

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Dario Domović

**Definiranje ključnih fizikalno-kemijskih čimbenika
povezanih s koagulacijskim svojstvima mlijeka**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Mikulec i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	KEMIJSKI SASTAV MLJEKA	2
1.2.	KOAGULACIJA MLJEKA	4
1.3.	KOAGULACIJSKA SVOJSTVA MLJEKA	6
1.4.	ČIMBENICI KOAGULACIJE MLJEKA	8
1.4.1.	Sirilo	8
1.4.2.	Ionometrijska kiselost mlijeka	9
1.4.3.	Ukupan broj somatskih stanica	9
1.4.4.	Udio mliječne masti i proteina	10
1.4.5.	Kalcijev klorid	11
2.	HIPOTEZE I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	12
3.	MATERIJAL I METODE	13
3.1.	UZORKOVANJE MLJEKA	13
3.2.	PRIPREMA OTOPINE SIRILA	13
3.3.	ODREĐIVANJE KOAGULACIJSKIH SVOJSTAVA MLJEKA	14
3.4.	ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA MLJEKA	15
3.5.	ODREĐIVANJE HIGIJENSKE KVALITETE MLJEKA	16
3.6.	ODREĐIVANJE FIZIKALNIH OSOBINA MLJEKA	16
3.7.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KALCIJA U MLJEKU	17
3.8.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4.	REZULTATI	19
4.1.	KEMIJSKI SASTAV KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	19
4.2.	FIZIKALNA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	20
4.3.	HIGIJENSKA KVALITETA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	20
4.4.	KONCENTRACIJA KALCIJA U KRAVLJEM, KOZJEM I OVČJEM MLJEKU	21
4.5.	KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	21
4.6.	UTJECAJ KALCIJA NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	23
4.7.	UTJECAJ KAZEINA NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	24
4.8.	UTJECAJ IONOMETRIJSKE KISELOSTI NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLJEKA	25

5.	RASPRAVA	26
6.	ZAKLJUČCI.....	31
8.	ZAHVALE.....	32
9.	POPIS LITERATURE	33
10.	SAŽETAK	42
11.	SUMMARY	43
12.	ŽIVOTOPIS.....	44

1. UVOD

Koagulacija mlijeka jedan je od ključnih proizvodnih procesa kojim se znatno utječe na kvalitetu i kvantitetu finalnog mliječnog proizvoda. U proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva, u svrhu koagulacije mlijeka koristi se sirilo. Proces koagulacije izazvan enzimatskom aktivnošću dominantnog enzima sirila, kimozina, dovodi do složenih biokemijskih reakcija kemijskih sastojaka prirodno prisutnih u mlijeku. Kimozin pripada skupini kiselih aspartat proteinaza (EC. 3.4.23), a primarno djeluje na cijepanje peptidne veze u aminokiselinskom lancu jedne od četiri kazeinskih frakcija, κ – kazeina. Koagulacijski proces u direktnoj je vezi s proteinima mlijeka, što upotpunjuje važnost kvalitete mlijeka kao i udjela pojedinih frakcija proteina u mlijeku.

S obzirom na kontinuirani porast asortimana mliječnih proizvoda prema zahtjevima potrošača, mliječna industrija na svjetskoj razini neprestano raste. Prvenstveno u proizvodnji sireva od velikog je značaja poznavanje čimbenika koji utječu na koagulaciju mlijeka. S druge strane, određivanje koagulacijskih svojstava mlijeka može utjecati na skraćivanje utrošenog vremena u tehnološkom procesu proizvodnje određenog mliječnog proizvoda kao i na bolju finalnu kvalitetu što udovoljava zahtjevima mliječne industrije. Širok je spektar čimbenika koji mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na proces koagulacije. Neki od najznačajnijih čimbenika su: kemijski sastav mlijeka, ionometrijska kiselost mlijeka (pH), količina dominantnog proteina mlijeka (kazeina), koncentracija makrominerala (Ca) te ukupan broj somatskih stanica. Određivanjem koagulacijskih svojstava mlijeka dobiva se uvid u vremenski početak koagulacijskog procesa, brzini formiranja grušā i čvrstoći grušā u točno definiranim vremenskim periodima. Ovisno o vrsti koagulacijskog svojstva ($RCT, k_{20}, a_{30}, a_{max}, a_{60}$) rezultati su izraženi u minutama ili milimetrima. Vrijednosti koje odgovaraju određenim koagulacijskim svojstvima mlijeka varijabilne su ovisno o vrsti mlijeka koje je podvrgnuto procesu koagulacije.

Istraživanja koagulacijskih svojstava mlijeka do sada se nisu provodila u Republici Hrvatskoj. U ovom radu određena su koagulacijska svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka koji se prvenstveno koriste u proizvodnji tradicionalnih sireva. Selekcijom muznih životinja na temelju koagulacijskih svojstava mlijeka može se utjecati na povećanje randmana i kvalitete finalnog proizvoda.

1.1. KEMIJSKI SASTAV MLIJEKA

Mlijeko je homogena tekućina složenog kemijskog sastava u kojoj se nalaze proteini, masti, ugljikohidrati, minerali, vitamini i ostali sastojci dispergirani u vodi (Ahmad i sur., 2008; Ozrenk i Inci, 2008). Kemijski sastav mlijeka vrlo je varijabilan ovisno o vrsti mlijeka. Uzrok varijacija koagulacijskih svojstava mlijeka pripisuje se kemijskom sastavu mlijeka te iz tog razloga mlijeko može imati različite koagulacijske sposobnosti (Abeykoon i sur., 2016). Na kemijski sastav mlijeka utječe niz vanjskih i unutarnjih čimbenika. Vanjski čimbenici dijele se u zootehničke, tehnološke čimbenike i uvjete vanjske sredine. Unutarnji čimbenici podijeljeni su na genetske i paragenetske (Bittante i sur., 2012). S obzirom da je proteinski sastav mlijeka od velikog značaja u procesu koagulacije, udio ukupnog proteina kao i pojedinih vrsta proteina razlikuje se ovisno o vrsti mlijeka. U tablici 1. prikazani su udjeli ukupnog proteina, kazeina kao i sirutkinih proteina u odnosu na vrstu mlijeka.

Tablica 1 Udio proteina kod različitih vrsta mlijeka (Rafiq i sur., 2016)

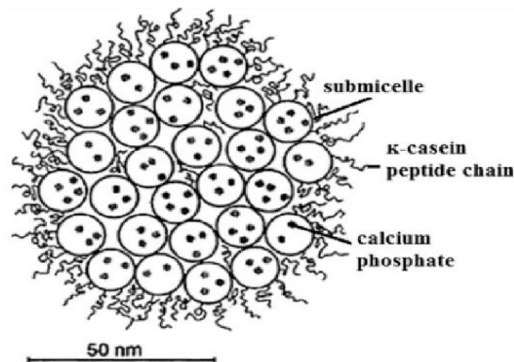
VRSTA MLIJEKA	UKUPNI PROTEIN (%)	KAZEIN (%)	SIRUTKINI PROTEINI (%)
<i>Kravlje mlijeko</i>	3,25 ± 0,03	2,79 ± 0,02	0,47 ± 0,01
<i>Ovčje mlijeko</i>	4,53 ± 0,03	3,87 ± 0,04	0,66 ± 0,02
<i>Kozje mlijeko</i>	2,95 ± 0,02	2,44 ± 0,03	0,53 ± 0,02

*Vrijednosti su prikazane kao aritmetička srednja vrijednost ± standardna devijacija (prosjeak podataka od 6 uzoraka)

Kazein je složeni fosfoprotein koji osim aminokiselina kao gradivnih komponenti sadrži i fosfor (P₈), šećer galaktozu (C₆H₁₂O₆) i N-acetil neuraminsku kiselinu (C₁₁H₁₉NO₉). U tekućoj fazi mlijeka koloidno je dispergirani u obliku složenih globula koje se nazivaju micelle. Kazeinske micelle u mlijeku variraju ovisno o veličini, zastupljenosti pojedinih frakcija kazeina, te stupnju hidratacije i mineralizacije. Kazeinska micela predstavlja „nakupinu“ većeg broja submicela (manje globularne jedinice) koje su međusobno povezane koloidnim kalcijevim fosfatom [Ca₃(PO₄)₂] (Tratnik, 1998). Općenito, kazeinske micelle predstavljaju visoko hidratizirane čestice (približno 3,5 g vode po 1 g bjelančevina) (Corredig i Salvatore, 2016). U neutralnoj sredini kazeinska je

molekula amfoternog karaktera ($\text{NH}_2\text{-R-COOH}$), no zbog prisustva dikarboksimonoamino aminokiselina (glutaminska kiselina, asparaginska kiselina) kazein ima slabo kisela (acidna) svojstva. Iz navedenog razloga kazeinska micela negativno je nabijena, a neto-negativan naboj omogućuje stabilnost micela u svježem mlijeku (Tratnik, 1998). Kazeinske micelle ovčjeg i kozjeg mlijeka karakterizira viši stupanj mineralizacije i manja toplinska stabilnost u odnosu na kazeinske micelle kravljeg mlijeka (Raynal-Ljutovac i sur., 2007a).

Jezgra kazeina sastoji se od α_{s1} , α_{s2} , β i κ – kazeina (koji se nalazi na površini i ima zaštitnu ulogu). Prosječno, navedene frakcije kazeina nalaze se u omjeru 4:1:4:1 (Bonizzi i sur., 2009). α_{s1} glavna je frakcija kravljeg mlijeka dok u kozjem i ovčjem mlijeku dominantnu frakciju čini β kazein (Mohanty i sur., 2016). Ovčji β kazein pojavljuje se u dvije forme, $\beta 1$ - i $\beta 2$ - kazein čiji je aminokiselinski sastav ekvivalentan aminokiselinskom sastavu goveđeg β kazeina (Selvaggi i sur., 2014).



Slika 1 Građa kazeinske micela (Kaya-Celiker i Mallikarjunana, 2012)

Suha tvar mlijeka predstavlja ostatak nakon isparavanja vode iz svježeg mlijeka kod konstantne temperature (102°C) do konstantne mase. Količina suhe tvari i prehrambena vrijednost mlijeka u proporcionalnom su odnosu. Stoga, ovčje mlijeko ima veću prehrambenu vrijednost i pokazuje veći stupanj randmana u sirarstvu. Jedna od tehnoloških prednosti ovčjeg mlijeka odnosi se na mineralnu komponentu kazeinske micela (Balthazar i sur., 2017a). Karakteristično je da kazeinske micelle ovčjeg mlijeka sadrže veći udio kalcija (Ca^{2+}) pa nije potrebno dodavanje aditiva (kalcijev klorid, CaCl_2) u tehnološkom procesu proizvodnje sira (Balthazar i sur., 2017a). Osim povećanih

vrijednosti suhe tvari u ovčjem mlijeku, prisutne su i povećane vrijednosti mliječne masti i proteina. Razlog najčešće prerade ovčjeg mlijeka u sir upravo stoji u povećanim vrijednostima suhe tvari i ukupnog proteina (kazeina) koji su u pozitivnoj korelaciji s procesom koagulacije (Balthazar i sur., 2017a).

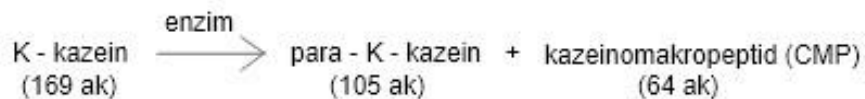
Mliječna mast predstavlja mješavinu estera masnih kiselina koji se u terminologiji nazivaju triacilgliceroli (trigliceridi). Triacilgliceroli se po kemijskom sastavu sastoje od trovalentnog alkohola glicerola [$C_3H_5(OH)_3$] i različitih masnih kiselina koji se nalaze u obliku masnih globula. Ovčje i kozje mlijeko sadrži znatno veće koncentracije masnih globula koje karakterizira manji promjer u odnosu na masne globule kravljeg mlijeka. Njihov prosječni promjer iznosi $\approx 3 - 3,6 \mu m$ dok promjer masnih globula kravljeg mlijeka približno iznosi $\approx 4 \mu m$ (Gantner i sur., 2015 ; Balthazar i sur., 2017b). Promjer masnih globula u obrnuto proporcionalnom je odnosu sa probavljivošću što rezultira boljom probavljivošću kozjeg i ovčjeg mlijeka u komparaciji sa kravljim (Mioč i Pavić, 2002).

