

Utjecaj ultrazvuka na taloženje proteina u slatkoj sirutki nakon toplinske obrade

Marinčić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:866683>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Marina Marinčić

749/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA NA
TALOŽENJE PROTEINA U
SLATKOJ SIRUTKI NAKON
TOPLINSKE OBRADE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Rajke Božanić Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Katarine Lisak Jakopović

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Rajki Božanić koja mi je svojim savjetima pomogla u oblikovanju i pisanju diplomskog rada.

Hvala i asistentici dr. sc. Katarini Lisak Jakopović na velikoj pomoći, savjetima i susretljivosti prilikom izrade i pisanja rada.

Najveće hvala mojoj obitelji koja mi je kroz sve godina školovanja pružala neizmjernu ljubav, podršku i razumijevanje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA NA TALOŽENJE PROTEINA U SLATKOJ SIRUTKI NAKON TOPLINSKE OBRADE

Marina Marinčić 749/PI

Sažetak: *Cilj rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta primjenom sonde različitih promjera (12,7 mm, 19 mm i 22 mm) na taloženje proteina u slatkoj sirutki. Sirutka je tretirana s 2 različita režima ultrazvuka 20kHz/8min/40% i 20kHz/5min/60% nakon čega su uzorci toplinski obrađeni pri 72 °C/20 s ili 95 °C/5 min te analizirani. Osim određivanja količine taloga i senzorske analize, praćena jekiselost (pH, °SH), distribucija veličine čestica te boja. Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da ultrazvuk ima pozitivan utjecaj na smanjenje količine nastalog taloga u sirutki nakon toplinske obrade. Promjer sonde značajno utječe na efikasnost primijenjenog ultrazvučnog režima, kao i na senzorske karakteristike tretiranih uzoraka sirutke. Najbolji rezultati postignuti su tretiranjem sondom od 19 mm i režimom 20kHz/8min/40% te pasterizacijom pri 72°C/20s (postotak smanjenja taloga 59,09%) s obzirom na to da su postignuta zadovoljavajuća senzorska svojstva tretirane sirutke.*

Ključne riječi: sirutka, ultrazvuk, proteini sirutke, talog

Rad sadrži: 53 stranice, 19 slika, 25 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Rajka Božanić*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Katarina Lisak Jakobović*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. *Irena Barukčić*
2. Prof. dr. sc. *Rajka Božanić*
3. Izv. prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*
4. Doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić* (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology and Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Dairy Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ULTRASOUND ON PROTEIN PERCIPITATION AFTER HEAT TREATMENT IN SWEET WHEY

Marina Marinčić 749/PI

Abstract: *The purpose of this study was to examine influence of high intensity ultrasound with different probe diameters on protein percipitation in sweet whey. Whey samples were treated with ultrasound with two different treatmants 20kHz/8min/40% and 20kHz/5min/60% and three different probe diameters of 12,7 mm, 19 mm and 22 mm. After the ultrasound treatment, whey samples were treated with heat 72 °C/20s or 95 °C/5min. Despite protein percipitation and sensory characteristics, pH, °SH, particle size and color were examined. According to results, ultrasound has positive influence on reduction of protein percipitate after heat treatment. Probe diameter has huge influence on efficiency of ultrasound treatment as well as sensory characteristics. Considering good sensory characteristic the best results were achieved with probe diameter 19 mm and ultrasound treatment 20kHz/8min/40% and pasteurization 72 °C/20 s (percentage of sediment reduction 59,09%).*

Keywords: whey, ultrasound, whey proteins, percipitate

Thesis contains: 53 pages, 19 figures, 25 tables, 45 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:

Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Rajka Božanić*, Full professor

Technical support and assistance: PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
2. PhD. *Rajka Božanić*, Full professor
3. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Associate professor
4. PhD. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 26 September 2017

SADRŽAJ:

1.UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.Sirutka	2
2.1.1. Sastav sirutke.....	2
2.2. Ultrazvuk	10
2.2.1. Princip rada ultrazvuka.....	10
2.2.2. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	13
3.2. Metode rada.....	13
3.2.1. Proizvodnja sirutke.....	13
3.2.2. Analize mlijeka i sirutke	16
4.REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1.Tretman sirutke ultrazvučnom sondom promjera 12,7 mm	26
4.2. Tretman sirutke ultrazvučnom sondom promjera 19 mm	34
4.3.Tretman sirutke ultrazvučnom sondom promjera 22 mm	40
5. ZAKLJUČCI	49
6. LITERATURA	50

