontrolni sir, kao i gruš i gruda koji su u plastičnim kesama smrznuti na -27°C. Tehnološki postupak proizvodnje kontrolnog sira je opisan u poglavlju 4.3.3.

Gruš je smrznut posle prve faze presovanja, dok je gruda smrznuta nakon završenog presovanja. Skladištenje smrznutog mleka, gruša i grude je iznosilo je 60 dana na temperaturi -27°C. Nakon 60 dana je započeto odmrzavanje koje je trajalo 36-48 časova na temperaturi od 4°C. Odmrznuti gruš dogrevan je u plastičnoj kesi indirektnim kontaktom sa vodom do ≈25°C, kako bi se nastavilo sa drugom fazom

presovanja. Do faze smrzavanja tehnološki postupak proizvodnje gruša i grude je identičan kao u poglavlju 4.3.3. Nakon odmrzavanja postupak proizvodnje je nastavljen od faze u kojoj je prekinut smrzavanjem, takođe prema prethodno opisanom postupku.

Ukupno je napravljeno četiri varijante sira:

CC – kontrolni sir

FM – sir od odmrznutog mleka

FC – sir od odmrznutog gruša

FPC – sir od odmrznute grude

Zrenje sireva iz ovog dela ogleda trajalo je 8 nedelja, a uzorkovanje je vršeno 1-og, 14-og, 28-og, 42-og i 56-og dana zrenja.

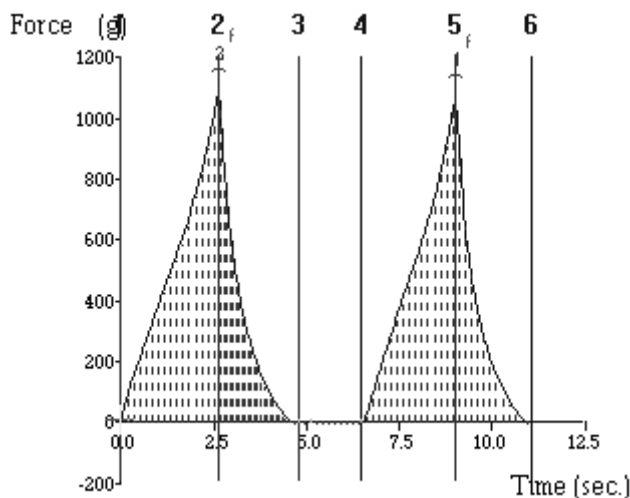
4.4.3 *Fizičko-hemijska svojstva sireva*

Fizičko-hemijska svojstva sireva su ispitivana prema sledećim metodama: sadržaj suve materije standardnom metodom sušenja na $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ (FIL-IDF, 1982), sadržaj mlečne masti (FIL-IDF, 1986), sadržaj ukupnih azotnih materija metodom po Kjeldalu (AOAC, 1990). Sadržaj proteina računat je množenjem sadržaja ukupnih azotnih materija sa faktorom 6,38. Sadržaj natrijumhlorida je određen metodom po Volhardu (FIL-IDF, 1988b). Na osnovu ovih analiza računati su sledeći parametri: sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira (VuBMS), mast u suvoj materiji (MuSM) i proteini u suvoj materiji (PuSM). Vrednost pH merena je digitalnim pH metrom (Consort, Belgija) u smesi 10g sira i 20 g destilovane (Ardö i Polychroniadou, 1999). Sve analize su vršene u tri ponavljanja.

4.4.4 *Teksturalna svojstva sireva*

Tekstura je ispitivana pomoću uređaja TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija) sa ćelijom kapaciteta 5 kg. Sonda cilindričnog

oblika (P/25mm) je korišćena za sva merenja. Uzorci su pripremani sečenjem sira na valjke visine 15 mm i prečnika 15 mm. Sirevi su ispitivani 1-og, 14-og, 28-og, 42-og i 56-og dana. Za svaku varijantu sira su vršena tri testa: analiza profila teksture (TPA – eng. *Texture Profile Analysis*), test maksimalnog naprezanja (eng. *Maximum Stress Test*) i test relaksacije naprezanja (eng. *Stress Relaxation Test*). Kompjuterski program Exponent je automatski beležio krive u toku merenja za sva tri testa i uz pomoć istog su vršeni proračuni parametara teksture.



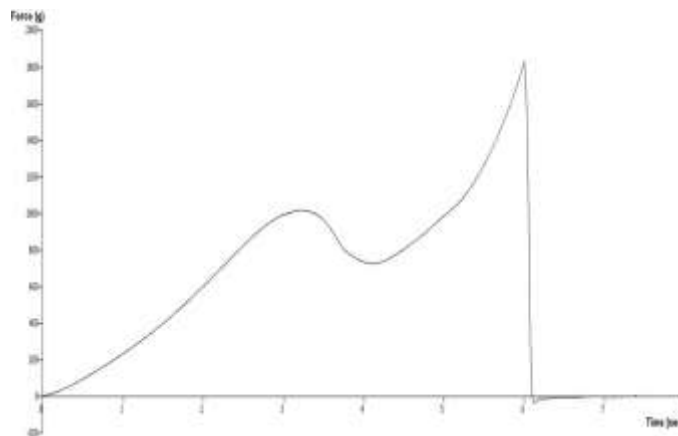
Slika 7. Primer idealne krive koja se dobija TPA testom (program Exponent, Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija)

Analiza profila teksture (TPA) vršena je tokom dve uzastopne kompresije bez lomljenja uzorka. Deformacija uzoraka bila je 33,3 % (5 mm). Brzina kojom je sonda vršila kompresiju bila je 2 mm/s. Analizom dobijene krive (Slika 7) tokom merenja ustanovljeni su sledeći parametri teksture (Pons i Fiszman, 1996):

- **Čvrstoća** (eng. *hardness*) - koja predstavlja silu potrebnu da se postigne zadata deformacija, a kvantifikuje se kao maksimalna visina pri prvoj kompresiji (tačka 2 na Slici 5). Potrebno je naglasiti da je, zbog jednostavnosti, za jedinicu ovog parametra uzet gram, a stvarna sila se dobija kao težina tela odgovarajuće mase.
- **Elastičnost** (eng. *springiness*) - koja predstavlja nivo oporavka deformisanog materijala do stanja pre deformacije nakon prestanka delovanja sile. Kvantifikuje

se kao količnik rastojanja od tačke 4 do tačke 5 i rastojanja od tačke 1 do tačke 2 na Slici 5. Rastojanje između tačaka 1 i 2 predstavlja vreme od početka prve kompresije do postizanja maksimalne deformacije, a rastojanje između tačaka 4 i 5 predstavlja vreme od početka druge kompresije do postizanja maksimalne deformacije. Ovaj parametar nema jedinicu. Termin elastičnost (eng. *elasticity*) je zamenjen terminom „springiness“ koji je široko prihvaćen u literaturi na engleskom jeziku, a za koji trenutno ne postoji precizan i adekvatan prevod na srpski jezik. Iz tog razloga, treba napomenuti da ovu elastičnost ne treba dovoditi u vezu sa fizičkim veličinama kao što je modul elastičnosti.

- **Kohezivnost** (eng. *cohesiveness*) – koja predstavlja jačinu unutrašnjih veza u materijalu koji se ispituje. Kvantifikuje se kao količnik površine ispod krive koja odgovara drugoj kompresiji i površine ispod krive koja odgovara drugoj kompresiji. Ovaj parametar takođe nema jedinicu.
- **Žvkljivost** (eng. *chewiness*) – koja predstavlja energiju potrebnu da se hrana u čvrstom stanju usitni kako bi bila spremna za gutanje, a vezana je sa čvrstoćom, kohezivnošću i elastičnošću kao primarnim parametrima teksture. Kvantifikuje se kao proizvod čvrstoće, kohezivnosti i elastičnosti.

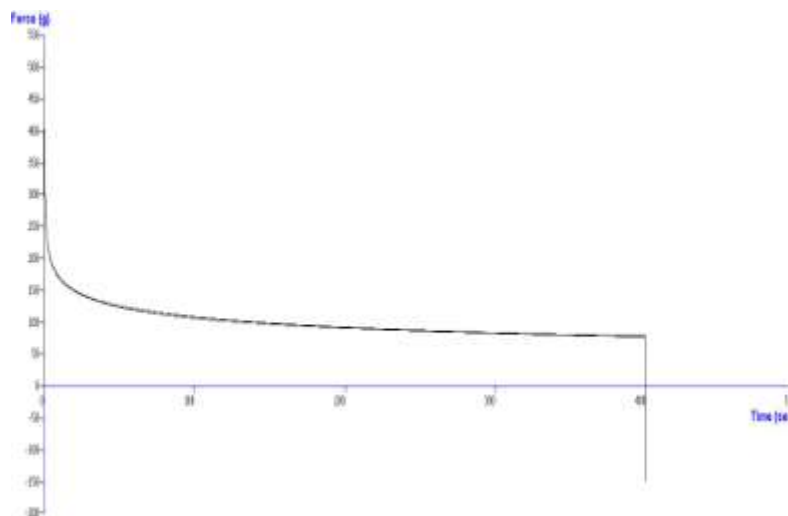


Slika 8. Primer dobijene krive nakon testa maksimalnog naprežanja (program Exponent, Stable MicroSystems Ltd., Velika Britanija)

Test maksimalnog naprežanja (eng. *Maximum Stress test*) vršen je jednostepenom kompresijom do 80% deformacije (12 mm) brzinom sonde od 2 mm/s, pri čemu je došlo

do lomljenja uzorka. **Lomljivost** je parametar koji je dobijen ovim testom, a predstavlja silu pri kojoj dolazi do lomljenja uzorka. Ovde je ponovo važno napomenuti da je, kao i kod čvrstoće, jedinica za ovaj parametar gram, a stvarna sila se dobija kao težina tela odgovarajuće mase. Kvantifikacija se vrši tako što se sa grafika očita maksimalna vrednost u prvoj prevojnoj tački krive (Slika 8).

Test relaksacije naprezanja (eng. *Stress relaxation test*) vršen je kompresijom do deformacije od 10% (1,5 mm) brzinom sonde od 5 mm/s. Pri ovom nivou deformacije merena je sila kojom je uzorak komprimovan u toku 400 s. Nakon završenog merenja dobijena je kriva (x osa – sila, y osa – vreme), čiji se primer može videti na Slici 9.



Slika 9. Primer dobijene krive nakon testa relaksacije naprezanja (program Exponent, Stable Microsystems Ltd., Velika Britanija)

Dobijena kriva se podvrgava matematičkoj analizi prema Pelegovom modelu relaksacije, koji se zasniva na predstavljanju viskoelastičnih svojstava hrane pomoću relaksacionih krivih koje se obično poklapaju sa eksponencijalnom jednačinom koja opada. Ova jednačina predstavlja izvedenu jednačinu iz Maksvelovog modela (Peleg, 1979). Matematička analiza predstavlja normalizaciju vrednosti F_t (merena sila u vremenu t) prema jednačini (3) i naknadnu linearizaciju normalizovanih vrednosti prema jednačini (4) (Buňka *i sar.*, 2013).

$$Y_t = \frac{F_{\max} - F_t}{F_{\max}} \quad (3)$$

$$\frac{1}{Y_t} = \frac{1}{AB} + \frac{t}{A} \quad (4)$$

Iz ove dve jednačine dobija se sledeća jednakost:

$$Y_t = \frac{F_{\max} - F_t}{F_{\max}} = \frac{ABt}{1 + Bt} \quad (5)$$

gde je F_t - vrednost sile merena u vremenu t , Y - relaksacija naprezanja u vremenu t , F_{\max} - maksimalna sila, A - predstavlja nivo smanjivanja vrednosti sile tokom relaksacije (što se više smanjuje sila, veća je vrednost koeficijenta A), B - povezana sa brzinom relaksacije, tako je $1/B$ predstavlja vreme potrebno da se postigne nivo relaksacije od $A/2$. A i B su poznati kao Pelegovi koeficijenti.

Na osnovu podataka sa eksperimentalne krive (Slika 9) određuje se njeno poklapanje sa Pelegovim modelom i izračunavaju se Pelegovi koeficijenti koji zapravo predstavljaju karakteristiku materijala, u ovom slučaju sira koji se ispituje.

4.4.5 Proteolitičke promene tokom zrenja sireva

Proteolitičke promene svih varijanti sireva iz ovog dela ogleda praćene su primenom UREA poliakrilamidne gel elektroforeze u prisustvu uree po metodi Andrews (1983) na uzoricima uzetim 1-og, 14-og, 28-og, 42-og i 56-og dana zrenja.

Priprema uzoraka sireva je obuhvatila sledeću proceduru: 0,4g homogenizovanog uzorka sira je rastvoreno u 5mL pufera pH 7,6 (1,875 g Tris i 120 g Uree se rastvara u 250 mL destilovane vode i pH vrednost podešava sa HCl), a potom temperirano u vodenom kupatilu na 40°C u toku 1 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, sadržaj je filtriran kroz papirnu vatu u ependorfove kivete. Nakon toga vršeno je centrifugiranje na 20°C na 600 g u toku 15 minuta (Miloradovic *i sar.*, 2015) sa ciljem izdvajanja sloja masti na površini. 100 µL dobijenog supernatanta je pomešano sa 300 µL pufera (pH 7,6) u koji su dodati β-merkaptoetanol (Merck, Nemačka) i par zrna

boje bromfenolplavo. Na ovaj način pripremljeni ekstrakti sireva čuvani su zamrznuti, a neposredno pred elektroforezu je izvršeno odmrzavanje i temperiranje uzoraka na sobnu temperaturu. Na gelove je nanošeno po 5 μ l pripremljenog ekstrakta uzoraka sira.

Kao gel za koncentrisanje korišćen je 4% gel (4 g akrilamida i 0,2 g bis akrilamida se rastvara u 100 mL Tris-HCl pufera pH 7,6) i 12% gel za razdvajanje (24 g akrilamida i 1 g bis akrilamida se rastvara u 200 mL Tris-HCl pufera pH 8,9). Pufer Tris-HCl pH 7,6 je pripremljen odmeravanjem 0,75 g Tris-a, 26 g Uree i dopunjavanjem destilovanom vodom do 100 mL, dok je pufer Tris-HCl pH 8,9 pripremljen odmeravanjem 4 g Tris-a, 26 g Uree i dopunjavanjem do 100 mL destilovanom vodom. Vrednost pH je podešavana sa HCl.

Kao elektrodni pufer korišćen je Tris-glicinski pufer (18 g Tris-a, 87,5 g glicina u 6 L vode). Kao katalizatori reakcije polimerizacije korišćeni su TEMED i amonijum persulfat.

Za razdvajanje je korišćena vertikalna elektroforetska jedinica tipa Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Biosciences, Velika Britanija), povezana sa izvorom napona MacroDrive (Consort, Belgija). Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu uree izvedena je pod sledećim uslovima:

$I_{const.} = 60 \text{ mA} / U_{max.} = 300 \text{ V} / t = 12^\circ\text{C}, t \sim 3 \text{ h}$

Bojenje gelova je vršeno sa 0,23% rastvorom Coomassie Blue R-250, koji je istovremeno sadržao 3,9% TCA, 6% sirćetne kiseline i 17% metanola, u toku 90 min. Obezbojavanje gelova je vršeno u rastvoru 18% etanola i 8% sirćetne kiseline. Gelovi su skenirani na skeneru Bear Paw 2448TA+ (Mustek, Nemačka) i relativna kvantifikacija frakcija kazeina je vršena pomoću kompjuterskog programa GelQuant.NET (Biochem Lab Solutions).

4.4.6 Mikrostruktura sireva

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena kako bi se ispitala mikrostruktura sireva. Uzorci sireva su pripremani sečenjem na veličinu 1 x 1 x 10 mm i fiksiranjem sa 2,8 % rastvorom glutaraldehida u fosfatnom puferu (pH 6,00 - 0,05 mol/dm³ natrijum fosfata) u trajanju od 48 h na temperaturi od 7°C. Potom su uzorci dehidrirani potapanjem u rastuće koncentracije etanola u trajanju od 1 čas za svaku koncentraciju. Posle dehidratacije, uzorci su odmašćeni pomoću hloroforma. Ovako pripremljeni uzorci su sušeni pomoću tečnog ugljenik(IV)oksida u uređaju CPD 030 „Critical Point Dryer“ (BAL-TEC, Nemačka). Nakon sušenja izvršeno je prevlačenje uzoraka zlatom pomoću uređaja SCD 005 „sputter coater“ (BAL-TEC, Nemačka). Prevlačenje uzoraka slojem zlata je vršeno u trajanju od 100 s, pri jačini struje od 30 mA. Mikroskopiranje uzoraka vršeno je elektronskim mikroskopom JEOL JSM-6390 LV (SAD) pri naponu od 10 kV, sa uvećanjima od 1.000, 2.000, 5.000 i 10.000 puta.

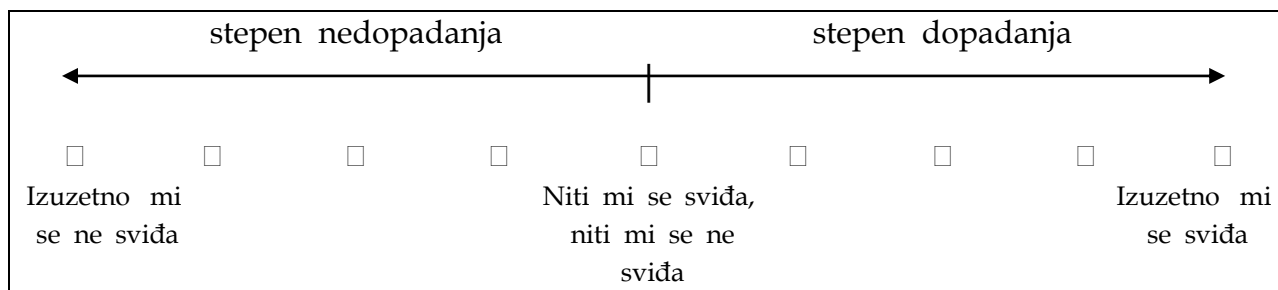
4.4.7 Senzorna analiza sireva

Senzorna analiza ispitivanih sireva obuhvatila je: testiranje potrošača i ocenjivanje kvaliteta 14-og i 56-og dana zrenja, a realizovana je u Laboratoriji za senzorno ispitivanje namirnica na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Analizirani su sledeći uzorci:

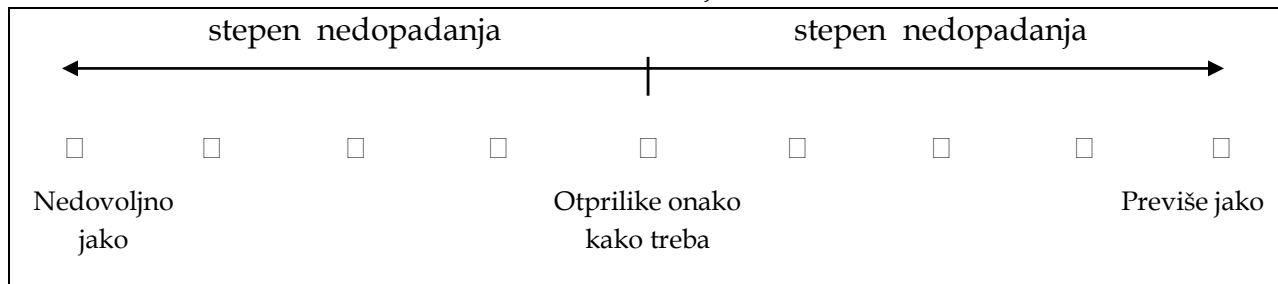
- A - kontrolni sir nakon 14 dana zrenja
- B - kontrolni sir nakon 56 dana zrenja
- C - sir od odmrznutog mleka nakon 14 dana zrenja
- D - sir od odmrznutog mleka nakon 56 dana zrenja

Senzorno testiranje potrošača u pogledu prihvatljivosti sireva izvršilo je 40 potrošača, pri čemu je svaka testirana osoba ocenila svaku ispitivanu varijantu sira. Ocenjivački list se sastojao od dve grupe pitanja, u okviru kojih su korišćeni i različiti tipovi skala za merenje prihvatljivosti. U okviru prve grupe pitanja od ispitanika je

traženo da ocene: (1) stepen ukupne prihvatljivosti proizvoda (kao celine), (2) stepen prihvatljivosti mirisa (3) stepen prihvatljivosti ukusa i (4) stepen prihvatljivosti teksture odnosno konzistencije, primenom hedonske skale od 9 podeoka (Slika 10). Centralna vrednost hedonske skale se odnosi na indiferentan stav potrošača prema proizvodu (“niti mi se dopada niti mi se ne dopada”). Od ove vrednosti u desnu stranu raste stepen dopadanja, a u levu stepen nedopadanja. Za sve ocene koje su imale vrednost 6 ili više, smatrano je da je potrošač ocenio karakteristiku kao prihvatljivu (Lawless i Heymann, 2010; Meilgaard *i sar.*, 1999).



Slika 10. Hedonska skala korišćena za ispitivanje stepena prihvatljivosti odabranih senzornih svojstava



Slika 11. Skala “upravo onako kako bi trebalo da bude”

U okviru druge grupe pitanja od ispitanika je traženo da ocene: (1) intenzitet boje (2) intenzitet kiselog ukusa, (3) intenzitet slanog ukusa, (4) intenzitet ukupne jačine ukusa, (5) tvrdoću i (6) masnoću sireva, primenom skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” koja se takođe sastojala od 9 podeoka (Slika 11). Centralna vrednost skale “upravo onako kako bi trebalo da bude” se odnosi na optimalni nivo intenziteta ispitivanog svojstva (“kako treba da bude”), onako kako ga potrošač doživljava kao prihvatljivog, dok prema desnoj i levoj strani raste stepen nedopadanja zbog jače i

slabije izraženog svojstva, redosledno (Rothman i Parker, 2009). Naime, kod intenziteta boje leva strana skale se odnosila na „previše svetlo“ a desna na „previše tamno“; kod intenziteta kiselog ukusa leva strana skale se odnosila na “nedovoljno kiselo”, a desna na “previše kiselo”; kod intenziteta slanog ukusa leva strana se odnosila na “nedovoljno slano”, a desna na “previše slano”; kod tvrdoće sira, leva strana se odnosila na “previše

Tabela 3. Primer ankete popunjavane od strane potrošača

Pol:	<input type="checkbox"/> muški	<input type="checkbox"/> ženski	
1. Da li konzumirate sireve?			
<input type="checkbox"/> Često	<input type="checkbox"/> Povremeno	<input type="checkbox"/> Retko	<input type="checkbox"/> Nikada
2. Koji tip sira najčešće kupujete/konzumirate? (možete zaokružiti i više odgovora):			
<input type="checkbox"/> Tvrdi sirevi (npr. Parmezan, Pekarino i sl.) <input type="checkbox"/> Polutvrdi sirevi (npr. Edamer, Trapist, Gauda, i sl.) <input type="checkbox"/> Sirevi sa belim/plavim plesnima (npr. Kamember, Bri, Gorgonzola, Rokfor i sl.) <input type="checkbox"/> Sirevi sa biljnim dodacima (npr. mirođija, biber, bosiljak i sl.) <input type="checkbox"/> Beli sirevi (npr. Kriška, Feta, Švapski i sl.) <input type="checkbox"/> Topljeni sirevi (npr. Zdenka, sendvič sir) <input type="checkbox"/> Sirni namazi (npr. krem sir, “a la kajmak” i sl.)			
3. Da li konzumirate sireve od kozjeg mleka?			
<input type="checkbox"/> Često	<input type="checkbox"/> Povremeno	<input type="checkbox"/> Retko	<input type="checkbox"/> Nikada
4. Rangirajte ograničavajuće faktore pri kupovini/konzumiranju kozjih sireva (1-najbitniji faktor; 5- najmanje bitan faktor):			
<input type="checkbox"/> Specifičan ukus/miris <input type="checkbox"/> Visoka cena <input type="checkbox"/> Slaba ponuda kozjih sireva na tržištu <input type="checkbox"/> Nemam naviku da konzumiram kozje sireve			
5. Razlozi zbog kojih kupujete ili biste kupili kozji sir (1-najbitniji razlog; 5- najmanje bitan razlog):			
<input type="checkbox"/> Zato što je u trendu <input type="checkbox"/> Volim da probam nove ukuse <input type="checkbox"/> Zato što ima pozitivne zdravstvene efekte <input type="checkbox"/> Volim kozje sireve			

Tabela 4. Uputstvo za senzornu ocenu kvaliteta kozjih belih sireva u salamuri

Grupa svojstava	Opis nivoa kvaliteta / mana
Izgled (Vizuelni utisci)	<p>Kozji beli sir u salamuri je proizvod ujednačeno bele boje, glatkog preseka, sa mogućom pojavom malog broja šupljika nepravilnog oblika veličine 1-2 mm (tehnološke šupljike).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kriške oštećene i nepravilnih dimenzija (oduzeti max 2) - Šupljike neodgovarajuće veličine ili u velikom broju (oduzeti max 3) - Prisustvo pukotina na preseku (oduzeti max 3) - Izrazito reljefasta površina preseka (nije ravna i glatka) (oduzeti max 2) - Neujednačena boja (oduzeti max 1,5)
Miris Ortonazalno (Olfaktorni utisci)	<p>Kozji beli sir u salamuri bi trebalo da ima mlečno-kiseo miris, sa svojstvenim mirisom kozjeg mleka.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Oštar miris (paleći osećaj u nosnoj sluzokoži) (oduzeti max 4,5) - Miris neke netipične kiseline (npr. sirćetna, buterna) (oduzeti max 3) - Miris na kvasce i/ili stran, netipičan miris, neprijatan miris (npr. na neku od životinjskih masti, na karton i sl.) (oduzeti max 4,5) - Previše izražen miris kozjeg mleka (podseća na vosak) (oduzeti max 3)
Tekstura Oralno (Palpatorni utisci)	<p>Proizvod bi trebalo da je srednje čvrste i povezane teksture.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Previše izražena zrnasta tekstura (oduzeti max 1,5) - Proizvod je izraženo krt/lomljiv (oduzeti max 3) - Proizvod je ili suviše mekan ili suviše tvrd (oduzeti max 3) - Proizvod je izrazito suve ili brašnjave teksture (oduzeti max 2)
Ukus (Gustativni utisci)	<p>Kozji beli sir u salamuri bi trebalo da ima prijatan, mlečno kiseo, umereno slan ukus, sa jasno izraženim ukusom na kozje mleko</p> <ul style="list-style-type: none"> - Previše izražena slanost (oduzeti max 2) - Previše izražena kiselost (oduzeti max 2) - Prisustvo arome netipične kiseline (npr. sirćetna, buterna) (oduzeti max 3) - Ukus na kvasce, loj, karton, metal, užeglo i sl. (oduzeti max 4,5) - Prisustvo gorčine i oporosti (oduzeti max 4) - Previše izražen ukus kozjeg mleka (podseća na vosak) (oduzeti max 3)

meko", a desna na "previše tvrdo"; kod ukupne jačine ukusa, leva strana odnosila se na "nedovoljno jak ukus", a desna na "previše jak ukus", dok se za stepen masnoće sira leva strana odnosila na "nedovoljno mastan", a desna na "previše mastan" sir (Miloradović, 2015). Potrošači su pored pomenutih ocenjivanja popunjavali i anketu o konzumiranju sireva koja je prikazana u Tabeli 3.