1.2. KOAGULACIJA MLIJEKA

Koagulacija mlijeka jedan je od najvažnijih koraka u proizvodnom procesu proizvodnje sira. Uglavnom je koagulacija uvjetovana proteinskim sastavom mlijeka (Troch i sur., 2017). Corredig i Salvatore (2016) koagulaciju mlijeka definiraju kao proteolitičku reakciju prilikom koje dolazi do destabilizacije proteina i stvaranja strukture gela. Kao produkt u procesu koagulacije nastaje gruša koji predstavlja gel na bazi proteina u kojem hidrolizirane kazeinske micelle tvore proteinsku mrežu (matriks) unutar koje su inkorporirane masne globule (Corredig i Salvatore, 2016). Također, koagulacija predstavlja proces u kojem dolazi do promjene agregatnog stanja mlijeka, mlijeko iz tekuće faze prelazi u čvrstu. Koagulacija može biti aktivirana mnogim biokemijskim i fizikalnim procesima, a najzastupljeniji enzimatski pripravak je sirilo koje sadrži enzim kimozin (Pazzola, 2019).

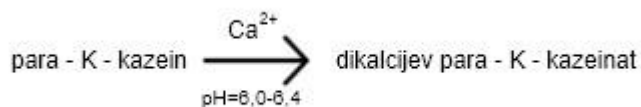
Kimozin reagira direktno sa kazeinom djelujući na mlijeko u tri faze. Molekule κ - kazeina ne nalaze se slobodne u otopini već su dio supramolekularne strukture kazeinske micelle (Corredig i Salvatore, 2016). Neovisno o temperaturi, tijekom prve (primarne) faze dolazi do cijepanja peptidne veze u aminokiselinskom lancu κ - kazeina između 105.

(fenilalanin) i 106. (metionin) aminokiseline pri čemu nastaje hidrofobni dio, para - κ - kazein i hidrofilni dio, kazeinomakropeptid (CMP). Djelovanjem kimozi ne dolazi do hidrolize peptidne veze između aminokiselina fenilalanina i metionina (Phe – Met) ako je ona prisutna u oligopeptidima (dipeptid, tripeptid, tetrapeptid). Povećanjem duljine lanca povećava se osjetljivost Phe – Met veze što analogno odgovara velikoj osjetljivosti Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ peptidne veze u aminokiselinskom lancu κ - kazeina sastavljenom od 169 aminokiselina (Creamer i sur., 1998). κ - kazein igra ulogu zaštitnog koloida te sprječava koagulaciju mlijeka. Stoga, cijepanjem aminokiselinskog lanca κ -kazeina omogućena je koagulacija mlijeka i agregacija kazeina. Kao rezultat cijepanja peptidne veze Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ dolazi do odvajanja peptidnog lanca između 106. i 169. aminokiselinskog ostatka molekule κ kazeina, često u terminologiji zvano kao gubitak „kose“ kazeina.



Slika 2 Cijepanje K - kazeina djelovanjem kimozi (Tratnik, 1998)

Druga (sekundarna) faza zvana još i faza agregacije (lat. aggregatio –pridruživanje) započinje dok se još nije pocijepao cijeli κ – kazein. CMP bitan je nositelj negativnog naboja, stoga odvajanjem CMP od kazeinske micelle dolazi do smanjivanja elektrostatskog potencijala kazeina (zeta potencijal κ – kazeina iz -20 mV prelazi na -10 mV) i povećanja hidrofobnosti površina kazeinskih micela. Prema teoriji fibrilarne strukture micelle, nakon odcijepljenja κ-kazeina od približno 80%, omogućuje se agregacija micela. Sam proces agregacije nemoguć je bez prisutnosti minimalnih količina kalcijevih iona. Za razliku od prve, faza agregacije je neenzimska (Garnot i Olson, 1982) koja se događa ovisno o koncentraciji kazeina u mlijeku. Nastankom Ca-mostova odnosno tzv. kalcij-fosfatne veze između micela omogućuje se stvaranje trodimenzionalne mreže gela.



Slika 3 Nastajanje dikalcijevog para - K - kazeinata djelovanjem kalcijevih iona (Tratnik, 1998)

U posljednjoj, trećoj (tercijarnoj) fazi dolazi do umrežavanje odnosno retikulacije što u krajnosti dovodi do stvaranja proteinske mreže. Osim procesa retikulacije, u tercijarnoj fazi odvija se daljnja proteoliza kazeina. Procesi koji se odvijaju u navedenoj fazi pod utjecajem su temperature koja određuje uspješnost završetka koagulacije. Nastankom hidrofobnog djela tj. para - κ – kazeina onemogućeno je održavanje stabilnosti micela. Kao posljedica destabilizacije ostatak micela formira proteinsku mrežu u kojoj su inkorporirani ostali sastojci mlijeka (Tratnik, 1998).

1.3. KOAGULACIJSKA SVOJSTVA MLIJEKA

Određivanje koagulacijskih svojstava mlijeka predstavlja važan faktor u unaprjeđenju proizvodnje finalnog proizvoda, sira (Cassandro, 2003). Koagulacijska svojstva mlijeka (eng. Milk Coagulation Properties, MCP) mogu se opisati kroz reakciju mlijeka i sirila (koagulansa) gdje kroz određeno vrijeme kao produkt nastaje gruša određene konzistencije. U koagulacijska svojstva mlijeka određena pomoću formagrafa ili laktodinamografa (eng. Formagraph) ubrajaju se (Bittante i sur., 2012):

1. vrijeme zgrušavanja (eng. rennet clotting time, RCT, min) – vremenski interval od nultog vremena (označava trenutak dodavanja sirila u mlijeku) do trenutka kada počinje rasti u širinu tj. vrijeme početka sirenja mlijeka
2. brzina formiranja gruša (k_{20} , min) - vremenski interval od početka formiranja gruša do oscilacijske širine od 20 mm tj. vrijeme potrebno da amplituda dosegne 20 mm
3. čvrstoća gruša (a_{30} , mm) – čvrstoća gruša 30 minuta nakon dodavanja enzima tj. širina amplitude nakon 30 minuta od dodatka sirila
4. maksimalna čvrstoća gruša (a_{max} , min) – vremenski interval koji odgovara maksimalnoj čvrstoći gruša tijekom koagulacijskog procesa
5. čvrstoća gruša (a_{60} , mm) - čvrstoća gruša 60 minuta nakon dodavanja enzima tj. širina amplitude nakon 60 minuta od dodatka sirila

Karakteristično je da sezona značajno može uvjetovati čvrstoću gruša što je u pozitivnoj korelaciji sa kemijskim sastavom mlijeka koji se mijenja tijekom laktacije (Bittante i sur., 2015). Prosječne vrijednosti za RCT razlikuju se ovisno o vrsti mlijeka. Kod kravljeg mlijeka RCT iznosi ≈ 12 minuta (Bittante, 2012). Prosječna vrijednost RCT-a za ovčje mlijeko iznosi $\approx 8,6$ minuta, dok je za kozje mlijeko vremenski raspon nešto veći, $\approx 13,2$ minute (Pazzola, 2019). Skraćivanjem vremena potrebnim za koagulaciju mlijeka omogućuje se duži vremenski period formiranja gruša čime je završetak koagulacijskog procesa popraćen zadovoljavajućom čvrstoćom gruša (Cassandro i sur., 2008). Zaključno tome, RCT koagulacijsko svojstvo u obrnuto proporcionalnom je odnosu sa a_{30} koagulacijskim svojstvom.

S fenotipskog stajališta, mlijeko uobičajenog sadržaja kazeina s dovoljnom koncentracijom koloidnog kalcijevog fosfata $[Ca_3(PO_4)_2]$ te zadovoljavajućim omjerom masti i kazeina poboljšava koagulacijska svojstva mlijeka čime se ostvaruje pozitivan učinak na prinos sira (Mariani i Battistotti, 1999). U istraživanju Politis i Kwai-Hang (1988) na kravljem mlijeku inicijalni pH mlijeka značajno određuje kvalitetu i uspješnost sva tri koagulacijska svojstva. Na RCT značajno utječe β – kazein, broj somatskih stanica i sadržaj laktoze. Na utjecaj k_{20} i a_{30} koagulacijskog svojstva značajan je sadržaj kazeina, ponajviše β i κ – kazeina. Isti autori navode broj somatskih stanica kao značajan čimbenik koji utječe na brže formiranje gruša (k_{20}), dok za čvrstoću gruša (a_{30}) navedeni čimbenik nije od značaja.

S genetskog stajališta, nekoliko je istraživanja provedenih na kravljem mlijeku potvrdilo pozitivnu genetsku korelaciju između koagulacijskih svojstava mlijeka i niske ionometrijske kiselosti mlijeka (pH) s manjim ukupnim brojem somatskih stanica (Ikonen i sur., 1999; Ikonen i sur., 2004). Mogućnost poboljšanja koagulacijskih svojstava mlijeka ogleđa se u genetskom razvitku kojim se može utjecati na povećanje ukupnog sadržaja κ – kazeinske frakcije (Bittante i sur., 2012). Ukupan sadržaj proteina unutar kojeg je količinski najzastupljeniji fosfoprotein kazein također je u pozitivnoj korelaciji s koagulacijskim svojstvima mlijeka (Ikonen i sur., 1999; Ikonen i sur., 2004). U istraživanju Cassandro i sur. (2008) provedenim na kravljem mlijeku genetska korelacija između RCT-a i udjela masti ili proteina gotovo je jednaka nuli (-0,05 odnosno -0,08). Suprotno tome, genetska korelacija između a_{30} (čvrstoća gruša) i ukupnog sadržaja proteina i kazeina bila

je umjerena do visoka (0,44 odnosno 0,53). Povećanjem koncentracije kalcija u mlijeku proporcionalno se utječe na čvrstoću gruša (a_{30}) (Glantz i sur., 2010). Temperatura koja se koristi za zagrijavanje uzoraka prije enzimatske aktivnosti kimoza iznosi 35 °C (Bittante i sur., 2012). Ikonen i sur. (1997) nižu temperature zagrijavanja navode kao inhibirajući faktor na proces koagulacije (produljenje RCT-a) i sinereze.

1.4. ČIMBENICI KOAGULACIJE MLIJEKA

Koagulacija mlijeka je proces koji ovisi o širokom spektru čimbenika. Vrsta preživača od kojeg mlijeko potječe uvelike utječe na koagulaciju kao i na koagulacijska svojstva mlijeka (Bittante i sur., 2012). Neki od najvažnijih čimbenika su: sirilo koje uzrokuje proces koagulacije, ionometrijska kiselost mlijeka (pH), ukupan broj somatskih stanica, udio mliječne masti i proteina te kalcijeva sol, kalcijev klorid (CaCl_2).

1.4.1. Sirilo

Na tržištu je dostupno nekoliko vrsta sirila: životinjska (predominantno teleća, koja se i dalje dobivaju ekstrakcijom iz želudaca sisavaca te puno rjeđe janjeća ili jareća) te neživotinjska: biljna, mikrobiološka ili dobivena genetskim inženjeringom, a proizvode se u različitim oblicima (tekućina, prah ili pasta). U proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva sirilo se dodaje u svrhu koagulacije mlijeka. Kod sirila životinjskog porijekla, u enzimatskom sastavu sirila ekstrahiranog iz četvrtog dijela želuca mladih sisavaca dominantan je enzim kimozin. Kimozin pripada skupini kiselih aspartat proteinaza (EC 3.4.23) s prisutnošću dvije asparaginske kiseline sa svake strane reaktivnog mjesta. Kimozin vrši kontroliranu (samo jedna frakcija proteina) i specifičnu (točno određeno konformacijsko mjesto u proteinu) proteolizu (Yegin i Dekker, 2013). Osim sirila životinjskog podrijetla, mogu se koristiti i mikrobna sirila (*Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pussillus*, *Cryphonectria parasitica*) (Andren, 2003) kao i kimozin dobiven fermentacijom (eng. Fermentation-produced chymosin, FPC) djelovanjem kvasca *Kluyveromyces marxianus var. lactis* ili bakterije *Escherichia coli* K-12 (Teuber, 1990). Količina sirila koja se koristi proporcionalna je sa čvrstoćom gruša unutar određenih granica. Prilikom povećane

koncentracije sirila skraćuje se vrijeme koagulacije radi ubrzane proteolize κ – kazeina (Foltman, 1959; McMahon i sur., 1984; Carlson i sur., 1987; Lopez i sur., 1998).