1.UVOD

Posljednjih nekoliko desetaka godina znanstvena istraživanja su sve više usmjerena na razvoj novih tehnika proizvodnje hrane kojima će se dobiti visokokvalitetni proizvodi sa senzorskim karakteristikama istim ili što je više moguće sličnim proizvodima dobivenim konvencionalnim putem. Jedna od novijih tehnika proizvodnje hrane, odnosno tretiranja gotove hrane je i upotreba ultrazvuka.

Ultrazvuk ima važnu ulogu pri proizvodnji visokokvalitetne hrane. Najčešće se koristi za inaktivaciju mikroorganizama, formiranje emulzija, homogenizaciju, poticanje i ubrzavanje kristalizacije, poboljšavanje ekstrakcije (Ashokkumar, 2014), ali i prema znanstvenim istraživanjima tretman ultrazvukom ima pozitivne učinke na povećanje stabilnosti proteina nakon toplinske obrade.

Budući da je sirutka visokovrijedan sporedni proizvod koji nastaje tijekom proizvodnje sira i sadrži visokovrijedne proteine po kojima je sirutka i najprepoznatljivija među širom populacijom, potrebno je pronaći metodu kojom bi se taj negativan utjecaj toplinske obrade na denaturaciju proteina smanjio. S obzirom na to da pri povišenim temperaturama dolazi do denaturacije proteina, a nakon obrade dolazi i do agregacije denaturiranih proteina i nastanka velikih čestica koje se talože, što je izuzetno negativna senzorska karakteristika, današnja istraživanja su usmjerena ka pronalasku metoda kojima bi se povećala stabilnost proteina i time smanjenje taloga u najvećoj mogućoj mjeri (Gajendragadkar i Gogate, 2016).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj ultrazvuka na stabilnost proteina sirutke, odnosno pojave taloga, podvrgnute toplinskoj obradi, te istražiti kako pojedine ultrazvučne sonde utječu na pojedina svojstva sirutke i senzorske karakteristike. Uzorci sirutke na kojima je provedeno istraživanje su proizvedeni u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda, a za proizvodnju je korišteno sirovo mlijeko s mljekomata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1.SIRUTKA

Sirutka je sporedni, visokovrijedan proizvod koji nastaje u tehnološkom procesu proizvodnje sira ili kazeina. To je tekućina zeleno-žute boje koja potječe od riboflavina. Sastav i svojstva sirutke prvenstveno ovise o tehnologiji proizvodnje osnovnog proizvoda te o kakvoći korištenog mlijeka (Tratnik, 1998).

Prema kiselosti sirutka se može svrstati u tri skupine (Tratnik i Božanić, 2012):

1. slatka sirutka: titracijska kiselost od 0,10 do 0,20%, pH- vrijednost 5,8-6,6;
2. srednje kisela: titracijska kiselost od 0,20 do 0,40%, pH-vrijednost manja od 5,0-5,8 te
3. kisela sirutka: titracijska kiselost veća od 0,40%, pH-vrijednost manja od 5,0;

gdje je titracijska kiselost izražena u postotcima mliječne kiseline.

Kisela sirutka nastaje kiselinskom koagulacijom djelovanjem kiseline, a slatka sirutka nastaje enzimskom koagulacijom djelovanjem proteolitičkih enzima ili enzima mikrobnog porijekla.

Glavna proteinaza sirila je kimozin. Koagulacija mlijeka sirilom odvija se u dvije faze. U prvoj, enzimskoj fazi dolazi do hidrolizacije κ -kazeina što rezultira destabilizacijom. Zatim slijedi druga, neenzimska faza u kojoj, uz prisutnost kalcijevih iona, dolazi do grupiranja izmijenjenih micela i formiranja kimozijskog gela (Fox, 1980).

