



Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

Ante Rako

**Utjecaj sastava ovčjeg mlijeka na  
proteolitičke i teksturne promjene  
bračkog sira tijekom zrenja**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb  
FACULTY OF AGRICULTURE

Ante Rako

**Effect of Sheep's Milk Composition on  
Proteolytic and Textural Changes During  
Ripening of Brač Cheese**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

Ante Rako

**Utjecaj sastava ovčjeg mlijeka na  
proteolitičke i teksturne promjene  
bračkog sira tijekom zrenja**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Samir Kalit, redoviti profesor

Zagreb, 2016.



University of Zagreb  
FACULTY OF AGRICULTURE

Ante Rako

**Effect of Sheep's Milk Composition on  
Proteolytic and Textural Changes During  
Ripening of Brač Cheese**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Samir Kalit, PhD, Full Professor

Zagreb, 2016.

## Bibliografska stranica

### Bibliografski podaci:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Poljoprivreda  
Znanstvena grana: Mljekarstvo  
Institucija: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet  
Voditelj doktorskog rada: prof. dr. sc. Samir Kalit  
Broj stranica: 142  
Broj slika: 7  
Broj tablica: 36  
Broj grafikona: 14  
Broj literaturnih referenci: 277  
Datum obrane doktorskog rada:  
Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:  
1. prof. dr. sc. Neven Antunac  
2. prof. dr. sc. Boro Mioč  
3. prof. dr. sc. Rajka Božanić

### Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10 000 Zagreb.

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 03. ožujka 2015. godine, te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 19. svibnja 2015. godine.

## Ocjena doktorskog rada

Doktorski rad je obranjen na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu  
\_\_\_\_\_ 2016. godine pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Neven Antunac, \_\_\_\_\_  
redoviti profesor u trajnom zvanju, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
2. Prof. dr. sc. Boro Mioč, \_\_\_\_\_  
redoviti profesor u trajnom zvanju, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
3. Prof. dr. sc. Rajka Božanić, \_\_\_\_\_  
redovita profesorica u trajnom zvanju, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno -  
biotehnološki fakultet

## Informacije o mentoru

Samir Kalit rođen je 22. veljače 1969. godine u Zagrebu i prvih pet razreda osnovne škole završio je u Bagdadu (Irak) na arapskom jeziku, a preostalo osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje u Zagrebu. Diplomirao je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1995. godine smjer Stočarstvo. Od tada radi u Zavodu za mljekarstvo na istom fakultetu, prvo kao znanstveni novak, a danas kao redoviti profesor. Magistrirao je 1999. godine, a doktorirao 2003. godine obranivši doktorsku disertaciju naslova „Biokemijske promjene tijekom zrenja tounjskog sira“. Koordinator je modula „Prerada mlijeka na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima“ na preddiplomskom studiju te modula „Biokemija i tehnologija zrenja sireva“ i „Sirarstvo“ na diplomskom studiju. Suradnik je na modulima „Mlijeko i mliječni proizvodi“ i „Izravna prodaja i prerada na seljačkim gospodarstvima“ na preddiplomskom studiju. Također je suradnik na modulu „Istraživanja u mljekarskoj znanost“ na poslijediplomskom doktorskom studiju. Znanstvena i stručna usavršavanja proveo je na IPC Livestock, Oenkerk (Nizozemska), na ETH Swiss Federal Institute of Technology Zurich (Švicarska) i University of Guelph (Kanada). Bio je voditelj ili suradnik na trinaest znanstvenih i stručnih projekata. Izradio je specifikaciju za zaštitu devet hrvatskih sireva: tounjski, lečevački, istarski, preveli, turoš, graničar, kvargl, sir iz mišine i škripavac. Član je Hrvatske mljekarske udruge i Uređivačkog odbora časopisa Mljekarstvo. Do sada je recenzirao više od dvadeset znanstvenih radova, jedan sveučilišni udžbenik, dva domaća i dva europska projekta. Aktivno promovira mljekarsku nacionalnu znanost i struku u medijima (radio, televizija i novine). Sudjelovao je u kreiranju većeg broja pravilnika pri Ministarstvu poljoprivrede i šumarstva Republike Hrvatske. Stručni je savjetnik Saveza sirara Hrvatske „SirCro“. Do sada je objavio više od sto znanstvenih i stručnih radova. Također je izradio više od sto pedeset tehničko tehnoloških projekata izgradnje uređenja i opremanja mljekarskih pogona u Hrvatskoj. Sudjelovao je na više od trideset znanstvenih i stručnih skupova gdje je održao četiri pozivna predavanja (dva puta u Kini, jednom u Indiji i Hrvatskoj). Predavao je na tri inozemna sveučilišta: Sveučilište u Mostaru (Bosna i Hercegovina), University of Wisconsin, Madison (Sjedinjene Američke Države) i Mehmet Akif Ersoy University, Burdur (Turska). Član je stručnog povjerenstva za organoleptičko ocjenjivanje sireva u Hrvatskoj, Sloveniji i Bosni i Hercegovini. Bio je dva puta sudac na Svjetskom prvenstvu sireva u Madisonu, Wisconsin (Sjedinjene Američke Države). Kao koautor objavio je sveučilišni udžbenik naslova Sirarstvo.

## **ZAHVALA**

S velikim, najiskrenijim poštovanjem zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Samiru Kalitu na pomoći i savjetima koje mi je davao tijekom izrade ovoga rada

Veliko hvala članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Nevenu Antuncu, prof. dr. sc. Bori Mioču i prof. dr. sc. Rajki Božanić na korisnim savjetima tijekom pregleda ovoga rada.

Zahvaljujem se Mariju i Božici Kuzmanić te Marku i Dragi Buvinić na pomoći oko organizacije i provođenja eksperimentalnog rada na njihovim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima.

Posebno zahvaljujem mojoj supruzi Zorici na potpori i razumijevanju tijekom izrade ovoga rada.



## SAŽETAK

Brački sir je punomasni, tvrdi ovčji sir te se kao i većina hrvatskih tradicijskih sireva proizvodi od sirovog ovčjeg mlijeka, o čijem sastavu i sposobnosti zgrušavanja u najvećoj mjeri ovisi i njegova kakvoća.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi: kemijski sastav, fizikalna svojstva i higijensku kvalitetu sirovog ovčjeg mlijeka, proteolitičke i teksturne promjene bračkog sira tijekom zrenja te povezanost navedenih promjena sa sastavom mlijeka.

Istraživanje je provedeno na 60 sireva proizvedenih u 15 proizvodnih šarži. Analiza kemijskog sastava, fizikalnih svojstava i higijenske kvalitete mlijeka te kemijskog sastava sira je provedena standardnim metodama. Sposobnost sinereze sirnog gruša je utvrđena centrifugiranjem i izražena je kao udio otpuštene sirutke u odnosu na ukupnu masu uzorka. Tvrdoa sirnog gruša je utvrđena pomoću cilindrične sonde i teksturnog analizatora prema uputama proizvođača. Proteolitičke promjene tijekom zrenja bračkog sira su utvrđene standardnim metodama dok su njegove teksturne značajke utvrđene metodom analize teksturnog profila.

Provedenim istraživanjem je utvrđeno da je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) povećana lomljivost i čvrstoća bračkih sireva dok se vrijednosti WSN (% TN), TCA-SN (% TN), ukupnih slobodnih aminokiselina,  $I_{\nu/\beta}$  i  $I_{\alpha}$  nisu značajnije mijenjale. Statistički značajno ( $P < 0,01$ ) najveća vrijednost lomljivosti i čvrstoće je utvrđena u bračkim sirevima proizvedenim od mlijeka s koncentracijom uree u rasponu od 25,01 do 35,00 mg/100 g dok su vrijednosti teksturnih pokazatelja ispod odnosno iznad navedenog raspona bile gotovo podjednake. Sirevi proizvedeni od mlijeka s koncentracijom uree manjom od 25,00 mg/100 ml su imali značajno ( $P < 0,05$ ) najveću vrijednost  $I_{\nu/\beta}$  te utvrđenu sekundarnu proteolitičku aktivnost. Nastavak povećanja koncentracije uree iznad 25,01 mg/100 ml u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) smanjio vrijednost navedenih pokazatelja u bračkom siru. Povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) smanjilo vrijednosti  $I_{\alpha}$  ali nije utjecalo na vrijednosti  $I_{\nu/\beta}$  u bračkom siru. Značajno ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) najveću lomljivost i čvrstoću ali i intenzitet sekundarne proteolitičke aktivnosti je utvrđen u sirevima proizvedenim od mlijeka s brojem somatskih stanica iznad 501.000/ml.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je kakvoća sirovog ovčjeg mlijeka jedan od ključnih čimbenika koji utječu na tijek razgradnje parakazeinske strukture bračkog sira kao temeljnog biokemijskog procesa koji mijenja njegove teksturne značajke.

Ključne riječi: sirovo ovčje mlijeko, brački sir, zrenje, proteoliza, tekstura.

## **Effect of sheep's milk composition on proteolytic and textural changes during ripening of brač cheese**

Extended summary

Introduction

Brač cheese is produced from raw sheep milk and its quality is mainly affected by the composition of milk as in most of Croatian traditional cheeses. If good hygiene is practised during milking of healthy sheep, wholeness and intact levels of milk constituents (especially casein) are retained. In the coagulation process of milk, casein forms the continuous and hard para-casein matrix which in relation to the other milk constituents mostly occludes the milk fat. Hard para-casein matrix also keeps its functional properties during syneresis process and represents basic substrate for proteolytic enzyme activity during process of cheese ripening. Proteolytic changes during cheese ripening are fundamental process which plays a vital role in development of characteristics of cheese texture. Therefore, the motivation for this study is to evaluate effect of raw sheep milk composition on textural curd characteristics and intensity of proteolytic and textural changes during the ripening of Brač cheese.

Hypothesis and aims of the research

The hypothesis of the research is that raw sheep milk composition has effect on curd syneresis and texture. The present research also aimed to assess the hypothesis that proteolytic and textural changes during ripening of brač cheese depends on raw sheep milk composition. Because casein network in cheese influence its mechanical behaviour, it can be hypothesized that intensity of proteolysis in brač cheese changes its textural characteristics during ripening.

The objective of this research is to determine:

- physicochemical composition and hygienic quality of raw sheep milk,
- texture and syneresis characteristics of curd as indicators of sheep milk coagulation ability,
- effect of sheep milk composition on texture, syneresis ability and whey expulsion of curd at four different times of coagulation,
- chemical, textural and proteolytic changes in Brač cheese during ripening,
- relationship between sheep milk composition and textural, proteolytic and composition changes of Brač cheese during ripening,
- relationship between proteolytic pattern and texture of Brač cheese.

Materials and methods

The research was conducted on a family farms in the area of Pražnice and Supetar on the Brač island. Milk samples were collected twice a month throughout the different lactation periods (Supetar – 125 and Pražnice – 75 days in milking). Raw milk samples were collected into a laboratory bottles, transported in a portable refrigerator to a laboratory and stored at 4<sup>0</sup> C until its coagulation within the next 24 hours. The milk samples intended for physicochemical analysis were filled in 100 ml capacity polyethylene laboratory bottles, preserved with azidiol and sent to the Reference Laboratory for Milk and Dairy Products at the Faculty of Agriculture in Zagreb. Raw sheep milk was analysed for fat, protein, casein, lactose, dry matter, solids-non-fat, urea, total and ionic calcium content as well as somatic cell counts, total number of bacteria and acidity.

Milk was poured in a laboratory beaker and warmed in water bath at 32<sup>0</sup> C. After rennet addition milk was immediately transferred into eight glass beakers and conical bottom centrifuge tubes. A hundred milliliters of milk for curd preparation was added in

each of eight glass beakers. Furthermore a thirty grams of milk for syneresis test was weighed in each of sixteen centrifuge tubes. Each analysis was done in duplicate. Milk samples were placed in water bath at 25°C and allowed to coagulate for 30, 45, 60 and 75 minutes in laboratory under climatized conditions at same temperature. Strength of obtained curd in glass beakers were measured by texture analyser (Lloyd instruments, model TA Plus) equipped with a 500 N load cell (model XLC -0500-A1) and cylindrical probe (model FG/CY3, 12,5 mm in diameter). Syneresis was measured by centrifuging the curd at 5000 RPM for 15 min. After centrifugation the free water was separated, weighed and expressed as percentage of the total weight of milk (30 g).

Fifteen batches of Brač cheese were produced with four cheeses in each batch. The cheeses were periodically sampled after 0, 30, 60, 90 and 120 days. Using a drill, cheese samples (about 20 g) were taken from the lateral side of each cheese in order to determine chemical composition and proteolytic changes of cheese during ripening period of four months. Cheese samples for texture measurement were taken by cork borer parallel to the direction of pressing of cheese between the edge of the top and bottom surface. Cheese cores were cut into cylindrical samples (diameter=17 mm; height=25 mm). One part of the cheese, with core, was cut at a depth of 1 cm which was nearest the surface, and was then replaced in the hole in the cheese. The hole was coated with cheese wax, covered with plastic mesh and finally sealed with cheese wax before the cheese was replaced in the ripening room. Cheese were analysed for content of fat, protein, dry matter and salt as well as pH value. Proteolysis in cheese was monitored by polyacrylamide gel electrophoresis and determining content of water soluble nitrogen (WSN) as a percentage of total nitrogen (% TN), trichloroacetic acid-soluble nitrogen (TCA-SN) as a percentage of total nitrogen as well as free amino acid (as g of leucine/100 g dry matter). The texture profile analysis (TPA) was carried out using the texture analyser (Lloyd instruments, model TA Plus). The textural characteristics of Brač cheese were analysed for hardness 1, strain at hardness 1, fracturability, strain at fracture, hardness 2, adhesiveness, cohesiveness and springiness.

Descriptive statistics, analysis of variance (ANOVA) using a GLM procedure, pairwise comparisons of mean values with Fisher's LSD test, Pearson's correlation coefficients and linear regression analysis were performed with SPSS (version 21).

## Results and conclusions

The results showed that composition of sheep milk had a greater effect on curd syneresis ability in comparison to its strength. Casein and fat content, casein to fat ratio as well as urea concentration in sheep milk had no significant effect on curd strength. Increasing of casein and fat content in sheep milk significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) reduced syneresis ability of curd while increasing casein to fat ratio significantly ( $P<0.01$ ) enhanced its syneresis ability. Enhanced curd strength and its syneresis ability were significantly affected by increase of total ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) and ionic calcium ( $P<0.01$ ) in sheep milk. The increase of urea concentration in sheep milk had no significant effect on curd strength but obtained curd showed significant reduction ( $P<0.01$ ) in syneresis ability. Somatic cell count in sheep milk significantly ( $P<0.05$ ) affected curd strength but did not affect its syneresis ability.

The increase of casein content in sheep milk significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) reduced the extent of secondary proteolysis in Brač cheese. The level of  $\beta$ -casein and its ripening index were significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) affected by increase of casein content in sheep milk. The levels of the rest of caseins in Brač cheese did not show statistically significant differences due to the increase of casein content in sheep milk. The research showed that increase of casein content in sheep milk had significant effect ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) on hardness 1 and hardness 2, fracturability and springiness of Brač cheese while changes in adhesiveness, cohesiveness as well as strain at fracture and hardness 1 did not show statistically significant differences.

The content of TCA-SN (%TN) in Brač cheese was significantly ( $P<0.01$ ) reduced as a result of an increase of milk fat in sheep milk. The increase of the aforementioned parameter in sheep milk also reduced the content of free amino acid and WSN (% TN) in Brač cheese but without statistical significances. The increase of milk fat in sheep milk significantly ( $P<0.05$ ) reduced level of  $\gamma$ -caseins in Brač cheese while the levels of the rest of caseins in Brač cheese did not show statistically significant differences. The fracturability, hardness 1 and hardness 2 of Brač cheese significantly ( $P<0.01$ ) decreased with increase of milk fat in sheep milk. On the other hand, adhesiveness, cohesiveness as well as strain at fracture and hardness 1 of Brač cheese were not affected by fat content in sheep milk.

The extend of secondary proteolysis in Brač cheese was not changed regardless of casein to fat ratio in sheep milk. The increase of casein to fat ratio in sheep milk caused a significant increase in levels of  $\beta$  and  $\gamma$ -caseins in Brač cheese. Although level of  $\alpha_{s1}$ -casein in Brač cheese did not undergo statistically significant changes, level of  $\alpha_{s1}$ -I-casein was significantly modified with increase of casein to fat ratio in sheep milk. The fracturability, hardness 1 and hardness 2 of Brač cheese significantly ( $P<0.01$ ) increased as a result of an increase of casein to fat ratio in sheep milk. Increase of casein to fat ratio significantly ( $P<0.05$ ) affected strain at fracture of Brač cheese but did not affect its adhesiveness, cohesiveness, springiness and strain at hardness 1.

The increase of urea concentration in sheep milk significantly ( $P<0.01$ ) modified levels of  $\beta$ -caseins but did not affect content of the rest of caseins in Brač cheese. The extent of secondary proteolysis in Brač cheese was significantly ( $P<0.05$ ) affected by the increase of urea concentration in sheep milk. The fracturability, hardness 1 and hardness 2 of Brač cheese were significantly ( $P<0.01$ ) modified with increase of urea concentration in sheep milk. However, no significant differences were found between urea concentration in sheep milk and adhesiveness, cohesiveness, springiness as well as strain at fracture and hardness 1.

Extend of secondary proteolysis in Brač cheese were significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) affected by increase of somatic cell count in sheep milk. The levels of  $\alpha$  and  $\beta$ -casein significantly ( $P<0.05$ ) increased with increasing somatic cell count in sheep milk while changes in  $\gamma$  and  $\alpha_{s1}$ -I caseins did not show statistically significant differences. The increase of somatic cell count content in sheep milk significantly increased fracturability ( $P<0.05$ ) and hardness 2 ( $P<0.01$ ) as well as significantly reduced adhesiveness ( $P<0.01$ ) in Brač cheese. Changes in strain at fracture and hardness 1 as well as springiness were also significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) affected by increase of somatic cell count in sheep milk. There were no significant differences in hardness 1 and cohesiveness in Brač cheese due to increase of somatic cell count in sheep milk.

The content of TCA-SN (%TN) in Brač cheese was significantly ( $P<0.01$ ) reduced as a result of advancement of lactation. The stage of lactation had no significant effect both on the content of free amino acid and WSN (% TN) in Brač cheese. The level of  $\beta$ -casein in Brač cheese was significantly ( $P<0.05$ ) reduced in Brač cheese with advancement of lactation. The levels of the rest of caseins in Brač cheese did not show significant differences due to stage of lactation. With advancement of lactation, the cheeses became significantly ( $P<0.01$ ) softer. The major consequences were a significant ( $P<0.01$ ) increase of fracturability, hardness 1 and hardness 2 with stage of lactation. The other texture parameters were not affected by stage of lactation.

The levels of  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$ -casein were significantly ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ) reduced and the levels of its degradation products were significantly ( $P<0.01$ ) increased during the 120-day maturation period of Brač cheese. The extend of secondary proteolysis in Brač cheese significantly ( $P<0.01$ ) increased by increasing of its ripening time. On the other hand, Brač cheese became significantly ( $P<0.01$ ) harder, less springy and less cohesive.

Key words: raw sheep milk, curd texture, curd syneresis, brač cheese, proteolysis, cheese texture.

<b>Sadržaj</b>	<b>str.</b>
1. UVOD	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja	2
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Tekstura i reologija sireva	3
2.2. Utjecaj kakvoće mlijeka na teksturu sirnog gruša i sira na početku zrenja	4
2.2.1. Proteini - kazein	5
2.2.2. Mliječna mast	7
2.2.3. Voda	10
2.2.4. Povezanost pH, udjela kalcija, vode i soli s teksturom	10
2.2.5. Urea	13
2.2.6. Somatske stanice	14
2.3. Povezanost proteolitičkih i teksturnih promjena tijekom zrenja sira	16
2.3.1. Količina i aktivnost rezidualnog sirila i prirodnih proteinaza iz mlijeka	18
2.3.2. Vrsta rezidualnog sirila	20
2.3.3. Omjer mliječne masti i proteina u siru	21
2.3.4. Temperatura zrenja	22
2.3.5. Udio vode i soli u siru	23
2.3.6. Koncentracija uree	24
3. MATERIJAL I METODE RADA	26
3.1. Tehnologija proizvodnje bračkog sira	26
3.2. Prikupljanje uzoraka ovčjeg mlijeka	28
3.3. Analize ovčjeg mlijeka	29
3.4. Postupak mjerenja teksture i sposobnosti sinereze sirnog gruša	29
3.5. Prikupljanje uzoraka bračkog sira	30
3.6. Analize kemijskog-fizikalnog sastava bračkog sira	31
3.7. Procjena proteolitičkih promjena u bračkom siru tijekom zrenja	31
3.8. Mjerenje teksture bračkog sira	32
3.8.1. Priprema uzoraka sira prije mjerenja	32
3.8.2. Analiza teksturnog profila (TPA)	33
3.9. Statistička obrada podataka	34
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	37
4.1. Kakvoća ovčjeg mlijeka	37
4.1.1. Utjecaj broja somatskih stanica	38

4.1.2. Utjecaj koncentracije uree	39
4.1.3. Utjecaj stadija laktacije	40
4.2. Tvrdoća i sposobnost sinereze sirnog gruša	41
4.2.1. Utjecaj kakvoće sirovog ovčjeg mlijeka	41
4.2.1.1. Mliječna mast	41
4.2.1.2. Kazein	42
4.2.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti	43
4.2.1.4. Urea	44
4.2.1.5. Ukupni kalcij	45
4.2.1.6. Ionski kalcij	46
4.2.1.7. Broj somatskih stanica	47
4.2.2. Utjecaj stadija laktacije	48
4.3. Kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira	49
4.4. Čimbenici sastava, proteolitičkih i teksturnih značajki bračkog sira	50
4.4.1. Utjecaj kakvoće ovčjeg mlijeka	50
4.4.1.1. Mliječna mast	50
4.4.1.2. Kazein	53
4.4.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti	56
4.4.1.4. Urea	59
4.4.1.5. Broj somatskih stanica	62
4.4.2. Utjecaj stadija laktacije	65
4.4.3. Utjecaj trajanja zrenja	68
4.5. Koeficijenti korelacija	72
5. RASPRAVA	80
5.1. Sastav i kakvoća sirovog ovčjeg mlijeka	80
5.2. Utjecaj sastava i kakvoće mlijeka za sirenje na teksturu i sinerezu sirnog gruša	87
5.3. Sastav, proteolitičke i teksturne značajke bračkog sira	93
5.3.1. Utjecaj sastava i kakvoće mlijeka za sirenje	93
5.3.1.1. Mliječna mast	93
5.3.1.2. Kazein	96
5.3.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti	101
5.3.1.4. Urea	103
5.3.1.5. Broj somatskih stanica	106
5.3.2. Utjecaj trajanja zrenja sira	109

5.3.3. Utjecaj stadija lakracije	115
6. ZAKLJUČCI	118
7. LITERATURA	120

## Popis kratica, tablica, grafikona i slika

Kratica	Značenje
WSN (% TN)	udio u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik
TCA-SN (% TN)	udio frakcija dušika topivih u 12 %-tnoj u trikloroctenoj kiselini u odnosu na ukupni dušik
USA	ukupne slobodne aminokiseline
$I_{\alpha}$	indeks alfa
$I_{\gamma/\beta}$	indeks beta
$\bar{x}$	srednja vrijednost
SD	standardna devijacija
C.V.	koeficijent varijacije
BSS	broj somatskih stanica
UBM	ukupan broj mikroorganizama
NZ	nema statistički značajne razlike
ST	suha tvar
STBM	suha tvar bez masti
UCa	udio ukupnog kalcija
NT	nemasna tvar
MM	mliječna mast
UK	udio kazeina
TZ	trajanje zrenja
čvrstoća 1	čvrstoća u prvom ciklusu kompresije
čvrstoća 2	čvrstoća u drugom ciklusu kompresije
N	Njutn
J	Džul
UMM	udio mliječne masti
OKMM	omjer kazeina i mliječne masti
KU	koncentracija uree
SL	stadij laktacije



Tablica br.	Naslov tablice	str.
1.	Prosječan sastav ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka	5
2.	Prosječan udio kazeinskih frakcija u ovčjem, kozjem i kravljem mlijeku	6
3.	Pokazatelji strukture kazeinske micelle u ovčjem, kozjem i kravljem mlijeku	6
4.	Sastav masnih kiselina u triacilglicerolima ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka	8
5.	Kakvoća ovčjeg mlijeka	37
6.	Utjecaj broja somatskih stanica na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka	38
7.	Utjecaj koncentracije uree na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka	39
8.	Utjecaj stadija laktacije na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka	40
9.	Utjecaj stadija laktacije na sposobnost sinereze i tvrdoću sirnog gruša	48
10.	Kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira 120 – og dana zrenja	49
11.	Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira	50
12.	Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira	51
13.	Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	52
14.	Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira	53
15.	Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira	54
16.	Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	55
17.	Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira	56
18.	Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira	57

Tablica br.	Naslov tablice	str.
19.	Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	58
20.	Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na fizikalno-kemijski sastav bračkog sira	59
21.	Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira	60
22.	Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	61
23.	Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na fizikalno-kemijski sastav bračkog sira	62
24.	Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira	63
25.	Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	64
26.	Utjecaj stadija laktacije na fizikalno-kemijski sastav bračkog sira	65
27.	Utjecaj stadija laktacije na proteolitičke promjene bračkog sira	66
28.	Utjecaj stadija laktacije na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira	67
29.	Promjene kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira tijekom zrenja	69
30.	Proteolitičke promjene bračkog sira tijekom zrenja	70
31.	Promjene pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira tijekom zrenja	71
32.	Koeficijenti korelacija između stadija laktacije i pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka	75
33.	Koeficijenti korelacija između pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka, tvrdoće i sposobnosti sinereze sirnog gruša	76
34.	Koeficijenti korelacija između pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka i kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira	77
35.	Koeficijenti korelacija između kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira	78
36.	Koeficijenti korelacija između pokazatelja primarnih odnosno sekundarnih proteolitičkih promjena i pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira tijekom zrenja	79

Grafikon br.	Naslov grafikona	str.
1.	Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	41
2.	Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	42
3.	Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	42
4.	Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	43
5.	Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	43
6.	Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	44
7.	Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	44
8.	Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	45
9.	Utjecaj udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	45
10.	Utjecaj udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	46
11.	Utjecaj udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	46
12.	Utjecaj udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	47
13.	Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša	47
14.	Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša	48

Slika br.	Naslov slike	str.
1.	Provjera prikladnosti sirnog gruša za rezanje	26
2.	Ručno usitnjavanje sirnog gruša	27
3.	Dodatno usitnjavanje sirnog gruša pjenjačom	27
4.	Stavljanje sirnog gruša u kalup	27
5.	Prešanje sira utegom od bračkog kamena	27
6.	Soljenje sira u salamuri	28
7.	Zrenje sira	28

# 1. UVOD

Uzgoj ovaca je od davnina jedna od najvažnijih gospodarskih grana na području otoka Brača. Alberto Fortis u svojoj knjizi „Put po Dalmaciji“ koja je prvi put objavljena 1774. godine navodi posebnost okusa janjetine, mlijeka i sira s otoka Brača. Prva organizirana proizvodnja bračkog sira započinje osnivanjem ovčarsko mljekarske zadruge u Pražnicama 1933. godine s podružnicama u Nerežišćima i Gornjem Humcu (Defilippis, 1966). Zadruga u Nerežišćima se 1937. godine osamostaljuje i nastavlja okupljati sve veći broj zadrugara (Baković, 1952). Autor navodi da je tijekom 1939. godine u Splitu potražnja za bračkim sirom bila puno veća u odnosu na paški sir, danas najpoznatiji i najtraženiji hrvatski sir.

Međutim, gospodarska važnost pojedinih proizvoda i uzgojni ciljevi u ovčarstvu su se posljednjih godina značajno mijenjali i prilagođavali potrebama tržišta tako da je meso (janjetina) i danas primarni proizvod ovčarstva otoka Brača jer navedena proizvodnja zahtjeva manja financijska ulaganja u objekte i opremu (Mioč i sur., 2013). Brački sir se danas proizvodi u malim količinama isključivo na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima ponajviše kao dodatni izvor prihoda. Proizvodnja ovčjeg mlijeka gospodarski je potencijal otoka koji se ne koristi u dovoljnoj mjeri iako potražnja za sirom i skutom od strane lokalnog stanovništva i turista višestruko premašuje njihovu sadašnju proizvodnju. Osim toga proizvodnja kvalitetnog ovčjeg mlijeka je preduvjet proizvodnje kvalitetnih tradicijskih sireva i zahtjeva određenu razinu znanja budući da se navedena proizvodnja temelji na uporabi sirovog mlijeka. U sirovom mlijeku ukoliko je higijenski ispravno odnosno dobiveno od zdravih ovaca, sačuvani su svi prirodni enzimi, prirodne bakterije mliječne kiseline, cjelovitost kazeina i ravnoteža mineralnog sastava (Samaržija, 2003). Sirovo ovčje mlijeko prema navedenoj autorici ima odlična preradbeno svojstva, a proizvedeni sirevi kraće zriju, imaju izraženiji okus i drugačiju teksturu u odnosu na sireve dobivene od toplinski obrađenog mlijeka. Stoga bi se temeljnim znanstvenim istraživanjima stvorila ne samo osnovica za utvrđivanje prepoznatljivosti bračkog sira već bi se i edukacijom proizvođača mogao unaprijediti tehnološki proces od proizvodnje ovčjeg mlijeka do njegove prerade.

Danas se u svim razvijenim zemljama povećava potražnja za posebnim proizvodima dobivenih od rijetkih i izvornih pasmina na tradicijski način kojeg karakterizira ekstenzivan način ispaše ovaca i proizvodnja mlijeka u zdravom i netaknutom okolišu na tlu specifične vegetacije (Barać i sur., 2006). Prirodni pašnjaci otoka Brača nisu izdašni u prinosima, ali ne oskudjevaju u raznolikosti brojnih vrsta ljekovitog i aromatičnog bilja čije arome ovce prenose u mlijeko, a brački sirari u sir i skutu. Otok Brač sjedinjuje netaknutu prirodu, bogato povijesno, kulturno i gastronomsko nasljeđe te se dohodovnost turističke

djelatnosti mora poboljšavati ponudom poljoprivrednih proizvoda proizvedenih na vlastitim proizvodnim resursima osobito tradicijskim prehrambenim proizvodima kao što su brački sir i skuta te sirutka.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Brački sir se kao i većina naših tradicijskih sireva proizvodi od sirovog ovčjeg mlijeka o čijem sastavu u najvećoj mjeri ovisi i njegova kakvoća. Ukoliko je mlijeko higijenski ispravno i dobiveno od zdravih ovaca sačuvana je ukupnost i cjelovitost svih njegovih sastojaka i to osobito kazeina. Sirenjem mlijeka nepromjenjenog sastava kazein stvara kontinuiranu i dobro povezanu parakazeinsku mrežu koja je sposobna obuhvatiti ostale sastojke mlijeka i zadržati svoja funkcionalna svojstva tijekom sinereze. Pored toga, parakazeinska mreža u najvećoj mjeri utječe na reološka (mehanička) svojstva sira i predstavlja osnovicu za djelovanje proteolitičkih enzima koji tijekom zrenja u konačnici najviše pridonose oblikovanju njegove karakteristične teksture.

Stoga se predmetnim istraživanjem pretpostavlja da:

- sastav ovčjeg mlijeka utječe na teksturne značajke gruša,
- proteolitičke i teksturne promjene tijekom zrenja bračkog sira ovise o sastavu mlijeka,
- tijek i intenzitet proteolitičkih promjena mijenja teksturne značajke bračkog sira u procesu zrenja

Da bi se navedene pretpostavke provjerile, potrebno je uvrstiti:

- kemijski sastav, fizikalna svojstva te higijensku kakvoću sirovog ovčjeg mlijeka,
- značajke teksture i sinereze gruša kao pokazatelje sposobnosti grušanja mlijeka,
- utjecaj sastava mlijeka na teksturne značajke i sposobnost sinereze gruša dobivenog tijekom različitog vremena grušanja,
- promjene kemijskog sastava, teksture te pokazatelja primarne i sekundarne proteolize u bračkom siru tijekom zrenja,
- povezanost sastava mlijeka s kemijskim sastavom, produktima proteolize odnosno pokazateljima teksture sira tijekom zrenja, povezanost proteolitičkih i teksturnih promjena tijekom zrenja bračkog sira.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Tekstura i reologija sireva

Tekstura sira jedan je od najvažnijih čimbenika njegove kvalitete i prepoznatljivosti (Creamer i Olson, 1982). Sastavom mlijeka za sirenje, tehnološkim postupkom kojem je mlijeko podvrgnuto te uvjetima zrenja u najvećoj se mjeri utječe na sastav odnosno teksturu sira (Lucey i sur., 2003). Pinho i sur. (2004) navode teksturu sira kao složeno senzorsko svojstvo koje proizlazi iz njegovih fizičkih značajki odnosno strukturnih elemenata, a može se utvrditi osjetilima dodira, vida i sluha.

Prema tome, tekstura je visokosubjektivno senzorsko svojstvo koje se spoznaje tijekom konzumacije sira (Gunasekaran i Ak, 2003). Senzorsku procjenu teksturnih značajki sireva u praksi obavljaju senzorski analitičari (Hort i sur., 1997). Međutim, nedostaci senzorske procjene su sljedeći: zahtjeva dobro obučene senzorske analitičare, njihova obuka je skupa i dugotrajna, procjene su opisne i subjektivne prirode te često mogu biti dvosmislene, zbunjujuće i kao takve nisu usporedive (Hort i sur., 1997, Moyny i sur., 2002). Instrumentalno odnosno objektivno mjerenje teksture sira temelji se na njegovim reološkim svojstvima (Le Quéré i Cayot, 2013). Reologija je znanost koja proučava tečenje i deformaciju materijala izloženih djelovanju vanjske sile (Gunasekaran i Ak, 2003). Pod tečenjem u reologiji se podrazumjeva reorganizacija sastojaka hrane pod utjecajem vanjske sile (Ritzoulis, 2013) dok deformacija predstavlja promjenu oblika i veličine uzorka koji je podvrgnut naprezanju (Bourne, 2002a). Prilikom mjerenja teksture najčešće se koriste uzorci sira koji imaju cilindrični oblik (Rohm i Jaros, 2002), ali mogu biti i u obliku kocke (Fox i sur., 2000). Međutim, prilikom teksturnih mjerenja uzorci u obliku kocke pokazuju sklonost koncentracije primjenjenog naprezanja na njihovim oštrim kutovima što značajno utječe na točnost dobivenih rezultata (Gunasekaran i Ak, 2003). Stoga, navedeni autori prilikom mjerenja teksture sira prednost daju uzorcima cilindričnog oblika. Tijekom instrumentalnog odnosno reološkog mjerenja uzorak sira je tijekom određenog vremenskog razdoblja podvrgnut naprezanju (sili po jedinici površine) i deformaciji pri čemu instrument i softver izračunavaju vrijednost naprezanja u zadanom stupnju deformacije (Hort i sur., 1997).

Prema tome, naprezanje, deformacija i vrijeme čine tri osnovne varijable u proučavanju mehaničkih značajki hrane (Renfu i Abbott, 2004). Međutim, tijekom senzorskog ocjenjivanja sir je u ustima također izložen naprezanju i deformaciji ali je formirani zalogaj podvrgnut i djelovanju sline te se navedenu pojavu ne može mjeriti pomoću instrumenata (Foegeding i Drake, 2007). Stoga se nastojalo iznaći odgovarajuće instrumentalne metode koje će biti u korelaciji sa senzorskim procjenama budući da

instrumenti ne mogu oponašati fizičke promjene u ustima (Drake i Gerard, 2009). Bourne, (2002b) ističe značajno preklapanje teksturnih i reoloških značajki hrane a kao primjer navodi da deformacija uzorka nastala senzorskom procjenom (pritiskom između palca i kažiprsta) je posljedica naprezanja te prema tome spada i u reološko i teksturno svojstvo. Stoga, Hort i Grys, (2001) definiraju teksturu kao reološku manifestaciju fizičke strukture hrane. Slijedom navedenog, Fox i sur. (2000) navode da teksturne odnosno reološke značajke sireva ovise o zajedničkom djelovanju sastava sira, njegove mikro i makrostrukture te o fizikalno-kemijskom stanju pojedinih sastojaka sira. Pod mikrostrukturom sireva dobivenih sirišnim zgrušavanjem mlijeka se podrazumjeva unutarnja struktura pojedinačnih sirišnih zrna odnosno trodimenzionalna kalcij fosfatna parakazeinska mreža koja obuhvaća ostale sastojke mlijeka (Fox i sur., 2000; Puđa, 2009). Cjelovitost navedene mreže održavaju veze kalcija s aminokiselinskim ostacima aspartata i glutamata, koloidnog kalcijevog fosfata s fosfatnim ostacima serina te razne elektrostatičke i hidrofobne veze između sastojaka sira (Guinee, 2011). O'Callaghan i Guinee, (2004) navode kontinuitet parakazeinske mreže kao važan čimbenik teksturnih značajki sireva iako se na razini mikro i makrostrukture javljaju različiti diskontinuiteti. Autori navode da diskontinuitet parakazeinske mreže na razini mikrostrukture je posljedica izlaska mliječne masti iz parakazeinske mreže odnosno dehidracije površine sirišnog zrna usljed rezanja, zakiseljavanja, dogrijavanja i prešanja sirišnog zrna. Makrostruktura sira nastaje objedinjavanjem pojedinačnih sirišnih zrna u sir kao cjelinu, a raspored i jačina njihove međusobne povezanosti utječe na nastanak diskontinuiteta vidljivog u obliku raznih rupica i pukotina (Puđa, 2009). Diskontinuitet proteinske strukture dovodi do nastanka kratke, lomljive i mrvljive teksture što značajno utječe na ponovljivost i rezultate teksturnih mjerenja (O'Callaghan i Guinee, 2004).

## **2.2. Utjecaj kakvoće mlijeka na teksturu gruša i sira na početku zrenja**

Sastav, prinos i u konačnici kakvoća sira primarno ovise o cjelokupnom sastavu mlijeka i učinkovitosti prijelaza njegovih sastojaka u sir (Amenu i Deeth, 2007). Kazein i mliječna mast u odnosu na ostale sastojke mlijeka u najvećoj količini prelaze u sir (Wendorff, 2002) te čimbenici koji mijenjaju udio kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na izravan način mijenjaju i sastav sira (Rodríguez-Nogales i sur., 2007). Određenim istraživanjima je utvrđena povezanost sastava sira s njegovom teksturom (Gunasekaran i Ak, 2003) što u konačnici dovodi do zaključka da sastav mlijeka preko sastava sira ima neizravan utjecaj na njegove teksturne značajke. Irigoyen i sur. (2002) tvrde da su sirevi

dobiveni od punomasnog ovčjeg mlijeka imali značajno manju čvrstoću radi manjeg udjela vode te većeg udjela mliječne masti odnosno manjeg udjela proteina u suhoj tvari u odnosu na sireve proizvedene iz obranog mlijeka. Ovčje mlijeko u usporedbi sa kravljim i kozjim ima veći udio suhe tvari, proteina, kazeina, mliječne masti i pepela (tablica 1). Stoga, ovčje mlijeko se gotovo u cijelosti prerađuje u sir jer u odnosu na kravlje i kozje daje gotovo dvostruko veći prinos (Antunac i Lukač Havranek, 1999).

Tablica 1. Prosječan sastav ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka (Park i sur., 2007; Guinee i O'Brien, 2010; Ramos i Juarez, 2011)

Sastojak (%)	Mlijeko		
	Ovčje	Kozje	Kravlje
Suha tvar	18,40	12,20	12,60
Mliječna mast	7,09	3,80	3,90
Proteini	5,72	3,40	3,25
Kazein	4,44	2,40	2,51
Albumini i globulini	0,98	0,60	0,54
Laktoza	4,61	4,40	4,70
Pepeo	0,91	0,80	0,74

### 2.2.1. Proteini - kazein

Prosječan udio proteina u ovčjem mlijeku je 5,72 %, a na kazein otpada od 76 - 83 % (Park i sur., 2007; Ramos i Juarez, 2011). Kazein u ovčjem kao u kozjem i u kravljem mlijeku nalazi se u obliku koloidnih čestica ili micela. Kazeinska micela se sastoji od velikog broja manjih podjedinica ili submicela pojedinačno sastavljenih od sljedećih frakcija:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$  (Fox i sur., 2000 ; Haenlein i Wendorff, 2006). Međutim, osim u udjelu kazeina, ovčje u usporedbi s kravljim i kozjim mlijekom se razlikuje po udjelu pojedinih frakcija u ukupnom kazeinu, a navedene frakcije se međusobno razlikuju i po broju fosfoserinskih ostataka (tablica 2). Fosfoserinski ostaci nastaju fosforilacijom hidroksilnih skupina serina te osim povezivanja navedenih podjedinica u kazeinsku micelu imaju i ključnu ulogu tijekom grušanja mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012) jer stupanj fosforilacije pojedinih kazeinskih podjedinica određuje i obujam njihove precipitacije u prisustvu ionskog kalcija (Horne i Banks, 2004).



Tablica 2. Prosječan udio kazeinskih frakcija u ovčjem, kozjem i kravljem mlijeku (Moatsou i sur., 2004; Haenlein, 2006; Giambra, 2011)

Frakcija	Ovčje mlijeko		Kozje mlijeko		Kravlje mlijeko	
	(%)	broj fosfatnih ostataka	(%)	broj fosfatnih ostataka	(%)	broj fosfatnih ostataka
$\alpha_{s1}$ - kazein	36,30	10	5,60	11	38,00	9
$\alpha_{s2}$ - kazein	16,40	13	19,20	10	12,00	12
$\beta$ - kazein	37,10	7	54,80	6	36,00	5
$\kappa$ - kazein	10,20	3	20,40	3	14,00	3

Kazein ovčjeg mlijeka u svom sastavu ima najveći udio  $\alpha_s$ -kazeina koji u aminokiselinskom slijedu sadržavaju najveći broj fosfoserinskih ostataka. Stoga, kazein ovčjeg mlijeka potencijalno ima veći broj mjesta povezivanja ionskog kalcija i sirlom izmjenjenog kazeina tijekom zgrušavanja mlijeka te sposobnost stvaranja guste, čvrste i dobro povezane kazeinske mreže ili gruš. Međutim, uzroke različite sposobnosti zgrušavanja ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka treba tražiti i u strukturi njihovih kazeinskih micela (tablica 3).

Tablica 3. Pokazatelji strukture kazeinske micela u ovčjem, kozjem i kravljem mlijeku (Park i sur., 2007)

Pokazatelj strukture kazeinske micela	Ovčje mlijeko	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
Promjer (nm)	193,00	260,00	180,00
Hidratacija (g/g suhe tvari)	-	1,77	1,90
Mineralizacija (mg Ca/g kazeina)	37,00	36,00	29,00

Kazeinska micela ovčjeg mlijeka neznatno je većeg promjera od micela kravljeg mlijeka, ali i značajno manjeg promjera u odnosu na micelu kozjeg mlijeka. Međutim, veći stupanj mineralizacije kazeinske micela u ovčjem mlijeku vjerojatno utječe i na pokazatelje njene hidratiziranosti. Iako nema podataka o pokazateljima hidratiziranosti kazeinske micelle ovčjeg mlijeka, za pretpostaviti je da je ona manja u odnosu na hidratiziranost micela kozjeg, a naročito kravljeg mlijeka jer Park i sur. (2007) navode obrnuto proporcionalan odnos stupnja mineralizacije kazeinske micela i njene hidratiziranosti. Zbog različitog udjela kazeina, udjela pojedinih frakcija u kazeinskoj miceli, veličine, stupnja hidratacije i

mineralizacije kazeinske micelle, ovčje u odnosu na kravlje i kozje mlijeko ima različite preradbene i teksturne značajke jer brže gruša i u konačnici daje čvršći gruš.

Dodatkom sirila u mlijeko dolazi do značajne promjene fizikalno-kemijske ravnoteže njegovog koloidnog sustava kojeg više od 3/4 sačinjava kazein (Puđa, 2009). Kimozin u mlijeku se veže na  $\kappa$ -kazein kazeinske micelle te dovodi do enzimske hidrolize peptidne veze između aminokiselina fenilalanina i metionina koje se nalaze na 105 i 106. mjestu polipeptidnog lanca  $\kappa$ -kazeina (Tratnik i Božanić, 2012). Veći N-terminalni hidrofobni dio  $\kappa$ -kazeina (f 1-105) koji se naziva parakapakazein ostaje vezan za kazeinsku micelu dok manji hidrofilni C-terminalni dio (f 106-169) ili glikomakropeptid se odvaja i prelazi u sirutku (Dalglish, 1994; Lucey, 2009). Agregacija kazeinskih micela započinje kada se odvoji oko 90 % glikomakropeptida (Ramkumar, 1997). Zbog svoje izrazite elektronegativnosti odvojeni glikomakropeptid je imao izražena hidrofilna svojstva dok je bio u sklopu kazeinske micelle, te je stoga imao zadaću njene stabilizacije u vodenoj fazi mlijeka (Horne i Banks, 2004). Gubitkom glikomakropeptida odnosno gubitkom elektronegativnog naboja, dolazi do destabilizacije parakapa kazeina (f 1-105) i njegovog povezivanja preko iona  $Ca^{2+}$  u parakazeinsku mrežu odnosno gruš.

Stoga, Daviau i sur. (2000b) i Lebecque i sur. (2001) naglašavaju važnost grušanja mlijeka nepromjenjenog sastava kao temeljnog čimbenika uspostave primarne strukture parakazeinske mreže odnosno gruša zadovoljavajuće čvrstoće koji u najvećoj mjeri utječe na proces otpuštanja sirutke te sastav i teksturu sira bez obzira što se značajnije promjene u sastavu i teksturi događaju tijekom prešanja i soljenja, a naročito tijekom zrenja sira.

Prema tome, kazein je najvažniji sastojak u strukturi gruša i sira jer im daje čvrstoću i elastičnost te o njegovom udjelu u najvećoj mjeri ovise njihove teksturne karakteristike (Gunasekaran i Ak, 2003). U prilog navedenoj tvrdnji, Flourey i sur. (2009) navode da je gruš koji je u svojoj mikrostrukturi imao veći udjel proteina u suhoj tvari (440:370 g/kg suhe tvari) imao gušću, razgranatiju i bolje povezaniju parakazeinsku mrežu te je stoga imao značajno veću čvrstoću. Prentice (1994) nadalje navodi da promjena udjela proteina u nemasnoj tvari sira značajno mijenja njegovu čvrstoću i elastičnost. Autor navodi da su sirevi koji su u nemasnoj tvari sadržavali manje od 40 % proteina imali manju čvrstoću i mekanu konzistenciju dok se čvrstoća progresivno povećavala s povećanjem udjela proteina iznad navedene vrijednosti.

### **2.2.2. Mliječna mast**

Prosječan udio mliječne masti u ovčjem mlijeku je 7,09 % (Ramos i Juarez, 2011). Mliječna mast je u vodenoj fazi mlijeka raspršena u obliku sitnih globula različitog

promjera te je njegova najveća, ali i najlakša čestica (Bylund, 1995). Masna globula se u osnovi sastoji od jezgre i membrane (Tratnik i Božanić, 2012). U jezgri gotovo u cijelosti dominiraju triacilgliceroli dok se membrana sastoji od fosfolipida, proteina, cerebrozida, glikoproteina, kolesterola, neutralnih glicerida, vitamina A, karotenoida i u manjoj mjeri od enzima i mineralnih tvari (Walstra i sur., 2006). Membrana masne globule nema stalan sastav niti debljinu jer stalno izmjenjuje sastojke s mliječnim serumom (Bylund, 1995). Promjer masne globule i njen sastav prije svega ovisi o vrsti mlijeka (Haenlein, 2006). El Zeini (2006) navodi da je promjer masne globule kravljeg (3,95  $\mu\text{m}$ ) i ovčjeg mlijeka (3,78  $\mu\text{m}$ ) puno veći u odnosu na istu u kozjem mlijeku (3,19  $\mu\text{m}$ ).

Tablica 4. Sastav masnih kiselina u triacilglicerolima ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka (Bylund, 1995; Markiewicz-Kęszycka i sur., 2013)

Masna kiselina	Udio (g/100 g)			Temperatura topljenja ( $^{\circ}\text{C}$ )	Fizičko stanje pri sobnoj temperaturi
	Ovčje mlijeko	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko		
Maslačna	2,57	2,03	2,87	-7,9	Tekuće
Kaprionska	1,87	2,78	2,01	-1,5	
Kaprilna	1,87	2,92	1,39	+16,5	
Kaprinska	6,63	9,59	3,03	+31,4	
Laurinska	3,99	4,52	3,64	+43,6	
Mirinstinska	10,17	9,83	10,92	+53,8	Kruto
Palmitinska	25,10	24,64	28,70	+62,6	
Stearinska	8,85	8,87	11,23	+69,3	
Oleinska	20,18	18,65	22,36	+14,0	Tekuće
Linolna	2,32	2,25	2,57	-5,0	
Linolenska	0,92	0,77	0,50	-5,0	

U sastav triacilglicerola masne globule ulaze veliki broj masnih kiselina (tablica 4). Veliki broj masnih kiselina ukazuje na činjenicu da završna temperatura topljenja odnosno temperatura očvršćavanja mliječne masti nisu fizikalne veličine koje se mogu iskazati jednom brojčanom jedinicom već temperaturnim intervalom (Puđa, 2009). Udio mliječne masti i promjer njenih globula u mlijeku za sirenje može utjecati na njegovu sposobnost

grušanja. O'Mahony i sur. (2005b) navode da mlijeko s većim promjerom globula mliječne masti sporije gruša i daje gruš manje čvrstoće jer navedene globule u fizičkom smislu spriječavaju agregaciju kazeinskih micela. Međutim, Calvo (2002) je utvrdila da udio mliječne masti nije značajno utjecao na nastanak glikomakropeptida tijekom enzimske faze grušanja mlijeka. Grušanjem obranog mlijeka dobiva se kompaktan gruš i sir s većim udjelom proteina i manjim ukupnim udjelom obuhvaćene mliječne masti (Guinee i sur., 2000b; Guinee i McSweeney, 2003). Globule mliječne masti također utječu na udio vode u grušu i siru jer fizički spriječavaju otpuštanje sirutke tijekom sinereze (Fenelon i Guinee, 1999).