1.4.2. Ionometrijska kiselost mlijeka

Smanjenom pH vrijednosti dolazi do povećane acidifikacije mlijeka što utječe na skraćivanje vremenskog trajanja primarne i sekundarne faze koagulacije te uvjetuje povećanje čvrstoće gruš. Intenzivnom acidifikacijom (vrijednosti na pH skali ispod 5,8) može doći do postizanja smanjene čvrstoće gruš. Niži pH mlijeka omogućuje otapanje koloidnog kalcijevog fosfata $[Ca_3(PO_4)_2]$ čime se utječe na koagulaciju mlijeka (Gaucheron, 2005).

1.4.3. Ukupan broj somatskih stanica

Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2020), kravlje mlijeko jedina je vrsta mlijeka kod koje postoji točno definiran maksimalan ukupan broj somatskih stanica dozvoljen u mililitru mlijeka (BSS/mL), 40×10^4 /mL. U kozjem i ovčjem mlijeku Pravilnikom navedeno nije utvrđeno. Za razliku od zemalja članica EU kod kojih nije definirana zakonska granica dozvoljenog ukupnog broja somatskih stanica kozjeg i ovčjeg mlijeka, Uprava za hranu i lijekove u Sjedinjenim Američkim Državama prihvaća graničnu vrijednost koja iznosi 1×10^6 /mL (Paape i sur., 2007). Ukupan broj somatskih stanica jasan je pokazatelj zdravlja vimena i kvalitete mlijeka (Villalobos i sur., 2015) i u svim razvijenim zemljama predstavlja marker za prevenciju od mastitisa (Alhussien i Dang, 2018).

Somatske stanice sastoje se od epitelnih i bijelih krvnih stanica (leukocita), a predstavljaju sekundarni mehanizam organizma u obrani od različitih infekcija, dok se primarna obrana odnosi na anatomske i kemijske barijere kanala u mliječnoj žlijezdi (Alhussien i Dang, 2018). Povećan broj somatskih stanica javlja se kao odgovor na upalni proces koji nastaje radi određene intramamarne infekcije (Raynal – Ljutovac i sur., 2007b). U istraživanjima provedenim na ovčjem mlijeku povećanje broja somatskih stanica uzrokovalo je promjene pH i kemijskog sastava mlijeka (Vivar-Quintana i sur., 2006; Marti de Olives i sur., 2013) te nepovoljno utjecalo na koagulaciju (Pirisi i sur., 2000; Bianchi i

sur., 2004). Prema istraživanju Raynal – Ljutovac i sur. (2007b) povećanje broja somatskih stanica u pozitivnoj je korelaciji sa vrijednošću pH. Prilikom povećanog broja somatskih stanica dolazi do povećanja pH mlijeka (Raynal – Ljutovac i sur., 2007b). Navedeno povećanje pH mlijeka uzrok je povećane propusnosti mamarnog epitela prilikom kojega sastojci poput citrata ($C_6H_5O_7^{3-}$), bikarbonata (HCO_3^-), iona natrija (Na^+) i klora (Cl^-) iz krvi mogu prijeći u mlijeko (Villalobos i sur., 2015). Povećane razine $C_6H_5O_7^{3-}$ i HCO_3^- u mlijeku proporcionalno utječu na pH mlijeka (Kitchen, 1981; Harmon, 1994). $C_6H_5O_7^{3-}$ u mlijeku mogu reagirati s kalcijem stvarajući soli koje utječu na smanjenje stabilnosti kazeinske micelle što je u pozitivnoj korelaciji sa samom koagulacijom (Frederiksen i sur., 2011; Sunderkilde i sur., 2011). Povećanim brojem somatskih stanica uz niže pH vrijednosti mlijeka ostvaruje se pozitivan učinak na koagulaciju mlijeka (Pirisi i sur., 2000). Villalobos i sur. (2015) analizom ovčjeg mlijeka potvrdili su konstatacije prilikom kojih povećanim brojem somatskih stanica dolazi do povećanja koncentracije proteina, smanjenja koncentracije laktoze dok koncentracija mliječne masti u pravilu ostaje nepromijenjena. Navedene promjene potvrđene su i u mnogim drugim istraživanjima (Pirisi i sur., 2000; Nudda i sur., 2003; Albenzio i sur., 2004; Vivar-Quintana i sur., 2006).

1.4.4. Udio mliječne masti i proteina

Mliječna mast i proteini, primarno kazein, glavni su kemijski sastojci mlijeka koji izravno utječu na koagulaciju mlijeka i prinos sira (Cecchinato i Bittante, 2016). U istraživanju Stocco i sur. (2018), kozje mlijeko bogato mliječnom masti pozitivno je utjecalo na koagulaciju, dok su povećane koncentracije proteina produljile koagulacijski proces. Što je koncentracija kazeina veća u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina, čvrstoća se gruša povećava (Pazzola, 2019). Povećane koncentracije masti u procesu koagulacije smanjuju sinerezu zbog masnih globula koji blokiraju kanale u grušu i tako sprječavaju potreban stupanj izdvajanja sirutke (sinereze) što posljedično uvjetuje nastanak mekšeg gruša (Tratnik, 1998).

1.4.5. Kalcijev klorid

Često se radi poboljšanja koagulacije mlijeka dodaje kalcijev klorid (CaCl_2) kojim se postiže bolja čvrstoća gruša. Mnogi autori ističu djelovanje CaCl_2 na koagulaciju (Wolfschoon-Pombo, 1997; Landfeld i sur., 2002; Soodam i sur., 2015) prilikom kojeg maksimalna koncentracija CaCl_2 koja se dodaje ne smije prelaziti razinu od 0,07% zbog onemogućenog stvaranja pozitivnih učinaka na koagulaciju mlijeka. Preporučena koncentracija CaCl_2 koja se dodaje u rasponu je od 0,02 do 0,03% (Tratnik, 1998). Osim što CaCl_2 povoljno utječe na čvrstoću gruša, sprječava dodatno izdvajanje mliječne masti putem sirutke (Ong i sur., 2013). Kao posljedicu povećane koncentracije CaCl_2 Phadungath i Metzger (2011) navode nastajanje kristala kalcijevog laktata $[\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2]$ koji predstavljaju čestu pogrešku u proizvodnji sira Cheddar.

2. HIPOTEZE I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Na temelju dosadašnjih istraživanja, hipoteza ovog rada je da se koagulacijska svojstva mlijeka razlikuju ovisno o vrsti muznih životinja. Na temelju postavljene hipoteze, opći je cilj ovog istraživanja usporediti koagulacijska svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka (RCT, k_{20} , a_{30} , a_{60} , a_{max}) te definirati ključne fizikalno-kemijske čimbenike u procesu koagulacije različitih vrsta mlijeka.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti kemijski sastav, fizikalne osobine, ukupan broj mikroorganizama, ukupan broj somatskih stanica, koncentraciju kalcija i koagulacijska svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka.
2. Usporediti razlike u kemijskom sastavu, fizikalnim osobinama, ukupnom broju mikroorganizama i somatskih stanica te koncentraciji kalcija između kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka.
3. Na temelju dobivenih rezultata istraživanja definirati glavne fizikalno-kemijske čimbenike koje utječu na koagulacijska svojstva mlijeka.
4. Usporediti povezanost koncentracije kalcija, sadržaja kazeina i ionometrijske kiselosti mlijeka na koagulacijska svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZORKOVANJE MLJEKA

U razdoblju od ožujka do prosinca 2021. godine prikupljeno je 33 skupna uzorka različitih vrsta mlijeka za potrebe ovog rada. U razdoblju od ožujka do rujna 2021. godine prikupljeno je 7 skupnih uzoraka ovčjeg mlijeka s područja Bjelovarsko - bilogorske županije, od travnja do prosinca 2021. godine prikupljeno je 9 skupnih uzoraka kravljeg mlijeka s područja Zagrebačke županije, a od ožujka do studenog 2021. prikupljeno je 17 skupnih uzoraka kozjeg mlijeka s područja Šibensko - kninske županije. Po uzorkovanju prikupljena je po 1 L mlijeka koja je količinski raspoređena za sve planirane analize. Za potrebe određivanja koagulacijskih svojstava mlijeka uzorci su se pohranjivali u bočice zapremnine 200 mL prilikom kojega su uzorci smrznuti tehnikom brzog smrzavanja na instrumentu Tecnomac E15-40 (Italija). Za potrebe fizikalno-kemijskih analiza isti su se pohranjivali u bočicama volumena 200 mL, te u sterilnim bočicama zapremnine 30 mL za određivanje ukupnog broja bakterija (CFU, eng. colony forming unit) kao i ukupnog broja somatskih stanica. Uzorci su u vremenu od 3 do 5 sati u prijenosnom hladnjaku (+4 °C) dostavljeni u Referentni laboratorij za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. PRIPREMA OTOPINE SIRILA

U svrhu određivanja koagulacijskih svojstava mlijeka korišteno je sirilo Bioren proizvođača Christian Hansen (Danska) jačine 791 IMCU/gr. Enzimatski sastav navedenog sirila čini kimozin s udjelom $97\% \pm 3\%$ i pepsin s udjelom $3\% \pm 3\%$. Sirilo je za potrebe analize razrijeđeno na jačinu 0.051 IMCU/mL. Priprema otopine sirila sastojala se u odvazi sirila u prahu na analitičkoj vagi i otapanju pomoću destilirane vode do oznake u odmjernoj tikvici volumena 25 ml. Svakog radnog dana prije analize priprema se svježa otopina sirila.

3.3. ODREĐIVANJE KOAGULACIJSKIH SVOJSTAVA MLIJEKA

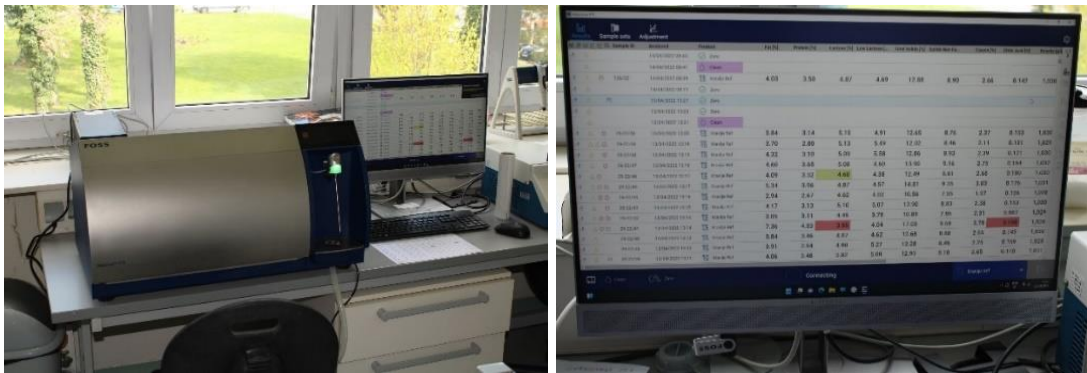
Za potrebe određivanja koagulacijskih svojstava mlijeka pojedinačnih uzoraka korišten je instrument za određivanje koagulacijskih svojstava mlijeka i osobina gruša (MA.PE SYSTEM SRL, Italija) (slika 4). Za potrebe analize na instrumentu uzorak se predinkubirao na temperaturi od 35 °C prije dodavanja otopine sirila. Također, neposredno prije analize određivala se ionometrijska kiselost uzorka (pH). Svaki uzorak mlijeka analizirao se u 3 ponavljanja. Blokovi za analizu popunjavali su se s 10 mL uzorka i 0,2 mL otopine sirila. Popunjeni blok s uzorcima stavljaio se na analizu u trajanju od 60 minuta. Kroz vremenski period od 60 minuta pratio se cijeli tijek koagulacije kao i postupka sinereze.