2.1.1. Sastav sirutke

Najveći dio sirutke čini voda i to oko 93% (Beucler i sur. 2005). U sirutku obično prelazi oko 50% suhe tvari mlijeka, uglavnom laktoza, zatim proteini sirutke u cijelosti, slijede topljive mineralne tvari te vitamini B skupine (Tratnik, 1998). Prosječan sastav sirutke te udjeli proteina u sirutki prikazani su tablicom 1.

Tablica 1. Prosječni sastav (g/100 mL) i udjel proteina (%) u sirutki (Tratnik i Božanić, 2012)

Sastojak	g/100 mL	% od ukupnih	Proteini sirutke	% od ukupnih
Laktoza	4,66	71,7	β -laktoglobulin	50
Proteini sirutke	0,91	14,0	α -laktalbumin	22
Mineralne tvari	0,50	7,7	Imunoglobulini	12
Mliječna mast	0,37	5,7	Proteoze-peptoni	10
Ostalo	0,06	0,9	Albumin krvnog seruma	5
UKUPNO	6,50	100,0	Ostalo (tragovi mnogih)	1

Laktoza

Laktoza je glavni sastojak u suhoj tvari sirutke. To je osnovni šećer koji se pojavljuje u mlijeku zbog čega se još zove i mliječni šećer. Laktoza je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) sastavljen od molekula α -D-glukoze i β -D-galaktoze (Tratnik i Božanić, 2012). U usporedbi s drugim ugljikohidratima ima nisku kalorijsku vrijednost i nizak glikemijski indeks (Souza i sur., 2010). Laktoza je lako probavljiva i potiče peristaltiku crijeva, osigurava optimalnu razinu magnezija, potpomaže apsorpciju kalcija i fosfora, te probavu masti i ostalih hranjivih tvari u organizmu. Osim toga laktoza sprječava rast i razmnožavanje štetnih bakterija, uspostavljajući blago kiselu reakciju u crijevima. Budući da se laktoza ne nagomilava u jetri pogodna je i za dijabetičare.

Toplinska obrada sirutke može uzrokovati pretvorbu određenog udjela laktoze u laktulozu, koja se ubraja u promotore rasta bifidobakterija, što je dodatna prednost za potrošača (Tratnik, 2003). Jedna od čestih pojava tijekom toplinske obrade mlijeka na visokoj temperaturi su Maillardove reakcije koje uzrokuju neenzimsko posmeđivanje, a odvijaju se između amino skupina proteina i aldehidnih skupina laktoze. Pri tome može nastati melanoidni pigment koji je odgovoran za posmeđivanje mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Laktoza je našla svoju primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Koristi se u proizvodnji hrane za dojenčad, kao pomoćna tvar u farmaceutskim proizvodima, te u proizvodnji pekarskih proizvoda radi kontroliranog posmeđivanja (Souza i sur., 2010). Kao što je prikazano tablicom 1, laktoze u sirutki ima oko 71,7% u suhoj tvari. S obzirom na to da se iz sirutke često izdvajaju proteini sirutke, u permeatu ostaje velika količina laktoze

koju se iz permeata može izdvojiti uparavanjem, ultrafiltracijom ili sušenjem sirutke (Marošević, 1981).

Proteini sirutke

Proteini sirutke gotovo u cijelosti prelaze u sirutku nakon izdvajanja gruš kazeina jer nisu osjetljivi na djelovanje kiseline ili enzima sirila zbog čega ostaju nepromijenjeni tijekom koagulacije mlijeka. Udjel proteina u slatkoj i kiseloj sirutki je podjednak, ali slatka sirutka sadrži i GMP (glikomakropeptid) koji nastaje enzimskom hidrolizom κ -kazeina (Tratnik i Božanić, 2012). Prema strukturi, proteini sirutke su globularni proteini koji imaju podjednaku raspodjelu nepolarnih, polarnih, neutralnih, nabijenih i nenabijenih ostataka aminokiselina. Nabrana struktura ovih proteina je posljedica disulfidnih veza (S-S) između ostataka cisteina koja je unutar molekule uglavnom prekrivena hidrofobnim ostacima (Tratnik, 1998). Proteini sirutke su nutritivno najvrijedniji proteini jer imaju visok udjel esencijalnih aminokiselina te visok udjel cisteina. Takav aminokiselinski sastav proteinima sirutke daje izrazito visoku biološku vrijednost (De Wit, 1998). Proteini sirutke imaju puno veću biološku vrijednost u usporedbi s kazeinom i većinom drugih proteina, kao i drugim proteinima animalnog porijekla (tablica 2). Još jedan od razloga zašto sirutka ima visoku biološku vrijednost je α -laktalbumin čiji je aminokiselinski sastav blizu biološkog optimuma (Renner, 1983). Za iskoristivost proteina u organizmu vrlo je bitan omjer cistein/metionin, koji je u proteinima sirutke oko 10 puta veći nego u kazeinu (Tratnik i Božanić, 2012).