Udio proteina i mliječne masti u siru se ne može promatrati odvojeno jer povećanjem udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje značajno se smanjuje udio proteina u suhoj tvari sira i obrnuto (Fenelon i Guinee, 1999; Sánchez-Macías i sur., 2010). Fenelon i Guinee, (1999) i Lteif i sur. (2009) navode da ovakav obrnuto proporcionalan odnos značajno utječe na teksturne značajke sira. Sirevi s nižim udjelom mliječne masti imali su značajno veći udio proteina i vode (Bryant i sur., 1995; Fenelon i Guinee 2000) te su vrijednosti njihove čvrstoće i napona lomljivosti bile znatno veće u odnosu na punomasne sireve (Fenelon i Guinee 2000) jer je mikrostruktura proteinskog matriksa sireva s nižim udjelom mliječne masti znatno kompaktnija (Bryant i sur., 1995; Madadlou i sur., 2005). Zbog kompaktnije mikrostrukture, sirevi sa smanjenim udjelom mliječne masti su bili kohezivniji i imali su značajno manju adhezivnost (Irudayaraj i sur., 1999). Kao drugi razlog čvršće teksture sireva s nižim udjelom mliječne masti Rudan i sur. (1999) navode smanjenje udjela vode u nemasnoj tvari sira. Smanjenje udjela mliječne masti u Halloumi siru dovodi do značajnog povećanja njihove čvrstoće, ali u odnosu na punomasne, nemasni sirevi imaju manju elastičnost i značajno manju adhezivnost (Lteif i sur., 2009). Sirevi nižeg udjela mliječne masti puknuće parakazeinske strukture postižu pri značajno većem naponu ali pri manjoj deformaciji u odnosu na punomasne sireve čije se puknuće parakazeinske strukture događa pri značajno manjem naponu i većoj deformaciji (Madadlou i sur., 2005). Promjenom udjela mliječne masti u siru, mijenja se, raspored (Guinee i sur., 2000b), promjer i oblik masnih globula uklopljenih u proteinsku strukturu sira (Rogers i sur., 2010). Masne globule u sirevima nižeg udjela mliječne masti imaju manji promjer, kuglasti oblik koji ima najmanju dodirnu površinu s proteinskom mrežom te su unutar nje u manjem broju jednolično raspoređene (Guinee i sur., 2000b; Madadlou i sur., 2005; Rogers i sur., 2010). Autori nadalje navode da se u masnijim sirevima više masnih globula spaja u nakupine nepravilnog oblika što za posljedicu ima povećanje njihove dodirne površine s vodom i proteinskom mrežom. Prema tome, udio mliječne masti u siru mijenja kontinuitet kazeinske mreže te utječe na kompaktnost i teksturu gruša i sira (Guinee i sur., 2000b). Učinak mliječne masti na teksturne značajke sira osim

količine i sastava masnih kiselina te stupnja koalescencije masnih globula značajno ovisi o i njenom agregatnom stanju (O'Callaghan i Guinee, 2004). Mliječna mast na nižim temperaturama od 5° C je u većoj mjeri u krutom stanju i pridonosi elastičnim značajkama sirne mase. Povećanjem temperature postaje tekuća i viskozna te prilikom naprezanja na dodirnim površinama s proteinskom strukturom i vodom ima učinak maziva što za posljedicu ima da se točka puknuća proteinske strukture postiže s manjom silom odnosno naprežanjem (Guinee, 2011).

### **2.2.3. Voda**

Voda je najzastupljeniji sastojak mlijeka te se nalazi kao vezana i slobodna (Đorđević, 1987). Vezana voda se nalazi adsorbirana na pojedine sastojke suhe tvari koji zbog različitog udjela hidrofилnih skupina imaju i različitu sposobnost vezanja vode odnosno stvaranja hidratacijskog sloja (Tratnik i Božanić, 2012). Prema Đorđeviću (1987), vezana voda je raspoređena na sljedeći način:

- kazein - oko 50 %,
- albumin i globulini – 30 %,
- adsorpcijski sloj masnih globula – 15 %,
- ostali sastojci suhe tvari – oko 4 %.

Slobodna voda je medij u kojemu su otopljeni, koloidno raspršeni i emulgirani sastojci suhe tvari mlijeka (Goff i Hill, 1993). Sirilom izmijenjeni kazein uz prisustvo iona Ca stvara gustu parakazeinsku mrežu u koju je pored mliječne masti uklopljena, voda i u njoj otopljena laktoza, dio mineralnih tvari i neproteinski dušični sastojci (Fox i sur., 2000; Gunasekaran i Ak, 2003; McSweeney, 2007). Prema tome, teksturne značajke grušā i sira ovise o udjelu vode čiji se izravan utjecaj prije svega ogleda u njenom niskom viskozitetu. Osim toga voda neizravno mijenja strukturu parakazeinske mreže jer utječe na udio rezidualne laktoze (mliječne kiseline) i kimozina (Fox i sur., 2000; McSweeney, 2007).

### **2.2.4. Povezanost pH, udjela kalcija, vode i soli s teksturom**

Istraživanje utjecaja pH vrijednosti na kazeinske micide u mlijeku osnovica su razumijevanja navedenog utjecaja na parakazeinske micide u siru (Pastorino i sur., 2003b). Međutim, istraživanje utjecaja pH vrijednosti na kemijski sastav, mikrostrukturu i teksturne značajke sira nije moguće provesti odvojeno jer promjena pH vrijednosti istovremeno utječe na promjenu udjela vode, soli, ukupnog i topljivog kalcija te mijenja

tijek i intenzitet proteolitičkih i teksturnih promjena u siru (Lawrence i sur., 1987; Lucey i Fox, 1993). Laktoza je specifičan proizvod mliječne žlijezde i najvažniji ugljikohidrat mlijeka (Đorđević, 1987). Mljekarske kulture je za potrebe vlastitog metabolizma koriste kao izvor energije a u mlijeko u konačnici oslobađaju mliječnu kiselinu i na taj način mijenjaju njegovu pH vrijednost (Walstra i sur., 2006). Smanjenje pH vrijednosti mlijeka za sirenje prije svega izravno utječe na povećavnje kimozijske aktivnosti na kazeinu, stupnja disocijacije koloidnog kalcijevog fosfata i povećanje koncentracije kalcijevih iona a neizravno na smanjenje elektronegativnog naboja i hidrataciju kazeinskih micela što značajno skraćuje vrijeme zgrušavanja mlijeka (Maćej i sur., 2007). Međutim, ukoliko se u mlijeko dodaje  $\text{CaCl}_2$ , skraćuje vremena zgrušavanja je osim povećanja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i posljedica sniženja njegove pH vrijednosti (Van Hooydonk i sur., 1986a). Solorza i Bell (1998) navode da dodatak od 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  smanjuje pH vrijednost mlijeka za 0,01 podjedinicu do u njemu ukupno postignute koncentracije od 5 mM. Smanjenje pH vrijednosti mlijeka pri dodatku sirila mijenja teksturu Cheddar sira (Ong i sur., 2012). Autori nadalje navode da su sirenjem mlijeka pH vrijednosti od 6,1 dobiveni sirevi koji su imali veći prinos, ali i niže vrijednosti teksturnog profila (čvrstoću, žvakljivost, gumenost, kohezivnost i elastičnost) u odnosu na sireve dobivene sirenjem mlijeka pri pH 6,5 i 6,7. Prema navedenim autorima, sirevi dobiveni sirenjem mlijeka pH vrijednosti 6,3 su imali neznatne teksturne razlike u odnosu na one dobivene sirenjem mlijeka pri pH 6,5 i 6,7 što ukazuje na mogućnost sirenja mlijeka pri pH vrijednosti u rasponu od 6,3–6,5 zbog podizanja prinosa sira uz neznatnu promjenu teksture pri čemu je predhodno potrebno i obaviti senzorsko ocjenjivanje od strane potrošača. Tijekom proizvodnje sira oko 98 % laktoze prelazi u sirutku dok samo manja količina od 0,3-0,6 % zaostaje u siru (Upreti i sur., 2006). McSweeney (2004) navodi da količina zaostale laktoze u Cheddar siru prilikom tehnološkog postupka mljevenja iznosi od 0,8-1,0 %. Međutim, Bertolino i sur. (2011) nisu utvrdili da sir Castelmagno nakon 3 dana zrenja sadrži laktozu. Iako u sir iz mlijeka prelazi vrlo mala količina laktoze, njena vrijednost u stvaranju svojstvene teksture sira je vrlo značajna jer je temeljni supstrat u proizvodnji mliječne kiseline i reguliranja njegove pH vrijednosti. Najveći dio mliječne kiseline u sirevima tipa Cheddar se proizvede prije soljenja i stavljanja u kalupe dok se kod većine sireva glavina zakiseljavanja događa tijekom oblikovanja u kalupima te se njihov konačni pH od 5,0 – 5,3 postiže unutar 12 sati od početka proizvodnje (McSweeney i Fox, 2004). Velike promjene u teksturi sira se događaju smanjenjem pH vrijednosti u rasponu od 5,3 do 4,9 kao posljedica nastavka disocijacije koloidnog kalcijevog fosfata iz parakazeinskih micela, promjene u mikrostrukturi sira zbog smanjenja promjera, smanjenja elektronegativnosti i stupnja njihove hidratiziranosti te u konačnici promjene veza između i unutar proteinskih lanaca u strukturi sira (Gunasekaran i Ak, 2003). Smanjenjem pH vrijednosti u Cheddar siru u

rasponu od 5,3 do 4,7 dolazi do značajnog smanjenja udjela netopljivog (vezanog) kalcija sa 17 na 6 mg/l i udjela vode sa 34 na 31 % (Pastorino i sur., 2003b). Kao posljedicu smanjenja navedene pH vrijednosti dolazi do smanjene površine proteinske mreže sa 82 na 80 % od ukupne površine u mikrostrukturi sira (Pastorino i sur., 2003b) jer sirevi niže pH vrijednosti imaju gušću, zbijeniju i manje poroznu mikrostrukturu (Ong i sur., 2012). Parakazeinske micelle imaju najveću hidratiziranost i voluminoznost pri pH vrijednosti od 5,2 do 5,3 (Van Hooydonk i sur., 1986b; Guinee i Kilcawley, 2004). Međutim, sirevi s pH vrijednošću iznad 5,2-5,3 zbog većeg udjela koloidnog kalcijevog fosfata u strukturi proteinske mreže i njene manje hidratiziranosti, imaju izraženija elastična (van Hooydonk i sur., 1986b; Guinee i Kilcawley, 2004) i kohezivna svojstva (Lawrence i sur., 1987). Lawrence i sur. (1987) navode da se strukturalne jedinice u proteinskoj mreži sira Goude nakon soljenja pri pH od 5,2 nalaze u gotovo nepromjenjenom globularnom stanju kao i u mlijeku. Daljnjim smanjenjem pH vrijednosti i to osobito ispod 5,0 dolazi do nastavka smanjenja rezidualnog kalcija u parakazeinskim micelama, jačeg prodora vodene faze u njihovu unutrašnjost te u konačnici rušenja micelarne i uspostavljanja sasvim nove proteinske strukture koja se značajno razlikuje od izvorne (Puđa, 2009). Autor nadalje navodi da je novonastala struktura velike čvrstoće i krtosti, vrlo male elastičnosti te stoga sirevi s niskom pH vrijednošću imaju kratku strukturu koja se pri reznju mrvi. Međutim, promjena pH vrijednosti u grušu odnosno siru pored strukturalnih promjena usljed promjene u udjelu kolodnog kalcijevog fosfata parakazeinskih micela mijenja i njihov afinitet odnosno osjetljivost prema djelovanu kimozi (Holsinger i sur., 1995; Larsson i sur., 1997). U prilog navedenom, Feeney i sur. (2002) tvrde da smanjenjem udjela kalcija sa 29 na 22 mg/g kazeina uz značajno povećanje u udjelu vode u siru dovodi i do značajne primarne i sekundarne proteolitičke aktivnosti tijekom njegovog zrenja. Stoga pH mladog sira utječe na količinu i aktivnost rezidualnog kimozi priprema kao značajnog čimbenika proteolitičkih i teksturnih promjena tijekom njegovog daljnjeg zrenja (Upadhyay i sur., 2004).

Smanjenje udjela vode u mladom siru je pored ostalih čimbenika i posljedica smanjenja njegove pH vrijednosti na početku zrenja (Watkinson i sur., 2001). Početni udio vode u mladom siru je jedan od glavnih čimbenika učinkovitosti difuzijskog procesa prelaska soli (NaCl) iz salamure u vodenu fazu sira (Ramkumar, 1997) te je za očekivati da će sirevi zbog veće pH vrijednosti sadržavati više vode a posljedično tome i više soli (Guinee, 2004). Sol je osim u vodenoj fazi sira prisutna i u parakazeinskoj mreži putem zamjene kalcijevih iona iz parakazeinata natrijevim ionima iz soli te na taj način doprinosi njenoj hidrataciji (Guinee i Fox, 2004). Pastorino i sur. (2003a) navode da dodatak soli pri pH od 5,45 pojačava ionsku jakost vodene faze sira što dovodi do pojačane hidratacije proteina ali ne i do zamjene kalcijevih iona iz parakazeinata natrijevim ionima iz soli jer je

udjel topljivog kalcija u siru bio konstantan. Do sličnog rezultata su došli i Flourey i sur. (2009) utvrdivši da povećavanjem udjela soli od 0,5 na 1,5 g/100 g sira nije došlo do promjene u omjeru ukupnog i topljivog kalcija u siru čija je pH vrijednost bila u rasponu od 6,2 do 6,5. Osim hidratacije, Guinee i Fox, (2004) navode da je udjel soli u mladom siru jedan od temeljnih uvjeta proteolitičke aktivnosti rezidualnog sirila na parakazeinskoj mreži tijekom zrenja kao primarnog čimbenika u nastanku njegove karakteristične teksture. Međutim, na stupanj apsorpcije soli u siru znatno utječe pH vrijednosti sirne mase (Tratnik i Božanić, 2012). Autori nadalje navode da veća količina soli može biti apsorbirana pri nižoj nego pri višoj pH vrijednosti sirne mase ali soljenjem sira čija je pH vrijednost niža od 5,0 pored izražene slanosti njegova tekstura postaje čvrsta i lomljiva. Razlog ovoj pojavi Guinee i Fox (2004) vide u manjem gubitku vode zbog većeg udjela topljivog kalcijevog laktata u sirevima niže pH vrijednosti tijekom salamurenja.

### 2.2.5. Urea

Urea je organska molekula koja sačinjava oko polovice ukupnog udjela neproteinskog dušika u mlijeku (Walstra i sur., 2006). Prosječna koncentracija uree tijekom laktacije krčkih i istočnofrizijskih ovaca iznosi 35,52 odnosno 33,13 mg/100 ml mlijeka (Bendelja i sur., 2009). Svrha sinteze uree je otklanjanje prekomjernog dušika kao posljedica suviška proteina odnosno manjka energije u obroku preživača (Marenjak i sur., 2009). Danas je određivanje koncentracije uree u kravljem mlijeku u praksi pronašla primjenu u praćenju hranidbenog statusa muznih krava. Međutim, Molle i Landau (2011) navode da koncentracija uree u ovčjem mlijeku može također biti dobar pokazatelj razine proteina u hranidbi ovaca. Koncentracija uree u ovčjem mlijeku u količini iznad 40 mg/dl ukazuje na prekomjeren unos proteina tijekom hranidbe i smanjenje reproduktivne sposobnosti mliječnih ovaca, dok koncentracija uree manja od 25 mg/dl se povezuje s nedovoljnim unosom proteina obrokom i smanjenom proizvodnjom mlijeka (Cannas, 2002). Međutim, kontrola koncentracije uree u ovčjem mlijeku bi osim pokazatelja izbalansiranosti obroka s energijom i proteinima mogao biti koristan kao podatak o prikladnosti prerade ovčjeg mlijeka u sir. Postoji značajna povezanost kimozijske aktivnosti na  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeinu s koncentracijom uree i pH vrijednosti supstrata. Mulvihill i Fox, (1977) su utvrdili da dodatkom kimozina u supstrat  $\alpha_{s1}$ -kazeina sa ili bez uree dolazi do njegove hidrolize u  $\alpha_{s1}$ -I,  $\alpha_{s1}$ -II,  $\alpha_{s1}$ -III i  $\alpha_{s1}$ -IV frakcije ukoliko je pH supstrata bio veći od 5,8. Isti autori navode da ukoliko u supstrat  $\alpha_{s1}$ -kazeina pri njegovoj izoelektričnoj točki nije dodana urea ne dolazi do nastanka njegovih razgradnih produkata ali je umjesto njih nastala  $\alpha_{s1}$ -V frakcija. Dodatkom uree u navedeni supstrat pri istoj pH vrijednosti osim navedenih frakcija na elektroforetogramu se pojavljuje i nastaje  $\alpha_{s1}$ -VI frakcija (Mulvihill i



Fox, 1977) ukazujući na činjenicu da urea povećava topljivost kazeina i smanjuje njegovu hidrofobnost (McMahon i Oommen, 2013). Međutim,  $\beta$ -kazein kimozijskom aktivnošću hidrolizira na njegove razgradne produkte neovisno o pH vrijednosti i dodatku uree (Mulvihill i Fox, 1978). Stoga, povećana koncentracija uree uvjetuje oštećenja na kazeinu odnosno dezintegraciju hidrofobnih dijelova jezgre kazeina (McMahon i Oommen, 2013; Havranek i sur., 2014). Navedene promjene dovode do produženog vremena zgrušavanja mlijeka, nastanka lomljivog gruša, smanjenog stupnja zakiseljavanja i nepravilnog tijeka fermentacije (Havranek i sur., 2014).

### **2.2.6. Somatske stanice**

Sastav ovčjeg mlijeka ovisi o velikom broju čimbenika kao što su primjerice pasmina i dužina laktacije, stadij i redosljed laktacije, zdravstveno stanje vimena, hranidba, sezona i klima (Bencini i Pulina, 1997). Međutim, najveći utjecaj na tehnološke značajke i sastav mlijeka za sirenje ima broj somatskih stanica (Le Maréchal i sur., 2011). Zdravlje vimena je najvažniji čimbenik broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku (Jaeggi i sur., 2003). Međutim, zbog apokrinog tipa sekrecije mlijeka u ovaca i koza se pored somatskih stanica nalaze i citoplazmatske čestice koje su po veličini slične somatskim stanicama (Souza i sur., 2012). Stoga se za utvrđivanje broja somatskih stanica u ovom tipu sekrecije ne mogu u potpunosti koristiti metode koje se koriste za kravlje mlijeko niti prihvatiti granična vrijednost od 400.000 somatskih stanica/ml odnosno mogu se koristiti samo metode specifične za stanice s DNA odnosno one koje razlikuju stanice nukleotida od citoplazmatskih čestica (Antunac i sur., 1997). Le Roux i sur. (2003) navode da tijekom upalnog procesa u mliječnoj žlijezdi dolazi do promjene u sastavu mlijeka zbog smanjenja u sekrecijskoj aktivnosti epitelnog tkiva te povećanju njegove propusnosti i proteolitičke aktivnosti u mlijeku. Smanjenje sekrecijske aktivnosti nastupa prije svega zbog oštećenja epitelnog tkiva djelovanjem bakterijskih toksina ali i zbog enzimske aktivnosti leukocita uslijed njihove produžene dijapedeze (Sordillo i sur., 1997). Međutim, uslijed djelovanja toksina dolazi do povećanja propusnosti sekrecijskog tkiva i ulaska sastojaka iz krvi u mlijeko (Le Roux i sur., 2003).

Prema Pintu i sur. (2013) pojačana proteolitička aktivnost u mlijeku tijekom upale vimena potječe od:

- leukocita odnosno polimorfonuklearnih neutrofila (elastaza, katepsin B i D),
- epitelnih stanica sekretornog tkiva (N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaze),
- krvi (plazmin).

Temeljem brojnih istraživanja, povećani broj somatskih stanica utječe na dnevnu proizvodnju mlijeka, mijenja njegov sastav, a posljedično tome i njegove tehnološke značajke. Proteolitička aktivnost somatskih stanica iz mastičnog mlijeka je značajno veća u odnosu na navedenu aktivnost leukocita u krvi zdravih krava (Verdi i Barbano, 1991). Povećanjem broja somatskih stanica značajno se smanjuje dnevna proizvodnja ovčjeg mlijeka (Gonzalo i sur., 2002, Albenzio i sur., 2004; Marti De Olives i sur., 2013). Međutim, istraživanja promjene kemijskog sastava ovčjeg mlijeka povećanjem broja somatskih stanica su poprilično proturječna (Raynal-Ljutovac i sur., 2007, Le Maréchal i sur., 2011). Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku udio suhe tvari se smanjuje (Jaeggi i sur., 2003) ili se uopće ne mijenja (Pirisi i sur., 2000). Međutim, većina autora je suglasna da se s povećanjem broja somatskih stanica značajno smanjuje udio laktoze u ovčjem mlijeku odnosno povećava njegova pH vrijednost (Raynal-Ljutovac i sur., 2007). Rodríguez-Nogales i sur. (2007) su utvrdili povezanost broja somatskih stanica s mliječnom masti ( $r = -0,40$ ) odnosno proteinima ( $r = 0,33$ ). Albenzio i sur. (2004), Bianchi i sur. (2004a), Revilla i sur. (2007) i Marti De Olives i sur. (2013) su također utvrdili značajno povećanje udjela proteina u mlijeku s povećanjem broja somatskih stanica ali je udio mliječne masti u navedenom mlijeku bio smanjen (Bianchi i sur., 2004a), bio veći (Marti De Olives i sur., 2013) ili se nije mijenjao (Albenzio i sur., 2004; Revilla i sur. 2007). Kao razlog povećanja udjela proteina povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku Rodríguez-Nogales i sur. (2007) vide u poremećenoj propusnosti sekretornog tkiva uslijed djelovanja bakterijskih toksina i pojačanom ulasku serumskih proteina iz ekstracelularnih tekućina u mlijeko. Međutim, vrlo važno je naglasiti da broj somatskih stanica odnosno promjena u udjelu proteina u mlijeku značajno zavisi i o vrsti uzročnika upalnog procesa (Coulon i sur., 2002). Autori nadalje navode značajno povećanje udjela proteina u mlijeku iz vimena inficiranog s *Staphylococcus aureus* (34,5 g/kg), *Streptococcus uberis* (36,3 g/kg) odnosno *Escherichia coli* (39,3 g/kg). Nasuprot navedenom, Jaeggi i sur. (2003) su utvrdili da se s povećanjem broja somatskih stanica smanjuje udjel proteina i mliječne masti u ovčjem mlijeku. Prema utvrđenim rezultatima brojnih istraživanja većina autora je suglasna da povećanjem broja somatskih stanica u kravljem mlijeku dolazi do značajnog smanjenja udjela kazeina što nije slučaj u ovčjem mlijeku (Raynal-Ljutovac i sur., 2007). Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku dolazi do značajnog smanjenja udjela kazeina (Leitner i sur., 2004; Summer i sur., 2012). Pirisi i sur. (2000), Jaeggi i sur. (2003) i Giaccone i sur. (2005) su također utvrdili smanjenje udjela kazeina s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku dok su nasuprot navedenim autorima Marti De Olives i sur. (2013) utvrdili njegovo povećanje. Smanjenje udjela kazeina u ovčjem mlijeku uslijed povećanja broja somatskih stanica je prije svega posljedica pojačane proteolitičke aktivnosti prije svega plazmina (Pinto i sur., 2013), ali i proteolitičkih enzima iz

polimorfonuklearnih neutrofila (Le Roux i sur., 2003). Albenzio i sur. (2004) su utvrdili značajnu korelaciju između broja somatskih stanica s aktivnošću plazmina u ovčjem mlijeku ( $r = 0,50$ ). Kao rezultat pojačane aktivnosti plazmina dolazi do hidrolize frakcija kazeina prema sljedećem intenzitetu razgradnje:  $\beta$ - >  $\alpha_{s2}$ - >  $\alpha_{s1}$ - >>  $\kappa$ -kazein (Pinto i sur., 2013). Plazminska aktivnost je najizraženija na  $\beta$ -kazeinu a kao posljedica njegove razgradnje je povećanje udjela frakcija  $\gamma$ -kazeina u ovčjem mlijeku (Bianchi i sur., 2004a; Le Maréchal i sur., 2011). Većina autora je gotovo suglasna da se povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno pogoršava njegova sposobnost zgrušavanja. Stoga se sirenjem navedenog mlijeka značajno produžava vrijeme njegovog grušanja i smanjuje čvrstoća (Pirisi i sur., 2000; Albenzio i sur., 2004; Bianchi i sur., 2004b i Giaccone i sur., 2005) i prinos dobivenog gruša (Leitner i sur., 2008). Mladi sirevi proizvedeni od mlijeka s povećanim brojem somatskih stanica ( $>1.000.000/\text{ml}$ ) imaju niži udio suhe tvari i mliječne masti a zbog slabije sposobnosti otpuštanja sirutke zadržavaju više vode (Pirisi i sur., 2000; Jaeggi i sur., 2003; Albenzio i sur., 2004). Međutim, Pirisi i sur. (2000) su utvrdili da s povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku za sirenje nije došlo do promjene teksture mladih sireva (napon i vrijednost deformacije u točki puknuća).

### **2.3. Povezanost proteolitičkih i teksturnih promjena tijekom zrenja sira**

Tijekom zrenja u siru se odvijaju tri biokemijska procesa: glikoliza, lipoliza i proteoliza. Međutim, budući da kazein čini osnovu strukture sira u koju su uklopljeni ostali sastojci mlijeka, prema većini autora proteoliza je najsloženiji i najvažniji proces koji pridonosi nastanku svojstvene teksture tijekom zrenja sireva (Fox i sur., 2000, Trujillo i sur., 2000, Sousa i sur., 2001). Iz navedenog se promjene na proteinima često označavaju kao zrenje sira u užem smislu (Puđa, 2009). McSweeney i Sousa (2000) navode da osim stvaranja teksture, proteoliza odnosno enzimi koji sudjeluju u navedenom procesu najznačajnije pridonose nastajanju poželjnog okusa i mirisa. Tijekom zrenja sira proteoliza izravno (hidrolizom proteinske mreže i smanjenjem aktivteta vode) i neizravno (povećanjem pH vrijednosti) pridonosi nastajanju karakteristične teksture sira (Upadhyay i sur., 2004). Najznačajniji proteolitički čimbenici u siru su: sirišni enzim, prirodne proteinaze mlijeka (plazmin, proteinaze somatskih stanica), proteolitički enzimi bakterija mliječne kiseline i proteolitički enzimi nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Havranek i sur., 2014).

Primarne proteolitičke promjene tijekom zrenja većine sireva u najvećoj mjeri ovise o količini odnosno aktivnosti rezidualnog sirišnog enzima (Bansal i sur., 2007) te u manjoj mjeri aktivnosti plazmina i proteinaza somatskih stanica, a kao rezultat njihovog djelovanja nastaju polipeptidi velike i srednje molekularne mase (McSweeney, 1993; Havranek i sur., 2014). Autori navode da se tijekom sekundarne proteolize aktivnošću enzima starterskih i nestarterskih bakterija mliječne kiseline navedeni spojevi razgrađuju u manje peptide i slobodne aminokiseline.

Teksturne promjene tijekom zrenja većine sireva uslijed aktivnosti rezidualnog sirišnog enzima odvijaju se u dva vremenska razdoblja (Creamer i Olson, 1982; Hort i Grys, 2001; Puđa, 2009):

- prvo vremensko razdoblje obuhvaća dva tjedna nakon proizvodnje sira tijekom kojeg rezidualni kimozi u parakazeinskoj mreži brzo hidrolizira  $\alpha_{s1}$ -kazein (f1-199) u vodi topljive peptide  $\alpha_{s1}$  (f1-23) i  $\alpha_{s1}$ -I (f24-199) što dovodi do značajnog omekšavanja teksture mladog sira. Osjetno omekšanje teksture se događa već pri 20 %-otnoj hidrolizi  $\alpha_{s1}$ -kazeina. Tijekom navedenog razdoblja proteinska mreža gubi dio vlastite mase koja prelazi u vodi topljive peptide velike i srednje molekularne mase što u konačnici dovodi do omekšanja teksture sira.
- druga faza obuhvaća preostalo vremensko razdoblje tijekom kojega se sporije nastavlja kimozijska aktivnost na preostalom  $\alpha_{s1}$ -kazeinu te aktivnost prirodnih proteaza mlijeka, enzima starterskih i nestarterskih bakterija mliječne kiseline te dolazi do povećanja pH vrijednosti. Tijekom ove faze nastaju peptidi male molekularne mase i slobodne aminokiseline odnosno hidrolizom svake peptidne veze dolazi do oslobađanja pozitivno i negativno nabijenih amino i karboksilnih skupina na koje se vežu dipolarne molekule vode što za posljedicu ima smanjenje slobodne vode, a tekstura sireva zrenjem postaje čvršća i manje kohezivna.

Vrlo važno je naglasiti da nastanak svojstvene teksture sira tijekom njegovog zrenja, osim navedenih proteolitičkih promjena, je i posljedica sljedećih promjena: pH vrijednosti, udjela vezanog kalcija u parakazeinskim micelama, udjela soli te gubitka vode (Lucey i sur., 2003). Lawrence i sur. (1987) navode da smanjenje pH vrijednosti sira sa 5,5 na 4,8 mijenja teksturu sira sa gipke i elastične na kratku i lomljivu kao posljedicu prije svega otapanja koloidnog kalcijevog fosfata iz parakazeinske mreže. Stoga, Lucey i Fox (1993) smatraju prikladnijim prikazivanje vezanog kalcija na protein (mg/g) u odnosu na ukupni udio kalcija jer omogućava bolji uvid u strukturu odnosno teksturu parakazeinske mreže. O'Mahony i sur. (2005a) su dodatkom pepstatina u siru zaustavili kimozijsku aktivnost na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu, ali je ipak došlo do omekšavanja njegove teksture tijekom prva tri tjedna zrenja uslijed smanjenja udjela netopljivog kalcija. Stoga, autori zaključuju da je

omekšavanje teksture sira tijekom prva 3 tjedna zrenja usporedni proces smanjivanja udjela netopljivog kalcija i razgradnje  $\alpha_{s1}$ -kazeina. Međutim, smanjenje udjela netopljivog kalcija u siru značajnije pridonosi početnom omekšavanju teksture sira u odnosu na process razgradnje  $\alpha_{s1}$ -kazeina jer ima viši koeficijent korelacije te dovodi do značajnijeg smanjivanja vrijednosti teksturnog profila (O'Mahony i sur., 2005a).

Tijek i intenzitet proteolitičkih promjena tijekom zrenja većine sireva određuju sljedeći čimbenici:

### **2.3.1. Količina i aktivnost rezidualnog sirila i prirodnih proteinaza iz mlijeka**

Sirišni enzim odnosno kimozin kao što je navedeno ima najveću sklonost razgradnje  $\alpha_{s1}$ -kazeina kojeg i brže razgrađuje u odnosu na  $\beta$ -kazein (Sousa i sur., 2001; An i sur., 2014). Njegovo optimalno djelovanje u siru je pri pH 5,0 (Walstra i sur., 2006). Trujillo i sur., (2000) navode  $\beta$ -I kazein kao tipični primarni peptid nastao djelovanjem kimozina na  $\beta$ -kazeinu dok Upadhyay i sur. (2004) navode zanemarivu proteolitičku aktivnost kimozina na  $\alpha_{s2}$ -kazeinu. Količina i aktivnost rezidualnog kimozina u siru ovisi o njegovoj količini dodanoj u mlijeko i pH vrijednosti mlijeka pri njegovom dodavanju. Udio rezidualnog sirišnog enzima u siru je proporcionalan njegovoj količini dodanoj u mlijeko (Johnston i sur., 1994; Fox i sur., 2000). Nasuprot tome, Bansal i sur. (2007) navode da se dodatkom pet puta veće količine kimozina u mlijeko za sirenje nije značajno povećao njegov udio u grušu jer je broj veza na kazeinskim micelama na koje se veže kimozin konstantan te zbog toga najveći dio preostalog sirila upravo i prelazi u sirutku. Nadalje navode da se udio rezidualnog kimozina u grušu nije značajno mijenjao prilikom njegovog dodavanja u mlijeko za sirenje čija je pH vrijednost bila od 6,6 do 6,1. Međutim, daljnjim smanjenjem pH vrijednosti mlijeka za sirenje (ispod 6,1) značajno se počeo povećavati njegov udio u grušu (Bansal i sur., 2007). Wilkinson i sur. (2005) su utvrdili da se dodatkom kimozina u mlijeko za sirenje pri pH vrijednosti 6,6 u sirnom grušu rasporedi oko 31 % kimozinske aktivnosti a u sirutku samo 17 %. Isti autori navode da nastavkom smanjenja pH vrijednosti do 5,2 u sirni gruš se rasporedi oko 86 % a u sirutku oko 14 % kimozinske aktivnosti.

Plazmin je najvažnija i najistraženija prirodna proteinaza mlijeka (Havranek i sur., 2014) čija se optimalna aktivnost u siru odvija pri pH 7-8 iako proteolitičku stabilnost pokazuje i u pH rasponu od 1,5-9,0 (Kalit i sur., 2002). U mlijeku dolazi kao cjeloviti plazminski sustav koji sadrži: plazmin, plazminogen te složeni sustav aktivatora i inhibitora (Albenzio i sur., 2009). Najvećim dijelom u mlijeku je vezan za kazeinsku micelu preko lizinskih ostataka  $\beta$ -kazeina te grušanjem mlijeka ostaje i dalje vezan za parakazeinske

micele grša (Kalit i sur., 2002). Plazminska aktivnost se najvećim dijelom odvija na  $\beta$ -kazeinu, a kao razgradni produkti nastaju njegovi različiti C-terminalni dijelovi odnosno  $\gamma$  kazeini ( $\gamma_1$  :  $\beta$  -CN f 29–209;  $\gamma_2$  :  $\beta$  -CN f 106–209;  $\gamma_3$  :  $\beta$  -CN f 108–209) i N- terminalni dijelovi odnosno proteoze i peptoni i to 5, 8 spori i 8 brzi (Fox, 2009). Autor naglašava plazminsku aktivnost i na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu pri čemu nastaju  $\lambda$  kazeini dok navedena aktivnost na  $\alpha_{s2}$ -kazeinu nije utvrđena.

Watkinson i sur. (2001), Feeney i sur. (2002) te Sheehan i Guinee (2004) navode značajnu povezanost pH vrijednosti i proteolitičke aktivnosti na kazeinu tijekom zrenja Mozzarella i Cheddar sira u trajanju od 70 odnosno 87 dana. Autori navode da smanjenje pH vrijednosti u navedenom rasponu dovodi do intenzivnije razgradnje  $\alpha_{s1}$  u odnosu na  $\beta$ -kazein tijekom njegovog zrenja zbog pojačane aktivnosti rezidualnog kimozina dok je povećanje razgradnje  $\beta$  u odnosu na  $\alpha_{s1}$ -kazein posljedica povećanja pH vrijednosti i proteolitičke aktivnosti plazmina. Povećanjem pH vrijednosti od 5,2 do 6,2, tijekom zrenja Cheddar sira, popuštanje njegove parakazeinske strukture postiže se usporednim povećanjem vrijednosti napona ali i deformacije do 28. dana zrenja (Watkinson i sur., 2001). Autori navode da se nastavkom zrenja od 28. do 70. dana pri navedenom povećanju pH vrijednosti i dalje nastavlja povećanje vrijednosti napona ali ne i deformacije u točki popuštanja te se popuštanje strukture postiže pri većem naponu ali nižem postotku deformacije. Feeney i sur. (2002) navode da se s povećanjem pH vrijednosti od 5,5 do 5,9 u Mozzarella siru uz nepromjenjen udio vode i omjer kalcija prema kazeinu smanjuje njegova čvrstoća kao posljedica primarne proteolitičke aktivnosti tijekom zrenja u trajanju od 70 dana.

Aktivnost rezidualnog kimozina značajno ovisi o visini temperature koja se primjenjuje u proizvodnji sira (van den Berg i Exterkate, 1993). Visoke temperature pri dogrijevanju sirnog zrna (52-54<sup>0</sup>C) kao što je slučaju Emmental sira povećavaju aktivnost plazmina te značajno inaktiviraju rezidualnu kimozinsku aktivnost na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu (Fröhlich-Wyder i Bachmann, 2004), ali je u potpunosti ne eliminiraju (Hynes i sur., 2004). Uz navedeno, Puđa (2009) navodi da aktivnost plazmina u siru zavisi i o njegovoj pH vrijednosti te zbog toga sir Emmental (prosječne pH vrijednosti od 5,4 do 5,7) ima tri puta izraženiju plazminsku aktivnost u usporedbi s Cheddar sirom (prosječna pH vrijednost 5,0). Iz navedenog razloga i polutvrđi sirevi se odlikuju izraženom razgradnjom  $\beta$ -kazeina (Stepaniak, 2004). Važno je naglasiti da pored visine temperature dogrijevanja sirnog zrna količina plazmina zavisi i o stadiju laktacije te zdravlju muznih životinja (Kalit i sur., 2002) jer povećanje broja somatskih stanica u mlijeku značajno povećava njegova aktivnost (Albenzio i sur., 2004; Kalit i sur., 2004). Albenzio i sur. (2009) nisu utvrdili značajnu promjenu plazminske aktivnosti u ovčjem mlijeku tijekom laktacije ukoliko broj somatskih stanica nije prelazio 600.000/ml. Tijekom zrenja ovčjih sireva razgradnja  $\beta$ -kazeina je

postupna, dok istovremeno  $\alpha_{s1}$ -kazein nije podvrgnut razgradnji ukoliko su navedeni sirevi proizvedeni od mlijeka koje sadrži manje od 500.000 somatskih stanica/ml (Revilla i sur., 2007). Autori navode da se u sirevima proizvedenim od mlijeka u kojemu je došlo do povećanjem broja somatskih stanica na 1.500.000/ml, brže smanjuje udio  $\alpha_{s1}$  u odnosu na  $\beta$ -kazein tijekom zrenja. Međutim, kada broja somatskih stanica u mlijeku za sirenje prijeđe 2.500.000/ml, u proizvedenim sirevima tijekom njihovog zrenja je naglašenije smanjenje  $\beta$  u odnosu na  $\alpha_{s1}$ -kazein (Revilla i sur., 2007) jer je izraženija aktivnost enzima polimorfonuklearnih neutrofila odnosno katepsina D (Sousa i sur., 2001). S obzirom da katepsin D ima vrlo slično djelovanje kao kimozi (Sousa i sur., 2001), oba enzima pripadaju skupini kiselih proteinaza (Puđa, 2009) te da je količina dodanog kimozi puno veća u usporedbi s količinom prisutnog katepsina D u mlijeku za sirenje, njegovo proteolitičko djelovanje je vrlo često prekriveno djelovanjem kimozi (Hurley i sur., 2000). Sirevi s najvećim brojem somatskih stanica su tijekom 90 dana zrenja imali najmanju čvrstoću zbog povećanog udjela  $\alpha_{s1}$ -I kazeina (Revilla i sur., 2007). Iako sirevi dobivenih od mlijeka s visokim brojem somatskih stanica imaju niži udio suhe tvari i mliječne masti a nešto veći udio vode, nisu utvrđene značajne teksturne razlike tijekom 60 dana zrenja (Pirisi i sur., 2000).

Stoga, ukoliko se u proizvodnji sireva koristi higijenski ispravno mlijeko dobiveno od zdravih životinja odnosno ukoliko se ne primjenjuje visoka temperatura dogrijavanja sirnog zrna, sirišni enzim u odnosu na plazmin ima dominantniju ulogu tijekom primarnih proteolitičkih promjena tijekom zrenja (Milesi i sur., 2008).

### 2.3.2. Vrsta rezidualnog sirila

Dodatkom različitih sirišnih enzima (čisti kimozi i pepsin, mikrobiološko sirilo, prirodno sirilo od telećeg i janječeg želuca) u otopinu cjelovitog ovčjeg kazeina koja je nakon njihovog pojedinačnog dodatka inkubirana u različitim vremenskim razdobljima, utvrđena je najmanja proteolitička aktivnost na  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeinu kod prirodnog janječeg a najveća kod mikrobiološkog sirila (Trujillo i sur., 2000). U sirevima dobivenim grušanjem mlijeka sirilom životinjskog porijekla odnosno enzimskim pripravkom od cvjetova *Cynara cardunculus* tijekom njihovog zrenja je utvrđeno povećanje proteolitičke aktivnosti u obe vrste sireva s tim da je ona bila značajno viša u sirevima proizvedenim uz djelovanje biljnog enzimskog pripravka (Sousa i Malcata, 1997). Međutim, navedeni autori su utvrdili veću aktivnost životinjskog sirila na  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeinu u odnosu na biljni enzimski pripravak. An i sur. (2014) su grušanjem mlijeka sirišnim enzimima mikrobiološkog i životinjskog porijekla proizveli Cheddar sireve s ciljem usporedbe proteolitičke aktivnosti navedenih enzimskih pripravaka s teksturnim značajkama tijekom zrenja. Autori su utvrdili veću

proteolitičku aktivnost odnosno veći udio ukupnog dušika tijekom zrenja sireva proizvedenih s mikrobiološkim sirilom te su zbog toga navedeni sirevi imali manju čvrstoću dok se kohezivnost i zakašnjela elastičnost nije značajno razlikovala u obje vrste sireva. Rezidualna proteolitička aktivnost oba koagulacijska enzima na  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeinu je bila gotovo identična (An i sur., 2014). Koristeći čisti kimozi i prirodno sirilo od telećeg želuca u proizvodnji Cheddar sira, Johnston i sur. (1994) su utvrdili da oba sirila brže razgrađuju  $\alpha_{s1}$  u odnosu na  $\beta$ -kazein. Autori navode da čisti kimozi u većoj mjeri razgrađuje  $\beta$ -kazein u odnosu na prirodno sirilo. Međutim, vrsta sirišnog pripravka nije imala značajnog utjecaja na teksturne značajke Cheddar sira tijekom zrenja (Johnston i sur. 1994). Povećanjem udjela enzimskog pripravka od cvjetova *Cynara cardunculus* u odnosu na čisti kimozi u mlijeku za sirenje odnosno u Cheddar sirevima tijekom zrenja dovodi do veće proteolitičke aktivnosti na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu i većeg udjela slobodnih aminokiselina (O'Mahony i sur., 2003). Uporaba različitih sirišnih enzima (prirodno sirilo od telećeg želuca, čisti kimozi i mikrobiološko sirilo) u proizvodnji Kashar sira, nije utjecala na pokazatelje teksturnog profila tijekom zrenja, iako su sirevi proizvedeni korištenjem mikrobiološkog sirila imali nešto manje teksturne vrijednosti (Yasar i Guzeler, 2011). Pirisi i sur. (2007) su utvrdili izraženiju ukupnu proteolitičku aktivnost janječeg sirila pripremljenog na tradicionalan način u odnosu na sirilo pripremljeno industrijski tijekom 120 dana zrenja Fiore Sardo sira, dok navedena aktivnost u vremenskom razoblju od 120. do 240. dana nije bila statistički značajna. Zrenjem Fiore Sardo sireva tijekom 240 dana nisu utvrđene teksturne razlike među proizvedenim sirevima bez obzira na vrstu korištenog sirila iako je u obe vrste sireva došlo do potpune razgradnje  $\alpha_{s1}$ -kazeina dok je  $\beta$ -kazein bio samo djelomično podvrgnut razgradnji plazmina (Pirisi i sur. 2007). Sirevi proizvedeni sirenjem mlijeka uporabom tradicijski proizvedenog sirila imali su značajno veće vrijednosti teksturnog profila (lomljivosti, čvrstoće i elastičnosti) u odnosu na sireve proizvedene s komercijalnim sirilom (Fresno i sur., 2006). Kao razlog navedenom, autori naglašavaju veću proteolitičku aktivnost komercijalnog sirila.

### **2.3.3. Omjer mliječne masti i proteina u siru**

Omjer mliječne masti i proteina u siru značajno utječe na aktivnost rezidualnog kimozina odnosno na tijek primarnih i sekundarnih proteolitičkih promjena u siru tijekom zrenja. Punomasni Cheddar sirevi imaju značajno veću rezidualnu aktivnost sirila što dovodi do veće hidrolize  $\alpha_{s1}$ -kazeina dok su sirevi s nižim udjelom mliječne masti imali intenzivniju hidrolizu  $\beta$ -kazeina (Fenelon i sur., 2000) te veći udjel dušika topljivog u trikloroctenoj kiselini u odnosu na ukupni dušik (Madadlou i sur., 2005). Zbog smanjenja udjela cjelovitog kazeina i većeg udjela mliječne masti, punomasni Cheddar sirevi su



tijekom zrenja bili elastičniji jer su pri većoj deformaciji postizali manje vrijednosti lomljivosti (Fenelon i sur., 2000). Guinee i sur. (2000b) navode veći intenzitet primarnih proteolitičkih promjena tijekom zrenja masnijih sireva što dovodi do značajnog smanjivanja napona lomljivosti i čvrstoće tijekom zrenja Cheddar sira. Smanjenjem udjela mliječne masti u siru dovodi do smanjenja proteolitičke aktivnosti (Guinee i sur., 2000a) usljed smanjenja udjela vode u nemasnoj tvari sira, jer se voda u navedenim sirevima ne nadomješta u razmjernom odnosu na smanjeni udio mliječne masti (Rudan i sur., 1999; Irudayaraj i sur., 1999). Stoga Tunick i Shieh (1995) tvrde da ukoliko se želi proizvesti Mozzarella sir s nižim udjelom mliječne masti sličnih teksturnih značajki kao i navedeni punomasni sir, udio vode u nemasnoj tvari mora biti iznad 65 % te se moraju držati nekoliko tjedana u rashlađenom stanju radi odvijanja proteolitičke aktivnosti. Sánchez-Macías i sur. (2010) navode značajne razlike pokazatelja teksturnog profila između kozjih sireva s nižim, smanjenim odnosno višim udjelom mliječne masti. Prema navedenim autorima, dolazi do razgradnje svih kazeinskih frakcija tijekom zrenja navedenih sireva te su punomasni sirevi u odnosu na sireve s nižim i smanjenim udjelom mliječne masti imali najveći udio cjelovitog kazeina tijekom zrenja. Stoga su sirevi s nižim udjelom mliječne masti imali veću lomljivost, čvrstoću i kohezivnost a manju adhezivnost i elastičnost u odnosu na sireve sa smanjenim udjelom mliječne masti i punomasne sireve (Sánchez-Macías i sur., 2010).

#### **2.3.4. Temperatura zrenja**

Povećanje temperature zrenja značajno smanjuje udio cjelovitog  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina u Manchego, Cheddar i Reggiano Argentino siru (Gaya i sur., 1990; Folkertsma i sur., 1996; Sihufe i sur., 2010). Guinee i sur. (2001) navode da pored smanjenja udjela ukupnog kazeina, povećanje temperature zrenja Mozzarella sira sa 0 na 15 °C, povećava sposobnost kazeina da veže vodu što dovodi do smanjenja njegove čvrstoće. Gaya i sur. (1990) su utvrdili da je pored pojačane proteolitičke aktivnosti, smanjenje vode u Manchego siru dovelo do povećanja čvrstoće i lomljivosti. Iako su primarne proteolitičke promjene bile intenzivnije pri višoj temperaturi zrenja, navedeni autori ističu da je čvršća tekstura posljedica prije svega gubitka vode u odnosu na proteolitičku razgradnju parakazeinske strukture tvrdih sireva. Bertola i sur. (2000) su utvrdili značajnije povećanje pH vrijednosti odnosno smanjenje udjela vode u Gouda sirevima pri višoj (20 °C) nego pri nižoj (10 °C) temperaturi tijekom zrenja. Autori nadalje navode da povećanje temperature i stupnja zakiseljavanja tijekom zrenja u navedenim sirevima je uzrokom povećanja kimozijske aktivnosti. Slijedom navedenog, bez obzira na visinu temperature, dolazi do smanjenja vrijednosti sile puknuća parakazeinske strukture tijekom zrenja ali je navedeno

smanjenje bilo puno brže pri višoj nego pri nižoj temperaturi zrenja (Bertola i sur., 2000). Međutim, zrenje je spor i u ekonomskom smislu financijski zahtjevan tehnološki postupak koji se zbog omekšavanja i izlučivanja mliječne masti iz sira te nastanka nepoželjnih okusa i mirisa u siru, u praksi ne provodi iznad 20 °C (Fox i sur., 1996). Van den Berg i Exterkate (1993) navode da povećanje temperature zrenja može pored ubrzanja proteolitičke aktivnosti usporedno ubrzati i gubitak vode što za posljedicu može imati gubitak ravnoteže između intenziteta okusa, mirisa i teksture.

### 2.3.5. Udio vode i soli u siru

Brojnim istraživanjima utvrđena je izravna povezanost udjela vode u siru s njegovim teksturnim značajkama. Povećanje udjela vode u siru smanjuje vrijednost napona lomljivosti i obrnuto (Gunasekaran i Ak, 2003). Pavia i sur. (1999) te Sihufe i sur. (2010) su zbog većeg udjela vode u središnjem dijelu Manchego i Reggiano Argentino sira utvrdili značajno manji udio  $\alpha_{s1}$ -kazeina u odnosu na njihov rubni dio tijekom zrenja od 90 odnosno 186 dana. Međutim, autori navode gotovo podjednak udio cjelovitog  $\beta$ -kazeina u oba navedena dijela sira. Udio  $\alpha_{s1}$ -kazeina je iznosio samo 20 % dok je polovica udjela  $\beta$ -kazeina ostala cjelovita 30-og dana zrenja Port Salut Argentino mekog sira (Bertola i sur., 1991). Fallico i sur. (2004) su utvrdili značajnu pozitivnu korelaciju između udjela vode i parametara primarne odnosno sekundarne proteolize tijekom zrenja Ragusano sira, ali su naglasili da se promjenom udjela vode istodobno značajno mijenjaju čimbenici proteolitičke aktivnosti kao što su pH vrijednost i udio soli.

Udio soli u siru značajno utječe na dinamiku primarnih proteolitičkih promjena tijekom zrenja sira. Guinee i Fox (2004) tvrde da količina soli do 5 % potiče aktivnost kimosina na razgradnju  $\alpha_{s1}$ -kazeina. Autori navode smanjenje kimosinske aktivnosti na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu pri višim koncentracijama soli ali se ona u manjoj mjeri nastavlja i pri koncentracijama soli iznad 20 %. Međutim, kimosinska aktivnosti na  $\beta$ -kazeinu je značajno smanjena pri koncentraciji soli od 5 % dok pri 10 %-tnoj koncentraciji soli u potpunosti prestaje (Mulvihill i Fox, 1978; Guinee i Fox, 2004). Nasuprot navedenom, Trujillo i sur. (1995) navode značajno povećanja kimosinske aktivnosti na  $\beta$ -kazeinu do 10 % udjela soli u kozjem siru dok je ona vrlo malo zamjetna pri 15 %-tnoj koncentraciji soli. Međutim, učinak soli na proteolitičku aktivnost kimosina na kazeinu značajno ovisi i o pH vrijednosti sira. Koncentracija soli od 5 % pri pojedinačnim pH vrijednostima sira od 7,0; 6,4 i 5,8 inhibira kimosinsku aktivnost na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu dok je inhibitorni učinak navedene koncentracije soli pri pH vrijednosti od 5,2 gotovo zanemariv (Mulvihill i Fox, 1980). Pri pH vrijednosti nižoj od 4,6 autori navode da sol ponovo inhibitora kimosinsku aktivnost na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu. Inhibitorni učinak soli na kimosinsku aktivnost na  $\beta$ -kazeinu se

smanjenjuje istovremeno s smanjenjem pH vrijednosti u rasponu od 7,0 do 4,6 te pri pH vrijednosti ispod 4,6 sol ima inhibitorni učinak na kimozijsku aktivnost na  $\beta$ -kazeinu (Mulvihill i Fox, 1978).

Pored značajnog utjecaja na aktivnost sirišnog enzima sol, u siru pojačava ionsku jakost te potiče hidrataciju odnosno povećanje sposobnosti proteina da vežu vodu što dovodi do njihovog bubrenja te u konačnici do promjene njihove konformacije (Paulson i sur., 1998; Møller i sur., 2013). Ranijim istraživanjima je utvrđeno da se soljenjem sira potiče izmjena kalcijevih iona iz parakazeinske mreže s ionima natrija (Kindstedt i sur., 1992). Međutim, istraživanjima je utvrđeno da se s povećanjem udjela soli ne mijenja odnos ukupnog i topljivog kalcija (Pastorino i sur., 2003a; Flourey i sur., 2009) a niti promjer parakazeinskih čestica u strukturi sira (Flourey i sur., 2009). Guinee i Fox (2004) navode značajne mikrostrukturne razlike u sirevima s različitim udjelom soli. Autori navode da sirevi s većim udjelom soli imaju homogeniju i kontinuiraniju parakazeinsku strukturu s manjim brojem međuprostora u odnosu na sireve s manjim udjelom soli. Prema većini istraživanja, udio soli u siru značajno mijenja njegove teksturne značajke tijekom zrenja (Guinee i Fox, 2004). Mistry i Kasperson (1998) navode da povećanjem udjela soli u vodenoj fazi sira dolazi do značajnog povećanja vrijednosti pokazatelja teksturnog profila (čvrstoće, lomljivosti i zakašnjele elastičnosti) te sirevi s većim udjelom soli imaju veću čvrstoću ali i krtost. Pastorino i sur. (2003a) tvrde da već pri koncentraciji soli do 0,5 % dolazi do povećanja čvrstoće, međutim nakon postizanja koncentracije soli iznad 0,5 %, učinak soli na daljnje povećanje navedenog parametra je povezano i sa smanjenjem udjela vode. U prilog navedenom, Møller i sur. (2013) ističu da pri jednakom udjelu vode, ali različitom udjelu soli u vodenoj fazi sira (od 2,3-6,0 %) nije došlo do značajne promjene u čvrstoći sira. Povećanje udjela soli do 0,5 % je također razlogom povećanja adhezivnosti da bi navedeni pokazatelj bez obzira na dalje povećanje udjela soli (od 0,5 – 2,7 %) ostao nepromijenjen (Pastorino i sur. 2003a). Autor navodi značajano i stalano smanjenje kohezivnosti s povećanjem udjela soli u siru (0-2,7 %).