Slika 4 Postupak određivanja koagulacijskih svojstava mlijeka na formagrafu (vlastiti izvor)

3.4. ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA MLIJEKA

Za kemijski sastav mlijeka korišten je instrument MilkoScan FT3 (Foss, Danska) (slika 5) u skladu s normom HRN ISO 9622 (DZNM, 2017). Unutar kemijskog sastava mlijeka određen je udio mliječne masti, proteina, laktoze, suhe tvari, suhe tvari bez masti, kazeina, citrata, slobodnih masnih kiselina i uree. Instrument MilkoScan FT3 predstavlja uređaj novije generacije za potrebe analize mlijeka uz pomoć Fourierove transformacije infracrvenog spektra (FTIR). FTIR tehnologija omogućuje mjerenje unutar čitavog infracrvenog spektra pomoću koje se dobiva širok spektar različitih rezultata. Prosječno, za potrebe analize jednog uzorka potrebno je 30 do 45 sekundi. Viskoznost uzorka značajan je fizikalni čimbenik koji utječe na brzinu analize. U sat vremena moguće je dobiti uvid u rezultate 500 različitih uzoraka (Matijević i Blažić, 2008.).



Slika 5 Instrument Milcoscan FT3 (vlastiti izvor)

3.5. ODREĐIVANJE HIGIJSKE KVALITETE MLIJEKA

Higijenska kvaliteta mlijeka određena je na osnovu ukupnog broja mikroorganizama na instrumentu Bactoscan FT 50 (Foss, Danska) (slika 6), prema međunarodnoj normi HRN ISO 4833 (DZNM, 2013) te ukupnog broja somatskih stanica na instrumentu Fossomatic Minor (Foss, Danska) prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 13366-3 (DZNM, 2008).



Slika 6 Instrument Bactoscan FT 50 (vlastiti izvor)

3.6. ODREĐIVANJE FIZIKALNIH OSOBINA MLIJEKA

Kiselost mlijeka određena je pomoću pH metra Seven Multi (Mettler Toledo, Švicarska), dok je točka ledišta mlijeka određena krioskopskom metodom na instrumentu Cryostar 1 (Funke Gerber, Njemačka) (slika 7) u skladu s normom HRN EN ISO 5764 (DZNM, 2010). Fizikalna osobina gustoće mlijeka određena je na instrumentu MilkoScan FT3.



Slika 7 Instrument Cryostar 1 (vlastiti izvor)

3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KALCIJA U MLIJEKU

Koncentracija kalcija određena je na instrumentu za određivanje koncentracije minerala metodom induktivne spregnute masene spektrometrije (ICP-MS, Japan) (slika 8). Prvotno, za potrebe analize odvagalo se 0,2 mL mlijeka u posudice za mikrovalnu pećnicu (Multiwave GO, Anton Paar, Austrija) uz dodatak 6 mL dušične kiseline (65 % HNO₃). Nakon dodatka dušične kiseline uzorak se stavljao na mokro spaljivanje. Pri završetku mokrog spaljivanja sadržaj se prelijeva u odmjernu tikvicu zapremnine 50 mL te nadopunjuje ultračistom vodom. Prije analize na instrumentu (ICP-MS) sadržaj u odmjernoj tikvici potrebno je homogenizirati i prelići u tubice. Otopina uzorka se pomoću peristaltičke pumpe uvodi u raspršivač gdje se raspršuje u struji plina argona, koji je nosač analita. Formira se aerosol koji prolazi kroz komoru za raspršivanje (eng. *spray chamber*) u kojem se kolizijom uklanjaju veće kapljice uzorka. Potom aerosol ulazi direktno u cijev horizontalno postavljenog ICP *torcha*. U središtu plazme kinetička temperatura varira od 4500 – 6500 kelvina (K) ovisno o protoku plina nosioca i jačini struje kojom se plazma opskrbljuje. Aerosol uzorka se ionizira pomoću plazme koja je izvor pojedinačnih pozitivno nabijenih iona. Za rad instrumenta koriste se plinovi: argon čistoće 99,9995% i helij čistoće 6.0. Pojedinačni standard kalcija (CPAChem, Velika Britanija) korišten je za pripremu kalibracijskog pravca uz linearnost od $\geq 0,999$.



Slika 8 Instrument ICP-MS (vlastiti izvor)

3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015). Razlike u kemijskom sastavu, fizikalnim svojstvima, higijenskoj kvaliteti, koncentraciji kalcija kao i koagulacijskim svojstvima različitih vrsta mlijeka ispitane su PROC GLM procedurom pri čemu je nezavisna varijabla (grupa) bila vrsta mlijeka. Povezanost fizikalno-kemijskih čimbenika s koagulacijskim svojstvima mlijeka ispitane su PROC REG procedurom pri čemu je zavisna varijabla bila koagulacijsko svojstvo mlijeka.

4. REZULTATI

4.1. KEMIJSKI SASTAV KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

Tablica 2 prikazuje prosječne vrijednosti kemijskih sastojaka mlijeka s obzirom na broj uzoraka i vrstu mlijeka. Sadržaj proteina, masti, kazeina, suhe tvari, suhe tvari bez masti i citrata značajno se razlikuju između svih triju vrsta mlijeka ($P < 0,001$). Nije utvrđena značajna razlika između ovčjeg i kozjeg mlijeka s obzirom na sadržaj laktoze ($P = 0,263$) i uree ($P = 0,028$) što znači da se kravlje mlijeko značajno razlikuje u odnosu na ostale vrste mlijeka u vidu sadržaja laktoze i uree ($P < 0,001$). Kozje se mlijeko prema koncentraciji masnih kiselina značajno razlikuje ($P < 0,001$) u odnosu na ostale vrste mlijeka, dok između ovčjeg i kravljeg mlijeka nije utvrđena značajnost s obzirom na njihovu koncentraciju ($P = 0,676$).

Tablica 2 Kemijski sastav kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka

KEMIJSKI SASTOJAK MLIJEKA	VRSTA MLIJEKA I BROJ UZORAKA (n)		
	KRAVLJE (n=9)	KOZJE (n=17)	OVČJE (n=7)
<i>Mliječna mast (g/100g)</i>	4,35	3,71	6,62
<i>Proteini (g/100g)</i>	3,52	3,08	6,03
<i>Laktoza (g/100g)</i>	4,61	4,40	4,47
<i>Suha tvar (g/100g)</i>	13,42	11,75	17,88
<i>Suha tvar bez masti (g/100g)</i>	9,05	7,70	11,15
<i>Kazein (g/100g)</i>	2,77	2,42	4,76
<i>Citrati (g/100g)</i>	0,162	0,061	0,117
<i>Slobodne masne kiseline (mmol/L)</i>	0,46	0,62	0,47
<i>Urea (mg/dL)</i>	10,67	26,76	19,86

4.2.FIZIKALNA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

U tablici 3 prikazane su prosječne vrijednosti fizikalnih svojstava mlijeka s obzirom na vrstu mlijeka i broj uzoraka. Između točke ledišta i gustoće utvrđena je značajna razlika između svih triju vrsta mlijeka ($P < 0,001$). Vrijednosti ionometrijske kiselosti (pH) kravljeg mlijeka značajno se razlikuju ($P < 0,001$) u odnosu na vrijednosti ostalih vrsta mlijeka odnosno nije utvrđena značajnost ($P = 0,237$) između ovčjeg i kozjeg mlijeka.

Tablica 3 Fizikalna svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka

FIZIKALNE OSOBINE MLIJEKA	VRSTA MLIJEKA I BROJ UZORAKA (n)		
	KRAVLJE (n=9)	KOZJE (n=17)	OVČJE (n=7)
<i>Ionometrijska kiselost (pH)</i>	6,55	6,40	6,42
<i>Točka ledišta (°C)</i>	-0,5213	-0,5408	-0,5567
<i>Gustoća (g/L)</i>	1029,34	1025,7	1034,62

4.3.HIGIJENSKA KVALITETA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

U tablici 4 prikazani su parametri prema kojima se procjenjuje higijenska kvaliteta mlijeka. Ukupan broj mikroorganizama i ukupan broj somatskih stanica prikazani su kao prosječne vrijednosti s obzirom na vrstu mlijeka i broj uzoraka. Utvrđena je značajna razlika ($P < 0,001$) između oba parametra između svih triju vrsta mlijeka. S obzirom da je u analiziranim uzorcima ukupan broj mikroorganizama ovčjeg mlijeka bio značajno veći u odnosu na ukupan broj mikroorganizama u kozjem i kravljem mlijeku, značajnost između kravljeg i kozjeg mlijeka s obzirom na ukupan broj mikroorganizama bila je nešto niža ($P = 0,018$).

Tablica 4 Higijenska kvaliteta kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka

HIGIJENSKA KVALITETA MLIJEKA	VRSTA MLIJEKA I BROJ UZORAKA (n)		
	KRAVLJE (n=9)	KOZJE (n=17)	OVČJE (n=7)
<i>Ukupan broj mikroorganizama (CFU/mL)</i>	92 778	405 882	1 183 571
<i>Ukupan broj somatskih stanica (mL)</i>	408 000	1 300 471	2 481 857

4.4. KONCENTRACIJA KALCIJA U KRAVLJEM, KOZJEM I OVČJEM MLIJEKU

Tablica 5 prikazuje prosječnu koncentraciju kalcija kao dominantnog makrominerala mlijeka s obzirom na vrstu mlijeka i broj uzoraka. Utvrđena je značajna razlika ($P < 0,001$) u koncentracijama kalcija ovisno o vrsti mlijeka. S obzirom da je u ovčjem mlijeku utvrđena najveća koncentracija kalcija, značajnost u koncentraciji kalcija između kozjeg i kravljeg mlijeka nešto je niža ($P = 0,004$).

Tablica 5 Koncentracija kalcija u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku

MINERALNI SASTAV MLIJEKA	VRSTA MLIJEKA I BROJ UZORAKA (n)		
	KRAVLJE (n=9)	KOZJE (n=17)	OVČJE (n=7)
<i>Kalcij (mg/kg)</i>	1501,11	1387,65	2271,43

4.5. KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

U tablici 6 prikazane su prosječne vrijednosti koagulacijskih svojstava mlijeka s obzirom na vrstu mlijeka i broj uzoraka. Koagulacijska svojstva mlijeka označena različitim brojevima značajno se razlikuju ovisno o vrsti mlijeka ($P < 0,001$). Prosječne vrijednosti a_{30} ovčjeg mlijeka značajno se razlikuju ($P < 0,001$) od prosječnih vrijednosti kozjeg i ovčjeg mlijeka kao i prosječne vrijednosti a_{60} kozjeg mlijeka od prosječnih vrijednosti kravljeg i ovčjeg mlijeka ($P < 0,001$). Između a_{30} kravljeg i kozjeg ($P = 0,908$) te a_{60} kravljeg i ovčjeg ($P = 0,823$) nije utvrđena značajnost. S obzirom na rezultate prikazane u tablici 6 u ovome je istraživanju proces koagulacije najprije započeo u kozjem, zatim u ovčjem i naposljetku u kravljem mlijeku. Do najbržeg formiranja gruš ($< k_{20}$) došlo je u ovčjem, zatim u kozjem i kravljem mlijeku. Čvrstoća gruš nakon 30 (a_{30}) i 60 minuta (a_{60}) najpovoljnija je bila u ovčjem, a najslabija u kozjem mlijeku. Za postizanjem maksimalne čvrstoće gruš (a_{max}) u kozjem je mlijeku trebao najkraći period, dok je u ovčjem mlijeku zabilježen najveći vremenski raspon prilikom kojega je došlo do postizanja maksimalne čvrstoće gruš.