Tablica 2. Prosječna biološka vrijednost (BV) proteina sirutke i drugih proteina (Tratnik i Božanić, 2012)

proteini	sirotka	jaja	mlijeko	govedina	kazein	krumpir	Brašno
BV	104	100	92	78	73	69	45

Proteini sirutke su izrazito termolabilni pa tijekom duljeg zagrijavanja sirutke dolazi do ireverzibilne denaturacije. Toplinski denaturirani α -laktalbumin se gotovo kvantitativno pretvara u tjelesni protein dok kod kazeina taj postotak iznosi oko 75% (Tratnik i Božanić, 2012). Denaturacija ovih proteina započinje već pri temperaturi iznad 60 °C, ali se

koagulacija gotovo svih proteina sirutke očekuje zagrijavanjem sirutke na temperaturu 90-95 °C kroz 10-20 minuta (Herceg i sur., 2008).

Toplinska denaturacija proteina sirutke odvija se u dva koraka. Prvi korak je razmotavanje proteina, koje može biti reverzibilno ili ireverzibilno, a drugi korak je agregacija denaturiranih proteina (Jovanović i sur., 2005). Stupanj koagulacije proteina ovisi o pH vrijednosti, temperaturi i trajanju zagrijavanja, ionskoj jakosti, udjelu suhe tvari, udjelu pojedinih frakcija proteina i broju njihovih reaktivnih –SH skupina (Tratnik i Božanić, 2012).

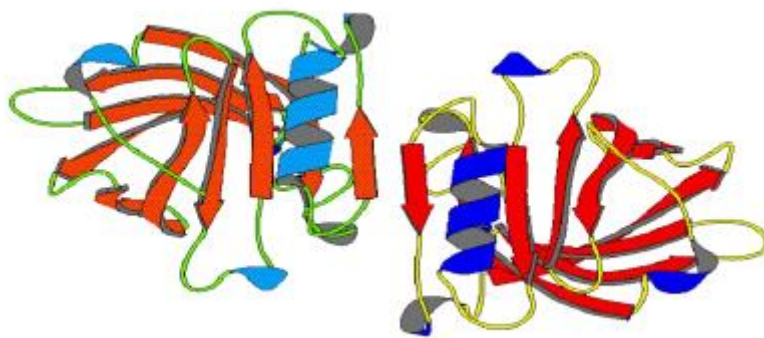
Kako je prikazano tablicom 1, proteine sirutke najvećim dijelom čine β -laktoglobulini i α -laktalbumini, a zatim slijede imunoglobulini, frakcija proteoza-peptona te albumin krvnog seruma.

Tablicom 3. su prikazane vrijednosti izoelektrične točke (pI), molekularne mase te temperature pri kojoj započinje denaturacija proteina sirutke.

Tablica 3. Fizikalna svojstva glavnih komponenti proteina sirutke (Herceg i sur., 2008)

protein	pI	Molarna masa (kDa)	Temperatura denaturacije (°C)
β -laktoglobulin	5,2	18,4	78
α -laktalbumin	4,8-5,1	14,2	62
albumin krvnog seruma	4,8-5,1	66,0	64
imunoglobulini	5,5-6,8	159,6	72

β -laktoglobulin je dimer sastavljen od dva peptidna lanca koji se čvrsto drže zajedno pomoću nekovalentnih veza s ukupno 162 aminokiseline u monomeru (Tratnik i Božanić, 2012). U globuli β -laktoglobulina zastupljen je dio α -uzvojnice i dio β -nabrane ploče, ali i dio neodređene strukture (slučajna klupka) (Tratnik, 1998). Na slici 1 je prikazana struktura β -laktoglobulina.