Senzorno ispitivanje kvaliteta sireva vršeno je primenom korigovanog petobalnog bod sistema (Radovanović i Popov-Raljić, 2001), u okviru kojeg je ukupan senzorni kvalitet ocenjivan preko sledećih odabranih grupa senzornih svojstava: izgled, miris, ukus i tekstura. Stručna komisija sastojala se od 5 članova. Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 0 do 5 sa mogućnošću davanja četvrtine bodova (0,25; 0,5; 0,75; 1,25; 1,5; 1,75...). Nivoi kvaliteta su definisani kao: „odličan kvalitet“ sa ocenama od 4,5 do 5, vrlo dobar kvalitet sa ocenama od 3,5 do 4,5, zadovoljavajući kvalitet sa ocenama od 2,5 do 3,5 i nezadovoljavajući kvalitet sa ocenama ispod 2,5. Korišćeno je takođe i uputstvo dato u Tabeli 4. Obzirom da reprezentativna svojstva nemaju jednak uticaj na ukupni kvalitet, za svako odabrano svojstvo kvaliteta određen je koeficijent važnosti (KV) pomoću kojeg je vršena korekcija (množenjem) date ocene.

Ispitivani parametri kvaliteta sa određenim koeficijentima važnosti su obuhvatili sledeće: izgled-3, miris-4, tekstura-6, ukus-7. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na ukupan kvalitet, a izbalansirani tako da njihov zbir iznosi 20. Sabiranjem pojedinačnih korigovanih ocena dobijen je jedinstven kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet i koji se izražava kao "procenat od maksimalno mogućeg kvaliteta". Deljenjem ove vrednosti sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobijena je ponderisana srednja ocena koja takođe izražava ukupni senzorni kvalitet sira.

Senzorno testiranje potrošača i senzorno ocenjivanje kvaliteta je izvedeno sa jednim ponavljanjem.

4.4.8 Statistička obrada podataka

Dvofaktorijalna analiza varijanse je korišćena kako bi se ispitaio uticaj smrzavanja i perioda zrenja na fizičko-hemijske karakteristike (MuSM, VuBMS, PuSM, udeo soli, pH), teksturalne karakteristike (čvrstoća, elastičnost, kohezivnost, žvackljivost, lomljivost, nivo relaksacije i brzina relaksacije) i proteolizu (procenat rezidualnog α_s - i β - kazeina). Obe ispitivane nezavisne promenljive bile su sa fiksnim nivoima faktora. Poređenje aritmetičkih sredina zavisnih promenljivih računato je Duncan-ovim testom u slučajevima gde je uticaj faktora bio statistički značajan. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$. Pearson-ovi koeficijenti korelacije su računati između pomenutih fizičko-hemijskih i teksturalnih svojstava. Koeficijenti determinacije (R^2) su računati kako bi se odredilo poklapanje eksperimentalnih krivih, dobijenih testom relaksacije naprezanja, sa Pelegovim modelom.

Podaci senzornog testiranja potrošača primenom hedonske skale su obrađeni primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), za boju, miris, ukus, teksturu i ukupnu prihvatljivost, gde su ispitivani efekti bili vrsta proizvoda i pol potrošača. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocena ispitivanih proizvoda primenjen je Tukey HSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Podaci senzornog testiranja potrošača dobijeni primenom skale "upravo onako kako bi trebalo da bude" najpre su prikazani u vidu distribucije učestalosti ocena. U ovom delu analize podataka izvršena je transformacija originalnih ocena iz skale od 9 podeoka u skalu sa 5 podeoka. Drugim rečima, originalne ocene su raspoređene u pet novih podgrupa. Ocene 4, 5 i 6 svrstane su grupu "kako treba", ocene 2 i 3 u grupu "umereno odstupa (-)", ocene 7 i 8 u grupu "umereno odstupa (+)", dok su ocene 1 i 9 činile grupe "izrazito odstupa (-)" i "izrazito odstupa (+), redosledno" (Tomić, 2016). Ukoliko je više od 80% potrošača za određeno svojstvo dalo ocenu 4, 5 ili 6, može se smatrati da je za konkretan uzorak intenzitet tog istog svojstva prihvatljiv za potrošače (Lawless i Heymann, 2010).

Nakon toga, podaci dobijeni na osnovu skale "onako kako treba da bude" obrađeni su takođe i primenom metode "pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda" (eng. *Mean drop analysis*) (Schraidt, 2009). U okviru ove metode, pad srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda se posmatra u odnosu na ocene dobijene primenom skale "upravo onako kako bi trebalo da bude" za svako ispitivano svojstvo, gde se podaci grupišu u tri grupe: (1) grupa ocena ispod "kako treba da bude", (2) grupa ocena "kako treba da bude" i (3) grupa ocena iznad "kako treba da bude". Uzimajući u obzir da je skala bila relativno osetljiva, sa 9 podeoka (od 1 do 9), u grupu ocena "kako treba da bude" svrstane su originalne ocene "4", "5" i "6". Ovakav pristup je opravdan uzimajući u obzir da je psihologija potrošača takva da se, prilikom probanja uzorka, po pravilu teže odlučuje za davanje ocene "kako treba da bude" iz razloga što u mislima uvek postoji neki idealan proizvod čija su svojstva na višem nivou u odnosu na proizvod koji se trenutno testira (Tomić, 2016). Grupa ocena ispod "kako treba da bude" obuhvatila je originalne ocene "1", "2" i "3", a grupa ocena iznad "kako treba da bude" ocene "7", "8" i "9". Razlika u srednjim vrednostima ocena ukupne prihvatljivosti proizvoda ispitana je primenom jednofaktorijalne ANOVA (gde su pomenute grupe ocena posmatrane kao fiksni faktor) i Tukey HSD testa. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

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

Podaci dobijeni primenom petobalnog bod sistema obrađeni su primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), gde je vrsta proizvoda odabrana kao nezavisna promenljiva sa fiksnim nivoima faktora, a ocenjivači kao promenljiva sa slučajnim nivoom faktora. U cilju poređenja srednjih vrednosti ocene kvaliteta ispitivanih proizvoda primenjen je LSD test. Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Podaci dobijeni rangiranjem ograničavajućih faktora pri kupovini/konsumiranju kozjih sireva i razloga za kupovinu kozjih sireva (anketiranje testiranih potrošača, Tabela 3, pitanja 4 i 5, redosledno) analizirani su primenom Fridmanovog testa, kao i LSD testa za poređenje suma rangova u okviru pojedinačnih parova ispitivanih proizvoda ISO8587 (2006). Zaključci su izvedeni na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,05$.

Statistička obrada podataka za celokupan opisani deo ogleda vršena je u računarskom programu SPSS verzija 21 (IBM corporation, Čikago, Illinois, SAD).

5. Rezultati i diskusija

5.1. Fizičko-hemijska svojstva mleka Sanske rase koza tokom perioda laktacije

5.1.1 Fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka

Kako bi krajnji proizvod imao stalan kvalitet u toku sezone, vrlo je važan podatak o variranju fizičko hemijskih svojstava sirovog kozjeg mleka u toku laktacije, što će i biti prikazano u ovom poglavlju.

Sva ispitivana svojstva kozjeg mleka, osim gustine, pokazala su statistički značajno variranje sa periodom laktacije (Tabela 5). Uočen je, takođe, statistički značajan efekat godine kao faktora na sva ispitivana svojstva mleka, osim na titracionu kiselost.

Tabela 5. Fizičko –hemijska svojstva mleka Sanske rase koza u periodu 2012 – 2015. godine

Svojstvo \ Period laktacije	Rani period (n=180)	Srednji period (n=180)	Kasni period (n=180)
Mlečna mast (%)	3,59±0,351 ^b	2,99±0,215 ^c	3,66±0,399 ^a
Proteini (%)	2,82±0,111 ^b	2,70±0,088 ^c	2,84±0,097 ^a
Laktoza (%)	4,23±0,160 ^b	4,05±0,123 ^c	4,27±0,150 ^a
SMBM (%)	7,70±0,299 ^b	7,38±0,222 ^c	7,76±0,264 ^a
Mineralne materije (%)	0,63±0,027 ^b	0,60±0,021 ^c	0,64±0,024 ^a
Titraciona kiselost (°SH)	5,82±0,385 ^b	5,80±0,223 ^b	6,72±0,469 ^a
pH	6,73±0,064 ^a	6,72±0,079 ^a	6,69±0,064 ^b
Gustina (gcm ⁻³)	1,0273±0,00133 ^a	1,0270±0,00064 ^a	1,0279±0,00085 ^a
Tačka mržnjenja (°C)	-0,486±0,0216 ^b	-0,462±0,0167 ^a	-0,490±0,0197 ^c

(Vrednosti u redovima obeleženi različitim slovima a, b i c se statistički značajno razlikuju na nivou značajnosti od $\alpha = 0,05$; vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija)
SMBM – Suva materija bez masti

Utvrđen je statistički značajan efekat interakcije ova dva faktora za sva posmatrana svojstva, osim pH vrednosti, ali je udeo u varijacijama bio nizak. Najveći koeficijent interklasne korelacije zabeležen je za gustinu mleka, gde je udeo efekta interakcije u varijacijama ovog svojstva bio 0,225. Sledeći najveći koeficijent interklasne

korelacije bio je za titracionu kiselost i iznosio je 0,123. Za sva ostala svojstva je udeo interakcije faktora u varijacijama bio manji od 0,10.

U srednjem periodu laktacije fizičko-hemijska svojstva, kao što su sadržaj mlečne masti, proteina, SMBM i laktoze bila su statistički značajno manja nego u ranom ili kasnom periodu laktacije. Najveća promena zabeležena je za sadržaj mlečne masti, koji je bio prosečno 16,7% i 18,3% niži od ranog i kasnog perioda laktacije, redosledno. Smanjenje u udelu proteina, SMBM i laktoze, u odnosu na rani i kasni period, je bilo manje izraženo i imalo je vrednost od 4,1% do 5,1%. Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 6, može se videti da su najniže vrednosti za udeo mlečne masti, proteina, SMBM i laktoze ustanovljene u avgustu (2,93%, 2,67%, 7,32% i 4,02% redosledno), dok su najviše vrednosti pomenutih svojstava ustanovljene u decembru (4,09%, 2,93%, 7,99% i 4,40% redosledno). Prema Goetsch *i sar.* (2011) najniže vrednosti za sadržaj mlečne masti i proteina kod kozjeg mleka utvrđene su tokom juna i jula, pri čemu su se vrednosti za ova svojstva povećavale sve do kraja laktacije. Mayer i Fiechter (2012) ustanovili su da je sadržaj suve materije, mlečne masti i proteina u kozjem mleku najniži u periodu jun - avgust, dok je najviša vrednost ovih komponenti ustanovljena na kraju laktacije, ali je kraj laktacije bio u oktobru. Važno je napomenuti da su istraživanja ovih autora rađena takođe na mleku Sanske rase koza u Austriji.

Sličan trend varijacije fizičko-hemijskih svojstava zabeležen je i u istraživanjima vezanim za kravlje mleko, pri čemu je sadržaj mlečne masti takođe bilo svojstvo sa najizraženijim varijacijama u toku sezone. Međutim, varijacija sadržaja mlečne masti kozjeg mleka zabeležena u ovom delu oglada bila je izraženija nego što su Chen *i sar.* (2014) utvrdili za kravlje mleko. Posmatrajući vrednosti pH tokom laktacije, može se uočiti da su razlike veoma male (Tabela 5), iako je utvrđena statistički značajna razlika u kasnom periodu laktacije u odnosu na rani i srednji. Najviša vrednost titracione kiselosti tokom kasnog perioda laktacije bila je 6,72°SH, a uzrokovana je visokim sadržajem proteina i mineralnih materija, što potvrđuju i istraživanja koja su sproveli McCarthy i Singh (2009).

Tabela 6. Prosečne mesečne vrednosti fizičko-hemijskih svojstava mleka Sanske rase koza tokom četiri ispitivane laktacije

Svojstvo Mesec	Mlečna mast (%)	Proteini (%)	Laktoza (%)	SMBM ¹ (%)	Mineralne materije (%)	Titraciona kiselost (°SH)	pH	Gustina (g/cm ⁻³)	Tačka mržnjenja (°C)
Mar	3,92±0,232 ^{ab}	2,90±0,069 ^a	4,33±0,094 ^{ab}	7,92±0,177 ^a	0,65±0,017 ^a	6,07±0,229 ^{bc}	6,74±0,048	1,0277±0,00050	-0,501±0,0131 ^{cd}
Apr	3,58±0,182 ^{cd}	2,81±0,098 ^{abc}	4,22±0,154 ^{bcd}	7,68±0,276 ^{abc}	0,63±0,022 ^{abc}	5,83±0,175 ^{cd}	6,73±0,042	1,0273±0,00169	-0,483±0,0182 ^{bc}
Maj	3,32±0,220 ^{def}	2,76±0,095 ^{bcd}	4,14±0,137 ^{cde}	7,54±0,258 ^{bcd}	0,62±0,023 ^{bcd}	5,63±0,062 ^d	6,72±0,033	1,0272±0,00137	-0,473±0,0184 ^{ab}
Jun	3,09±0,195 ^{fg}	2,75±0,123 ^{bcd}	4,11±0,143 ^{de}	7,50±0,298 ^{bcd}	0,61±0,025 ^{cd}	5,68±0,144 ^d	6,70±0,032	1,0272±0,00075	-0,469±0,0205 ^{ab}
Jul	2,97±0,223 ^g	2,68±0,033 ^d	4,02±0,062 ^e	7,34±0,103 ^d	0,60±0,012 ^d	5,79±0,033 ^{cd}	6,73±0,050	1,0269±0,00040	-0,461±0,0060 ^a
Avg	2,93±0,149 ^g	2,67±0,044 ^d	4,02±0,066 ^e	7,32±0,127 ^d	0,59±0,010 ^d	5,90±0,099 ^{bcd}	6,74±0,069	1,0268±0,00045	-0,458±0,0087 ^a
Sep	3,17±0,039 ^{efg}	2,72±0,064 ^{cd}	4,08±0,093 ^{de}	7,44±0,177 ^{cd}	0,61±0,018 ^{cd}	6,19±0,240 ^b	6,72±0,023	1,0272±0,00055	-0,467±0,0102 ^{ab}
Okt	3,43±0,167 ^{de}	2,83±0,064 ^{abc}	4,25±0,098 ^{abcd}	7,74±0,178 ^{abc}	0,63±0,013 ^{abc}	6,71±0,299 ^a	6,70±0,049	1,0279±0,00077	-0,487±0,0095 ^{bc}
Nov	3,81±0,159 ^{bc}	2,85±0,045 ^{ab}	4,30±0,056 ^{abc}	7,80±0,127 ^{ab}	0,64±0,014 ^{ab}	6,92±0,438 ^a	6,67±0,029	1,0280±0,00025	-0,495±0,0099 ^{cd}
Dec	4,09±0,210 ^a	2,93±0,060 ^a	4,40±0,087 ^a	7,99±0,159 ^a	0,66±0,017 ^a	6,93±0,222 ^a	6,68±0,068	1,0282±0,00033	-0,509±0,0125 ^d

¹SMBM – suva materija bez masti

Vrednosti u tabeli su date kao aritmetička sredina ± standardna devijacija

Vrednosti u kolonama označene bar jednim istim slovom se statistički značajno ne razlikuju

Kolone u kojim vrednosti nisu označene ne pokazuju statistički značajne razlike između meseci

Tačka mržnjenja mleka bila je najviša u srednjem periodu laktacije ($-0,462^{\circ}\text{C}$) kada je sadržaj proteina, laktoze i mineralnih materija bio na minimumu (Tabela 5). Henno *i sar.* (2008) su izneli slične rezultate ispitujući sezonske varijacije kravljeg mleka, dajući moguće objašnjenje da ishrana u ekstenzivnom uslovima gajenja stada dovodi do manje iskoristivosti proteina. Stado Sanskih koza gajeno je isključivo u štali, te pomenuto objašnjenje ne možemo prihvatiti u ovom slučaju. Može se pretpostaviti da je viša tačka mržnjenja u srednjem periodu laktacije posledica većeg unosa vode zbog visokih temperatura vazduha i visoke insolacije tokom tog perioda, što je u skladu sa istraživanjima koje su sproveli Bjerg *i sar.* (2005).

5.1.2 Korelacija između fizičko-hemijskih svojstava mleka Sanske rase koza i klimatskih faktora

Prema studijama koje su radili Brouček *i sar.* (2006), kao i Sharma *i sar.* (1983), ustanovljeno je da visoka temperatura vazduha ima negativan uticaj na sastav i količinu kravljeg mleka. Vrednosti klimatskih faktora merenih od marta do decembra u periodu od 2012 - 2015. godine prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Vrednosti klimatskih faktora u periodu od 2012. do 2015. godine

Klimatski faktor Meseci	Temperatura vazduha ($^{\circ}\text{C}$)	Relativna vlažnost vazduha (%)	Insolacija (h)	THI ¹
Mar	7,50±1,347	70,0±10,44	186,47±63,256	47,71±2,765
Apr	12,65±0,507	70,0±4,58	195,83±41,360	55,64±0,214
Maj	17,20±0,868	71,3±2,52	228,33±15,958	61,61±0,989
Jun	20,92±1,217	69,3±5,03	277,30±36,806	67,70±1,855
Jul	23,15±1,611	67,3±9,02	316,53±41,003	70,21±1,877
Avg	22,62±1,389	63,7±12,50	311,83±52,901	69,25±1,456
Sep	17,75±1,578	71,0±10,00	182,33±39,847	62,49±2,467
Okt	12,80±0,942	77,0±1,73	166,70±10,941	56,06±0,705
Nov	8,22±0,936	82,0±1,73	93,60±5,864	48,61±0,706
Dec	1,97±1,350	87,0±2,00	65,97±16,426	36,54±2,217

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao prosečne mesečne vrednosti ± standardna devijacija

¹THI - indeks temperature i relativne vlažnosti vazduha

Na osnovu obrade podataka dobijenih u ispitivanom periodu od četiri godine može se zaključiti da visoka temperatura vazduha takođe ima negativan uticaj i na kvalitet mleka Sanskih koza. Postoji statistički značajna negativna korelacija između osnovnih fizičko-hemijskih svojstava kozjeg mleka i temperature vazduha, kao što se može uočiti u Tabeli 8. Na sadržaj mlečne masti kozjeg mleka je najviše uticala visoka temperatura, te ima najviši koeficijent korelacije čija je vrednost -0,90. Svojstvo na koje je najmanje uticala temperatura vazduha je gustina mleka, sa koeficijentom korelacije od -0,46. Vrednost pH je jedino svojstvo koje nije u statistički značajnoj korelaciji sa temperaturom vazduha.

Tabela 8. Koeficijenti korelacije između fizičko-hemijskih svojstava kozjeg mleka i klimatskih faktora

Klimatski faktor \ Svojstvo	Temperatura vazduha	Relativna vlažnost vazduha	Insolacija	THI ¹
Mlečna mast	-0,90*	0,56*	-0,79*	-0,93*
Proteini	-0,74*	0,22	-0,51*	-0,72*
Laktoza	-0,77*	0,27	-0,57*	-0,76*
SMBM ²	-0,74*	0,22	-0,52*	-0,72*
Mineralne materije	-0,75*	0,22	-0,53*	-0,73*
Titraciona kiselost	-0,70*	0,64*	-0,76*	-0,69*
pH	0,30	-0,67*	0,41*	0,23
Gustina	-0,46*	0,07	-0,31	-0,40*
Tačka mržnjenja	0,78*	-0,29	-0,57*	-0,76*

Koeficijenti korelacije obeleženi sa * su statistički značajni na nivou značajnosti od $\alpha = 0,05$

¹THI - indeks temperature i relativne vlažnosti vazduha

²SMBM - suva materija bez masti

Prema dobijenim koeficijentima korelacije može se uočiti da je insolacija još jedan značajan klimatski faktor koji utiče na fizičko-hemijski sastav mleka. Sva ispitivana fizičko-hemijska svojstva su u statistički značajnoj korelaciji sa insolacijom (Tabela 8). Sadržaj mlečne masti ima najveći koeficijent korelacije sa insolacijom (-0,79) od svih ispitivanih fizičko-hemijskih svojstava, dok pH vrednost ima najmanji koeficijent korelacije (0,41) sa posmatranim klimatskim faktorom. Temperatura vazduha i

insolacija zajedno, kao što je već pomenuto (Bjerg *i sar.*, 2005; Chen *i sar.*, 2014), uzrokuju veći unos vode kod životinja, samim tim utičući i na fizičko-hemijski sastav mleka. Koliko je poznato u literaturi do sada nije zabeleženo istraživanje o korelaciji između insolacije i fizičko-hemijskih svojstava nijedne vrste mleka.

Iako prema istraživanju Rodriguez *i sar.* (1985) relativna vlažnost vazduha značajno utiče na glavna fizičko-hemijska svojstva kravljeg mleka, u istraživanju sprovedenom u ovoj disertaciji korelacija sa ovim klimatskim faktorom postoji samo kod sadržaja mlečne masti, pH vrednosti i titracione kiselosti, pri čemu su za sva tri pomenuta svojstva koeficijenti korelacije manji od 0,70 (Tabela 8). S obzirom na prethodne iskaze može se reći da relativna vlažnost, kao klimatski faktor, ne doprinosi varijacijama u fizičko-hemijskim svojstvima kozjeg mleka u meri u kojoj doprinose temperatura vazduha i insolacija.

Indeks temperature i relativne vlažnosti vazduha (THI) je u statistički značajnoj korelaciji sa svim ispitivanim svojstvima kozjeg mleka osim sa vrednosti pH. Slično kao i kod temperature vazduha, svojstvo koje je u najvećoj korelaciji je udeo mlečne masti sa koeficijentom korelacije od -0,90, dok je gustina u najslabijoj korelaciji sa ovim klimatskim faktorom sa koeficijentom korelacije od -0,40. Posmatrajući prosečne vrednosti THI po mesecima (Tabela 7) vidi se da vrednost ovog faktora nije prelazila 72, što predstavlja kritičnu vrednost na kojoj se pojavljuje stres izazvan toplotom kod krava (Gantner *i sar.*, 2011). U ovoj disertaciji je takođe pokazana visoka korelacija između THI i većine fizičko-hemijskih svojstava kozjeg mleka. Iz rezultata predstavljenih u poglavlju 5.1.1 se može uočiti da u srednjem periodu laktacije dolazi do smanjenja u sadržaju važnih fizičko-hemijskih parametara, posebno sadržaja mlečne masti. Iako tokom istraživanja nije postojala mogućnost da se precizno izmeri unos hrane i vode kod koza tokom ispitivane četiri godine, možemo pretpostaviti da se kod Sanskih koza stres izazvan toplotom pojavljuje na nižim vrednostima THI nego kod krava i da se kritična vrednost kreće oko 67, što je najniža prosečna vrednost zabeležena u srednjem periodu laktacije (Tabela 7).

Ranija istraživanja o kozjem mleku, koja su sprovedi Mayer i Fiechter (2012) u Austriji, pokazuju da fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka imaju više vrednosti nego u istraživanju obavljenom u ovoj disertaciji. S obzirom da je stado na kome su vršena ispitivanja uvezeno iz Austrije, može se pretpostaviti da su Sanske koze veoma osetljive i podložne stresu koji se javlja u toplim mesecima tokom godine, odnosno da svakako postoji razlika u klimatskim uslovima u Austriji i Srbiji.

Smanjenje sadržaja mlečne masti, proteina, SMBM i laktoze tokom srednjeg perioda laktacije može se objasniti utvrđenom visokom korelacijom između pomenutih komponenti i posmatranih klimatskih faktora, posebno temperature vazduha, insolacije i THI. Variranjem fizičko-hemijskog sastava dolazi i do variranja u tehnološkim svojstvima mleka i ukupnom kvalitetu krajnjih proizvoda. Zbog toga, veoma je važno poznavanje variranja sastava mleka, kako bi se razlike korigovale i umanjio njihov uticaj na sastav i kvalitet krajnjih proizvoda. Smrzavanje mleka može biti jedan od načina da se variranje sastava kozjeg mleka ublaži, i da se kvalitet kozjih proizvoda održava konstantnim u toku godine.

5.2. Uticaj smrzavanja na parametre sirišne koagulacije mleka Sanske rase koza

5.2.1 Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka i promena pH vrednosti tokom skladištenja u smrznutom stanju

Prema istraživanju koje je sproveo Park (2006), kao i prema rezultatima predstavljenim u poglavlju 5.1 ove disertacije, poznato je da fizičko-hemijski sastav kozjeg mleka u istom stadu može varirati u toku laktacije u zavisnosti od ishrane, načina držanja ili klimatskih uslova. Takođe je u poglavlju 5.1 pokazano da je udeo mlečne masti svojstvo koje je najpodložnije varijacijama. Sastav mleka korišćenog u ovom delu rada prikazan je u Tabeli 9. Vrednosti dobijene ispitivanjem parametara kvaliteta sirovog kozjeg mleka su uporediva sa rezultatima koje su dobili Miloradovic i

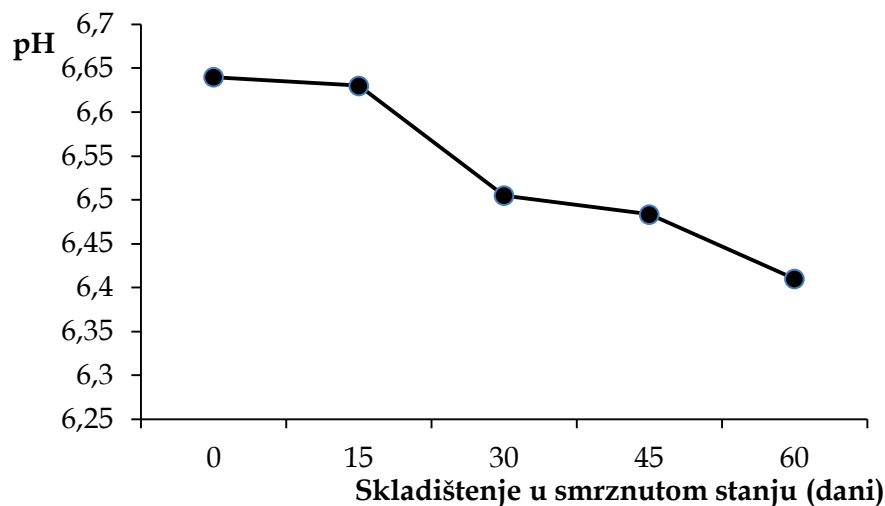
sar. (2015), s obzirom da su istraživanja vršena na istom stadu koza, osim što je udeo u mlečne masti u ovom istraživanju bio manji, usled različitog perioda ispitivanja.