Tablica 6 Koagulacijska svojstva kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka

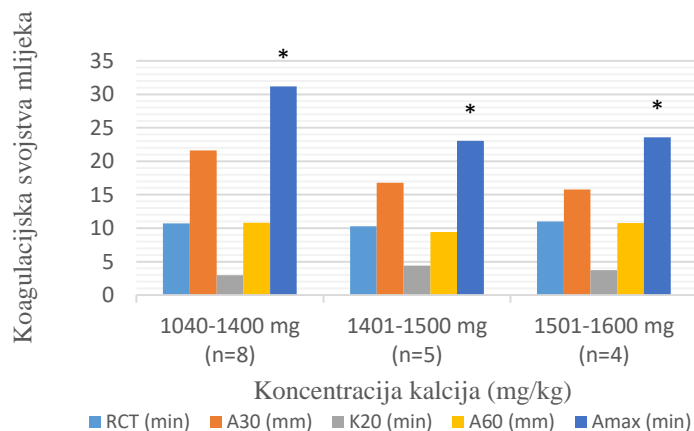
KOAGULACIJSKA SVOJSTVA MLIJEKA	VRSTA MLIJEKA I BROJ UZORAKA (n)		
	KRAVLJE (n=9)	KOZJE (n=17)	OVČJE (n=7)
<i>RCT (min)</i>	22,34 ^a	10,64 ^b	15,41 ^c
<i>A₃₀ (mm)</i>	19,49 ^a	18,81 ^a	39,29 ^b
<i>K₂₀ (min)</i>	7,75 ^a	3,57 ^b	1,67 ^c
<i>A₆₀ (mm)</i>	27,98 ^a	10,40 ^b	29,12 ^a
<i>A_{max} (min)</i>	33,25 ^a	27,00 ^b	48,58 ^c

*a,b,c srednje vrijednosti u istom redu tablice s različitim oznakama su značajno različite ($P < 0,001$)

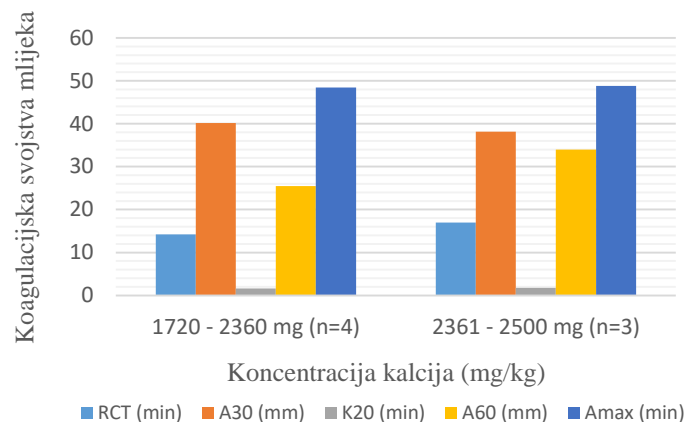
*(*RCT*: početak koagulacije [min], *A₃₀*: čvrstoća gruša [mm], *K₂₀*: brzina formiranja gruša [min], *A₆₀*: čvrstoća gruša nakon 60 minuta [mm], *A_{max}*: maksimalna čvrstoća gruša [min]).

4.6. UTJECAJ KALCIJA NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

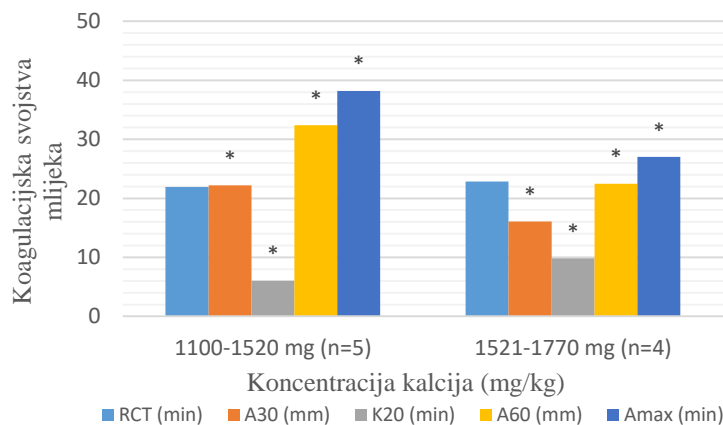
Grafikoni 1-3. Grafikoni prikazuju ovisnost koagulacijskih svojstava mlijeka o različitim koncentracijama kalcija u različitim vrstama mlijeka. Nezavisna varijabla predstavlja koncentraciju kalcija (mg/kg), a koagulacijska svojstva mlijeka čine zavisnu varijablu (RCT: početak koagulacije [min], A₃₀: čvrstoća grušica [mm], K₂₀: brzina formiranja grušica [min], A₆₀: čvrstoća grušica nakon 60 minuta [mm], A_{max}: maksimalna čvrstoća grušica [min]).



Grafikon 1 Povezanost promjene koncentracije kalcija s koagulacijskim svojstvima kozjeg mlijeka (n=17)



Grafikon 2 Povezanost promjene koncentracije kalcija s koagulacijskim svojstvima ovčjeg mlijeka (n=7)

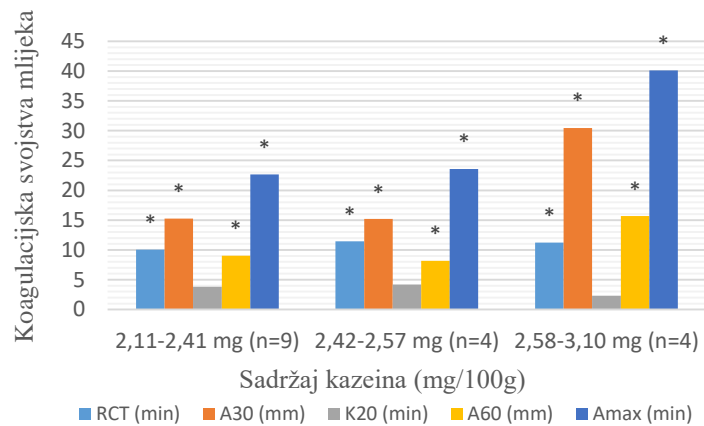


Grafikon 3 Povezanost promjene koncentracije kalcija s koagulacijskim svojstvima kravljeg mlijeka (n=9)

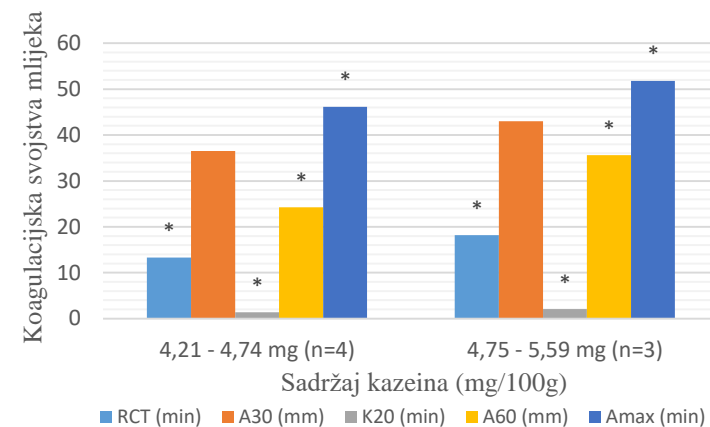
* p < 0,05

4.7. UTJECAJ KAZEINA NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

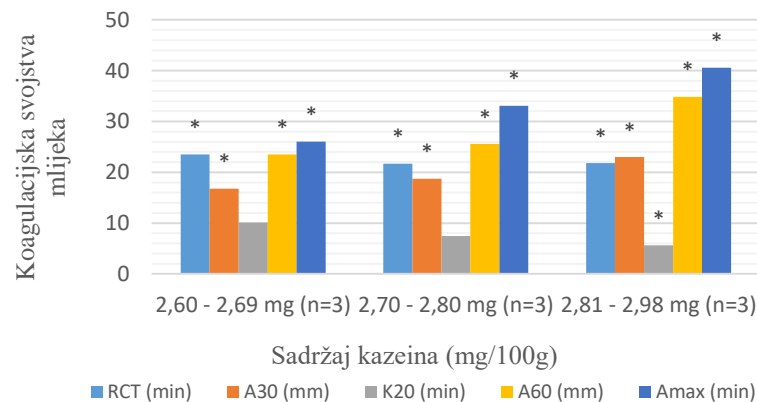
Grafikoni 4-6. Grafikoni prikazuju ovisnost koagulacijskih svojstava mlijeka o različitom sadržaju kazeina u različitim vrstama mlijeka. Nezavisna varijabla predstavlja sadržaj kazeina (g/100g), a koagulacijska svojstva mlijeka čine zavisnu varijablu (RCT: početak koagulacije [min], A₃₀: čvrstoća gruš [mm], K₂₀: brzina formiranja gruš [min], A₆₀: čvrstoća gruš nakon 60 minuta [mm], A_{max}: maksimalna čvrstoća gruš [min]).



Grafikon 4 Povezanost promjene sadržaja kazeina sa koagulacijskim svojstvima kozjeg mlijeka (n=17)



Grafikon 5 Povezanost promjene sadržaja kazeina sa koagulacijskim svojstvima ovčjeg mlijeka (n=7)

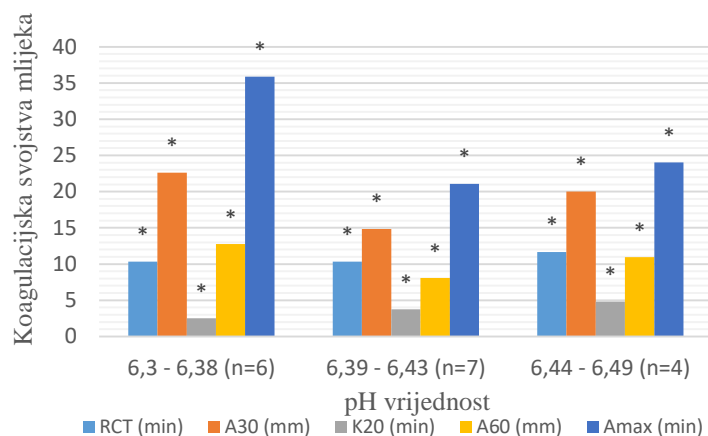


Grafikon 6 Povezanost promjene sadržaja kazeina sa koagulacijskim svojstvima kravljeg mlijeka (n=9)

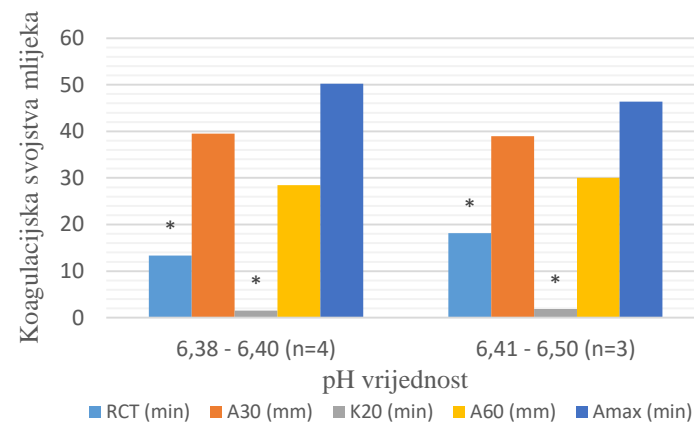
* $p < 0,05$

4.8. UTJECAJ IONOMETRIJSKE KISELOSTI NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA KRAVLJEG, KOZJEG I OVČJEG MLIJEKA

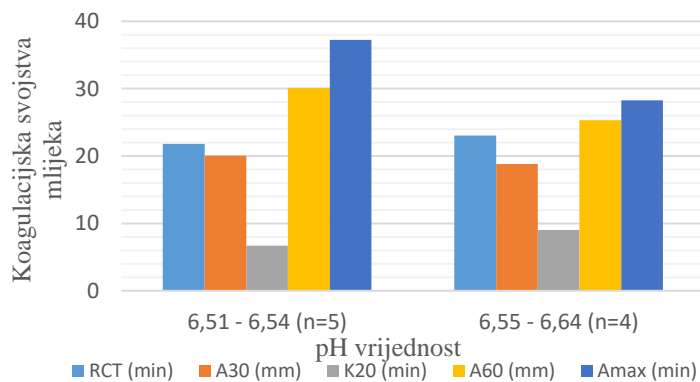
Grafikoni 7-9. Grafikoni prikazuju ovisnost koagulacijskih svojstava mlijeka o različitim pH vrijednostima u različitim vrstama mlijeka. Nezavisna varijabla predstavlja pH vrijednost, a koagulacijska svojstva mlijeka čine zavisnu varijablu (RCT: početak koagulacije [min], A₃₀: čvrstoća grušica [mm], K₂₀: brzina formiranja grušica [min], A₆₀: čvrstoća grušica nakon 60 minuta [mm], A_{max}: maksimalna čvrstoća grušica [min]).