Slika 1. β -laktoglobulin (Herceg i Režek, 2006)

Pri temperaturi od 60 °C dimer disocira u otopini i postaje prikladan za denaturaciju odnosno odmotavanje (Tratnik i Božanić; 2012). Nakon razmatanja, β -laktoglobulin tvori intermolekularne veze, bilo hidrofobnim interakcijama ili S-S mostovima (Herceg i sur., 2004) i time se može objasniti svojstvo agregacije globula i nastajanje taloga. β -laktoglobulin je bogat cisteinom koji je važan za sintezu glutaciona (GSH) (De Wit, 1998). GSH je tripeptid aminokiselina L-cisteina, L-glutamina i glicina i najvažniji je antioksidans koji se nalazi u tijelu, a topljiv je u vodi. Ima svojstva podizanja imuniteta, sprječavanja oksidativnog stresa i podizanja općeg zdravlja organizma (Herceg i Režek, 2006). Budući da se GSH smatra esencijalnim za podizanje imuniteta to je još jedan razlog zašto bi proteini sirutke trebali imati važno mjesto u prehrani ljudi.

α -laktalbumin je monomerni protein te drugi po zastupljenosti u sirutki (Herceg i sur., 2004). To je kompaktan protein i ima primarnu strukturu koja sličí lizozimu. Sastoji se od jednog lanca sa 123 aminokiseline (King, 1996). Bogat je triptofanom i cisteinom, ali molekula ne sadržava slobodne SH-skupine nego ima 4 stabilne disulfidne veze (S-S) (Tratnik i Božanić, 2012). Na slici 2 je prikazana struktura α -laktalbumina.



Slika 2. α -laktalbumin (Herceg i Režek, 2006)

α -laktalbumin je najotporniji protein sirutke na djelovanje topline jer veže jedan Ca^{2+} ion po molu, ali pri $\text{pH} < 5$ gubi sposobnost vezanja Ca iona i znatno je podložniji toplinskoj denaturaciji (Tratnik i Božanić, 2012). Prema Markus i sur. (2002) α -laktalbumin je povezan s liječenjem kroničnog stresa koji uzrokuje pad serotonina. Budući da je triptofan prekursor serotonina, a α -laktalbumin je bogat triptofanom tako bi prehrana obogaćena α -laktalbuminom mogla omogućiti povećanje ukupne količine triptofana u plazmi.

Herceg i sur. (2004) su u svome radu istraživali funkcionalna svojstva β -laktoglobulina i α -laktalbumina te su otkrili da β -laktoglobulin ima veću specifičnu površinu, kao i veličinu čestica u odnosu na α -laktalbumin. Također, β -laktoglobulin ima bolju topljivost, bolja svojstva pjenjenja, te stvara stabilnije emulzije nego α -laktalbumin.

Imunoglobulini su najtermolabilniji proteini sirutke. U sebi sadržavaju i ugljikohidrate (heksoza i heksozamin) pa se ubrajaju i u glikoproteine. To su specifična antitijela čija je osnovna uloga vezivanje antigena pa su tako odgovorni za prijenos imuniteta na potomstvo i mogu biti zaštita od bolesti (Tratnik i Božanić, 2012).

Proteoze-peptoni su termostabilne frakcije. Stabilne su i na djelovanje kiseline i enzima, a prisutne su u tragovima, kao i brojni drugi proteini: laktoferin, transferin te laktoperoksidaza, lizozim i drugi imunoaktivni enzimi. Važni su jer utječu na vezivanje minerala i vitamina te utječu na stabilnost okusa mliječnih proizvoda (King, 1996).

Albumin krvnog seruma sastoji se od jednog polipeptidnog lanca s 582 aminokiseline od kojih je 35% cisteinskih ostataka koji oblikuju 17 disulfidnih mostova i ostaje jedna slobodna –SH skupina (Tratnik i Božanić, 2012). Albumin krvnog seruma je jedan od najvažnijih želirajućih proteina sirutke. U prirodnom stanju sadrži oko 60% α -uzvojnice. Međutim, porastom temperature udio α -uzvojnice opada, a povećava se udio β -nabrane ploče (Wijayanti i sur., 2014).