### **2.3.6. Koncentracija uree**

Vintila i Marcu (2011) su utvrdili da koncentracija rezidualne uree u siru prije svega ovisi o početnoj koncentraciji uree u mlijeku za sirenje (0,8 - 28,7 mg/100 ml) i trajanju zrenja. Autori navode da su proizvedeni sirevi nakon 24 sata po završetku proizvodnje sadržavali preko 80 % uree u odnosu na njenu početnu koncentraciju u mlijeku za sirenje. Nakon 14 dana zrenja urea je bila prisutna samo u sirevima proizvedenim od mlijeka s koncentracijom uree većom od 3,8 mg/100 ml mlijeka te su sirevi sadržavali oko 30% rezidualne uree u odnosu na početak zrenja, da bi nakon 40 dana njena prisutnost bila

samo u sirevima proizvedenim od mlijeka s koncentracijom uree većom od 12,8 mg/100 ml mlijeka (Vintila i Marcu, 2011). Istraživanja o učinku rezidualne uree na parakazeinsku strukturu tijekom zrenja sira do sada nisu provedena. Međutim, Yamaughi i Tsugo (1960) su utvrdili da se kazein i parakazein značajno razlikuju ovisno o dodatku uree u njihovu otopinu. Autori su utvrdili da dodatak uree nije uzrokovao precipitaciju kazeina u otopini ali je dodatkom uree u pojedinačnu otopinu  $\alpha$  i  $\beta$ -parakazeinata došlo do precipitacije  $\alpha$ , ali ne i  $\beta$ -parakazeinata. Martin i sur. (1997) su utvrdili da su sirevi proizvedeni od mlijeka s višom koncentracijom uree tijekom zrenja sadržavali nešto više vode te su imali mekaniju teksturu iako u sirevima nije utvrđena značajna razlika udjela topljivog dušika.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje je provedeno na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva u Supetru i Pražnicama na otoku Braču tijekom cjelokupne laktacijske proizvodnje ovčjeg mlijeka u 15 proizvodnih šarži. Proizvodna šarža je obuhvaćala jednom mjesečno uzeti uzorak sirovog ovčjeg mlijeka i iz njega procesom sirišnog zgrušavanja proizvedeni sirni gruši i četiri sira.

#### 3.1. Tehnologija proizvodnje bračkog sira u pokusu

U posudu za sirenje je pomiješano sirovo ovčje mlijeko jutarnje i večernje mužnje te mu je pomoću pH metra izmjerena početna pH vrijednost. U mlijeko predhodno zagrijano na temperaturi od 32 °C su dodane liofizirane mljekarske kulture (Lyofast MOT 086 EE). Tijekom navedenog postupka zakiseljavanja mlijeka istovremeno se provodila aktivacija sirila tako što je propisana količina dodavana u mlaku destiliranu vodu. Kada se početna pH vrijednost mlijeka spustila za jednu podjedinicu, a to se obično dogodi nakon 20 do 25 minuta od dodatka kultura, predhodno pripremljeno prirodno sirilo (Caglificio Clerici) se ravnomjerno rasporedi, promiješa, posuda poklopi i ostavi da se mlijeko zgruša. Sirenje mlijeka je trajalo od 30 do 45 minuta a procjena prikladnosti gruša za rezanje se u praksi određivala iskustveno uranjanjem noža u gruši. Pri podizanju noža puknuće gruša je vidljivo u obliku jasne pukotine s jasnim rubovima uz izdvajanje bistre sirutke (slika 1).



Slika 1. Provjera prikladnosti sirnog gruša za rezanje

Po utvrđivanju svršetka grušanja, pristupa se rezanju sirnog gruša. Sirni gruš je rezan nožem okomito da bi ga se nakon toga rukom usitnio na manje dijelove (slika 2). Po završetku navedene radnje, sirni gruš je pjenjačom dodatno usitnjen na veličinu zrna pšenice (slika 3).



Slika 2. Ručno usitnjavanje sirnog gruša (vlastita fotografija)



Slika 3. Dodatno usitnjavanje sirnog gruša pjenjačom (vlastita fotografija)

Nakon usitnjavanja pristupilo se, u početku laganom a kasnije i nešto bržem, ručnom miješanju smjese sirnog zrna i sirutke uz istovremeno postupno povećavanje temperature dogrijavanja sa 32 do najviše 41 °C. Povećanje temperature se provodilo postupno odnosno 1 °C svakih 2 – 3 minute. Postupak sušenja je trajao od 15 do 20 minuta. Nakon iskustvene provjere osušenosti gruša, smjesa sirnog zrna i sirutke je odlijevana u perforirane kalupe u koje je predhodno stavljena gaza a gruš pomoću dlanova pritiskao u kalupima (slika 4).



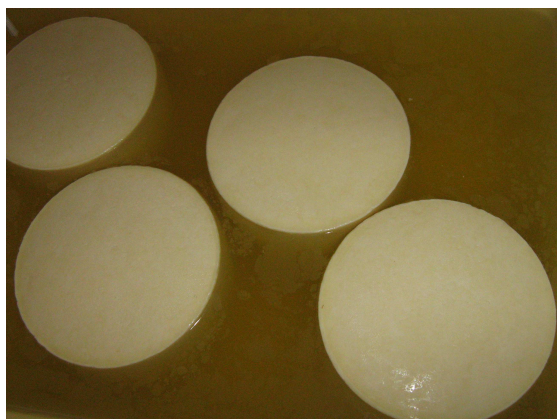
Slika 4. Stavljanje sirnog gruša u kalup (vlastita fotografija)



Slika 5. Prešanje sira utegom od bračkog kamena (vlastita fotografija)

Gruš zajedno sa sirnom maramom je izvađen iz kalupa te je nakon odvajanja sirne marame ponovno gornjom površinom prema dolje vraćen u kalup. Tijekom prvih pola sata

prešanje se odvijalo pod vlastitom masom (samoprešanje) uz okretanje. Sljedećih pola sata se gruša ponovo okrenuo i opteretio kamenom okruglom pločom mase 2 kg. Nakon toga, se gruša opet okrenuo i opteretio još jednom kamenom okruglom pločom mase 2 kg tako da je ukupno opterećenje tijekom sljedećih pola sata iznosilo 4 kg. Po završetku navedenih pola sata, gruša se ponovo okrenuo te opteretio okruglom pločom i utegom od 6 kg do kraja prešanja (slika 5). Prešanje je trajalo od 5,5 do 6,0 sati odnosno dok sirna masa nije postigla pH vrijednost od 5,1 – 5,3 kada se pristupilo soljenju sira.



Slika 6. Soljenje sira u salamuri (vlastita fotografija)



Slika 7. Zrenje sira (vlastita fotografija)

Sirevi su soljeni u salamuri slanosti oko 20 °Be te pH vrijednosti od 5,1 – 5,3 (slika 6). Postupak soljenja je trajao 24 sata. Nakon vađenja iz salamure i cijeđenja odnosno formiranja kore, sirevi su premazivani sirarskim premazom i stavljeni u posebnu klimatiziranu prostoriju na zrenje pri temperaturi od 16 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 70 – 80 % (slika 7).

### 3.2. Prikupljanje uzoraka mlijeka

Sirovo mlijeko za analizu je ovisno o mjestu provedbe istraživanja, uzimano dva puta mjesečno (u sklopu i između proizvodnih šarži) tijekom 75 - 120 dana laktacije. U svrhu utvrđivanja kemijskog sastava i broja somatskih stanica uzimani su uzorci sirovog mlijeka u dvije sterilne bočice pojedinačnog obujma od 100 ml u kojima je kao konzervans dodan azidiol. Mlijeko namijenjeno određivanju ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija uzimano je u sterilnu bočicu volumena 30 ml u kojoj je kao konzervans dodan bronopol. Nakon toga je uziman uzorak mlijeka u količini od 1,5 l koji je bio namijenjen dobivanju gruša.

### 3.3. Analize ovčjeg mlijeka

U svrhu utvrđivanja kemijskog sastava, fizikalnih svojstava i higijenske kakvoće sirovog ovčjeg mlijeka provedene su sljedeće analize:

- kemijski sastav mlijeka (udjel masti, proteina, laktoze, suhe tvari i suhe tvari bez masti) metodom infra-crvene spektrometrije (HRN ISO 9622:2001) pomoću aparata MilkoScan FT 120,
- pH-vrijednost potenciometrijskom metodom pomoću aparata Mettler Toledo SG78-B SevenGo Duo Pro i elektrode InLab Solids Pro ISM,
- koncentracija uree metodom kontinuiranog mjerenja (Urea UV Method, Grainer Diagnostic) pomoću spektrofotometra Helios,
- udjel kazeina izravnom metodom (HRN ISO 17997-2:2010) pomoću aparata Kjelttec 2300,
- udjel ukupnog kalcija titrimetrijskom metodom (HRN ISO 12081:2010),
- udjel ionskog kalcija pomoću instrumenta Mettler Toledo SG78-B SevenGo Duo Pro i ion selektivne elektrode Mettler Toledo BNC connector perfect IONTM comb  $\text{Ca}^{2+}$  prema proceduri proizvođača,
- točka ledišta krioskopskom metodom (HRN EN ISO 5764:2010) pomoću aparata Cryostar I,
- broj somatskih stanica fluoro-opto-elektronskom metodom (HRN EN ISO 13366-2:2007) pomoću aparata Fossomatic Minor,
- ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija metodom protočne citometrije pomoću aparata BactoScan FC, tip 73700 i izražen kao broj kolonija (CFU)/ml.

Kazeinski broj izračunat je kao udio kazeina u proteinima (%).

### 3.4. Postupak mjerenja teksture i sposobnosti sinereze gruša

Zgrušavanje ovčjeg mlijeka i proizvodnja sirišnog gruša u sklopu i između svake pojedine proizvodne šarže se odvijalo dva puta mjesečno na sljedeći način: U svaku od ukupno 8 laboratorijskih čaša pipetom je odmjereno 100 ml mlijeka koje je zagrijano u vodenoj kupelji na temperaturu sirenja (32 °C) i u svaku posudicu je dodano sirilo u količini od 100 µl. Proces grušanja se odvijao u dva ponavljanja u klimatiziranoj prostoriji na temperaturi od 25 °C i trajao je 30, 45, 60 i 75 minuta. Teksturane značajke navedenih gruševa su mjerene pomoću teksturnog analizatora (TA Plus Lloyd Instruments) opremljenog mjernom stanicom od 500 N i cilindričnom sondom Ø 12,5 mm. Prije



mjerenja, uzorak je stavljen na radnu površinu i sonda se spusti na površinu gruša. Nakon toga se pomoću softvera pokrene postupak mjerenja. Tijekom postupka mjerenja sonda se kretala konstantnom brzinom od 10 mm/min do dubine od 20 mm a cijeli postupak je prikazan na grafikonu. Pomoću softvera Nexygen plus, izračunata je tvrdoća gruša kao najveća vrijednost postignute sile tijekom testa i izražena je u njutnima (N).

Postupak utvrđivanja sposobnosti sinereze gruša u sklopu svake pojedine proizvodne šarže je proveden prema postupku koji su opisali Pandey i sur. (2000) i odvijao se na sljedeći način: Na vagu je stavljen stalak sa 8 polipropilenskih epruveta za centrifugiranje zapremnine 50 ml. U 250 ml mlijeka predhodno zagrijanog na temperaturu od 32 °C je dodano 250 µl sirila. U svaku je od 8 pojedinačnih polipropilenskih epruveta odvagano po 30 g mlijeka. Nakon toga je mlijeko stavljeno u vodenu kupelj predhodno zagrijanu na 25 °C. Nakon 30, 45, 60 i 75 minuta zgrušavanja, centrifugirana su po dva uzorka na 5000 okretaja kroz 15 min. Po završetku centrifugiranja, iz epruveta je pomoću pipete odvojen, a nakon toga i odvagan eksudat, a sposobnost sinereze je izražena kao postotak otpuštene mase sirutke u odnosu na ukupnu masu uzorka.

### **3.5. Prikupljanje uzoraka sira**

Tijekom istraživanja ukupno je proizvedeno 60 sireva. U svakoj pojedinoj proizvodnoj šarži u svrhu utvrđivanja kemijsko-fizikalnog sastava te procjene proteolitičkih promjena tijekom zrenja sira, pomoću sirarskog svrdla su uzimana četiri uzorka s bočne strane od kraja prema sredini. Uzorci su uzimani na početku, 30., 60., 90. i 120. dana zrenja. Minimalna količina sira po jednom uzorku za navedene analize iznosila je oko 70 g. Vanjska strana uzorka je rezana da bi se odvojio tvrdi dio uz koru i dobio čep debljine 10 mm. Za mjerenje teksture sira različitog stupnja zrelosti u svakoj predhodno navedenoj fazi zrenja uzimana su po četiri uzorka cilindričnog oblika s gornje strane sira paralelno sa smjerom prešanja cijelom dubinom pomoću cjevastog svrdla zaoštrenog na vrhu (cork borer). Prije uzimanja uzoraka, svrdlo je premazano uljem da bi se spriječilo trenje i dobio uzorak pravilnog cilindričnog oblika. Vanjska strana (gornji i donji dio) cilindričnog uzorka je rezan kako bi se uklonio tvrdi sloj blizu kore i dobili čepovi debljine 10 mm kojima je zatvarana unutrašnjost sira. Prije zatvaranja sireva, na bočne strane čepova je nanesen sloj premaza a zatim su čepovi utiskivani u sireve radi daljnjeg zrenja. Nakon očvršćivanja, na čepove je pomoću premaza lijepljena plastična mrežica koja je u potpunosti prekrila čep i napravljeni rez. Nakon očvršćivanja, čepovi s mrežicama su ponovo premazani voskom da ne bi došlo do puknuća premaza tijekom zrenja sireva.

Uzeti uzorci su prije stavljanja u hladnjak predhodno omotavani prijanjajućom zaštitnom folijom kako bi se spriječila njihova dehidracija.

### 3.6. Analize kemijskog-fizikalnog sastava bračkog sira

U svrhu utvrđivanja kemijskog-fizikalnog sastava sira provedene su sljedeće analize:

- količina mliječne masti metodom po Van Guliku (HRN ISO 3433:2009),
- količina proteina, udio u vodi topljivih frakcija dušika (WSN) u odnosu na ukupni dušik (% TN) i udio frakcija dušika topljivih u 12 %-tnoj u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (% TN) metodom blok digestije (HRN EN ISO 8968-1:2014), pomoću aparata Kjeltex 2300,
- količina ukupnih slobodnih aminokiselina (g Leu/100 g suhe tvari) spektrofotometrijskom metodom pomoću spektrofotometra Helios,
- količina suhe tvari – sušenjem na 102 +/- 2°C (HRN EN ISO 5534:2008),
- pH vrijednost potenciometrijskom metodom pomoću aparata Mettler Toledo SG78-B SevenGo Duo Pro i electrode InLab Solids Pro ISM,
- količina soli metodom po Volhardu (AOAC 935.43).

### 3.7. Procjena proteolitičkih promjena u siru tijekom zrenja

Za procjenu intenziteta primarnih proteolitičkih promjena kazeina, korištena je specifična metoda razdvajanja frakcija kazeina u električnom polju - elektroforeza na urea poliakrilamidnom gelu (urea-PAGE). Gelovi su skenirani pomoću uređaja Gel Doc 2000 (BIO RAD), a denzitometrijske vrijednosti traka na gelu su određene pomoću programa Quantity One, Quantitation Software (BIO RAD). Denzitometrijske vrijednosti izražene su u postotku pojedine frakcije kazeina u odnosu na ukupnu količinu u urea puferu topljivih kazeinskih frakcija elektroforetograma svakog uzorka.

Denzitometrijskim mjerenjem određeni su sljedeći indeksi zrelosti:

- $\Sigma\gamma\text{-CN}/\beta\text{-CN}$  (ukupni relativni udio svih  $\gamma\text{-CN}$  u odnosu na  $\beta\text{-CN}$ ),
- $\alpha_{s1}\text{-I-CN}/(\alpha_{s1}\text{-I-CN} + \alpha_{s1}\text{-CN})$  (relativni udio razgradnog fragmenta  $\alpha_{s1}\text{-I-CN}$  u odnosu na sumu  $\alpha_{s1}\text{-CN}$  i  $\alpha_{s1}\text{-I-CN}$ ).

U procjeni sekundarnih proteolitičkih promjena, korištena je nespecifična metoda procjene proteolize i to:

- postotak u vodi topljivih frakcija dušika (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN) kao pokazatelj količine polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina i njihovih soli kao posljedica ponajviše enzimatske aktivnosti kimozina i u manjoj mjeri plazmina (Bansal i sur., 2010),
- postotak dušične frakcije topljive u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (TN) kao pokazatelj količine neproteinskog dušika odnosno malih peptida (2-20 ostataka) i slobodnih aminokiselina kao posljedica enzimatske aktivnosti proteinaza i peptidaza mljekarskih kultura i slučajno prisutnih mikroorganizama te u manjoj mjeri kimozina (Bansal i sur., 2010),
- količina ukupnih slobodnih aminokiselina izražena kao koncentracija leucina u suhoj tvari sira.

### **3.8. Mjerenje teksture sira**

Mjerenje teksture sira tijekom zrenja je obavljeno analizom teksturnog profila pomoću teksturnog analizatora (TA Plus Lloyd Instruments) opremljenog mjernom stanicom od 500 N, a kao alat je korištena okrugla ploča Ø 50 mm.

#### **3.8.1. Priprema uzoraka sira prije mjerenja**

Prije provođenja navedenih testova cilindrični uzorci sira su uzimani cijelom dubinom, prethodnog dana su u rashlađenom stanju pomoću naprave za rezanje s tankom napetom čeličnom niti rezani na manje uzorke. Uzorci su imali pravilan cilindrični oblik odnosno promjer 17 i visinu 25 mm (odnos promjera i visine uzorka morao je biti 1,5) kako prilikom izvođenja testa ne bi dolazilo do njihovog postranog ispupčenja (stvaranja nehomogene deformacije). Prije mjerenja uzorci sira su ponovo omotani prijanjajućom plastičnom folijom da ne bi došlo do gubitka vlage, te su čuvani na sobnoj temperaturi prostorije (od 22 do 25 °C) kako bi temperatura uzoraka i radnih alata na teksturnom analizatoru bila identična. Za sve uzorke bilo je jednako vrijeme od uzimanja uzoraka do trenutka mjerenja.

### 3.8.2. Analiza teksturnog profila (TPA)

Uzorak sira je postavljen na radnu površinu, a gornja pomična ploča je spuštena do površine samog uzorka. Radi spriječavanja trenja i pojave nehomogene deformacije uzorka, obje površine su predhodno premazane uljem niskog viskoziteta. Nakon pokretanja teksturnog analizatora i postizanja vrijednosti predtestne sile okidača, započelo je mjerenje, a uzorak je bio podvrgnut dvostrukom ciklusu kompresije i dekompresije prema sljedećim softverskim postavkama: vrijednost predtestne sile okidača – 0,05 N, kompresija uzorka – 70 % od njegove početne visine, promjer i visina uzorka – 17/25 mm, brzina kretanja ploče tijekom prvog i drugog ciklusa kompresije - 50 mm/min, brzina povratka ploče u početno stanje nakon obavljenog prvog i drugog ciklusa kompresije - 50 mm/min, vrijeme zadržavanja ploče između prvog i drugog ciklusa kompresije – 5 s. Navedeni postupak dvostruke kompresije i dekompresije je vidljiv u obliku krivulje na grafikonu a pomoću softvera Nexygen izračunati su sljedeći pokazatelji teksturnog profila:

- Čvrstoća 1 – najveća vrijednost sile u prvom ciklusu kompresije izražena u njutnima (N),
- Deformacija uzorka pri čvrstoći 1 - visina uzorka postignuta pri čvrstoći u prvom ciklusu kompresije u odnosu na početnu visinu uzorka (%),
- Lomljivost – vrijednost sile pri kojoj dolazi do puknuća odnosno popuštanja parakazeinske strukture uzorka izražene u njutnima (N),
- Deformacija uzorka u točki loma - visina uzorka postignuta prilikom puknuća parakazeinske strukture u odnosu na početnu visinu uzorka (%),
- Čvrstoća 2 – najveća vrijednost sile u drugom ciklusu kompresije izražene u njutnima (N),
- Adhezivnost – vrijednost rada koji je potreban da se odvoje dodirne površine između pomične ravne ploče i uzorka sira izraženog u džulima (J),
- Kohezivnost – jakost unutrašnjih sila koje pri kompresiji uzorak održavaju cjelovitim te predstavlja omjer između površine koja se proteže od početka pa do postizanja najveće vrijednosti sile ispod krivulje drugog i navedene površine ispod krivulje prvog ciklusa kompresije,
- Zakašnjela elastičnost – sposobnost povrata visine uzorka sira te predstavlja omjer između visine uzorka na početku drugog i visine uzorka na kraju prvog ciklusa kompresije.

### 3.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je obavljena korištenjem statističkog programa SPSS (IBM, i.21). Opisna statistika za sastojke mlijeka i sira je izračunata primjenom DESCRIPTIVES procedure (SPSS, 2012). S obzirom da vrijednosti broja somatskih stanica i ukupnog broja mikroorganizama nisu bile raspoređene u okviru normalne krivulje, navedene vrijednosti su pretvorene u logaritam s bazom 10.

Utjecaj broja somatskih stanica, koncentracije uree te stadija laktacije na kemijski sastav i fizikalna svojstva sirovog ovčjeg mlijeka je analiziran analizom varijance korištenjem GLM UNIVARIATE procedure primjenom sljedećeg modela:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

gdje je:

$Y_{ij}$  = j-to opažanje sastojka mlijeka i-te razine čimbenika S,

$\mu$  = ukupna srednja vrijednost,

$S_i$  = fiksni utjecaj i-tog/e:

- broja somatskih stanica (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 150.000, 2 = 151.000 - 500.000, 3 = 501.000 - 850.000 /ml),
- stadija laktacije (i = 1, 2, 3; 1 = rani, 2 = srednji, 3 = kasni)
- koncentracije uree (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 25,00, 2 = 25,01 - 35,00, 3 = 35,01 - 45,00 mg/100 ml),

$\varepsilon_{ijk}$  = neprotumačeni utjecaj

Razdoblje laktacije je bilo podijeljeno na tri vremenski podjednake cjeline ili stadija i to: rani (od početka mužnje do 50 dana), srednji (od 51 do 100 dana) i kasni stadij (iznad 101 dana).

Utjecaj kakvoće ovčjeg mlijeka odnosno stadija laktacije na tvrdoću i sposobnosti sinereze sirnog gruš utvrđen je analizom varijance korištenjem GLM UNIVARIATE procedure primjenom sljedećeg modela:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

gdje je:

$Y_{ij}$  = j-to opažanje vrijednosti tvrdoće odnosno sposobnosti sinereze gruš a i-te razine čimbenika S,

$\mu$  = ukupna srednja vrijednost,

$S_i$  = fiksni utjecaj i-tog/e:

- udjela kazeina (i = 1, 2, 3; 1 = 4,00 – 4,35, 2 = 4,36 – 4,70, 3 = 4,71 – 5,50 mg/100 g),
- udjela mliječne masti (i = 1, 2, 3; 1 = 6,00 – 7,00, 2 = 7,01 – 8,00, 3 = 8,01 - 9,00 g/100 g),
- omjera kazeina i mliječne masti (i = 1, 2, 3; 1 = 0,53 – 0,58, 2 = 0,59 – 0,63, 3 = 0,64 – 0,68),
- udjela ukupnog kalcija (i = 1, 2, 3; 1 = 182,00 – 189,00, 2 = 189,01 – 196,00, 3 = 196,01 – 203,00),
- udjela  $Ca^{2+}$  (i = 1, 2, 3; 1 = 8,00 – 10,66, 2 = 10,67 – 13,32, 3 = 13,33 – 15,98),
- broja somatskih stanica (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 150.000, 2 = 151.000 - 500.000, 3 = 501.000 - 850.000 /ml),
- stadija laktacije (i = 1, 2, 3; 1 = rani, 2 = srednji, 3 = kasni)
- koncentracije uree (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 25,00, 2 = 25,01 - 35,00, 3 = 35,01 - 45,00 mg/100 ml),

$\epsilon_{ijk}$  = neprotumačeni utjecaj

Utjecaj sastojaka mlijeka odnosno stadija laktacije na kemijsko-fizikalni sastav, teksturne i proteolitičke promijene tijekom zrenja bračkog sira je utvrđen analizom varijance korištenjem GLM UNIVARIATE procedure primjenom sljedećeg modela:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + V_j + (S*V)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

gdje je:

$Y_{ijk}$  = k-to opažanje sastava i teksture sira i-te razine sastojka mlijeka odnosno stadija laktacije j-tog vremenskog razdoblja zrenja sira,

$\mu$  = ukupna srednja vrijednost,

$S_i$  = utjecaj i-tog/e:

- udjela kazeina (i = 1, 2, 3; 1 = 4,00 – 4,35, 2 = 4,36 – 4,70, 3 = 4,71 – 5,50 mg/100 g),
- udjela mliječne masti (i = 1, 2, 3; 1 = 6,00 – 7,00, 2 = 7,01 – 8,00, 3 = 8,01 - 9,00 g/100 g),
- omjera kazeina i mliječne masti (i = 1, 2, 3; 1 = 0,53 – 0,58, 2 = 0,59 – 0,63, 3 = 0,64 – 0,68),
- broja somatskih stanica (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 150.000, 2 = 151.000 - 500.000, 3 = 501.000 - 850.000 /ml),
- stadija laktacije (i = 1, 2, 3; 1 = rani, 2 = srednji, 3 = kasni)
- koncentracije uree (i = 1, 2, 3; 1 = manje od 25,00, 2 = 25,01 - 35,00, 3 = 35,01 - 45,00 mg/100 ml),

$V_j$  = utjecaj j-tog vremenskog razdoblja zrenja sira  
( $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;  $1 = 0.$  dan,  $2 = 30.$  dan,  $3 = 60.$  dan,  $4 = 90.$  dan,  $5 = 120.$  dan),

$(S*V)_{ij}$  = interakcija između i-te razine sastojaka mlijeka odnosno stadija laktacije i j-tog trajanja zrenja sira,

$\varepsilon_{ijk}$  = neprotumačeni utjecaj

Budući da dobivene vrijednosti adhezivnosti nisu bile raspoređene u okviru normalne krivulje, navedene vrijednosti su pretvorene u logaritam s bazom 10.

Promjene kemijskog sastava odnosno proteolitičke i teksturne promjene sira tijekom zrenja su analizirane analizom varijance korištenjem GLM UNIVARIATE procedure primjenom sljedećeg modela:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

gdje je:

$Y_{ij}$  = j-to opažanje vrijednosti sastojka odnosno teksture sira i-tog trajanja zrenja sira,

$\mu$  = ukupna srednja vrijednost,

$S_i$  = fiksni utjecaj i-tog trajanja zrenja sira ( $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;  $1 = 0.$  dan,  $2 = 30.$  dan,  $3 = 60.$  dan,  $4 = 90.$  dan,  $5 = 120.$  dan),

$\varepsilon_{ijk}$  = neprotumačeni utjecaj

Navedene promjene su također prikazane regresijskom analizom a optimalni pravac regresije je određen metodom najmanjih kvadrata. Koeficienti korelacije su izračunati pomoću BIVARIATE CORRELATIONS procedure.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1 Kakvoća ovčjeg mlijeka

Opisni statistički pokazatelji kakvoće ovčjeg mlijeka prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Kakvoća ovčjeg mlijeka (n = 25)

<b>Pokazatelj</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>SD</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>C.V.</b>
Suha tvar (g/100 g)	18,72	0,80	17,30	20,43	4,27
Mliječna mast (g/100 g)	7,51	0,69	6,48	8,98	9,19
Proteini (g/100 g)	5,73	0,31	5,20	6,40	5,41
Kazein (g/100 g)	4,57	0,25	4,08	5,06	5,47
Kazeinski broj	79,69	2,62	72,97	81,50	3,29
Laktoza (g/100 g)	4,43	0,16	4,02	4,63	3,61
STBM (g/100 g)	11,25	0,26	10,81	11,60	2,31
Urea (mg/100 ml)	28,96	7,97	16,25	44,69	27,80
Ukupni Ca (mg/100 g)	192,08	7,03	178,02	208,08	3,66
Ca <sup>2+</sup> (mg/100 g)	11,89	1,74	8,12	15,96	14,63
Udio Ca <sup>2+</sup> u UCa (%)	6,19	0,90	4,12	7,92	14,54
Gustoća (g/cm <sup>3</sup> )	1,0344	0,0012	1,0320	1,0364	0,12
pH - vrijednost	6,65	0,06	6,54	6,84	0,90
Točka leđišta (°C)	-0,5608	0,0069	-0,5731	-0,5493	1,23
UBM (log <sub>10</sub> )	4,34	0,43	3,70	5,32	9,91
BSS (log <sub>10</sub> )	5,30	0,35	4,52	5,92	6,60

$\bar{x}$  - srednja vrijednost, SD = standardna devijacija, C.V. = koeficijent varijacije, STBM = suha tvar bez masti, UCa = udjel ukupnog kalcija, Ca<sup>2+</sup> = udjel ionskog kalcija, UBM = ukupan broj mikroorganizama, BSS = broj somatskih stanica

Iz tablice 5. je vidljivo da kakvoća ovčjeg mlijeka udovoljava odredbama Pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (Narodne novine br. 102/00, 111/00 i 74/08) i Pravilnika o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (Narodne novine br. 110/10).



#### 4.1.1. Utjecaj broja somatskih stanica

Kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka, ovisno o broju somatskih stanica prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Utjecaj broja somatskih stanica na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka (n = 25)

Pokazatelj	Broj somatskih stanica (x 1.000)/ml			Razina značajnosti
	< 150	151 - 500	501 - 850	
Suha tvar (g/100 g)	18,56 ± 0,24	19,02 ± 0,25	18,49 ± 0,36	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	7,33 ± 0,21	7,70 ± 0,22	7,55 ± 0,31	NZ
Proteini (g/100 g)	5,73 ± 0,09	5,84 ± 0,09	5,52 ± 0,13	NZ
Kazein (g/100 g)	4,45 <sup>a</sup> ± 0,07	4,72 <sup>b</sup> ± 0,07	4,52 <sup>ab</sup> ± 0,10	*
Kazeinski broj	77,79 <sup>a</sup> ± 0,62	80,68 <sup>b</sup> ± 0,65	81,88 <sup>b</sup> ± 0,92	**
OKMM	0,61 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,60 ± 0,02	NZ
Laktoza (g/100 g)	4,47 ± 0,05	4,42 ± 0,05	4,35 ± 0,07	NZ
STBM (g/100 g)	11,28 <sup>a</sup> ± 0,07	11,36 <sup>a</sup> ± 0,07	10,98 <sup>b</sup> ± 0,10	*
UCa (mg/100 g)	192,12 <sup>a</sup> ± 1,81	195,73 <sup>a</sup> ± 1,90	184,68 <sup>b</sup> ± 2,68	*
Ca <sup>2+</sup> (mg/100 g)	11,85 ± 0,55	11,94 ± 0,57	11,83 ± 0,81	NZ
Udio Ca <sup>2+</sup> u UCa (%)	6,16 ± 0,28	6,11 ± 0,29	6,41 ± 0,41	NZ
Gustoća (g/cm <sup>3</sup> )	1,034 ± 0,0004	1,035 ± 0,0004	1,035 ± 0,0015	NZ
pH - vrijednost	6,63 <sup>a</sup> ± 0,01	6,63 <sup>a</sup> ± 0,01	6,73 <sup>b</sup> ± 0,02	**
Točka ledišta (°C)	-0,5611 ± 0,0021	-0,5621 ± 0,0022	-0,5574 ± 0,0031	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, STBM = suha tvar bez masti, UCa = udjel ukupnog kalcija, Ca<sup>2+</sup> = udjel ionskog kalcija

Povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je statistički značajno (P<0,05) utjecalo na udio kazeina, ukupnog kalcija i suhe tvari bez mliječne masti (tablica 6). Najveći udio ukupnog kalcija i suhe tvari bez mliječne masti je utvrđen u mlijeku čiji je broj somatskih stanica bio u rasponu od 151.000 do 500.000 /ml dok je najmanja vrijednost navedenih sastojaka utvrđena u mlijeku s brojem somatskih stanica iznad 500.000/ml.

Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku statistički značajno se ( $P < 0,01$ ) mijenjala vrijednost kazeinskog broja te njegova pH vrijednost. Vrijednosti kazeinskog broja te pH vrijednost su bile najmanje u mlijeku s najnižim brojem somatskih stanica dok su navedeni pokazatelji postigli najveću vrijednost u mlijeku s brojem somatskih stanica iznad 500.000/ml (tablica 6).

#### 4.1.2. Utjecaj koncentracije uree

Utjecaj različite koncentracije uree na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Utjecaj koncentracije uree na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka (n = 25)

Pokazatelj	Udjel uree (mg/100 ml)			Razina značajnosti
	< 25,00	25,01 - 35,00	35,01 - 45,00	
Suha tvar (g/100 g)	18,42 ± 0,24	19,16 ± 0,25	18,59 ± 0,29	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	7,29 ± 0,20	7,94 ± 0,21	7,28 ± 0,24	NZ
Proteini (g/100 g)	5,62 ± 0,9	5,80 ± 0,1	5,81 ± 0,12	NZ
Kazein (g/100 g)	4,40 <sup>a</sup> ± 0,07	4,71 <sup>b</sup> ± 0,07	4,62 <sup>b</sup> ± 0,08	*
Kazeinski broj	78,33 <sup>a</sup> ± 0,76	81,26 <sup>b</sup> ± 0,80	79,61 <sup>ab</sup> ± 0,90	*
OKMM	0,61 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,64 ± 0,02	NZ
Laktoza (g/100 g)	4,43 ± 0,05	4,35 ± 0,05	4,52 ± 0,06	NZ
STBM (g/100 g)	11,15 ± 0,08	11,25 ± 0,08	11,41 ± 0,1	NZ
UCa (mg/100 g)	191,06 ± 2,26	191,30 ± 2,38	194,52 ± 2,70	NZ
Ca <sup>2+</sup> (mg/100 g)	11,98 ± 0,57	11,80 ± 0,60	11,86 ± 0,68	NZ
Udio Ca <sup>2+</sup> u UCa (%)	6,27 ± 0,29	6,18 ± 0,31	6,10 ± 0,35	NZ
Gustoća (g/cm <sup>3</sup> )	1,0342 ± 0,0004	1,0342 ± 0,0004	1,0348 ± 0,0005	NZ
Točka ledišta (°C)	-0,5586 ± 0,0022	-0,5618 ± 0,0023	-0,5625 ± 0,0026	NZ
pH - vrijednost	6,66 ± 0,02	6,67 ± 0,02	6,62 ± 0,02	NS

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), NZ = nema značajne razlike, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, STBM = suha tvar bez masti, UCa = udjel ukupnog kalcija, Ca<sup>2+</sup> = udjel ionskog kalcija

Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku je statistički značajno utjecalo ( $P < 0,05$ ) na udio kazeina i vrijednost kazeinskog broja. Najveća vrijednost kazeinskog broja odnosno najveći udio kazeina je utvrđen u mlijeku čija je koncentracija uree bila u rasponu od 25,01 do 35,00 mg/100 ml dok je najmanje vrijednosti navedenih pokazatelja imalo mlijeko s najmanjom koncentracijom uree (tablica 7).

#### 4.1.3. Utjecaj stadija laktacije

Utjecaj stadija laktacije na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka prikazan je u tablici 8.

Tablica 8. Utjecaj stadija laktacije na kemijski sastav i fizikalna svojstva ovčjeg mlijeka ( $n = 25$ )

Pokazatelj	Stadij laktacije			Razina značajnosti
	Rani	Srednji	Kasni	
Suha tvar (g/100 g)	18,25 <sup>a</sup> ± 0,19	18,59 <sup>a</sup> ± 0,20	19,58 <sup>b</sup> ± 0,23	**
Mliječna mast (g/100 g)	7,17 <sup>a</sup> ± 0,19	7,43 <sup>a</sup> ± 0,20	8,12 <sup>b</sup> ± 0,23	*
Proteini (g/100 g)	5,59 <sup>a</sup> ± 0,08	5,63 <sup>a</sup> ± 0,08	6,07 <sup>b</sup> ± 0,09	**
Kazein (g/100 g)	4,47 <sup>a</sup> ± 0,07	4,53 <sup>a</sup> ± 0,08	4,75 <sup>b</sup> ± 0,09	*
Kazeinski broj	79,86 ± 0,82	80,52 ± 0,86	78,37 ± 0,98	NZ
OKMM	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,59 ± 0,02	NZ
Laktoza (g/100 g)	4,49 <sup>a</sup> ± 0,05	4,48 <sup>a</sup> ± 0,05	4,28 <sup>b</sup> ± 0,05	*
STBM (g/100 g)	11,16 <sup>a</sup> ± 0,08	11,21 <sup>ab</sup> ± 0,08	11,45 <sup>b</sup> ± 0,09	*
Urea (mg/100 ml)	29,99 ± 2,54	28,49 ± 2,67	27,68 ± 3,03	NZ
Ukupni Ca (mg/100 g)	190,34 ± 2,26	192,41 ± 2,38	194,13 ± 2,70	NZ
Ca <sup>2+</sup> (mg/100 g)	11,10 <sup>a</sup> ± 0,49	11,64 <sup>a</sup> ± 0,51	13,31 <sup>b</sup> ± 0,58	*
Udio Ca <sup>2+</sup> u UCa (%)	5,84 ± 0,26	6,06 ± 0,27	6,86 ± 0,31	NZ
Gustoća (g/cm <sup>3</sup> )	1,035 ± 0,001	1,034 ± 0,001	1,034 ± 0,001	NZ
pH - vrijednost	6,64 ± 0,02	6,66 ± 0,02	6,65 ± 0,02	NZ
Točka leđišta (°C)	-0,561 ± 0,002	-0,563 ± 0,002	-0,557 ± 0,003	NZ
BSS (log <sub>10</sub> )	5,28 ± 0,11	5,38 ± 0,12	5,23 ± 0,14	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, STBM = suha tvar bez masti, UCa = udjel ukupnog kalcija, Ca<sup>2+</sup> = udjel ionskog kalcija, BSS = broj somatskih stanica

Iz tablice 8. je vidljivo da je stadij laktacije statistički značajno utjecao na udio proteina ( $P < 0,01$ ), mliječne masti, kazeina, laktoze, suhe tvari, suhe tvari bez mliječne masti i ionskog kalcija ( $P < 0,05$ ) u ovčjem mlijeku. U mlijeku kasne laktacije je utvrđen najveći udio mliječne masti, proteina, suhe tvari, suhe tvari bez mliječne masti, ukupnog i ionskog kalcija dok je vrijednost navedenih sastojaka bila najmanja u mlijeku na početku laktacije. Udio laktoze je bio gotovo podjednak u mlijeku tijekom ranog i srednjeg stadija laktacije da bi statistički značajno ( $P < 0,05$ ) smanjenje navedenog sastojka uslijedilo tek u posljednjem dijelu laktacije (tablica 8).

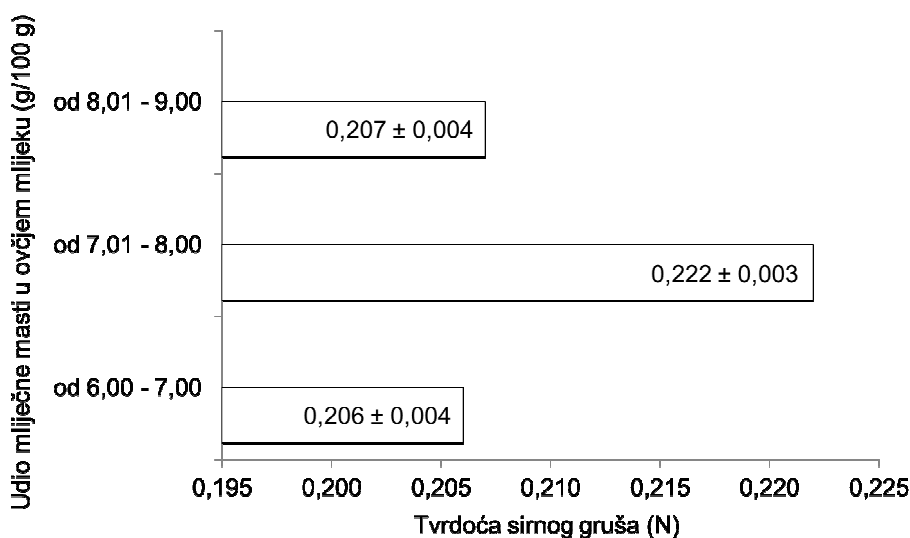
## 4.2. Tvrdoća i sposobnost sinereze sirnog gruša

### 4.2.1. Utjecaj kakvoće sirovog ovčjeg mlijeka

Utjecaj kakvoće ovčjeg mlijeka na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša je prikazan sljedećim parametrima:

#### 4.2.1.1. Mliječna mast

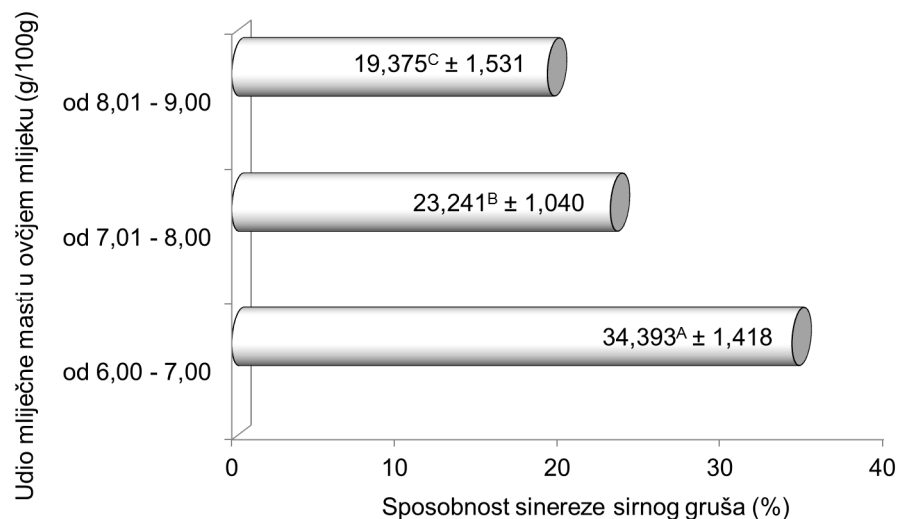
Utjecaj udjela mliječne masti na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 1 i 2.



Grafikon 1. Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata  $\pm$  standardna greška razlike, N = njutn

Povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku nije značajno utjecalo na tvrdoću sirnog gruša (grafikon 1).



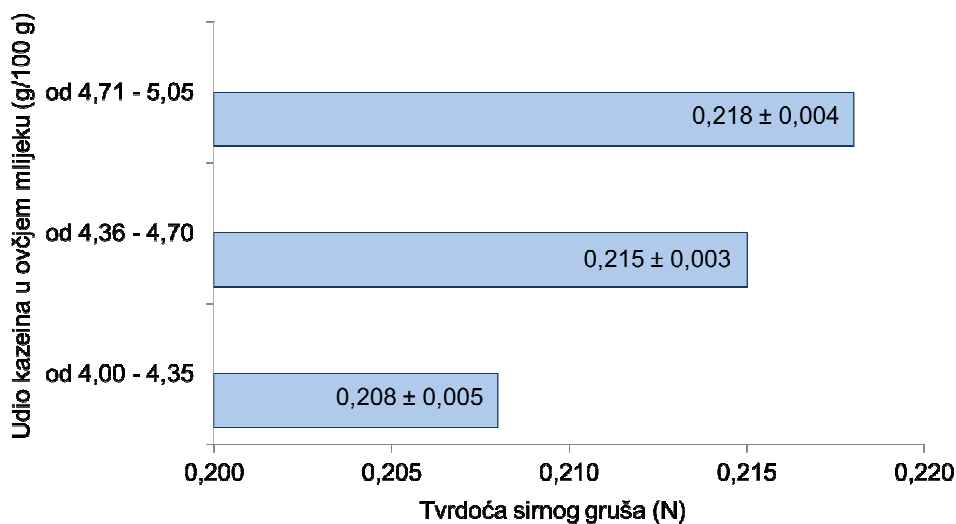
Grafikon 2: Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; A, B, C vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,01)

Povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,01) smanjilo sinerezu sirnog gruša (grafikon 2).

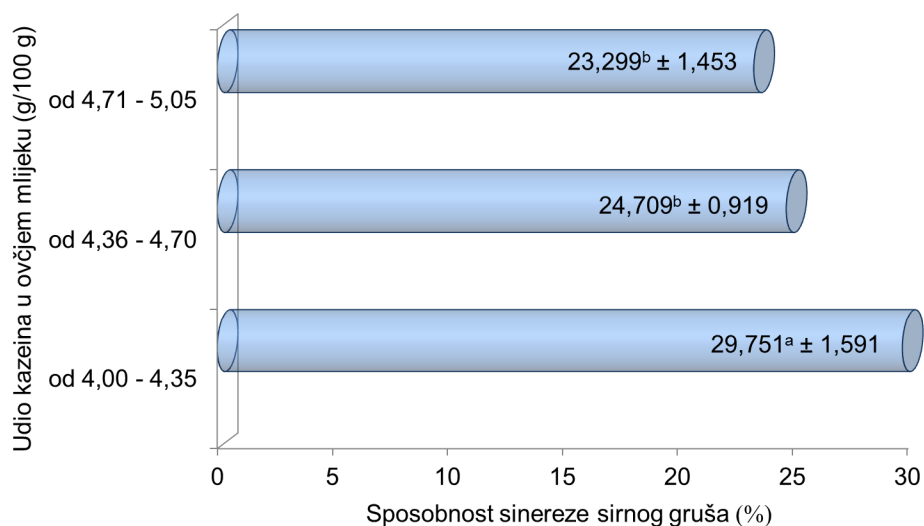
#### 4.2.1.2. Kazein

Utjecaj udjela kazeina na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 3 i 4.



Grafikon 3. Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, N = njutn



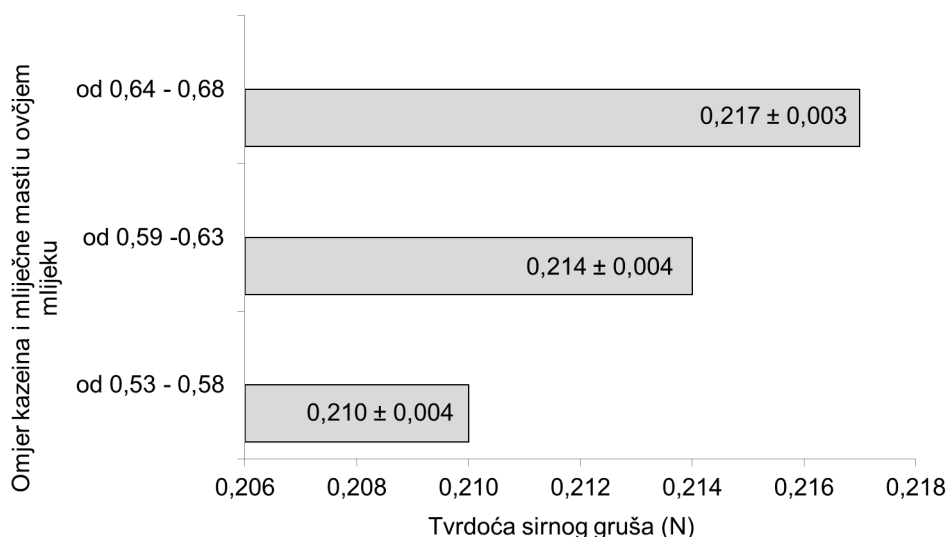
Grafikon 4: Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju ( $P < 0,05$ ).

Iz grafikona 3 je vidljivo da je s povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku povećava tvrdoća sirnog gruša. Povećanjem udjela kazeina u mlijeku za sirenje sirni gruševi su bili značajno ( $P < 0,05$ ) slabije sposobnosti sinereze (grafikon 4).

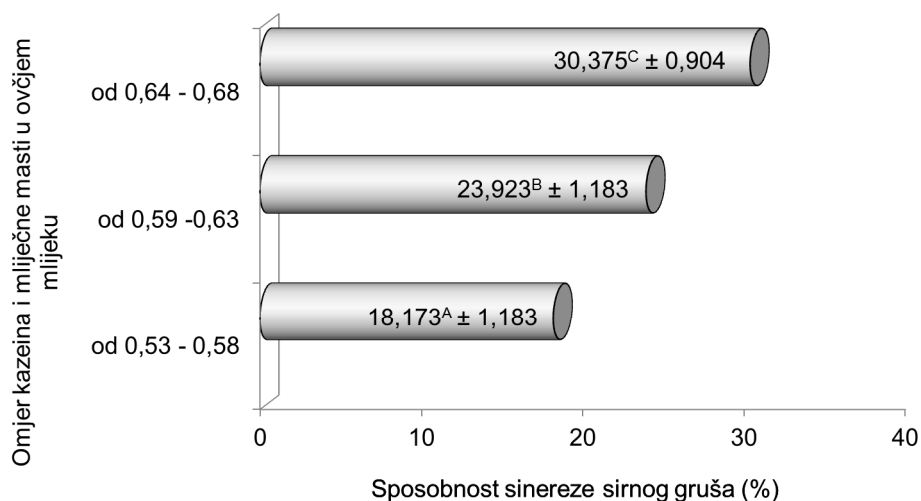
#### 4.2.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti

Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 5 i 6.



Grafikon 5. Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, N = njutn



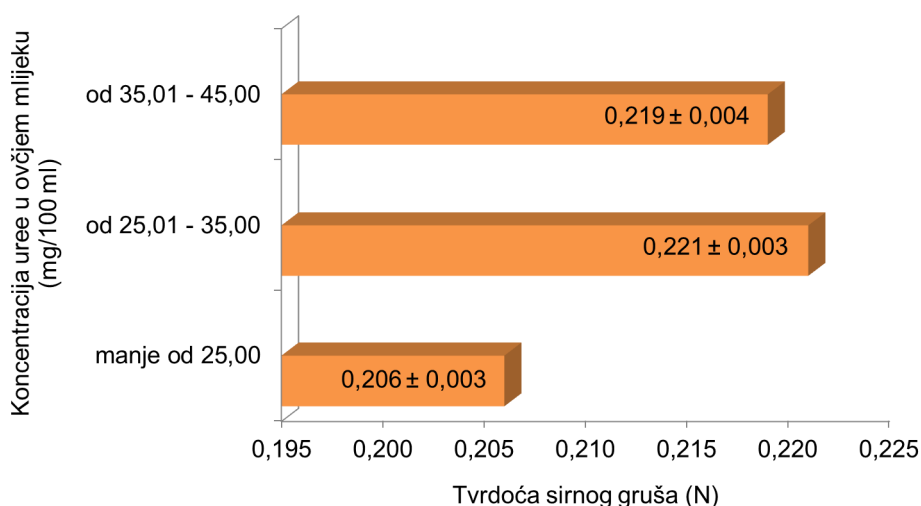
Grafikon 6. Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; A, B, C vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,01).

Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno utjecalo (P<0,01) na sposobnost sinereze (grafikon 6) ali ne i na tvrdoću sirnog gruša (grafikon 5).