Grafikon 7 Povezanost promjene pH vrijednosti sa koagulacijskim svojstvima kozjeg mlijeka (n=17)



Grafikon 8 Povezanost promjene pH vrijednosti sa koagulacijskim svojstvima ovčjeg mlijeka (n=7)



Grafikon 9 Povezanost promjene pH vrijednosti sa koagulacijskim svojstvima kravljeg mlijeka (n=9)

* $p < 0,05$

5. RASPRAVA

Uspoređujući kemijski sastav triju vrsta mlijeka, u ovčjem je mlijeku zabilježen najveći udio mliječne masti (6,62 g/100g), proteina (6,03 g/100g), suhe tvari (17,88 g/100g), suhe tvari bez masti (11,15 g/100g) kao i kazeina (4,76g/100g), što je sukladno rezultatima istraživanja provedenim na ovčjem mlijeku (Martini i sur., 2008; Rafiq i sur., 2016). Rafiq i sur. (2016) u istraživanju kemijskog sastava različitih vrsta mlijeka navode ovčje mlijeko kao mlijeko s najbogatijim kemijskim sastavom (mliječna mast: $6,82 \pm 0,04$ g/100g, suha tvar: $18,05 \pm 0,05$ g/100g, suha tvar bez masti: $11,24 \pm 0,02$ g/100g). Ovo istraživanje pokazalo je da se kravlje mlijeko razlikuje u sadržaju laktoze (4,61 g/100g) u usporedbi s ovčjim (4,47 g/100g) i kozjim mlijekom (4,40 g/100g). U nekim istraživanjima nije utvrđena značajnost između različitih vrsta mlijeka s obzirom na sadržaj laktoze (Mahmood i Usman 2010; Tagliazucchi i sur., 2018). Često se u kozjem mlijeku navode slobodne masne kiseline kao indikatori specifičnosti mirisa i okusa mlijeka (Haenlein, 2004). Rezultati određivanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u ovom istraživanju potvrđuju povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina u kozjem mlijeku (0,62 mmol/L), što je u skladu s istraživanjem Strzałkowska i sur. (2010).

Nadalje, ovim istraživanjem utvrđena je razlika u gustoći ovisno o vrsti mlijeka. Pojedini autori uspoređuju gustoće kozjega i kravljega mlijeka bez značajnih razlika uz naglasak na ovčjem mlijeku koje ima najveću gustoću (Parkash i Jenness, 1968; Haenlein i Wendorff, 2006), što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Neovisno o vrsti mlijeka, ukupan broj somatskih stanica podliježe velikim varijacijama (Pirisi i sur., 2007) što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Kod koza i ovaca karakterističan je apokrini tip sekrecije mlijeka prilikom kojeg dolazi do kontaminacije mlijeka većim brojem citoplazmatskih čestica i povećanim ukupnim brojem somatskih stanica u odnosu na kravlje mlijeko (Zeng, 1996). S obzirom na koncentraciju kalcija, u ovome istraživanju ovčje je mlijeko imalo najveću, dok je kozje mlijeko imalo najmanju koncentraciju kalcija. Autori često navode veće koncentracije kalcija u kozjem nego u kravljem mlijeku (Park i sur., 2007; Chia i sur., 2017). Prema Gaucheronu (2005) koncentracije kalcija u kravljem mlijeku kreću se od 1043-1283 mg/kg što su niže vrijednosti od onih dobivenih ovim istraživanjem (1501,11 mg/kg). Koncentracije kalcija u ovčjem mlijeku kreću se od 1950-2000 mg/kg (Chia i sur.,

2017) što su također niže vrijednosti u odnosu na ovo istraživanje (2271,43 mg/kg). Chia i sur. (2017) navode prosječnu koncentraciju kalcija u kozjem mlijeku (1340 mg/kg) koja je slična koncentraciji dobivenoj ovim istraživanjem (1387,65 mg/kg).

Zbog različitosti u kemijskom sastavu mlijeka u proizvodnji sireva od kozjeg mlijeka postižu se manji randmani u odnosu na sireve proizvedene od ovčjeg mlijeka (Bittante i sur., 2022). Prema istraživanju Stocco i sur. (2021) na kozjem mlijeku, koagulacijska svojstva kozjeg mlijeka koja prikazuju čvrstoću gruša nakon 30 i 60 minuta koagulacijskog procesa, a_{30} i a_{60} ($a_{30} = 38,8$ mm; $a_{60} = 24,1$ mm) znatno su se razlikovala od onih dobivenih u ovome istraživanju ($a_{30} = 18,81$ mm; $a_{60} = 10,40$ mm). Prema Stoco i sur. (2021) koagulacijska svojstva kozjeg mlijeka RCT i k_{20} (RCT = 12,4 min; $k_{20} = 4,02$ min) nisu znatno drugačija od onih dobivenih ovim istraživanjem (RCT = 10,64 min; $k_{20} = 3,57$ min). Pazzola (2019) navodi prosječne vrijednosti za a_{30} (36 mm) koagulacijsko svojstvo kozjega mlijeka slične onom u istraživanju Stoco i sur. (2021). Uzorci kozjega mlijeka obuhvaćeni ovim istraživanjem imali su slabiju čvrstoću gruša što posljedično može uzrokovati slabije randmane finalnog mliječnog proizvoda.

Postoje određene razlike u vrijednostima koagulacijskih svojstava kravljeg mlijeka u ovome istraživanju u usporedbi s istraživanjima Bittante (2011) i De Marchi i sur. (2013). Kod uzoraka kravljeg mlijeka u ovome istraživanju proces koagulacije započeo je nešto kasnije (RCT= 22,34 min), dok je u istraživanju Bittante (2011) koagulacijski proces vremenski ranije krenuo (RCT = 19,2 min). De Marchi i sur. (2013) navode znatno duži vremenski period za početak koagulacije kravljega mlijeka (RCT = 30,55 min) u usporedbi s ovim i istraživanjem Bittante (2011). Koagulacijska svojstva a_{30} i k_{20} ($a_{30} = 19,49$ mm; $k_{20} = 7,75$ min) također su se kvantitativno razlikovala od onih u istraživanju Bittante (2011) ($a_{30} = 28,5$ mm; $k_{20} = 5,5$ min). Usporedbom koagulacijskih svojstava a_{30} i k_{20} kravljega mlijeka u uzorcima ovoga istraživanja i istraživanja Bittante (2011) zabilježena je nešto manja čvrstoća gruša nakon 30 minuta koagulacijskog procesa (a_{30}) kao i sporija brzina formiranja gruša (k_{20}). S druge strane, uspoređujući vrijednosti brzine formiranja gruša (k_{20}) i čvrstoće gruša nakon 30 (a_{30}) i 60 minuta (a_{60}) s istraživanjem De Marchi i sur. (2013) zabilježene su razlike u odnosu na prethodnu usporedbu s istraživanjem Bittante (2011). U uzorcima ovoga istraživanja zabilježeno je brže formiranja gruša ($k_{20} = 7,75$ min) u odnosu na brzinu formiranja gruša kod De Marchi i sur. (2013) ($k_{20} = 9,61$ min). Čvrstoća

gruša 30 minuta nakon početka koagulacijskog procesa u ovome istraživanju ($a_{30} = 19,49$ mm) bila je slabija u odnosu na istraživanje De Marchi i sur. (2013) ($a_{30} = 26,97$ mm). S obzirom da su De Marchi i sur. (2013) pratili cijeli tijek koagulacije kroz 60 minuta kao što se pratilo i ovim istraživanjem, čvrstoća gruša 60 minuta nakon početka koagulacijskog procesa pokazala je drugačije rezultate. Ovim istraživanjem čvrstoća gruša pri završetku koagulacijskog procesa ($a_{60} = 27,98$ mm) bila je znatno bolja od one u istraživanju De Marchi i sur. (2013) ($a_{60} = 14,76$ mm). Konačno gledano, uspoređujući kvalitetu kravljega mlijeka za proizvodnju sireva ovoga istraživanja s istraživanjem Bittante (2011) i De Marchi i sur. (2013) može se zaključiti kako je kravlje mlijeko korišteno u ovom istraživanju imalo nešto niže vrijednosti za čvrstoću gruša nego što navodi Bittante (2011), ali znatno bolje u odnosu na istraživanje De Marchi i sur. (2013).

Gledano sa stajališta koagulacijskih svojstava mlijeka, ovčje je mlijeko vrsta mlijeka s najboljim kvantitativnim vrijednostima koagulacijskih svojstava radi bogatog kemijskog sastava koji utječe na koagulacijska svojstva u vidu vremenskog početka koagulacije te čvrstoće gruša (Gele i sur., 2014; Pazzola i sur., 2014; Pazzola, 2019). Kombinacijom visokog udjela mliječne masti i bjelančevina (primarno kazeina) ostvaruju se visoki prinosi sira (Bittante i sur., 2022), što je potvrđeno i u ovome istraživanju prilikom određivanja kemijskog sastava ovčjeg mlijeka. Prema istraživanju Martini i sur. (2008) na ovčjem mlijeku vrijednosti koagulacijskih svojstava ovčjega mlijeka slična su vrijednostima dobivenih ovim istraživanjem. S obzirom da su Martini i sur. (2008) proučavali i sezonalnost kao čimbenik utjecaja na koagulacijska svojstva ovčjeg mlijeka, prosječan početak koagulacije u njihovom istraživanju bio je nešto kraći ($RCT = 12,99$ min) u odnosu na ovo istraživanje ($RCT = 15,41$ min). Vrijednosti koagulacijskih svojstava ovčjega mlijeka a_{30} i k_{20} ovoga istraživanja ($a_{30} = 39,29$ mm; $k_{20} = 1,67$ min) u skladu su s navedenim istraživanjem ($a_{30} = 35,07$ mm; $k_{20} = 1,23$ min). Navedenim se potvrđuje kvaliteta ovčjega mlijeka ovoga istraživanja za proizvodnju visokokvalitetnih tradicionalnih sireva s ostvarivanjem visokog randmana finalnog proizvoda.

Osim usporedbe koagulacijskih svojstava različitih vrsta mlijeka, u ovome istraživanju pratio se utjecaj koncentracije kalcija, sadržaja kazeina i ionometrijske kiselosti mlijeka na koagulacijska svojstva različitih vrsta mlijeka. Prateći kako promjena koncentracije kalcija utječe na koagulacijska svojstva mlijeka dobio se uvid u slijedeće

rezultate. Utvrđena je značajna povezanost koncentracije kalcija na A_{max} koagulacijsko svojstvo kozjega mlijeka iz čega slijedi da se povećanjem koncentracije kalcija u kozjem mlijeku skratilo vrijeme potrebno za postizanje maksimalne čvrstoće gruša ($<a_{max}$). U dostupnoj literaturi gotovo i ne postoje radovi koje određuju vremenski period koagulacije u kojem se postiže maksimalna čvrstoća gruša (a_{max}). Inglingstad i sur. (2014) navode kako povećanje koncentracije kalcija u kozjem mlijeku utječe na smanjenu čvrstoću gruša nakon 30 minuta ($<a_{30}$) i produljeno vrijeme početka koagulacije ($>RCT$) što je slučaj i u ovome istraživanju no nije utvrđena značajnost između navedenih varijabli. Suprotno tome, nije utvrđena značajna povezanost između koncentracije kalcija i koagulacijskih svojstava ovčjeg mlijeka što je jednako istraživanju Bencini (2002) koja navodi kako povećanjem koncentracije kalcija u ovčjem mlijeku ne dolazi do značajnih promjena u koagulacijskim svojstvima, prvenstveno RCT , k_{20} i a_{30} . Koagulacijska svojstva kravljeg mlijeka u pogledu koncentracije kalcija prikazuju drugačije rezultate od onih dobivenih analizom ovčjeg mlijeka. Utvrđena je značajna povezanost koncentracije kalcija na a_{30} , k_{20} , a_{60} i a_{max} koagulacijska svojstva kravljeg mlijeka. Navedeno povećanje koncentracije kalcija u kravljem mlijeku predstavlja sporiju brzinu formiranja gruša ($>k_{20}$), smanjenu čvrstoću gruša nakon 30 i 60 minuta koagulacijskog procesa ($<a_{30,60}$) te kraći vremenski period za postizanje maksimalne čvrstoće gruša ($<a_{max}$). Summer i sur. (2014) navode optimalnu koncentraciju kalcija ($129,54 \pm 11,08$ mg/100g) koja pozitivno utječe na koagulacijska svojstva kravljeg mlijeka. Ovim istraživanjem utvrđeno je kako povećanje koncentracije kalcija u kravljem mlijeku od optimalnih predstavljenih istraživanjem Summer i sur. (2014) negativno utječe na čvrstoću gruša ($<a_{30,60}$).