Tabela 9. Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka

Svojstvo	Vrednost
Mlečna mast (%)	2,77±0,21
Proteini (%)	2,68±0,13
Suva materija (%)	10,35±0,36
pH	6,64±0,03

(vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija)

Na Slici 12 je prikazan trend promene pH vrednosti tokom skladištenja kozjeg mleka u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana.



Slika 12. Vrednost pH tokom skladištenja smrznutog kozjeg mleka na -27°C

Vreme skladištenja u smrznutom stanju je imalo statistički značajan uticaj na pH vrednost (nivo značajnosti od $\alpha=0,05$). Poređenjem srednjih vrednosti utvrđeno je da se pH vrednost posle 60 dana skladištenja statistički značajno razlikuje od vrednosti koje su dobijene pre smrzavanja (0 dan) i nakon skladištenja od 15 i 30 dana. Usled toga, može se reći da se statistički značajno smanjenje zapaža u drugoj fazi, odnosno tek na kraju skladištenja od 60 dana. U ranijim istraživanjima je utvrđeno da se tokom smrzavanja mleka može dogoditi značajna precipitacija kalcijumfosfata (Goff i Sahagian, 1996), što bi moglo dovesti do snižavanja pH vrednosti, što nije u potpunosti

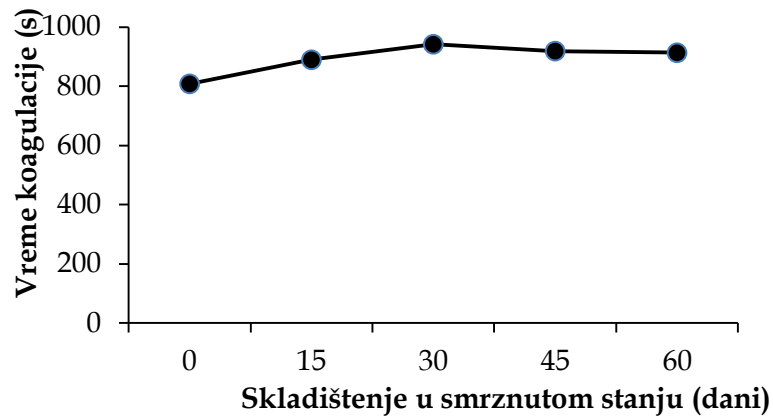
u skladu sa rezultatima ovog dela rada. Naime, precipitacija kalcijum fosfata se događa tokom smrzavanja mleka, što bi značilo da bi se već 15-og dana trebalo pojaviti statistički značajno sniženje pH vrednosti, a to nije slučaj. Clark i Sherbon (2000) su utvrdili da frakcija β -kazeina ima najveći udeo u kazeinu kozjeg mleka, dok α_{s1} -kazeina ima jako malo ili ga nema uopšte. Na osnovu toga možemo razmotriti sledeće činjenice:

- β -kazein je slabo fosforilovan (Salaün *i sar.*, 2005), pa ima manje mesta za vezivanje kalcijumovih jona;
- povećavanje jonske jačine koje se dešava tokom smrzavanja smanjuje vezivanje kalcijumovih jona za β -kazein;
- afinitet β -kazeina za prvo vezivanje kalcijumovih jona je slično kao i kod α_{s1} -kazeina, ali je afinitet za sledeće vezivanje drastično manji od afiniteta koji ima α_{s1} -kazein (Parker i Dalgleish, 1981; Ribeiro i Ribeiro, 2010).

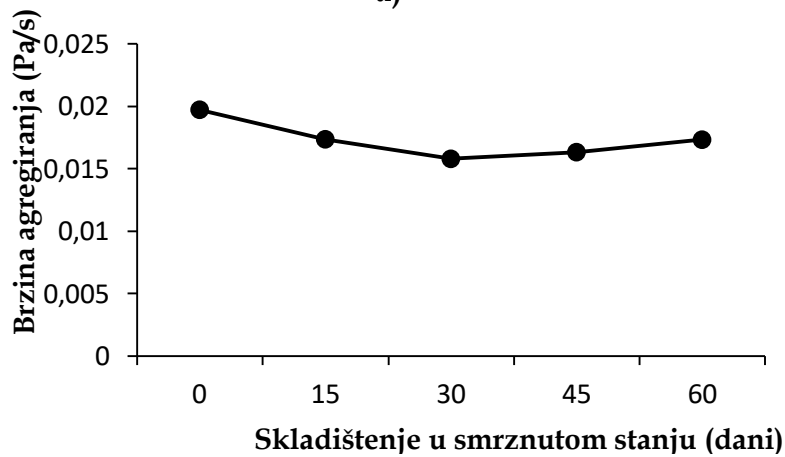
Na osnovu iznetih činjenica može se reći da, iako precipitacija kalcijum fosfata postoji, ona je usporena tokom smrzavanja i skladištenja kozjeg mleka u smrznutom stanju, stoga je to i najverovatniji razlog zbog kojeg se pH snižava tek na kraju skladištenja od 60 dana.

5.2.2 Reološka merenja

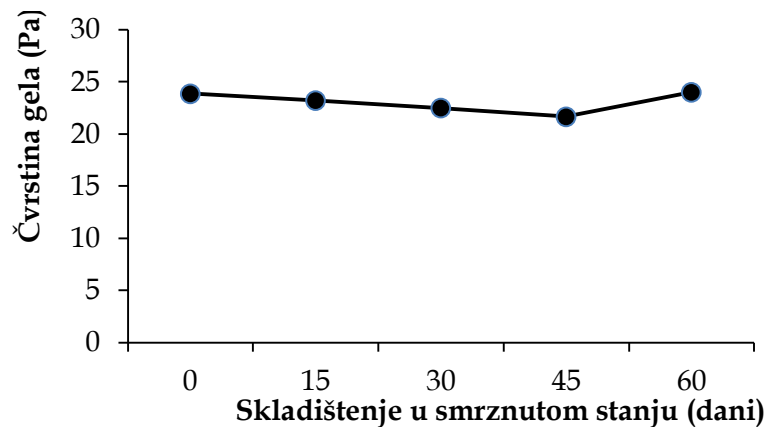
Vreme koagulacije (CT), brzina agregiranja (AR) i čvrstina gela (CF) su parametri koji karakterišu proces koagulacije, tačnije njegovu fizičko-hemijsku fazu. Parametri CT i AR su veoma korisni za predviđanje gotovosti sirnog gela. Čvrstina gela (CF) je relevantan parametar koagulacije, s obzirom da je u korelaciji sa randmanom i ukupnim kvalitetom proizvedenog sira (Dimassi *i sar.*, 2005). Na Slici 13 su predstavljeni pomenuti reološki parametri u zavisnosti od vremena skladištenja kozjeg mleka u smrznutom stanju. Rezultati jednofaktorskih analiza varijanse pokazali su da vreme skladištenja nema statistički značajan uticaj na ova tri parametra koagulacije.



a)



b)



c)

Slika 13. Reološki parametri u zavisnosti od vremena skladištenja kozjeg mleka u smrznutom stanju:

a) - vreme koagulacije; b) - brzina agregiranja; c) - čvrstina gela

Ovi reološki parametri se već decenijama koriste za kalkulaciju i predviđanje efikasnosti proces proizvodnje sira (Alloggio *i sar.*, 2000; Clark i Sherbon, 2000; Mishra *i*

sar., 2005; Ustunol i Brown, 1985; Tan *i sar.*, 2007). Prema Alloggio *i sar.* (2000) vrednosti parametara koagulacije mogu biti neočekivane i konfliktne posmatrajući različite rase koza, što može biti posledica različitog mineralnog sastava i sastava proteina, uključujući i serum proteine (Jeness, 1980; O'Connor i Fox, 1977; Remeuf *i sar.*, 1989; Storry *i sar.*, 1983). Uzimajući u obzir rezultate pomenutih ranijih istraživanja, kao i istraživanja iz ovog dela disertacije, može se tvrditi da parametri koagulacije mleka Sanske rase koza neće biti izmenjeni posle skladištenje u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana, ali ne možemo sa sigurnošću ovu tvrdnju preneti i na mleko koza drugih rasa. Ova tvrdnja takođe može implicirati da će i ukupan kvalitet sira proizvedenog od mleka koje je bilo smrznuto ostati u velikoj meri nepromenjen, o čemu će biti reči u narednim poglavljima ove disertacije.

5.3. Svojstva sireva od kozjeg mleka i gruša skladištenih 7 dana u smrznutom stanju

5.3.1 Fizičko-hemijski sastav sirovog kozjeg mleka i sireva

U ovom delu oglada ispitivan je fizičko-hemijski sastav uzoraka od svake partije kozjeg mleka koje je korišćeno za izradu sireva. Proizvedenim sirevima je takođe ispitivan fizičko-hemijski sastav u cilju pronalaženja eventualnih razlika. Svojstva sirovog kozjeg mleka u ovom delu oglada prikazana su u Tabeli 10. Kao i u poglavlju 5.2, svojstva su uporediva sa ranijim istraživanjima, koja su se bavila mlekom Sanske rase koza (Miloradović, 2015; Miloradovic *i sar.*, 2015; Park, 2006).

Tabela 10. Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka

Svojstvo	Vrednost
Mlečna mast (%)	3,45±0,07
Proteini (%)	2,72±0,18
Suve materija (%)	11,31±0,86
Titraciona kiselost (°SH)	6,15±0,21
pH	6,55±0,03

Vrednosti u tabeli su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Takođe, ove vrednosti su u skladu sa istraživanjem o varijacijama fizičko-hemijskih svojstava kozjeg mleka Sanske rase, koje je opisano u poglavlju 5.1.

Iz Tabele 11 se može videti da se prema sadržaju MuSM svi sirevi mogu klasifikovati kao punomasni (>45% MuSM). Posmatrajući vrednosti za VuBMS, dva eksperimentalna sira (SS i SV) se mogu klasifikovati kao polutvrđi, dok je vrednost VuBMS kod ostalih varijanti sireva odgovarala kategoriji mekih sireva (CAC, 2013). Kontrolni sir (C) se nije statistički značajno razlikovao (na nivou značajnosti $\alpha=0,05$)

Tabela 11. Fizičko-hemijska svojstva sireva

Svojstvo Varijanta sira	pH	MuSM (%)	PuSM (%)	VuBMS (%)
C	4,70±0,04 ^a	54,25±2,87 ^a	30,77±1,81 ^a	75,17±4,17 ^a
F	4,54±0,03 ^b	50,88±1,93 ^{b,c}	34,05±1,07 ^b	71,97±3,79 ^b
SS	4,83±0,03 ^c	51,00±1,83 ^c	33,37±2,01 ^b	63,55±3,52 ^c
SV	4,87±0,02 ^c	49,44±2,04 ^b	35,06±1,71 ^c	64,07±2,91 ^c
PS	4,76±0,05 ^a	55,22±1,56 ^a	31,26±1,32 ^a	70,00±3,13 ^d
PV	4,85±0,05 ^c	54,38±3,20 ^a	31,34±2,63 ^a	68,57±3,71 ^e

Vrednosti u tabeli su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Vrednosti u kolonama koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju
MuSM–mast u suvoj materiji, **PuSM**–proteini u suvoj materiji, **VuBMS**–voda u bezmasnoj materiji sira
Varijanta sira: C – kontrolni sir; F – sir od odmrznutog mleka; **SS** – sir od samopresovanog odmrznutog gruša, dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom; **SV** – sir od samopresovanog odmrznutog gruša, dogrevanog indirektnim kontaktom sa vodom; **PS** – sir od presovanog odmrznutog gruša, dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom; **PV** – sir od presovanog odmrznutog gruša, dogrevanog indirektnim kontaktom sa vodom

od varijanti sireva PS i PV kada je u pitanju sadržaj proteina i masti u suvoj materiji, a sa varijantom sira PS se nije razlikovao ni u pH vrednosti. Prema svojstvu VuBMS kontrolni sir se statistički značajno razlikovao od ostalih sireva na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$. Svojstvo VuBMS je parametar koji se koristi za klasifikaciju sireva prema njihovoj teksturi. Variranje vrednosti ovog svojstva, koje predstavlja odnos između vode i proteina, dovodi do promena u teksturalnim svojstvima sireva (Tunick *i sar.*, 1993). Svi eksperimentalni sirevi imali su statistički značajno manji sadržaj vode u

bezmasnoj materiji sira od kontrolnog sira. U ranijim istraživanjima je ustanovljeno da nakon smrzavanja i odmrzavanja, tekstura sireva postaje mrvljiva i brašnjava (Goff i Sahagian, 1996). Takva pojava se može objasniti povećanjem neuređene strukture proteina u smrznutom siru, naročito u sporije smrzanim uzorcima, što rezultuje višim stepenom narušavanja mikrostrukture (Fontecha *i sar.*, 1993). Takođe, Van Hekken *i sar.* (2005) su zaključili da se kod sireva koji su odmrznuti odmah nakon smrzavanja dogodila najveća promena u reološkim svojstvima, te su predložili da mora postojati minimalni period skladištenja nakon smrzavanja, kako bi se dozvolilo proteinskoj strukturi da se prilagodi na kristale leda unutar sirnog matriksa, kao i da se prilagodi na efekte povećanja koncentracije supstanci u vodenoj fazi usled smrzavanja koje su opisane u poglavlju 2.5. Prema rezultatima ovog dela rada može se postaviti hipoteza da usled povećanja neuređene proteinske strukture u siru, a samim tim i oštećenja na proteinskom matriksu (mikrostrukturi) dolazi do pojave veće količine izdvojene vode tokom otapanja gruša, što je i uzrok manjeg sadržaja VuBMS sireva dobijenih od odmrznutog gruša. Zagrevanje gruša u direktnom kontaktu sa surutkom (varijante SS i PS) vršeno je radi rehidriranja proteina kako bi se sprečio preveliki gubitak vode prilikom otapanja. Može se primetiti da je ovakav načina dogrevanja odmrznutog gruša imao uticaja na gruš koji je bio smrznut u kasnijoj fazi presovanja (varijanta PS), ali ne i na gruš smrznut posle samopresovanja (varijanta SS). Varijanta PS je imala statistički značajno veći sadržaj VuBMS od varijante PV koja je dobijena od gruša smrznutog u istoj fazi presovanja, ali je posle odmrzavanja dogrevana indirektnim kontaktom sa vodom. Ipak, vrednosti VuBMS kod varijante PS su statistički značajno niže i od kontrolne varijante sira (C) i od varijante koja je dobijana od odmrznutog mleka (F). Prema Alichanidis *i sar.* (1981), predloženo je da se niže vrednosti VuBMS kod sireva u salamuri pravljenih od odmrznutog gruša kompenzuju dodavanjem veće količine salamure u finalno pakovanje proizvoda.

Kod varijanti sireva F, SS i SV utvrđen je statistički značajno niži sadržaj MuSM i statistički značajno veći sadržaj PuSM u odnosu na kontrolni sir. Za ove varijante sireva

može se reći da se smrzavanje odvijalo u ranijoj fazi tehnološkog procesa proizvodnje: F – smrznuo mleko, SS i SV – smrznut gruša koji je samopresovan. Ovo je rezultovalo većim udelom vode prilikom smrzavanja, a nakon odmrzavanja i nastavka procesa proizvodnje još uvek postoji presovanje kao proces gde se izdvaja značajna količina surutke. S obzirom da tokom smrzavanja dolazi do promena na proteinima, matriks koji se stvara je neuređen pa se i masne globule teže zadržavaju u takvom matriksu. Krajnja posledica pomenutih pojava je da kod ove tri varijante sira dolazi do većeg gubitka mlečne masti kroz izdvojenu surutku.

Kao što je pomenuto, značajna precipitacija kalcijumfosfata se odvija tokom smrzavanja mleka (Goff i Sahagian, 1996), a formiranje nerastvorljivog kalcijumfosfata dovodi do pomeranja pufernog kapaciteta ka nižim pH vrednostima (Salaün *i sar.*, 2005). Značajna posledica ovih pojava je da sir dobijen od odmrznutog mleka (F) ima najnižu pH vrednost.

Prema Alichanidis *i sar.* (1981), sirevi u salamuri dobijeni od odmrznutog gruša imaju pH vrednost iznad 5,00, što se može pripisati odumiranju starterskih mikroorganizama tokom smrzavanja i skladištenja gruša u smrznutom stanju. Eksperimentalni sirevi dobijeni od odmrznutog gruša su imali pH vrednosti niže od 5,00, a uzrok tome je kratkotrajno skladištenje u smrznutom stanju u trajanju od 7 dana, jer značajno odumiranje starterskih mikroorganizama nastaje nakon perioda od 2 meseca skladištenja gruša u smrznutom stanju (Alichanidis *i sar.*, 1981).

5.3.2 Teksturalna svojstva sireva

Tokom procesa smrzavanja, formiranje kristala leda dovodi do lokalne dehidratisanosti proteina, što dovodi do oštećenja u strukturi proteina, kao što je već pomenuto u poglavljima 2.4 i 2.5. Ova oštećenja u strukturi dalje omogućavaju kontakt između manjih masnih globula, što dovodi do stvaranja granula masti. Proteini postaju kompaktniji i stvaraju se disulfidni mostovi između lanaca proteina. Na taj način se „zarobljavaju“ novoformirane granule masti. Nakon odmrzavanja, proteinima se

smanjuje kapacitet vezivanja vode i na taj način dobija se čvršća i elastičnija tekstura sira, sa manje slobodnih granula masti. Tokom skladištenja u smrznutom stanju prečnik kristala leda se uvećava zbog pojave rekristalizacije (poglavlje 2.4). Ova pojava uzrokuje otežanu migraciju vode na granici između masti i kazeina, pa se povećava efekat trenja što dalje dovodi do pojave čvršće teksture (Alvarenga *i sar.*, 2011; Diefes *i sar.*, 1993). Opisani mehanizam može biti objašnjenje za veći gubitak vode kod sireva proizvedenih od odmrznutog gruša, kao i za veće vrednosti teksturalnih svojstava prikazanih u Tabeli 12.

Tabela 12. Teksturalna svojstva sireva

Teksturalno svojstvo Varijanta sira	Čvrstoća pri sečenju (g)	Čvrstoća pri lomljenju (g)	Krtost (mm)	Čvrstoća pri kompresiji (g)
C	232,95±6,20 ^a	96,79±10,48 ^a	5,62±1,57 ^a	1644,26±30,21 ^a
F	360,47±24,90 ^b	202,69±19,03 ^b	5,18±1,09 ^a	2011,76±120,72 ^b
SS	644,07±19,26 ^c	434,24±26,46 ^c	10,00±0,00 ^b	4028,63±314,18 ^c
SV	695,54±9,91 ^c	598,91±50,36 ^d	10,00±0,00 ^b	5530,89±138,08 ^d
PS	547,55±50,49 ^d	295,17±35,06 ^e	8,62±0,70 ^c	3229,27±253,88 ^e
PV	469,45±27,31 ^e	359,83±43,33 ^f	9,78±0,49 ^{b,c}	2803,65±112,68 ^f

Vrednosti u tabeli su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Vrednosti u kolonama koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Varijanta sira: C - kontrolni sir; F - sir od odmrznutog mleka; SS - sir od samopresovanog odmrznutog gruša, dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom; SV - sir od samopresovanog odmrznutog gruša, dogrevanog indirektnim kontaktom sa vodom; PS - sir od presovanog odmrznutog gruša, dogrevanog direktnim kontaktom sa surutkom; PV - sir od presovanog odmrznutog gruša, dogrevanog indirektnim kontaktom sa surutkom; **Teksturalna svojstva:** Čvrstoća pri sečenju - **CFR**; Čvrstoća pri lomljenju - **FF**; Krtost - **B**; Čvrstoća pri kompresiji - **HC**

Varijante sira SS i SV imale su statistički značajno više vrednosti teksturalnih svojstava od svih ispitivanih varijanti na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$. Kontrolna varijanta sira (C) je imala statistički značajno različite vrednosti svih teksturalnih svojstava u odnosu na eksperimentalne sireve, osim u slučaju svojstva B (krtost) gde se vrednost kontrolne varijante nije razlikovala u odnosu na varijantu F.

Varijante sireva SS i SV imale su maksimalne vrednosti za krtost ($B=10$ mm), što znači da tokom analize nije došlo do lomljenja uzoraka. Druge dve varijante proizvedene od smrznutog gruša PS i PV su takođe imale visoke vrednosti ovog svojstva ($B=8,62$ mm i $B=9,78$ mm, redosledno). Ovi rezultati ukazuju da struktura proteinskog matriksa kod odmrznutog gruša uzrokuje manju krtost i veću elastičnost proizvedenih sireva.

Autori koji su ispitivali teksturu ovčijih sireva proizvedenih od odmrznutog gruša, kao i teksturu odmrznutih sireva (Tejada *i sar.*, 2000; Alichanidis *i sar.*, 1981; Sendra *i sar.*, 1999), utvrdili su mrvljivu, brašnjavu i mekšu teksturu eksperimentalnih sireva. Nasuprot tome, u ovom delu disertacije vrednosti teksturalnih svojstava eksperimentalnih sireva su bile statistički značajno veće ($p<0,05$) od vrednosti izmerenih za kontrolni sir, što ukazuje da se eksperimentalni sirevi mogu opisati kao čvršći i elastičniji u poređenju sa kontrolnim sirom. Važno je, takođe, napomenuti da su pomenuti autori u svojim istraživanjima teksturu ispitivali senzorno, a ne instrumentalno. Gruševi koji su smrznuti odmah posle faze samopresovanja imali su statistički značajno ($p<0,05$) čvršću teksturu sireva od gruševa koji su smrznuti posle prve faze presovanja. Gruševi smrznuti posle faze samopresovanja su nakon odmrzavanja bili izloženi dužem presovanju. S obzirom da je proteinski matriks nakon smrzavanja i odmrzavanja oštećen, duže presovanje sira sa takvom proteinskom strukturom dovelo je do pojave većeg izdvajanja surutke tokom presovanja, drugačijeg hemijskog sastava i čvršće teksture.

5.3.3 Statistička obrada podataka kvadratnim Ivanovičevim odstojanjem

Kvadratnim Ivanovičevim odstojanjem su ekperimentalni sirevi rangirani prema sličnosti sa kontrolnim sirom na osnovu sledećih svojstava: sadržaja masti u suvoj materiji, sadržaja proteina u suvoj materiji, sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira, pH vrednosti, čvrstoće pri sečenju, čvrstoće pri lomljenju, krtosti i čvrstoće pri kompresiji. Vrednosti kvadratnog Ivanovičevog odstojanja, kao i rangovi prikazani su u Tabeli 13.

Vrednosti svih parametara kontrolne varijante sira uključene u analizu su uzete kao referentne (odstojanje je računato od tih vrednosti), pa u tabeli vrednost kvadratnog Ivanovićeovog odstojanja za kontrolnu varijantu sira nije predstavljena, jer iznosi 0.

Tabela 13. Vrednosti kvadratnog Ivanovićeovog odstojanja i rangovi eksperimentalnih sireva

	F	SS	SV	PS	PV
D ²	3,0305	17,7192	23,4623	5,5242	8,3494
Rang	I	IV	V	II	III

Iz tabele se može videti da, kada se sve varijable uključe u analizu, najbližiji, odnosno onaj koji ima najmanje rastojanje od nule, kontrolnoj varijanti je sir proizveden od odmrznutog mleka (F). Sledeće što se može uočiti iz vrednosti kvadratnog Ivanovićeovog odstojanja je da su sirevi koji su smrznuti posle prve faze presovanja (PS i PV) sličniji kontrolnoj varijanti od sireva smrznutih posle faze samopresovanja (SS i SV). Ako bi međusobno poredili sireve koji su smrznuti posle iste faze presovanja/samopresovanja uočava se da su sirevi koji su proizvedeni od gruša dogrevanog u direktnom kontaktu sa surutkom (SS i PS) sličniji kontrolnoj varijanti sira od gruševa koji su dogrevani indirektnim kontaktom s vodom (SV i PV, redosledno).

Statističke metode koje se baziraju na principu poređenja srednjih vrednosti parametara često ne govore o sličnostima i razlikama između ispitivanih entiteta (u smislu rangiranja), posebno kada se ispitivani entiteti posmatraju kroz više varijabli koje ih opisuju. Kvadratno Ivanovićevo odstojanje, kao i obično Ivanovićevo odstojanje, može se koristiti kako bi se razvila nova proizvodna procedura, u smislu sveukupne sličnosti sa željenim ili referentim proizvodom. U ovom delu rada, kvadratno Ivanovićevo odstojanje, zajedno sa prethodno izvršenom analizom varijanse, poslužilo je za utvrđivanje koji je eksperimentalni sir najbližiji kontrolnoj varijanti sira prema svim analiziranim svojstvima. Iako se kontrolni sir (C) nije statistički značajno razlikovao od varijanti PS i PV posmatrajući određena fizičko-hemijska svojstva (Tabela 11), a bio je statistički značajno različit od varijante F prema svim fizičko-hemijskim

svojstvima, kvadratno Ivanovićevo odstojanje je pokazalo da je varijanta F, u ukupnom poretku, najslabija varijanti C.

Praktičan značaj ovog dela istraživanja se ogleda u tome da se može izvršiti optimizacija proizvodnje sireva od odmrznutog mleka ili gruš, kako bi se dobio sir koji je po svojim svojstvima najslabiji kontrolnom siru proizvedenom od svežeg mleka, najjednostavnijom mogućom procedurom. Na primer, ako se uzmu u obzir transportni i skladišni kapaciteti u industrijskoj proizvodnji, u nekom slučaju će možda biti jednostavnije smrznuti grušu, a ne mleko, bez obzira na činjenicu da je sir proizveden od smrznutog mleka najslabiji kontrolnoj varijanti sira. U tom slučaju pomoću kvadratnog Ivanovićevo odstojanja se dobija podatak da je bolje smrznuti grušu u kasnijim fazama presovanja, kao i podatak da je nakon odmrzavanja gruš najbolje dogrejati u direktnom kontaktu sa surutkom. Svakako da dogrevanje gruševa u surutki može biti komplikovano i opasno u smislu kontaminacije, te je potrebno postići što bolje higijenske uslove u pogonu.

5.4. Svojstva sireva od kozjeg mleka, gruš i grude skladištenih 60 dana u smrznutom stanju

5.4.1 Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka i sireva

S obzirom na relativno pozitivne rezultate dobijene kratkotrajnim smrznutjem mleka i gruš, u ovom delu rada ispitivano je skladištenje mleka, gruš i grude u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana. Osnovna fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka korišćenog u ovom delu ogleda prikazana su u Tabeli 14. Vrednosti fizičko-hemijskog sastava sirovog kozjeg mleka su u skladu sa istraživanjima prikazanim u prethodnim poglavljima: 5.1, 5.2 i 5.3.

Tabela 14. Fizičko-hemijska svojstva sirovog kozjeg mleka

Svojstvo	Vrednost
Mlečna mast (%)	3,56±0,14
Proteini (%)	2,86±0,08
Suva materija (%)	11,38±0,36
Titraciona kiselost (°SH)	7,33±0,42
pH	6,67±0,08

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Fizičko-hemijske karakteristike eksperimentalnih, kao i kontrolnog sira tokom perioda zrenja od 8 nedelja se mogu videti u Tabeli 15.