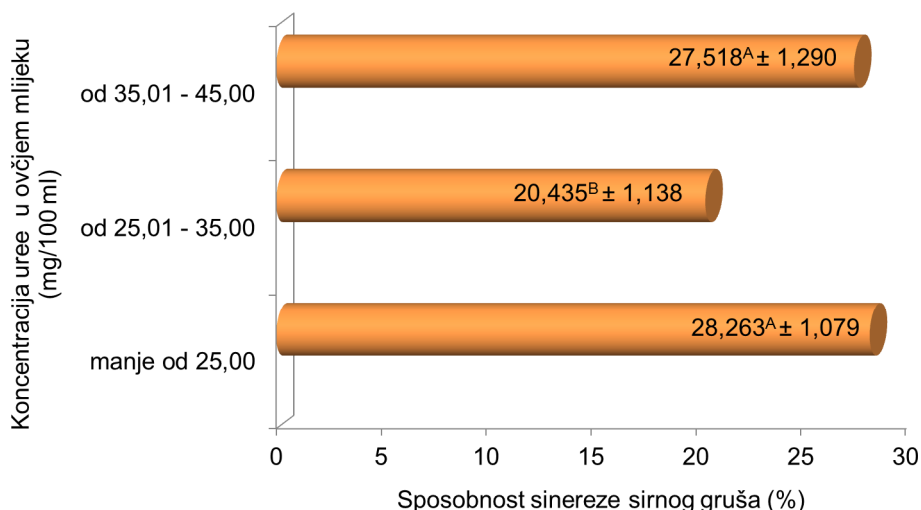
#### 4.2.1.4. Urea

Utjecaj koncentracije uree na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 7 i 8.



Grafikon 7. Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, N = njutn



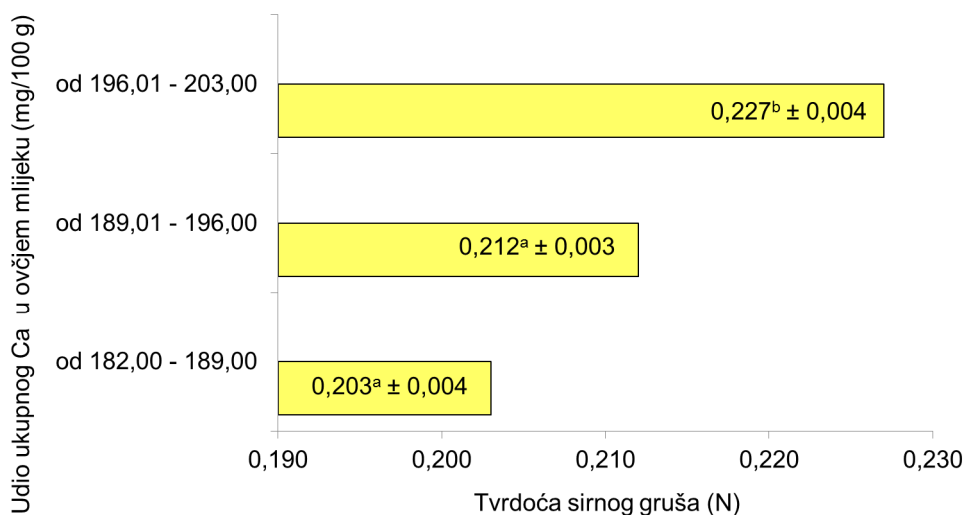
Grafikon 8. Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; A, B vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju ( $P < 0,01$ ).

Koncentracija uree u ovčjem mlijeku nije značajno utjecala na tvrdoću sirnog gruša (grafikon 7). Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku značajno je utjecalo na promijenu ( $P < 0,01$ ) sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 8).

#### 4.2.1.5. Ukupni kalcij

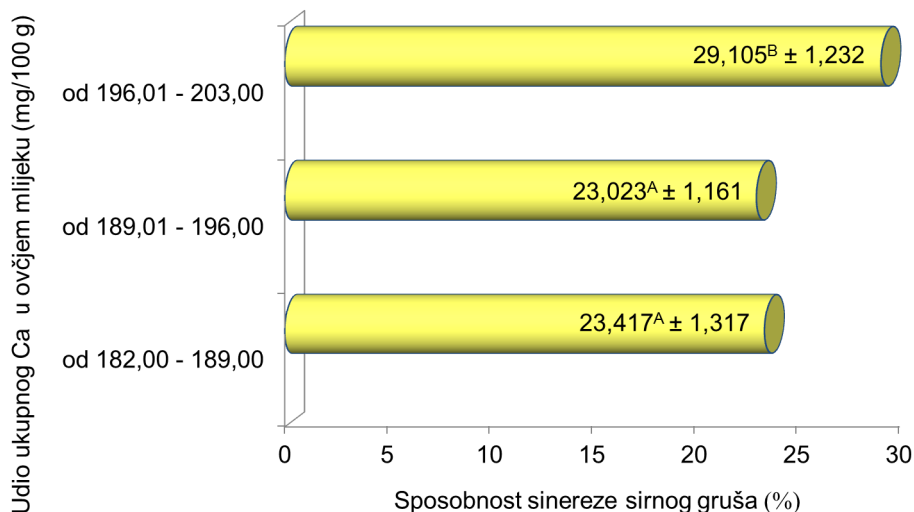
Utjecaj udjela ukupnog kalcija na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 9 i 10.



Grafikon 9. Utjecaj udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju ( $P < 0,05$ ), N = njutn





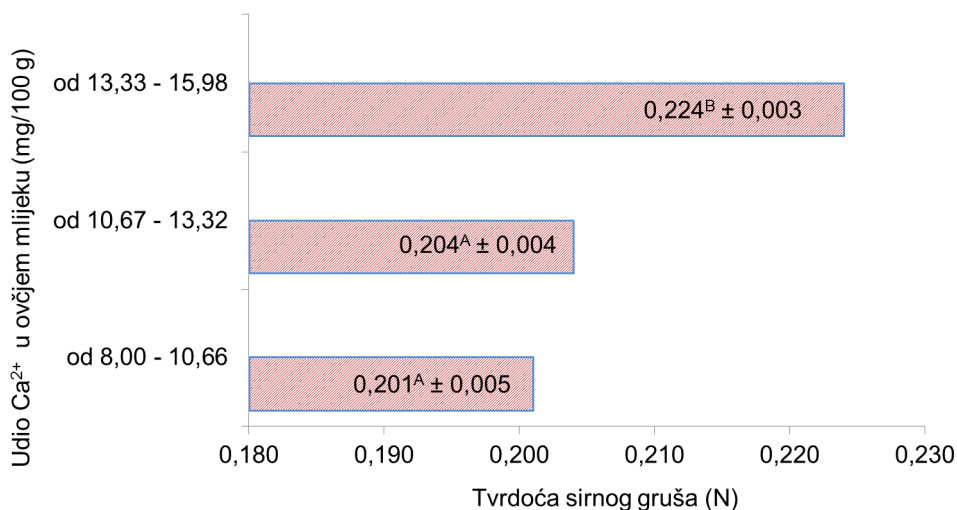
Grafikon 10. Utjecaj udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; A, B vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,01).

Povećanjem udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,05) povećana tvrdoća (grafikon 9) te (P<0,01) sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 10).

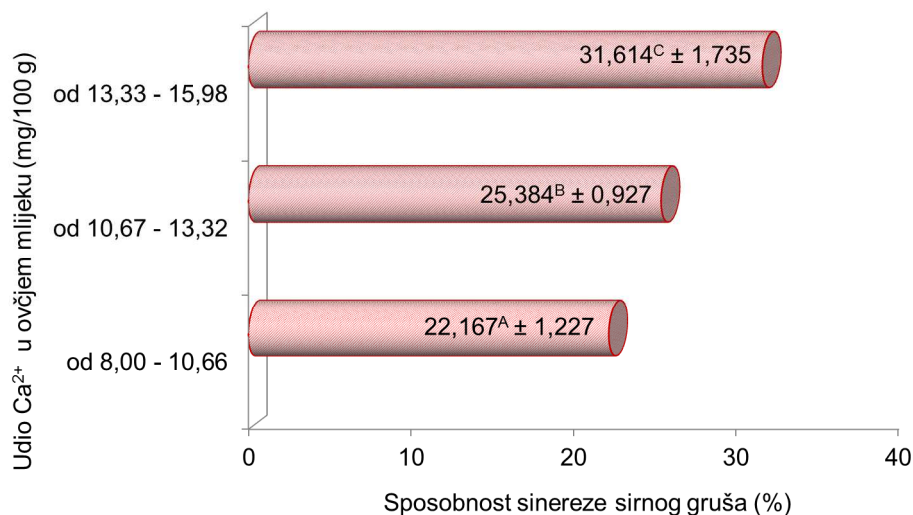
#### 4.2.1.6. Ionski kalcij

Utjecaj udjela ionskog kalcija na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 11 i 12.



Grafikon 11. Utjecaj udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; A, B vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,01), N = njuton



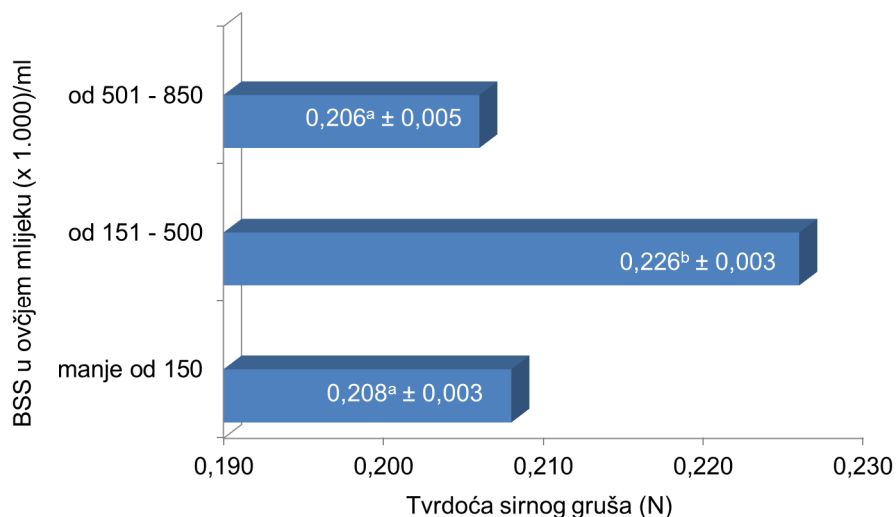
Grafikon 12. Utjecaj udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, A, B, C vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,01).

Povećanjem udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,01) povećana tvrdoća (grafikon 11) te sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 12).

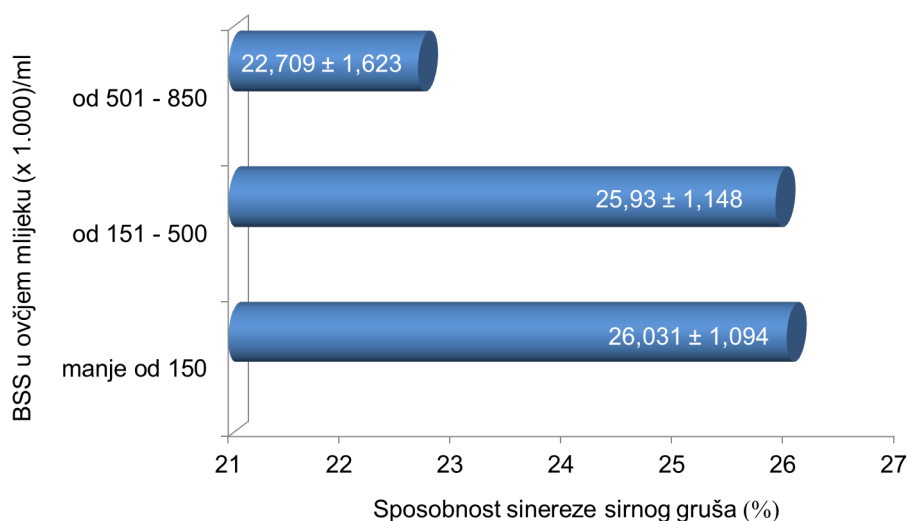
#### 4.2.1.7. Broj somatskih stanica

Utjecaj broja somatskih stanica na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je na grafikonima 13 i 14.



Grafikon 13. Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na tvrdoću sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, a, b vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju (P<0,05), BSS = broj somatskih stanica, N = njutn



Grafikon 14. Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Rezultati su izraženi kao prosjek najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike, BSS = broj somatskih stanica

Povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecalo na tvrdoću (grafikon 13) ali nije utjecao na sposobnost sinereze gruša (grafikon 14).

#### 4.2.2. Utjecaj stadija laktacije

Utjecaj stadija laktacije na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Utjecaj stadija laktacije na tvrdoću i sposobnost sinereze sirnog gruša (n = 25)

Pokazatelj	Stadij laktacije			Razina značajnosti
	Rani	Srednji	Kasni	
Tvrdoća (N)	0,214 ± 0,003	0,219 ± 0,004	0,210 ± 0,004	NZ
Sinereza (%)	25,485 <sup>ab</sup> ± 1,330	27,509 <sup>a</sup> ± 1,402	22,387 <sup>b</sup> ± 1,589	*

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), NZ = nema značajne razlike, N = njutn

Iz tablice 9. je vidljivo da je sirni gruš proizveden u sredini laktacije imao najveću a pri kraju laktacije najmanju tvrdoću s tim da između navedenih vrijednosti nisu utvrđene statistički značajne razlike. Sposobnost sinereze sirnog gruša se značajno ( $P < 0,05$ ) mijenjala tijekom laktacije. Najveća sposobnost sinereze utvrđena je u sirnom grušu tijekom srednjeg stadija laktacije dok je pri kraju proizvodnog razdoblja sirni gruš imao najmanju sposobnost otpuštanja sirutke (tablica 9).

### 4.3. Kemijsko fizikalni sastav bračkog sira

Kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira 120. dana zrenja prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira 120 - og dana zrenja (n = 60)

<b>Sastojak bračkog sira</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>SD</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>C.V.</b>
Suha tvar (g/100 g)	67,62	3,12	62,00	72,08	4,61
Mliječna mast (g/100 g)	35,02	2,46	31,50	38,50	7,02
Udjel MM u ST (%)	51,75	1,95	48,59	54,96	3,77
Proteini (g/100 g)	26,87	1,32	24,38	28,64	4,91
Udjel proteina u ST (%)	39,76	1,41	37,81	42,12	3,55
Udjel vode u NT (%)	49,75	3,28	45,03	55,88	6,59
Sol (%)	2,09	0,29	1,65	2,77	13,88
pH - vrijednost	5,14	0,09	5,02	5,36	1,75

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, SD = standardna devijacija, C.V = koeficijent varijacije, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar

S obzirom na udio vode u nemasnoj tvari brački sir prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva pripada skupini tvrdih sireva. Prema udjelu mliječne masti u suhoj tvari brački sir pripada skupini punomasnih sireva (tablica 10).

## 4.4. Čimbenici koji utječu na sastav, proteolitičke i teksturne značajke bračkog sira

### 4.4.1. Utjecaj kakvoće ovčjeg mlijeka

#### 4.4.1.1. Mliječna mast

Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira prikazan je u tablici 11.

Tablica 11. Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Udio mliječne masti u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	6,00 - 7,00	7,01 - 8,00	8,01 - 9,00	UMM	TZ	UMM x TZ
Suha tvar (g/100 g)	62,05 <sup>a</sup> ± 0,51	62,97 <sup>a</sup> ± 0,38	64,72 <sup>b</sup> ± 0,51	**	**	NZ
Voda (g/100 g)	37,95 <sup>a</sup> ± 0,51	37,02 <sup>a</sup> ± 0,38	35,28 <sup>b</sup> ± 0,51	**	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	30,52 <sup>a</sup> ± 0,45	32,00 <sup>b</sup> ± 0,34	34,79 <sup>c</sup> ± 0,45	**	**	NZ
Udio MM u ST (%)	49,12 <sup>a</sup> ± 0,51	50,76 <sup>b</sup> ± 0,38	53,77 <sup>c</sup> ± 0,51	**	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	24,97 ± 0,32	25,07 ± 0,24	24,92 ± 0,32	NZ	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	40,21 <sup>a</sup> ± 0,47	39,87 <sup>a</sup> ± 0,35	38,52 <sup>b</sup> ± 0,47	*	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	54,54 ± 0,55	54,30 ± 0,41	53,90 ± 0,55	NZ	**	NZ
Sol (%)	1,57 ± 0,06	1,72 ± 0,05	1,66 ± 0,06	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,10 ± 0,03	5,07 ± 0,02	5,03 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, UMM = udjel mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, UMM x TZ = interakcija između udjela mliječne masti i trajanja zrenja.

Iz tablice 11. je vidljivo da je s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku značajano ( $P < 0,01$ ) povećan udio suhe tvari i mliječne masti te njen udio u suhoj tvari bračkog sira. Međutim, navedenim povećanjem u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja ukupnog udjela vode ali i značajnog ( $P < 0,05$ ) smanjenja udjela proteina u suhoj tvari bračkog sira. Udio mliječne masti u ovčjem mlijeku nije značajno utjecao na udio proteina i soli te vode u nemasnoj tvari bračkog sira, ali ni na promjenu pH vrijednosti (tablica 11).

Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 12.

Tablica 12 Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Udio mliječne masti u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	6,00 - 7,00	7,01 - 8,00	8,01 - 9,00	UMM	TZ	UMM x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	20,39 ± 1,50	22,02 ± 1,14	22,15 ± 1,50	NZ	**	NZ
$\alpha_{s1-l}$ - kazein (%)	11,14 ± 0,88	10,97 ± 0,67	11,00 ± 0,88	NZ	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	49,70 ± 1,79	48,24 ± 1,35	44,44 ± 1,79	NZ	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	17,54 <sup>a</sup> ± 1,18	14,90 <sup>ab</sup> ± 0,89	12,55 <sup>b</sup> ± 1,18	*	**	*
$l \gamma/\beta$	0,39 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,03	NZ	**	NZ
$l \alpha$	0,39 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,03	NZ	**	NZ
WSN (% TN)	18,11 ± 0,78	16,54 ± 0,59	15,50 ± 0,78	NZ	**	NZ
TCA-SN (% TN)	10,72 <sup>a</sup> ± 0,54	8,62 <sup>b</sup> ± 0,41	8,44 <sup>b</sup> ± 0,54	**	**	NZ
USA (g Leu/100 g ST)	1,77 ± 0,16	1,30 ± 0,12	1,37 ± 0,16	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar,  $l_{\gamma/\beta}$  = indeks beta,  $l_{\alpha}$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroctenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, UMM = udjel mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, UMM x TZ = interakcija između udjela mliječne masti i trajanja zrenja.

Provedenim istraživanjem nije utvrđen statistički značajan utjecaj povećanog udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na promjenu primarnih proteolitičkih pokazatelja u

bračkom siru osim značajnog ( $P < 0,05$ ) smanjenja udjela  $\gamma$ -kazeina (tablica 12). Povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog smanjenja u vodi ( $P < 0,05$ ) i trikloroetanoj kiselini ( $P < 0,01$ ) topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik dok se udio ukupnih slobodnih aminokiseline nije značajnije mijenjao (tablica 12).

Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 13.

Tablica 13. Utjecaj udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Udio mliječne masti u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	6,00 - 7,00	7,01 - 8,00	8,01 - 9,00	UMM	TZ	UMM x TZ
Lomljivost (N)	37,29 <sup>a</sup> ± 1,40	33,02 <sup>b</sup> ± 1,06	28,26 <sup>c</sup> ± 1,41	**	**	NZ
Deformacija u točki loma (%)	35,10 ± 0,67	34,27 ± 0,51	35,31 ± 0,67	NZ	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	47,35 <sup>a</sup> ± 1,79	42,23 <sup>b</sup> ± 1,35	35,87 <sup>c</sup> ± 1,79	**	**	NZ
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	59,08 ± 2,40	61,39 ± 1,81	65,22 ± 2,40	NZ	**	NZ
Čvrstoća 2 (N)	37,18 <sup>a</sup> ± 1,48	32,68 <sup>b</sup> ± 1,12	27,57 <sup>c</sup> ± 1,48	**	**	NZ
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,65 ± 0,10	-5,60 ± 0,08	-5,64 ± 0,10	NZ	NZ	NZ
Kohezivnost	0,149 ± 0,010	0,144 ± 0,007	0,124 ± 0,010	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, UMM = udjel mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, UMM x TZ = interakcija između udjela mliječne masti i trajanja zrenja.

Povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog povećanja ( $P < 0,01$ ) vrijednosti čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije te lomljivosti bračkog sira. Međutim, navedeno povećanje nije značajno utjecalo na promjene ostalih pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira (tablica 13).

#### 4.4.1.2. Kazein

Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira prikazan je u tablici 14.

Tablica 14. Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Udio kazeina u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	4,00 - 4,35	4,36 - 4,70	4,71 - 5,05	UK	TZ	UK x TZ
Suha tvar (g/100 g)	62,68 <sup>a</sup> ± 0,45	62,23 <sup>a</sup> ± 0,34	65,40 <sup>b</sup> ± 0,45	**	**	NZ
Voda (g/100 g)	37,32 <sup>a</sup> ± 0,45	37,78 <sup>a</sup> ± 0,34	34,60 <sup>b</sup> ± 0,45	**	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	31,70 <sup>a</sup> ± 0,47	31,31 <sup>a</sup> ± 0,35	34,83 <sup>b</sup> ± 0,47	**	**	NZ
Udio MM u ST (%)	50,50 <sup>a</sup> ± 0,60	50,28 <sup>a</sup> ± 0,45	53,24 <sup>b</sup> ± 0,60	**	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	24,46 <sup>a</sup> ± 0,30	24,88 <sup>a</sup> ± 0,23	25,77 <sup>b</sup> ± 0,30	*	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	39,02 ± 0,47	40,03 ± 0,36	39,47 ± 0,47	NZ	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	54,55 <sup>a</sup> ± 0,52	54,87 <sup>a</sup> ± 0,40	52,90 <sup>b</sup> ± 0,52	*	**	NZ
Sol (%)	1,65 ± 0,06	1,64 ± 0,05	1,73 ± 0,06	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,15 <sup>a</sup> ± 0,03	5,05 <sup>b</sup> ± 0,02	5,02 <sup>b</sup> ± 0,03	**	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, UK = udjel kazeina, TZ = trajanje zrenja, UK x TZ = interakcija između udjela kazeina i trajanja zrenja.

Udio kazeina u ovčjem mlijeku je statistički značajno (P<0,01) utjecalo na promjenu pH vrijednosti, udio mliječne masti i suhe tvari te udio mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira. Povrh toga, povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku značajno je (P<0,05) utjecalo na promjenu udjela proteina i udjela vode u nemasnoj tvari bračkog sira (tablica 14).



Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 15.

Tablica 15. Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Udio kazeina u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	4,00 - 4,35	4,36 - 4,70	4,71 - 5,05	UK	TZ	UK x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	19,87 ± 1,50	21,82 ± 1,13	23,03 ± 1,50	NZ	**	NZ
$\alpha_{s1-I}$ - kazein (%)	12,39 ± 0,84	10,43 ± 0,64	10,69 ± 0,84	NZ	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	42,44 <sup>a</sup> ± 1,61	51,09 <sup>b</sup> ± 1,22	46,72 <sup>a</sup> ± 1,61	**	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	15,46 ± 1,31	15,59 ± 0,99	13,44 ± 1,30	NZ	**	NZ
I $\gamma/\beta$	0,40 <sup>a</sup> ± 0,03	0,33 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,30 <sup>b</sup> ± 0,03	*	**	NZ
I $\alpha$	0,41 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,32 ± 0,03	NZ	**	NZ
WSN (% TN)	19,51 <sup>a</sup> ± 0,61	16,70 <sup>b</sup> ± 0,46	13,82 <sup>c</sup> ± 0,02	**	**	NZ
TCA-SN (% TN)	10,63 <sup>a</sup> ± 0,52	9,11 <sup>b</sup> ± 0,39	7,67 <sup>c</sup> ± 0,52	**	**	NZ
USA (g Leu/100 g ST)	1,88 <sup>a</sup> ± 0,15	1,27 <sup>b</sup> ± 0,12	1,32 <sup>b</sup> ± 0,15	**	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar,  $I_{\gamma/\beta}$  = indeks beta,  $I_{\alpha}$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroetenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, UK = udjel kazeina, TZ = trajanje zrenja, UK x TZ = interakcija između udjela kazeina i trajanja zrenja.

Povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,01) utjecalo na sve pokazatelje sekundarnih proteolitičkih promjena u bračkom siru (tablica 15). U odnosu na navedeno, povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,01) utjecalo na udio  $\beta$ -kazeina ali i na (P<0,05) vrijednost  $I_{\gamma/\beta}$ . Vrijednosti ostalih pokazatelja primarnih proteolitičkih promjena se nisu značajnije mijenjale (tablica 15).

Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 16.

Tablica 16. Utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Analiza teksturnog profila	Udio kazeina u ovčjem mlijeku (g/100 g)			Razina značajnosti		
	4,00 - 4,35	4,36 - 4,70	4,71 - 5,05	UK	TZ	UK x TZ
Lomljivost (N)	30,73 <sup>a</sup> ± 1,26	29,77 <sup>a</sup> ± 0,95	40,52 <sup>b</sup> ± 1,26	**	**	*
Deformacija u točki loma (%)	34,25 ± 0,65	34,89 ± 0,49	35,06 ± 0,65	NZ	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	39,39 <sup>a</sup> ± 1,62	37,90 <sup>a</sup> ± 1,22	51,41 <sup>b</sup> ± 1,62	**	**	*
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	62,00 ± 2,34	63,29 ± 1,77	58,99 ± 2,34	NZ	**	*
Čvrstoća 2 (N)	31,57 <sup>a</sup> ± 1,39	29,30 <sup>a</sup> ± 1,05	39,10 <sup>b</sup> ± 1,39	**	**	*
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,74 ± 0,11	-5,62 ± 0,08	-5,53 ± 0,11	NZ	NZ	NZ
Kohezivnost	0,138 ± 0,010	0,135 ± 0,007	0,151 ± 0,010	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,43 <sup>a</sup> ± 0,03	0,46 <sup>a</sup> ± 0,02	0,52 <sup>b</sup> ± 0,03	*	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, UK = udjel kazeina, TZ = trajanje zrenja, UK x TZ = interakcija između udjela kazeina i trajanja zrenja.

Povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku je došlo do značajne promjene (P<0,01; P<0,05) čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije te lomljivosti i zakašnjele elastičnosti bračkog sira sa statistički značajnom (P<0,05) interakcijom između udjela kazeina i trajanja zrenja osim za vrijednost zakašnjele elastičnosti (tablica 16).

#### 4.4.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti

Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira prikazan je u tablici 17.

Tablica 17. Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Omjer kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku			Razina značajnosti		
	0,53 - 0,58	0,59 - 0,63	0,64 - 0,68	OKMM	TZ	OKMM x TZ
Suha tvar (g/100 g)	64,86 <sup>a</sup> ± 0,49	63,51 <sup>b</sup> ± 0,40	61,48 <sup>c</sup> ± 0,44	**	**	NZ
Voda (g/100 g)	35,14 <sup>a</sup> ± 0,49	36,49 <sup>b</sup> ± 0,40	38,52 <sup>c</sup> ± 0,44	**	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	34,93 <sup>a</sup> ± 0,42	32,26 <sup>b</sup> ± 0,34	30,40 <sup>c</sup> ± 0,37	**	**	NZ
Udio MM u ST (%)	53,59 <sup>a</sup> ± 0,52	50,72 <sup>b</sup> ± 0,42	49,41 <sup>c</sup> ± 0,46	**	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	24,69 ± 0,32	25,03 ± 0,26	25,23 ± 0,29	NZ	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	38,07 <sup>a</sup> ± 0,40	39,43 <sup>b</sup> ± 0,33	41,07 <sup>c</sup> ± 0,36	**	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	53,85 ± 0,57	53,71 ± 0,47	55,24 ± 0,51	NZ	**	NZ
Sol (%)	1,59 ± 0,06	1,75 ± 0,05	1,62 ± 0,05	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,11 ± 0,03	5,08 ± 0,02	5,03 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, OKMM x TZ = interakcija između omjera kazeina i mliječne masti s trajanjem zrenja.

Istraživanjem je utvrđeno da je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku došlo do značajnog (P<0,01) smanjenja udjela mliječne masti ali i njenog udjela u suhoj tvari bračkog sira (tablica 17). Iako je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno (P<0,01) povećan udio proteina u suhoj tvari, ukupni udio proteina u bračkom siru je bio neznatno povećan ali razlika nije bila statistički značajna. Povećanjem navedenog sastojka u ovčjem mlijeku se značajno (P<0,01)

smanjio udio suhe tvari, ali nije došlo do značajnije promjene u udjelu soli i vode u nemasnoj tvari, a niti promjene pH vrijednosti bračkog sira (tablica 17).

Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 18.

Tablica 18. Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Omjer kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku			Razina značajnosti		
	0,53 - 0,58	0,59 -0,63	0,64 - 0,68	OKMM	TZ	OKMM x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	21,67 ± 1,39	20,11 ± 1,14	23,40 ± 1,24	NZ	**	NZ
$\alpha_{s1}$ -I-kazein (%)	11,11 <sup>ab</sup> ± 0,86	12,03 <sup>a</sup> ± 0,70	9,74 <sup>b</sup> ± 0,77	*	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	40,45 <sup>a</sup> ± 1,49	48,86 <sup>b</sup> ± 1,22	51,85 <sup>b</sup> ± 1,33	**	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	11,05 <sup>a</sup> ± 1,08	16,36 <sup>b</sup> ± 0,88	16,47 <sup>b</sup> ± 0,97	**	**	*
I $\gamma/\beta$	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,03	NZ	**	NZ
I $\alpha$	0,36 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,33 ± 0,03	NZ	**	NZ
WSN (% TN)	17,11 ± 0,82	16,54 ± 0,67	16,51 ± 0,73	NZ	**	NZ
TCA-SN (% TN)	8,61 ± 0,57	9,02 ± 0,46	9,69 ± 0,51	NZ	**	NZ
USA (g Leu/100 g ST)	1,62 ± 0,17	1,39 ± 0,14	1,38 ± 0,15	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar, I $\gamma/\beta$  = indeks beta, I $\alpha$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroctenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, OKMM x TZ = interakcija između omjera kazeina i mliječne masti s trajanjem zrenja.

Udio  $\beta$  kazeina i njegovog razgradnog produkta odnosno  $\gamma$  kazeina je značajno (P<0,01) povećan u bračkom siru s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku dok se vrijednost I $\gamma/\beta$  nije značajnije mijenjala. Bez obzira što se s navedenim povećanjem nije značajnije mijenjao udio  $\alpha_{s1}$  kazeina a niti vrijednost I $\alpha$ , promjene udjela  $\alpha_{s1}$ -I kazeina su bile statistički značajne (tablica 18). Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku nije značajno utjecalo na vrijednosti pokazatelja sekundarnih proteolitičkih promjena (tablica 18).

Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 19.

Tablica 19. Utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Analiza teksturnog profila	Omjer kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku			Razina značajnosti		
	0,53 - 0,58	0,58 -0,63	0,63 - 0,68	OK MM	TZ	OKMM x TZ
Lomljivost (N)	28,99 <sup>a</sup> ± 1,24	32,80 <sup>a</sup> ± 1,14	37,89 <sup>b</sup> ± 1,39	**	**	NZ
Deformacija u točki loma (%)	35,61 <sup>a</sup> ± 0,57	33,79 <sup>b</sup> ± 0,52	35,19 <sup>ab</sup> ± 0,64	*	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	36,91 <sup>a</sup> ± 1,58	41,71 <sup>a</sup> ± 1,44	48,42 <sup>b</sup> ± 1,77	**	**	NZ
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	64,95 ± 2,13	60,96 ± 1,95	59,11 ± 2,38	NZ	**	NZ
Čvrstoća 2 (N)	29,01 <sup>a</sup> ± 1,33	31,29 <sup>a</sup> ± 1,21	38,74 <sup>b</sup> ± 1,49	**	**	NZ
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,57 ± 0,09	-5,54 ± 0,09	-5,82 ± 0,10	NZ	NZ	NZ
Kohezivnost	0,131 ± 0,009	0,142 ± 0,008	0,148 ± 0,010	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,43 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti, TZ = trajanje zrenja, OKMM x TZ = interakcija između omjera kazeina i mliječne masti s trajanjem zrenja.

Povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog (P<0,01) povećanja lomljivosti bračkog sira te njegove čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije (tablica 19). Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku (P<0,05) je značajno utjecalo na promjenu vrijednosti deformacije u točki loma parakazeinske strukture bračkog sira. Iako se s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti značajno povećala vrijednost čvrstoće u prvom ciklusu kompresije, vrijednost deformacije pri postignutim vrijednostima navedenog pokazatelja se smanjivala, ali razlike nisu bile statistički značajne. Omjer kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku nije imao značajan utjecaj na vrijednost adhezivnosti, kohezivnosti i zakašnjele elastičnosti bračkog sira (tablica 19).

#### 4.4.1.4. Urea

Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira prikazan je u tablici 20.

Tablica 20. Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Koncentracija uree u ovčjem mlijeku (mg/100 ml)			Razina značajnosti		
	< 25,00	25,01 – 35,00	35,01 – 45,00	KU	TZ	KU x TZ
Suha tvar (g/100 g)	62,22 <sup>a</sup> ± 0,35	65,28 <sup>b</sup> ± 0,32	61,27 <sup>a</sup> ± 0,39	**	**	NZ
Voda (g/100 g)	37,77 <sup>a</sup> ± 0,35	34,72 <sup>b</sup> ± 0,32	38,73 <sup>a</sup> ± 0,39	**	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	31,41 <sup>a</sup> ± 0,32	34,63 <sup>b</sup> ± 0,30	30,10 <sup>c</sup> ± 0,36	**	**	NZ
Udio MM u ST (%)	50,44 <sup>a</sup> ± 0,49	53,04 <sup>b</sup> ± 0,45	49,12 <sup>a</sup> ± 0,55	**	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	24,41 <sup>a</sup> ± 0,26	25,56 <sup>b</sup> ± 0,24	24,91 <sup>ab</sup> ± 0,29	**	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	39,23 <sup>a</sup> ± 0,41	39,20 <sup>a</sup> ± 0,37	40,71 <sup>b</sup> ± 0,46	*	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	54,97 <sup>a</sup> ± 0,48	52,95 <sup>b</sup> ± 0,44	55,33 <sup>a</sup> ± 0,53	**	**	NZ
Sol (%)	1,69 ± 0,06	1,68 ± 0,05	1,61 ± 0,06	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,06 ± 0,03	5,07 ± 0,03	5,08 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, KU = koncentracija uree, TZ = trajanje zrenja, KU x TZ = interakcija između koncentracije uree i trajanja zrenja.

Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku značajno (P<0,01; P<0,05) je utjecalo na promjenu udjela većine sastojaka bračkog sira. Bez obzira na koncentraciju uree u ovčjem mlijeku udio soli u bračkom siru, a niti njegova pH vrijednost se nisu značajnije mijenjali (tablica 20).

Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 21.

Tablica 21. Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	Koncentracija uree u ovčjem mlijeku (mg/100 ml)			Razina značajnosti		
	< 25,00	25,01 – 35,00	35,01 – 45,00	KU	TZ	KU x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	19,63 ± 1,32	22,47 ± 1,21	22,84 ± 1,48	NZ	**	NZ
$\alpha_{s1-l}$ - kazein (%)	11,48 ± 0,76	10,81 ± 0,70	10,78 ± 0,85	NZ	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	46,58 <sup>a</sup> ± 1,46	44,73 <sup>a</sup> ± 1,33	53,24 <sup>b</sup> ± 1,63	**	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	16,52 ± 1,14	13,68 ± 1,04	15,01 ± 1,27	NZ	**	NZ
I $\gamma/\beta$	0,39 <sup>a</sup> ± 0,03	0,32 <sup>b</sup> ± 0,02	0,30 <sup>b</sup> ± 0,03	*	**	NZ
I $\alpha$	0,40 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,03	NZ	**	NZ
WSN (% TN)	18,37 <sup>a</sup> ± 0,68	15,55 <sup>b</sup> ± 0,62	16,26 <sup>b</sup> ± 0,76	*	**	NZ
TCA-SN (% TN)	10,34 <sup>a</sup> ± 0,48	8,35 <sup>b</sup> ± 0,44	8,80 <sup>b</sup> ± 0,54	*	**	NZ
USA (g Leu/100 g ST)	1,65 <sup>a</sup> ± 0,14	1,54 <sup>a</sup> ± 0,13	1,05 <sup>b</sup> ± 0,16	*	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar, I $\gamma/\beta$  = indeks beta, I $\alpha$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroctenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, KU = koncentracija uree, TZ = trajanje zrenja, KU x TZ = interakcija između koncentracije uree i trajanja zrenja.

Provedenim istraživanjem je utvrđen značajan (P<0,05) utjecaj povećanja koncentracije uree u ovčjem mlijeku na sve pokazatelje sekundarnih proteolitičkih promjena u bračkom siru. Za razliku od pokazatelja sekundarne proteolize, pokazatelji primarnih proteolitičkih promjena se nisu značajnije mijenjali osim značajne (P<0,01) promjene udjela  $\beta$  kazeina što je posljedično značajno (P<0,05) smanjilo vrijednost I $\gamma/\beta$  u bračkom siru (tablica 21).

Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 22.

Tablica 22. Utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Analiza teksturnog profila	Koncentracija uree u ovčjem mlijeku (mg/100 ml)			Razina značajnosti		
	< 25,00	25,01 - 35,00	35,01 - 45,00	KU	TZ	KU x TZ
Lomljivost (N)	29,56 <sup>a</sup> ± 1,17	38,44 <sup>b</sup> ± 1,07	28,73 <sup>a</sup> ± 1,31	**	**	NZ
Deformacija u točki loma (%)	34,04 ± 0,60	34,77 ± 0,55	35,68 ± 0,67	NZ	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	37,54 <sup>a</sup> ± 1,50	49,03 <sup>b</sup> ± 1,37	36,65 <sup>a</sup> ± 1,68	**	**	NZ
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	63,25 ± 2,13	60,90 ± 1,94	61,33 ± 2,38	NZ	**	NZ
Čvrstoća 2 (N)	29,54 <sup>a</sup> ± 1,21	38,66 <sup>b</sup> ± 1,10	27,02 <sup>a</sup> ± 1,36	**	**	NZ
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,63 ± 0,09	-5,55 ± 0,08	-5,73 ± 0,10	NZ	NZ	NZ
Kohezivnost	0,131 ± 0,009	0,147 ± 0,008	0,140 ± 0,010	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,44 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, KU = koncentracija uree, TZ = trajanje zrenja, KU x TZ = interakcija između koncentracije uree i trajanja zrenja.

Povećanjem koncentracije uree u ovčjem mlijeku je došlo do značajne promjene (P<0,01) čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije te lomljivosti bračkog sira (tablica 22). Iz prikazanih rezultata istraživanja je također vidljivo da koncentracija uree u ovčjem mlijeku nije značajno utjecala na promjene ostalih pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira (tablica 22).



#### 4.4.1.5. Broj somatskih stanica

Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira prikazan je u tablici 23.

Tablica 23. Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na kemijsko-fizikalni sastav bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	BSS u ovčjem mlijeku (x 1.000)/ml			Razina značajnosti		
	< 150	151 - 500	501 - 850	BSS	TZ	BSS x TZ
Suha tvar (g/100 g)	62,78 ± 0,5	62,89 ± 0,42	64,56 ± 0,64	NZ	**	NZ
Voda (g/100 g)	37,20 ± 0,5	37,11 ± 0,42	35,44 ± 0,64	NZ	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	31,90 <sup>a</sup> ± 0,50	31,95 <sup>a</sup> ± 0,42	34,03 <sup>b</sup> ± 0,64	*	**	NZ
Udio MM u ST (%)	50,78 ± 0,57	50,73 ± 0,48	52,65 ± 0,74	NZ	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	24,11 <sup>a</sup> ± 0,25	25,34 <sup>b</sup> ± 0,21	25,73 <sup>b</sup> ± 0,33	**	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	38,39 <sup>a</sup> ± 0,38	40,35 <sup>b</sup> ± 0,32	39,94 <sup>b</sup> ± 0,49	**	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	54,54 ± 0,52	54,36 ± 0,44	53,56 ± 0,67	NZ	**	NZ
Sol (%)	1,69 ± 0,06	1,66 ± 0,05	1,63 ± 0,07	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,14 <sup>a</sup> ± 0,03	5,03 <sup>b</sup> ± 0,02	5,05 <sup>b</sup> ± 0,03	**	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, BSS = broj somatskih stanica, TZ = trajanje zrenja, BSS x TZ = interakcija između broja somatskih stanica i trajanja zrenja.

Iako je s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno (P<0,05) povećan udio mliječne masti, njen udio u suhoj tvari bračkog sira se nije značajnije mijenjao (tablica 23). Povećani broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,01) utjecao na povećanje udjela proteina u siru ali je značajno (P<0,01) utjecao i na njihov udio u suhoj tvari bračkog sira. Provedenim istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj (P<0,01) broja somatskih stanica na pH vrijednost bračkog sira. Broj somatskih

stanica nije imao značajan utjecaj na udio soli, suhe tvari te vode u nemasnoj tvari bračkog sira (tablica 23).

Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 24.

Tablica 24. Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na proteolitičke promjene bračkog sira (n = 60)

Pokazatelj	BSS u ovčjem mlijeku (x 1.000)/ml			Razina značajnosti		
	< 150	151 - 500	501 - 850	BSS	TZ	BSS x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	19,04 <sup>a</sup> ± 1,26	22,88 <sup>b</sup> ± 1,06	22,99 <sup>ab</sup> ± 1,62	*	**	NZ
$\alpha_{s1-l}$ - kazein (%)	12,32 ± 0,71	10,19 ± 0,60	10,81 ± 0,92	NZ	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	43,88 <sup>a</sup> ± 1,53	49,79 <sup>b</sup> ± 1,29	48,76 <sup>ab</sup> ± 1,97	*	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	13,92 ± 1,10	14,70 ± 0,93	17,42 ± 1,43	NZ	**	*
$I_{\gamma/\beta}$	0,35 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,38 ± 0,03	NZ	**	**
$I_{\alpha}$	0,42 <sup>a</sup> ± 0,03	0,34 <sup>b</sup> ± 0,02	0,33 <sup>b</sup> ± 0,03	*	**	NZ
WSN (% TN)	18,81 <sup>a</sup> ± 0,02	14,99 <sup>b</sup> ± 0,53	17,08 <sup>a</sup> ± 0,81	**	**	NZ
TCA-SN (% TN)	9,59 <sup>a</sup> ± 0,50	8,22 <sup>b</sup> ± 0,42	10,50 <sup>a</sup> ± 0,64	**	**	NZ
USA (g Leu/100 g ST)	1,45 <sup>a</sup> ± 0,09	1,05 <sup>b</sup> ± 0,08	2,37 <sup>c</sup> ± 0,12	**	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar,  $I_{\gamma/\beta}$  = indeks beta,  $I_{\alpha}$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroctenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, BSS = broj somatskih stanica, TZ = trajanje zrenja, BSS x TZ = interakcija između broja somatskih stanica i trajanja zrenja.

Osim na kemijski sastav, povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno (P<0,05) utjecalo na pokazatelje primarnih proteolitičkih promjena odnosno udio  $\beta$  i  $\alpha_{s1}$  – kazeina te na vrijednost  $I_{\alpha}$  s tim da nije značajno utjecalo na udio njihovih razgradnih produkata ( $\gamma$  i  $\alpha_{s1-l}$  – kazeina) niti mijenjalo vrijednosti  $I_{\gamma/\beta}$  (tablica 24). Pokazatelji sekundarnih proteolitičkih promjena u bračkom siru su se značajno mijenjali (P<0,01; P<0,05) s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku (tablica 24).

Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 25.

Tablica 25. Utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Analiza teksturnog profila	BSS u ovčjem mlijeku (x 1.000)/ml			Razina značajnosti		
	< 150	151 - 500	501 - 850	BSS	TZ	BSS x TZ
Lomljivost (N)	30,76 <sup>a</sup> ± 1,36	32,87 <sup>a</sup> ± 1,15	36,49 <sup>b</sup> ± 1,76	*	**	NZ
Deformacija u točki loma (%)	34,49 <sup>a</sup> ± 0,56	36,11 <sup>b</sup> ± 0,47	32,10 <sup>c</sup> ± 0,72	**	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	39,40 ± 1,73	41,81 ± 1,47	46,26 ± 2,24	NZ	**	NZ
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	59,54 <sup>a</sup> ± 2,16	61,97 <sup>a</sup> ± 1,83	65,14 <sup>b</sup> ± 2,79	*	*	NZ
Čvrstoća 2 (N)	29,89 <sup>a</sup> ± 1,33	30,90 <sup>a</sup> ± 1,12	40,67 <sup>b</sup> ± 1,71	**	**	NZ
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,88 <sup>a</sup> ± 0,09	-5,60 <sup>b</sup> ± 0,07	-5,25 <sup>c</sup> ± 0,11	**	NZ	NZ
Kohezivnost	0,14 ± 0,009	0,14 ± 0,007	0,13 ± 0,011	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,42 <sup>a</sup> ± 0,02	0,52 <sup>b</sup> ± 0,02	0,43 <sup>a</sup> ± 0,03	*	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, BSS = broj somatskih stanica, TZ = trajanje zrenja, BSS x TZ = interakcija između broja somatskih stanica i trajanja zrenja.

Kao posljedica povećanja broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je došlo do povećanja čvrstoće ali i do značajnog (P<0,05) povećanja vrijednosti deformacije uzorkabračkog sira u prvom ciklusu kompresije (tablica 25). Povećanje broja somatskih stanica do 500.000/ml u ovčjem mlijeku je dovelo do značajnog povećanja lomljivosti (P<0,05) ali i postignute deformacije u točki loma (P<0,01) bračkog sira. Daljnje povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je posljedica nastavka značajnog (P<0,05) povećanja lomljivosti ali je navedeni pokazatelj postignut pri značajno najmanjoj vrijednosti deformacije u točki loma (P<0,01). Iz prikazanih rezultata istraživanja je također vidljivo značajno (P<0,01) povećanje čvrstoće u drugom ciklusu kompresije. Značajano (P<0,01) najveća vrijednosti zakašnjele elastičnosti utvrđena je u bračkom siru

proizvedenom od mlijeka čiji je broj somatskih stanica bio u rasponu od 151.000 do 500.000/ml dok su gotovo podjednake vrijednosti dobivene u bračkom siru proizvedenom od mlijeka s nižim i višim brojem somatskih stanica u odnosu na navedeni raspon. Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja adhezivnosti dok se kohezivnost bračkog sira nije značajnije mijenjala (tablica 25).

#### 4.4.2. Utjecaj stadija laktacije

Utjecaj stadija laktacije na fizikalno kemijski sastav bračkog sira prikazan je u tablici 26.

Tablica 26. Utjecaj stadija laktacije na fizikalno kemijski sastav bračkog sira ( $n = 60$ )

Pokazatelj	Stadij laktacije			Razina značajnosti		
	Rani	Srednji	Kasni	SL	TZ	SL x TZ
Suha tvar (g/100 g)	62,36 <sup>a</sup> ± 0,45	63,34 <sup>ab</sup> ± 0,55	64,08 <sup>b</sup> ± 0,49	*	**	NZ
Voda (g/100 g)	37,64 <sup>a</sup> ± 0,45	36,67 <sup>ab</sup> ± 0,55	35,92 <sup>b</sup> ± 0,49	*	**	NZ
Mliječna mast (g/100 g)	30,96 <sup>a</sup> ± 0,41	32,23 <sup>a</sup> ± 0,51	34,12 <sup>b</sup> ± 0,45	**	**	NZ
Udio MM u ST (%)	49,60 <sup>a</sup> ± 0,47	50,81 <sup>a</sup> ± 0,57	53,23 <sup>b</sup> ± 0,51	**	NZ	NZ
Proteini (g/100 g)	25,15 ± 0,26	25,14 ± 0,32	24,72 ± 0,29	NZ	**	NZ
Udio proteina u ST (%)	40,38 <sup>a</sup> ± 0,38	39,76 <sup>ab</sup> ± 0,46	38,57 <sup>b</sup> ± 0,41	**	NZ	NZ
Udio vode u NT (%)	54,41 ± 0,48	53,97 ± 0,59	54,31 ± 0,53	NZ	**	NZ
Sol (%)	1,70 ± 0,05	1,55 ± 0,06	1,73 ± 0,05	NZ	**	NZ
pH - vrijednost	5,07 ± 0,03	5,11 ± 0,03	5,04 ± 0,03	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar, SL = stadij laktacije, TZ = trajanje zrenja, SL x TZ = interakcija između stadija laktacije i trajanja zrenja.

Količina mliječne masti u siru se značajno ( $P < 0,01$ ) povećavala tijekom laktacije te su brački sirevi proizvedeni od mlijeka pri kraju proizvodnog razdoblja bili znatno masniji jer su imali veći udio mliječne masti te njen veći udio u suhoj tvari u odnosu na sireve proizvedene na početku i sredini laktacije (tablica 26). Povećanjem udjela mliječne masti je značajno ( $P < 0,05$ ) povećan i udio suhe tvari u bračkom sir dok se udio soli, vode u nemasnoj tvari sira, te njegova pH vrijednost nisu značajnije mijenjale. Međutim, iako se udio proteina u siru nije značajno mijenjao udio navedenog sastojka u suhoj tvari bračkog sira se značajno ( $P < 0,01$ ) smanjivao tijekom laktacije (tablica 26).

Utjecaj stadija laktacije na proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablici 27.

Tablica 27. Utjecaj stadija laktacije na proteolitičke promjene bračkog sira ( $n = 60$ )

Pokazatelj	Stadij laktacije			Razina značajnosti		
	Rani	Srednji	Kasni	SL	TZ	SL x TZ
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	22,69 ± 1,17	20,51 ± 1,44	21,23 ± 1,29	NZ	**	NZ
$\alpha_{s1-l}$ - kazein (%)	10,64 ± 0,73	10,67 ± 0,89	11,76 ± 0,79	NZ	**	NZ
$\beta$ - kazein (%)	50,52 <sup>a</sup> ± 1,44	47,03 <sup>ab</sup> ± 1,77	44,60 <sup>b</sup> ± 1,58	*	NZ	NZ
$\gamma$ - kazein (%)	15,96 ± 1,06	15,71 ± 1,30	13,22 ± 1,16	NZ	**	NZ
$l \gamma/\beta$	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,32 ± 0,03	NZ	**	NZ
$l \alpha$	0,35 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,03	NZ	**	NZ
WSN (% TN)	16,64 ± 0,62	17,82 ± 0,76	15,82 ± 0,68	NZ	**	NZ
TCA-SN (% TN)	9,72 <sup>a</sup> ± 0,40	9,70 <sup>a</sup> ± 0,50	7,98 <sup>b</sup> ± 0,44	**	**	**
USA (g Leu/100 g ST)	1,40 ± 0,14	1,61 ± 0,17	1,37 ± 0,15	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, ST = suha tvar,  $l_{\gamma/\beta}$  = indeks beta,  $l_{\alpha}$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroacetonu topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline, SL = stadij laktacije, TZ = trajanje zrenja, SL x TZ = interakcija između stadija laktacije i trajanja zrenja.

Tijekom laktacije je došlo do značajnog smanjenja ( $P < 0,05$ ) udjela  $\beta$  kazeina dok stadij laktacije nije imao značajan utjecaj na udio ukupnih slobodnih aminokiselina,  $\alpha_{s1}$ ,

$\alpha_{s1}$ -I i  $\gamma$  kazeina te na vrijednosti  $I_{\gamma/\beta}$  i  $I_{\alpha}$  (tablica 27). Ovisno o stadiju laktacije značajno se mijenjao ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) udio u vodi topljivih frakcija dušika i udio frakcija dušika topivih u 12 %-tnoj u trikloroctenoj kiselini u odnosu na ukupni dušik (tablica 27).