Utvrđena je značajna veza između sadržaja kazeina i gotovo svih koagulacijskih svojstava kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka. Nije utvrđena značajnost između sadržaja kazeina i k_{20} koagulacijskog svojstva kozjeg mlijeka kao i a_{30} koagulacijskog svojstva ovčjeg mlijeka. U kozjem i ovčjem mlijeku povećanjem sadržaja kazeina duži je vremenski period potreban za početak koagulacije ($>RCT$) što je jednako istraživanju Inglingstad i sur. (2014) provedenim na kozjem mlijeku. U kravljem je mlijeku utvrđen obrnuto proporcionalan odnos između sadržaja kazeina i vremenskog početka koagulacije ($<RCT$), navedeni obrnuto proporcionalni odnos navode i u istraživanju Joudu i sur. (2008). U kravljem se mlijeku povećanjem sadržaja kazeina uvjetuje brže formiranje gruša ($<k_{20}$),

dok se u ovčjem mlijeku brzina formiranja grušā smanjuje ($>k_{20}$). Utvrđeno je kako povećanje sadržaja kazeina uvjetuje postizanje bolje čvrstoće grušā nakon 30 i 60 minuta koagulacijskog procesa ($>a_{30,60}$) te duži vremenski period za postizanje maksimalne čvrstoće grušā u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku ($>a_{max}$). Praćenjem sadržaja kazeina ovim je istraživanjem utvrđen veliki značaj njegovog sadržaja na koagulacijska svojstva mlijeka što znanstvenici predstavljaju i u drugim istraživanjima (Ikonen i sur., 2004; Joudu i sur., 2008; Stocco i sur., 2018).

Praćenjem inicijalne ionometrijske kiselosti mlijeka (pH) i koagulacijskih svojstava dobiveni su različiti rezultati ovisno o vrsti mlijeka. Ovim istraživanjem nije utvrđena značajnost između inicijalnog pH i koagulacijskih svojstava kravljega mlijeka, no općenito trend povećanja pH vrijednosti kravljega mlijeka utječe na promjene koagulacijskih svojstava kravljeg mlijeka identično kao i na promjene koagulacijskih svojstava kozjeg mlijeka (Okigbo i sur., 1985). Suprotno tome, utvrđena je značajnost inicijalnog pH i svih koagulacijskih svojstava kozjega mlijeka. U uzorcima kozjega mlijeka s većim inicijalnim pH bio je potreban dulji period za početak koagulacije ($>RCT$), slabija je bila brzina formiranja grušā ($>k_{20}$), čvrstoća grušā je bila manja nakon 30 i 60 minuta koagulacijskog procesa ($<a_{30,60}$) te je bilo potrebno kraće vrijeme za postizanje maksimalne čvrstoće grušā ($<a_{max}$). Zullo i sur. (2005) u istraživanju koagulacijskih svojstava kozjeg mlijeka navode kako pH ima utjecaj na čvrstoću grušā ako je ona mjerena u počecima koagulacijskog procesa, ali odmicanjem koagulacijskog procesa smanjuje se intenzitet utjecaja pH na čvrstoću grušā. Istraživanjem inicijalnog pH ovčjega mlijeka utvrđena je značajnost između RCT i k_{20} ovčjega mlijeka i inicijalne ionometrijske kiselosti mlijeka (pH). U uzorcima ovčjega mlijeka kod kojih je inicijalni pH mlijeka bio bliži neutralnom potreban je bio dulji period za početak koagulacije ($>RCT$) kao i slabija brzina formiranja grušā ($>k_{20}$). Ovi rezultati na ovčjem mlijeku identični su istraživanju Bencini (2002) koja navodi kako povećanjem inicijalnog pH dolazi i do smanjena čvrstoće grušā nakon 30 minuta ($<a_{30}$), no u ovom istraživanju između pH i a_{30} ovčjega mlijeka nije utvrđena značajnost.

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđene su razlike u kemijskom sastavu, fizikalnim svojstvima, ukupnom broju mikroorganizama i somatskih stanica te koncentraciji kalcija u kozjem, kravljem i ovčjem mlijeku.
2. Koagulacijska se svojstva mlijeka razlikuju ovisno o vrsti muznih životinja.
3. Koncentracija kalcija najviše je utjecala na promjene koagulacijskih svojstava u kravljem mlijeku.
4. Određivanje sadržaja kazeina važno je radi mogućnosti poboljšanja koagulacijskih svojstava kozjeg, kravljeg i ovčjeg mlijeka i postizanja većeg randmana finalnog proizvoda, posebice sira. U uzorcima s povećanim sadržajem kazeina ostvario se pozitivan utjecaj na čvrstoću grušā ($>a_{30,60}$). U uzorcima ovčjeg i kozjeg mlijeka povećan sadržaj kazeina uvjetovao je produljenje početka koagulacije ($>RCT$), a u uzorcima kravljeg mlijeka proces koagulacije započeo je ranije ($<RCT$).
5. Vrijednosti inicijalne pH mlijeka veće od optimalnih negativno su utjecale na koagulacijska svojstva ovčjeg i kozjeg mlijeka.
6. Na osnovu svih dobivenih rezultata može se zaključiti da su sadržaj kazeina, koncentracija kalcija i pH vrijednost mlijeka ključni fizikalno-kemijski čimbenici koji imaju značajan utjecaj na koagulacijska svojstva mlijeka.
7. Određivanjem fizikalno-kemijskih čimbenika i praćenjem koagulacijskih svojstava mlijeka omogućuje se korištenje znanstvenog pristupa u praksi uz mogućnost povećanja kvalitete finalnog mliječnog proizvoda.

8. ZAHVALE

Mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataši Mikulec na izdvojenom vremenu, potpori, mnogobrojnim konstruktivnim savjetima, ali i ukazanoj prilici da pod njenim vodstvom prijavim ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.

Profesoru, dr. sc. Nevenu Antuncu na realizaciji ovoga rada, savjetima i podršci tijekom izvođenja svih laboratorijskih analiza i pisanja rada.

Doktorandu Fabijanu Oštariću, mag. ing. agr. na prenesenom znanju, strpljenju, brojnim savjetima, susretljivosti, proširivanju znanstvenih vidika i podršci prilikom izrade ovoga rada.

Svim djelatnicama Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo koji su mi pomogli prilikom provođenja svih analiza potrebnih za ovaj rad.

Mojoj obitelji, kolegama s fakuleta i prijateljima za veliku podršku prilikom pisanja ovoga rada te smjernicama koje su mi uvelike pomogle da budem uspješniji i bolji u onome što radim.

9. POPIS LITERATURE

1. Abeykoon, C. D., Rathnayake, R. M. C., Johansson M., Silva G. L. L. P., Ranadheera C. S., Lundh A., Vidanarachchi J. K. (2016). Milk coagulation properties and milk protein genetic variants of three cattle breeds/types in Sri Lanka. *Procedia food science*, 6: 348 – 35
2. Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., Grongnet, J. F., Gaucheron, F. (2008). Effects of acidification on physico – chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow’s milk. *Food chemistry*, 106: 11-17.
3. Albenzio, M., Caroprese, M., Santillo, A., Marino, R., Taibi, L., Sevi, A. (2004): Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheesemaking properties of ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 87 (3), 533-542.
4. Alhussien, M. N., Dang A. K. (2018): Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview, *Veterinary World*, 11(5): 562-577.
5. Andren, A. (2003): Rennets and coagulants. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Roginski, H., Fuquay, W. J., Fox, P.F.). Academic Press: London, 283–286, prvo izdanje.
6. Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrao, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A. M., Nascimento, J. S., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Sant’Ana, A. S., Granato, D., Cruz, A. G. (2017a): Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2): 247 – 262.
7. Balthazar, C. F., Silva, H. L. A., Vieira, A. H., Neto, R. P. C., Cappato, L. P., Coimbra, P. T., Moraes, J., Andrade, M. M., Calado, V. M. A., Granato, D., Freitas, M. Q., Tavares, M. I. B., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Cruz, A. G. (2017b): Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Research International*, 91: 38 – 46.
8. Bencini, R. (2002): Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 705-719.

9. Bianchi, L., Bolla, A., Budelli, E., Caroli, A., Casoli, C., Pauselli, M., Duranti, E. (2004): Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 87 (8), 2401- 2408.
10. Bittante (2011): Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5821-5832.
11. Bittante, G., Amalfitano, N., Bergamaschi, M., Patel, N., Haddi, M. L., Benabid, H., Pazzola, M., Vacca, G. M., Tagliapietra, F. (2022): Composition and aptitude for cheese-making of milk from cows, buffaloes, goats, sheep, dromedary camels, and donkeys. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 2132-2152.
12. Bittante, G., Cipolat-Golet, C., Malchiodi, F., Sturaro, E., Tagliapietra, F., Schiavon, S., Cecchinato, A. (2015): Effect of dairy farming system, herd, season, parity, and days in milk on modeling of the coagulation, curd firming, and syneresis of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 1-16.
13. Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, A. (2012): Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95(12): 6843–6870.
14. Bonizzi, I., Buffoni, J. N., Feligini, M.(2009). Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. *Journal of Chromatography A*, 1216(1): 165 – 168.
15. Carlson, A. C., Hill, C. G., Olson, N. F. (1987): Kinetics of milk coagulation: III. Mathematical modeling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of κ casein – Parameter estimation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(5): 601- 611.
16. Cassandro, M. (2003): Status of milk production and market in Italy. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 68(2), 65-69.
17. Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Gallo, L., Carnier, P., Bittante, G. (2008): Genetic Parameters of Milk Coagulation Properties and Their Relationships with Milk Yield and Quality Traits in Italian Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 371-376.
18. Cecchinato, A., Bittante, G. (2016): Genetic and environmental relationships of different measures of individual cheese yield and curd nutrients recovery with coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1975–1989.

19. Chia, J., Burrow, K., Carne1, A., McConnell, M., Samuelsson, L., Day, L., Young, W., Bekhit, A. E. A. (2017): Minerals in Sheep Milk. *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*, 345-362.
20. Corredig, M., Salvatore, E. (2016): Enzymatic Coagulation of Milk. U: *Advanced Dairy Chemistry* (Ed. McSweeney, Paul L. H., O'Mahony, James A.). Poglavlje 11, 287-308.
21. Creamer, L. K., Plowman, J. E., Liddell, M. J., Smith, M. H., Hill, J. P. (1998): Micelle Stability: κ – Casein Structure and Function. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 3004-3012.
22. De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., Penasa, M. (2013): Prediction of coagulating and noncoagulating milk samples using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4707-4715.
23. DZNM. (2008): HRN EN ISO 13366-3. Mlijeko - Određivanje broja somatskih stanica – 3. dio: Fluoro-opto-elektronska metoda.
24. DZNM. (2010): HRN EN ISO 5764. Mlijeko - Određivanje točke smrzavanja - Termistorsko krioskopska metoda.
25. DZNM. (2013): HRN ISO 4833. Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalna metoda za brojanje mikroorganizama – Tehnika brojenja kolonija na 30 °C.
26. DZNM. (2017): HRN ISO 9622. Punomasno mlijeko – Određivanje udjela mliječne masti, bjelančevina i laktoze – Uputstva za rad mid - infrared instrumenata.
27. Foltmann, B. (1959). On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. *XVI International Dairy Congress*, 2: 655 – 661.
28. Frederiksen, P. D., Hammershøj, M., Bakman, M., Andersen, P. N., Andersen, J. B., Qvist, K. B., LarseN, L. B. (2011): Variations in co-agulation properties of cheese milk from three Danish dairy breeds as determined by a new free oscillation rheometry-based method. *Dairy Science and Technology*, 91(3):309–321.
29. Gantner, V., Mijic, P., Baban, M., Zoran, S., Alka, T. (2015): The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo*, 65:223–31.
30. Garnot, P., Olson, N. F. (1982): Use of oscillatory deformation technique to determine clotting times and rigidities of milk clotted with different concentrations of rennet. *Journal of Food Science*, 47(6):1912-1915.