Važan rezultat ovog dela ogleada predstavljaju promene koje su se dogodile na sirevima napravljenim od odmrznutog gruša i grude (FC i FPC, redosledno). Naime, posle 14 dana zrenja mogao se uočiti značajan porast vrednosti vode u bezmasnoj materiji sira koji je iznosio 20,44% za varijantu FC i 23,49% za varijantu FPC. Takođe, uočen je i značajan gubitak masti u salamuri koji je doveo do smanjenja sadržaja masti u suvoj materiji za 22,72% kod varijante FC i 28,91% kod varijante FPC, kao i vizuelno zamućenje salamure i značajno omekšavanje sireva. Nakon 28 dana zrenja svi uzorci ove dve varijante sira (FC i FPC) su bili u potpunosti neupotrebljivi za ishranu i nepodesni za dalju analizu, jer se dogodilo skoro potpuno razaranje mase sira u salamuri. Iz pomenutih razloga u Tabeli 15 su prikazane vrednosti fizičko-hemijskih svojstava pomenutih varijanti sireva samo za 1. i 14. dan zrenja, dok su parametri ostalih varijanti ispitivani tokom celokupnog perioda zrenja od 56 dana. Prema Alichanidis (2007), omekšavanje sireva u salamuri i raspadanje sirne mase se odvija ukoliko pH vrednost 24 časa nakon koagulacije nije ispod 5,0, ukoliko je sadržaj vode veći od 58%, a udeo soli u vodenoj fazi sira manji od 2,5%. Svi sirevi su imali sadržaj vode manji od 58%, osim varijante FM, sadržaj soli u vodenoj fazi veći od 2,5%, ali im je pH vrednost bila iznad granice od 5,0. Kod varijanti CC i FM početna viša vrednost pH nije proizvela efekat koji se uočio kod varijanti sireva koji su pravljani od odmrznute grude i gruša. Kao što je već navedeno u poglavlju 5.3, smrzavanje i skladištenje sireva u smrznutom stanju dovodi do promena na proteinskom matriksu. Prema Alichanidis *i*

sar. (1981), 60 dana skladištenja u smrznutom stanju dovodi do inaktivacije starterske mikroflore.

Tabela 15. Fizičko-hemijska svojstva sireva tokom perioda zrenja

Svojstvo	Varijanta sira	Dani zrenja				
		1	14	28	42	56
VuBMS (%)	CC	68,04±1,298 ^a	73,32±1,409 ^a	73,06±2,229 ^a	72,46±1,604 ^a	73,03±4,092 ^a
	FM	73,63±1,371 ^a	73,56±3,636 ^a	71,91±1,675 ^a	74,53±2,507 ^a	75,25±0,958 ^a
	FC	64,41±2,576	77,58±1,047	-	-	-
	FPC	64,10±2,533	79,16±2,608	-	-	-
MuSM (%)	CC	43,13±1,649 ^a	43,74±3,255 ^a	44,55±1,863 ^a	44,50±0,953 ^a	44,05±1,436 ^a
	FM	44,43±0,401 ^a	44,68±3,473 ^a	43,48±0,817 ^a	45,59±1,567 ^a	47,00±0,321 ^a
	FC	43,17±1,488	33,36±1,454	-	-	-
	FPC	42,67±1,812	30,48±1,972	-	-	-
PuSM (%)	CC	46,43±2,485 ^a	44,11±1,462 ^a	44,86±1,128 ^a	44,97±5,314 ^a	44,25±2,801 ^a
	FM	44,40±2,847 ^a	44,51±0,861 ^a	43,28±1,780 ^a	43,44±1,092 ^a	45,42±0,953 ^a
	FC	46,37±2,385	45,67±1,113	-	-	-
	FPC	49,28±1,922	42,74±1,739	-	-	-
So (%)	CC	1,48±0,764 ^a	3,27±0,499 ^b	3,16±0,328 ^b	3,37±0,396 ^b	3,06±0,328 ^b
	FM	1,56±0,682 ^a	3,29±0,210 ^b	3,67±0,503 ^b	3,30±0,084 ^b	3,09±0,053 ^b
	FC	1,45±0,591	-	-	-	-
	FPC	1,61±0,833	-	-	-	-
pH	CC	5,49±0,471 ^a	5,24±0,103 ^a	5,20±0,158 ^a	5,24±0,234 ^a	5,19±0,171 ^a
	FM	5,11±0,101 ^a	4,79±0,177 ^a	4,77±0,147 ^a	4,95±0,128 ^a	4,98±0,237 ^a
	FC	5,73±0,229	5,52±0,106	-	-	-
	FPC	5,40±0,120	5,15±0,064	-	-	-

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Vrednosti u redovima table koje su označene istim slovima se statistički značajno ne razlikuju u toku perioda zrenja

VuBMS- voda u bezmasnoj materiji sira, **MuSM**- mast u suvoj materiji, **PuSM**-proteini u suvoj materiji

Varijanta sira: CC - kontrolni sir; FM - sir od odmrznutog mleka; FC - sir od odmrznutog grušā; FPC - sir od odmrznute grude

Na osnovu prethodno iznetih činjenica može se postaviti hipoteza da promenama na proteinskom matriksu grude i grušā kod varijanti FC i FPC (redosledno) nije moguće istiskivanje vodene faze iz sira u salamuru procesom difuzije, a doprinos tome daje i slabija aktivnost starterske mikroflore, koja je u nemogućnosti da dovoljno brzo snizi pH vrednost sira. Vrednost pH kontrolnog sira (CC) je bila veća od 5,0 tokom celokupnog perioda zrenja, ali izostanak oštećenja na proteinima koja nastaju usled

smrzavanja, sprečilo je pojavu raspadanja sirne mase u salamuri. Varijanta sira napravljena od smrznutog mleka (FM) je imala najnižu pH vrednost, kao što je pokazano i u poglavlju 5.3 u kojem se ispitalo kratkotrajno smrzavanje, što još jednom potvrđuje da se smrzavanjem mleka puferni kapacitet pomera ka nižim vrednostima usled precipitacije kalcijum fosfata (Goff i Sahagian, 1996). Takođe, smrzavanjem mleka se izbegava oštećenje proteinskog matriksa, jer se koagulacija odvija nakon njegovog odmrzavanja, za razliku od varijanti FC i FPC. Kao što se može i videti iz rezultata dobijenih u ovom delu istraživanja, oštećenja koja nastaju na proteinskom matriksu gruša i grude mogu imati značajnije posledice od oštećenja koja nastaju kada su proteini u formi micela, kao što je to slučaj pri smrzavanju mleka. Ako se uporede rezultati ovog dela istraživanja za sir napravljen od odmrznutog gruša sa rezultatima za sir napravljen od odmrznutog gruša sa kratkotrajnim periodom skladištenja, opisanim u poglavlju 5.3, uočava se da u prethodnom ogledu ne dolazi do drastičnih promena za sireve proizvedene od odmrznutog gruša. Postoji više razloga kojima bi se ovo zapažanje moglo objasniti:

- 1) U toku kraćeg skladištenja sira u smrznutom stanju, proteinski matriks je pretrpeo manja oštećenja i samim tim nije bio podložan razaranju u toku zrenja u salamuri koje je takođe trajalo kraće nego u ovom delu ogleda.
- 2) Mleko prikupljeno u septembru je korišćeno za ogled kratkotrajnog skladištenja, a mleko prikupljeno u novembru za ogled dugotrajnog skladištenja u smrznutom stanju. Veći puferni kapacitet mleka iz novembra (koji se može videti u poglavlju 5.1.1) doprineo je većim početnim vrednostima pH nakon izrade sira, čineći sir podložnijim za raspadanje u toku zrenja.
- 3) Smrzavanje u periodu od 60 dana u velikoj meri je negativno uticalo na aktivnost starterskih mikroorganizama, koji nisu mogli u potrebnom vremenskom periodu da snize pH vrednost sira ispod 5,0.

Zbog očiglednih, jako izraženih negativnih promena, kao i nepotpunih podataka usled omekšavanja i razaranja sirne mase u toku zrenja, ove dve varijante sira (od grušā i grude) nisu uvrštene u analizu varijanse, pa će se o statistički značajnim razlikama govoriti samo između kontrolne varijante sira i varijante koja je napravljena od odmrznutog mleka.

Statistički značajne razlike između sireva CC i FM se pojavljuju kod svojstava VuBMS i pH vrednosti. Period zrenja je imao uticaj samo na sadržaj soli u siru i poređenjem srednjih vrednosti uočava se da su sirevi CC i FM prvog dana zrenja imali statistički značajno ($p < 0,05$) manji udeo soli od ostalih vrednosti dobijenih u toku perioda zrenja, koje se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Fontecha *i sar.* (1993) su utvrdili da smrzavanje sireva rezultuje neuređenom strukturom proteinskog matriksa i smanjenjem kapaciteta vezivanja vode, te i nižim vrednostima VuBMS kod odmrznutih sireva. U slučaju sireva proizvedenih od odmrznutog mleka uočava se povećanje VuBMS u odnosu na kontrolni sir (Tabela 15). Ovo takođe može biti još jedna činjenica koja ide u korist hipoteze da smrzavanje sireva (ili grušā i grude) ima drugačiji uticaj na proteine u odnosu na uticaj koji može imati smrzavanje mleka, jer je u trenutku smrzavanja sireva već izgrađen proteinski matriks. Statistički značajno niža pH vrednost varijante FM još jednom potvrđuje da je puferni kapaciteta odmrznutog mleka pomeren ka nižim pH vrednostima, te je i pH vrednost proizvedenih sireva od takvog mleka niža (Goff i Sahagian, 1996). Niža pH vrednost sireva trebalo bi da rezultuje i nižim vrednostima VuBMS, jer je kazein u tom slučaju bliži svojoj izoelektričnoj tački i samim tim mu je smanjena sposobnost vezivanja vode. Međutim, precipitacija kalcijumfosfata, odnosno njegovo vezivanje za kazein, može da dovede do izmene u prostornoj strukturi proteina (Salaün *i sar.*, 2005), što može da utiče i na vrednost VuBMS, nezavisno od pH vrednosti sira, a može biti objašnjenje za višu vrednost VuBMS kod varijante FM.

5.4.2 Teksturalna svojstva sireva i njihova korelacija sa fizičko-hemijskim svojstvima

Pored izgleda, ukusa i mirisa, tekstura sireva ima najveći značaj za ukupni kvalitet i prihvatljivost sireva. U ovom delu ogleda su prikazane razlike u teksturalnim svojstvima između kontrolnog i eksperimentalnih sireva. Teksturalna svojstva sireva utvrđena su metodom analize profila teksture, dok su viskoelastična svojstva prikazana pomoću Pelegovog modela.

Pelegov model se zasniva na predstavljanju viskoelastičnih svojstava hrane pomoću relaksacionih krivih koje se obično poklapaju sa eksponencijalnom jednačinom koja opada. Na osnovu podataka sa eksperimentalne krive određuje se njeno poklapanje sa Pelegovim modelom i izračunavaju se Pelegovi koeficijenti, koji zapravo predstavljaju viskoelastičnu karakteristiku sira. Poklapanja tih eksperimentalnih krivih sa Pelegovim modelom su bila značajna, te se Pelegovi koeficijenti mogu smatrati merom za viskoelastična svojstva ispitivanih sireva. Stepem poklapanja eksperimentalnih krivih sa teorijskim prikazan je u Tabeli 16.

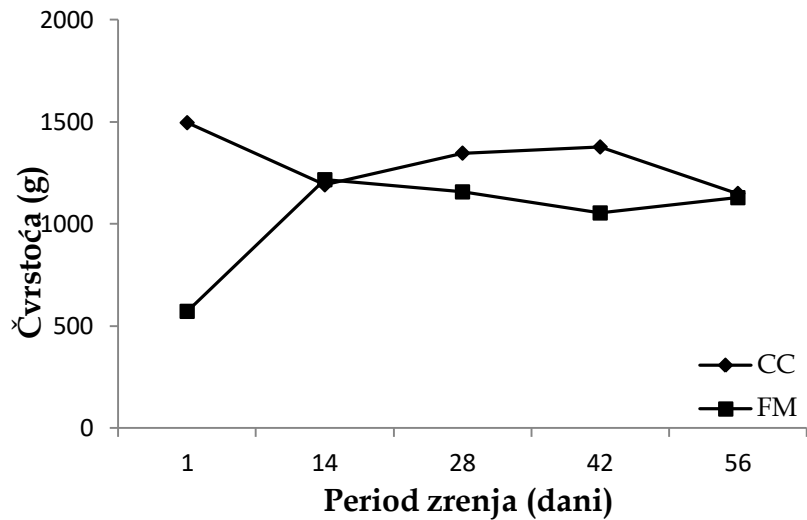
Tabela 16. Koeficijenti determinacije poklapanja eksperimentalnih krivih sa Pelegovim modelom

Period zrenja (dani)	0	14	28	42	56
Varijanta sira					
CC	0,95	0,96	0,94	0,95	0,96
FM	0,95	0,95	0,93	0,91	0,95

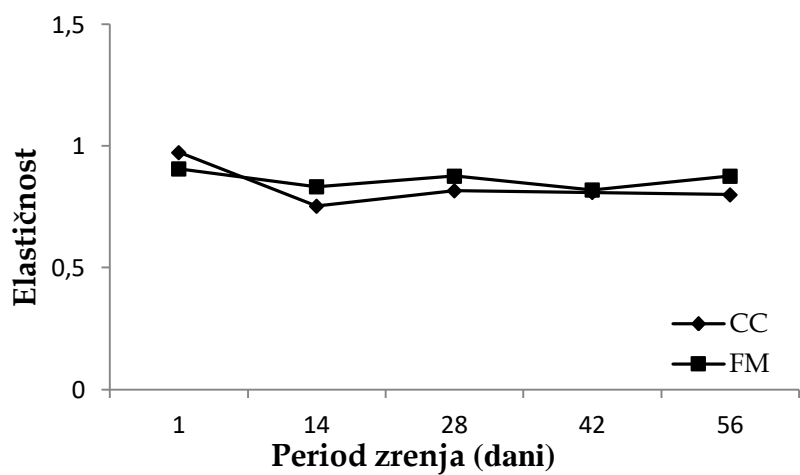
Svi koeficijenti determinacije su statistički značajni na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$

Varijanta sira: CC – kontrolni sir; FM - sir proizveden od odmrznutog mleka

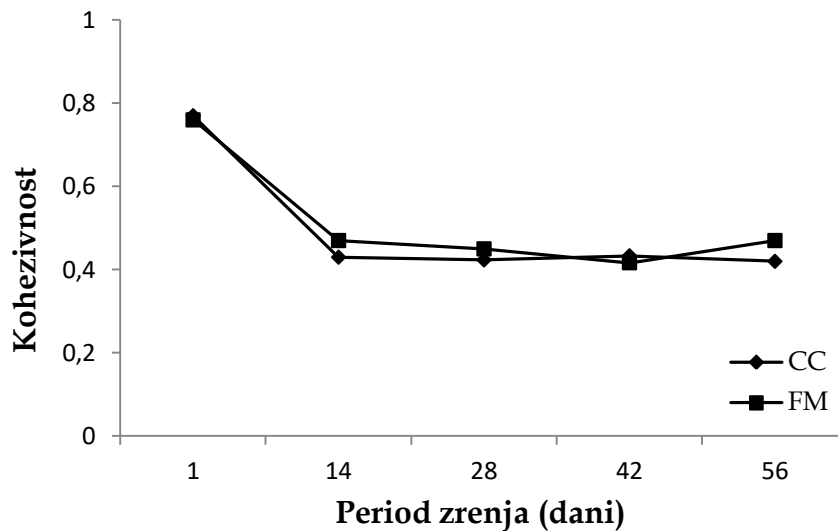
Vrednosti ispitivanih teksturalnih svojstava kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) su prikazane na Slikama 14 -20. Kao što je prethodno opisano, zbog omekšavanja i razaranja sirne mase rezultati teksture nisu prikazani za varijante FC i FPC. Čvrstoća ovih sireva je već nakon 14-og dana zrenja bila višestruko (6-7 puta) manja od varijanti sira CC i FM.



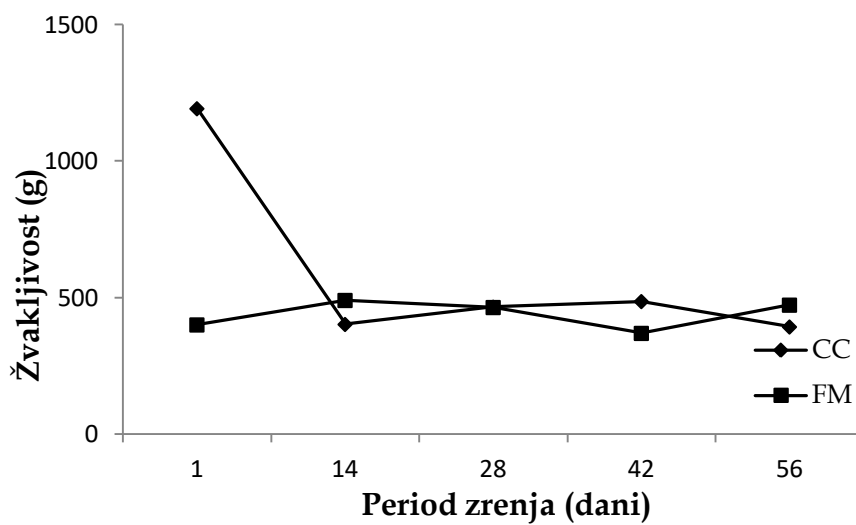
Slika 14. Čvrstoća kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja



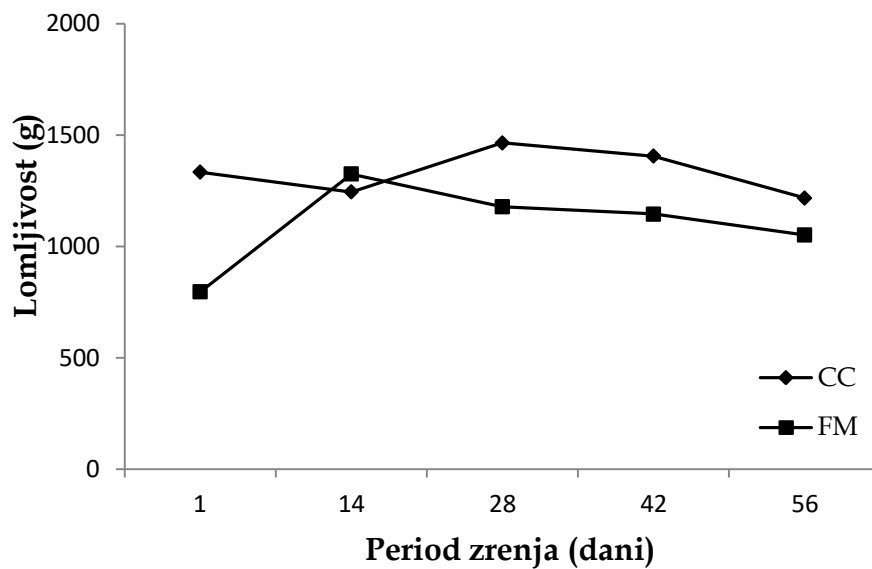
Slika 15. Elastičnost kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja



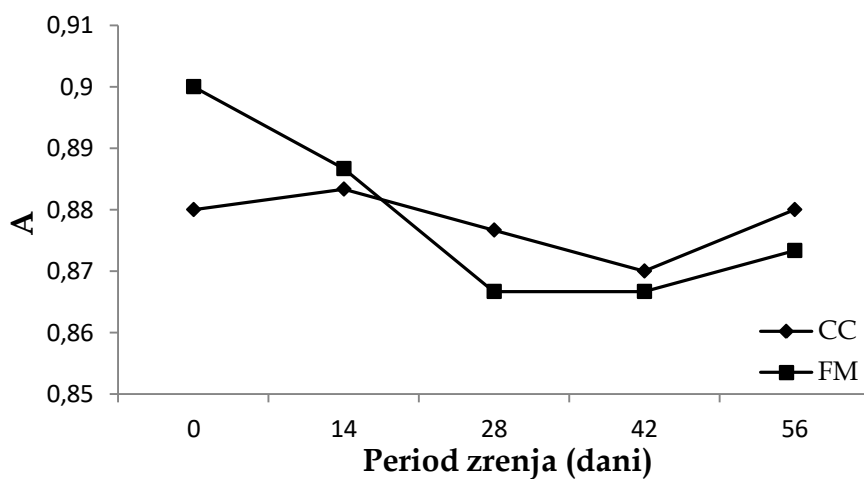
Slika 16. Kohezivnost kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja



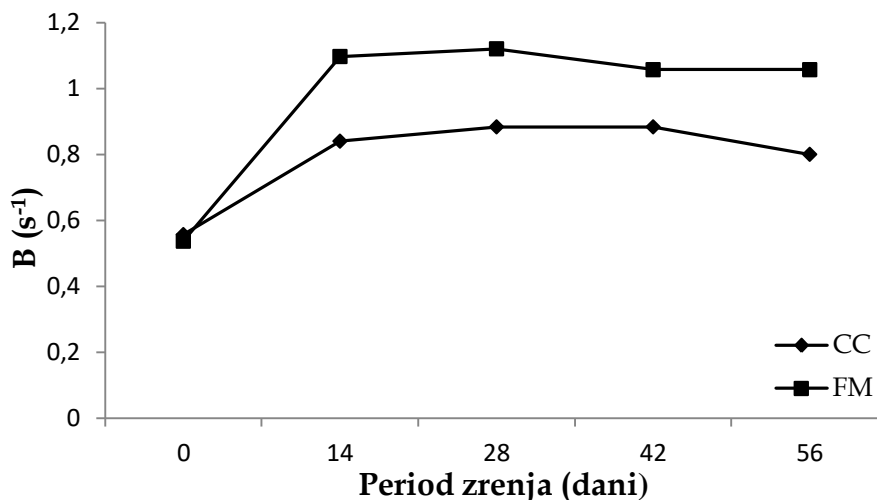
Slika 17. Žvkljivost varijanti sireva CC (kontrolna varijanta sira) i FM (varijanta sira od odmrznutog mleka) tokom perioda zrenja



Slika 18. Lomljivost kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja



Slika 19. Nivo relaksacije (A) kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja



Slika 20. Brzina relaksacije (B) kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) tokom perioda zrenja

Rezultati analize varijanse ukazuju da smrzavanje mleka ima statistički značajan uticaj na sledeća teksturalna svojstva: čvrstoću, lomljivost i brzinu relaksacije. Čvrstoća i lomljivost su u proseku bila za 18-25% veći kod varijante CC u odnosu na varijantu FM. Brzina relaksacije je bila u proseku za 19% veća kod varijante FM. Na ostala teksturalna svojstva smrzavanje nije imalo statistički značajan efekat. Imajući u vidu da je voda u bezmasnoj materiji sira zapravo odnos između vode i proteina u siru (Tunick *i sar.*, 1993), razlike u ovom svojstvu dovode do pojave razlika i u teksturalnim svojstvima sireva. S obzirom na to da postoji statistički značajna razlika između sadržaja VuBMS sireva CC i FM, to može objasniti razlike u njihovoj čvrstoći i lomljivosti. Na ovo zapažanje takođe ukazuju i podaci iz Tabele 17, u kojoj se vidi da su svojstva lomljivosti i čvrstoće u najjačoj korelaciji sa sadržajem VuBMS. Brzina relaksacije je u najjačoj statistički značajnoj korelaciji sa udelom soli, zatim sa pH vrednosti, a na kraju sa udelom masti u suvoj materiji. U prethodnom poglavlju je ukazano na to da od ova tri svojstva jedino postoji statistički značajna razlika u pH vrednosti između varijanti FM i CC. Vrednost pH je u negativnoj korelaciji sa brzinom relaksacije ($r = -0,62$), te se može uvideti da je uzrok razlika u brzini relaksacije značajno niža pH vrednost kod varijante FM.

Tabela 17. Pearson-ovi koeficijenti korelacije između fizičko-hemijskih i teksturalnih svojstava sireva

Fizičko-hemijska svojstva Svojstva teksture	VuBMS	MuSM	PuSM	pH	So
Čvrstoća	-0.55*	-0.08	0.10	0.17	-0.05
Kohezivnost	-0.42*	-0.18	0.20	0.33	-0.90*
Elastičnost	-0.43*	0.04	0.26	0.07	-0.56*
Žvakljivost	-0.65*	-0.20	0.28	0.41	-0.62*
Lomljivost	-0.50*	-0.26	0.06	0.04	0.02
Nivo relaksacije (A)	0.08	0.21	0.04	-0.03	-0.37*
Brzina relaksacije (B)	0.22	0.45*	-0.33	-0.62*	0.72*

Koeficijenti korelacije označeni sa (*) su statistički značajni na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$

A - Nivo relaksacije; B - Brzina relaksacije

VuBMS-voda u bezmasnoj materiji sira, MuSM-mast u suvoj materiji, PuSM-proteini u suvoj materiji

U Tabeli 17 prikazano su Pearson-ovi koeficijenti korelacije između teksturalnih i fizičko-hemijskih svojstava sireva. Najveći stepen korelacije sa teksturalnim svojstvima je ustanovljen sa VuBMS i sadržajem soli, kada su fizičko-hemijska svojstva u pitanju. Voda u bezmasnoj materiji sira (VuBMS) je u statistički značajnoj korelaciji sa svim svojstvima teksture osim sa Pelegovim koeficijentima (A i B). Udeo soli u siru je u statistički značajnoj korelaciji sa svim svojstvima teksture osim sa čvrstoćom i lomljivošću. Udeo proteina u suvoj materiji nije u statistički značajnoj vezi ni sa jednim ispitivanim svojstvom teksture. Mast u suvoj materiji i pH vrednost su u statistički značajnoj korelaciji samo sa Pelegovim koeficijentom B, odnosno brzinom relaksacije. Iz izloženih rezultata može se uočiti da najveći značaj u formiranju teksture imaju VuBMS i udeo soli u siru, posmatrajući sva ispitivana fizičko-hemijska svojstva.

Period zrenja je statistički značajno uticao na elastičnost, kohezivnost, žvakljivost i brzinu relaksacije (B). Kod svih ovih svojstava poređenje srednjih vrednosti pokazuje da se njihove vrednosti statistički značajno razlikuju prvog dana zrenja, dok u u toku daljeg perioda zrenja ne postoji statistički značajna razlika, što se može uočiti i na Slikama 15, 16, 17 i 20. Period zrenja je takođe uticao i na nivo relaksacije (A). Poređenja sredina ukazuju da razlike postoje između 1-og i 28-og dana, kao i 1-og i 42-og dana

zrenja. Zatim, razlike postoje još i između nivoa relaksacije 14-og i 42-og dana zrenja. Vrednosti za nivo relaksacije između ostalih dana zrenja se statistički značajno ne razlikuju.