Utjecaj stadija laktacije na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira prikazan je u tablici 28.

Tablica 28. Utjecaj stadija laktacije na pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (n = 60)

Analiza teksturnog profila	Stadij laktacije			Razina značajnosti		
	Rani	Srednji	Kasni	SL	TZ	SL x TZ
Lomljivost (N)	29,87 <sup>a</sup> ± 1,14	31,36 <sup>a</sup> ± 1,40	37,73 <sup>b</sup> ± 1,25	**	**	NZ
Deformacija u točki loma (%)	35,27 ± 0,53	35,46 ± 0,65	33,61 ± 0,58	NZ	**	NZ
Čvrstoća 1 (N)	38,09 <sup>a</sup> ± 1,46	40,20 <sup>a</sup> ± 1,78	47,83 <sup>b</sup> ± 1,60	**	**	NZ
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	63,13 ± 1,94	64,31 ± 2,37	58,19 ± 2,12	NZ	*	NZ
Čvrstoća 2 (N)	29,65 <sup>a</sup> ± 1,24	31,73 <sup>a</sup> ± 1,52	36,59 <sup>b</sup> ± 1,36	**	**	NZ
Adhezivnost – log <sub>10</sub> (J)	-5,50 ± 0,08	-5,70 ± 0,10	-5,71 ± 0,09	NZ	NZ	NZ
Kohezivnost	0,140 ± 0,008	0,131 ± 0,010	0,147 ± 0,009	NZ	**	NZ
Zakašnjela elastičnost	0,45 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,47 ± 0,02	NZ	**	NZ

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njutn, J = džul, SL = stadij laktacije, TZ = trajanje zrenja, SL x TZ = interakcija između stadija laktacije i trajanja zrenja.

Iz tablice 28 je vidljivo da su brački sirevi proizvedeni od ovčjeg mlijeka kasnog stadija laktacije bili značajno ( $P < 0,01$ ) tvrdi te su imali veću vrijednost lomljivosti u odnosu na one proizvedene od ovčjeg mlijeka na početku i sredini laktacije. Stadij laktacije nije imao značajnog utjecaja na vrijednosti preostalih pokazatelja analize teksturnog profila (tablica 28).

#### 4.4.3. Utjecaj trajanja zrenja sira

Utjecaj trajanja zrenja na promjene fizikalno kemijskog sastava, teksturne i proteolitičke promjene bračkog sira prikazan je u tablicama 29, 30 i 31.

Tijekom zrenja bračkog sira je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) linearnog povećanja udjela mliječne masti, proteina, suhe tvari i soli dok je udio proteina i mliječne masti u suhoj tvari sira ostao gotovo nepromjenjen (tablica 29). Nasuprot navedenom, zrenjem je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) linearnog smanjenja udjela vode te njenog udjela u nemasnoj tvari bračkog sira. Promjena pH vrijednosti sira tijekom zrenja se također značajno ( $P < 0,01$ ) mijenjala, ali nije bila linearnog karaktera (tablica 29). Zrenje je imalo značajan utjecaj ( $P < 0,01$ ) na linearno smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$  kazeina dok je smanjenje udjela  $\beta$  kazeina također bilo značajano ( $P < 0,05$ ), ali nije imalo izražen linearan karakter (tablica 30). Međutim, zrenjem je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) linearnog povećanja svih ostalih pokazatelja proteolitičkih promjena (tablica 30). Zrenje je značajno utjecalo ( $P < 0,01$ ) na linearno povećanje lomljivosti te čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira (tablica 31). Usporedo s povećanjem lomljivosti, došlo je do značajnog ( $P < 0,01$ ) linearnog smanjenja postotka deformacije u točki loma bračkog sira. U odnosu na predhodne pokazatelje, adhezivnost i kohezivnost se nisu značajnije mijenjali tijekom zrenja bračkog sira. Osim toga trajanje zrenja je značajno ( $P < 0,01$ ) utjecalo na promjenu zakašnjele elastičnosti i postotak deformacije pri čvrstoći u prvom ciklusu kompresije ali navedeni parametri nisu imali izražen linearan karakter (tablica 31).

Tablica 29. Promjene kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira tijekom zrenja (n = 60)

Pokazatelj	Trajanje zrenja (dani)					Razina značajnosti	Jednadžba regresije
	0	30	60	90	120		
Suha tvar (%)	57,02 <sup>a</sup> ± 0,39	61,08 <sup>b</sup> ± 0,38	64,16 <sup>c</sup> ± 0,43	66,08 <sup>d</sup> ± 0,41	67,62 <sup>e</sup> ± 0,57	**	y=2,62x+57,95, R <sup>2</sup> =0,69
Voda (%)	42,98 <sup>a</sup> ± 0,39	38,92 <sup>b</sup> ± 0,38	35,84 <sup>c</sup> ± 0,43	33,91 <sup>d</sup> ± 0,41	32,38 <sup>e</sup> ± 0,57	**	y=-2,62x+42,05, R <sup>2</sup> =0,69
Mliječna mast (%)	28,57 <sup>a</sup> ± 0,47	31,28 <sup>b</sup> ± 0,43	33,10 <sup>c</sup> ± 0,51	33,78 <sup>cd</sup> ± 0,41	35,02 <sup>d</sup> ± 0,45	**	y=1,54x+29,27, R <sup>2</sup> =0,43
Udio mliječne masti u suhoj tvari (%)	50,10 ± 0,73	51,19 ± 0,54	51,53 ± 0,54	51,08 ± 0,37	51,76 ± 0,36	NZ	-
Proteini (%)	23,00 <sup>a</sup> ± 0,24	24,30 <sup>b</sup> ± 0,22	25,23 <sup>c</sup> ± 0,27	25,62 <sup>c</sup> ± 0,25	26,87 <sup>d</sup> ± 0,24	**	y=0,91x+23,19, R <sup>2</sup> =0,48
Udio proteina u suhoj tvari (%)	40,36 ± 0,38	39,83 ± 0,38	39,34 ± 0,38	38,78 ± 0,38	39,76 ± 0,38	NZ	-
Udio vode u nemasnoj tvari (%)	60,20 <sup>a</sup> ± 0,43	56,63 <sup>b</sup> ± 0,42	53,54 <sup>c</sup> ± 0,42	51,18 <sup>d</sup> ± 0,33	49,75 <sup>e</sup> ± 0,26	**	y=-2,64x+59,53, R <sup>2</sup> =0,68
Sol (%)	0,70 <sup>a</sup> ± 0,04	1,61 <sup>b</sup> ± 0,04	1,88 <sup>c</sup> ± 0,05	2,05 <sup>d</sup> ± 0,05	2,09 <sup>d</sup> ± 0,05	**	y=0,32x+1,02, R <sup>2</sup> =0,64
pH	5,03 <sup>a</sup> ± 0,02	4,96 <sup>b</sup> ± 0,02	5,07 <sup>c</sup> ± 0,03	5,16 <sup>d</sup> ± 0,03	5,13 <sup>d</sup> ± 0,02	**	y=0,04x+4,99, R <sup>2</sup> =0,16

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c, d, e vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike



Tablica 30. Proteolitičke promjene bračkog sira tijekom zrenja (n = 60)

Sastojak sira	Trajanje zrenja (dani)					Razina značajnosti	Linearna regresija
	0	30	60	90	120		
$\alpha_{s1}$ - kazein (%)	32,72 <sup>a</sup> ± 1,32	24,54 <sup>b</sup> ± 1,21	20,01 <sup>c</sup> ± 1,33	16,20 <sup>d</sup> ± 1,03	14,64 <sup>d</sup> ± 0,94	**	y=-4,45x+30,52, R <sup>2</sup> =0,48
$\alpha_{s1-l}$ - kazein (%)	6,41 <sup>a</sup> ± 0,46	9,47 <sup>b</sup> ± 0,43	11,70 <sup>cd</sup> ± 0,53	13,07 <sup>de</sup> ± 0,79	14,47 <sup>e</sup> ± 0,96	**	y=1,97x+7,08, R <sup>2</sup> =0,37
$\beta$ - kazein (%)	50,24 <sup>a</sup> ± 1,03	49,32 <sup>ab</sup> ± 1,34	48,36 <sup>ab</sup> ± 1,55	46,44 <sup>bc</sup> ± 1,48	44,04 <sup>cd</sup> ± 1,60	*	y=-1,56x+50,74, R <sup>2</sup> =0,08
$\gamma$ - kazein (%)	4,30 <sup>a</sup> ± 0,34	10,60 <sup>b</sup> ± 1,37	16,55 <sup>c</sup> ± 0,89	19,77 <sup>d</sup> ± 1,15	23,67 <sup>e</sup> ± 1,30	**	y=4,79x+5,40, R <sup>2</sup> =0,57
I $\gamma/\beta$	0,09 <sup>a</sup> ± 0,01	0,23 <sup>b</sup> ± 0,03	0,36 <sup>c</sup> ± 0,02	0,45 <sup>c</sup> ± 0,02	0,57 <sup>d</sup> ± 0,03	**	y=0,12x+0,11, R <sup>2</sup> =0,61
I $\alpha$	0,17 <sup>a</sup> ± 0,01	0,27 <sup>b</sup> ± 0,02	0,39 <sup>c</sup> ± 0,02	0,47 <sup>d</sup> ± 0,03	0,51 <sup>d</sup> ± 0,03	**	y=0,09x+0,18, R <sup>2</sup> =0,51
WSN (% TN)	6,77 <sup>a</sup> ± 0,37	13,95 <sup>b</sup> ± 0,56	18,72 <sup>c</sup> ± 0,68	21,84 <sup>d</sup> ± 0,68	22,13 <sup>d</sup> ± 0,77	**	y=3,86x+8,96, R <sup>2</sup> =0,67
TCA-SN (% TN)	3,02 <sup>a</sup> ± 0,21	6,69 <sup>b</sup> ± 0,38	11,08 <sup>c</sup> ± 0,34	12,13 <sup>cd</sup> ± 0,59	12,75 <sup>d</sup> ± 0,64	**	y=2,49x+4,15, R <sup>2</sup> =0,62
USA (g Leu/100 g ST)	0,18 <sup>a</sup> ± 0,02	0,83 <sup>b</sup> ± 0,10	1,65 <sup>c</sup> ± 0,15	2,17 <sup>d</sup> ± 0,16	2,40 <sup>d</sup> ± 0,16	**	y=0,58x+0,29, R <sup>2</sup> =0,57

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c, d, e vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, I $\gamma/\beta$  = indeks beta, I $\alpha$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroacetoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA = ukupne slobodne aminokiseline

Tablica 31. Promjene pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira tijekom zrenja (n = 60)

Analiza teksturnog profila	Trajanje zrenja (dani)					Razina značajnosti	Linearna regresija
	0	30	60	90	120		
Lomljivost (N)	23,61 <sup>a</sup> ± 1,33	25,43 <sup>a</sup> ± 1,06	32,32 <sup>b</sup> ± 1,84	39,09 <sup>c</sup> ± 2,03	43,99 <sup>c</sup> ± 2,23	**	y=5,44x+22,00, R <sup>2</sup> =0,40
Deformacija u točki loma (%)	54,02 <sup>a</sup> ± 0,89	36,69 <sup>b</sup> ± 0,80	30,93 <sup>c</sup> ± 0,75	27,35 <sup>d</sup> ± 0,55	24,86 <sup>e</sup> ± 0,77	**	y=-6,77x+48,30, R <sup>2</sup> =0,73
Čvrstoća 1 (N)	30,49 <sup>a</sup> ± 1,69	32,83 <sup>a</sup> ± 1,39	40,89 <sup>b</sup> ± 2,33	49,40 <sup>c</sup> ± 2,55	55,87 <sup>d</sup> ± 2,84	**	y=6,73x+28,43, R <sup>2</sup> =0,38
Deformacija pri čvrstoći 1 (%)	53,11 <sup>a</sup> ± 1,85	64,50 <sup>b</sup> ± 2,64	61,82 <sup>b</sup> ± 3,40	66,78 <sup>b</sup> ± 2,26	62,78 <sup>b</sup> ± 3,44	**	y=2,16x+57,47, R <sup>2</sup> =0,04
Čvrstoća 2 (N)	16,64 <sup>a</sup> ± 1,04	26,67 <sup>b</sup> ± 1,29	33,30 <sup>c</sup> ± 1,71	41,21 <sup>d</sup> ± 2,38	44,76 <sup>d</sup> ± 2,44	**	y=7,08x+18,36, R <sup>2</sup> =0,50
Adhezivnost - log <sub>10</sub> (J)	-5,79 ± 0,09	-5,58 ± 0,05	-5,84 ± 0,16	-5,46 ± 0,14	-5,45 ± 0,12	NZ	-
Kohezivnost	0,23 <sup>a</sup> ± 0,010	0,13 <sup>b</sup> ± 0,012	0,12 <sup>bd</sup> ± 0,012	0,10 <sup>cd</sup> ± 0,007	0,12 <sup>bd</sup> ± 0,013	**	y=-0,03x+0,19, R <sup>2</sup> =0,24
Zakašnjela elastičnost	0,59 <sup>a</sup> ± 0,03	0,42 <sup>b</sup> ± 0,06	0,45 <sup>b</sup> ± 0,06	0,45 <sup>b</sup> ± 0,08	0,44 <sup>b</sup> ± 0,08	**	y=-0,027x+0,53, R <sup>2</sup> =0,042

Rezultati su izraženi kao prosjek sume najmanjih kvadrata ± standardna greška razlike; a, b, c, d, e vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, \*\* (P<0,01), NZ = nema značajne razlike, čvrstoća 1 = čvrstoća u prvom ciklusu kompresije, čvrstoća 2 = čvrstoća u drugom ciklusu kompresije, N = njušn, J = džul.

## 4.5. Koeficijenti korelacija

Koeficijenti korelacije između sastojaka mlijeka i stadija laktacije prikazani su u tablici 32. Udio mliječne masti, suhe tvari i ionskog kalcija u ovčjem mlijeku je bio u značajnoj ( $P < 0,01$ ) pozitivnoj korelaciji sa stadijem laktacije. Stadij laktacije je imao značajan ( $P < 0,05$ ) pozitivan korelacijski koeficijent s udjelom suhe tvari bez mliječne masti te kazeina. Pored toga, stadij laktacije je imao značajno ( $P < 0,01$ ) negativnu korelaciju s udjelom laktoze u ovčjem mlijeku. Provedenim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija udjela mliječne masti s udjelom suhe tvari i kazeina u ovčjem mlijeku dok je udio laktoze bio u značajno ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s udjelom suhe tvari, mliječne masti i kazeina. Udjel laktoze je imao značajan ( $P < 0,05$ ) negativan korelacijski koeficijent s ukupnim brojem mikroorganizama. Utvrđena je značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija udjela kazeina s udjelom suhe tvari i suhe tvari bez mliječne masti. Predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija ukupnog broja mikroorganizama s brojem somatskih stanica. Ukupan broj mikroorganizama je imao značajno ( $P < 0,05$ ) negativan korelacijski koeficijent s udjelom suhe tvari bez mliječne masti. Broj somatskih stanica je imao značajno ( $P < 0,05$ ) negativan koeficijent korelacije sa suhom tvari bez mliječne masti dok je korelacija broja somatskih stanica s pH vrijednošću ovčjeg mlijeka bila značajno ( $P < 0,01$ ) pozitivna i visoka. U konačnici je i utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija udjela ukupnog kalcija s udjelom suhe tvari bez mliječne masti.

Korelacije sastojaka mlijeka s tvrdoćom i sposobnosti sinereze sirnog gruša prikazane su u tablici 33. Istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija sposobnosti sinereze sirnog gruša s laktozom te omjerom kazeina i mliječne masti. Osim toga, utvrđen je značajan ( $P < 0,05$ ) pozitivan koeficijent korelacije između sposobnost sinereze sirnog gruša i udjela ionskog kalcija.

Međutim, provedenim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija sposobnosti sinereze sirnog gruša s udjelom suhe tvari te mliječne masti. Utvrđen je značajno ( $P < 0,05$ ) negativan koeficijent korelacije između sposobnost sinereze sirnog gruša i kazeina. Tijekom istraživanja nije utvrđena statistički značajna korelacija sastojaka mlijeka s tvrdoćom sirnog gruša osim s kazeinskim brojem ( $P < 0,05$ ).

Koeficijenti korelacije između sastava mlijeka i sastava sira prikazani su u tablici 34. Udio mliječne masti u ovčjem mlijeku je bio u značajnoj ( $P < 0,01$ ) pozitivnoj korelaciji s udjelom mliječne masti te njenim udjelom u suhoj tvari bračkog sira. Utvrđen je značajan ( $P < 0,05$ ) pozitivan koeficijent korelacije između udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku i udjela suhe tvari bračkog sira.

Udio suhe tvari u mlijeku je imao značajnu ( $P < 0,01$ ) pozitivnu korelaciju s udjelom mliječne masti te njenim udjelom u suhoj tvari bračkog sira. Udio suhe tvari u ovčjem mlijeku je imao značajan ( $P < 0,05$ ) pozitivan koeficijent korelacije s udjelom suhe tvari bračkog sira. Utvrđena je i značajno ( $P < 0,05$ ) negativna korelacija između pH vrijednosti bračkog sira i udjela kazeina u ovčjem mlijeku. Pored toga ovim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,05$ ) pozitivna korelacija udjela proteina u suhoj tvari bračkog sira s kazeinskim brojem i koncentracijom uree u ovčjem mlijeku. Kiselost ovčjeg mlijeka je imala značajan ( $P < 0,05$ ) negativan korelacijski koeficijent s udjelom proteina u suhoj tvari bračkog sira. Povrh toga, utvrđena je značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku s udjelom proteina u suhoj tvari bračkog sira. Udio ionskog kalcija u ovčjem mlijeku je bio u značajnoj ( $P < 0,05$ ) pozitivnoj korelaciji s udjelom mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira.

Koeficijenti korelacije između pojedinih sastojaka bračkog sira tijekom zrenja prikazani su u tablici 35. Udio mliječne masti i proteina u siru je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji ( $P < 0,01$ ) s udjelom suhe tvari i soli u siru. Povrh toga, udio mliječne masti i proteina u bračkom siru je bio u značajno ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s udjelom vode i njenom udjelu u nemasnoj tvari bračkog sira. Provedenim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između udjela mliječne masti i njenog udjela u suhoj tvari bračkog sira odnosno njena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija s udjelom proteina u suhoj tvari sira. Nadalje, utvrđena je i značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između udjela proteina s njenim udjelom u suhoj tvari bračkog sira. Udio soli te mliječne masti u suhoj tvari sira je u značajnoj ( $P < 0,01$ ) pozitivnoj korelaciji sa udjelom suhe tvari dok je udio proteina u suhoj tvari te vode u nemasnoj tvari imao značajno ( $P < 0,01$ ) negativan korelacijski koeficijent sa udjelom suhe tvari sira. Također je utvrđeno da se s povećanjem udjela mliječne masti značajno ( $P < 0,05$ ) smanjuje udio proteina u suhoj tvari sira i obrnuto. Međutim, između udjela vode u nemasnoj tvari i udjela soli u siru je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija. Udio mliječne masti i suhe tvari u siru su bili u značajno ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) pozitivnoj korelaciji s njegovom pH vrijednošću dok je kiselost sira bila u značajno ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s udjelom proteina u suhoj tvari i udjelom vode u nemasnoj tvari sira (tablica 35).

Koeficijenti korelacije između pokazatelja primarnih odnosno sekundarnih proteolitičkih promjena i pokazatelja teksturnog profila bračkog sira prikazani su u tablici 36. Lomljivost te čvrstoća u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira je bila u značajno ( $P < 0,01$ ) pozitivnoj korelaciji s udjelom svih razgradnih proteolitičkih produkata i pripadajućih indeksa zrenja odnosno u značajno ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) negativnoj korelaciji s udjelom  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina. Udio razgradnih produkata sekundarne proteolize je bio u značajno ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s kohezivnošću i vrijednosti deformacije u točki

loma ali i u značajno ( $P < 0,01$ ) pozitivnoj korelaciji s zakašnjelom elastičnošću, vrijednosti deformacije pri postignutoj vrijednosti čvrstoće u prvom ciklusu kompresije. Udio svih razgradnih produkata primarne proteolize i pripadajućih indeksa zrenja je bio u značajno ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s vrijednosti deformacije u točki loma dok je navedeni pokazatelj analize teksturnog profila bio u značajnoj ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) pozitivnoj korelaciji s udjelom  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina. Provedenim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između indeksa zrenja i kohezivnosti. Utvrđena je i značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između indeksa zrenja i zakašnjele elastičnosti bračkog sira.

Tablica 32. Koeficijenti korelacija između stadija laktacije i pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka (n = 25)

	Mliječna mast	Laktoza	Suha tvar	STBM	Ukupni Ca	Ca <sup>2+</sup>	Kazein	pH	UBM	Urea	BSS
<b>Stadij laktacije</b>	0,54 **	-0,51 **	0,66 **	0,44 *	0,22	0,50 **	0,45 *	0,11	0,11	-0,12	0,03
<b>BSS</b>	0,14	-0,27	-0,02	-0,44 *	-0,39	0,01	0,09	0,62 **	0,58 **	-0,23	
<b>Urea</b>	0,04	0,21	0,12	0,36	0,29	-0,02	0,35	-0,37	-0,28		
<b>UBM</b>	0,32	-0,43 *	0,14	-0,43 *	-0,54 **	0,08	0,00	0,26			
<b>pH</b>	-0,06	-0,14	-0,17	-0,37	-0,38	0,06	-0,05				
<b>Kazein</b>	0,66 **	-0,54 **	0,81 **	0,65 **	0,38	0,28					
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,03	0,03	0,17	0,36	0,12						
<b>Ukupni Ca</b>	0,11	0,05	0,29	0,61 **							
<b>STBM</b>	0,17	-0,07	0,51 **								
<b>Suha tvar</b>	0,93 **	-0,81 **									
<b>Laktoza</b>	-0,88 **										

\* P<0,05; \*\* P<0,01, UBM=ukupan broj mikroorganizama, BSS = broj somatskih stanica, Ca<sup>2+</sup> = ionski kalcij, STBM = suha tvar bez masti,

Tablica 33. Koeficijenti korelacija između pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka, tvrdoće i sposobnosti sinereze sirnog gruša (n = 25)

<b>Pokazatelj</b>	<b>Tvrdoća gruša</b>	<b>Sposobnost sinereze</b>
<b>Suha tvar</b>	-0,05	-0,41 **
<b>Voda</b>	0,05	0,41 **
<b>Mliječna mast</b>	-0,04	-0,55 **
<b>Proteini</b>	-0,07	-0,20
<b>Kazein</b>	0,11	-0,29 *
<b>Kazeinski broj</b>	0,29 *	-0,18
<b>Omjer kazeina i mliječne masti</b>	0,16	0,49 **
<b>Laktoza</b>	0,20	0,54 **
<b>Suha tvar bez masti</b>	0,02	0,13
<b>Urea</b>	0,27	-0,06
<b>Ukupni kalcij</b>	0,10	0,16
<b>Ionski kalcij</b>	0,11	0,29 *
<b>Broj somatskih stanica</b>	0,02	-0,14
<b>pH</b>	-0,16	-0,16
<b>Tvrdoća gruša</b>		-0,25

\* P<0,05; \*\* P<0,01.

Tablica 34. Koeficijenti korelacija između pokazatelja kakvoće ovčjeg mlijeka i kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira (n = 60)

		Kemijsko-fizikalni sastav sira								
		Suha tvar	Voda	Mliječna mast	Udjel MM u ST	Proteini	Udjel proteina u ST	Udjel vode u NT	pH	Sol
Kakvoća mlijeka	Mliječna mast	0,29 *	-0,29 *	0,52 **	0,60 **	0,05	-0,31 **	-0,12	-0,08	0,02
	Laktoza	-0,26 *	0,26 *	-0,51 **	-0,61 **	0,02	0,37 **	0,09	0,06	0,00
	Suha tvar	0,24 *	-0,24 *	0,46 **	0,56 **	0,06	-0,24 *	-0,09	-0,20	0,06
	STBM	-0,03	0,03	0,03	0,09	0,02	0,07	0,05	-0,39 **	0,14
	Ukupni Ca	-0,12	0,12	-0,09	0,00	-0,17	-0,09	0,12	-0,28 **	0,06
	Ca <sup>2+</sup>	-0,03	0,03	0,13	0,27 *	-0,02	0,01	0,11	-0,21	-0,01
	Kazein	0,21	-0,21	0,37 **	0,42 **	0,20	0,01	-0,10	-0,28 *	0,05
	OKMM	-0,27 *	0,27 *	-0,48 **	-0,55 **	0,10	0,52 **	0,11	-0,17	0,00
	Kazeinski broj	0,18	-0,18	0,21	0,16	0,36 **	0,29 *	-0,14	-0,07	-0,06
	pH	0,19	-0,19	0,33 **	0,35 **	0,02	-0,23 *	-0,09	-0,04	-0,06
	BSS	0,18	-0,18	0,30 **	0,31 **	0,25 *	0,12	-0,10	-0,08	-0,06
	Urea	-0,10	0,10	-0,15	-0,15	0,06	0,25 **	0,06	0,01	-0,04

\* P<0,05; \*\* P<0,01, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, STBM = suha tvar bez masti, Ca<sup>2+</sup> = ionski kalcij, NT = nemasna tvar, BSS = broj somatskih stanica, OKMM = omjer kazeina i mliječne masti,



Tablica 35. Koeficijenti korelacija između kemijsko-fizikalnog sastava bračkog sira (n = 60)

	Mliječna mast	Proteini	Suha tvar	Voda	Udjel MM u ST	Udjel proteina u ST	Udjel vode u NT	pH
<b>Proteini</b>	0,57 **							
<b>Suha tvar</b>	0,86 **	0,75 **						
<b>Voda</b>	-0,86 **	-0,75 **	-1,00 **					
<b>Udjel mm u ST</b>	0,75 **	0,10	0,31 **	-0,31 **				
<b>Udjel proteina u ST</b>	-0,36 **	0,41 **	-0,30 **	0,30 **	-0,28 *			
<b>Udjel vode u NT</b>	-0,67 **	-0,76 **	-0,95 **	0,95 **	-0,02	0,22		
<b>pH</b>	0,27 *	0,07	0,34 **	-0,34 **	0,07	-0,34 **	-0,33 **	
<b>Sol</b>	0,62 **	0,69 **	0,78 **	-0,78 **	0,16	-0,10	-0,77 **	0,07

\* P<0,05; \*\* P<0,01, MM = mliječna mast, ST = suha tvar, NT = nemasna tvar

Tablica 36. Koeficijenti korelacija između pokazatelja primarnih odnosno sekundarnih proteolitičkih promjena i pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira tijekom zrenja (n = 60)

	Lomljivost	% deformacija u točki loma	Čvrstoća 1	% deformacija pri čvrstoći 1	Čvrstoća 2	Adhezivnost	Kohezivnost	Zakašnjela elastičnost
$\alpha_{s1}$ - kazein	-0,33 **	0,68 **	-0,32 **	-0,14 **	-0,41 **	0,29 **	0,42 **	0,59 **
$\alpha_{s1}$ -I - kazein	0,22 **	-0,56 **	0,21 **	0,09	0,30 **	-0,01	-0,32 **	0,46 **
$\beta$ - kazein	-0,22 **	0,19 *	-0,23 **	0,05	-0,20 *	-0,18 *	0,07	-0,15
$\gamma$ - kazein	0,36 **	-0,71 **	0,35 **	0,19 *	0,44 **	-0,30 **	-0,40 **	0,67 **
I $\gamma/\beta$	0,39 **	-0,70 **	0,39 **	0,15	0,46 **	-0,16 *	-0,38 **	0,56 **
I $\alpha$	0,28 **	-0,64 **	0,27 **	0,14	0,35 **	-0,14	-0,41 **	0,66 **
WSN (% TN)	0,36 **	-0,81 **	0,35 **	0,26 **	0,52 **	-0,17 **	-0,56 **	0,70 **
TCA-SN (% TN)	0,37 **	-0,78 **	0,36 **	0,26 **	0,52 **	-0,35 **	-0,53 **	0,72 **
USA	0,46 **	-0,73 **	0,45 **	0,22 **	0,63 **	-0,31 **	-0,44 **	0,70 **

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ,  $I_{\gamma/\beta}$  = indeks beta,  $I_{\alpha}$  = indeks alfa, WSN (%TN) = postotak u vodi topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, TCA-SN (%TN) = postotak u trikloroacenoj kiselini topljivih frakcija dušika u odnosu na ukupni dušik, USA-ukupne slobodne aminokiseline.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Sastav i kakvoća sirovog ovčjeg mlijeka

Sastav i kakvoća sira prije svega zavisi o sastavu i kakvoći mlijeka za sirenje. Količina i sastav ovčjeg mlijeka zavise o genotipu (pasmini) te o nizu negenetskih (fizioloških i okolišnih) čimbenika (Mioč i sur., 2004). Navedeni čimbenici mijenjaju ukupnost i međusobni omjer sastojaka mlijeka odnosno njegove fizikalne značajke te posljedično tome i njegove preradbene odlike (Amenu i Deeth, 2007). Pod kakvoćom ovčjeg mlijeka Bencini i Pulina (1997) osim njegove preradbene sposobnosti odnosno učinkovitosti prijelaza sastojaka mlijeka u sir podrazumjevaju i učinkovitost postizanja poželjnog okusa, mirisa i teksture nakon njegovog zrenja.

Temeljem rezultata prikazanih u tablici 5. je vidljivo da sastav i kakvoća sirovog ovčjeg mlijeka udovoljavaju odredbama Pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka i Pravilnika o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji. Provedenim istraživanjem je utvrđeno da je prosječan udio mliječne masti i proteina u mlijeku bračke ovce iznosio 7,51 odnosno 5,73 %. Prema podacima kontrola mliječnosti na otoku Braču, prosječan udio mliječne masti i proteina se razlikovao u odnosu na navedene vrijednosti dobivene tijekom istraživanja i iznosio je 7,32 % odnosno 6,03 % (Hrvatska poljoprivredna agencija, 2002 i 2003). Tijekom provedenih kontrola mliječnosti na otoku Braču utvrđen je samo udio mliječne masti i proteina.

Stoga su ovim istraživanjem utvrđeni ostali kemijski sastojci i fizikalna svojstva sirovog ovčjeg mlijeka te pokazatelji njegove higijenske ispravnosti. Istraživanjem je utvrđena visoka higijenska kakvoća sirovog ovčjeg mlijeka jer je najveća vrijednost ukupnog broja aerobnih mezofilnih mikroorganizama bila gotovo dva puta manja od broja propisanog Pravilnikom o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (tablica 5). U odnosu na zakonski propisanu najveću vrijednost ukupnog broja aerobnih mezofilnih mikroorganizama u ovčjem mlijeku gornja granična vrijednost broja somatskih stanica zbog specifičnosti njegove sekrecije još uvijek nije zakonski propisana. Ovim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija ( $r = 0,58$ ) između broja somatskih stanica i ukupnog broja mikroorganizama u ovčjem mlijeku (tablica 32). Sličan koeficijent korelacije ( $r = 0,57$ ) navode i Rodríguez-Nogales i sur. (2007). U prilog navedenoj tvrdnji Sevi i sur. (1999) i Albenzio i sur. (2011) su utvrdili znatno povećanje ukupnog broja mikroorganizama u ovčjem mlijeku čiji je broj somatskih stanica bio iznad 1.000.000/ml. Pored toga, navedeni autori naglašavaju promjene sastava mlijeka s povećanim brojem somatskih stanica. Stoga se može zaključiti da je broj somatskih

stanica pored zdravstvenog stanja vimena dobar pokazatelj njegove higijenske kvalitete i prikladnosti za preradu u sir (Rodríguez-Nogales i sur., 2007). Međutim, kada se govori o broju somatskih stanica u ovčjem mlijeku važno je naglasiti i da na broj somatskih stanica utječe više neinfektivnih čimbenika kao što su pasmina, redosljed i stadij laktacije, broj janjadi, način mužnje i hranidba (Sevi i sur., 1999). Uvidom u literaturne podatke je vidljivo da se prema većini istraživanja taj granični broj kreće od 250.000 do 1.500.000 somatskih stanica/ml (Pengov, 2001; Souza i sur., 2012). Također se može zaključiti da je veliki broj istraživanja proveden usporedbom mlijeka čiji je krajnji broj somatskih stanica bio ili premali da bi se mogla utvrditi infekcija i postojanje mastitisa ili preveliki pri kojem je infekcija bila značajna s izraženijom pojavom mastitisa (Sevi i sur., 2009).

Broj somatskih stanica u predmetnom ovčjem mlijeku je u prosjeku iznosio 272.000/ml i kretao se u rasponu od 33.000 do 830.000/ml. Stoga je ovčje mlijeko prema broju somatskih stanica bilo podijeljeno u tri skupine: mlijeko s brojem somatskih stanica manjim od 150.000/ml, mlijeko čiji je broj somatskih stanica bio u rasponu od 151.000 do 500.000 te mlijeko čiji je broj somatskih stanica bio u rasponu od 501.000 do 850.000/ml. Provedenim istraživanjem je utvrđeno da povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku do 850.000/ml nije značajno utjecalo na većinu sastojaka mlijeka i njegovih fizikalnih svojstava ali je navedeno povećanje broja somatskih stanica značajno utjecalo na pH vrijednost i kazeinski broj ( $P < 0,01$ ) odnosno na suhe tvari bez masti, udio kazeina i ukupnog kalcija ( $P < 0,05$ ). Naknadnim ili post hoc testom je utvrđeno da je s povećanjem broja somatskih stanica iznad 501.000/ml došlo do značajnog smanjenja ( $P < 0,05$ ) udjela ukupnog kalcija i suhe tvari bez masti u ovčjem mlijeku odnosno značajnog ( $P < 0,01$ ) povećanja njegove pH vrijednosti. U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Novotná i sur. (2007) su utvrdili značajno smanjenje udjela suhe tvari bez mliječne masti u ovčjem mlijeku čiji je broj somatskih stanica bio u manjem rasponu u odnosu na njihov broj u predmetnom mlijeku. Međutim, Pellegrini i sur. (1997), Summer i sur. (2012) i Caballero Villalobos i sur. (2015) su također sukladno ovom istraživanju utvrdili značajno smanjenje udjela ukupnog kalcija odnosno značajno povećanje pH vrijednosti u ovčjem mlijeku koje je sadržavalo do 1.000.000 somatskih stanica/ml. Međutim, u suprotnosti s dobivenim rezultatima istraživanja Pirisi i sur. (2000) i Bianchi i sur. (2004a) nisu utvrdili značajne promjene u udjelu ukupnog kalcija, a niti promjene pH vrijednosti ovčjeg mlijeka koje je sadržavalo do 1.000.000 somatskih stanica/ml. Značajno ( $P < 0,05$ ) najmanji udio kazeina je utvrđen u mlijeku čiji je broj somatskih stanica bio manji od 150.000/ml dok je značajno najveći udio navedenog sastojka utvrđen u mlijeku s brojem somatskih stanica u rasponu od 151.000 do 500.000/ml. Povećanjem broja somatskih stanica iznad 501.000/ml je došlo do smanjenja udjela kazeina. Međutim, smanjenje udjela kazeina u ovčjem mlijeku s brojem somatskih stanica iznad 501.000/ml se nije značajno razlikovalo u odnosu na

njegovu najveću (4,72 g/100 g) i najmanju (4,45 g/100 g) vrijednost u mlijeku (tablica 6). Smanjenje udjela kazeina iznad 501.000 somatskih stanica/ml je posljedica proteolitičke prije svega plazminske aktivnosti u istraživanom mlijeku jer na količinu i aktivnost plazmina u mlijeku pored niza čimbenika najveći utjecaj ima povišeni broj somatskih stanica (Kalit i sur., 2002). Somatske stanice u ovčjem mlijeku se mogu svrstati u tri tipa stanica: epitelne stanice, krvne stanice (makrofagi, polimorfonuklearni leukociti i limfociti) i citoplazmatske čestice (Havranek i sur., 2014). U ovčjem mlijeku koje potječe iz zdravog vimena dominiraju makrofagi (Paape i sur., 2001; Bonelli i sur., 2013) čiji proteolitički enzimi mogu pridonijeti razgradnji kazeina i o ovčjem mlijeku čiji je broj somatskih stanica manji od 600.000/ml (Caroprese i sur., 2007). Povećanje broja somatskih stanica predstavlja imunološki odgovor mliječne žlijezde na ulazak patogena u organizam te usljed toga dolazi do kontinuiranog povećanja broja polimorfonuklearnih leukocita, smanjenja udjela epitelnih stanica dok je udio makrofaga i limfocita ostao nepromjenjen (Dore i sur., 2011). Gotovo najveći udio plazmina u mlijeku se nalazi u obliku inaktivnog oblika odnosno plazminogena čiju aktivaciju u plazmin provode dva tipa aktivatora: urokinazni i tkivni (Kalit i sur., 2002). Polimorfonuklearni leukociti i makrofagi imaju sposobnost sinteze aktivatora urokinaznog tipa (uPA) čiji su katalitički aktivni oblici vezani na specifične receptore (uPAR) a dijelom su zajedno s navedenim receptorima smješteni unutar granuliranih tvorevina na površini membrane (Owen i Campbell, 1999). Autori nadalje navode da aktivacijom polimorfonuklearnih leukocita i makrofaga tijekom upalnog procesa dolazi do ubrzanog premještanja navedenih receptora i aktivatora na površinu membrane. Polimorfonuklearni leukociti i makrofagi imaju veći broj receptorskih mjesta u odnosu na broj aktivatora (Politis i sur., 2002) što dovodi do zaključka da pri jačim upalama sekretornog tkiva aktivaciju plazmina osim povećanog broja somatskih stanica usljed poremećaja u njegovoj propusnosti mogu obaviti i plazminogeni aktivatori iz krvi. Navedena pojava ide u prilog istraživanjima koje su proveli Sevi i sur. (1999) i Albenzio i sur. (2011) te utvrdili promjene u sastavu mlijeka s nižim brojem somatskih stanica od 1.000.000/ml. Međutim, opseg navedenih promjena je bio znatno veći i značajniji kada je broj somatskih stanica prelazio navedenu vrijednost. Stoga, sukladno rezultatima ovog istraživanja, Angelopoulos i Zoidou (2011) navode značajno povećanje plazminske aktivnosti u mlijeku s brojem somatskih stanica iznad 500.000/ml u odnosu na mlijeko čiji je broj somatskih stanica bio ispod navedenog broja. Nadalje, Mauriello i sur. (2007) i Albenzio i sur. (2011) navode značajne kvalitativno kvantitativne promjene kazeina kada je početni broj somatskih stanica ispod 500.000/ml. Do sličnih rezultata, kao i u provedenom istraživanju su došli i Bianchi i sur. (2004b) iako je broj somatskih stanica u odnosu na istraživano mlijeko bio veći od 1.000.000 somatskih stanica/ml. U odnosu na dobivene rezultate, Albenzio i sur. (2011) su utvrdili značajano kontinuirano smanjenje

udjela kazeina u ovčjem mlijeku koje je sadržavalo do 1.000.000 somatskih stanica/ml. Međutim, Novotná i sur. (2007) su utvrdili značajno kontinuirano smanjenje udjela kazeina u ovčjem mlijeku iako je broj somatskih stanica tijekom njihovog istraživanja bio znatno manji u odnosu na broj somatskih stanica u predmetnom mlijeku. Kontinuirano smanjenje udjela kazeina su utvrdili i Nudda i sur. (2001), ali bez statistički značajne razlike. Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) kontinuitet povećanja kazeinskog broja u ovčjem mlijeku s povećanjem broja somatskih stanica do 850.000/ml. (tablica 6). Povećanje vrijednosti kazeinskog broja su utvrdili i Nudda i sur. (2003) s tim da je navedeno povećanje utvrđeno u ovčjem mlijeku koje je u odnosu na predmetno mlijeko sadržavalo više od 1.000.000 somatskih stanica/ml. Međutim, prema istraživanjima većine autora, povećanje broja somatskih stanica smanjuje vrijednost kazeinskog broja (Pirisi i sur., 2000; Nudda i sur., 2003; Jaeggi i sur., 2003; Bianchi i sur., 2004a; Summer i sur., 2012). Tijekom laktacije nije se značajnije mijenjao udio mliječne masti, proteina i suhe tvari u analiziranom mlijeku što je u skladu s istraživanjima koje su proveli Pirisi i sur. (2000); Jaeggi i sur. (2003); Summer i sur. (2012) i Caballero Villalobos i sur. (2015). Autori nisu utvrdili promjene navedenih sastojaka iako je broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku tijekom njihovih istraživanja bio u širem rasponu u odnosu na rezultate predmetnog istraživanja. Međutim, u suprotnosti s rezultatima predhodnih istraživanja je utvrđeno da povećanjem broja somatskih stanica dolazi do značajnog smanjenja udjela mliječne masti (Bianchi i sur., 2004a; Novotná i sur., 2007) odnosno značajnog povećanja udjela proteina u ovčjem mlijeku (Nudda i sur., 2001; Rodríguez-Nogales i sur., 2007). Provedenim istraživanjem je utvrđeno da s povećanjem broja somatskih stanica dolazi do kontinuiranog smanjenja udjela laktoze u ovčjem mlijeku ali navedene razlike nisu bile statistički značajne (tablica 6). Osim toga, ovim istraživanjem je utvrđena i negativna korelacija ( $r = -0,27$ ) između laktoze i broja somatskih stanica, koja nije bila statistički značajna (tablica 32). U skladu s rezultatima ovog istraživanja, utjecaj povećanja broja somatskih stanica na smanjenje udjela laktoze u ovčjem mlijeku bez statistički značajne razlike utvrdili su i drugi autori (Sevi i sur., 1999; Revilla i sur., 2007). Međutim, većina autora je utvrdila značajan kontinuitet u smanjenju udjela laktoze povećanjem broja somatskih stanica (Pirisi i sur., 2000; Raynal-Ljutovac i sur., 2007; Albenzio i sur., 2011, Le Maréchal i sur., 2011).

Provedenim istraživanjem je utvrđeno da povećanje koncentracije uree u rasponu od 25,00 – 45,00 mg/100 ml nije utjecalo na udjele većine sastojaka sirovog ovčjeg mlijeka osim udjela kazeina i vrijednosti kazeinskog broja ( $P < 0,05$ ; tablica 7). Istraživanja utjecaja koncentracije uree na sastav kravljeg, kozjeg i pogotovo ovčjeg mlijeka do sada su provedena u vrlo malom broju istraživanja. Međutim, pri usporedbi rezultata navedenih istraživanja potrebno je obratiti pozornost na sljedeće činjenice:

- da pri jednakom udjelu proteina u obroku, ovčje u odnosu na kravlje mlijeko ima veću koncentraciju uree i to u prosjeku za 5-15 mg/100 ml (Cannas, 2002),
- da je većina laboratorijskih istraživanja provedena dodatkom značajno većih količina uree u kravlje mlijeko u odnosu na količinu uree koju mlijeko sadržava u okviru fizioloških granica u proizvodnim uvjetima te je posljedično tome vrijednost provedenih istraživanja upitna u praktičnim uvjetima proizvodnje i prerade mlijeka (Martin i sur., 1997, Cottrill, 1998).

Pored niza čimbenika, hranidba odnosno uravnoteženost obroka u proteinima i energiji u najvećoj mjeri utječe na koncentraciju uree u mlijeku (Giaccone i sur., 2007). Cannas i sur. (1998) su utvrdili da povećanjem udjela proteina u obroku dolazi do linearnog povećanja koncentracije uree u ovčjem mlijeku bez obzira je li obrok u suhoj tvari imao nisku ili visoku koncentraciju energije. Autori su utvrdili da se linearnim povećanjem koncentracije uree u rasponu od 12,90 - 26,70 mg/100 ml nije mijenjao udio mliječne masti, proteina i laktoze u ovčjem mlijeku, a niti se mijenjala njegova pH vrijednost što je u skladu s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Međutim, u odnosu na navedeno, važno je naglasiti da do promjene navedenih sastojaka tijekom predmetnog istraživanja nije došlo ni pri značajno većoj koncentracije uree u ovčjem mlijeku koja je bila u rasponu od 16,25 do 44,69 mg/100 ml (tablica 5). Do sličnih rezultata su došli Martin i sur. (1997) koji su zaključili da povećanje koncentracije uree u rasponu od 24,00 do 49,00 mg/100 ml nije značajno mijenjalo udio mliječne masti i proteina u kravljem mlijeku, a niti njegovu pH vrijednost. Iz rezultata naknadnog testa predmetnog istraživanja je vidljivo značajno ( $P < 0,05$ ) povećanje udjela kazeina i vrijednosti kazeinskog broja u ovčjem mlijeku kada se koncentracija uree povećavala u rasponu od 25,00 do 35,00 mg/100 ml. Nastavkom povećavanja koncentracije uree u rasponu od 35,01 do 45,00 mg/100 ml je dovelo do smanjenja oba navedena pokazatelja. Preporučena koncentracija uree u ovčjem mlijeku bi trebala biti od 25,00 do 40,00 mg/100 ml (Cannas, 2002) što ukazuje na činjenicu da je predmetno ovčje mlijeko u pojedinim uzorcima sadržavalo nedovoljne ili prekomjerne količine uree. U svrhu povećanja iskoristivosti proteina i onemogućavanja prekomjernog koncentracije uree u mlijeku ovaca koje borave na paši, pored paše potrebno im je omogućiti i energetski dodatak u obliku žitarica (Mikolayunas i sur., 2008). Stoga, razlog smanjenju udjela kazeina i kazeinskog broja u ovčjem mlijeku čija je koncentracija uree bila iznad 35,01 mg/100 ml treba tražiti u činjenici da povećana koncentracija uree uvjetuje oštećenja na kazeinu povećavajući njegovu topljivost odnosno dezintegraciju njegovih hidrofobnih dijelova (McMahon i Oommen, 2013; Havranek i sur., 2014) pri čemu kalcijeve fosfatne veze ostaju nepromijenjene (McGann i Fox, 1974, Wen, 2014). Za

razliku od rezultata provedenog istraživanja Martin i sur. (1997) nisu utvrdili značajnije promjene udjela kazeina odnosno vrijednosti kazeinskog broja s povećanjem koncentracije uree u kravljem mlijeku.

Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj stadija laktacije ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) na povećanje udjela mliječne masti, proteina, kazeina, suhe tvari i suhe tvari bez mliječne masti u ovčjem mlijeku (tablica 8). Slične rezultate istraživanja navode Pavić i sur. (2002), Kuchtik i sur. (2008), Albenzio i sur. (2009), Abilleira i sur. (2010) i Antunac i sur. (2011). Istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,05$ ) utjecaj stadija laktacije na povećanje udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku (tablica 8). Osim toga provedenim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija ( $r = 0,50$ ) između stadija laktacije i udjela ionskog kalcija u ovčjem mlijeku (tablica 32). Uvidom u bazu podataka nisu utvrđeni rezultati istraživanja o udjelu ionskog kalcija u ovčjem mlijeku, ali je utvrđen vrlo mali broj radova u svezi zastupljenosti navedenog sastojka u kravljem mlijeku tijekom laktacije. U skladu s rezultatima predmetnog istraživanja, Lin (2002) je također utvrdila povećanje udjela ionskog kalcija u kravljem mlijeku tijekom laktacije ali bez statistički značajne razlike. Međutim, predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je s trajanjem laktacije također došlo do povećanja i ukupnog kalcija u predmetnom mlijeku ali razlike nisu bile statistički značajne (tablica 8). Polychroniadou i Vafopoulou (1985) su utvrdili povećanje udjela ukupnog kalcija tijekom laktacije ali ono nije bilo statistički značajno što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. U odnosu na rezultate ovog istraživanja Pellegrini i sur. (1997) i Nájera i sur. (2009) su utvrdili statistički značajano povećanje udjela ukupnog kalcija tijekom laktacije. Povećanje sastojaka mlijeka se može objasniti činjenicom da tijekom laktacije dolazi do količinski značajnog smanjenja dnevne količine proizvedenog mlijeka (Bianchi i sur., 2004b; Kuchtik i sur., 2008) usljed čega, ukoliko je vime zdravo dolazi do koncentracijskog učinka na sastojke mlijeka (Albenzio i sur., 2009). U prilog navedenom Albenzio i sur. (2009) navode da u ovčjem mlijeku koje sadrži manje od 600.000 somatskih stanica/ml ne dolazi do značajnijih proteolitičkih aktivnosti odnosno promjene u udjelu kazeinskih razgradnih sastojaka bez obzira na stadij laktacije. Iz rezultata predmetnog istraživanja je vidljivo da s trajanjem laktacije dolazi do značajnog smanjenja ( $P < 0,05$ ) udjela laktoze u mlijeku (tablica 8). U skladu s provedenim istraživanjem, najveći broj autora je također utvrdio smanjenje udjela laktoze u ovčjem mlijeku tijekom laktacije (Pellegrini i sur., 1994, Pavić i sur., 2002, Sevi i sur., 2004, Caroprese i sur., 2007 i Antunović i sur., 2015). Za razliku od rezultata predmetnog istraživanja, Antunac i sur. (2011) nisu utvrdili promjenu udjela laktoze ovisno o stadiju laktacije dok Albenzio i sur. (2009) navode povećanje udjela navedenog sastojka u ovčjem mlijeku tijekom laktacije. Povećanje udjela mliječne masti u odnosu na udio kazeina u ovčjem mlijeku s trajanjem laktacije je bio veći što je posljedično smanjilo njihov



međusobni omjer ali navedeno smanjenje nije bilo statistički značajno (tablica 8). Slične rezultate smanjenja omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku tijekom laktacije navode Pellegrini i sur. (1997). U odnosu na navedeno Jaeggi i sur. (2005) su utvrdili povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku tijekom laktacije. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je tijekom laktacije također došlo do postupnog smanjenja koncentracije uree (tablica 8). Do sličnih rezultata koncentracije uree su došli Mikolayunas i sur. (2008) dok su za razliku od navedenog, Bendelja i sur. (2009) utvrdili da je koncentracija uree u mlijeku krčkih ovaca značajno manja u ranom u odnosu na srednji i kasni stadij laktacije. Autori su utvrdili značajno povećanje koncentracije uree u mlijeku krčkih ovaca do sredine laktacije da bi prema kraju došlo do postupnog smanjivanja. Do sličnih rezultata su došli i Kuchtik i sur. (2008) utvrdivši značajno i postupno povećanje koncentracije uree u razdoblju od 67 do 129 dana laktacije da bi nakon toga uslijedilo postupno smanjenje koncentracije uree prema kraju laktacije. Tijekom predmetnog istraživanja stadij laktacije nije značajno utjecao na promjene fizikalnih svojstava mlijeka (tablica 8). Iako se nije značajnije mijenjala gustoća mlijeka, Kuchtik i sur. (2008) su utvrdili značajno postupno smanjenje vrijednosti gustoće do 129 dana laktacije. Autori navode da je nakon toga uslijedilo postupno povećanje gustoće te je najveća vrijednost postignuta na kraju laktacije. U odnosu na dobivene vrijednosti točke ledišta tijekom provedenog istraživanja, Pavić i sur. (2002) su utvrdili značajno nižu točku ledišta ovčjeg mlijeka pri kraju laktacije u odnosu na njen početak i sredinu. Stadij laktacije nije utjecao na vrijednost točke ledišta iako je njena najviša vrijednost utvrđena na početku, a najniža krajem laktacije (Antunac i sur., 2007). Tijekom provedenog istraživanja se nije značajno mijenjala pH vrijednost ovčjeg mlijeka. Do sličnih spoznaja su došli Abilleira i sur. (2010). Međutim, za razliku od navedenog rezultati pojedinih istraživanja su utvrdili značajano kontinuirano smanjenje (Pellegrini i sur., 1997; Antunac i sur., 2007) odnosno povećanje pH vrijednosti ovčjeg mlijeka (Pavić i sur., 2002; Sevi i sur., 2004) tijekom laktacije. Tijekom predmetnog istraživanja nije došlo do značajne promjene broja somatskih stanica s trajanjem laktacije (tablica 8). Slične rezultate navode Jaeggi i sur. (2005), Antunac i sur. (2007) te Albenzio i sur. (2009). Međutim, Sevi i sur. (1999) naglašavaju kontinuirano povećanje broja somatskih stanica, ali tek nakon prvog mjeseca laktacije dok Králíčková i sur. (2012) navode kontinuirano smanjenje navedenog sastojka tijekom cijele laktacije. Tijekom predmetnog istraživanja stadij laktacije nije značajnije utjecao na promjene vrijednost kazeinskog broja (tablica 8). U odnosu na rezultate predmetnog istraživanja, Jaeggi i sur. (2005) su utvrdili povećanje vrijednosti kazeinskog broja. Pellegrini i sur. (1997) su utvrdili značajno najveću vrijednost kazeinskog broja u srednjem dijelu laktacije dok je njegova vrijednost na početku i na kraju laktacije bila identična. Vrijednost kazeinskog broja se nije značajnije mijenjala tijekom prva tri kvartala laktacijske

proizvodnje ovčjeg mlijeka da bi u posljednjem kvartalu došlo do značajnog smanjenja navedenog pokazatelja (Bianchi i sur., 2004b).