31. Gaucheron, F. (2005): The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45: 473–483.
32. Gaucheron, F. (2005): The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473-483.
33. Gelè, M., Minery, S., Astruc, J. M., Brunshwig, P., Ferrand- Calmels, M., Lagriffoul, G., Larroque, H., Legarto, J., Leray, O., Martin, P., Miranda, G., Palhiere, I., Trossat, P., Brochard, M. (2014): Phénotypage et génotypage à grande échelle de la composition fine des laits dans les filières bovine, ovine et caprine. *Inra Production Animales*, 27(4),255–268.
34. Glantz, M., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Månsson, H. L., Stålhammar, H., Paulsson, M. (2010): Importance of casein mi-celle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, 93(4),1444–1451.
35. Haenlein, G. F. W. (2004): Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51 (2), 155-163.
36. Haenlein, G. F. W., Wendorff, W. L. (2006): Sheep milk—production and utilization of sheep milk. U: Park, Y. W., Haenlein, G. F. W. (Editors): *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, 137– 194.
37. Harmon, R. J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77 (7), 2103-2112.
38. Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., Ruottinen, O. (1999): Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(1):205–214.
39. Ikonen, T., Morri, A., Tyriseva, A. M., Ruottinen, O., Ojala, M. (2004): Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content and pH of milk. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 458–467.
40. Ikonen, T., Ojala, M., Syväoja, E. L. (1997): Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agricultural and Food Science*, 6(4):283–294.

41. Inglingstad, R. A., Steinshamn, H., Dagnachew, B. S., Valenti, B., Criscione, A., Rukke, E. O., Devold, T. G., Skeie, S. B., Vegarud, G. E. (2014): Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3800-3814.
42. Joudu, I., Henno, M., Kaart, T., Pussa, T., Kart, O. (2008): The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal*, 18, 964-967.
43. Kaya-Celiker, H., Mallikarjunana, P. (2012): Better Nutrients and Therapeutics Delivery in Food Through Nanotechnology. *Food Engineering Reviews*, 4: 114-123.
44. Kitchen, B. J. (1981): Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48 (01), 167-188.
45. Landfeld, A., Novotna, P., Houška, M. (2002): Influence of the Amount of Rennet, Calcium Chloride Addition, Temperature, and High-Pressure Treatment on the Course of Milk Coagulation. *Food Research Institute Prague*, 20(6): 237-244.
46. Lopez, M. B., Lomholt, S. B., Qvist, K. B. (1998). Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 8: 289–293.
47. Mahmood, A., Usman, S. (2010): A Comparative Study on the Physicochemical Parameters of Milk Samples Collected from Buffalo, Cow, Goat and Sheep of Gujrat, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12), 1192-1197.
48. Mariani, P., Battistotti, B. (1999): Milk quality for cheesemaking. *Recent Progress in Animal Production Science*. 1, 499–516.
49. 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 (12), 7698-7708.
50. Martini, M., Mele, M., Scolozzi, C., Salari, F. (2008): Cheese making aptitude and the chemical and nutritional characteristics of milk from Massese ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 7, 419-437.
51. Matijević, B., Blažić, M. (2008): Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 58(2), 151-169.

52. McMahon, D. J., Brown, R. J., Ernstorm, C. A. (1984). Enzymic Coagulation of Milk Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 67(4): 745 – 748.
53. Mioč , B. , Pavić , V. (2002): Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
54. Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P.S. (2016): Milk driven bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi Journal of Biological Science*, 23: 577 – 583.
55. 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 (1), 29-39.
56. Okigbo, L. M., Richardson, G. H., Brown, R. J., Ernstrom, C. A. (1985): Effects of pH, Calcium Chloride, and Chymosin Concentration on Coagulation Properties of Abnormal and Normal Milk. *Journal of Dairy Science*, 68(10), 2527-2533.
57. Ong, L., Dagastine, R. R., Kentish, S. E., Gras, S. L. (2013): The effect of calcium chloride addition on the microstructure and composition of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 33(2), 135-141.
58. Ozrenk, E., Inci, SS. (2008). The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in Van Province. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1): 161-164.
59. Paape, M. J., Wiggans, G. R., Bannerman, D. D., Thomas, D. L., Sanders, A. H., Contreras, A., Moroni, P., Miller, R. H. (2007): Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68 (1), 114–125.
60. Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
61. Parkash, S., Jenness, R. (1968): The composition and characteristics of goat's milk: a review. *Journal of Dairy Science*, 63(10), 1605-1630.
62. Pazzola M. (2019): Coagulation traits of sheep and goat milk. *Journal Animals*, 9(8):540
63. Pazzola, M., Dettori, M. L., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., Vacca, G. M. (2014): Phenotypic factors affecting coagulation properties of milk from Sarda ewes. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 7247–7257.
64. Phadungath, C., Metzger, L. E. (2011): Effect of sodium gluconate on the solubility of calcium lactate. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4843-4849.

65. Pirisi, A., Lauret, A., Dubeuf, J. P. (2007): Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 167-178.
66. Pirisi, A., Piredda, G., Corona, M., Pes, M., Pintus, S., Ledda, A. (2000): Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheese yield and cheese quality, 47-59.
67. Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2020). *Narodne novine*. Broj 42 od 09. prosinca.
68. Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., Khan, M. I. (2016): Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 29(7), 1022-1028.
69. Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., Bouhallab, S. (2007a). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68: 207–20.
70. Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., De Cremoux, R., Gonzalo, C. (2007b): Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Reserch*, 68 (1), 126 - 144.
71. Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., Tufarelli, V. (2014): Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 3090-9.
72. Soodam, K., Ong, L., Powell, I. B., Kentish, S. E., Gras, S. L. (2015): Effect of calcium chloride addition and draining pH on the microstructure and texture of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food Chemistry*, 181, 111-118.
73. Stocco, G., Dadousis, C., Vacca, G. M., Pazzola, M., Paschino, P., Dettori, L. M., Ferragina, A., Cipolat-Gotet, C. (2021): Breed of goat affects the prediction accuracy of milk coagulation properties using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal od Dairy Science*, 104(4), 3956-3969.
74. Stocco, G., Pazzola, M., Dettori, M. L., Paschino, P., Bittante, G., Vacca, G. M. (2018): Effect of composition on coagulation, curd firming, and syneresis of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9693 – 9702.

75. Strzałkowska, N., Józwik, A., Bagnicka, E., Krzyżewski, J., Horbańczuk, K., Pyzel, B., Słoniewska, D., Horbańczuk, O. J. (2010): The concentration of free fatty acids in goat milk as related to the stage of lactation, age and somatic cell count. *Animal Science Papers and Reports*, 28(4), 389-395.
76. Summer, A., Franceschi, P., Malacarne, M. (2014): Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 129-136.
77. Sundekilde, U. K., Frederiksen, P. D., Clausen, M. R., Larsen, L. B., Bertram, H. C. (2011): Relationship between metabolite profile and technological properties of bovine milk from two dairy breeds elucidated by NMR-based metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:7360–7367.
78. Tagliazucchi, D., Martini, S., Shamsia, S., Helal, A., Conte, A. (2018): Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk. *International Dairy Journal*, 81, 19-27.
79. Teuber, M. (1990): Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 251, 3–15.
80. Tratnik Lj. (1998) : Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
81. Troch, T., Lefébure, E., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., Sindic, M. (2017) : Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 21(4): 276 – 287.
82. Villalobos, J. C., Sigler, A. I. G., Oliete, B., Sánchez, R. A., Jiménez, L., Sanchez, N. N., Marín, A. L. M. (2015): Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk. *Mljekarstvo* 65 (2), 138 – 143.
83. Vivar-Quintana, A. M., Beneitez De La Mano, E., Revilla, I. (2006): Relationship between somatic cell counts and the properties of yoghurt made from ewes' milk. *International Dairy Journal*, 16 (3), 262-267.
84. Wolfschoon-Pombo A. F. (1997): Influence of Calcium Chloride Addition to Milk on the Cheese Yield. *International Dairy Journal*, 7(4): 249-254.

85. Yegin, S., Dekker, P. (2013): Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93, 565–594.
86. Zeng, S. S. (1996): Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, 21(3), 221-225.
87. Zullo, A., Barone, C. M. A., Chianese, L., Colatruglio, P., Occidente, M., Matassino, D. (2005): Protein polymorphisms and coagulation properties of Cilentana goat milk. *Small Ruminant Research*, 58(3), 223-230.

10. SAŽETAK

Dario Domović

Definiranje ključnih fizikalno-kemijskih čimbenika povezanih s koagulacijskim svojstvima mlijeka

Koagulacija mlijeka predstavlja obveznu te jednu od najznačajnijih faza u proizvodnji sireva. Prilikom koagulacije mlijeka dolazi do niza biokemijskih procesa gdje kao produkt koagulacijskog procesa nastaje gruša. Za postizanjem što boljega finalnog proizvoda (sira) nužno je određivanje koagulacijskih svojstava mlijeka. Određivanjem koagulacijskih svojstava mlijeka dobiva se uvid u vremenski početak koagulacije (RCT koagulacijsko svojstvo), brzinu formiranja gruša (k_{20} koagulacijsko svojstvo), čvrstoću gruša nakon 30 (a_{30} koagulacijsko svojstvo) i 60 (a_{60} koagulacijsko svojstvo) minuta koagulacijskog procesa te točno definirano vrijeme prilikom kojega se u tijeku koagulacijskog procesa postiže maksimalna čvrstoća gruša (a_{max}). U praksi se ovisno o dobivenim vrijednostima koagulacijskih svojstava mlijeka može vršiti selekcija životinja. Koagulacijska se svojstva mlijeka uvelike razlikuju ovisno o vrsti muzne životinje. Niz je čimbenika koji imaju utjecaj na koagulacijska svojstva mlijeka, a ovim se istraživanjem pratio utjecaj koncentracije kalcija, sadržaja kazeina i ionometrijske kiselosti mlijeka. Istraživanjem je ustanovljeno kako su uzorci s većim sadržajem kazeina imali bolje vrijednosti koagulacijskih svojstava mlijeka od onih prosječnih čime se u finalnome proizvodu ostvaruju veći randmani. Također, ukoliko je u uzorcima izmjerena viša pH vrijednost od optimalne (bliže neutralnom) veća je vjerojatnost za postizanjem slabije kvalitete i manjega randmana u finalnom proizvodu. Na osnovu svih dobivenih rezultata može se zaključiti da su sadržaj kazeina, koncentracija kalcija i pH vrijednost mlijeka ključni fizikalno-kemijski čimbenici koji imaju značajan utjecaj na koagulacijska svojstva mlijeka.

Ključne riječi: koagulacijska svojstva mlijeka, kazein, kalcij, ionometrijska kiselost mlijeka

11. SUMMARY

Dario Domović

Defining key physicochemical factors related to the milk coagulation properties

During milk coagulation, many biochemical processes occur which result in curd production. To achieve the best possible final product (cheese), it is necessary to determine the coagulation properties of milk. Determination of milk coagulation properties gives an insight into the time required for the start of coagulation (RCT coagulation property), the rate of coagulum formation (k_{20} coagulation properties), the coagulation strength after 30 (a_{30} coagulation properties) and 60 (a_{60} coagulation properties) minutes of coagulation process, and precisely defined time during which the coagulation process reaches the maximum clotting strength (a_{max}). In practice, depending on the obtained values of milk coagulation properties, animal selection can be performed. The coagulation properties of milk vary greatly depending on the type of dairy animals. There are many factors that influence the coagulation properties of milk, and the influence of calcium concentration, casein content and ionometric acidity of milk were monitored in this study. Research revealed that samples with higher casein content had better coagulation properties of milk than average ones, resulting in a higher yield in the final product. Also, if higher pH values were measured in the samples then the optimum (closer to neutral) value is more likely to achieve lower quality and lower yield in the final product. Based on all obtained results, it can be concluded that casein content, calcium concentration and milk pH value are key physicochemical factors that have a significant influence on milk coagulation properties.

Keywords: *milk coagulation properties, casein, calcium, ionometric acidity of milk*

12. ŽIVOTOPIS

Dario Domović rođen je 16.01.2000. u Zagrebu. U Zagrebu završava osnovnu školu Ksavera Šandora Gjalskoga te opću gimnaziju Sesvete. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2018. godine. U devetom mjesecu 2021. godine završava preddiplomski studij animalne znanosti i steče naziv univ. bacc. ing. agr. Tijekom preddiplomskog studija dobitnik je STEM stipendije. U ovoj akademskoj godini kategoriziran je u 10 % najuspješnijih studenata na studiju te je dobitnik stipendije Sveučilišta u Zagrebu u A kategoriji (stipendije za izvrsnost).