Kohezivnost, elastičnost i žvackljivost su u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa udelom soli u siru. Kao i na tri pomenuta parametra teksture i na udeo soli utiče period zrenja (Tabela 15). Takođe je zajedničko za sva ova svojstva da se vrednosti statistički značajno razlikuju samo prvog dana zrenja, dok su tokom preostalog perioda zrenja vrednosti konstantne. Sve pomenute činjenice ukazuju da je udeo soli vrlo značajan faktor u formiranju teksture sireva. Na efekat udela soli na teksturu sireva ukazano je i u brojnim ranijim istraživanjima (Guinee, 2004; Kaya, 2002; Madadlou *i sar.*, 2007). Povećanje udela soli u navedenim istraživanjima uglavnom je objašnjen kroz smanjenje vode u siru, te povećanjem čvrstoće i lomljivosti sireva. U delu eksperimenta koji se opisuje u ovom poglavlju, može se primetiti da ni čvrstoća ni lomljivost nisu u statistički značajnoj korelaciji sa udelom soli. Madadlou *i sar.* (2007) su predložili da se mehanizam uticaja molekula NaCl svodi na smanjivanje elektrostatičke interakcije između molekula proteina. Predloženi mehanizam promena na mikro nivou može biti razlog za statistički značajnu korelaciju između udela soli i kohezivnosti, elastičnosti i žvackljivosti.

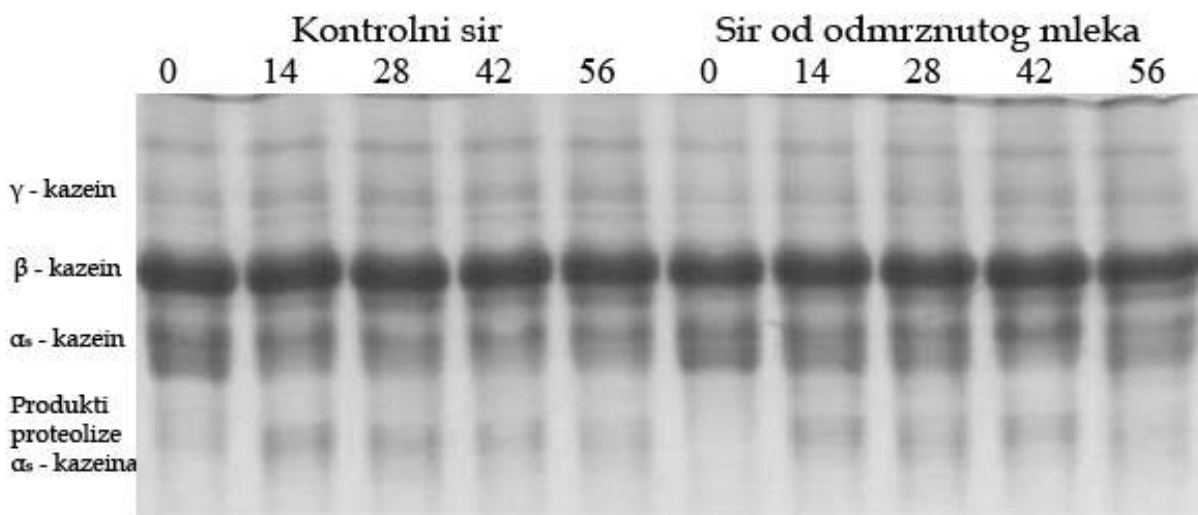
Pelegovi koeficijenti (A i B) pokazuju statistički značajne promene pod uticajem perioda zrenja. Brzina relaksacije pokazuje vrlo sličan trend kao i udeo soli (Slika 20 i Tabela 15), pri čemu je i koeficijent korelacije između ova dva svojstva statistički značajan i njegova vrednost iznosi $r=0,72$. Nivo relaksacije (A) je za varijantu FM bio najveći prvog dana zrenja i imao je tokom ostalog perioda zrenja opadajući trend. Za varijantu CC najveća vrednost nivoa relaksacije je bila 14-og dana, ali osim toga trend tokom zrenja je bio vrlo sličan kao i kod varijante FM (Slika 19). Nivo relaksacije je bio u statistički značajnoj korelaciji samo sa udelom soli, mada koeficijent korelacije nije bio visok ($r=-0,37$). Nasuprot tome brzina relaksacije je u pozitivnoj korelaciji sa udelom soli, što ukazuje da udeo soli u siru utiče na oba Pelegova koeficijenta, ali sa različitim

efektom. Takođe, značajno je pomenuti da je udeo soli jedino fizičko-hemijsko svojstvo koje ima statistički značajnu korelaciju sa oba Pelegova koeficijenta.

5.4.3 Proteoliza sireva i korelacija između udela β - i α - kazeina i teksturalnih svojstava

Proteolitičke promene podrazumevaju hidrolizu kazeina na peptide različitih molekulskih masa i aminokiseline. Ovaj biohemijski proces koji se u siru odvija tokom perioda zrenja ima veliki uticaj na teksturu, mikrostrukturu, miris i ukus sireva (Fox *i sar.*, 2000). U ovom delu rada opisan je uticaj skladištenja smrznutog mleka na proteolizu kozjeg sira u salamuri, kao i povezanost udela β - i α - kazeina sa prethodno ispitivanim svojstvima teksture.

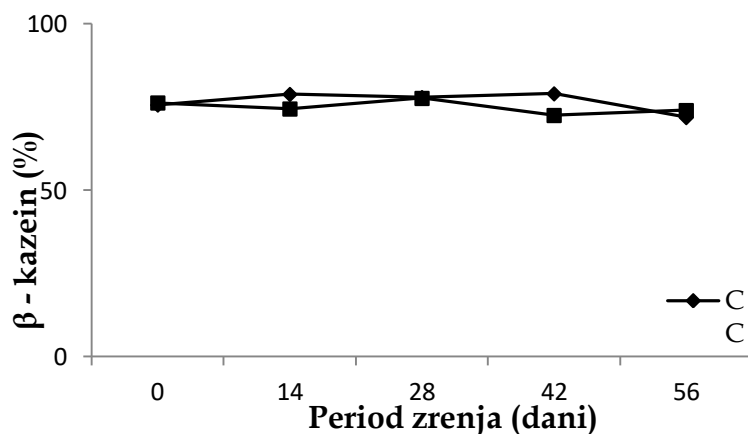
Elektroforegram kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM) prikazan je na Slici 21. Označavanje frakcija kazeina na elektroforegramu je urađeno prema Hayaloglu *i sar.* (2013) i Asteri *i sar.* (2010).



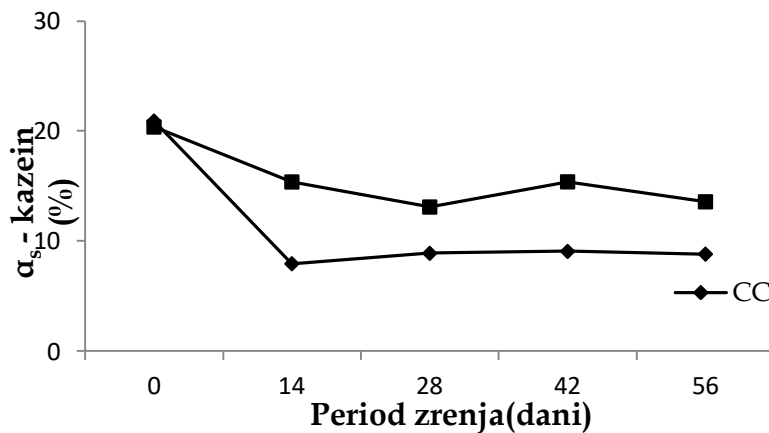
Slika 21. Elektroforegram kontrolnog sira (CC) i sira od odmrznutog mleka (FM)

Između varijanti CC i FM ne postoji razlika u udelu β - kazeina. Analiza varijanse takođe pokazuje da je tokom zrenja udeo β - kazeina konstantan, pa se može zaključiti da ne postoji statistički značajna proteoliza ove frakcije kazeina tokom perioda zrenja, što se može uočiti na Slici 22.

Na proteolizu α_s - kazeina je statistički značajno uticalo smrzavanje mleka. Analiza varijanse je pokazala da je manji obim proteolize postojao kod varijante FM u odnosu na varijantu CC. Precipitacija kalcijumfosfata prilikom smrzavanja, o čemu se diskutovalo u prethodnim poglavljima, i menjanje prostorne strukture proteinskog matriksa mogu biti uzroci za slabiju proteolizu α_s - kazeina kod varijante FM, iako niža pH vrednost ove varijante sira pogoduje izraženijoj aktivnosti himozina u hidrolizi α_s - kazeina. Značajan uticaj na proteolizu je imao i period zrenja, pri čemu se intenzivna proteoliza odvijala u periodu od prvog do 14-og dana, dok je udeo α_s -kazeina u ukupnom kazeinu bio konstantan od 14-og do 56-og dana, što je prikazano na Slici 23.



Slika 22. Udeo rezidualnog β - kazeina u ukupnom kazeinu
CC - kontrolni sir; FM - sir od odmrznutog mleka



Slika 23. Udeo rezidualnog α_s - kazeina u ukupnom kazeinu
CC - kontrolni sir; FM - sir od odmrznutog mleka

Limitirana proteoliza β - kazeina kod sireva u salamuri je već zabeležena više puta u literaturi. Takođe, postoji veliki broj naučnih izvora koji govore o intenzivnoj proteolizi α_s - kazeina kod ove vrste sira proizvedene od kozjeg mleka (Miloradović, 2015; Bontinis *i sar.*, 2012; Asteri *i sar.*, 2010; Barać *i sar.*, 2013). Ukoliko se pri izradi sira koristi sirilo životinjskog porekla, kao što je korišćeno u ovom istraživanju, izraženija je proteoliza α_s - kazeina u odnosu na β - kazein (Bontinis *i sar.*, 2012). Frakcija β - kazeina je u najvećoj meri supstrat za plazmin čija je aktivnost slabija pri niskim pH vrednostima, koje su karakteristične za sireve u salamuri (Miloradović, 2015; Upadhyay *i sar.*, 2004). Osim toga, pri niskim pH vrednostima je veća aktivnost himozina, tako da je kod sireva koji imaju nižu pH vrednost izraženija proteoliza upravo α_s - kazeina (Sousa *i sar.*, 2001). Sa Slike 23 se uočava da se značajna proteoliza α_s - kazeina odvija prvih 14 dana, što je saglasno sa rezultatima Miloradović (2015), gde je zabeleženo da se značajna proteoliza odvija u prvih 10 dana zrenja kozjih sireva u salamuri, a da u preostalih 30 dana zrenja nema značajne proteolize. Denzitometrijskom analizom elektroforegrama prikazanog na Slici 21, udeo α_s - kazeina se nakon prvih 14 dana zrenja smanjuje sa 20,92% na 7,95% kod kontrolne varijante sira, odnosno sa 20,38% na 15,38% kod varijante sira od smrznutog mleka. Statistički značajno niža vrednost udela soli u siru (Tabela 15) je doprinela intenzivnijim biohemijskim promenama u prvih 14 dana zrenja.

U Tabeli 18 su prikazane vrednosti koeficijenta korelacije teksturalnih svojstava sa udelima rezidualnog α_s - i β - kazeina. Kao što se može videti iz rezultata, udeo rezidualnog β -kazeina ne pokazuje statistički značajnu korelaciju ni sa jednim svojstvom teksture, dok je udeo rezidualnog α_s - kazeina u statistički značajnoj, pozitivnoj korelaciji sa svojstvima kohezivnosti, elastičnosti i žvakljivosti sireva. Promena udela rezidualnog α_s - kazeina tokom zrenja ima isti trend kao i promena pomenutih svojstava teksture, što se može i videti na Slikama 15, 16, 17 i 23. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim saznanjima, s obzirom da je α_s - kazein, a posebno α_{s1} - frakcija, gradivna komponenta kazeinske micle i da pri sirišnoj koagulaciji ima

funkcionalnu ulogu u formiranju gela, odnosno proteinskog matriksa (Clark i Sherbon, 2000).

Tabela 18. Vrednosti koeficijenta korelacije između teksturalnih parametara i udela rezidualnog α_s - i β - kazeina

Svojstvo teksture \ Udeo	Rezidualni α_s - kazein	Rezidualni β - kazein
Čvrstoća	-0,14	0,21
Kohezivnost	0,79*	0,10
Elastičnost	0,67*	0,01
Žvakljivost	0,50*	0,19
Lomljivost	-0,25	0,12
Nivo relaksacije (A)	0,18	-0,07
Brzina relaksacije (B)	-0,35	-0,24

Koeficijenti korelacije označeni sa (*) su statistički značajni na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$

5.4.4 Mikrostruktura sireva

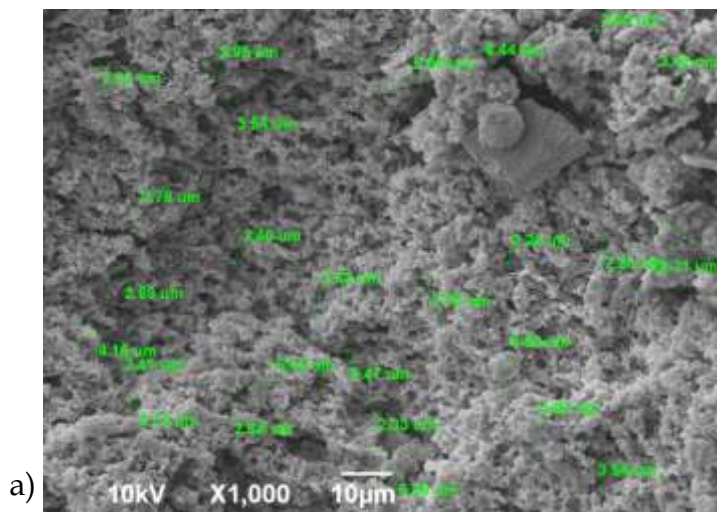
U ovom delu ogleđa opisana mikrostruktura sireva je dala uvid u promene koje su se pod uticajem smrzavanja i skladištenja dogodile na mikro nivou, koje na dalje mogu biti uzrok promenama koje su se dogodile u teksturi sireva.

Mikrostruktura sireva je ispitivana skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uvećanjima od 1.000x, 2.000x, 5.000x i 10.000x. Uzorci su uzeti 1-og i 56-og dana zrenja za kontrolnu varijantu sira (CC) i varijantu sira proizvedenu od odmrznutog mleka (FM). Za varijante sira proizvedene od odmrznutog grušča (FC) i odmrznute grude (FPC) uzorci su uzeti samo 1-og dana zrenja, usled raspadanja sirne mase u salamuri koja se dogodila između 14-og i 28-og dana zrenja, a o čemu je diskutovano u poglavlju 5.4.1. Na Slikama 24 - 27 prikazana je mikrostruktura prvog dana zrenja za kontrolni uzorak sira i tri eksperimentalne varijante sira (FM, FC, FPC), na uvećanjima od 1.000x, 2.000x, 5.000x i 10.000x, redosledno.

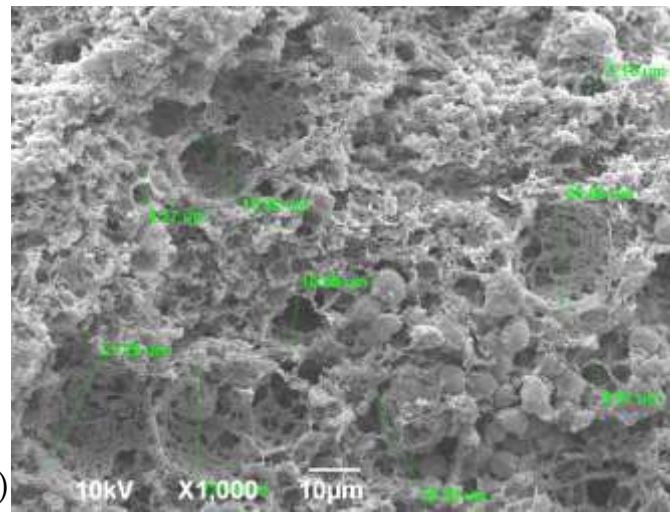
Sa Slike 24 može se uočiti različita struktura između kontrolnog sira i eksperimentalnih varijanti sireva prvog dana zrenja. Na Slici 24c i 24d može se videti

više tankih lanaca proteinskog matriksa u poređenju sa 24a i 24b. Ovaj rezultat ide u prilog prethodno iznetoj hipotezi (poglavlje 5.4.1) da oštećenja na proteinima u toku smrzavanja i skladištenja gruš i grude imaju veće posledice za svojstva sira od oštećenja koja se mogu javiti na proteinima u toku smrzavanja i skladištenja mleka. Veći obim finije strukture lanaca u proteinskom matriksu, uz višu pH vrednost varijanti sireva FC i FPC verovatno su doveli do upijanja velike količine vode iz salamure, a potom i do razaranja sirne mase. Ova neuređena struktura tankih (finih) lanaca proteina u matriksu sireva FC i FPC se još jasnije može uočiti na uvećanjima od 2.000, 5.000 i 10.000 puta, odnosno na Slikama 25c, 25d, 26c, 26d, 27c, 27d.

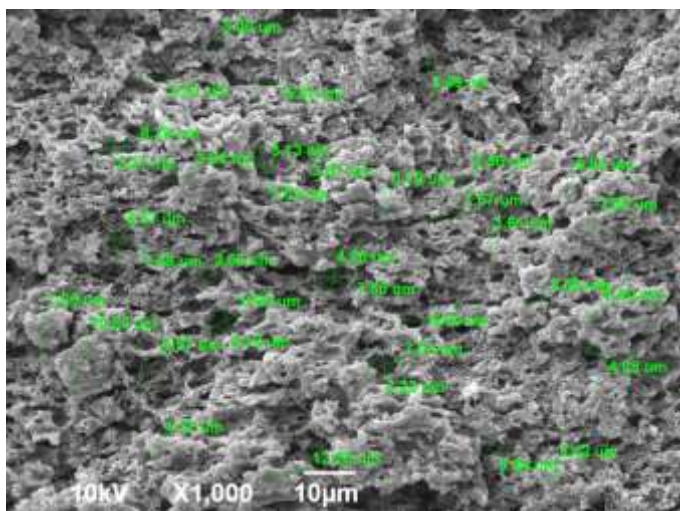
Upoređujući mikrostrukturu sireva CC i FC uočava se da CC ima nešto kompaktniju mikrostrukturu sa manjim brojem šupljina od sira FC. Na Slici 24b se uočavaju šupljine pravilnog oblika koje su prečnika i preko 20 μm . Šupljine tog oblika i veličine nisu utvrđene ni kod jedne druge ispitivane varijante sira. Prema svom obliku, one bi mogle odgovarati masnim globulama. Međutim prema Attaie i Richter (2000) prosečna veličina masnih globula u kozjem mleku je 2,76 μm , a raspon prečnika se kreće od 0,83 μm do 8,58 μm . Iako membrane masnih globula kozjeg mleka ne sadrže aglutinin (Jandal, 1996), evidentno je došlo do koalescencije masnih globula u ovom uzorku. Kao što je prethodno pomenuto u poglavlju 2.5, tokom smrzavanja mleka kristali leda uzrokuju oslobađanje lipoproteina iz membrane masnih globula, što kasnije prilikom otapanja mleka rezultuje njihovom koalescencijom (Fennema *i sar.*, 1973). S obzirom na prethodno razmotrene činjenice može se izneti pretpostavka da se na Slici 24b upravo vide mesta (šupljine) na kojima su velike masne globule nastale koalescencijom manjih. Na svim mestima na kojima je uočena ovakva šupljina, ona je bila prečnika većeg od najvećeg izmerenog prečnika masne globule prema Attaie i Richter (2000), a koji je iznosio 8,58 μm .



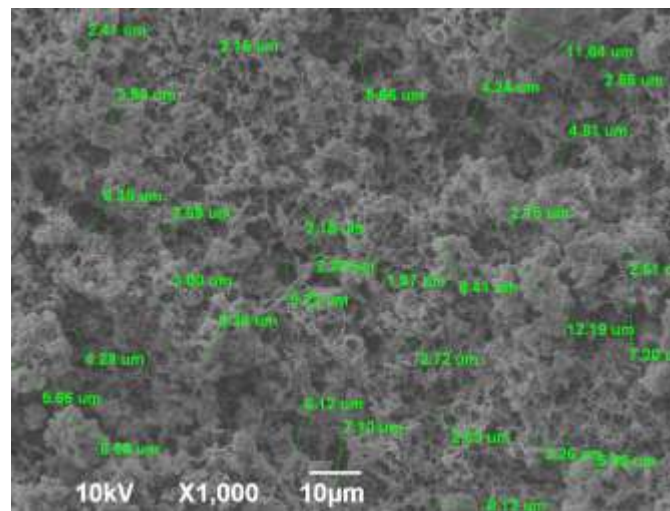
a)



b)

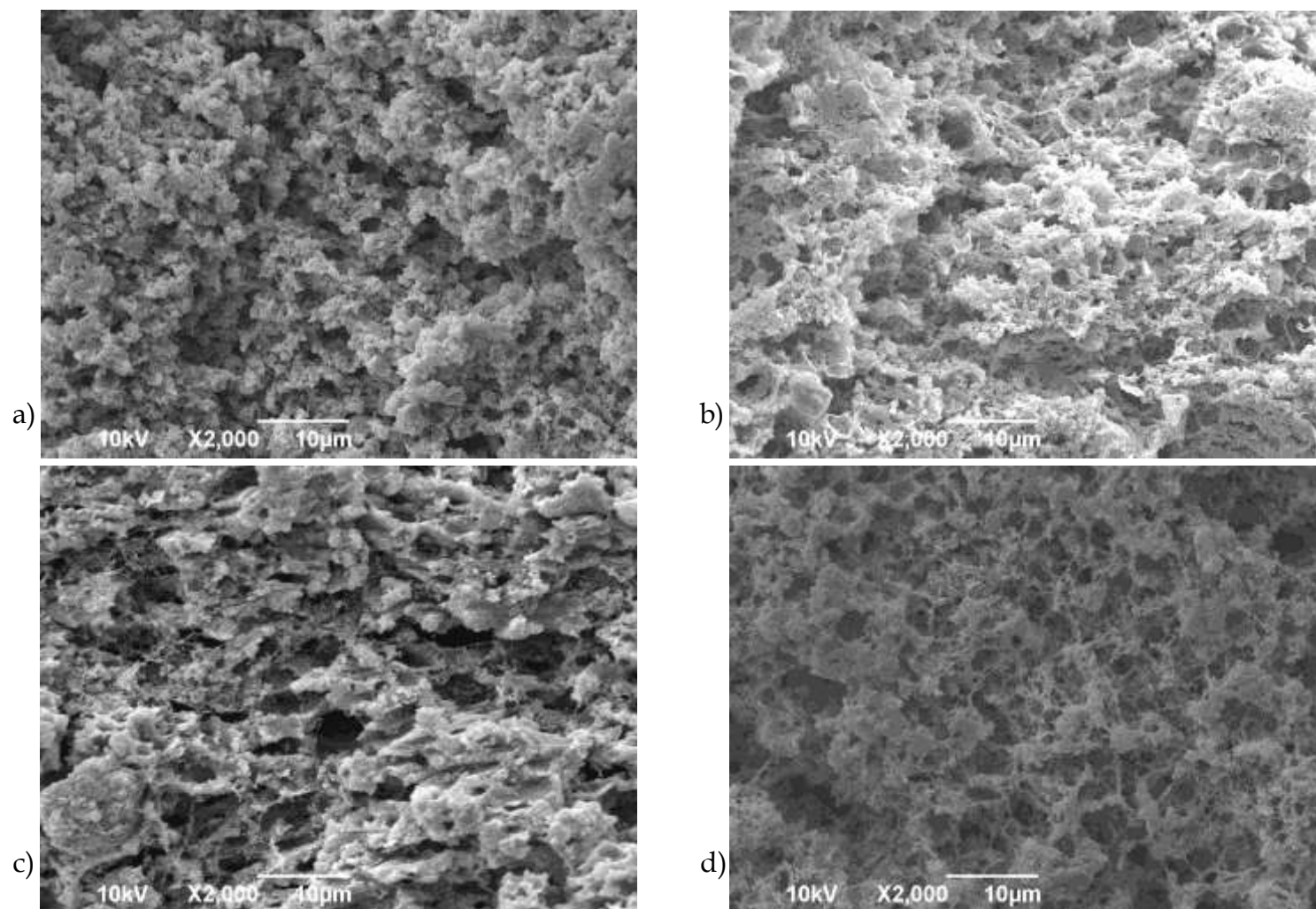


c)

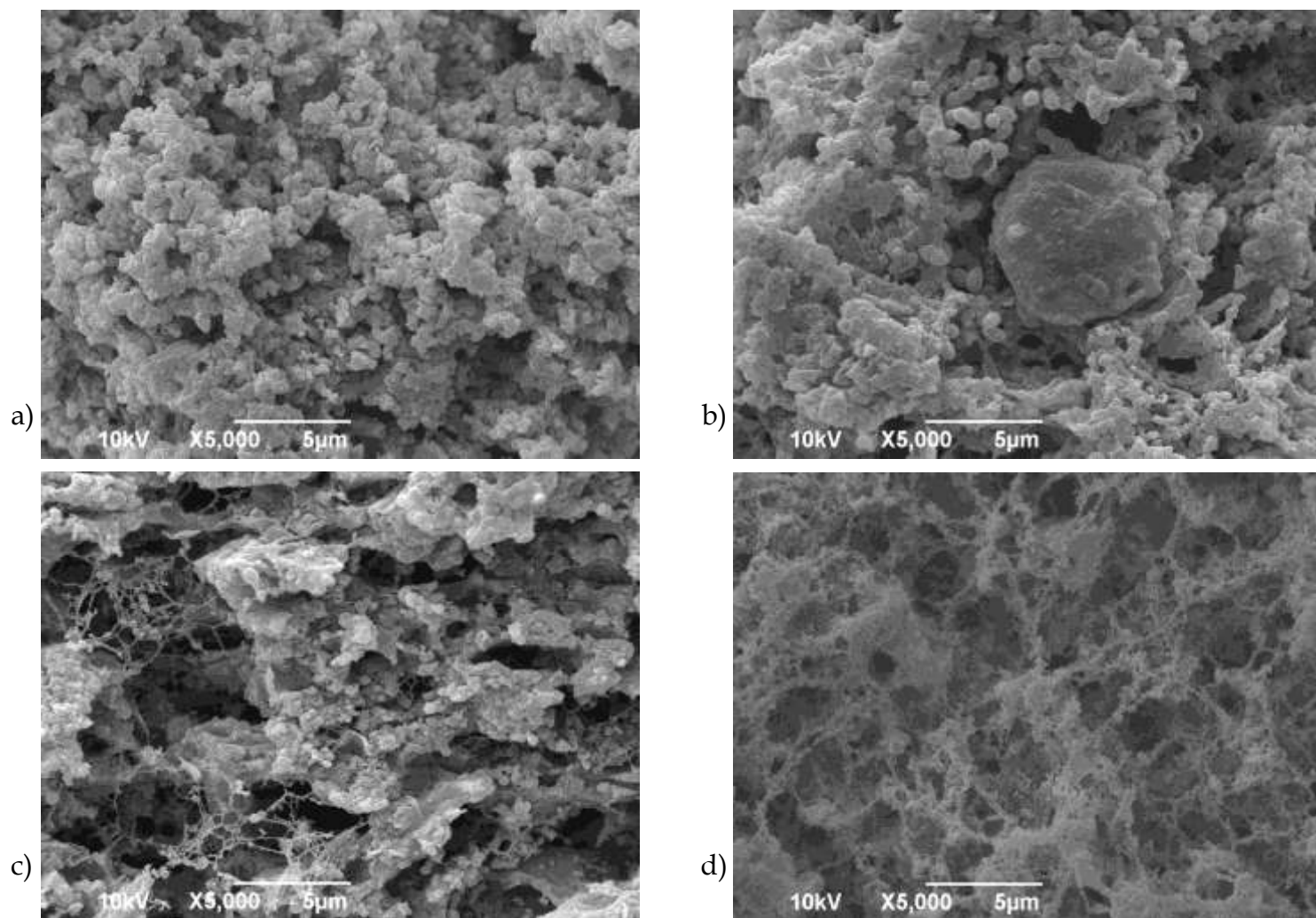


d)