## **5.2. Utjecaj sastava i kakvoće mlijeka za sirenje na teksturu i sinerezu sirnog gruša**

Sastav i kakvoća mlijeka za sirenje ima primarni utjecaj na sposobnost zgrušavanja mlijeka, čvrstoću i sposobnost otpuštanja sirutke proizvedenog sirnog gruša što u konačnici utječe na učinkovitost proizvodnje i sastav sira (Ng-Kwai-Hang i sur., 1989, Pandey i sur., 2000). Iz cijelog niza čimbenika koji mijenjaju sastav i kakvoću mlijeka za sirenje, broj somatskih stanica ima najveći utjecaj na njegove preradbene značajke (Le Maréchal i sur., 2011, Malacarne i sur., 2014).

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,05$ ) utjecao na tvrdoću sirnog gruša ali nije značajnije mijenjao njegovu sposobnost otpuštanja sirutke (grafikoni 13 i 14). Naknadnim testom je utvrđeno povećanje tvrdoće sirnog gruša s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku do 500.000/ml. Nastavkom povećanja broja somatskih stanica iznad 501.000/ml je došlo do smanjenja navedenog teksturnog pokazatelja (grafikon 13). Slične rezultate u svojim radovima navode Sevi i sur. (1999), Nudda i sur. (2001) i Caballero Villalobos i sur. (2015). Povećanjem broja somatskih stanica u predmetnom mlijeku iznad 500.000/ml značajano ( $P < 0,05$ ) se smanjio udio kazeina u mlijeku za sirenje (tablica 6). U skladu s rezultatima ovog istraživanja Pirisi i sur. (2000) su utvrdili značajno povećanje udjela topljivog kazeina u ovčjem mlijeku čiji je broj somatskih stanica bio iznad 500.000/ml. Autori su utvrdili značajnu negativnu korelaciju između udjela topljivog kazeina i učinkovitosti prelaska proteina iz mlijeka u sirni gruš. U odnosu na navedeno Albenzio i sur. (2011) su utvrdili značajno kontinuirano smanjenje udjela kazeina u ovčjem mlijeku čiji je broj somatskih stanica prelazio 300.000/ml. Smanjenje u udjelu kazeina je prije svega posljedica proteolitičke aktivnosti enzima somatskih stanica koje uz značajan utjecaj na plazminsku aktivnost u sastavu vlastitih lizozoma sadrže niz proteolitičkih enzima kao što su elastaze, kolageneze i katepsini (Albenzio i sur., 2004). Slijedom navedenog, Le Roux i sur. (1995) navode korelaciju između plazminske aktivnosti i broja somatskih stanica u kravljem mlijeku u kojem je taj broj bio manji od 250.000/ml. Budući da sirni gruš u reološkom smislu predstavlja kontinuiranu elastičnu parakazeinsku mrežu u čiji je porozni dio u najvećoj količini obuhvaćena mliječna mast te ostali sastojci mlijeka uključujući i njegovu tekuću fazu (Prentice, 1994), za očekivati je da će svako smanjenje udjela kazeina u mlijeku za sirenje smanjiti tvrdoću sirnog gruša. U prilog navedenoj

tvrdnji idu i rezultati ovog istraživanja kojim je utvrđeno da se grušanjem mlijeka s manjim udjelom kazeina dobiva mekši gruša ali bez utvrđene statistički značajne razlike (grafikon 3). Slične rezultate navode Guinee i sur. (1997), Daviau i sur. (2000a) i Bornaz i sur. (2009).

Predmetnim istraživanjem je utvrđena najmanje izražena sposobnost sinereze sirnog gruša kada je u mlijeku za sirenje broj somatskih stanica prelazio 501.000/ml (grafikon 14). Prema tome, značajnim ( $P < 0,05$ ) smanjenjem udjela kazeina usljed povećanja broja somatskih stanica iznad navedenog praga u ovčjem mlijeku (tablica 6) se smanjila i sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 14) što je logično s obzirom na činjenicu da sirilom izmjenjeni kazein čini temeljni supstrat parakazeinske mreže. Međutim, značajno smanjenje sposobnosti sinereze se također dogodilo i u sirnim gruševima proizvedenim od mlijeka s većim udjelom kazeina u odnosu na one dobivene od mlijeka s nižim udjelom navedenog sastojka (grafikon 4). Stoga, rezultati ovog istraživanja ukazuju na činjenicu da udio kazeina u mlijeku za sirenje nije jedini čimbenik nastanka sirnog gruša poželjne teksture i sposobnosti otpuštanja sirutke. Fox i Cogan (1994) pored udjela kazeina navode da udio mliječne masti, kalcija te pH vrijednost mlijeka u najvećoj mjeri utječu na njegovu sposobnost grušanja te na tvrdoću i sposobnost otpuštanja sirutke proizvedenog gruša. Usljed povećanog broja somatskih stanica složenim biokemijskim procesom dolazi do aktivacije plazminogena u plazmin koji najintenzivnije razgrađuje  $\beta$  kazein (Kalit i sur., 2002). Pearse i Mackinlay (1989) tvrde da učinkovitost nastanka gruša i sposobnost otpuštanja sirutke zavise o udjelu i cjelovitosti  $\beta$  kazeina u sklopu kazeinske micela. Autori navode da uvođenjem potpuno ili djelomično defosforiliranog  $\beta$  kazeina u sklopu umjetne kazeinske micela smanjuje učinkovitost nastanka gruša te njegovu sposobnost sinereze. Snižavanjem pH vrijednosti mlijeka za sirenje dolazi do smanjenja elektrostatičkog odbijanja usljed smanjenja elektronegativnog naboja na kazeinskoj miceli (Mishra i sur., 2005) i smanjenja njene hidratiziranosti (Puđa, 2009). Osim toga smanjenje pH vrijednosti u mlijeku za sirenje povećava udio i aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$  kao posljedicu otapanja koloidnog kalcijevog fosfata, agregaciju kazeina pri manjem stupnju hidrolize  $\kappa$ -kazeina i povećanje aktivnosti sirila (van Hooydonk i sur., 1986b; Janhøj i Qvist, 2010). Van den Berg i Exterkate (1993) zaključuju da se smanjenjem pH vrijednosti mlijeka za sirenje sa 6,6 na 6,4 povećava kimozijska aktivnost za 30 %. Navedene promjene dovode do stvaranja većeg broja veza između negativno nabijenih ostataka parakazeinskih micela preko dvovalentnih iona Ca što posljedično skraćuje vrijeme grušanja mlijeka i omogućuje dobivanje gruša zadovoljavajuće čvrstoće (Lucey, 2011).

Stoga temeljem navedenih činjenica razloge smanjenja tvrdoće i sposobnosti sinereze sirnog gruša proizvedenog od mlijeka čiji je broj somatskih stanica bio iznad

501.000/ml treba tražiti prije svega u značajnom ( $P < 0,05$ ) smanjenju udjela kazeina ali i u značajnom ( $P < 0,01$ ) povećanju pH vrijednosti te značajnom ( $P < 0,05$ ) smanjenju udjela ukupnog kalcija u ovčjem mlijeku za sirenje (tablica 6). Pri razmatranju smanjene tvrdoće i sposobnosti sinereze istraživanih sirnih gruševa proizvedenih od mlijeka u kojem je broj somatskih stanica bio iznad 501.000/ml treba uzeti i smanjenu aktivnost ionskog kalcija bez obzira što smanjenje navedenog sastojka nije bilo statistički značajno (tablica 6). U prilog navedenoj činjenici idu i rezultati predmetnog istraživanja tijekom kojega je usljed smanjenog udjela ukupnog i ionskog kalcija u mlijeku za sirenje osim značajnog ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$ ) smanjenja tvrdoće sirnog gruša utvrđena i njegoa značajno ( $P < 0,01$ ) manja sposobnost sinereze (grafikoni 9, 10, 11 i 12). Nadalje, predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,05$ ) pozitivna korelacija ( $r = 0,29$ ) između udjela ionskog kalcija u mlijeku za sirenje i sposobnosti sinereze sirnog gruša (tablica 33). Udio ukupnog kalcija je također bio u korelaciji sa sposobnošću otpuštanja sirutke proizvedenog sirnog gruša ( $r = 0,16$ ) ali razlika nije bila statistički značajna (tablica 33). Međutim, udio ukupnog i ionskog kalcija u mlijeku za sirenje nije bio značajno povezan s teksturnim značajkama proizvedenog sirnog gruša (tablica 33). U skladu s rezultatima provedenog istraživanja Lin (2002) je utvrdila da povećanje udjela ionskog kalcija u kravljem mlijeku skraćuje vrijeme grušanja i povećava čvrstoću dobivenog gruša. Do sličnih rezultata je došao i Zoon i sur. (1988) utvrdivši povećanu aktivnost  $Ca^{2+}$  dodatkom od 6 mM  $CaCl_2$  u mlijeko za sirenje pri njegovoj konstantnoj pH vrijednost od 6,6. Navedeni dodatak je skratio vrijeme grušanja mlijeka i povećao elastičnost dobivenog gruša za 10 % u odnosu na gruš proizveden od mlijeka bez dodatka  $CaCl_2$ . Dodatkom  $CaCl_2$  u navedenoj količini osim povećanja udjela ionskog kalcija povećavao se i udio micelnog kalcija te nije moguće donijeti zaključak koji od ova dva oblika kalcija je značajniji čimbenik navedenih promjena (Zoon i sur. 1988). U odnosu na rezultate ovog istraživanja Remeuf i sur. (1991), Nian i sur. (2012) te Bland i sur. (2015) nisu utvrdili značajnu povezanost između udjela ionskog kalcija u mlijeku i čvrstoće gruša. Slične rezultate kao i u predmetnom istraživanju su dobili i Solorza i Bell (1998) te su utvrdili da je dodatkom  $CaCl_2$  značajno povećan udio  $Ca^{2+}$  u mlijeku što je dovelo do povećanja sposobnosti sinereze proizvedenog gruša. Auldist i sur. (2004) te Nájera i sur. (2009) su utvrdili pozitivnu korelaciju između udjela ukupnog kalcija u mlijeku za sirenje i čvrstoće dobivenog gruša što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, u odnosu na rezultate ovog istraživanja Storry i sur. (1983) te Bornaz i sur. (2009) su utvrdili da je povećani udio ukupnog kalcija u mlijeku za sirenje imao negativan učinak na sposobnost sinereze proizvedenog gruša. Smanjenje sposobnosti sinereze sirnog gruša proizvedenog od mlijeka s većim udjelom kazeina (grafikon 4) je prema istraživanjima Ong i sur. (2013) prije svega posljedica njegove mikrostrukture koju odlikuje veća zbijenost te manja poroznost i propusnost. Navedeni

autori navode da sirenjem mlijeka s većim udjelom kazeina dolazi do bližeg povezivanja većeg broja kazeinskih čestica u sirnom grušu što osim stvaranja većeg broja Ca mostova dovodi i do njihovog jačeg povezivanja, smanjenja međuprostora između parakazeinskih čestica i posljedično do nastanka čvršćeg sirnog gruša i njegove manje sposobnosti otpuštanja sirutke. Predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,05$ ) negativna korelacija između udjela kazeina u mlijeku za sirenje i sposobnosti sinereze ( $r = -0,29$ ) proizvedenog sirnog gruša (tablica 33). U skladu s rezultatima ovog istraživanja smanjenje sposobnosti sinereze u grušu proizvedenom od mlijeka s većim udjelom kazeina navode Storry i sur. (1983), Calvo i Balcones (2000), Daviau i sur. (2000a) i Bornaz i sur. (2009). U odnosu na navedene rezultate, Jaramillo i sur. (2008) su utvrdili značajnu, ali malu pozitivnu korelaciju između udjela kazeina u ovčjem mlijeku i sposobnosti sinereze gruša.

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da povećanje udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje nije značajno utjecalo na tvrdoću sirnog gruša (grafikon 1). Jaramillo i sur. (2008) su utvrdili mali, ali negativan koeficijent korelacije između navedenih pokazatelja što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja (tablica 33). Za razliku od navedenog istraživanjima je utvrđena niska (Pellegrini i sur., 1997, Auld i sur., 2004, Bland i sur., 2015) do visoka (Storry i sur., 1983) pozitivna korelacija između udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje i čvrstoće gruša. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je povećanje udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje značajno ( $P < 0,01$ ) utjecalo na smanjenje sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 2). Nadalje, utvrđena je značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija ( $r = -0,55$ ) između udjela mliječne masti i sposobnosti sinereze sirnog gruša (tablica 33). Do sličnih rezultata su došli Mateo i sur. (2009) utvrdivši da se količina otpuštene sirutke iz gruša kontinuirano smanjivala s povećanjem udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje bez obzira što se proces sinereze odvijao u različitim vremenskim razdobljima nakon rezanja gruša (15-25 odnosno 35-75 min). Kao razlog smanjenoj sposobnosti sinereze Guinee i McSweeney (2003) navode da globule mliječne masti obuhvaćene u porozni dio parakazeinske mreže gruša zbog svojih viskoznih svojstava ograničavaju gibanje proteinskih lanaca te stoga umanjuju njegovu sposobnost otpuštanja sirutke. Guinee i sur. (1997) navode da povećanje udjela mliječne masti od 0,1 do 10 % uz istovremeno održavanje udjela proteina na stalnu vrijednost od 3,3 % u mlijeku za sirenje skraćuje vrijeme njegovog grušanja te dobiveni gruš prije postiže odgovarajuću čvrstoću prije rezanja (20 Pa). Autori navode da ukoliko se povećava udio mliječne masti u odnosu na udio proteina u okviru njihovog ukupnog udjela koji se ne mijenja i iznosi 7,1 %, povećani udio mliječne masti značajno smanjuje čvrstoću gruša.

S obzirom na navedeno te na činjenicu da omjer proteina i mliječne masti osim na njihov pojedinačni udio u grušu utječe i na udio vode međusobni omjer navedenih sastojaka objektivniji je pokazatelj teksture gruša i sira (Guinee i McSweeney, 2003). Stoga je ovim istraživanjem utvrđeno da je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje došlo do povećanja tvrdoće sirnog gruša, ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (grafikon 5). Međutim, s povećanjem navedenog omjera proizvedeni sirni gruševi su imali značajno ( $P < 0,01$ ) izraženiju sposobnost sinereze (grafikon 6). Ovim istraživanjem je također utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija ( $r = 0,49$ ) između omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje i sposobnosti sinereze proizvedenog sirnog gruša (tablica 33). Također je utvrđeno da je tvrdoća sirnog gruša imala nizak koeficijent korelacije ( $r = 0,16$ ) s omjerom kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (tablica 33). Nizak koeficijent korelacije tvrdoće sirnog gruša s omjerom kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje su utvrdili i Storry i sur. (1983). Za razliku od rezultata ovog istraživanja, autori su utvrdili vrlo nisku korelaciju između omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje i sposobnosti sinereze dobivenog gruša. Guinee i sur. (2007) su utvrdili da povećanje omjera mliječne masti i proteina u mlijeku za sirenje nisu utjecale na teksturne značajke gruša u proizvodnji Cheddar sira.

Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku tijekom provedenog istraživanja nije značajnije utjecalo na tvrdoću proizvedenih sirnih gruševa tijekom testa ali se njihova sposobnost sinereze značajno ( $P < 0,01$ ) mijenjala. (grafikon 7 i 8). Razlog tome ponajviše je u značajnoj ( $P < 0,05$ ) promjeni udjela kazeina usljed povećanja koncentracije uree u mlijeku za sirenje (tablica 7). Iz rezultata naknadnih testova je vidljivo da se s povećanjem koncentracije uree do 35 mg/100 ml mlijeka za sirenje značajno ( $P < 0,05$ ) povećao udio kazeina (tablica 7). Povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku koncentracije uree do 35 mg/100 ml se povećala i vrijednost tvrdoće proizvedenih sirnih gruševa (grafikon 7) te se značajno ( $P < 0,01$ ) smanjila njegova sposobnost sinereze (grafikon 8). Međutim, nastavkom povećanja koncentracije uree iznad 35,01 mg/100 ml mlijeka, smanjio se udio kazeina u mlijeku za sirenje (tablica 7) što je posljedično dovelo do blagog smanjivanja tvrdoće (grafikon 7) i značajnog ( $P < 0,01$ ) povećanja sposobnost sinereze sirnog gruša (grafikon 8). Predmetnim istraživanjem je utvrđena korelacija između ( $r = 0,27$ ) koncentracije uree u ovčjem mlijeku i tvrdoće sirnog gruša ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (tablica 33). U odnosu na navedene rezultate, Abilleira i sur. (2010) su utvrdili negativnu korelaciju između koncentracije neproteinskog dušika u ovčjem mlijeku i čvrstoće gruša. Prelaskom krava sa nizinske na planinsku ispašu značajno se povećala koncentracija uree u mlijeku sa 21,4 na 43,7 mg/100 ml ali navedeno povećanje nije značajno utjecalo na vrijeme grušanja mlijeka a niti na čvrstoću dobivenog gruša

(Umbertalle i sur., 1998). Martin i sur. (1997) su utvrdili da je povećanje koncentracije uree u kravljem mlijeku sa 24,0 na 49,0 mg/100 ml tek neznatno utjecalo na njegove sposobnosti grušanja u proizvodnji Reblochon sira. Castagnetti i sur. (1995) proučavajući povezanost između koncentracije uree u kravljem mlijeku i njegovih koagulacijskih značajki su utvrdili značajnu ali nisku korelaciju koncentracije uree i vremena grušanja mlijeka. Predmetnim istraživanjem je utvrđena vrlo niska negativna korelacija ( $r=-0,06$ ) između koncentracije uree u ovčjem mlijeku i sposobnosti sinereze proizvedenog sirnog gruša ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (tablica 33). Karapetkovska Hristova i sur. (2014) su utvrdili da je s povećanje koncentracije uree u kravljem mlijeku do 39,16 mmol/100 ml smanjena količina otpuštene sirutke ( $r=-0,62$ ). Autori navode da je s povećanjem koncentracije uree iznad navedene količine proizvedeni gruš imao izraženiju sposobnost sinereze ( $r=0,39$ ).

Stadij laktacije nije značajnije utjecao na tvrdoću sirnog gruša tijekom testa ali je značajno ( $P<0,05$ ) utjecao na promjenu njegove sposobnosti sinereze (tablica 9). Najveća tvrdoća i sposobnost sinereze sirnog gruša utvrđena je u sredini a najmanja u onima na kraju laktacije. Gotovo podjednake rezultate navode i Requena i sur. (1999) nakon mjerenja sposobnosti grušanja mlijeka Manchego ovaca tijekom laktacije. Najmanja sposobnost otpuštanja sirutke dobivenog gruša je posljedica promjena u sastavu mlijeka kasne laktacije i to ponajviše radi značajnog ( $P<0,05$ ) povećanja udjela kazeina i mliječne masti (tablica 8). Povećanje udjela kazeina u mlijeku pogoduje stvaranju kompaktnije mikrostrukture parakazeinske mreže te takav gruš odlikuje veća zbijenost, manja poroznost i propusnost (Ong i sur., 2013). Stoga globule mliječne masti obuhvaćene u poroznom dijelu kompaktnijeg gruša većom aktivnom površinom dolaze u dodir s parakazeinskom mrežom i u fizičkom smislu čine zapreku koja ometa otjecanje sirutke što posljedično smanjuje njegovu čvrstoću (Guinee i sur., 1997, Mateo i sur., 2009). U prilog navedenoj činjenici ide i značajno ( $P<0,01$ ) negativan koeficijent korelacije ( $r=-0,55$ ) između udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku i sposobnosti sinereze dobivenog gruša (tablica 33). Osim toga, ovim istraživanjem je utvrđen i značajno ( $P<0,05$ ) negativan koeficijent korelacije ( $r=-0,29$ ) između udjela kazeina u mlijeku za sirenje i sposobnosti sinereze proizvedenog sirnog gruša (tablica 33). Međutim, jedan od razloga smanjenja sposobnosti sinereze pri kraju laktacije je i smanjivanje omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku kasne laktacije bez obzira što razlika nije bila statistički značajna. Uvidom u rezultate predmetnog istraživanja je također vidljivo da smanjenjem omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje sirni gruševi imaju značajno ( $P<0,01$ ) slabiju sposobnost sinereze (grafikon 6, tablica 33) te manju tvrdoću sirnog gruša ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (grafikon 5, tablica 33). Slične rezultate čvrstoće gruša tijekom laktacije Comisana ovaca su utvrdili i Sevi i sur. (2004). Osim toga, autori su

pored značajnog utjecaja stadija laktacije utvrdili i značajan utjecaj sezone janjenja na vrijednost navedenih pokazatelja. U odnosu na rezultate predmetnog istraživanja Pellegrini i sur. (1994) su utvrdili neznatno povećanje čvrstoće gruša s trajanjem laktacije dok je smanjenje njegove sposobnosti otpuštanja sirutke bio značajnije zbog kontinuiranog povećanja udjela mliječne masti i kazeina u mlijeku za sirenje tijekom laktacijske proizvodnje Lacaune ovaca.

### **5.3. Sastav, proteolitičke i teksturne značajke bračkog sira**

Proizvodnja sira podrazumjeva prevođenje pojedinih sastojaka mlijeka u sir, prvenstveno proteina (kazeina) i mliječne masti (Havranek i sur., 2014). Stoga se iz brojnih istraživanja može zaključiti da sastav mlijeka uz tehnološke postupke prerade izravno utječe na sastav sira te neizravno preko sastava sira (količine i stanja njegovih pojedinih sastojaka) na teksturne značajke (Gunasekaran i Ak, 2003).

#### **5.3.1. Utjecaj sastava i kakvoće mlijeka za sirenje**

##### **5.3.1.1. Mliječna mast**

Predmetnim istraživanjima je utvrđeno da je povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku sa 6,00 na 9,00 g/100 g, došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) kontinuiranog povećanja udjela mliječne masti i njenog udjela u suhoj tvari bračkog sira. Osim toga, navedenim povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja udjela vode u bračkom siru (tablica 11). Slijedom navedenog predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku i udjela mliječne masti ( $r = 0,52$ ) odnosno njenog udjela u suhoj tvari bračkog sira ( $r = 0,60$ ). Povrh toga, utvrđena je i značajna ( $P < 0,05$ ) negativna korelacija između udjela vode u bračkom siru ( $r = -0,29$ ) i udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku (tablica 34). Međutim, povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u navedenom rasponu nije značajnije mijenjalo udio proteina ali je imalo značajan ( $P < 0,05$ ) utjecaj na kontinuitet smanjenja udjela proteina u suhoj tvari bračkog sira (tablica 11). Bez obzira na udio mliječne masti u ovčjem mlijeku, udio soli i vode u nemasnoj tvari bračkog sira te njegova pH vrijednost se nije značajnije mijenjala. U skladu s rezultatima ovog istraživanja Irigoyen i sur. (2002) su utvrdili da se s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u rasponu od 2 do 8 %, smanjio udio vode ali i povećao udio mliječne masti u suhoj tvari u Roncal sira. Autori su kao i u predmetnom istraživanju utvrdili



suprotan učinak povećanja mliječne masti u ovčjem mlijeku na udio proteina u suhoj tvari sira te nadalje navode da udio mliječne masti nije mijenjao pH vrijednost navedenog sira. Slične rezultate navode Rudan i sur. (1999), Fenelon i sur. (1999) i Guinee i sur. (2000b) s tim da se tijekom njihovih istraživanja smanjio udio proteina odnosno povećavao udio vode u nemasnoj tvari Mozzarella i Cheddar sireva u odnosu na gotovo nepromjenjeni udio navedenih sastojaka u bračkom siru.

U svezi s predhodnim rezultatima važno je naglasiti da se tijekom navedenih istraživanja za proizvodnju sireva korišteno kravlje mlijeko čiji je udio mliječne masti bio u znatno širem rasponu u odnosu na ovčje mlijeko korišteno za proizvodnju bračkog sira. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u rasponu od 6,00 do 9,00 g/100 g u većoj mjeri utjecalo na tijek sekundarnih u odnosu na primarne proteolitičke promjene u bračkom siru (tablica 12). Navedeno povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku nije značajnije mijenjalo tijek primarne proteolize ali je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecalo na smanjenje udjela  $\gamma$ -kazeina u bračkom siru. U odnosu na rezultate ovog istraživanja Sánchez-Macias i sur. (2011) i Van Hekken i sur. (2013) su utvrdili da je s smanjenjem udjela mliječne masti u kozjim sirevima smanjena proteolitička aktivnost na  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$  kazeinu. Iz rezultata naknadnog testa je vidljivo da je s povećanjem udjela mliječne masti u rasponu od 6,00 do 9,00 g/100 g došlo do kontinuiranog smanjenja udjela WSN (%TN) u bračkom siru ali utvrđene razlike nisu bile statistički značajne. Nadalje, značajno ( $P < 0,01$ ) smanjenje udjela TCA-SN (%TN) u bračkom siru se dogodilo povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku iznad 7,01 g/100 g. Nastavkom povećanja udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku udio TCA-SN (%TN) je ostao nepromjenjen (tablica 12). Bez obzira na udio mliječne masti u ovčjem mlijeku udio ukupnih slobodnih aminokiselina u bračkom siru se nije značajnije mijenjao. U odnosu na dobivene rezultate ovog istraživanja Banks i sur. (1989) navode da su Cheddar sirevi s manjim udjelom mliječne masti imali nešto niži udio WSN (%TN) u odnosu na one s većim udjelom navedenog sastojka. Razlog tome je podjednakom udjelu vode u nemasnoj tvari u obe skupine sireva. Fenelon i sur. (2000) navode da povećanje udjela mliječne masti u Cheddar siru nije značajnije utjecao na tijek sekundarnih proteolitičkih promjena. Autori navode da je povećanjem udjela mliječne masti u Cheddar siru došlo do značajnog smanjenja udjela ukupnih slobodnih aminokiselina u odnosu na ukupnu masu sira. Osim toga, također je utvrđeno smanjenje ukupnih slobodnih aminokiselina u odnosu na udio ukupnog dušika u siru. Ustunol i sur. (1995) navode da je s povećanjem udjela mliječne masti u Cheddar siru u rasponu od 13 do 34 % došlo do izraženijeg povećanja WSN (%TN). Prema tome s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) se povećao udio mliječne masti te značajno ( $P < 0,05$ ) smanjio udio proteina u suhoj tvari bračkog sira (tablica 11) kao temeljnog supstrata za

proteolitičku, prije svega rezidualnu kimozijsku aktivnost što je za posljedicu imalo gotovo nepromjenjen tijekom primarnih odnosno značajano ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) smanjenje sekundarnih proteolitičkih promjena (tablica 12).

Naknadnim testiranjem je utvrđeno da se s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u rasponu od 6,00 do 9,00 g/100 g značajano ( $P < 0,01$ ) smanjivala lomljivost te čvrstoća u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira (tablica 13). Predmetno istraživanje je također dokazalo da se bez obzira na udio mliječne masti u ovčjem mlijeku vrijednosti ostalih istraživanih pokazatelja teksturnog profila bračkog sira nisu značajnije mijenjale. Slične rezultate navode i Irigoyen i sur. (2002) utvrdivši da se s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u rasponu od 2,00 do 8,00 % smanjila vrijednost napona na uzorcima Roncal sireva tijekom kompresijskog testa. Popuštanje parakazeinske strukture pri nižem naponu i manjoj deformaciji je postignuto u Cheddar siru, čiji se udio mliječne masti povećavao u rasponu od 6,30 do 32,50 g/100 g (Fenelon i Guinee, 2000). Koristeći punomasno, djelomično obrano te obrano ovčje i kravlje mlijeko, Lteif i sur. (2009) su utvrdili da je povećanje udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje doveo do smanjenja čvrstoće i povećanja adhezivnosti Halloumi sireva dok se kohezivnost i zakašnjela elastičnost u navedenim sirevima nisu mijenjale. U odnosu na navedene rezultate Van Hekken i sur. (2013) su utvrdili da je povećanje udjela mliječne masti u kozjim sirevima smanjilo njihovu čvrstoću i kohezivnost ali je povećalo vrijednosti zakašnjele elastičnosti. Značajno ( $P < 0,01$ ) smanjenje lomljivosti i čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira je posljedica prije svega značajne promjene u sastavu njihove suhe tvari. Povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) smanjilo udio proteina ali i značajno ( $P < 0,01$ ) povećalo udio mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira (tablica 11). Također je važno naglasiti da se s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku u manjoj mjeri povećala hidratiziranost parakazeinske mreže zbog kontinuiranog smanjenja udjela proteina u suhoj tvari pri gotovo nepromjenjenom udjelu vode u nemasnoj tvari bračkog sira (tablica 11). Povećanje udjela mliječne masti u siru povećava obujam globula mliječne masti (Rogers i sur., 2010). Stoga Guinee i sur. (1997) navode da povećanje obujma kuglice mliječne masti izdužuje lance u parakazeinskoj mreži čime oni postaju tanji sa slabije izraženom mehaničkom sposobnošću odupiranja pri njihovom naprezanju. U prilog navedenoj tvrdnji idu i rezultati predmetnog istraživanja koji pokazuju da se s povećanjem udjela mliječne masti u bračkom siru smanjivala njegova sposobnost odupiranja na kompresiju jer su vrijednosti čvrstoće u prvom ciklusu kompresije postajale sve niže pri sve višim stupnjevima postignute deformacije (tablica 13).

### 5.3.1.2. Kazein

Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) udjela kazeina u ovčjem mlijeku na većinu analiziranih sastojaka sira te na njegovu pH vrijednost (tablica 14). Tijekom istraživanja nije došlo do značajnijih promjena u udjelu soli te udjelu proteina u suhoj tvari proizvedenih sireva. Povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku iznad 4,71 mg/100 g značajnije je ( $P < 0,01$  :  $P < 0,05$ ) utjecalo na promjenu udjela mliječne masti u odnosu na udio proteina u bračkom siru. Posljedično navedenom došlo je do značajnog ( $P < 0,01$ ) povećanja udjela suhe tvari u siru ali i do promjena u udjelu mliječne masti i proteina u suhoj tvari sira. Iz rezultata naknadnog testa je vidljivo da se s povećanjem udjela kazeina u mlijeku za sirenje iznad navedene vrijednosti značajno ( $P < 0,01$ ) povećao udio mliječne masti u suhoj tvari sira dok je udio proteina u sklopu suhe tvari sira, bez obzira na udio kazeina u ovčjem mlijeku, bio poprilično ujednačen bez utvrđenih statističkih značajnih razlika (tablica 14). Nadalje je utvrđeno da je navedeno povećanje udjela kazeina u mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) smanjilo udio vode te njen udio u nemasnoj tvari bračkog sira. Budući da je predmetnim istraživanjem utvrđena negativna statistički značajna ( $P < 0,05$ ) korelacija ( $r = -0,29$ ) između udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku i udjela vode u bračkom siru (tablica 34) može se zaključiti da je povećanje udjela mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira prije svega posljedica značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja udjela vode ali i značajnog ( $P < 0,05$ ) smanjenja njenog udjela u nemasnoj tvari sira. Međutim, značajnije ( $P < 0,01$ ) smanjenje pH vrijednosti u bračkom siru se dogodio kada se udio kazeina u mlijeku za sirenje povećao iznad 4,36 mg/100 g. U skladu s rezultatima ovog istraživanja Hrković i sur. (2011) su utvrdili da se s povećanjem udjela proteina u ovčjem mlijeku povećao udio suhe tvari i mliječne masti u livanjskom i travničkom siru ali je došlo do smanjenja udjela vode i pH vrijednosti. Guinee i sur. (2006) su utvrdili da se s povećanjem udjela proteina u kravljem mlijeku u rasponu od 3,3 – 4,0 % dodatkom koncentrata mliječnih proteina i fosfokazeina povećao udio mliječne masti i proteina ali se istovremeno smanjio udio vode odnosno njen udio u nemasnoj tvari Cheddar sireva što je također u skladu s rezultatima predmetnog istraživanja. Stoga se povećanje udjela mliječne masti, proteina, suhe tvari te udjela mliječne masti u suhoj tvari u bračkom siru može obrazložiti činjenicom da se kazein iz mlijeka u visokom udjelu (93,3 %) ugrađuje u gruš (Hallén i sur., 2010) te je ključni čimbenik u proizvodnji sira. Prema tome o zastupljenosti kazeina u mlijeku za sirenje u značajnoj mjeri ovisi i zastupljenost proteinske faze u siru (Puđa, 2009) koja od svih sastojaka mlijeka u najvećoj količini obuhvaća mliječnu mast (Fox i sur., 2000). U odnosu na prikazane rezultate istraživanja Guinee i sur. (1994) su utvrdili da je povećanje udjela proteina u mlijeku za sirenje u

rasponu od 30 do 70 g/l imalo mali utjecaj na sastav Cheddar sira ali ipak navode nizak udio vode u suhoj tvari bez masti u sirevima s većim udjelom proteina.

Povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku je imao izraženiji utjecaj na tijek sekundarnih u odnosu na primarne proteolitičke promjene u bračkom siru (tablica 15). Naknadnim testom je utvrđeno da se s povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku značajano i kontinuirano ( $P < 0,01$ ) smanjivao udio WSN (%TN) i TCA-SN (%TN) u bračkom siru. U odnosu na navedeno, udio ukupnih slobodnih aminokiselina se značajno ( $P < 0,01$ ) smanjio u bračkom siru kada se udio kazeina u ovčjem mlijeku povećao iznad 4,35 mg/100 g (tablica 15). Nastavkom povećanja udjela kazeina u rasponu od 4,36 do 5,05 mg/100 g, vrijednosti navedenih pokazatelja se nisu značajnije mijenjale. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku značajno utjecalo na promjenu udjela  $\beta$  kazeina ( $P < 0,01$ ) te je najveća vrijednost navedenog pokazatelja postignuta u sirevima proizvedenim od mlijeka s rasponom udjela kazeina od 4,36 do 4,70 mg/100 (tablica 15). Nadalje je utvrđeno da je s povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku dovelo i do značajnog ( $P < 0,05$ ) kontinuiteta u smanjenju vrijednosti  $I_{\gamma/\beta}$ . Istraživanjem je utvrđeno povećanje udjela  $\alpha_{s1}$  kazeina te smanjenje  $I_{\alpha}$  ali utvrđene razlike nisu bile statistički značajne. Također je važno naglasiti da se udjeli njihovih razgradnih produkata odnosno udjeli  $\alpha_{s1}$ -I i  $\gamma$  kazeina nisu značajnije mijenjali što ukazuje na činjenicu da povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku nije značajnije mijenjalo cjelovitost parakazeinskih čestica u strukturi bračkog sira (tablica 15). Upadhyay i sur. (2004) navode značajnu ulogu kimoza u razgradnji  $\alpha_{s1}$  kazeina tijekom primarnih proteolitičkih promjena u siru. Autori navode da je razgradnja  $\beta$  kazeina tijekom primarne proteolize prije svega posljedica rezidualne plazminske aktivnosti u siru. U svezi s navedenim, Bansal i sur. (2010) naglašavaju doprinos kimoza i u manjoj mjeri plazmina na udio WSN (%TN) kao pokazatelja prisutnih količina polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina i njihovih soli u sirevima tijekom zrenja. Stoga se smanjenje proteolitičke aktivnosti u bračkom siru usljed povećanja udjela kazeina u ovčjem mlijeku ponajprije treba pripisati smanjenom udjelu te posljedično tome i nedovoljnom aktivnošću rezidualnog kimoza. U skladu s rezultatima ovog istraživanja Shakeel-Ur-Rehman i sur. (2003) su utvrdili da je s povećanjem proteina u kravljem mlijeku za sirenja sa 2,45 na 5,30 % došlo do smanjenja udjela WSN (%TN) u Cheddar siru. Kao razlog smanjenju primarne odnosno sekundarne proteolize Guinee i sur. (1994) navode dodatak kimoza prema količini mlijeka, a ne prema udjelu kazeina u mlijeku za sirenje što je utvrđeno i pri proizvodnji bračkog sira. Osim toga, smanjenje primarne odnosno sekundarne proteolize je posljedica smanjenja udjela vode, a naročito njenog udjela u nemasnoj tvari usljed smanjenja pH vrijednosti bračkog sira (tablica 14). U prilog navedenom ide i činjenica da se smanjenjem pH vrijednosti usporedo smanjuje udio vode u siru (Watkinson i sur.,

2001) te budući da se dio rezidualnog kimoza nalazi otopljen u vodenoj fazi sira smanjenjem udjela vode u nemasnoj tvari, smanjena je i proteolitička aktivnost u Mozzarella siru (Tunick i sur., 1993, Rudan i sur., 1999). U odnosu na prikazane rezultata Soodam i sur. (2014) nisu utvrdili značajne promjene udjela WSN (%TN) u Cheddar siru bez obzira na udio proteina u mlijeku za sirenje. Udio TCA-SN (%TN) je posljedica enzimatske aktivnosti proteinaza i peptidaza starterskih i slučajno prisutnih mikroorganizama i u manjoj mjeri kimoza i pokazatelj je prisutnih količina neproteinskog dušika, malih peptida i slobodnih aminokiselina (Bansal i sur., 2010). Slično rezultatima ovog istraživanja Shakeel-Ur-Rehman i sur. (2003) navode da je usljed povećanja udjela proteina u mlijeku za sirenje došlo je do smanjenja udjela ukupnih slobodnih aminokiselina izraženih kao koncentracija leucina u suhoj tvari sira. Autori navode da je navedeno smanjenje posljedica smanjenja broja starterskih i nestarterskih bakterija mliječne kiseline odnosno smanjenja njihove peptidazne aktivnosti. Povećanje udjela proteina u mlijeku za sirenja je također značajno smanjilo udio TCA-SN (%TN) u Cheddar (Soodam i sur., 2014) odnosno Mozzarella siru (Rudan i sur., 1999).

Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na pojedine pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (tablica 16). Naknadnim testiranjem je utvrđeno da je povećanje udjela kazeina iznad 4,71 mg/100 g u ovčjem mlijeku posljedica značajnog ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) povećanja čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije te lomljivosti i zakašnjele elastičnosti bračkog sira. Bez obzira što su se vrijednosti lomljivosti i čvrstoće u prvom ciklusu kompresije tijekom provedenog istraživanja značajno ( $P < 0,01$ ) mijenjale, pripadajuće vrijednosti deformacija pri kojima su se postizale vrijednosti navedenih pokazatelja su bile vrlo slične i nisu se tijekom testa značajnije mijenjale. Udio kazeina u mlijeku za sirenje nije imao značajnog utjecaja na adhezivnost i kohezivnost u bračkom siru (tablica 16). Teksturane značajke sireva su prije svega odraz njegovog sastava (Gunasekaran i Ak, 2003) pa stoga ovise o udjelu i cjelovitosti kazeina u mlijeku za sirenje, udjelu vode i mliječne masti u siru odnosno njegovoj pH vrijednosti, mineralnom sastavu te međusobnoj uzajamnoj povezanosti i fizičkom stanju pojedinih sastojaka sira (Creamer i Olson, 1982, Fox i sur., 2000, Puđa, 2009). Već je navedeno da se s kontinuiranim povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku u rasponu od 4,00 do 5,05 g/100 g značajno ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$ ) mijenjao sastav bračkog sira ali je naknadnim testom utvrđeno da je izraženija promjena sastava sireva usljedila tek kada su proizvedeni od mlijeka čiji je udio kazeina prelazio prag od 4,71 mg/100 g (tablica 14). Međutim, s povećanjem udjela kazeina u ovčjem mlijeku iznad navedenog praga se i izraženije povećala vrijednost navedenih teksturnih pokazatelja bračkog sira (tablica 16). Uvidom u dostupne literaturne podatke je utvrđeno da je s povećanjem udjela cjelovitog kazeina u parakazeinskoj strukturi Cheddar sira značajno

povećana lomljivost (Guinee i sur., 2000b), čvrstoća u prvom ciklusu kompresije (Ong i sur., 2013) ali ne i kohezivnost (Soodam i sur., 2014) što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. De Jong (1978) je utvrdio da su Meshanger sirevi s udjelom kazeina u nemasnoj tvari sira manjom od 40 % bili manje čvrstoće i mekane konzistencije ali povećanjem udjela kazeina u nemasnoj tvari sira iznad navedene vrijednosti progresivno se povećavala njihova čvrstoća. Prentice (1994) navodi da je kazein temeljni sastojak u strukturi parakazeinske mreže te ovisno o njegovom udjelu i stupnju cjelovitosti u najvećoj mjeri ovisi čvrstoća i elastičnost sira. Nadalje Masi i Addeo (1986) navode da otpornost prema deformaciji pri naprezanju uzorka sira primarno ovisi o mehaničkim značajkama parakazeinske mreže. Stoga, Fox i sur. (2000) navode da se s povećanjem udjela kazeina povećava i broj veza između parakazeinskih čestica unutar i između proteinskih lanaca te ukoliko se uzorak sira podvrgne kompresiji, parakazeinska mreža će napon preraspodjeliti na veći broj navedenih veza pa će prema tome sir pokazivati povećanu elastičnost i otpornost prema deformaciji. I u konačnici, povećanje čvrstoće sira je pored povećanja udjela cjelovitog kazeina u strukturi sira i odraz njegove mikrostrukture. Sirevi proizvedeni od mlijeka čiji je udio proteina u kravljem mlijeku bio 5,8 % su bili kompaktnije i manje porozne mikrostrukture gruša u odnosu na one proizvedene od mlijeka s udjelom proteina od 3,7 % (Ong i sur., 2013). Izraženije povećanje predhodno prikazanih teksturnih pokazatelja u bračkom siru je također i posljedica značajnog ( $P < 0,05$ ) smanjenja udjela vode u nemasnoj tvari sireva (tablica 14). Predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između udjela proteina ( $r = -0,76$ ) i mliječne masti ( $r = -0,67$ ) s udjelom vode u nemasnoj tvari sira (tablica 35). Mnogobrojnim istraživanjima je utvrđeno da s povećanjem udjela mliječne masti u sirevima smanjuje njihova čvrstoća i elastičnost te su sirevi mekše konzistencije (Guinee i McSweeney, 2003). Koliki je značaj promjene udjela vode u nemasnoj tvari u odnosu na udio mliječne masti u predmetnim sirevima na njihovu čvrstoću i lomljivost pokazuje i činjenica da je bez obzira na statistički značajnije povećanje udjela mliječne masti u odnosu na smanjenje udjela vode u nemasnoj tvari bračkog sira ( $P < 0,01$  :  $P < 0,05$ ), vrijednost navedenih teksturnih pokazatelja se značajno povećavala (tablice 14 i 16). U prilog provedenom istraživanju, Gunasekaran i Ak (2003) također tvrde da svaka najmanja promjena udjela vode u nemasnoj tvari sira ima značajan utjecaj na njegove teksturne značajke. O važnosti vode u teksturi sireva ide u prilog i činjenica da se sireve prema reološkim svojstvima svrstava isključivo prema udjelu vode u nemasnoj tvari sira (Rüegg, 1985; Puđa, 2009). Tijekom istraživanja utjecaja sastava sira na njegove teksturne značajke Rüegg (1985) je utvrdio najveću negativnu korelaciju između udjela vode u nemasnoj tvari sira i vrijednosti primjenjene sile pri ekstruzijskom testu. Budući da udio vode u nemasnoj tvari isključuje mliječnu mast, navedeni pokazatelj u osnovi predstavlja odnos između vode i proteina u siru (Guinee i

sur., 2006) te stoga svako povećanje čvrstoće zbog smanjenja udjela vode u nemasnoj tvari Mozzarella sireva je primarno posljedica smanjene hidratacije proteina. (Tunick i sur., 1993). Povezanost udjela vode u siru s njegovim teksturnim značajkama Prentice (1994) i Walstra i sur. (2006) objašnjavaju na sljedeći način:

- veći udio vode smanjuje udio proteina kao sastojka koji u najvećoj mjeri daje čvrstoću siru,
- voda kao tekućina niskog viskoziteta ispunjava prostor između proteinske mreže i globula mliječne masti te ima učinak maziva,
- veći udio vode povećava hidrataciju te posljedično mijenja konformaciju proteina,
- udio vode u siru značajno utječe na brzinu difuzijskog koeficijenta proteolitičkih enzima te sirevi s većim udjelom vode imaju intenzivniju proteolitičku aktivnost.

Osim toga, u bračkom siru proizvedenom od ovčjeg mlijeka čiji je udio kazeina prelazio prag od 4,71 mg/100 g došlo je do značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja pH vrijednosti (tablica 14) dok su čvrstoća i lomljivost bili veći (tablica 16) iako je prema većini istraživanja utvrđen suprotan učinak smanjenja pH vrijednosti na navedene teksturne pokazatelje. Smanjenje pH vrijednosti prije svega smanjuje čvrstoću i lomljivost zbog disocijacije koloidnog kalcijevog fosfata iz strukture parakazeinske mreže i njegovog prelaska u topljivi oblik vodene faze sira (Watkinson i sur., 2001). Pastorino i sur. (2003b) navodi da se smanjenjem pH vrijednosti sira u rasponu od 5,4 do 5,0 smanjio udio vezanog kalcija sa 17 na 14 mg/g proteina što je smanjilo njegovu čvrstoću i kohezivnost. Suprotan učinak smanjenja pH vrijednosti na teksturu bračkog sira je prije svega posljedica korištenja ovčjeg mlijeka. Međutim, uvidom u dostupnu literaturu, gotovo sva istraživanja su provedena na sirevima proizvedenim od kravljeg mlijeka. Zbog većeg udjela kazeina i kalcija ovčje u odnosu na kravlje mlijeko grušanjem stvara bolje povezan, čvršći i kompaktniji gruš (Storry i sur., 1983, Bornaz i sur., 2009), ali zbog podjednakog udjela laktoze ovčje i kravlje mlijeko imaju približno jednaku fermentacijsku sposobnost. Osim toga parakazeinska micela u strukturi ovčjeg u odnosu na kravljji sir ima znatno veći udio kalcija (Park i sur., 2007, Guinee i O'Brien, 2010, Ramos i Juarez, 2011). Stoga se može zaključiti da smanjenje pH vrijednosti tijekom predmetnog istraživanja nije imalo takav učinak na smanjenje koloidnog kalcijevog fosfata u strukturi parakazeinske mreže bračkog sira koji bi bio uzrokom smanjenja njegove čvrstoće i lomljivosti navedene strukture.

### 5.3.1.3. Omjer kazeina i mliječne masti

Predmetnim istraživanjima je utvrđeno da udio mliječne masti i kazeina u ovčjem mlijeku ima različiti učinak na njihove udjele u sastavu sira (tablica 11 i 14). Povećanje udjela mliječne masti u siru je posljedica povećanja udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje ali i kazeina. Predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija udjela mliječne masti u bračkom siru s udjelom mliječne masti ( $r = 0,52$ ) i kazeina ( $r = 0,37$ ) u ovčjem mlijeku (tablica 34). Međutim, predmetnim istraživanjem je utvrđena niska korelacija udjela proteina u bračkom siru s udjelom mliječne masti ( $r = 0,05$ ) i kazeina ( $r = 0,20$ ) u ovčjem mlijeku ali utvrđene razlike nisu bile statistički značajne (tablica 34). Rezultati istraživanja pokazuju da promjene mliječne masti i kazeina u ovčjem mlijeku različito utječu na njihov udio i u suhoj tvari bračkog sira. Povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) povećava udio mliječne masti ( $r = 0,60$ ) ali istovremeno značajno ( $P < 0,01$ ) smanjuje udio proteina u suhoj tvari bračkog sira ( $r = -0,31$ ). Nadalje povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku također dovodi do značajnog ( $P < 0,01$ ) povećanja udjela mliječne masti ( $r = 0,42$ ) ali ne i udjela proteina u suhoj tvari bračkog sira (tablica 34). Povrh toga udio mliječne masti i kazeina u ovčjem mlijeku različito utječu na udio vode u bračkom siru. Slijedom navedenog, udio vode u bračkom siru je u značajnoj ( $P < 0,01$ ) negativnoj korelaciji s udjelom mliječne masti ( $r = -0,29$ ) u ovčjem mlijeku dok je udio kazeina u ovčjem mlijeku u negativnoj korelaciji s udjelom vode u bračkom siru ( $r = -0,21$ ). Budući da mliječna mast i kazein od svih sastojaka mlijeka u najvećoj mjeri prelaze u sir (Amenu i Deeth, 2007) njihov udjeli u mlijeku za sirenje se ne mogu promatrati odvojeno jer se povećanjem udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje značajno smanjenjuje udio proteina u suhoj tvari sira i obrnuto (Fenelon i Guinee, 1999; Sánchez-Macías i sur., 2010). U prilog navedenom idu i rezultati ovog istraživanja kojima je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) korelacija omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku s udjelom mliječne masti ( $r = -0,55$ ) i proteina u suhoj tvari ( $r = 0,52$ ) bračkog sira. Omjer kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku je također u značajnoj ( $P < 0,01$ ) korelaciji s ukupnim udjelom vode ( $r = -0,27$ ) u bračkom siru (tablica 34). Stoga se temeljem navedenog može tvrditi da promjene međusobnog odnosa kazeina i mliječne masti u odnosu na promjene njihovog pojedinačnog udjela u ovčjem mlijeku daju cjelovitiji uvid u promjenu sastava, teksturne i proteolitičke promjene u bračkom siru. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da se s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajano ( $P < 0,01$ ) smanjio udio mliječne masti i njen udio u suhoj tvari bračkog sira (tablica 17). Rezultati ovog istraživanja ukazuju i na činjenicu da se s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje značajno ( $P < 0,01$ ) povećao udio proteina u suhoj tvari bračkog sira. Bez obzira na značajno ( $P < 0,01$ ) smanjenje udjela



suhe tvari, udio proteina je neznatno povećan zbog povećanja njegovog udjela u suhoj tvari bračkog sira (tablica 17). U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Fenelon i Guinee (1999) su utvrdili da je povećanje omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku u rasponu od 0,75 do 4,71 utjecalo na značajno smanjenje udjela suhe tvari, mliječne masti i masti u suhoj tvari Cheddar sira. U odnosu na predmetne rezultate, autori potvrđuju da je s povećanjem omjera navedenih sastojaka značajno povećao udio proteina u Cheddar siru. Iz rezultata predmetnih istraživanja je također vidljivo da je povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) povećan udio vode, ali promjena njenog udjela u nemasnoj tvari bračkog sira nije bila statistički značajna. Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku sa 0,57 na 0,65 nije mijenjao udio vode a niti njen udio u nemasnoj tvari proizvedenih ovčjih sireva (Jaeggi i sur., 2005). Guinee i sur. (2007) su također utvrdili da povećanje omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku u rasponu od 0,70 – 1,15 utječe na značajno povećanje vode u sirevima s tim da se za razliku od rezultata predmetnog istraživanja njen udio u nemasnoj tvari Cheddar sira smanjio. Razloge smanjenja udjela vode u nemasnoj tvari sireva Rudan i sur. (1999) vide u činjenici da se voda u navedenim sirevima ne nadomješta u razmjernom odnosu na smanjeni udio mliječne masti.