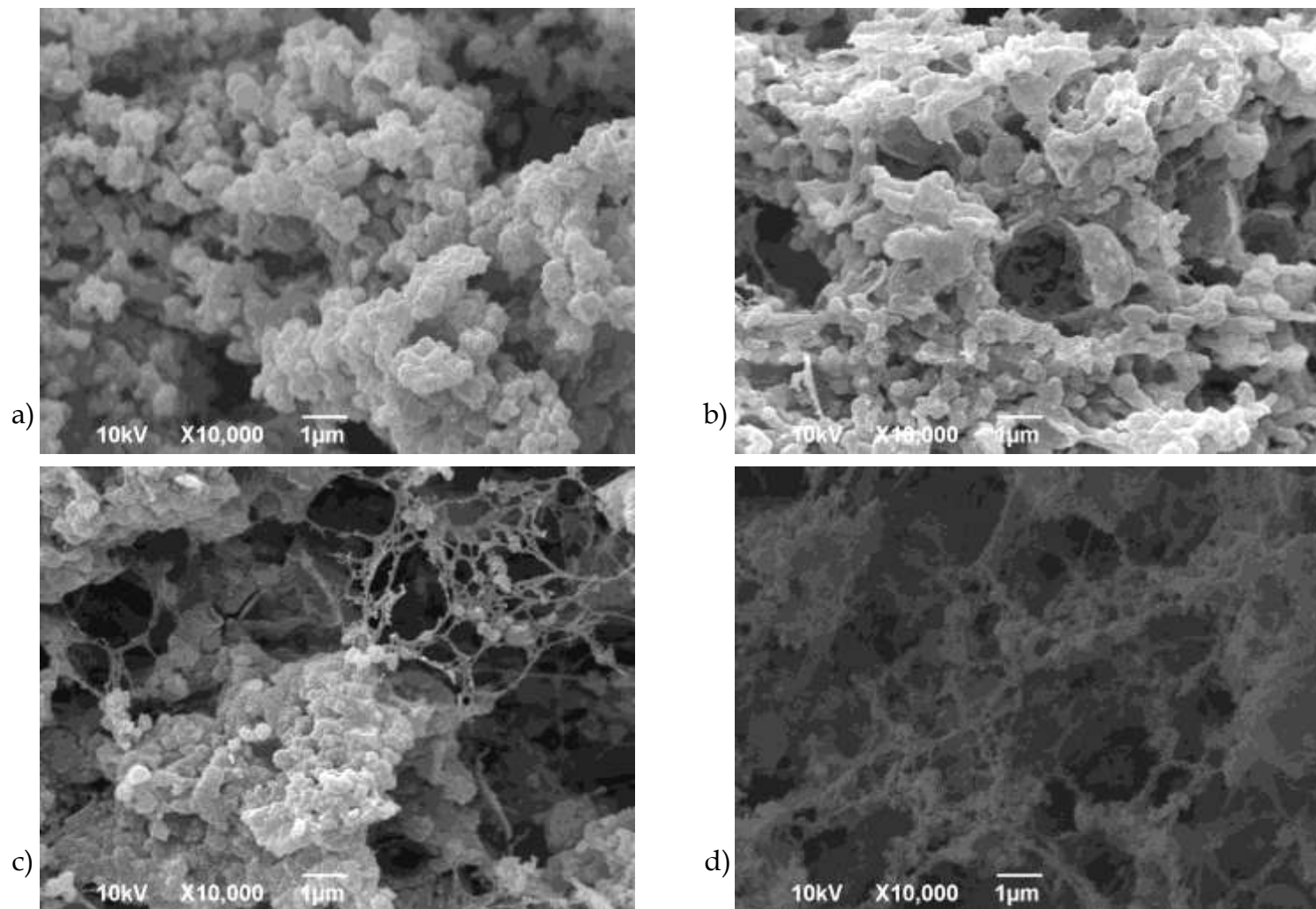
Slika 24. Mikrostruktura sireva prvog dana zrenja pri uvećanju od 1.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM); c) sir od odmrznutog gruša (FC); d) sir od odmrznute grude (FPC).



Slika 25. Mikrostruktura sireva prvog dana zrenja pri uvećanju od 2.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM); c) sir od odmrznutog gruša (FC); d) sir od odmrznute grude (FPC).



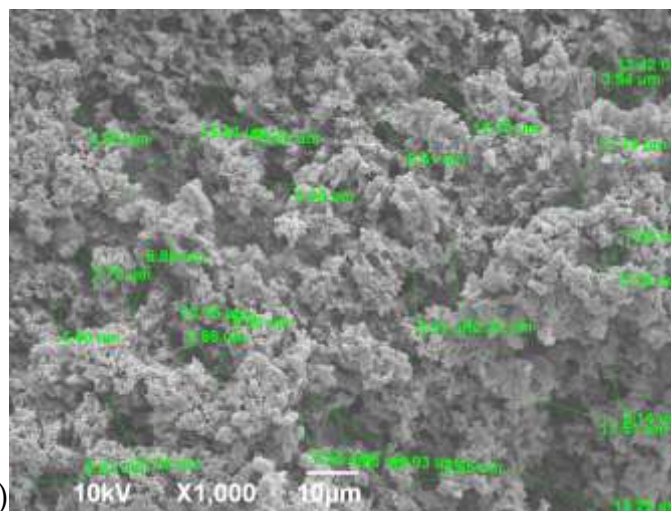
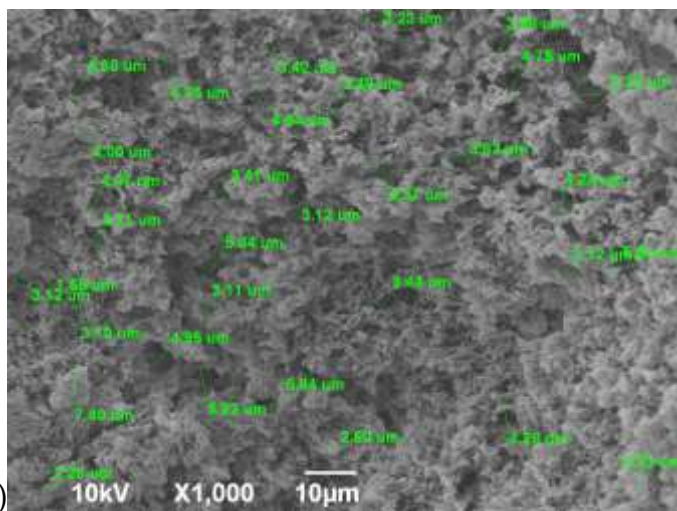
Slika 26. Mikrostruktura sireva prvog dana zrenja pri uvećanju od 5.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM); c) sir od odmrznutog gruša (FC); d) sir od odmrznute grude (FPC).



Slika 27. Mikrostruktura sireva prvog dana zrenja pri uvećanju od 10.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM); c) sir od odmrznutog gruša (FC); d) sir od odmrznute grude (FPC).

Sa slika koje prikazuju mikrostrukturu sireva prvog dana zrenja se takođe može zapaziti da se u strukturi nalaze i ćelije mikroorganizama kod kontrolnog sira, kao i kod sira od odmrznutog mleka. Kod varijanti koje su dobijene od odmrznutog gruša i odmrznute grude se ni na jednom uvećanju nisu mogle uočiti ćelije mikroorganizama. Ovo zapažanje je saglasno sa istraživanjem Alichanidis *i sar.* (1981), u kom se govori o intenzivnom odumiranju starterskih mikroorganizama posle 60 dana skladištenja smrznutog gruša. Odsustvo mikroorganizama na slikama koje prikazuju mikrostrukturu sireva dobijenih od odmrznutog gruša i grude (FC i FPC, redosledno) predstavlja još jednu potvrdu navoda iz poglavlja 5.4.1., gde se diskutovalo o odumiranju starterskih mikroorganizama.

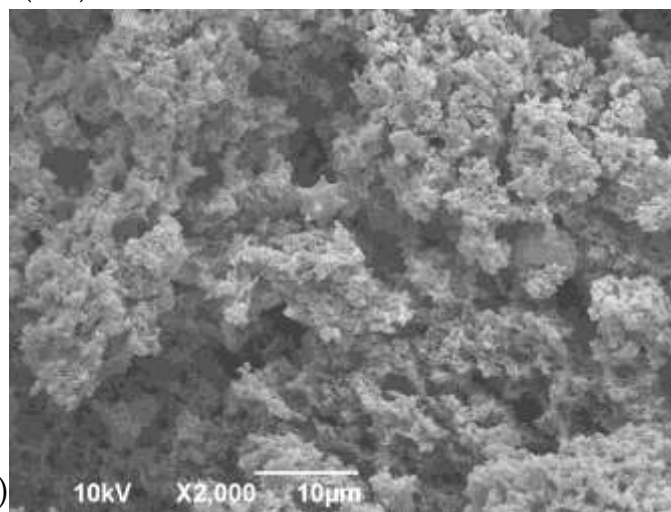
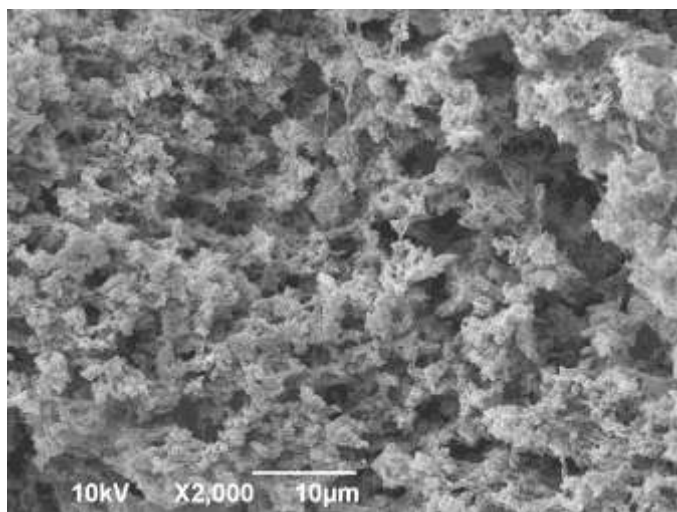
Na Slikama 28 - 31 prikazana je mikrostruktura 56-og dana zrenja kontrolne varijante sira i sira dobijenog od odmrznutog mleka (FM) na uvećanjima od 1.000x, 2.000x, 5.000x i 10.000x, redosledno. Ako se pogleda mikrostruktura sireva CC i FM 56-og dana zrenja uočava se da postoji veća sličnost između kontrolne varijante sira i varijante koja je dobijena od odmrznutog mleka nego što je to bio slučaj prvog dana zrenja. Takođe se uočava odsustvo šupljika koje su se mogle primetiti prvog dana zrenja kod varijante FM (Slika 24b). Imajući u vidu da je utvrđeno da postoji statistički značajna proteoliza ispitivanih varijanti sira (poglavlje 5.4.3) može se izneti pretpostavka da je utvrđena intenzivna proteoliza u toku prvih 14 dana zrenja doprinela promeni mikrostrukture varijante FM, iako je utvrđeno da je intenzitet proteolitičkih promena bio manjeg obima nego što je to slučaj sa varijantom CC. Ako zapažanjima o mikrostrukтури dodaju teksturalne promene ove dve varijante sira, može se uočiti da je razlika u čvrstoći i lomljivosti najizraženija na početku zrenja ove dve varijante sira (Slika 14 i 18, poglavlje 5.4.2). Na slikama koje predstavljaju mikrostrukturu 56-og dana zrenja, i dalje se može uočiti prisustvo mikroorganizama u proteinskom matriksu. Kod varijante CC može se uočiti nešto učestalija pojava tankih lanaca proteina u matriksu, što se može objasniti delovanjem proteolitičkih agenasa kao što su proteolitički enzimi starterske mikroflore i himozina.



a)

b)

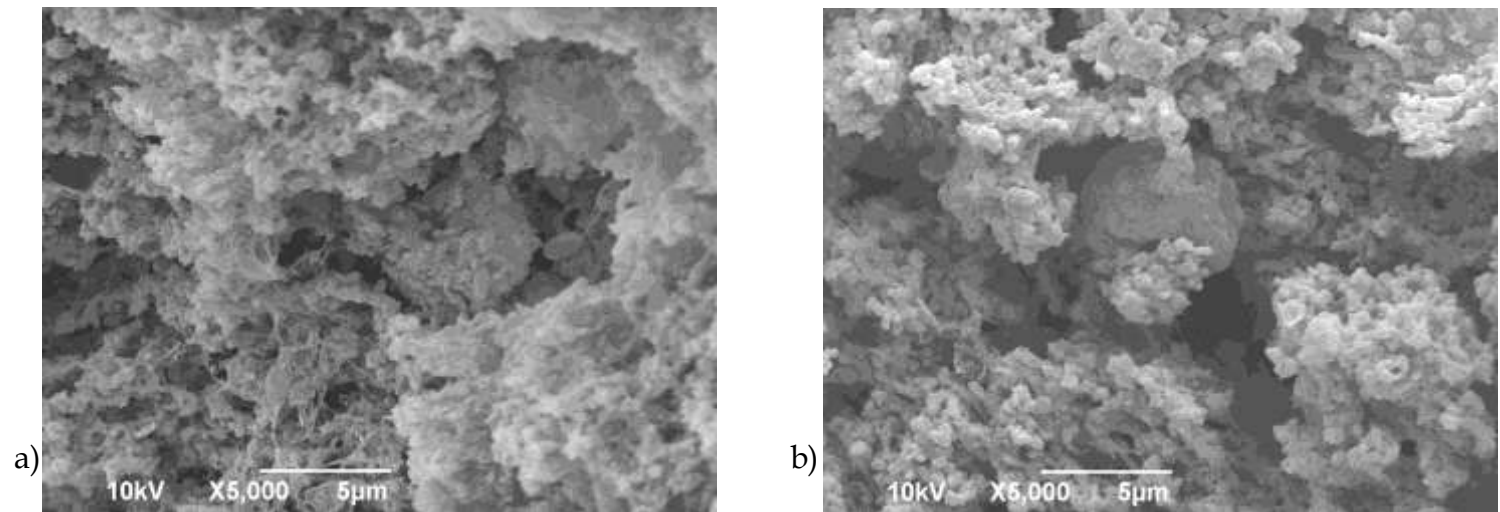
Slika 28. Mikrostruktura sireva 56-og dana zrenja pri uvećanju od 1.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM).



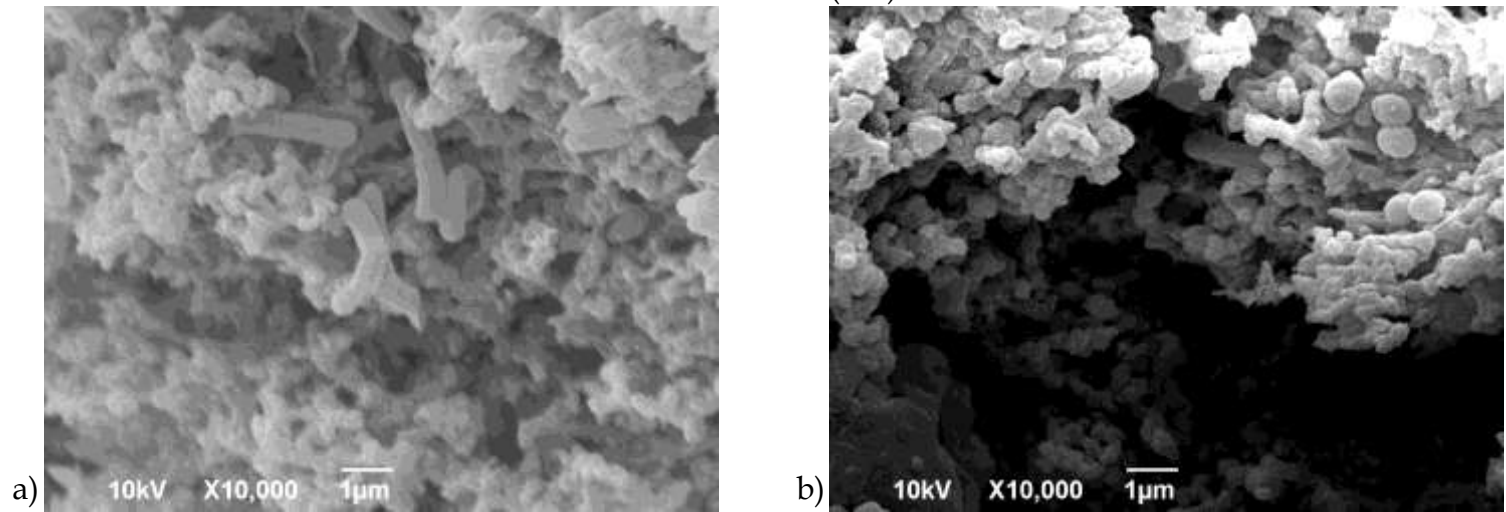
a)

b)

Slika 29. Mikrostruktura sireva 56-og dana zrenja pri uvećanju od 2.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM).



Slika 30. Mikrostruktura sireva 56-og dana zrenja pri uvećanju od 5.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM).



Slika 31. Mikrostruktura sireva 56-og dana zrenja pri uvećanju od 10.000x: a) kontrolni sir (CC); b) sir od odmrznutog mleka (FM).

5.4.5 Senzorna analiza sireva

U završnom delu ovog istraživanja vršena je senzorna analiza: kontrolnog sira 14-og dana zrenja (A), kontrolnog sira 56-og dana zrenja (B), sira od odmrznutog mleka 14-og dana zrenja (C) i sira od odmrznutog mleka 56-og dana zrenja (D). Sirevi su ocenjivani kako od strane potrošača, tako i od strane stručnog panela, sa ciljem da se utvrdi eventualna razlika između gorepomenutih varijanti sira.

Rezultati ispitivanja ukupne prihvatljivosti sireva od strane potrošača su prikazani u Tabeli 19. Potrošači su na sličan način ocenili prihvatljivost proizvoda kao celine, zatim prihvatljivost teksture i ukusa, odnosno između srednjih vrednosti ocena nije bilo statistički značajne razlike. Što se mirisa tiče statistički značajno niže ocenjen je sir proizveden od smrznutog mleka posle 56 dana zrenja (D), ali je važno napomenuti se on nije statistički značajno razlikovao od kontrolne varijante sira posle 56 dana zrenja (B). Pol ispitanih potrošača nije imao statistički značajan uticaj na vrednost ocena teksture i mirisa, ali je imao statistički značajan uticaj na vrednost ocena ukupne prihvatljivosti i ukusa. Ispitanici muškog pola su za ukupnu prihvatljivost i ukus u proseku davali ocene, 7,8 i 7,9, redosledno, dok su ispitanici ženskog pola za iste parametre dali ocenu 7,4. Iz ovih ocena se može uočiti da su ispitanici oba pola ocenili sireve sa visokim stepenom prihvatljivosti.

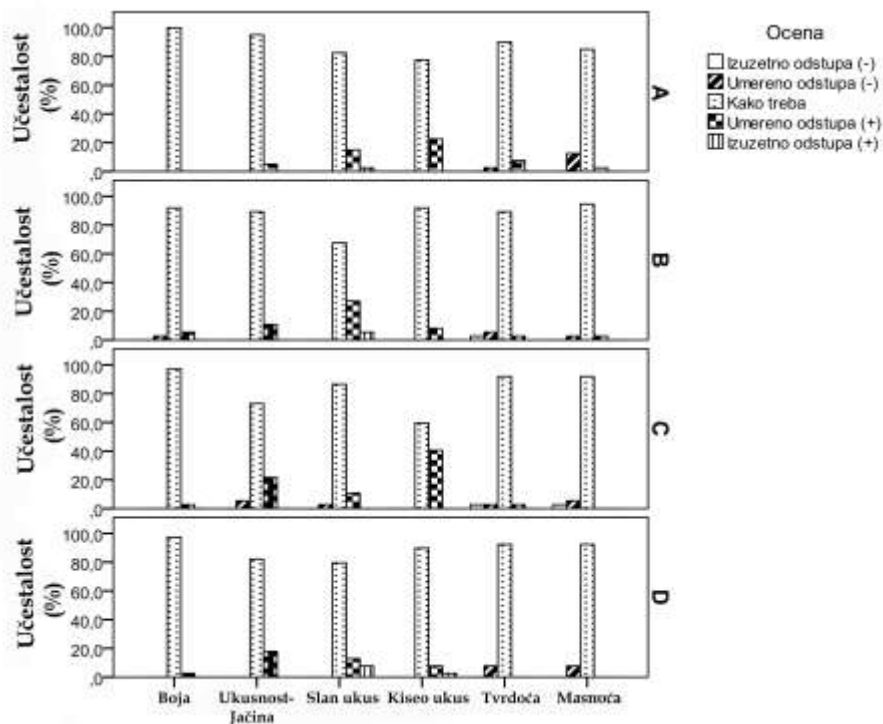
Tabela 19. Ocene prihvatljivosti sireva dobijene pomoću hedonske skale

Senzorno svojstvo Varijanta sira	Ukupna prihvatljivost	Tekstura	Ukus	Miris
A	8,2 ^a	7,6 ^a	8,2 ^a	8,07 ^a
B	8,0 ^a	7,8 ^a	8,1 ^a	7,5 ^{ab}
C	7,6 ^a	6,9 ^a	7,6 ^a	7,9 ^a
D	7,8 ^a	7,4 ^a	7,9 ^a	6,7 ^b

Vrednosti u kolonama obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju (na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$)

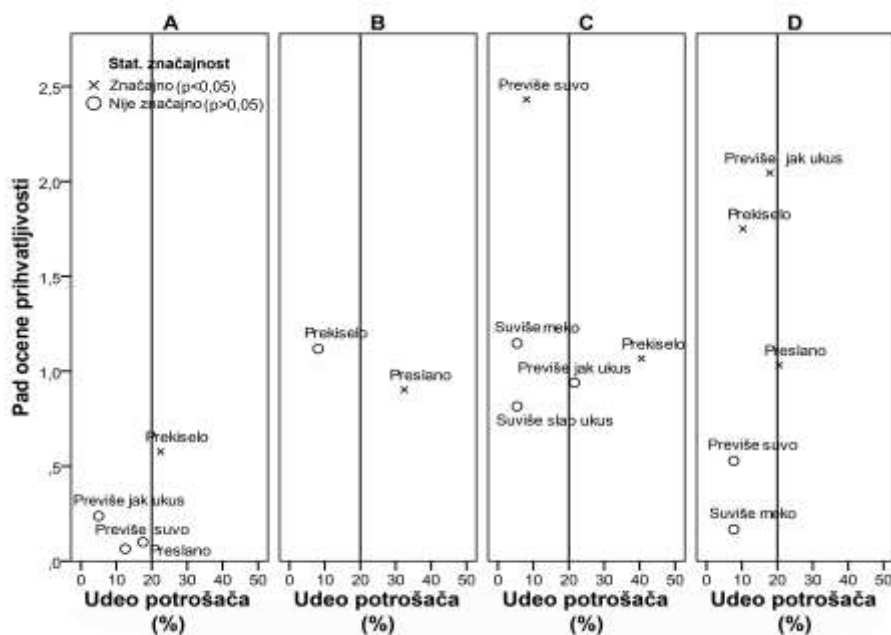
Varijanta sira: **A** - kontrolni sir nakon 14 dana zrenja; **B** - kontrolni sir nakon 56 dana zrenja; **C** - sir od smrznutog mleka nakon 14 dana zrenja; **D** -sira od smrznutog mleka nakon 56 dana zrenja

Na Slici 30 prikazane su distribucije frekvencija ocena ispitivanih potrošača JAR (eng. *just about right* – upravo onako kako treba) skalom. Može se uočiti da je veliki udeo potrošača davao ocene da su ispitivana svojstva onako kako treba da budu. Izuzetak se može videti kod varijante C gde je 59,5% ispitanika odgovorilo da je kiselost onako kako treba da bude, dok je 40,5% odgovorilo da je sir umereno prekiseo. Za varijantu B, 67,6% ispitanika je odgovorilo da je slanost onako kako treba da bude, dok je 27% ispitanika odgovorilo da je sir umereno preslan. Gledajući preostale ocene, potrošači su u najmanje 73% slučajeva odgovarali da su svojstva onakva kakva treba da budu. Podaci dobijeni primenom skale „upravo onako kako treba da bude”, dalje su iskoršćeni za određivanje pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti proizvoda (eng. *mean drop analysis*).



Slika 30. Distribucija frekvencije ocena potrošača dobijenih korišćenjem JAR skale
Varijanta sira: A – kontrolni sir nakon 14 dana zrenja; B – kontrolni sir nakon 56 dana zrenja; C – sir od smrznutog mleka nakon 14 dana zrenja; D – sir od smrznutog mleka nakon 56 dana zrenja

Rezultati analize pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti ocenjivanih sireva prikazani su na Slici 31. U poglavlju koje se odnosi na **Materijal i metode** navedeno je da su sve grupe koje su brojale više ili jednako 20% od ukupnog broja testiranih potrošača smatrane kao značajno velike. Ovo znači da se za sve vrednosti pada ocene ukupne prihvatljivosti, koje su statistički značajne i koje se na dijagramima nalaze desno od graničnih 20% potrošača, može izvesti zaključak da su potrošači ocenili posmatrani uzorak kao proizvod sa većim ili manjim intenzitetom posmatranog svojstva u odnosu na proizvod "kako treba da bude". Sa slike se može videti da kod svih ispitivanih sireva postoji statistički značajna vrednost pada ukupne prihvatljivosti koja se nalazi desno od granične linije, koja označava 20% potrošača. Kod sira A (kontrolni uzorak sira, 14-og dana zrenja), 22,5% potrošača ocenilo je sir kao previše kiseo. Kod sira B (kontrolni uzorak sira, 56-og



Slika 31. Analiza pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti ocenjivanih sireva
Varijanta sira: A – kontrolni sir nakon 14 dana zrenja; B – kontrolni sir nakon 56 dana zrenja; C –sir od smrznutog mleka nakon 14 dana zrenja; D –sir od smrznutog mleka nakon 56 dana zrenja

dana zrenja), 32,4% potrošača je ocenilo sir kao previše slan. Kod sira C (varijanta proizvedena od odmrznutog mleka, 14-og dana zrenja), 40,5% potrošača je ocenilo sir kao previše kiseo. Takođe, ovaj sir je statistički značajno ocenjen kao previše suv, ali samo od 8,1% potrošača. Kod sira D (varijanta proizvedena od odmrznutog mleka, 56-og dana zrenja), 20,5% potrošača je ocenilo sir kao previše slan. Ovaj sir je, takođe, statistički značajno ocenjen da ima previše jak ukus i da je previše kiseo, ali samo od 17,9 i 10,3% potrošača redosledno. Može se reći da je analizom pada srednje vrednosti ocene ukupne prihvatljivosti utvrđeno da su sirevi A i C dobili nešto slabije ocene za ukupnu prihvatljivost usled toga što su bili previše kiseli, dok su sirevi B i D slabije ocenjeni usled toga što su bili previše slani. Sirevi nisu statistički značajno menjali svoju pH vrednost u toku zrenja (Tabela 15), te je neobičan podatak da su 14-og dana (sirevi A i C) ocenjeni kao previše kiseli, a da su 56-og dana (sirevi B i D) ocenjeni kao previše slani, iako se udeo soli statistički značajno ne menja od 14-og do 56-og dana zrenja (Tabela 15). Ova neobičnost se može objasniti time da određeni broj potrošača usled intenzivno percepiranog jednog ukusa, nije dovoljno dobro percepirao drugi i obrnuto, a da su zapravo sva četiri sira bila previše slana i kisela. S obzirom da su sva četiri ispitivana sira imala relativno visoku vrednost za ocenu ukupne prihvatljivosti (Tabela 19), ova informacija dobijena od strane potrošača bi trebalo da se shvati prvenstveno u smislu mere poboljšanja proizvoda.

Na osnovu ankete prikazane u Tabeli 3 (poglavlje **Materijal i metode**), koja je bila postavljena potrošačima iz ovog ogleda, može se dati odgovor na dva pitanja: koji je najvažni ograničavajući faktor pri kupovini kozjih sireva i koji su razlozi zbog kojih bi potrošači kupovali kozji sir. Sumiranjem rangova koje su potrošači navodili u anketi i pronalaženjem statistički značajnih razlika između suma rangova dobijeni su rezultati, koji su prikazani u Tabelama 20 i 21.

Tabela 20. Stavovi potrošača u pogledu ograničavajućih faktora pri kupovini kozjih sireva

Faktor	Suma rangova
Visoka cena	78 ^a
Slaba ponuda	86 ^a
Specifičan ukus	114 ^b
Nepostojanje navike	122 ^b

Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju (na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$)

*što je suma rangova manja faktor je značajniji

Iz Tabele 20 može se zaključiti da su dva najvažnija ograničavajuća faktora pri kupovini kozjih sireva visoka cena i slaba ponuda sireva na tržištu, kao i da su specifičan ukus i nepostojanje navike manje važni faktori u odnosu na prethodna dva. Slaba ponuda kozjih sireva na tržištu bi se svakako mogla korigovati smrzavanjem mleka, kako bi bilo dostupno za proizvodnju i van perioda laktacije, čime bi se eventualno postigla i prihvatljivija cena zbog porasta ponude. Najvažniji faktori pri kupovini kozjih sireva su prikazani u Tabeli 21. Može se zaključiti da su tri faktora podjednako važna pri kupovini kozjih sireva: da potrošači vole kozje sireve, da postoje pozitivni zdravstveni efekti i da potrošači vole da probaju nove ukuse. Statistički značajno manje važan faktor za kupovinu je „zato što je u trendu“.

Tabela 21. Stavovi potrošača po pitanju razloga za kupovinu kozjih sireva

Faktor	Suma rangova
Volim kozji sir	73 ^a
Pozitivni zdravstveni efekti	82 ^a
Volim nove ukuse	92 ^a
Zato što je u trendu	153 ^b

Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju (na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$)

Anketa je takođe dala informacije da 82,5% potrošača iz ovog istraživanja često konzumira sireve, dok ih 17,5% konzumira povremeno. Udeo od 32,5% potrošača konzumira kozje sireve često, 37,5% povremeno, a 30% ih konzumira retko. Na pitanje „koji tip sira najčešće kupuju“ (moguće je bilo zaokružiti više odgovora) odgovori su bili sledeći:

- 1 - Sireve u tipu Parmezan i Pekorino kupuje 22,5% ispitivanih potrošača
- 2 - Polutvrde sireve (tipa Edam, Trapist, Gauda) kupuje 62,5% ispitivanih potrošača
- 3 - Sireve sa belim plesnima kupuje 27,5% ispitivanih potrošača
- 4 - Sireve sa biljnim dodacima kupuje 2,5% ispitivanih potrošača
- 5 - Bele sireve (Kriška, Feta, Švapski) kupuje 90% ispitivanih potrošača
- 6 - Topljene sireve kupuje 30% ispitivanih potrošača
- 7 - Sirne namaze (krem sir, „ala kajmak“) kupuje 60% ispitivanih potrošača

Vrlo značajan aspekt ovog dela istraživanja predstavlja ocenjivanje sireva od strane stručnog panela, sačinjenog od eksperata iz oblasti senzorne analize i tehnologije mleka. Ocenjivanje je izvršeno u skladu sa kriterijumima utvrđenim u poglavlju **Materijal i metode**. U Tabeli 22 su prikazane prosečne ocene ispitivanja senzornog kvaliteta sireva.

Tabela 22. Rezultati ispitivanja senzornog kvaliteta sireva

Senzorno svojstvo Varijanta sira	Ocena ukupnog kvaliteta	Izgled	Miris	Tekstura	Ukus
A	4,4 ^a	4,9 ^a	4,6 ^{ab}	3,7 ^a	4,7 ^a
B	4,5 ^a	5,00 ^a	4,0 ^a	4,6 ^b	4,5 ^a
C	4,3 ^a	4,9 ^a	4,8 ^b	3,7 ^a	4,2 ^a
D	4,3 ^a	5,0 ^a	4,2 ^{ab}	3,9 ^a	4,5 ^a

Vrednosti u kolonama obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju (na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$)

Varijanta sira: **A** - kontrolni sir nakon 14 dana zrenja; **B** - kontrolni sir nakon 56 dana zrenja; **C** -sir od smrznutog mleka nakon 14 dana zrenja; **D** - sir od smrznutog mleka nakon 56 dana zrenja

Analizom varijanse je utvrđeno da je proizvod, kao faktor, (sirevi A, B, C i D) imao uticaj na vrednosti ocena senzornog kvaliteta za svojstva mirisa i teksture. Efekat ocenjivača je bio statistički značajan samo na ocenu svojstva mirisa, a koeficijent interklasne korelacije je iznosio 0,533. Ocena mirisa sira B se statistički značajno razlikovala od ocena sira C, ali se nije razlikovala od ocena za sireve A i D. Takođe se i

ocena mirisa sira C nije statistički značajno razlikovala od ocena za sireve A i D. Ocena teksture za sir B je bila statistički značajno viša od ocena za ostale sireve. Bez obzira na pomenute razlike, važno je istaći da je ukupan kvalitet sira B ocenjen kao odličan, dok su ostali sirevi bili ocenjeni vrlo dobrim kvalitetom. Uočeno je da je glavni razlog da ostali sirevi ne budu ocenjeni odličnim kvalitetom lošija tekstura koja se manifestovala kroz izraženiju mekoću ovih sireva, o čemu svedoče i ocene koje su ocenjivači davali za teksturu (Tabela 22). Sirevi A i C, kao i sirevi B i D, predstavljaju kontrolnu varijantu sira i sir proizveden od odmrznutog mleka (redosledno) u istim stadijumima zrenja (A i C - 14 dana zrenja, a B i D - 56 dana zrenja). Imajući to u vidu važno je primetiti da se prema mirisu sirevi A i C ne razlikuju, kao što se ne razlikuju ni B i D. Iako se među ispitivanim sirevima mogu uočiti razlike u senzornim svojstvima, svi sirevi su ocenjeni vrlo prihvatljivim ocenama, što je uostalom bio slučaj i pri ispitivanju potrošača.

6. Zaključci

1. Sadržaj mlečne masti, proteina, suve materije bez masti, laktoze, mineralnih materija, kao i titraciona kiselost, pH vrednost i tačka mržnjenja, kozjeg mleka Sanske rase, statistički značajno variraju tokom laktacije. U srednjem periodu laktacije koji obuhvata period od početka juna do početka septembra ispitivana svojstva kozjeg mleka imaju statistički značajno niže vrednosti u odnosu na vrednosti koje su izmerene u ranom i kasnom periodu laktacije. Posmatrajući glavna fizičko-hemijska svojstva, najviše je bilo izraženo smanjenje sadržaja mlečne masti, dok je smanjenje sadržaja proteina, laktoze i suve materije bez masti bilo manjeg obima. Najniže vrednosti za ova svojstva su izmerene tokom avgusta, dok su najviše vrednosti izmerene u decembru.
2. Posmatrajući svojstva pH vrednosti, titracione kiselosti, može se zaključiti da titraciona kiselost ima najnižu vrednost kada je najniži udeo mineralnih materija, proteina i laktoze, pri čemu nizak udeo ovih komponenti rezultuje povišenom vrednosti za tačku mržnjenja. Razlike u pH vrednosti između perioda laktacije su bile male ($\pm 0,04$ jedinice), iako je postojala statistički značajna razlika.
3. Visoka temperatura vazduha imala je negativan uticaj na fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka Sanske rase. Najviši (negativan) koeficijent korelacije temperatura vazduha je pokazala sa udelom mlečne masti, a jedino svojstvo koje nije u statistički značajnoj korelaciji sa temperaturom vazduha je pH vrednost.
4. Insolacija, odnosno broj sunčanih sati, je još jedan klimatski faktor od kog zavise fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka. Fizičko-hemijska svojstva kozjeg mleka su bila u statistički značajnoj korelaciji sa ovim klimatskim faktorom. Kao u slučaju sa temperaturom vazduha, i insolacija ima najvišu vrednost koeficijenta korelacije sa sadržajem mlečne masti. Visoka insolacija i visoke vrednosti temperature vazduha zajedno utiču na smanjenje unosa hrane kod životinja i povećani unos vode, što je neposredan uzrok nižih vrednosti za fizičko-hemijska svojstva mleka.

5. Samo tri fizičko-hemijska svojstva su pokazala statistički značajnu zavisnost od relativne vlažnosti vazduha: udeo mlečne masti, pH vrednost i titraciona kiselost. Za sva tri pomenuta svojstva koeficijenti korelacije su manji od 0,70.
6. Indeks temperature i vlažnosti vazduha (THI) je bio u statistički značajnoj korelaciji sa svim ispitivanim fizičko-hemijskim svojstvima, osim pH vrednosti. I ovaj parametar je pokazao najviši koeficijent korelacije sa sadržajem mlečne masti u mleku. S obzirom da je pri višim vrednostima ovog indeksa došlo do statistički značajnog pada vrednosti fizičko-hemijskih svojstava, može se pretpostaviti da su Sanske koze u letnjim mesecima doživljavale stres izazvan toplotom, kao i da se taj stres javljao pri nešto nižim vrednostima indeksa temperature i vlažnosti od kritične granice koja je uspostavljena za muzne krave.
7. Vreme skladištenja smrznutog kozjeg mleka Sanske rase je imalo statistički značajan uticaj na promenu pH vrednosti (nivo značajnosti od $\alpha=0,05$) tek na kraju skladištenja od 60 dana. Poznato je da tokom smrzavanja može doći do precipitacije kalcijumfosfata, a samim tim i do promene pH vrednosti. Na osnovu ranijih saznanja, može se izneti pretpostavka da se pH smanjuje tek pred kraj skladištenja mleka u smrznutom stanju zbog velikog udela frakcije β -kazeina u kozjem mleku, koji je slabo fosforilovan, pri čemu se vezivanje kalcijumovih jona smanjuje povećanjem jonske jačine prilikom smrzavanja.
8. Parametri sirišne koagulacije kao što su: vreme koagulacije, brzina agregiranja i čvrstina gela, se nisu značajno menjali posle skladištenja mleka Sanske rase koza u smrznutom stanju u trajanju od 60 dana. Ipak, ova tvrdnja se ne može sa sigurnošću odnositi i na mleko drugih rasa koza. Izostanak uticaja smrzavanja mleka na reološke parametre sirišne koagulacije je veoma važan zaključak, jer se oni koriste za predviđanje efikasnosti postupka proizvodnje sireva.
9. Kratkotrajno skladištenje u smrznutom stanju (7 dana) kozjeg mleka i gruševa smrznutih u različitim fazama presovanja imalo je statistički značajan uticaj na fizičko-hemijska i teksturalna svojstva sireva. Smrzavanjem gruša došlo je do oštećenja na proteinskom matriksu koja su dovela do povećanja neuređene

proteinske strukture u siru, što je doprinelo izdvajanju veće količine vode tokom otapanja gruša, kao i promenama fizičko-hemijskih i teksturalnih svojstava ispitivanih uzoraka. Rehidriranje odmrznutih uzoraka gruša u direktnom kontaktu sa surutkom pozitivno je uticalo samo u slučaju gruševa koji su bili smrznuti u kasnijoj fazi presovanja. Sadržaj VuBMS kod ovih uzoraka sira je ipak bio niži nego kod kontrolnog sira, što je rezultiralo i razlikama koje su zapažene u teksturi sireva.

10. Varijante sira od gruša smrznutog u ranijim fazama presovanja, kao i varijanta sira od smrznutog mleka, imale su manji udeo MuSM u krajnjem proizvodu, jer nakon njihovog odmrzavanja i mleka posle 7 dana skladištenja tek sledi faza presovanja, odnosno izdvajanje surutke. Smrzavanje kozjeg mleka i gruša uticalo je na veće gubitke masti tokom izdvajanja surutke u fazi presovanja, zbog promena na proteinima koje su izazvane smrzavanjem.
11. Utvrđeno je da se i kod kozjeg mleka tokom procesa smrzavanja smanjuje puforni kapacitet, što ima za posledicu da sir proizveden od ovakvog mleka ima najnižu pH vrednost.
12. Sirevi, čiji je gruš smrznut odmah posle faze samopresovanja, imali su statistički značajno čvršću teksturu od sireva čiji je gruš smrznut posle prve faze presovanja, jer su se obe faze presovanja odvijale nakon odmrzavanja, a promene na proteinskom matriksu su se već dogodile.
13. Statističkom obradom podataka, koja je izvršena pomoću kvadratnog Ivanovićevog odstojanja, pri kratkotrajnom skladištenju smrznutog mleka i gruša ustanovljeno je da je sir od odmrznutog mleka bio najbliži kontrolnom siru prema svim ispitivanim fizičko-hemijskim i teksturalnim svojstvima. Sirevi koji su proizvedeni od gruša koji je bio smrznut u kasnijim fazama presovanja su sličniji kontrolnoj varijanti sira od sireva proizvedenih od gruša koji je smrznut odmah nakon faze samopresovanja. Takođe, sirevi koji su proizvedeni od gruša dogrevanog u direktnom kontaktu sa surutkom su sličniji kontrolnom siru od varijanti kod kojih je dogrevanje vršeno indirektnim kontaktom s vodom. Mogućnost kvadratnog Ivanovićevog odstojanja da integriše veliki broj promenljivih u jednu veličinu, kao i

da se na osnovu dobijene veličine rangiraju eksperimentalne varijante sireva prema sličnosti, pokazala se u ovom istraživanju kao veoma efektivna i korisna.

14. Ispitivanja uticaja dugotrajnog skladištenja (60 dana) kozjeg mleka, gruš a i grude u smrznutom stanju na svojstva sireva su pokazala da sirevi proizvedeni od odmrznute gruš e i grude su neodrživi nakon 14 dana zrenja. Navedeni sirevi su imali visoku početnu pH vrednost, zbog jakog pufernog kapaciteta kozjeg mleka u tom periodu laktacije, kao i zbog negativnog uticaja skladištenja u smrznutom stanju na vijabilnost ć elija starterskih mikroorganizama. Visoka pH vrednost ovih varijanti sira, kao i utvrđ ena oštećenja u mikrostrukturi, prouzrokovana skladištenjem u smrznutom stanju, dovela su do raspadanja sirne mase koja je ustanovljena 14-og dana zrenja.
15. Tekstura kontrolnog sira i sira proizvedenog od mleka odmrznutog nakon 60 dana skladištenja u smrznutom stanju (FM) se statistički značajno razlikovala u pogledu čvrstoće, lomljivosti i brzine relaksacije. Kontrolni sir je pokazao veću čvrstoću i lomljivost od sira FM, zbog manjeg sadržaja VuBMS.
16. Ispitivanjem teksture testom relaksacije potvrđeno je da se i kontrolna i eksperimentalna varijanta sira ponašaju u skladu sa Pelegovim modelom, te se izračunati Pelegovi koeficijenti mogu posmatrati kao pokazatelji viskoelastičnih karakteristika ispitivanih sireva.
17. Sadržaj VuBMS i sadržaj soli u siru su svojstva koja su pokazala najviše korelacije sa ispitivanim parametrima teksture. Ova dva hemijska svojstva sira pokazala su najveći značaj u formiranju teksture.
18. Utvrđeno je da frakcija β - kazeina ne podleže proteolitičkim promenama tokom zrenja eksperimentalnih sireva. Značajna proteoliza α_s - kazeina odvijala se u toku prvih 14 dana zrenja, pri čemu je statistički značajno slabija proteoliza bila kod sira proizvedenog od mleka odmrznutog nakon 60 dana skladištenja u smrznutom stanju (FM), iako je ovaj sir imao nižu pH vrednost od kontrolne varijante, što pogoduje jačem proteolitičkom dejstvu himozina na α_s - kazein. Promene u strukturi proteina, tokom skladištenja smrznutog mleka, mogu biti uzrok ove

pojave. Proteoliza α_s - kazeina imala je uticaj i na promenu teksture tokom zrenja, što pokazuje statistički značajna korelacija udela α_s - kazeina u ukupnom kazeinu sa svojstvima kao što su elastičnost, kohezivnost i žvackljivost.

19. Pelegovi koeficijenti (A i B), takođe pokazuju promene tokom perioda zrenja. Udeo soli je jedino fizičko-hemijsko svojstvo koje je u korelaciji sa Pelegovim koeficijentima. Promene u ovim koeficijentima ukazuju na promenu viskoelastičnih svojstava eksperimentalnih sireva tokom zrenja, uslovljenu reorganizacijom proteinskog matriksa pod uticajem značajne proteolize α_s - kazeina.
20. Mikrostruktura eksperimentalnih varijanti sira potvrdila je negativan uticaj smrzavanja i skladištenja na proteinski matriks sireva proizvedenih od odmrznutog gruša i grude. Navedene varijante pokazale su mikrostrukturu koja je vrlo neuređena sa velikim brojem finih i tankih lanaca proteina u matriksu. Kod sira proizvedenog od mleka odmrznutog nakon 60 dana skladištenja u smrznutom stanju (FM), prvog dana zrenja se uočavaju šupljine koje su i preko 2 puta većeg prečnika od prečnika masnih globula. Posmatranjem mikrostrukture se takođe uočava prisustvo mikroorganizama kod kontrolne varijante sira i varijante FM, dok se kod varijanti proizvedenih od odmrznutog gruša i grude mikroorganizmi ne mogu uočiti. Na kraju zrenja mikrostruktura varijante FM postaje uređenija i kompaktnija, te su i razlike u mikrostrukтури između ova dva sira nešto slabije uočljive, što je verovatno posledica određenog obima proteolize i reorganizacije matriksa.
21. Senzorno ispitvanje koje su izvršili potrošači i stručni panel pokazali su da postoje izvesne razlike u senzornim svojstvima između kontrolne varijante sira i varijante proizvedene od mleka odmrznutog nakon 60 dana skladištenja u smrznutom stanju (FM). Međutim, imajući u vidu praktičan značaj ocena senzornih svojstava od strane potrošača i stručnog panela, utvrđeno je da su potrošači sve sireve ocenili kao vrlo prihvatljive, a stručni panel je dao ocene u rasponu vrlo dobrog i odličnog kvaliteta. Na osnovu navedenog, može se izvesti zaključak da smrzavanje mleka ne utiče značajno na senzorna svojstva kozjih sireva u salamuri.

22. Konačan zaključak ove disertacije je da smrzavanje kozjeg mleka, gruša i grude utiče na svojstva kozjih sireva u salamuri. Eksperimentalni sir proizveden od odmrznutog mleka pokazao je najbližnja svojstva kontrolnom siru u ogleđima pri kratkotrajnom i dugotrajnom skladištenju u smrznutom stanju, a odmrznuto mleko je pokazalo nepromenjena svojstva sirišne koagulacije u odnosu na sirovo. Isti sir je 14-og i 56-og dana zrenja ocenjen kao prihvatljiv od strane potrošača i od strane ocenjivača, pa se rezultati ove disertacije mogu iskoristiti za početak usavršavanja proizvodnje sira u salamuri na ovaj način, kako bi se premostila sezonska proizvodnja kozjeg mleka, ili kako bi se smrznuto mleko koristilo za standardizaciju sastava kozjeg mleka u periodu kada je ono nešto slabijih fizičko-hemijskih svojstava. Sirevi proizvedeni od odmrznutog gruša i grude nakon dugotrajnog skladištenja pokazali su se kao neodrživi tokom perioda zrenja, te su potrebna dalja istraživanja da se uočeni problem prevaziđe.

7. Literatura

- Alichanidis E.** 2007 Cheeses ripened in brine. in *Cheese problems solved*, pp. 330-342 (Ed. PLH McSweeney). Woodhead Publishing
- Alichanidis E. & Polychroniadou A.** 2008 Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science & Technology* **88**(4): 495-510
- Alichanidis E., Polychroniadou A., Tzanetakis N. & Vafopoulou A.** 1981 Teleme cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science* **64**(5): 732-739
- Alloggio V., Caponio F., Pasqualone A. & Gomes T.** 2000 Effect of heat treatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. *Food Chemistry* **70**(1): 51-55
- Alvarenga N., Canada J. & Sousa I.** 2011 Effect of freezing on the rheological, chemical and colour properties of Serpa cheese. *Journal of Dairy Research* **78**(01): 80-87
- Ambrosoli R., di Stasio L. & Mazzocco P.** 1988 Content of α_{s1} -casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science* **71**(1): 24-28
- Andrews A. T.** 1983 Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* **50**(1): 45-55
- Anema S. G. & Stanley D. J.** 1998 Heat-induced, pH-Dependent Behaviour of Protein in Caprine Milk. *International Dairy Journal* **8**(10-11): 917-923
- Anese M. & Gormley R.** 1996 Effects of dairy ingredients on some chemical, physico-chemical and functional properties of minced fish during freezing and frozen storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **29**: 151-157
- AOAC** 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 841-842, 807-809pp.
- Ardö Y. & Polychroniadou A.** 1999 *Laboratory manual for chemical analysis of cheese*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities
- Asteri I.-A., Kittaki N. & Tsakalidou E.** 2010 The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* **63**(2): 234-242
- Attaie R. & Richter R. L.** 2000 Size Distribution of Fat Globules in Goat Milk. *Journal of Dairy Science* **83**(5): 940-944
- Bald W. B.** 1991 Ice crystal formation in idealised freezing systems. in *Food Freezing: Today and Tomorrow*, pp. 67-80 (Ed. WB Bald). Springer-Verlag
- Barać M. B., Smiljanić M., Pešić M. B., Stanojević S. P., Jovanović S. T. & Maćej O. D.** 2013 Primary proteolysis of white brined goat cheese monitored by high molarity Tris buffer SDS- PAGE system. *Mljekarstvo* **63**(3): 122-131
- Bjerg M., Rasmussen M. D. & Nielsen M. O.** 2005 Changes in the freezing point of blood and milk during dehydration and rehydration of lactating cows. *Journal of Dairy Science* **88**(9): 3174-3185
- Bönisch M. P., Heidebach T. C. & Kulozik U.** 2008 Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids* **22**(2): 288-297

- Bontinis T. G., Mallatou H., Pappa E. C., Massouras T. & Alichanidis E.** 2012 Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research* **105**(1-3): 193-201
- Bouraoui R., Lahmar M., Majdoub A., Djemali M. n. & Belyea R.** 2002 The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research* **51**(6): 479-491
- Boyazoglu J., Hatziminaoglou I. & Morand-Fehr P.** 2005 The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research* **60**(1-2): 13-23
- Brendehaug J. & Abrahamsen R. K.** 1986 Chemical composition of milk from a herd of Norwegian goats. *Journal of Dairy Research* **53**(2): 211-221
- Brouček J., Mihina Š., Ryba Š., Tongel P., Kišac P., Uhrinčat M. & A. H.** 2006 Effects of high air temperatures on milk efficiency in dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* **51**(3): 93-101
- Buňka F., Pachlová V., Pernická L., Burešová I., Kráčmar S. & Lošák T.** 2013 The Dependence of Peleg's Coefficients on Selected Conditions of a Relaxation Test in Model Samples of Edam Cheese. *Journal of Texture Studies* **44**(3): 187-195
- Buttkus H.** 1970 Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *Journal of Food Science* **32**: 558-652
- CAC** 2013: Codex General Standard for Cheese. 283-1978. FAO and WHO.
- Calvo M. M.** 2000 Effects of preservation treatments and ultrafiltration on chemical and technological properties of goat dairy products. 7th International Conference on Goats, France, 15-21 May: 564-567
- Carić M., Milanović S. & Vucelja D.** 2000 Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Novi Sad: Tehnološki fakultet
- Casper J. L., Wendorff W. L. & Thomas D. L.** 1998 Seasonal Changes in Protein Composition of Whey from Commercial Manufacture of Caprine and Ovine Specialty Cheeses. *Journal of Dairy Science* **81**(12): 3117-3122
- Centeno J. A., Tomillo F. J., Fernández-García E., Gaya P. & Nuñez M.** 2002 Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* **85**(12): 3164-3172
- Cheftel J. C., Thiebaud M. & Dumay E.** 2002 Pressure-assisted freezing and thawing: a review of recent studies. *High Pressure Research* **22**: 601-611
- Chen B., Lewis M. J. & Grandison A. S.** 2014 Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry* **158**: 216-223
- Clark S. & Sherbon J. W.** 2000 Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research* **38**(2): 123-134
- Connell J. J.** 1959 Aggregation of myosin during frozen storage. *Nature* **183**: 664-665
- Cozzolino A., Di Pierro P., Mariniello L., Sorrentino A., Masi P. & Porta R.** 2003 Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38**(3): 289-295