Iz rezultata predmetnog istraživanja je vidljivo da je povećanje omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje značajno ( $P < 0,01$ ) povećalo udio  $\beta$  i  $\gamma$ -kazeina ali povećanje navedenih pokazatelja nije značajnije utjecalo na vrijednost  $I_{\gamma/\beta}$  (tablica 18). Također je utvrđeno da nije došlo do značajnih promjena udjela  $\alpha_{s1}$ -kazeina u sklopu parakazeinske mreže bračkog sira iako se značajno ( $P < 0,05$ ) mijenjao udio njegovog razgradnog produkta. Naknadnim testom je utvrđen izraženije smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$  – I kazeina u bračkom siru proizvedenom od ovčjeg mlijeka čiji je omjer kazeina i mliječne masti bio u rasponu od 0,64 do 0,68 ali promjene navedenog sastojka nisu značajnije mijenjale vrijednost  $I_{\alpha}$ . U skladu s rezultatima ovog istraživanja Fenelon i Guinee, (2000) također navode da je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u kravljem mlijeku u rasponu od 0,95 do 6,20 povećan udio cjelovitog  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina u Cheddar siru. Iz rezultata istraživanja je također vidljivo da je razgradnja  $\alpha_{s1}$  kazeina bila izraženija u bračkim sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka s manjim omjerom kazeina i mliječne masti. U odnosu na navedeno, intenzivnija razgradnja  $\beta$ -kazeina je bila u bračkim sirevima proizvedenim od mlijeka s većim omjerom kazeina i mliječne masti (tablica 18). Slične rezultate navode i Fenelon i Guinee, (2000). Predmetnim istraživanjem nije utvrđen značajan utjecaj omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku na udjele WSN (%TN), TCA-SN (%TN) i ukupnih slobodnih aminokiselina u bračkom siru. Za razliku od rezultata ovog istraživanja, Rudan i sur. (1999) su utvrdili da je povećanje omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje smanjilo udio TCA-SN (%TN) u Mozzarella sirevima. Stoga je

povećanje udjela cjelovitog kazeina u bračkom siru prije svega posljedica smanjenja rezidualne kimozijske aktivnosti jer se količina sirila dodavala prema količini mlijeka a ne prema udjelu kazeina u mlijeku za sirenje (Guinee i sur., 1997). Osim toga povećanje udjela cjelovitog kazeina u bračkom siru i smanjene rezidualne aktivnosti otopljenog kimozina je i posljedica udjela vode u nemasnoj tvari koja se bez obzira na kontinuirano povećanje njenog ukupnog udjela u siru nije statistički značajnije mijenjala (Tunick i sur., 1993).

Ovim istraživanjem je utvrđeno da su se s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajano ( $P < 0,01$ ) i kontinuirano povećavale vrijednosti lomljivosti te čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira (tablice 19). Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecalo na promjenu vrijednosti deformacije u točki loma ali nije značajno utjecalo na promjenu vrijednosti postignute deformacije pri čvrstoći u prvom ciklusu kompresije, adhezivnosti, kohezivnosti i zakašnjele elastičnosti (tablica 19). Povećanje navedenih teksturnih pokazatelja je prije svega posljedica blagog povećanja proteina i cjelovitog kazeina u bračkom siru ali i značajnog ( $P < 0,01$ ) i kontinuiranog smanjenja udjela mliječne masti te njenog udjela u suhoj tvari bračkog sira (tablice 17 i 18). Iako se značajno povećao ukupan udio vode kao čimbenika viskoznih svojstava u teksturi pokusnih sireva, promjene njenog udjela u nemasnoj tvari nisu bile statistički značajne jer se udio vode ne nadomješta u razmjernom odnosu na smanjeni udio mliječne masti (Madadlou i sur., 2005). U skladu s rezultatima ovog istraživanja Rudan i sur. (1999) navode da je s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u mlijeku za sirenje povećana čvrstoća i kohezivnost Mozzarella sira. Guinee i sur. (2000b) navode da povećanje navedenog odnosa u mlijeku dovodi do uzajamnog povećanja čvrstoće i napona u točki puknuća parakazeinske strukture Cheddar sira.

#### **5.3.1.4. Urea**

Određivanje koncentracije uree u mlijeku je važan pokazatelj uravnoteženosti obroka preživača energijom i proteinima budući da navedena uravnoteženost utječe na učinkovitost ugradnje suvišnog amonijaka u mikrobnii protein (Bendelja i sur., 2009). S obzirom da se ovčje mlijeko gotovo u cijelosti preradi u sir, predmetnim istraživanjem se željelo utvrditi je li i u kojoj mjeri koncentracije uree u sirovom ovčjem mlijeku utječe na sastav i teksturu tvrdih sireva. Provedenim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na sve istraživane sastojke bračkog sira osim udjela soli (tablica 20). Međutim, koncentracije uree u ovčjem mlijeku nije utjecala na pH vrijednost u bračkom siru. Naknadnim testom je utvrđeno da se s

povećanjem koncentracije uree do 35,00 mg/100 g ovčjeg mlijeka povećao udio mliječne masti, proteina i suhe tvari u bračkom siru odnosno udio mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira. Iz rezultata naknadnog testa je vidljivo da je značajno ( $P < 0,01$ ) najveći udio mliječne masti, proteina i suhe tvari te udjela mliječne masti u suhoj tvari utvrđen u bračkim sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka čiji je koncentracija uree bila u rasponu od 25,01 do 35,00 mg/100 g. Međutim, u navedenim sirevima je istovremeno utvrđen značajno ( $P < 0,01$ ) najmanji udio vode odnosno njen najmanji udio u nemasnoj tvari (tablica 20). Povećanjem koncentracije uree u ovčjem mlijeku iznad 35,01 mg/100 g smanjuje se udio mliječne masti, proteina, suhe tvari te udio mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira s tim da je zamjetno izraženije smanjenje udjela mliječne masti u odnosu na navedene sastojke bračkog sira. Povećanjem koncentracije uree iznad navedene vrijednosti u ovčjem mlijeku brački sirevi su imali više vode ali i njenog udjela u nemasnoj tvari. Iako se povećanjem koncentracije uree u ovčjem mlijeku iznad 35,01 mg/100 g smanjio udio proteina u bračkom siru, udjel navedenog sastojka u suhoj tvari bračkog sira se značajno ( $P < 0,05$ ) povećao. Uvidom u literaturne podatke provedeno je samo jedno istraživanje utjecaja koncentracije uree u mlijeku za sirenje na sastav i teksturu sira (Martin i sur., 1997). Nedostatak tog istraživanja je bio vrlo mali broj Reblochon kravljih sireva obuhvaćenih istraživanjem. Međutim, istraživanja utjecaja navedenog sastojka na sastav i teksturu tvrdih ovčjih sireva do sada nisu provedena. Cottrill (1998) navodi da većina istraživača ali i proizvođača smatra da koncentracija uree u mlijeku za sirenje ima vrlo mali ili gotovo zanemariv utjecaj na sastav i kvalitetu sira. Do sličnih rezultata kao i u predmetnom istraživanju su došli Martin i sur (1997) utvrdivši da se s povećanjem koncentracije uree u mlijeku za sirenje sa 24,00 na 49,00 mg/100 ml značajno smanjio udio mliječne masti i suhe tvari u Reblochon sirevima, dok se njihova pH vrijednost nije značajnije mijenjala. Međutim, u odnosu na navedene autore i rezultate predmetnog istraživanja Politis i Ng-Kwai-Hang (1988) nisu utvrdili povezanost koncentracije uree u mlijeku za sirenje sa sastavom Cheddar sira.

Iz rezultata predmetnog istraživanja je vidljiv izraženiji utjecaj povećanja koncentracije uree u ovčjem mlijeku na pokazatelje sekundarnih u odnosu na pokazatelje primarnih proteolitičkih promjena u bračkom siru (tablica 21). Naknadnim testom je utvrđeno da su značajno ( $P < 0,05$ ) najveće vrijednosti TCA-SN (%TN) i WSN (%TN) utvrđene u bračkim sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka s najmanjom koncentracijom uree. Povećanjem koncentracije uree u ovčjem mlijeku iznad 25,01 mg/100 g dolazi do značajnog ( $P < 0,05$ ) smanjenja vrijednosti navedenih pokazatelja u bračkom siru. Međutim, daljnje povećanje koncentracije uree u mlijeku za sirenje u rasponu od 25,01 do 45,00 mg/100 g nije utjecalo na intenzitet sekundarnih proteolitičkih promjena pa su vrijednosti TCA-SN (%TN) i WSN (%TN) ostale gotovo nepromjenjene (tablica 24). U

odnosu na navedene pokazatelje značajno ( $P < 0,05$ ) smanjenje udjela ukupnih slobodnih aminokiselina je utvrđeno u bračkim sirevima proizvedenim od mlijeka s koncentracijom uree iznad 35,01 mg/100g. Za razliku od rezultata predmetnog istraživanja, Martin i sur (1997) su utvrdili da s povećanjem koncentracije uree u mlijeku za sirenje sa 24,00 na 49,00 mg/100 ml nije došlo do značajnijih promjena pokazatelja sekundarnih proteolitičkih promjena u Reblochon sirevima. Iz rezultata naknadnog testa je vidljivo značajno ( $P < 0,01$ ) povećanje udjela  $\beta$ -kazeina u bračkom siru proizvedenom od ovčjeg mlijeka s koncentracijom uree iznad 35,01 mg/100 g što je za posljedicu imalo značajno ( $P < 0,05$ ) kontinuirano smanjenje  $I_{V\beta}$  (tablica 21). Iz rezultata je nadalje vidljivo da bez obzira na koncentraciju uree u ovčjem mlijeku udio njegovog razgradnog produkta odnosno  $\gamma$  kazeina u bračkom siru se nije značajnije mijenjao. Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku je utjecalo na povećanje udjela  $\alpha_{s1}$  kazeina odnosno smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$ -I-kazeina i vrijednosti  $I_{\alpha}$  ali razlike nisu bile statistički značajne (tablica 21). Za razliku od navedenog Bugaud i sur. (2001) su utvrdili značajnu povezanost koncentracije uree u kravljem mlijeku s relativnim udjelom  $\alpha_{s1}$ -I kazeina u odnosu na sumu  $\alpha_{s1}$  i  $\alpha_{s2}$  kazeina. Mulvihill i Fox (1977) navode da dodatak uree u mlijeko u količini od 5 mol/l dovodi do denaturacije kimozina te da pored navedene količine dodane uree stupanj denaturacije kimozina značajno ovisi i o pH vrijednosti mlijeka. Navedena količina uree je mijenjala specifičnost kimozina na  $\alpha_{s1}$  (Mulvihill i Fox, 1977) ali ne i na  $\beta$  kazeinu (Mulvihill i Fox, 1978). Iako su autori dodavanjem uree u mlijeko postigli višestruko veće koncentracije navedenog sastojka u odnosu na predmetno istraživanje, rezultati njihovog istraživanja ipak navode na činjenicu da je cjelovitost  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$  kazeina odnosno smanjenje udjela njihovih razgradnih produkata u istraživanim sirevima prije svega posljedica smanjene kimozinske aktivnosti i to osobito u sirevima proizvedenim od mlijeka s koncentracijom uree većom od 35,01 mg/100 g.

Iz rezultata analize teksturnog profila bračkih sireva je vidljivo da je s povećanjem koncentracije uree u ovčjem mlijeku iznad 35,01 mg/100 g došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja vrijednosti lomljivosti, čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije dok se vrijednosti ostalih pokazatelja nisu značajnije mijenjali (tablica 22). Važno je naglasiti da su vrijednosti pri kojima je došlo do puknuća proteinske strukture odnosno vrijednosti čvrstoće bračkog sira u prvom ciklusu kompresije postignute pri gotovo nepromjenjenim vrijednostima deformacije. Razloge značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja vrijednosti pokazatelja analize teksturnog profila bračkih sireva proizvedenih od ovčjeg mlijeka čija je koncentracija uree bila iznad 35,01 mg/100 g prije svega treba tražiti u značajnom ( $P < 0,01$ ) povećanju udjela vode odnosno udjela vode u nemasnoj tvari u navedenim sirevima (tablica 20). Stoga se može zaključiti da je usljed pojačane hidratacije proteinske strukture došlo do smanjenja vrijednosti teksturnih pokazatelja bez obzira na značajno

( $P < 0,05$ ) povećanje udjela proteina u suhoj tvari, sačuvanu cjelovitost kazeina i smanjenu proteolitička aktivnost u bračkim sirevima (tablica 21). U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Martin i sur. (1997) su utvrdili da je s povećanjem koncentracije uree u mlijeku za sirenje sa 24,00 na 49,00 mg/100 ml došlo do značajnog smanjenja čvrstoće proizvedenih sireva bez obzira je li je povećanje koncentracije uree bilo posljedica njenog dodatka u mlijeko ili posljedica pojačane hranidbe proteinskim krmivima. Mekaniju teksturu sireva usljed povećanja koncentracije uree u mlijeku za sirenje navedeni autori također vide u povećanju udjela vode a ne promjeni pokazatelja sekundarnih proteolitičkih promjena u Reblochon sirevima što je u skladu s predmetnim istraživanjem.

### **5.3.1.5. Broj somatskih stanica**

Broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje je prije svega pokazatelj zdravlja mliječne žlijezde (Haenlein i Wendorff, 2006), ali u tehnološkom smislu i pokazatelj njegove prikladnosti za preradu u sir (Kalit, 1999). Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ) utjecaj broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na udio mliječne masti, proteina, udjela proteina u suhoj tvari te pH vrijednosti bračkog sira. Međutim, broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku nije značajnije utjecao na udio suhe tvari, soli, udio vode u nemasnoj tvari te udio mliječne masti u suhoj tvari bračkog sira (tablica 23). Naknadnim testom je utvrđeno da se s povećanjem broja somatskih stanica iznad 501.000/ml u ovčjem mlijeku značajano povećao ( $P < 0,05$ ) udio mliječne masti u bračkom siru s tim da se povećao i njen udio u suhoj tvari ali razlika nije bila statistički značajna. Povećanjem broja somatskih stanica iznad navedenog broja je značajnije ( $P < 0,01$ ) povećan udio proteina odnosno njihov udio u suhoj tvari bračkog sira (tablica 23). Uz navedeno, povećanje broja somatskih stanica iznad 151.000/ml u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,01$ ) smanjilo pH vrijednost bračkog sira. Bez obzira što tijekom istraživanja nije utvrđena statistički značajna razlika, naknadnim testiranjem je utvrđen gotovo ujednačen udio soli ali je zamjetno izraženije smanjenje udjela vode odnosno njenog udjela u nemasnoj tvari bračkog sira proizvedenog od mlijeka s brojem somatskih stanica iznad 501.000/ml (tablica 23).

Uvidom u dostupne literaturne podatke je utvrđen mali broj istraživanja o utjecaju broja somatskih stanica na sastav ovčjih sireva tijekom zrenja. Također je potrebno naglasiti da su ta malobrojna istraživanja u odnosu na predmetno istraživanje provedena na ovčjim sirevima proizvedenim od mlijeka s brojem somatskih stanica znatno većim u odnosu na ovčje mlijeko za proizvodnju bračkog sira. Sastav ovčjih sireva proizvedenih od mlijeka čiji je gornji prag broja somatskih stanica bio 2.000.000 odnosno 3.000.000/ml se nije značajnije mijenjao tijekom zrenja od 2 i 3 mjeseca (Pirisi i sur., 2000, Giaccone i sur.,

2005). Revilla i sur. (2011) su utvrdili da se s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno povećao udio vode u sirevima na početku njihovog zrenja. Autori navode da se udio vode tijekom zrenja istih sireva mijenjao neovisno o broju somatskih stanica u mlijeku za sirenje. Jaeggi i sur. (2003) su sirenjem ovčjeg mlijeka s brojem somatskih stanica iznad 1.000.000/ml proizveli sireve sa značajno manjim udjelom mliječne masti ali su i sadržavali značajno više vode.

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku dovodi do jačeg intenziteta sekundarnih u odnosu na primarne proteolitičke promjene u bračkom siru (tablica 24). Povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,01$ ) utjecao na povećanje udjela ukupnih slobodnih aminokiselina u bračkom siru. Iz tablice 24 je vidljivo da je značajno ( $P < 0,01$ ) najveća vrijednost TCA-SN (%TN) postignuta u sirevima proizvedenim od mlijeka s više od 501.000 somatskih stanica/ml. Također je vidljivo da je brački sir imao značajno ( $P < 0,01$ ) najmanju vrijednost WSN (%TN) kad je proizveden od mlijeka s brojem somatskih stanica u rasponu od 151.000 do 500.000 somatskih stanica /ml dok su podjednake vrijednosti navedenog pokazatelja bile u bračkom siru bez obzira da li je ovčje mlijeko sadržavalo manje od 150.000 ili više od 501.000 somatskih stanica /ml (tablica 24). U odnosu na prikazane rezultate Kalit, (1999) navodi da različit broj somatskih stanica u kravljem mlijeku nije značajnije mijenjao pokazatelje sekundarne proteolize u proizvedenim sirevima. Pirisi i sur. (2000) nisu utvrdili značajne promjene navedenih pokazatelja sekundarne proteolize u sirevima na početku ili nakon 2 mjeseca zrenja bez obzira što je gornja granica broja somatskih stanica dosegla 2.000.000/ml. Za razliku od navedenog Jaeggi i sur. (2003) nisu utvrdili značajne promjene udjela TCA-SN (%TN) u sirevima tijekom zrenja u trajanju od 9 mjeseci, proizvedenim od ovčjeg mlijeka s brojem somatskih stanica nižim od 1.000.000/ml. Međutim, s povećanjem broja somatskih stanica iznad 1.000.000/ml u mlijeku za sirenje je značajno i povećan udio TCA-SN (%TN) u proizvedenim sirevima (Jaeggi i sur. 2003). Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) se povećao udio  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina u bračkom siru (tablica 24). Međutim, različiti broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku nije značajno utjecao na udio njihovih razgradnih produkata odnosno  $\alpha_{s1}$ -I i  $\gamma$ -kazeina s tim što je udio  $\gamma$ -kazeina odnosno vrijednost  $I_{\gamma/\beta}$  značajno ( $P < 0,05$ ) ovisila o međusobnoj interakciji broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku i trajanju zrenja bračkog sira. U odnosu na navedeno vrijednost  $I_{\alpha}$  se značajno ( $P < 0,05$ ) smanjivala s povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku (tablica 24). Revilla i sur. (2007, 2011) su proveli dva istraživanja o utjecaju broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na udio kazeinskih frakcija u proizvedenim sirevima različitog stupnja zrelosti pri čemu je vrlo važno naglasiti da je tijekom navedenih istraživanja ovčje mlijeko u svom sastavu imalo znatno veći broj somatskih stanica u

odnosu na ovčje mlijeko za proizvodnju bračkog sira te je stoga prema njihovom udjelu bilo podjeljeno u 3 razreda (< 500.000, 1.000.000 – 1.500.000 i >2.500.000/ml). Revilla i sur. (2011) navode da  $\alpha_{s1}$  kazein u mladim ovčjim sirevima nije bio podvrgnut značajnijim promjenama bez obzira na broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje jer se udio njegovog razgradnog produkta odnosno  $\alpha_{s1}$ -I kazeina nije značajnije mijenjao. Autori navode značajniju razgradnju  $\beta$  kazeina što je dovelo do značajne promjene u udjelu njegovog razgradnog produkta odnosno  $\gamma$  kazeina. Nadalje, istražujući promjene udjela kazeinskih frakcija u ovčjim sirevima tijekom zrenja u trajanju od tri mjeseca Revilla i sur. (2007) su utvrdili da se udio  $\alpha_{s1}$  kazeina tijekom prvog mjeseca zrenja nije značajnije mijenjao bez obzira na broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje. Međutim, značajno smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$  kazeina s povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku za sirenje je utvrđeno u sirevima tijekom trećeg mjeseca njihova zrenja. Navedeni autori nadalje navode značajno smanjenje udjela  $\beta$  kazeina tijekom dva mjeseca zrenja da bi se u zadnjem mjesecu zrenja njegova razgradnja znatno usporila.

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku osim kohezivnosti značajno ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ) utjecalo na promjene pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira različitog stupnja zrelosti. Naknadnim testom je utvrđeno značajno ( $P < 0,05$ ) povećanje čvrstoće u prvom ciklusu kompresije i to osobito u bračkim sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka s više od 501.000 somatskih stanica/ml. Osim toga vidljivo je i značajno ( $P < 0,01$ ) povećanje lomljivosti i čvrstoće u drugom ciklusu kompresije, a navedeno povećanje je bilo osobito izraženije u bračkim sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka s više od 501.000 somatskih stanica/ml. Pored toga povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecalo na promjene vrijednosti zakašnjele elastičnosti (tablica 25). S povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku značajno ( $P < 0,01$ ) i kontinuirano se smanjivala adhezivnost bračkog sira (tablica 25). Promjene pokazatelja analize teksturnog profila bračkog sira su posljedica prije svega promjene njegovog sastava usljed povećanja broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku a osobito kada je taj broj bio iznad 501.000 somatskih stanica/ml. (tablica 23). Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku osim što se značajno ( $P < 0,01$ ) i kontinuirano povećao udio proteina (tablica 23), povećao se i stupanj njihove cjelovitosti (tablica 24) u bračkom siru pa je stoga bilo i očekivano da će se povećati i vrijednosti njegove lomljivosti odnosno čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije. Međutim iako su proteini temeljni sastojak o kojem ovise mehanička svojstva proteinske strukture sira (Masi i Addeo, 1986), teksturne značajke sireva ovise i o ostalim sastojcima koji su navedenim strukturom obuhvaćeni i utječu na njenu stabilnost (Van Hekken i sur., 2007). Povećanjem broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je pored značajnog ( $P < 0,01$ ) povećanja udjela proteina značajno ( $P < 0,05$ ) povećan i udio mliječne

masti što je posljedično utjecalo na smanjenje udjela vode u nemasnoj tvari bračkog sira. U prilog navedenom ide i utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija udjela mliječne masti ( $r = -0,67$ ) i proteina ( $r = -0,76$ ) s udjelom vode u nemasnoj tvari bračkog sira (tablica 35). S obzirom da je udio vode u nemasnoj tvari pokazatelj hidratacije proteina (Tunick i sur., 1993), kontinuirano smanjenje navedenog sastojka u bračkom siru utječe na povećanje vrijednosti lomljivosti odnosno čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije. U svezi s navedenim Rüegg, (1985) navodi da povećanje udjela vode u nemasnoj tvari sira u najvećoj mjeri pridonosi smanjenu njegove čvrstoće. Međutim, potrebno je obratiti pozornost i na činjenicu da je najveća vrijednost lomljivosti postignuta pri značajno ( $P < 0,05$ ) najmanjoj a najveća vrijednost čvrstoće u prvom ciklusu kompresije pri značajno ( $P < 0,05$ ) najvećoj deformaciji uzoraka bračkog sira. Prilikom naprezanja parakazeinska mreža je pružala otpor prema deformaciji te je stoga usljed pružanja otpora u uzorcima sireva utvrđen manji stupanj deformacije do točke u kojoj je došlo do puknuća odnosno prekida kontinuiteta u njenoj strukturi (tablica 25). Međutim nastavkom naprezanja nakon puknuća strukture parakazeinske mreže uzorci pokusnih sireva su u znatno manjoj mjeri pružali otpor te je posljedično tome u uzorcima sireva utvrđen veći stupanj deformacije (tablica 25). U odnosu na rezultate analize teksturnog profila predmetnog istraživanja Revilla i sur. (2009) su utvrdili da je broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje značajno utjecao na kohezivnost ali nije utjecao na čvrstoću proizvedenih sireva. Međutim, u odnosu na predmetno istraživanje autori su utvrdili da su sirevi proizvedeni od mlijeka s visokim brojem somatskih stanica imali veće vrijednosti adhezivnosti u odnosu na one čiji je broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje bio nizak. U odnosu na rezultate ovog istraživanja Pirisi i sur. (2000) nisu utvrdili značajane teksturne promjene u sirevima na početku odnosno nakon tri mjeseca zrenja bez obzira što je broj somatskih stanica u mlijeku za sirenje bio znatno viši u odnosu na istraživano mlijeko. Sirenjem mlijeka čiji je broj somatskih stanica prelazio 2.500.000/ml Revilla i sur. (2007) su dobili znatno mekše sireve u odnosu na one proizvedene od mlijeka s manje od 500.000/ml.

### **5.3.2. Utjecaj trajanja zrenja sira**

Većina nezrelih sireva proizvedenih enzimatskim zgrušavanjem mlijeka je povezana s neizraženim okusom, mirisom i bojom ali s izraženom elastičnošću koja se pri konzumaciji doživljava kao žilava konzistencija (Puđa, 2009; Tratnik i Božanić, 2012; Havranek i sur., 2014). Stoga, je zrenje vremensko razdoblje tijekom kojega su sirevi podvrgnuti brojnim kemijskim, biokemijskim, fizičkim i mikrobiološkim promjenama s ciljem postizanja poželjnog okusa, mirisa i teksture (Puđa, 2009). Promjene kemijsko-fizikalnog



sastava bračkog sira tijekom zrenja su prikazane u tablici 29. U tablici su prikazane i jednadžbe linearne regresije za pojedine fizikalno-kemijske parametre bračkog sira.

Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj trajanja zrenja na udio suhe tvari, mliječne masti i proteina u bračkom siru. Tijekom zrenja udio suhe tvari u bračkom siru je povećan s prosječnih 57,02 % u početku zrenja na 67,62 % na kraju zrenja, te je regresijskom analizom utvrđeno prosječno mjesečno povećanje navedenog sastojka od 2,62 %. Udio mliječne masti u bračkom siru se s 28,57 % u početku povećao na 35,02 % na kraju zrenja, s prosječnim regresijskim mjesečnim povećanje od 1,54 %, dok je udio proteina s početnih 23,00 % povećan na 26,87 % s tim da je prosječno regresijsko mjesečno povećanje bilo nešto niže i iznosilo je 0,91 % (tablica 29). Kao i u predmetnom istraživanju, povećanje udjela suhe tvari, mliječne masti i proteina je utvrđen i tijekom zrenja drugih ovčjih sireva kao npr. Fiore Sardo (Pirisi i sur., 2007), Manchego (Licón i sur., 2012), Roncal (Irigoyen i sur., 2001) i Los Pedroches (Sanjuán i sur., 2002). U odnosu na značajne ( $P < 0,01$ ) promjene udjela mliječne masti i proteina njihovi udjeli u suhoj tvari bračkog sira tijekom zrenja se nisu značajnije mijenjali (tablica 29). Također se može zamjetiti neznatno povećanje udjela mliječne masti i smanjenje udjela proteina u suhoj tvari tijekom prvog mjeseca zrenja bračkog sira da bi nakon toga navedeni udjeli do kraja zrenja ostali gotovo nepromjenjeni. U skladu s rezultatima predmetnog istraživanja Irigoyen i sur. (2001) navode gotovo sličan tijek promjena udjela mliječne masti i proteina u suhoj tvari Roncal sireva tijekom zrenja u trajanju od 180 dana. Tijekom predmetnog istraživanja je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj zrenja na pH vrijednost bračkog sira ali tijekom navedenih promjena je imao slabo izražen linearni trend. Ovim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj zrenja na udio soli u bračkom siru koji je s prosječnih 0,70 % u početku zrenja povećan na 2,09 % na kraju zrenja te je regresijskom analizom utvrđeno prosječno mjesečno povećanje navedenog sastojka od 0,32 %. Povećanje udjela suhe tvari, mliječne masti i proteina je prije svega posljedica značajnog ( $P < 0,01$ ) gubitka vode odnosno njenog udjela iz nemasne tvari bračkog sira pri čemu je navedenom gubitku pored mikroklimatskih uvjeta u zrionici pogodovalo i povećanja udjela soli tijekom zrenja. U prilog navedenom ide i značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između udjela soli i vode ( $r = -0,78$ ) u bračkom siru tijekom zrenja (tablica 35). Schroeder i sur. (1988) navode da je s povećanjem udjela soli u siru u rasponu od 0,7 do 1,44 %, došlo do smanjenja udjela vode u Cheddar siru u rasponu od 38,52 do 34,89 %. Prema tome soljenjem sira se potiče proces sinereze i smanjenje udjela vode u siru (Guinee i Fox, 2004). Slijedom navedenog Pastorino i sur. (2003a) tvrde da ulaskom soli u vodenu fazu sira dio vode hidratizira parakazeinsku mrežu, a dio zbog ograničene sposobnosti navedene mreže za vezivanje vode prelazi u njene međuprostore. Usljed pojačane hidratacije parakazeinska mreža povećava svoj obujam (Paulson i sur., 1998) što

posljedično smanjuje obujam njenih međuprostora (Pastorino i sur. 2003a). Soljenjem se povećava obujam vodene faze sira te usljed smanjenja obujma međuprostora unutar parakazeinske mreže dolazi do njenog otpuštanja iz sira. Međutim, važno je napomenuti da je izraženijem gubitku vode tijekom prvog mjeseca zrenja bračkog sira pored dvostrukog povećanja udjela soli u velikoj mjeri i pogodovalo smanjenje njegove pH vrijednosti. Predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između pH vrijednosti i udjela vode ( $r = -0,34$ ) u bračkom siru tijekom zrenja (tablica 35). Pastorino i sur. (2003b) navodi da smanjenje pH vrijednosti sa 5,3 na 4,7 potiče otapanje koloidnog kalcijevog fosfata iz parakazeinske mreže i povećanje topljivog kalcija sa 3,5 na 4,7 mg/g sira. Autori tvrde da smanjenje pH vrijednosti osobito ispod 5,0 dovodi do smanjenja negativnog naboja na miceli u strukturi parakazeinske mreže u siru čime se potiče međusobno povezivanje proteina odnosno njihova kontrakcija i otpuštanje vode. Osim toga smanjenjem pH vrijednosti ispod 5,0 smanjenjuje se i sposobnost proteina u vezivanju vode (Marchesseau i sur., 1997).

Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj zrenja na pokazatelje primarnih proteolitičkih promjena odnosno udjele  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina te udjele njihovih razgradnih produkata i pripadajućih indeksa zrelosti (tablica 30). Tijekom zrenja bračkog sira udio  $\beta$ -kazeina se smanjio s prosječnih 50,24 % u početku zrenja na 44,04 % na kraju zrenja s tim da je navedeno smanjenje je imalo slabo izražen linearni trend. Značajno ( $P < 0,01$ ) smanjenje cjelovitosti  $\beta$ -kazeina je povećalo udio  $\gamma$ -kazeina s prosječnih 4,30 % u početku zrenja na 23,67 % na kraju zrenja bračkog sira, a prosječno regresijsko mjesečno povećanje navedene kazeinske frakcije je iznosilo je 4,79 %. S obzirom na prosječnih 32,72 % u početku zrenja udio  $\alpha_{s1}$ -kazeina se smanjio na 14,64 % na kraju zrenja bračkog sira s prosječnim mjesečnim regresijskim smanjenjem navedenog sastojka od 4,45 %. Kao posljedica smanjenja cjelovitosti  $\alpha_{s1}$ -kazeina povećan je udio  $\alpha_{s1}$ -I kazeina s 6,41 % u početku zrenja na 14,47 % na kraju zrenja bračkog sira a prosječno mjesečno regresijsko povećanje navedenog sastojka je iznosilo 1,97 % (tablica 30). Slične promjene navedenih kazeinskih frakcija su utvrđene i tijekom zrenja Roncal (Irigoyen i sur., 2001), Ragusano (Fallico i sur., 2004) i Manchego (Gaya i sur., 1990) sireva. Iz rezultata predmetnog istraživanja je vidljiva izraženija razgradnja  $\alpha_{s1}$  u odnosu na  $\beta$ -kazein u bračkom siru. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da se tijekom zrenja bračkog sira udio  $\alpha_{s1}$  kazeina smanjio za 55,26 % dok je udio  $\beta$ -kazeina bio manji za 12,34 %. U skladu s rezultatima provedenog istraživanja izraženija razgradnja  $\alpha_{s1}$  u odnosu na  $\beta$ -kazein je utvrđena i tijekom zrenja Manchego (Pavia i sur., 1999), Pecorino (Santillo i Albenzio, 2008), Canestrato Pugliese (Albenzio i sur., 2001) i Fiore Sardo (Pirisi i sur., 2007). Smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$ -kazeina u ovčjim sirevima je ponajviše posljedica proteolitičke aktivnosti rezidualnog kimozina koji navedenu frakciju unutar

aminokiselinskog lanca primarno razgrađuje između Phe<sub>23</sub> i Phe<sub>24</sub> u dva dijela i to:  $\alpha_{s1}$  (f1-23) kojeg brzo razgrade starterske peptidaze i  $\alpha_{s1}$ -I (f24-199) iz kojeg daljnjom kimozijskom aktivnošću nastaju mobilnije frakcije (Trujillo i sur., 2000). Međutim, smanjenje cjelovitosti  $\beta$ -kazeina je posljedica proteolitičke aktivnosti plazmina dok je navedena kazeinska frakcija u manjoj mjeri tijekom zrenja većine vrsta sireva podvrgnuta proteolitičkom djelovanju rezidualnog kimozijskog (Fox i sur., 2000). Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj trajanja zrenja na pokazatelje sekundarnih proteolitičkih promjena odnosno udjele WSN (% TN), TCA-SN (%TN) i ukupnih slobodnih aminokiselina (tablica 30). Tijekom zrenja udio WSN (% TN) je povećan s prosječnih 6,77 % u početku zrenja na 22,13 % na kraju zrenja bračkog sira te je regresijskom analizom utvrđeno prosječno mjesečno povećanje navedenog sastojka od 3,86 %. Sličan smjer povećanja tijekom zrenja je pokazao i udio TCA-SN (%TN) koji je s prosječnih 3,02 % u početku zrenja povećao na 12,75 % na kraju zrenja s prosječnim mjesečnim regresijskim povećanjem navedenog sastojka od 2,49 %. U skladu s rezultatima ovog istraživanja sličan trend povećanja navedenih pokazatelja sekundarne proteolize je utvrđen i tijekom zrenja Krčkog (Mikulec i sur., 2008), Manchego (Pavia i sur., 1999, Licón i sur., 2012) i Pecorino (Santillo i Albenzio, 2008) sireva. Sousa i Malacata, (1997) su utvrdili povećanje udjela WSN (% TN) i TCA-SN (%TN) tijekom zrenja Serra da Estrela sireva bez obzira na vrstu korištenog sirila u njihovoj proizvodnji. U odnosu na prosječnih 0,18 % u početku zrenja udio ukupnih slobodnih aminokiselina se povećao na 2,40 % na kraju zrenja bračkog sira, s prosječnim mjesečnim regresijskim povećanjem navedenog sastojka od 0,58 % (tablica 30). Slično povećanje udjela ukupnih slobodnih aminokiselina je utvrđen tijekom zrenja Krčkog (Mikulec i sur., 2013), Idiazábal (Barcina i sur., 1995), Ossau-Iraty (Izco i sur., 2000) i Los Pedroches sireva (Sanjuán i sur., 2002).

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da je zrenje uz izuzeće adhezivnosti značajano ( $P < 0,01$ ) utjecalo na promjene pokazatelje analize teksturnog profila bračkog sira (tablica 31). Prosječna vrijednost lomljivosti tijekom zrenja bračkog sira je povećana s 23,61 N u početku zrenja na 43,99 N na kraju zrenja, te je regresijskom analizom utvrđeno prosječno mjesečno povećanje navedenog teksturnog pokazatelja od 5,44 N. Iz predmetnih rezultata je vidljivo da su vrijednosti lomljivosti imale suprotan tijek u odnosu na pripadajuće vrijednosti deformacija, pri kojima su navedene vrijednosti loma parakazeinske strukture postignute. U odnosu na prosječnih 54,02 % u početku zrenja vrijednost deformacije pri lomu parakazeinske strukture bračkog sira se smanjila na 24,86 % na kraju zrenja s prosječnim mjesečnim regresijskim smanjenjem navedenog teksturnog pokazatelja od 6,77 %. Smanjenje vrijednosti deformacije pri lomu parakazeinske strukture ukazuje na „kratku“ teksturu koja postaje sve više izraženija s

trajanjem zrenja sireva i znakovita je za većinu zrelih tvrdih sireva (Lucey i sur., 2003; Gunasekaran i Ak, 2003) pa tako i bračkog sira. Izraženija „kratka“ tekstura odnosno smanjenje vrijednosti deformacije pri lomu parakazeinske strukture je utvrđena i tijekom zrenja Manchego (Licón i sur., 2012), Fiore Sardo (Pirisi i sur., 2007) i Cheddar sira (Watkinson i sur., 1997). Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj zrenja na vrijednost čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira (tablica 31). Vrijednost čvrstoće u prvom ciklusu kompresije se povećala s prosječnih 30,49 N u početku zrenja na 55,87 N na kraju zrenja bračkog sira te je regresijskom analizom utvrđeno prosječno mjesečno povećanje navedenog teksturnog pokazatelja od 6,73 N. Iako se zrenjem značajno ( $P < 0,01$ ) mijenjala vrijednost deformacije pri postignutoj vrijednosti čvrstoće u prvom ciklusu kompresije iz rezultata naknadnog testa je vidljivo da je vrijednost navedenog teksturnog pokazatelja bila značajno najniža na početku zrenja sira da bi napredovanjem zrenja ostala gotovo nepromjenjena (tablica 31). Razlog navedenom je u činjenici da je tijekom prvog ciklusa kompresije primarno postignuta vrijednost čvrstoće s pripadajućom vrijednosti deformacije (53,11 %) da bi nakon toga daljnjim nastavkom deformacije (54,02 %) i u konačnici došlo do puknuća parakazeinske strukture sira (tablica 31). Međutim, nastavkom zrenja predmetni uzorci su bili podvrgnuti prvom ciklusu kompresije pri čemu je došlo do obrata odnosno primarno do puknuća parakazeinske strukture uzoraka pri postignutim vrijednostima deformacija (36,69 : 30,93 : 27,35 : 24,86 %), a nakon toga su postignute vrijednosti čvrstoće s pripadajućom vrijednosti deformacije (64,50 : 61,82 : 66,78 : 62,78 %). Prema tome uzorci sira su zbog ranijeg puknuća i gubitka cjelovitosti parakazeinske mreže izgubili sposobnost pružanja otpora pri njihovom naprezanju. Stoga Masi i Addeo, (1986) navode da mehaničke značajke sireva primarno ovise o strukturi parakazeinske mreže i njenoj otpornosti prema naprezanju i deformaciji. U usporedbi s prosječnih 16,64 N na početku zrenja vrijednost čvrstoće u drugom ciklusu kompresije bračkog sira se povećala na 44,76 N na kraju zrenja tim da je prosječno regresijsko mjesečno povećanje bio nešto više i iznosilo je 7,08 N. Prosječna vrijednost zakašnjele elastičnosti tijekom zrenja bračkog sira se smanjila s 0,59 u početku zrenja na 0,44 na kraju zrenja, ali tijekom navedenog smanjenja nije imalo izražen linearan trend. Osim toga važno je naglasiti da su vrijednosti zakašnjele elastičnosti nakon 30. dana pa sve do kraja zrenja bile poprilično ujednačene (tablica 31). Sličan trend zakašnjele elastičnosti te povećanja čvrstoće i lomljivosti tijekom zrenja Pecorino sireva navode i Rinaldi i sur. (2010). Razlog povećanja čvrstoće i lomljivosti tijekom zrenja bračkog sira prije svega treba tražiti u značajnom ( $P < 0,01$ ) povećanju udjela proteina, pojačanoj proteolitičkoj aktivnosti, povećanju udjela soli te smanjenju vode u nemasnoj tvari (tablice 29 i 30). Već je ranije navedeno da teksturne značajke sireva u najvećoj mjeri pored udjela proteina u siru ovise i o strukturi odnosno stupnju cjelovitosti

proteinske mreže (Prentice, 1994). Važno je naglasiti da je značajno ( $P < 0,01$ ) povećanje udjela proteina popraćeno istovremenim značajnim ( $P < 0,01$ ) povećanjem vrijednosti čvrstoće i lomljivosti bračkog sira iako je tijekom navedenog povećanja značajno smanjena njihova cjelovitost (tablice 29, 30 i 31). Međutim, promjena udjela vode u nemasnoj tvari sira je značajan čimbenik u nastanku znakovite teksture sireva tijekom njihovog zrenja (Tunick i sur., 1993). Smanjenje udjela vode u nemasnoj tvari sira tijekom zrenja je, osim njenog fizičkog otpuštanja usljed mikroklimatskih uvjeta u zrionici, i posljedica razgradnje proteina odnosno stupnja njihove hidratacije. Hidrolizom peptidnih veza unutar proteinskih lanaca u siru nastaju peptidi različite molekularne mase i slobodne aminokiseline odnosno oslobađaju se pozitivno i negativno nabijene amino i karboksilne skupine na koje se vežu dipolarne molekule vode (Creamer i Olson, 1982; Hort i Grys, 2001; Puđa, 2009). Autori navode da usljed toga dolazi do smanjenja slobodne vode a tekstura sireva zbog nastanka novog povezivanja zrenjem postaje čvršća i manje kohezivna. Lucey i sur. (2003) navode da proteolitičkom razgradnjom parakazeinske mreže peptidi različite molekularne mase postaju dio vodene faze sira i kao takvi ne pridonose strukturi i teksturi sira. Međutim, autori pretpostavljaju da dio proteolitičkih produkata ne prelazi u vodenu fazu već usljed njihove hidrofobnosti odnosno elektrostatičke međuzavisnosti stvaraju nove veze u sklopu proteinske strukture te na taj način pridonose čvršćoj teksturi sira. U skladu s navedenim, predmetnim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između udjela  $\alpha_{s1}$ -I kazeina i lomljivosti ( $r=0,22$ ) te čvrstoće pri prvom ( $r=0,21$ ) i drugom ( $r=0,30$ ) ciklusu kompresije (tablica 36). Nadalje, utvrđena je značajna ( $P < 0,01$ ) pozitivna korelacija između udjela  $\gamma$  kazeina i lomljivosti ( $r=0,36$ ) odnosno čvrstoće pri prvom ( $r=0,35$ ) i drugom ( $r=0,44$ ) ciklusu kompresije. U prilog navedenom ide i značajna pozitivna korelacija udjela WSN (%TN), TCA-SN (% TN) i ukupnih slobodnih aminokiselina s lomljivošću odnosno čvrstoćom pri prvom i drugom ciklusu kompresije (tablica 36). Osim toga povećanje čvrstoće sireva tijekom zrenja je i posljedica uzajamnog djelovanja udjela vode i soli u siru. Povećanjem udjela soli u siru povećava se njegova čvrstoća tijekom zrenja jer sol potiče hidrataciju proteina i na taj način pridonosi povećanju obujma proteinske mreže odnosno promjeni njene konformacije (Paulson i sur., 1998, Guinee i Fox, 2004). Stoga povećanje obujma proteinske mreže u značajnoj mjeri povećava sposobnost navedene mreže deformaciji pri njenom naprezanju (Pastorino i sur., 2003a). U odnosu na ranija istraživanja, povećanje udjela soli u siru povećava ionsku jakost vodene faze sira koja ne mijenja promjer parakazeinskih čestica unutar proteinske mreže, ne potiče otapanja proteina niti izlazak koloidnog kalcijevog fostafa iz proteinske strukture sira (Pastorino i sur., 2003a, Flourey i sur., 2009). Zrenjem bračkog sira prosječna vrijednost kohezivnosti se smanjila s prosječnih 0,23 u početku zrenja na 0,12 pri kraju zrenja te je regresijskom analizom

utvrđeno prosječno mjesečno smanjenje navedenog teksturnog pokazatelja od 0,03. Međutim, istraživanjem je utvrđeno da je povećanjem intenziteta primarne i sekundarne proteolize tijekom zrenja bračkog sira značajno ( $P < 0,01$ ) smanjena vrijednost njegove kohezivnosti (tablica 36). Smanjenje kohezivnosti usljed povećanja udjela soli u sirevima tijekom njihovog zrenja u svojim istraživanjima navode Pastorino i sur. (2003a) te Flourey i sur. (2009).

### 5.3.3. Utjecaj stadija laktacije

Rezultati naknadnog testa tijekom predmetnog istraživanja pokazuju da stadij laktacije nije značajnije utjecao na promjenu udjela proteina ali je imao značajan ( $P < 0,01$ ) utjecaj na kontinuitet smanjenja udjela proteina u suhoj tvari bračkog sira (tablica 26). Međutim s trajanjem laktacije je došlo do značajnog ( $P < 0,01$ ) kontinuiranog povećanja udjela mliječne masti i njenog udjela u suhoj tvari što je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecalo i na povećanje udjela suhe tvari u bračkom siru. U odnosu na rezultate provedenog istraživanja Raquena i sur. (1999) navode povećanje udjela mliječne masti odnosno smanjenje udjela proteina u Manchego sirevima proizvedenim od ovčjeg mlijeka do sredine laktacije. Autori navode smanjenje udjela mliječne masti s tim da je udio proteina ostao nepromjenjen u sirevima proizvedenim od sredine pa prema kraju laktacije. Trajanjem laktacije se značajno ( $P < 0,05$ ) smanjio udio vode u bračkom siru (tablica 26) što je i očekivano jer je predmetnim istraživanjem utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između udjela vode i udjela mliječne masti ( $r = -0,86$ ) u bračkom siru (tablica 35). Osim toga, utvrđena je značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između udjela vode i udjela mliječne masti u suhoj tvari ( $r = -0,31$ ) bračkog sira (tablica 35). Bez obzira jesu li brački sirevi proizvedeni od ovčjeg mlijeka ranog, srednjeg ili kasnog stadija laktacije udio soli, vode u nemasnoj tvari te njihova pH vrijednost se nisu značajnije mijenjali (tablica 26). U odnosu na navedene rezultate Jaeggi i sur. (2005) su utvrdili da su Manchego sirevi proizvedeni od ovčjeg mlijeka u početku laktacije bili masniji i s nižim udjelom proteina u odnosu na sireve srednjeg i kasnog stadija ali s poprilično ujednačenim udjelom vode tijekom laktacije. Osim toga autori navode da stadij laktacije nije utjecao na promjenu udjela vode u nemasnoj tvari, udjela soli te pH vrijednost u Manchego sirevima što je u skladu s rezultatima predmetnog istraživanja. Međutim, Sapru i sur. (1997) te Hickey i sur. (2006) navode da su Cheddar sirevi proizvedeni od mlijeka u ranoj laktaciji bili masniji te su imali niži udio vode u odnosu na one proizvedene od mlijeka srednjeg i kasnog stadija. Prema navedenim autorima najveći udio proteina su imali Cheddar sirevi proizvedeni u sredini laktacije dok se bez obzira na stadij laktacije udio vode u nemasnoj tvari, udio soli te pH vrijednost u navedenim sirevima nije mijenjala.

Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da stadij laktacije nije značajno utjecao na tijek proteolitičkih promjena u bračkom siru (tablica 27). Iz rezultata predmetnih istraživanja je vidljivo da se s trajanjem laktacije značajno ( $P < 0,05$ ) smanjivao udio  $\beta$ -kazeina s tim da je navedeno smanjenje popraćeno promjenom udjela  $\gamma$ -kazeina i vrijednosti  $I_{\gamma/\beta}$  ali navedene promjene nisu bile statistički značajne. Bez obzira na stadij laktacije udio  $\alpha_{s1}$ -kazeina,  $\alpha_{s1}$ -I-kazeina te vrijednost  $I_{\alpha}$  se nije značajnije mijenjalo. Manji udio cjelovitog  $\beta$ -kazeina u Cheddar sirevima proizvedenim od mlijeka pri kraju u odnosu na one proizvedene u ranom i srednjem stadiju laktacije navode Hinz i sur. (2012). Autori navode minimalnu razinu hidrolize  $\alpha_{s1}$ -kazeina u Cheddar sirevima tijekom cjelokupnog trajanja laktacije. Najveći stupanj hidrolize  $\alpha_{s1}$ -kazeina je utvrđen u mladim Cheddar sirevima proizvedenim od mlijeka na početku laktacije u odnosu na one proizvedene u ranom i srednjem stadiju dok je u sirevim iz srednjeg stadija laktacije utvrđen najveći stupanj hidrolize  $\beta$ -kazeina (Sapru i sur., 1997). Međutim, autori navode da su Cheddar sirevi čije je zrenje trajalo 6 mjeseci sadržavali podjednak udio  $\alpha_{s1}$ -kazeina neovisno o stadiju laktacije, a najmanji udio cjelovitog  $\beta$ -kazeina su sadržavali Cheddar sirevi kasnog stadija laktacije. Predmetnim istraživanjem nije utvrđen statistički značajan utjecaj stadija laktacije na udio WSN (% TN) u bračkom siru (tablica 27). Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazuju da su brački sirevi u srednjm stadiju laktacije imali najveći udio WSN (% TN) dok su oni pri kraju laktacije imali najmanji udio navedenog sastojka. Stadij laktacije je značajno ( $P < 0,01$ ) utjecao na udio TCA-SN (% TN) u bračkom siru te je utvrđeno da je udio navedenog sastojka bio najniži u sirevima iz kasnog stadija laktacije (tablica 27). Osim toga, ovim istraživanjem je utvrđena značajna ( $P < 0,01$ ) interakcija između udjela TCA-SN (% TN) i stadija laktacije. Najveći udio ukupnih slobodnih aminokiselina je utvrđen u bračkim sirevima proizvedenim u srednjem stadiju laktacije ali utvrđene razlike navedenog sastojka u istraživanim sirevima tijekom laktacije nisu bile statistički značajne. U odnosu na rezultate provedenog istraživanja Sapru i sur. (1997) navode gotovo nepromjenjen udio TCA-SN (% TN) u Cheddar sirevima tijekom cjelokupnog trajanja laktacije. Međutim, Perna i sur. (2014) zaključuju da su najveći udjeli WSN (% TN) i TCA-SN (% TN) utvrđeni u Caciocavallo sirevima proizvedenim od mlijeka na početku laktacije dok su udjeli navedenih sastojaka bili najmanji u sirevima proizvedenim od mlijeka iz srednjeg dijela proizvodnje.