- Diefes H. A., Rizvi S. S. H. & Bartsch J. A.** 1993 Rheological Behavior of Frozen and Thawed Low-Moisture, Part-Skim Mozzarella Cheese. *Journal of Food Science* **58**(4): 764-769
- Dimassi O., Neidhart S., Carle R., Mertz L., Migliore G., Mané-Bielfeldt A. & Zárate A. V.** 2005 Cheese production potential of milk of Dahlem Cashmere goats from a rheological point of view. *Small Ruminant Research* **57**(1): 31-36
- Dozet N., Stanišić M. & Bijeljac S.** 1982 The effect of low temperature on the duration of cheese. *Mljekarstvo* **32**(6): 163-170
- Dubeuf J. P., Morand-Fehr P. & Rubino R.** 2004 Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research* **51**(2): 165-173
- Evans J. A.** 2008 *Frozen Food Science and Technology*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd
- FAOSTAT** 2013 Food and Agriculture Organization of the United Nations. link: <http://faostat.fao.org>
- Faye B. & Konuspayeva G.** 2012 The sustainability challenge to the dairy sector - The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal* **24**(2): 50-56
- Fellows P.** 2000 *Food processing technology - principles and practice*. 2nd Edition. Cambridge, UK: Woodhead Publishing
- Fennema O. R.** 1985 Water and Ice. in *Food Chemistry*, pp. 23-67 (Marcel Dekker)
- Fennema O. R., William D. & Elmer H.** 1973 *Low-temperature preservation of food and living matter*. New York: Marcel Dekker Inc.
- FIL-IDF** 1981: Determination of fat content. Gerber butyrometers. Milk. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF** 1982: Determination of the total solids content. Cheese and processed cheese. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF** 1986: Determination of fat content. Cheese and processed cheese products. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF** 1987: Determination of total solids content. Milk, cream and evaporated milk. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF** 1988b: Determination of chloride content. Cheese and processed cheese. International Dairy Federation, Brussels Belgium.
- Fontecha J., Bellanato J. & Juarez M.** 1993 Infrared and Raman spectroscopic study of casein in cheese: Effect of freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Science* **76**(11): 3303-3309
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M. & McSweeney P. L. H.** 2000 *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Gantner V., Mijić P., Kuterovac K., Solić D. & Gantner R.** 2011 Temperature-humidity index values and their significance on the daily production of dairy cattle. *Mljekarstvo* **61**(1): 56-63
- Garcia-Lopez S., Echeverria E., Tsui I. & Balch B.** 1994 Changes in the content of conjugated linoleic acid (CLA) in processed cheese during processing. *Food Research International* **27**(1): 61-64

- Goetsch A. L., Zeng S. S. & Gipson T. A.** 2011 Factors affecting goat milk production and quality. *Small Ruminant Res.* **101**(1-3): 55-63
- Goff H. D. & Sahagian M. E.** 1996 Freezing of dairy products. in Freezing effects on food quality (Ed. L E.J.). Marcel Dekker, Inc.
- Gomes M. I. F. V., Bonassi I. A. & Roça R. d. O.** 1997 Características químicas, microbiológicas e sensoriais de leite de cabra congelado. *Food Science and Technology (Campinas)* **17**: 111-114
- Govindarajan A. G. & Lindow S. E.** 1988 The size of bacterial ice-nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**(5): 1334-1338
- Guinee T. P.** 2004 Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology* **57**(2-3): 99-109
- Gunasekaran S. & Mehmet Ak M.** 2003 Cheese rheology and texture. Boca Raton, Florida: CRC Press
- Ha Y. L., Grimm N. K. & Pariza M. W.** 1989 Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**(1): 75-81
- Haenlein G. F. W.** 2001 Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science* **84**(9): 2097-2115
- Haenlein G. F. W.** 2004 Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51**(2): 155-163
- Hartel R.** 2001 *Crystallization in Foods*. Gaithersburg: MD: Aspen Publishers Inc
- Hayaloglu A. A., Tolu C. & Yasar K.** 2013 Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokceada goat cheese during ripening. *Small Ruminant Research* **113**(1): 231-238
- Hayes L. J., Diller K. R. & Lee H. S.** 1984 On the definition of an average cooling rate during cell freezing. *Cryoletters* **5**: 97-110
- Henno M., Ots M., Jõudu I., Kaart T. & Kärt O.** 2008 Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal* **18**(2): 210-215
- Hinrichs J.** 2001 Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal* **11**(4-7): 495-503
- Hinz K., Huppertz T., Kulozik U. & Kelly A. L.** 2007 Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal* **17**(4): 289-293
- Hsu C. L., Heldman D. R., Taylor T. A. & Kramer H. L.** 2003 Influence of cooling rate on glass transition temperature of sucrose solutions and rice starch gel. *Journal of Food Science* **68**(6): 1970-1975
- Huppertz T. & de Kruif C. G.** 2007 Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. *International Dairy Journal* **17**(5): 442-447
- ISO8587** 2006 Sensory analysis - Methodology - Ranking. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization
- Ivanovic B.** 1977 *Classification theory*. Belgrade: Institute for Industrial Economic

- Jandal J. M.** 1996 Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **22**(2): 177-185
- Jason A. C. & Richards J. C. S.** 1975 The development of an electronic fish freshness meter. *Journal of Physics. E: Scientific Instruments* **8**: 826-830
- Jen J. J. & Ashworth U. S.** 1970 Factors influencing the curd tension of rennet coagulated milk. Salt balance. *Journal of Dairy Science* **53**(9): 1201-1206
- Jenness R.** 1980 Composition and characteristics of goat milk: review *Journal of Dairy Science* **63**(10): 1605-1630
- Jensen R. G., Ferris A. M. & Lammi-Keefe C. J.** 1991 The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* **74**(9): 3228-3243
- Jeremic V., Bulajic M., Martic M. & Radojicic Z.** 2011 A fresh approach to evaluating the academic ranking of world universities. *Scientometrics* **87**(3): 587-596
- Jeremic V. M.** 2012 Statistical efficiency model based on the Ivanovic distance. Faculty of Organizational sciences
- Jooyandeh H. & Aberoumand A.** 2010 Physico-chemical, nutritional, heat treatment effects and dairy products aspects of goat and sheep milks. *World Applied Sciences Journal* **11**(11): 1316-1322
- Kashiwagi T., Yokoyama K.-i., Ishikawa K., Ono K., Ejima D., Matsui H. & Suzuki E.-i.** 2002 Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry* **277**(46): 44252-44260
- Kaya S.** 2002 Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining. *Journal of Food Engineering* **52**(2): 155-159
- Keenan T. W. & Mather I. H.** 2003 Milk fat globule membrane. in *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 3, pp. 1568-1576 (Eds. JW Fuquay & PF Fox). Academic Press
- Kent M., Knöchel R., Barr U.-K., Tejada M. & Nunes L.** 2005 A new method for measurement of the quality of seafood., . Shaker Verlag GmbH Germany
- Kent M., Knöchel R., Daschner F. & Berger U.-K.** 2001 Composition of foods including added water using microwave dielectric spectra. *Food Control* **12**(7): 467-482
- Kent M., Oehlenschlager J., Mierke-Klemeyer S., Knöchel R., Daschner F. & Schimmer O.** 2004 Estimation of the quality of frozen cod using a new instrumental method. *European Food Research and Technology and Health Care* **219**(5): 540-544
- Kitamikado M., Yuan C. S. & Ueno R.** 1990 An enzymatic method designed to differentiate between fresh and frozen-thawed fish. *Journal of Food Science* **55**: 74-76
- Koschak M. S., Fennema O., Amundson C. H. & Lee J. Y.** 1981 Protein stability of frozen milk as influenced by storage temperature and ultrafiltration. *Journal of Food Science* **46**(4): 1211-1217
- Krivchenia M. & Fennema O. R.** 1988 Effect of cryoprotectants on frozen turbot fillets and comparison with white fish fillets. *Journal of Food Science* **53**: 1004-1008

- Kuo M. I. & Gunasekaran S.** 2003 Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and nonpasta filata Mozzarella cheeses. *Journal of Dairy Science* **86**(4): 1108-1117
- Lanari M. C., Bevilacqua A. E. & Zaritzky N. E.** 1990 Pigments modifications during freezing and frozen storage of packaged beef. *Journal of Food Process Engineering* **12**: 49-66
- Lanari M. C. & Zaritzky N. E.** 1991 Effect of packaging and frozen storage temperatures on beef pigments. *International Journal of Food Science and Technology* **26**: 629-640
- Lawless H. T. & Heymann H.** 2010 *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. Second Edition Edition. New York: Springer Science and Business Media, LLC
- Levine H. & Slade L.** 1988 Principle of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems - A review. *Cryo-Letters* **9**: 21-63
- Lindmark-Månsson H., Fondén R. & Pettersson H.-E.** 2003 Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal* **13**(6): 409-425
- Lopez C., Maillard M.-B., Briard-Bion V., Camier B. & Hannon J. A.** 2006 Lipolysis during ripening of emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(16): 5855-5867
- Love R. M.** 1966 The freezing of animal tissue. in *Cryobiology*, pp. 317-405 (Ed. HT Meryman). Academic Press
- Low D., Ahlgren J. A., Horne D., McMahon D. J., Oberg C. J. & Broadbent J. R.** 1998 Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(6): 2147-2151
- Luck H.** 1977 Preservation of cheese and perishable dairy products by freezing. *South African Journal of Dairy Technology* **9**: 127-132
- Mackie I. M.** 1993 The effect of freezing on fish proteins. *Food Review International* **9**: 575-610
- Madadlou A., Khosrowshahi asl A., Mousavi M. E. & Farmani J.** 2007 The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian White cheese. *Journal of Food Engineering* **81**(2): 330-335
- Marziali A. S. & Ng-Kwai-Hang K. F.** 1986 Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* **69**(7): 1793-1798
- Mayer K. H. & Fiechter G.** 2012 Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria—seasonal variations and differences between six breeds. *Dairy Sci. Technol.* **92**: 167-177
- Mazur P.** 1970 Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* **168**: 939-949
- Mazur P.** 1984 Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* **247**: C125-C142

- McCarthy O. J. & Singh H.** 2009 Physico-chemical properties of milk. in *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, pp. 691-758 (Eds. P McSweeney & PF Fox). Springer
- Meilgaard M., Civille G. V. & Carr B. T.** 1999 *Sensory evaluation techniques*. Third edition. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC
- Meza B. E., Verdini R. A. & Rubiolo A. C.** 2011 Effect of freezing on the viscoelastic behaviour during the ripening of a commercial low-fat soft cheese. *International Dairy Journal* **21**(5): 346-351
- Milani M., Hense A., Rahmani E. & Ploeger A.** 2015 A pilot investigation of the relationship between climate variability and milk compounds under the bootstrap technique. *Foods* **4**(3): 420
- Miles C. A.** 1991 The thermophysical properties of frozen foods. in *Food Freezing: Today and Tomorrow*, pp. 45-65 (Ed. WB Bald). Springer-Verlag
- Miles C. A., Mayer Z., Morley M. J. & Houřska M.** 1997 Estimating the initial freezing point of foods from composition data. *International Journal of Food Science & Technology* **32**: 389-400
- Miles C. A., Morley M. J. & Randell M.** 1999 High power ultrasonic thawing of frozen foods. *Journal of Food Engineering* **39**(2): 151-159
- Miloradovic Z. N., Kljajevic N. V., Jovanovic S. T., Vucic T. R. & Macej O. D.** 2015 The effect of heat treatment and skimming on precipitate formation in caprine and bovine milks. *Journal of Dairy Research* **82**(01): 22-28
- Miloradović Z.** 2015 Karakteristike belih sireva u salamuri proizvedenih od kozjeg mleka tretiranog različitim termičkim tretmanima. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Mishra R., Govindasamy-Lucey S. & Lucey J. A.** 2005 Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: Impact of processing conditions. *Journal of Texture Studies* **36**(2): 190-212
- Morand-Fehr P., Boutonnet J. P., Devendra C., Dubeuf J. P., Haenlein G. F. W., Holst P., Mowlem L. & Capote J.** 2004 Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research* **51**(2): 175-183
- Morgan F., Micault S. & Fauquant J.** 2001 Combined effect of whey protein and α_{S1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. *International Journal of Dairy Technology* **54**(2): 64-68
- Muir D. D.** 1984 Reviews of the progress of Dairy Science: Frozen concentrated milk. *Journal of Dairy Research* **51**(04): 649-664
- Needs E. C.** 1992 Effects of long-term deep-freeze storage on the condition of the fat in raw sheep's milk. *Journal of Dairy Research* **59**(01): 49-55
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E. & Monardes H. G.** 1985 Percentages of Protein and Nonprotein Nitrogen with Varying Fat and Somatic Cells in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* **68**(5): 1257-1262
- O'Connor P. & Fox P. F.** 1977 The proteins and salts of some non-bovine milks. *Journal of Dairy Research* **44**(03): 607-609

- Oberg C. J., Merrill R. K., Brown R. J. & Richardson G. H.** 1992 Effects of Freezing, Thawing, and Shredding on Low Moisture, Part-Skim Mozzarella Cheese1. *Journal of Dairy Science* **75**(5): 1161-1166
- Okigbo L. M., Richardson G. H., Brown R. J. & Ernstrom C. A.** 1985 Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *Journal of Dairy Science* **68**(4): 822-828
- Oosterhuis J. J.** 1981 Double freezing of plaice. *Voedingsmiddelentechnologie* **14** (2): 11-15
- Park Y. W.** 2006 Goat Milk - chemistry and nutrition. in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, pp. 34-59 (Eds. YW Park & GFW Haenlein). Blackwell Publishing
- Park Y. W.** 2007 Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**(1-2): 73-87
- Park Y. W.** 2013 Effect of 5 years long-term frozen storage on sensory quality of Monterey Jack caprine milk cheese. *Small Ruminant Research* **109**(2-3): 136-140
- Park Y. W. & Drake M. A.** 2005 Effect of 3 months frozen-storage on organic acid contents and sensory properties, and their correlations in soft goat milk cheese. *Small Ruminant Research* **58**(3): 291-298
- Park Y. W., Gerard P. D. & Drake M. A.** 2006 Impact of frozen storage on flavor of caprine milk cheeses. *Journal of Sensory Studies* **21**(6): 654-663
- Park Y. W. & Guo M.** 2006 Goat milk products: Types of products, manufacturing technology, chemical composition and marketing. in *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*, pp. 34-58 (Eds. YW Park & GFW Haenlein). Blackwell Publishing
- Park Y. W., Juárez M., Ramos M. & Haenlein G. F. W.** 2007 Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**(1-2): 88-113
- Park Y. W. & Lee J. H.** 2006 Effect of freezing on organic acid contents and lipolytic index of plain soft and Monterey Jack goat milk cheeses. *Small Ruminant Research* **63**(1-2): 58-65
- Parker M. L., Gunning P. A., Macedo A. C., Malcata F. X. & Brocklehurst T. F.** 1998 The microstructure and distribution of micro-organisms within mature Serra cheese. *Journal of Applied Microbiology* **84**(4): 523-530
- Parker T. G. & Dalgleish D. G.** 1981 Binding of calcium ions to bovine β -casein. *Journal of Dairy Research* **48**(01): 71-76
- Peleg M.** 1979 Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *Journal of Food Science* **44**(1): 277-281
- Pereira C. I., Gomes A. M. P. & Xavier Malcata F.** 2009 Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends in Food Science & Technology* **20**(5): 213-219
- Petersen B. L., Dave R. I., McMahon D. J., Oberg C. J. & Broadbent J. R.** 2000 Influence of capsular and ropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *Journal of Dairy Science* **83**(9): 1952-1956

- Picon A., Alonso R., Gaya P., Fernández-García E., Rodríguez B., de Paz M. & Nuñez M.** 2010a Microbiological, chemical, textural and sensory characteristics of Hispánico cheese manufactured using frozen ovine milk curds scalded at different temperatures. *International Dairy Journal* **20**(5): 344-351
- Picon A., Gaya P., Fernández-García E., Rivas-Cañedo A., Ávila M. & Nuñez M.** 2010b Proteolysis, lipolysis, volatile compounds, texture, and flavor of Hispánico cheese made using frozen ewe milk curds pressed for different times. *Journal of Dairy Science* **93**(7): 2896-2905
- Pippard A. B.** 1961 *Elements of classical thermodynamics*. Cambridge: Cambridge University Press
- Pirisi A., Colin O., Laurent F., Scher J. & Parmentier M.** 1994 Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α S1-casein synthesis. *International Dairy Journal* **4**(4): 329-345
- Pons M. & Fiszman S. M.** 1996 Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies* **27**(6): 597-624
- Poulsen N. A., Rybicka I., Poulsen H. D., Larsen L. B., Andersen K. K. & Larsen M. K.** 2015 Seasonal variation in content of riboflavin and major minerals in bulk milk from three Danish dairies. *International Dairy Journal* **42**: 6-11
- Puđa P.** 2009 *Tehnologija mleka 1 - Sirarstvo - Opšti deo*. Beograd: Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Radovanović R. & Popov-Raljić J.** 2001 *Senzorna analiza prehrambenih proizvoda*. Beograd/Novi Sad: Univerzitet u Beogradu/Univerzitet u Novom Sadu
- Radulović Z., Miočinović J., Pudja P., Barać M., Miloradović Z., Paunović D. & Obradović D.** 2011 The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo* **61**(1)
- Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I. & Chilliard Y.** 2008 Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* **79**(1): 57-72
- Raynal-Ljutovac K., Le Pape M., Gaborit P. & Barrucand P.** 2011 French goat milk cheeses: An overview on their nutritional and sensorial characteristics and their impacts on consumers' acceptance. *Small Ruminant Research* **101**(1-3): 64-72
- Raynal-Ljutovac K., Park Y. W., Gaucheron F. & Bouhallab S.** 2007 Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**(1-2): 207-220
- Raynal K. & Remeuf F.** 1998 The Effect of Heating on Physicochemical and Renneting Properties of Milk: A Comparison between Caprine, Ovine and Bovine Milk. *International Dairy Journal* **8**(8): 695-706
- Rehbein H.** 1992 Physical and biochemical methods for the differentiation between fresh and frozenthawed fish or fillets. *Italian Journal of Food Science* **4**: 75-86
- Remeuf F., Lenoir J., Duby C., Letilly M.-T. & Normand A.** 1989 Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait* **69**(6): 499-518

- Ribeiro A. C. & Ribeiro S. D. A.** 2010 Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* **89**(2): 225-233
- Rodriguez L. A., Mekonnen G., Wilcox C. J., Martin F. G. & Krienke W. A.** 1985 Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy, and stage of lactation on milk composition and yield. *Journal of Dairy Science* **68**(4): 973-978
- Roos Y. H.** 1995 *Phase transitions in foods*. London: Academic Press
- Rothman L. & Parker M. J.** 2009 Structure and Use of Just-About-Right Scales. in *ASTM Manual Series: MNL 63 - Just-About-Right (JAR) Scales: Design, Usage, Benefits and Risks*, pp. 1-13 (Eds. L. Rothman & MJ Parker). ASTM International - American Society for Testing and Materials
- Salaün F., Mietton B. & Gaucheron F.** 2005 Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal* **15**(2): 95-109
- Salfi V., Fucetola F. & Pannunzio G.** 1986 A micromethod for the differentiation of fresh from frozen fish muscle. *Journal of Food Science and Agriculture* **36**: 811-814
- Saunders M., Podlunii K., Shergill S., Buckton G. & Royall P.** 2004 The potential of high speed DSC (Hyper-DSC) for the detection and quantification of small amounts of amorphous content in predominantly crystalline samples. *International Journal of Pharmaceutics* **274**: 35-40
- Schraidt M.** 2009 Appendix L: Penalty analysis or mean drop analysis. in *ASTM Manual Series: MNL 63 - Just-About-Right (JAR) scales: Design, usage, benefits and risks* (Eds. L. Rothman & MJ Parker). ASTM International - American Society for Testing and Materials
- Seçkin A. K., Esmer Ö. K., Balkir P. & Ergönül P. G.** 2011 Effect of curd freezing and packaging methods on the organic acid contents of goat cheeses during storage. *Mljekarstvo* **61**(3): 234-243
- Sendra E., Mor-Mur M., Pla R. & Guamis B.** 1999 Evaluation of freezing pressed curd for delayed ripening of semi-hard ovine cheese. *Milchwissenschaft* **54**: 550-553
- Shantha N. C., Decker E. A. & Ustunol Z.** 1992 Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **69**(5): 425-428
- Sharma A. K., Rodriguez L. A., Mekonnen G., Wilcox C. J., Bachman K. C. & Collier R. J.** 1983 Climatological and genetic effects on milk composition and yield. *Journal of Dairy Science* **66**(1): 119-126
- Siefarth C. & Buettner A.** 2014 The aroma of goat milk: Seasonal effects and changes through heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(49): 11805-11817
- Singh H. & Waungana A.** 2001 Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal* **11**(4-7): 543-551
- Slade L. & Levine H.** 1991 Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. in *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 30, pp. 115-359 (Ed. C F.M.). CRC Press

- Smith C. E. & Schwartzberg H. G.** 1985 Ice crystal size changes during ripening in freeze concentration. *Biotechnology Progress* **1**: 111-120
- Sousa M. J., Ardö Y. & McSweeney P. L. H.** 2001 Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11**: 327-345
- Sperling L. H.** 1986 Introduction to physical polymer science. New York: John Wiley
- Steffl A., Schreiber R., Hafenmair M. & Kessler H.-G.** 1999 Effect of denatured whey proteins on the rennet-induced aggregation of casein micelles. *International Dairy Journal* **9**(3-6): 401-402
- Storry J. E. & Ford G. D.** 1982 Development of coagulum firmness in renneted milk - a two-phase process. *Journal of Dairy Research* **49**(02): 343-346
- Storry J. E., Grandison A. S., Millard D., Owen A. J. & Ford G. D.** 1983 Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* **50**(02): 215-229
- Tan Y. L., Ye A., Singh H. & Hemar Y.** 2007 Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems. *Journal of Texture Studies* **38**(3): 404-422
- Tejada L., GÓmez R., Vioque M., SÁnchez E., Mata C. & FernÁNdez-Salguero J.** 2000 Effect of freezing and frozen storage on the sensorial characteristics of Los Pedroches, a Spanish ewe cheese. *Journal of Sensory Studies* **15**(3): 251-262
- Tejada L., Sánchez E., Gómez R., Vioque M. & Fernández-Salguero J.** 2002 Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. *Journal of Food Science* **67**(1): 126-129
- Tomić N.** 2016 Senzorna analiza hrane. Praktikum sa teorijskim osnovama. Beograd: Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet
- Trancoso I. M., Trancoso M. A., Martins A. P. L. & Roseiro L. B.** 2010 Chemical composition and mineral content of goat milk from four indigenous Portuguese breeds in relation to one foreign breed. *International Journal of Dairy Technology* **63**(4): 516-522
- Trout G. R.** 1988 Techniques for measuring water-binding capacity in muscle foods - a review of methodology. *Meat Science* **23**: 235-232
- Tunick M. H., Mackey K. L., Shieh J. J., Smith P. W., Cooke P. & Malin E. L.** 1993 Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* **3**(7): 649-662
- Tziboula-Clarke A.** 2003 Goat milk. in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1270-1279 (Eds. JW Fuquay & PF Fox). Academic Press
- Upadhyay V. K., McSweeney P. L. H., Magboul A. A. A. & Fox P. F.** 2004 Proteolysis in cheese during ripening. in *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1, pp. 390-434 (Eds. PF Fox, PLH McSweeney, TM Cogan & G T.P.). Elsevier Applied Science
- Ustunol Z. & Brown R. J.** 1985 Effects of heat treatment and posttreatment holding time on rennet clotting of milk. *Journal of Dairy Science* **68**(3): 526-530

- Van Hekken D. L., Tunick M. H. & Park Y. W.** 2005 Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk cheese. *Journal of Dairy Science* **88**(6): 1966-1972
- Verdini R. A. & Rubiolo A. C.** 2002a Effect of frozen storage time on the proteolysis of soft cheeses studied by principal component analysis of proteolytic profiles. *Journal of Food Science* **67**(3): 963-967
- Verdini R. A. & Rubiolo A. C.** 2002b Texture changes during the ripening of Port Salut Argentino cheese in 2 sampling zones. *Journal of Food Science* **67**(5): 1808-1813
- Verdini R. A., Zorrilla S. E. & Rubiolo A. C.** 2005 Effects of the freezing process on proteolysis during the ripening of Port Salut Argentino cheeses. *International Dairy Journal* **15**(4): 363-370
- Vincent J. F. V., Jeronimidis G., Khan A. A. & Luyten H.** 1991 The wedge fracture test. A new method for measurement of food texture. *Journal of Texture Studies* **22**(1): 45-57
- Walstra P.** 2003 *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Walstra P., Jenness R. & Badings H. T.** 1984 *Dairy chemistry and physics*. New York: Wiley
- Walstra P., Wouters J. T. M. & Geurts T. J.** 2006 *Cooling and freezing*. in *Dairy science and technology* (Taylor & Francis Group, LLC
- Wendorff W. L.** 2001 Freezing qualities of raw ovine milk for further processing. *Journal of Dairy Science* **84**: E74-E78
- Wunderlich B.** 1981 The basis of thermal analysis. in *Thermal characterization of polymeric materials*, pp. 91-234 (Ed. EA Turi). Academic Press
- Zaritzky N.** 2000 Factors affecting the stability of frozen foods. in *Managing Frozen Foods*, pp. 111-133 (Ed. CJ Kennedy). Woodhead Publishing Limited
- Zaritzky N.** 2006 Physical-chemical principles in freezing. in *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*, pp. 3-33 (Ed. DW Sun). FL: CRC/Taylor & Francis Group
- Zhang R. H., Mustafa A. F., Ng-Kwai-Hang K. F. & Zhao X.** 2006 Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. *Small Ruminant Research* **64**(3): 203-210
- Žujović M., Tomić Z., Petrović M. P., Ivanović S. & Nešić Z.** 2005 Goat breeding, need and possibility in households located in hilly-mountainous and plain regions. *Biotechnology in animal husbandry* **21**(5-6): 117-122

BIOGRAFIJA

Nemanja Kljajević je rođen 4. septembra 1986. godine u Beogradu. Završio je Devetu beogradsku gimnaziju „Mihailo Petrović Alas“ 2005. godine. Odsek za prehrambenu tehnologiju na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu upisao je školske 2005/06. godine. Diplomirao je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,52, ocenom 10 na diplomskom radu i stekao zvanje diplomirani inženjer prehrambene tehnologije animalnih proizvoda.

U periodu od novembra 2010. do maja 2011. godine, radio je u kompaniji „Squadra“, na poziciji tehnologa u proizvodnji. Tokom 2012. godine radio je u Poljoprivrednoj savetodavnoj i stručnoj službi Ruma, na poziciji asistenta savetodavca.

Školske 2012/13. godine upisao je doktorske studije, na odseku za Prehrambenu tehnologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od juna 2014. do marta 2018. godine radio je u mlekari „Beocapra“ u Kukujevcima, na poziciji tehnologa u proizvodnji. Od marta 2018. do septembra 2018. godine radio je u kompaniji „Invetlab“, na poziciji tehnologa u proizvodnji i razvoju novih proizvoda. Od septembra 2018. godine radi u „Mlekari Šabac“, na poziciji tehnologa u proizvodnji.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavio 9 naučnih radova, od kojih se 3 nalaze u međunarodnim časopisima sa SCI liste.