Analizom teksturnog profila bračkog sira je utvrđeno da je stadij laktacije značajno ( $P < 0,01$ ) utjecao na vrijednosti lomljivosti i čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije dok se vrijednosti postignutih deformacija nisu značajnije mijenjale (tablica 28). Bez obzira da li su brački sirevi proizvedeni od mlijeka tijekom ranog, srednjeg ili kasnog stadije laktacije, vrijednosti adhezivnosti, kohezivnosti i zakašnjele elastičnosti se nisu značajnije mijenjale. Provedenim istraživanjem je utvrđeno značajno ( $P < 0,01$ ) i kontinuirano

povećanje vrijednosti lomljivosti i čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije s trajanjem laktacije. Razlog povećanja navedenih pokazatelja je prije svega posljedica značajnog ( $P < 0,05$ ) i kontinuiranog povećanja udjela kazeina i ionskog kalcija u ovčjem mlijeku s trajanjem laktacije (tablica 8). Smanjivanje vrijednosti lomljivosti i čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije je i posljedica smanjenja hidratiziranosti parakazeinske strukture jer je predmetnim istraživanjem utvrđeno značajno ( $P < 0,05$ ) i kontinuirano smanjenje udjela vode pri gotovo nepromjenjenom udjelu proteina u bračkom siru (tablica 26). Uvidom u dostupne literaturne podatke je utvrđen vrlo mali broj istraživanja o utjecaju stadija laktacije na promjene teksturnih značajki sireva. Van Hekken i sur. (2007) su utvrdili da su tijekom laktacijske proizvodnje kozjeg mlijeka sirevi u njenom srednjem dijelu imali najveće vrijednosti čvrstoće i kohezivnosti dok su najveće vrijednosti zakašnjele elastičnosti izmjerene na sirevima kasnog stadija laktacije.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Povećanje udjela kazeina u ovčjem mlijeku je značajano utjecalo na udio  $\beta$ -kazeina i vrijednost  $I_{\gamma/\beta}$  te smanjenje udjela WSN (% TN), TCA-SN (% TN) i slobodnih aminokiselina u bračkom siru. Utvrđen je značajan utjecaj udjela kazeina u ovčjem mlijeku na vrijednosti čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije te lomljivosti i zakašnjele elastičnosti bračkog sira.
2. Povećanje udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno smanjilo udio  $\gamma$ -kazeina i TCA-SN (%TN) u bračkom siru. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da se s povećanjem udjela mliječne masti u ovčjem mlijeku značajano smanjivale vrijednosti lomljivosti te čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira.
3. Povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno je povećan udio  $\beta$ -kazeina te udio njegovog razgradnog produkta u bračkom siru. Povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno je utjecalo na promjenu udjela  $\alpha_{s1}$ -I kazeina u bračkom siru. Ovim istraživanjem je utvrđeno da su se s povećanjem omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku značajno i kontinuirano povećavale vrijednosti lomljivosti te čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije bračkog sira. Osim toga, povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku je značajno utjecao na vrijednost deformacije u točki loma.
4. Povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku je značajno utjecalo na udio  $\beta$ -kazeina u bračkom siru i vrijednost  $I_{\gamma/\beta}$ . Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj koncentracije uree u ovčjem mlijeku na udio WSN (% TN), TCA-SN (% TN) i slobodnih aminokiselina u bračkom siru. Analizom teksturnog profila bračkog sira je utvrđeno da je povećanje koncentracije uree u ovčjem mlijeku značajno utjecalo na vrijednosti lomljivost te čvrstoće u prvom i drugom ciklusu kompresije.
5. Broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno utjecao na udio  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina u bračkom siru. Povećanje broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku je značajno utjecalo i na udio WSN (% TN), TCA-SN (% TN) te udio slobodnih aminokiselina u bračkom siru. Istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj povećanja broja somatskih stanica u ovčjem mlijeku na lomljivost, čvrstoću u drugom ciklusu kompresije, adhezivnost, zakašnjelu elastičnost te na vrijednosti deformacije u prvom ciklusu kompresije i točki loma bračkog sira.

6. Stadij laktacije je značajno utjecao na udio  $\beta$ -kazeina te na promjenu udjela WSN (% TN) i TCA-SN (% TN) bračkom siru. Analizom teksturnog profila bračkog sira je utvrđeno da je stadij laktacije značajno utjecao na lomljivost te čvrstoću u prvom i drugom ciklusu kompresije.
7. Predmetnim istraživanjem je utvrđen značajan utjecaj trajanja zrenja na smanjenje udjela  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$ -kazeina te na povećanje vrijednosti pokazatelja sekundarnih proteolitičkih promjena u bračkom siru. Istraživanjem je utvrđeno da je trajanjem zrenja značajno porasla lomljivost te čvrstoća u prvom i drugom ciklusu kompresije. Trajanjem zrenja je značajno smanjena kohezivnost i vrijednost deformacije u točki loma bračkog sira.

## 7. LITERATURA

1. Abilleira, E., Virto M., Nájera, A.I., Salmerón, J., Albisu, M., Pérez-Elortondo, F.J., Ruiz de Gordo, J.C., de Renobales, M., Barron, L.J.R. (2010): Effects of seasonal changes in feeding management under part-time grazing on the evolution of the composition and coagulation properties of raw milk from ewes. *Journal of Dairy science*, 93: 3902-3909.
2. Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobbetti, M. (2001): Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 35–48.
3. Albenzio, M., Carporese, M., Santillo, A., Marino, R., Taibi, L., Sevi, A. (2004): Effect of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 533-542.
4. Albenzio, M., Santillo, A., Carporese, M., d'Angelo, F., Marino, R., Sevi, A. (2009): Role of endogenous enzymes in proteolysis of sheep milk. *Journal of Dairy Science*, 92: 79-86.
5. Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Schena, L., Russo, D.E., Sevi, A. (2011): Composition, indigenous proteolytic enzymes and coagulating behaviour of ewe milk as affected by somatic cell count. *Journal of Dairy Research*, 78: 442-447.
6. Amenu, B., Deeth, H.C. (2007): The impact of milk composition on Cheddar cheese manufacture. *The Australian Journal Of Dairy Technology*, 62: 171-184.
7. An, Z., He X., Gao, W., Zhao, W., Zhang, W. (2014): Characteristics of miniature Cheddar-type cheese made by microbial rennet from *Bacillus amyloliquefaciens*: A comparison with commercial calf rennet. *Journal of Food Science*, 79: 214-221.
8. Angelopoulos, P.D., Zoidou, E.M. (2011): The effect of somatic cell count on the plasminogen, plasmin and plasminogen activator system in ewe milk. *Special Issue of the International Dairy Federation*: 51-53.
9. Antunac, N., Havranek, J., Samaržija, D. (1997): Somatske stanice u kozjem mlijeku. *Mljekarstvo*, 47: 123-134.
10. Antunac, N., Lukač Havranek, J. (1999): Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo*, 49: 241-254.
11. Antunac, N., Mioč, B., Mikulec, N., Kalit S., Pecina, M., Havranek, J., Pavić, V. (2007): Utjecaj paragenetskih čimbenika na proizvodnju i kvalitetu mlijeka istočnofrizijskih ovaca u Hrvatskoj. *Mljekarstvo*, 57: 195-208.

12. Antunac, N., Samaržija, D., Mioč, B., Pecina, M., Bendelja, D., Barać, Z. (2011): Utjecaj paragenetskih čindbenika na proizvodnju i kemijski sastav paških ovaca. *Mljekarstvo*, 61: 226-233.
13. Antunović, Z., Marić, I., Novoselić, J., Klir, Ž. (2015): Utjecaj stadija laktacije na kvalitetu mlijeka dubrovačke rude. *Proceedings - 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture*: 405-109.
14. Auld, M.J., Johnston, K.A., White, N.J., Fitzsimons, W.P., Boland, M.J. (2004): A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 71: 51–57.
15. Baković, A. (1952): Nerežišće - centar ovčjeg mljekarstva na Braču. *Mljekarstvo*, 2: 7-10.
16. Banks, J.M., Brechany, E.Y., Christie, W.W. (1989): The production of low fat Cheddar-type cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42: 6-9.
17. Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2007): Factors Affecting the Retention of Rennet in Cheese Curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9219–9225.
18. Bansal, N., Piraino, P., McSweeney, P.L.H. (2010): Determination of proteolysis in cheese. U: *Handbook of Dairy Food Analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 405-426.
19. Barać, Z., Mioč, B., Čokljat, Z. (2006): *Ovčarstvo u Primorsko-goranskoj županiji*. Hrvatski savez zadruga, Zagreb.
20. Barcina, Y., Ibáñez, F.C., Ordóñez, A.I. (1995): Evolution of free amino acids during Idiazábal cheese ripening. *Food Control*, 6: 161-164.
21. Bencini, R., Pulina, G. (1997): The quality of sheep milk: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37: 485–504.
22. Bendelja, D., Antunac, N., Mikulec, N., Vnučec, I., Mašek, T., Mikulec, Ž., Havranek, J. (2009): Koncentracija ureje u ovčjem mlijeku. *Mljekarstvo*. 59:3-10.
23. Bertola, N.C., Bevilacqua, A.E., Zaritzky, N.E. (1991): Changes in rheological and viscoelastic properties and protein breakdown during the ripening of Port Salut Argentino cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 26: 467-478.
24. Bertola, N.C., Califano, A.N., Bevilacqua, A.E., Zaritzky, N.E. (2000): Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 207–214.
25. Bertolino, M., Dolci, P., Giordano, M., Rolle, L., Zeppa, G. (2011): Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry*, 129: 1001–1011.

26. Bianchi, L., Bolla, A., Budelli, E., Caroli, A., Casoli, C., Pauselli, M., Duranti, E. (2004a): Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 2401-2408.
27. Bianchi, L., Casoli, C., Pauselli, M., Budelli, E., Caroli, A., Bolla, A., Duranti, E. (2004b): Effect of somatic cell count and lactation stage on sheep milk quality. *Italian Journal of Animal Science*, 3: 147-156.
28. Bland, J.H., Grandison, A.S., Fagan, C.C. (2015): Evaluation of milk compositional variables on coagulation properties using partial least squares. *Journal of Dairy Research*, 82: 8–14.
29. Bonelli, P., Dimauro, C., Re, R., Pilo, G., Dore, S., Cannas, A.E., Nicolussi, P.S. (2013): Peripheral blood and milk leukocytes subsets of lactating Sarda ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 12: 208-212.
30. Bornaz, S., Sahli, A., Attalah, A., Attia, H. (2009): Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: A comparison with goats', ewes' and cows' milks. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 505-513.
31. Bourne, M.C. (2002a): *Food Texture and Viscosity*. Elsevier.
32. Bourne, M.C. (2002b): Relationship between rheology and food texture. U: *Engineering and Food for the 21st century* CRC Press: 291-306.
33. Bryant, A., Ustunol, Z., Steffe, J. (1995): Texture of Cheddar cheese as influenced by fat reduction. *Journal of Food Science*, 60: 1216-1219.
34. Bugaud, C., Buchin, S., Noel, Y., Tessier, L., Pochet, S., Martin, B., Chamba, JF.(2001): Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. *Lait*, 81: 593-607.
35. Bylund, G. (1995): The chemistry of milk. U: *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB: 13-36.
36. Caballero Villalobos, J.C., Garzón Sigler, A.I., Oliete, B., Sánchez, R.A., Jiménez, L., Núñez Sánchez, N., Andrés, L., Martínez Marín, A.L. (2015): Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk. *Mljekarstvo*, 65: 138-143.
37. Calvo, M.M., Balcones, E. (2000): Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine, and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83: 1733-1739.
38. Calvo, M. (2002): Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropeptide formation. *European Food Research and Technology*, 214:182–185.
39. Cannas, A., Pes, A., Mancuso, R., Vodret, B., Nudda, A. (1998): Effect of dietary energy and protein concentration on the concentration of milk urea nitrogen in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 81: 499-508.

40. Cannas, A. (2002): Feeding of lactating ewes. U: *Dairy Sheep Nutrition*. Cabi Publishing: 79-108.
41. Caroprese, M., Marzano, A., Schena, L., Marino, R., Santillo, A., Albenzio, M. (2007): Contribution of macrophages to proteolysis and plasmin activity in ewe bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 2767-2772.
42. Castagnetti, G.B., Cuoghi, F., Gambini, G. (1995): Contenuto e variabilità di urea nel latte massale e sua relazione con alcuni parametri di significato tecnologico caseario. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, 27: 99-110.
43. Cottrill, B. (1998): The effect of milk urea on cheese yield and quality. *ADAS Bridgets Research Center. MAFF Project Code: WA0313*.
44. Coulon, J.B., Gasqui, P., Barnouin, J., Ollier, A., Pradel, P., Pomiès, D. (2002): Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research*, 51:383-393.
45. Creamer, L.K., Olson, N.F. (1982): Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47: 631-636.
46. Dalglish, D.G. (1994): The enzymatic coagulation of milk. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1*. An Aspen Publication: 63-93.
47. Daviau, C., Famelart, M.H., Pierre, A., Goudéranche, H., Maubois, J.L. (2000a): Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait*, 80: 397-415.
48. Daviau, C., Pierre, A., Famelart, M.H., Goudéranche, H., Jacob, D., Garnier, M., Maubois, J.L. (2000b): Residual amount of water in a draining curd of camembert cheese and physicochemical characteristics of the drained curd as modified by the pH at renneting, the casein concentration and the ionic strength of milk. *Lait*, 80: 555-571.
49. De Jong, L. (1978): Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 3. The micellar structure of Meshanger cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32: 15-25.
50. Defilippis, J. (1966): Neki aspekti regionalne razvijenosti i strukture poljoprivrede Dalmacije sa posebnim osvrtom na ovčarstvo. *Institut za jadranske kulture, Split*.
51. Dore, S., Bonelli, P., Nicolussi, P., Re, R., Pilo, G.A., Cannas, E.A. (2011): Variation in cell population and lymphocyte subpopulation in milk from Sarda dairy sheep in relation to the total somatic cell content. *Special Issue of the International Dairy Federation*: 31-33.
52. Drake, M.A., Gerard, P.D. (2009): Relationship between instrumental and sensory measurements of cheese texture. *Journal of Texture Studies*, 30: 451-476.

53. Đorđević, J. (1987): Sastav i osobine pojedinih komponenata mleka. U: Mleko - hemija i fizika mleka. *Naučna knjiga, Beograd*, 11-58.
54. El-Zeini, H.M. (2006): Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Polish Journal Of Food And Nutrition Science*, 2: 147-154.
55. Fallico, V., McSweeney, P.L.H., Siebert, K.J., Horne, J., Carpino, S., Licitra, G. (2004): Chemometric Analysis of Proteolysis During Ripening of Ragusano Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 3138–3152.
56. Feeney, E.P., Guinee, T.P., Fox, P.F. (2002): Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85: 1646-1654.
57. Fenelon, M.A., Guinee, T.P. (1999): The Effect of Milk Fat on Cheddar Cheese Yield and Its Prediction, Using Modifications of the Van Slyke Cheese Yield Formula. *Journal of Dairy Science*, 82: 2287–2299.
58. Fenelon, M.A., Guinee, T.P. (2000): Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheese manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 10: 151-158.
59. Fenelon, M.A., O'Connor, P., Guinee, T.P. (2000): The Effect of Fat Content on the Microbiology and Proteolysis in Cheddar Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science*, 83: 2173-2183.
60. Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J.P., Famelart, M.H. (2009): Reducing salt level in food Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure–texture relationships. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1611-1620.
61. Foegeding, E.A., Drake, M.A. (2007): Invited review: Sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 90: 1611-1624.
62. Folkertsma, B., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996): Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*, 6: 1117-1134.
63. Fortis, A. (1984): *Put po Dalmaciji*. Globus, Zagreb.
64. Fox, P.F., Cogan, T.M. (1994): Factors that affect the quality of cheese. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1*. An Aspen Publication: 583-608.
65. Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J., Tobin, J. (1996): Acceleration of cheese ripening. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 271–297.
66. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, M.T., McSweeney, P.L.H. (2000): *Fundamentals of Cheese Science*. An Aspen Publication.
67. Fox, P.F. (2009): Milk: an overview. U: *Milk proteins: from expression to food*. Elsevier: 1-54.

68. Fresno, M.R., Álvarez, S., Rodríguez, V., Castro, N., Argüello, A. (2006): Evaluation of the effect of rennet type on the texture and colour of goats cheese. *Journal of Applied Research*, 30: 157-160.
69. Fröhlich-Wyder, M.T., Bachmann, H.P. (2004): Cheeses with propionic acid fermentation. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.2*. Elsevier Academic Press: 141-156.
70. Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., Nuñez, M. (1990): Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73: 26-32.
71. Giaccone, P., Scatassa, M.L., Todaro, M. (2005): The influence of somatic cell count on sheep milk composition and cheese-making properties. *Italian Journal of Animal Science*, 4 (suppl.2): 345-347.
72. Giaccone, P., Todaro, M., Scatassa, M.L. (2007): Factors associated with milk urea concentrations in Girgentana goats. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (suppl.1): 622-624.
73. Giambra, I.J. (2011): Milk proteins. U: *Ovine milk proteins: DNA, mRNA, and protein analyses and their associations to milk performance traits. Doctoral Dissertation*. Faculty of Agricultural Sciences, Nutritional Sciences and Environmental Management, Justus-Liebig-University Gießen: 6-16.
74. Goff, H.D., Hill, A.R. (1993): Chemistry and Physics. U: *Dairy Science and Technology Handbook Volume 1. Principles and Properties*. Wiley-VCH, Inc: 2-62.
75. Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J.A., San Primitivo, F. (2002): Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, 85: 1460-1467.
76. Guinee, T.P., Puđa, P.D., Mulholland, E.O. (1994): Effect of milk protein standardization, by ultrafiltration, on the manufacture, composition and maturation of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 61: 117-131.
77. Guinee, T.P., Gorry, C.B., O'Callaghan, D.J., O'Kennedy, B.T., O'Brie, N., Fenelon, M.A. (1997): The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 99–106.
78. Guinee, T.P., Auty, M.A.E., Mullins, C., Corcoran, M.O., Mulholland, E.O. (2000a): Preliminary observations on effects of fat content and degree of fat emulsification on the structure-functional relationship of Cheddar-type cheese. *Journal of Texture Studies*, 10: 277-288.



79. Guinee, T.P., Auty, M.A.E., Fenelon, M.A. (2000b): The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 10: 277-288.
80. Guinee, P.T., Feeney, E.P., Fox, F.P. (2001): Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese 2. Texture and functionality. *Lait*, 81: 457-485.
81. Guinee, T.P., McSweeney, P.L.H. (2003): Significance of milk fat in cheese. U: *Advanced dairy chemistry, Volume:2, Lipids*. Springer: 377-440.
82. Guinee, P.T. (2004): Salting and role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 99-109.
83. Guinee, P.T., Fox, F.P. (2004): Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier Academic Press: 207-259.
84. Guinee, T.P., Kilcawley, K.N. (2004): Cheese as an Ingredient. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.2*. Elsevier Academic Press: 395-428.
85. Guinee, T.P., O'Kennedy, B.T., Kelly, P.M. (2006): Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 89: 468-482.
86. Guinee, T.P., Mulholland, E.O., Kelly, J., Callagan, O. (2007): Effect of protein to fat ratio of milk on the composition, manufacturing efficiency and yield of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 90: 110-123.
87. Guinee, T.P. (2011): Cheese rheology. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences Vol. 1*. Elsevier: 685-698.
88. Guinee, T.P., O'Brien, B. (2010): The quality of milk for cheese manufacture. U: *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell: 1-68.
89. Gunasekaran, S., Ak, M.M. (2003): *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press.
90. Haenlein, G.F.W. (2006): Goat milk. U: *Handbook of Milk of Non Bovine Mammals*. Blackwell Publishing: 11-135.
91. Haenlein, G.F.W., Wendorff, W.L. (2006): Sheep milk. U: *Handbook of Milk of Non Bovine Mammals*. Blackwell Publishing: 137-194.
92. Hallén, E., Lundén, A., Allmere, T., Andrén, A. (2010): Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, 77: 71-76.
93. Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014): *Sirarstvo*. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
94. Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Sheehan, E.M., Wilkinson, M.G. (2006): The influence of a seasonal milk supply on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 16: 679-690.

95. Hinz, K., O'Connor, P.M., O'Brien, B., Huppertz, T., Ross, R.P., Kelly, A.L. (2012): Proteomic study of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made from milk over a lactation cycle. *Journal of Dairy Research*, 79: 176–184.
96. Holsinger, V.H., Smith, P.W., Tunick, M.H. (1995): Overview: Cheese chemistry and rheology. U: *Chemistry of structure-function relationships in Cheese*. Plenum Press, New York: 1-6.
97. Horne, D.S; Banks, J.M. (2004): Rennet-induced coagulation of milk. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier Academic Press: 47-70.
98. Hort, J., Grys, G., Woodman, J. (1997): The relationships between the chemical, rheological and textural properties of Cheddar cheese. *Lait*, 77: 587-600.
99. Hort, J., Grys, G.L. (2001): Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 11: 475-481.
100. Hrković, A., Hodžić, A., Sarić, Z., Hamamdžić, M., Vegara, M., Šaljić, E., Juhas-Pašić, E. (2011): Utjecaj kemijskog sastava ovčjeg mlijeka na kemijski sastav Livanjskog i Travničkog sira. *Mljekarstvo*, 61: 175-181.
101. HRN ISO 9622 (2001): Punomasno mlijeko-Određivanje udjela mliječne masti, bjelančevina i laktoze-Upute za rad MID-infrared instrumentima. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
102. HRN EN ISO 13366-2 (2007): Mlijeko-Brojanje somatskih stanica-2. dio: Upute za rad Fluor-opto-elektronskim brojačem. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
103. HRN EN ISO 5534 (2008): Sir i topljeni sir-određivanje sadržaja suhe tvari. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
104. HRN ISO 3433 (2009): Sir-određivanje udjela masti-Van Gulikova metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
105. HRN EN ISO 5764 (2010): Mlijeko-određivanje točke leđišta-termistorsko krioskopska metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
106. HRN ISO 12081 (2010): Mlijeko-određivanje količine kalcija-titracijska metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
107. HRN ISO 17997 - 2 (2010): Mlijeko-određivanje udjela kazeinskog dušika 2. dio: direktna metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
108. HRN EN ISO 8968-1 (2014): Mlijeko-određivanje sadržaja dušika 1. dio: Kjeldalovo načelo i izdračunavanje sirovih proteina. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
109. Hrvatska poljoprivredna agencija (2002): *Godišnje izvješće za 2002 godinu*, Ovčarstvo: 91-104.
110. Hrvatska poljoprivredna agencija (2003): *Godišnje izvješće za 2003 godinu*. Ovčarstvo: 87-107.

111. Hurley, J.M., Larsen, L.B., Kelly, L.A., McSweeney, P.L.H. (2000): The milk acid proteinase cathepsin D: A review. *International Dairy Journal*, 10: 673-681.
112. Hynes, E. R., Aparo, L., Candiotti, M.C. (2004): Influence of residual milk-clotting enzyme on  $\alpha$ s1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, 87:565–573.
113. Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibáñez, F.C., Torre, P. (2001): Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chemistry*, 72: 137-144.
114. Irigoyen, A., Castiella, M., Ordóñez, A.I., Torre, P., Ibáñez, F.C. (2002): Sensory and instrumental evaluations of texture in cheese made from ovine milks with differing fat contents. *Journal of Sensory studies*, 17: 145-161.
115. Irudayaraj, J., Chen, M., McMahon, D.J. (1999): Texture development in Cheddar cheese during ripening. *Canadian Agricultural Engineering*, 41: 253-258.
116. Izco, J.M., Torre, P., Barcina, Y. (2000): Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*, 11: 7-11.
117. Jaeggi, J.J., Govindasamy-Lucey, S., Berger, J.M., Johnson, M.E., McKusick, B.C., Thomas, D.L., Wendorff, W.L. (2003): Hard ewe,s milk cheese manufactured from milk of three different groups of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*. 86: 3082-3089.
118. Jaeggi, J.J., Wendorff, W.L., Romero, J., Berger, Y.M., Johnson, M.E. (2005): Impact of Seasonal Changes in Ovine Milk on Composition and Yield of a Hard-Pressed Cheese. *Journal of Dairy Science*. 88: 1358-1363.
119. Janhøj, T., Qvist, K.B. (2010): The Formation of Cheese Curd. U: *Technology of cheesemaking*.Wiley-Blackwell: 130-165.
120. Jaramillo, D.P., Zamora, A., Guamis, B., Rodríguez, M., Trujillo, A.J. (2008): Cheesemaking aptitude of two Spanish dairy ewe breeds: Changes during lactation and relationship between physico-chemical and technological properties. *Small Ruminant Research*, 78: 48-55.
121. Johnston, K.A., Dunlop, F.P., Coker, C.J., Wards, S.M. (1994): Comparisons between the electrophoretic pattern and textural assessment of aged Cheddar cheese made using various levels of calf rennet or microbial coagulant (Rennilase 46L). *International Dairy Journal*, 4: 303-327.
122. Kalit, S. (1999): Somatske stanice i njihov utjecaj na proizvodnju i zrenje sira Podravca. *Magistarski rad*. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
123. Kalit, S., Havranek-Lukač, J., Čubrčić, V. (2002): Plazmin: indogena proteinaza mlijeka. *Mljekarstvo*, 52: 191-206.

124. Kalit, S., Havranek, J., Kapš, M., Perko, B. Čubrić Čurik, V. (2004.): Effect of somatic cell count (SSC) on cheese milk composition and yield efficiency of artisanal Tounj cheese. *Milchwissenschaft*, 59: 612-615.
125. Karapetkovska Hristova, V., Tomovska, J., Bonev, G., Dimitrov, S., Dimitrovska, G., Presilski, S., Ayaz Ahmad, M. (2014): Interrelationship between the milk urea nitrogen level and milk coagulation traits in Holstein- Friesian cows with reproductive disorders in R. Macedonia. *International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering*, 3: 199-207.
126. Kindstedt, P.S., Kiely, L.J., Gilmore, J.A. (1992): Variation in Composition and Functional Properties Within Brine-Salted Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 75:2913-2921.
127. Králíčková, Š., Pokorná, M., Kuchtík, J., Filipčík, R. (2012): Effect of parity and stage of lactation on milk yield composition and quality of organic sheep milk. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 1: 71-78.
128. Kuchtik, J., Šustova, K., Urban, T., Zapletal, D. (2008): Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes. *Czech Journal of Animal Science*. 53: 55-63.
129. Larsson, K.I., Andrén, A., Geurts, T.J., de Roos, A.L., Walstra, P. (1997): Association of chymosin with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH. *International Dairy Journal*. 7: 43–46.
130. Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J. (1987): Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70: 1748-1760.
131. Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y. (2011): Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Science & Technology*, 91: 247-282.
132. Le Quéré, J.L., Cayot, N. (2013): Instrumental assessment of the sensory quality of dairy products. U: *Instrumental assessment of Food Sensory Quality*, Woodhead Publishing Limited: 420-445.
133. Le Roux, Y., Colin, O., Laurent, F. (1995): Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 78:1289-1297.
134. Le Roux, Y., Laurent, F., Moussaoui, F. (2003): Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Veterinary Research*. 34: 629-645.
135. Lebecque, A., Laguet, A., Devaux, M.F., Dufour, É. (2001): Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods. *Lait*, 81: 609-623.

136. Leitner, G., Chaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Saran, A., Silanikove, N. (2004): Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science*, 87: 46-52.
137. Leitner, G., Silanikove, N., Merin, U. (2008): Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*, 74: 221-225.
138. Licón, C.C., Carmona, M., Molina, A., Berruga, M.I. (2012): Chemical, microbiological, textural, color, and sensory characteristics of pressed ewe milk cheeses with saffron. *Journal of Dairy Science*, 95: 4263-4274.
139. Lin, M.J. (2002): Measurement of ionic calcium and its role in milk stability. *Doctoral Dissertation*. The University of Reading, UK: 115-140.
140. Lteif, L., Olabi, A., Kebbe Baghdadi, O., Toufeili, I. (2009): The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced-fat, and low-fat ovine and bovine Halloumi. *Journal of Dairy Science*, 92: 4135–4145.
141. Lucey, J.A., Fox, P.F. (1993): Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. *Journal of Dairy Science*. 76: 1714-1724.
142. Lucey, A.J., Johnson, E.M., Horne, S.D. (2003): Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86: 2725-2743.
143. Lucey, J.A. (2009): Milk protein gels. U: *Milk Proteins: from Expression to Food*. Elsevier: 450-458.
144. Lucey, J.A. (2011): Rennet-Induced Coagulation of Milk. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences vol. 1*. Elsevier: 579-584.
145. Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M. (2007): Faktori koji utiču na koagulaciju mleka sirilom. U: *Proteini mleka*. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun: 227-243.
146. Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, M.E. (2005): Rheology, microstructure, and functionality of low-fat iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88: 3052-3062.
147. Malacarne, M., Franceschi, P., Formaggioni, P., Sandri, S., Mariani, P., Summer, A. (2014): Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *Journal of Dairy Research*, 81: 129-136.
148. Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., Cuq, J.L. (1997): Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 80:1483–1489.
149. Marenjak, T.S., Poljičak Milas, N., Stojević, Z. (2004): Svrha određivanja koncentracije ureje u kravljem mlijeku. *Praxis Veterinaria*. 52: 233-241.

150. Markiewicz-Kęszycka, M., Czyżak-Runowska, G., Lipińska, P., Wójtowski, J. (2013): Fatty acid profile of milk – A review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57: 135-139.
151. Martí De Olives, A., Díaz, J.R., Molina, M.P., Peris, C. (2013): Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*, 96: 7698-7708.
152. Martin, B., Coulon, J.B., Chamba, J.F., Bugaud, C. (1997): Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. *Lait*, 77: 505-514.
153. Masi, P., Addeo, F. (1986): An examination of some mechanical properties of a group of Italian cheeses and their relation to structure and conditions of manufacture. *Journal of Food Engineering*, 5: 217-229.
154. Mateo, M.J., Everard, C.D., Fagan, C.C., O'Donnell, C.P., Castillo, M., Payne, F.A., O'Callaghan, D.J. (2009): Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. *International Dairy Journal*, 19: 264–268.
155. Mauriello, R., Caira, S., De Pascale, S., Pirisi, A., Piredda, G., Addeo, F., Chianese, L. (2007): Influence of somatic cell count on ewe's milk composition with particular reference to casein fraction. *Special Issue of the International Dairy Federation*:134-137.
156. McGann, T.C.A., Fox, P.F. (1974): Physico-chemical properties of casein micelles reformed from urea-treated milk. *Journal of Dairy Research*, 41: 45-53.
157. McMahan, D.J., Oommen, B.S. (2013): Casein micelle structure, functions, and interactions. U: *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A: Proteins: Basic Aspects*. Springer: 185-210.
158. McSweeney, P.L.H. (1993): Primary proteolysis of caseins in Cheddar cheese. *Doctoral Dissertation*. University College Cork, Department of Food Chemistry.
159. McSweeney, P.H.L., Sousa, M.J. (2000): Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80: 293-324.
160. McSweeney, H.L.P. (2004): Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 127-140.
161. McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (2004): Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier academic press: 361-371.
162. McSweeney, P.L.H. (2007): Conversion of milk to curd. U: *Cheese problems solved*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England: 50-69.

163. Mikolayunas, C.M., Thomas, D.L., Albrecht, K.A., Combs, D.K., Berger, Y.M., Eckerman, S.R. (2008): Effects of supplementation and stage of lactation on performance of grazing dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 91: 1477-1485.
164. Mikulec, N., Kalit, S., Havranek, J., Antunac, N., Horvat, I., Prpić, Z. (2008): Characteristics of traditional Croatian ewe's cheese from the island Krk. *International Journal of Dairy Technology*, 61: 126-132.
165. Mikulec, N., Habuš, I., Antunac, N., Vitale, Lj., Havranek, J. (2013): Free amino acid profile during ripening of ewe's milk cheese from the Croatian island Krk. *International Journal of Dairy Technology*, 66: 1-6.
166. Milesi, M.M., McSweeney, P.L.H., Hynes, E.R. (2008): Impact of chymosin and plasmin mediated primary proteolysis on the growth and biochemical activities of Lactobacilli in miniature Cheddar-type cheeses. *Journal of Dairy Science*, 91: 3277-3290.
167. Mioč, B., Pavić, V., Havranek, D., Vnučec, I. (2004): Čimbenici proizvodnosti i kemijskog sastava ovčjeg mlijeka. *Stočarstvo*, 58: 103-115.
168. Mioč, B., Ivanković, A., Rako, A., Pavić, V. (2013): Sustavi animalne proizvodnje u mediteranskoj Hrvatskoj. *Zbornik radova sa znanstvenog skupa: Šumarstvo i poljoprivreda hrvatskog središnjeg europske unije: 271-285.*
169. 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, 190–212.
170. Mistry, V.V., Kasperson, K.M. (1998): Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 81: 1214-1221.
171. Moatsou, G., Samolada, M., Katsabeki, A., Anifantakis, E. (2004): Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait*, 84: 285-296.
172. Moiny, V., Meullenet, J., Xiong, R. (2002): Uniaxial compression of Cheddar cheese at various loading rates and its correlation to sensory texture. *Journal of Texture Studies*, 33: 237-254.
173. Molle, G., Landau, S. (2011): Sheep: Feeding Management. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences vol. 1*. Elsevier: 848-856.
174. Møller, K.K., Rattray, F.P., Bredie, W.L.P., Høier, E., Ardö, Y. (2013): Physicochemical and sensory characterization of Cheddar cheese with variable NaCl levels and equal moisture content. *Journal of Dairy Science*, 96: 1953-1971.
175. Mulvihill, D.M., Fox, P.F. (1977): Proteolysis of  $\alpha$ s1-casein by chymosin: influence of pH and urea. *Journal of Dairy Research*, 44: 533-540.

176. Mulvihill, D. M., Fox, P.F. (1978): Proteolysis of bovine  $\beta$ -casein by chymosin: influence of pH, urea and sodium chloride. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 2: 135-139.
177. Mulvihill, D.M., Fox, P.F. (1980): Proteolysis of bovine  $\alpha$ s1-casein by chymosin in dilute NaCl solutions and in Cheddar cheese. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 4: 13-23.
178. Nájera, A.I., Barron, L.J.R., Ribeiro, P., Pèlissier, F., Abilleira, E., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Salmerón, J., Ruiz de Gordóa, J.C., Virto, M., Oregi, L., Ruiz, R., de Renobales, M. (2009): Seasonal changes in the technological and compositional quality of ewe's raw milks from commercial flocks under part-time grazing. *Journal of Dairy Research*, 76: 301-307.
179. Ng-Kwai-Hang, K.F., Politis, L., Cue, R.L., Marziali, A.S. (1989): Correlations between coagulation properties of milk and cheese yielding capacity and cheese composition. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22: 291-294.
180. Nian, Y., Chen, B.Y., Aikman, P., Grandison, A., Lewis, M. (2012): Naturally occurring variations in milk pH and ionic calcium and their effects on some properties and processing characteristics of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 65: 490-497.
181. Novotná, L., Kuchtík, J., Dobeš, I., Šustová, K., Zajícová, P. (2007): Effect of somatic cell count on ewe's milk composition, its properties and the quality of rennet curd. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55: 59-64.
182. Nudda, A., Feligini, M., Battacone, G., Murgia, P., Pulina, G. (2001): Relationship between somatic cells count, whey protein and coagulation properties in sheep milk. *Proceedings of the ASPA XIV Congress*: 511–513.
183. Nudda, A., Feligini, M., Battacone, G., Macciotta, N.P.P., Pulina, G. (2003): Effects of lactation stage, parity,  $\beta$ -lactoglobulin genotype and milk SCC on whey protein composition in Sarda dairy ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 2: 29-39.
184. O'Callaghan, D.J., Guinee, T.P. (2004): Rheology and Texture of Cheese. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier Academic Press: 511-540.
185. O'Mahony, J.A., Sousa, M.J., McSweeney, P.L.H. (2003): Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 52-58.
186. O'Mahony, J.A., Lucey, J.A., McSweeney, P.L.H. (2005a): Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88: 3101-3114.



187. O'Mahony, J.A., Auty, M.A.E., McSweeney, P.L.H. (2005b): The manufacture of miniature Cheddar-type cheeses from milks with different fat globule size distributions. *Journal of Dairy Research*, 72: 338-348.
188. Ong, L., Dagastine, R.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2012): The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. *Food Research International*. 48: 119-130.
189. Ong, L., Dagastine, R.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2013): Microstructure and composition of full fat Cheddar cheese made with ultrafiltered milk retentate. *Foods*, 2: 310-331.
190. Owen, C.A., Campbell, E.J. (1999): The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of Leukocyte Biology*, 65: 137-150.
191. Paape, M. J., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J.C., Capuco, A.V. (2001): Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*. 84 E Suppl: 237-244.
192. Pandey, P.K., Ramaswamy, H.S., St-Gelais, D. (2000): Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Research International*, 33: 655-663.
193. Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68: 88-113.
194. Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J. (2003a): Effect of Salt on Structure-Function Relationships of Cheese. *Journal of Dairy Science*. 86: 60-69.
195. Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J. (2003b): Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-Function Relationships of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*. 86: 2751-2760.
196. Paulson, B.M., McMahon, D.J., Oberg, C.J. (1998): Influence of sodium chloride on appearance, functionality and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 81: 2053–2064.
197. Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. (1999): Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal of Dairy Science*, 83: 1414-1447.
198. Pavić, V., Antunac, N., Mioč, B., Ivanković, A., Havranek, L.J. (2002): Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech journal of Animal Science*. 47: 80-84.
199. Pearse, M.J., Mackinlay, A.G. (1989): Biochemical Aspects of Syneresis: A Review. *Journal of Dairy Science*, 72: 1401-1407.

200. Pellegrini, O., Remeuf, F., Rivemale, M. (1994): Evolution of physico-chemical characteristics and renneting properties of ewe's milk collected in the Roquefort area. *Lait*, 74: 425-442.
201. Pellegrini, O., Remeuf, F., Rivemale, M., Barillet, F. (1997): Renneting properties of milk from individual ewes - influence of genetic and non-genetic variables, and relationship with physicochemical characteristics. *Journal of Dairy Research*, 64: 355-366.
202. Pengov, A. (2001): The role of coagulase-negative staphylococcus spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 84: 572-574.
203. Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Gambacorta, E. (2014): Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 97:1909–1917.
204. Pinho, O., Mendes, E., Alves, M.M., Ferreira I.M.P.L.V.O. (2004): Chemical, physical, and sensorial characteristics of “Terrincho” ewe cheese changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science*, 87: 249-257.
205. Pinto, G., Caira, S., Nicolai, M.A., Mauriello, R., Cuollo, M., Pirisi, A., Piredda, G., Chianese, L., Addeo, F. (2013): Proteolysis and partial dephosphorylation of casein are affected by high somatic cell counts in sheep milk. *Food Research International*. 53: 510-521.
206. Pirisi, A., Pirreda, G., Corona, M., Pes, M., Pintus, S., Ledda, A. (2000): Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheeseyield and cheese quality. *6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium.Proceedings, Ontario, Canada*: 47–59.
207. Pirisi, A., Pinna, G., Addis, M., Piredda, G., Mauriello, R., De Pascale, S., Caira, S., Mamone, G., Ferranti, P., Addeo, F., Chianese, L. (2007): Relationship between the enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal*, 17: 143-156.
208. Politis, I., Ng-Kwai-Hang, K.F. (1988): Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and Cheese making efficiency. *Journal of Dairy Science*, 71: 1711-1719.
209. Politis, I., Bizelis, I., Rogdakis, E. (2002): The urokinase-plasminogen activator system in ovine macrophages and neutrophils. *Small Ruminant Research*, 44: 17-23.
210. Polychroniadou, A., Vafopoulou, A. (1985): Variations of Major Mineral Constituents of Ewe Milk During Lactation. *Journal of Dairy Science*, 68: 147-150.
211. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (2000). *Narodne novine* br: 102.
212. Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (2010). *Narodne novine* br: 110.

213. Prentice, J.H. (1994): Cheese rheology. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1*. An Aspen Publication: 299-343.
214. Puđa, P. (2009): *Tehnologija mleka 1, Sirarstvo - opšti deo*. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
215. Ramkumar, C. (1997): The effect of pH shift on early cheese maturation. *Doctoral Dissertation*, Food technology, Massey University.
216. Ramos, M., Juarez, M. (2011): Sheep milk. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences Vol. 3*. Elsevier: 494-502.
217. Raquena, R., Molina, P., Fernandez, N., Rodriguez, M., Peris, C., Torres, A. (1999): Changes in milk and cheese composition throughout lactation in Manchega sheep. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Milking of Small Ruminants*, EAAP Publication No. 95, Wageningen: 501-506.
218. Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., de Cremoux, R., Gonzalo, C. (2007): Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, 68: 126-144.
219. Remeuf, F., Cassin, V., Dervin, C., Lenoir, J., Tomassone, R. (1991): Relationships between physico-chemical characteristics of milks and their cheese-making properties. *Lait*, 71: 397-421.
220. Renfu Lu, R., Abbott, J.A. (2004): Force/deformation techniques for measuring texture. U: *Texture in food, volume 2: Solid foods*. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC: 109-145.
221. Revilla, I., Rodríguez-Nogales, J.M., Vivar Quintana, A.M. (2007): Proteolysis and texture of hard ewe's milk cheese during ripening as affected by somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*, 74: 127-136.
222. Revilla, I., Rodríguez-Nogales, J.M., Vivar Quintana, A.M. (2009): Effect of somatic cell counts on ewes' milk protein profile and cheese-making properties in different sheep breeds reared in Spain. *Journal of Dairy Research*, 76: 210-215.
223. Revilla, I., Rodríguez-Nogales, J. M., Vivar-Quintana, A.M. (2011): Effects of somatic cells on the protein profile of hard ovine cheese produced from different breeds. *Journal of Dairy Research*, 78: 279–286.
224. Rinaldi, M., Chiavaro, E., Massini, R. (2010): Pecorino of Appennino Reggiano cheese: evaluation of ripening time using selected physical properties. *Italian Journal of Food Science*, 22: 55-59.
225. Ritzoulis, C. (2013): Rheology. U: *Introduction to the Physical Chemistry of Foods*. CRC Press: 157-171.

226. Rodríguez-Nogales, J.M., Vivar-Quintana, A.M., Revilla, I. (2007): Influence of Somatic Cell Count and Breed on Capillary Electrophoretic Protein Profiles of Ewes' Milk: A Chemometric Study. *Journal of Dairy Science*, 90: 3187-3196.
227. Rogers, N.R., McMahon, D.J., Daubert, C.R., Berry, T.K., Foegeding, E.A. (2010): Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 93:4565–4576.
228. Rohm, H., Jaros, D. (2002): Rheology of milk and dairy products-Instrumentation.U: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier: 2438-2445.
229. Rudan, M.A., Barbano, D.M., Yun, J.J., Kindstedt, P.S. (1999): Effect of Fat Reduction on Chemical Composition, Proteolysis, Functionality, and Yield of Mozzarella Cheese<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 82: 661-672.
230. Rüegg, M. (1985): Water in dairy products related in quality with special reference to cheese. U: *Properties of water in foods in relation to quality and stability*. Martinus Nijhoff Publishers: 603-625.
231. Samaržija, D. (2003): Kvaliteta ovčjeg mlijeka i specifičnost ovčjih autohtonih sireva. *Peto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj*. Zbornik predavanja: 74-82.
232. Sánchez-Macías, D., Fresno, M., Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-dela Nuez, A., Álvarez, S. (2010): Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat, and low-fat artisan-style goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 93: 3950-3956.
233. Sánchez-Macías, D., Morales-dela Nuez, A., Moreno-Indias, I., Hernández-Castellano, L.E., Mendoza-Grimón, V., Castro, N., Argüello, A. (2011): Lipolysis and proteolysis profiles of fresh artisanal goat cheese made with raw milk with 3 different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 94: 5786–5793.
234. Santillo, A., Albenzio, M. (2008): Influence of lamb rennet paste containing probiotic on proteolysis and rheological properties of Pecorino cheese. *Journal of Dairy Science*, 91:1733–1742.
235. Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. (2002): Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78: 281-289.
236. Sapru, A., Barbano, M.D., Yun, J.J., Klei, R.L., Oltenacu, A.P., Bandler, K.D. (1997): Cheddar cheese: Influence of milking frequency and stage of lactation on composition and yield. *Journal of Dairy Science*, 80: 437-446.
237. Schroeder, C.L., Bodyfelt, F.W., Wyatt, C.J., McDaniel, M.R. (1988): Reduction of sodium chloride in Cheddar cheese: Effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science*, 71: 2010-2020.

238. Sevi, A., Albenzio, M., Taibi, L., Dantone, D., Massa, S., Annicchiarico, G. (1999): Changes of somatic cell count through lactation and their effects on nutritional, renneting and bacteriological characteristics of ewe's milk. *Advances in Food Sciences*, 3/4: 122-127.
239. Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A., Muscio, A. (2004): Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research*, 51: 251-259.
240. Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N.Y., Considine, T., Schaffner, A., Drake, M.A. (2003): Effects of standardization of whole milk with dry milk protein concentrate on the yield and ripening of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86: 1608-1615.
241. Sheehan, J.J., Guinee, T.P. (2004): Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 14: 161-172.
242. Sihufe, G.A., Zorrilla, S.E., Rubiolo, A.C. (2010): The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 247-253.
243. Solorza, J.F., Bell, E.A. (1998): Effect of calcium on the mineral retention and cheesemaking parameters of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 51: 37-43.
244. Soodam, K., Ong L., Powell, I.B., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2014): The effect of milk protein concentration on the microstructure and textural properties of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food and Bioprocess Technology*, 7: 2912-2922.
245. Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., De Rosa, D. (1997): Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80: 1851-1865.
246. Sousa, M.J., Malcata, F.X. (1997): Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 74-81.
247. Sousa, J.M., Ardö, Y., McSweeney, H.L.P. (2001): Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11: 327-345.
248. Souza, F.N., Blagitz, M.G., Penna, C.F.A.M., Della Libera, A.M.M.P., Heinemann, M.B., Cerqueira, M.M.O.P. (2012): Somatic cell count in small ruminants Friend or foe?. *Small Ruminant Research*. 107: 65-75.
249. SPSS (2012): SPSS 21, *Base and advanced statistics*. IBM Corporation, North castle drive, New York, USA.
250. Stepaniak, L. (2004): Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 153-171.

251. 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: 215-229.
252. Summer, A., Malacarne, M., Sandri, S., Formaggioni, P., Mariani, P., Franceschi, P. (2012): Effects of somatic cell count on the gross composition protein fractions and mineral content of individual ewe's milk. *African Journal of Biotechnology*, 97: 16377-16381.
253. Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): *Mlijeko i mliječni proizvodi*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
254. Trujillo, A. J., Guamis, B., Carretero, C. (1995): Proteolysis of goat  $\beta$ -casein by calf rennet under various factors affecting the cheese ripening process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1472-1478.
255. Trujillo, A.J., Guamis, B., Laencina, J., López, M.B. (2000): Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry*, 71: 449-457.
256. Tunick, M.H., Malin, E.L., Smith, P.W., Shieh, J.J., Sullivan, B.C., Mackey, K.L., Holsinger, V.H. (1993): Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 76: 3621–3628.
257. Tunick, M.H. Shieh, J.J. (1995): Rheology of reduced-fat Mozzarella cheese. U: *Chemistry of Structure-function Relationships in Cheese*. Plenum Press, New York: 7-19.
258. Umbertalle, A., Profiti, M., Battaglini, L.M., Mimosi, A., Fortina, R. (1998): Milk urea nitrogen of Italian Friesian and Valdostana RP dairy cattle. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49: 249-265.
259. Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Fox, P.F. (2004): Proteolysis in Cheese during ripening. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier Academic Press: 391-433.
260. Upreti, P., McKay, L.L., Metzger, L.E. (2006): Influence of Calcium and Phosphorus, Lactose, and Salt-to-Moisture Ratio on Cheddar Cheese Quality Changes in Residual Sugars and Water-Soluble Organic Acids During Ripening. *Journal of Dairy Science*, 89: 429-443.
261. Ustunol, Z., Kawachi, K., Steffe, J. (1995): Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *Journal of Food Science*, 60: 1208-1210.
262. Van den Berg, G., Exterkate, F.A. (1993): Technological parameters involved in cheese ripening. *International Dairy Journal*, 3: 485 507.

263. Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Soryal, K.A., Zeng, S.S. (2007): Proteolytic and rheological properties of aging Cheddar - like caprine milk cheeses manufactured at different times during lactation. *Journal of Food Science*, 72: 115-119.
264. Van Hekken, D.L., Park, Y.W., Tunick, M.H. (2013): Effects of reducing fat content on the proteolytic and rheological properties of Cheddar-like caprine milk cheese. *Small Ruminant Research*, 110: 46-51.
265. Van Hooydonk, A.C.M., Hagedoorn, H.G., Boerrigter, I.J. (1986a): The effect of various cations on the renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40: 369-390.
266. Van Hooydonk, A.C.M., Boerrigter, I.J., Hagedoorn, H.G. (1986b): pH induced physicochemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 40: 297–313.
267. Verdi, R., Barbano, D.M. (1991): Properties of proteases from somatic cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 74: 2077–2081.
268. Vintila, C., Marcu, A. (2011): Milk urea disappears during milk processing into cheese. *Animal Science and Biotechnologies*, 44: 455-457.
269. Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (2006): *Dairy science and technology*. Taylor & Francis.
270. Watkinson, P., Boston, G., Campanella, O., Coker, C., Johnston, K., Luckman, M., White, N. (1997): Rheological properties and maturation of New Zealand Cheddar. *Lait*, 77: 109–120.
271. Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., White, N. (2001): Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11: 455–464.
272. Wen, X. (2014): The dissociation of caseins aggregates. U: Effects of urea addition on the structural and material properties of caseinate solutions and emulsions. *Master Thesis*. Massey University Manawatu, New Zealand.
273. Wendorff, W.L. (2002): Milk composition and cheese yield. *Proceedings of the 8th Great Lakes Dairy sheep symposium*: 104-117.
274. Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N.(2005): Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15: 817-830.
275. Yamaughi, K., Tsugo, T. (1960): On the urea denaturation paracasein. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 24: 101-104.
276. Yasar, K., Guzeler, N. (2011): Effects of coagulant type on the physicochemical and organoleptic properties of Kashar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 372-379.

277. Zoon, P., van Vliet, T., Walstra, P. (1988): Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 3. The effect of calcium and phosphate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42: 295-312.



## Životopis autora

Ante Rako rođen je 16. kolovoza 1966. godine u Imotskom gdje završava osnovnu i srednju školu. Na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je 1992. godine obranio diplomski rad pod naslovom "Proizvodni rezultati nesilica Isabrown na farmi Agrokoka Imotski" te stekao zvanje diplomirani inženjer agronomije – smjer stočarstvo. Nakon završetka studija zapošljava se u poduzeću Kooperacija d.d. iz Virovitice na poslovima tehnologa u stočarskoj proizvodnji. Nakon odlaska iz Virovitice zapošljava se u Uredu državne uprave u Splitsko-dalmatinskoj županiji, Ispostavi Imotski na administrativnim poslovima iz područja poljoprivrede. Godine 2006. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je obranio magistarski rad naslova "Runovički sir - tehnologija i kvaliteta" te stekao zvanje magistra znanosti. Od 2009. godine zaposlen je u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu gdje kao suradnik u nastavi sudjeluje u nastavi studija Mediteranska poljoprivreda (moduli: Osnove stočarstva, Uzgoj i korištenje ovaca, Uzgoj i korištenje koza). Bio je voditelj na tri istraživača projekta i to:

- Unapređenje i prilagodba kvalitete ovčjeg mlijeka dalmatinske pramenke kao temelj proizvodnje tradicijskih dalmatinskih ovčjih sireva (2011. – 2012. godina),
- Očuvanje i prepoznatljivost autohtonog Bračkog sira (2011. – 2013. godina),
- Tehnologija i kvaliteta bračke skute (2014. – 2015.).

Projekte je financirala Splitsko-dalmatinska županija, grad Supetar, općine Nerežišća, Postira, Pučišća, Sutivan, Selca i Milna te Udruga uzgajivača domaćih životinja "Vidova gora", Nerežišća.

### Popis radova:

Matutinović, S., Rako, A., Kalit, S., Havranek, J. (2007): Značaj tradicijskih sireva s posebnim osvrtom na Lećevečki sir. *Mljekarstvo*, 57: 49-65.

Valkaj, K., Cerjak, M., Kalit, S., Rako, A., Wendorff, W. L. (2013): Do consumers from Međimurje region recognize their autochthonous Turoš cheese? *Mljekarstvo*, 63: 211-219.

Valkaj, K., Zimmermann, B., Kalit, S., Rako, A., Baranović, G. (2014): Suitability of the infrared spectroscopy and the rheological method for distinguishing traditional cheese from industrial Turoš cheese. *Mljekarstvo*, 64: 94-101.

Mioč, B., Ivanković, A., Rako, A., Pavić, V. (2011): Sustavi animalne proizvodnje u mediteranskoj Hrvatskoj. *Zbornik radova sa znanstvenog skupa: Šumarstvo i poljoprivreda hrvatskog sredozemlja na pragu europske unije*, Anić I., Tomić F., Matić, S. (ur.). Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti: 271-285.

Rako, A. (2015): Tradicijski sirevi od mlijeka dalmatinske pramenke. *Zbornik radova sa stručno znanstvenog skupa: Gospodarske mogućnosti Zagore i oblici njihova optimalnog iskorištavanja*: 41-47.

Rako, A., Kalit, S., Tudor Kalit, M. (2016): Hranjiva vrijednost i potrošačka prihvatljivost bračke skute. *Zbornik radova, 51. hrvatski i 11. međunarodni simpozija agronoma*, Agronomski fakultet, Zagreb: 360-363.