Mineralne tvari

Mineralne tvari su najpromjenjiviji sastojak sirutke zbog različitih biokemijskih procesa u tehnologiji proizvodnje sira. Sirutka je bogata topljivim solima i mikroelementima iz mlijeka, ali sadrži i soli dodane pri proizvodnji sira. Kalcij i fosfor se djelomično zadrže u kazeinu sira, ovisno o načinu i stupnju hidrolize kazeina, a druge mineralne tvari se pojavljuju u sirutki približno u istim udjelima kao i u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012). U slatkoj sirutki ima manje kalcija i fosfora nego u kiseloj jer su manje topljive soli i Ca-fosfati (Tratnik, 1998).

Pri toplinskoj obradi sirutke se smanjuje topljivost mineralnih tvari što umanjuje njihovu hranjivu vrijednost, a i visok udio mineralnih tvari uzrokuje nepoželjni slano-trpki okus sirutke (Tratnik, 2003).

Mliječna mast

Mliječna mast iz mlijeka uglavnom se zadrži u siru, ali se uvijek pojavljuje mali gubitak masti sa sirutkom. U usporedbi s mlijekom, mliječna mast koja prelazi u sirutku bolje je dispergirana i sadržava veći postotak manjih globula jer se veće globule uglavnom zadrže u siru (Tratnik i Božanić, 2012). Ovisno o početnom udjelu masti u mlijeku i tehnologiji koja je primijenjena u proizvodnji sireva, mliječna mast se u sirutki kreće od 0,05 do 0,45 %. Kisela sirutka sadržava manje mliječne masti jer se kiseli svježi sirevi proizvode uglavnom od obranog mlijeka (Marošević i Peraković, 1981).

Vitamini

Vitamini koji prelaze u sirutku su većinom hidrosolubilni vitamini. Udjel vitamina B₂ (riboflavin) je čak veći nego u mlijeku radi aktivnosti nekih bakterija mliječne kiseline pri proizvodnji sira (Tratnik i Božanić, 2012). Vitamin B₂ daje žuto zelenu boju sirutki pa se ona često koristi kao sirovina za proizvodnju koncentriranog riboflavina (Tratnik, 2003).

2.2. ULTRAZVUK

Pod ultrazvukom podrazumijeva se zvučni val s frekvencijama višima od praga osjetljivosti ljudskog sluha (16-18 kHz). Glavni fizički parametri koji karakteriziraju ultrazvučni val su snaga (W), frekvencija (Hz) i valna duljina (cm) iz kojih se računa jakost ultrazvuka (I) (Mason i sur., 2005).

Rasponi zvuka pri ultrazvuku mogu se općenito podijeliti na:
-*dijagnostički ultrazvuk* (raspon u mHz), ultrazvučni valovi niskog intenziteta-visoke frekvencije i niske energije

-*ultrazvuk visoke energije* (raspon u kHz), ultrazvučni valovi visokog intenziteta-niske frekvencije i visoke energije.

Ultrazvučni valovi niskog intenziteta–frekvencije 1 do 10 MHz te vrlo male razine snage (manje od 1 W/cm²) ne dovode do fizikalnih i kemijskih oštećenja materijala kroz koji prolaze. Ultrazvučni valovi niskog intenziteta se mogu koristiti za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane. Također se može koristiti za kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, procese sušenja i zamrzavanja, kao i za omekšavanje mesa.

Ultrazvučni valovi visokog intenziteta–frekvencije 20 do 100 kHz te visoke razine snage (u rasponu od 10 do 1000 W/cm²) zbog velike snage kojom djeluju na materijal uzrokuju fizička oštećenja tkiva kao i određene kemijske reakcije. Tijekom prolaska kroz materijal ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje ubrzanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009a).

2.2.1. Princip rada ultrazvuka

Prolazak zvučnog vala kroz tekući medij izaziva nastanak longitudinalnog vala, te stvaranje izmjeničnog pritiska i ekspanzijskih vrtloga. Kad je tlak dovoljno nizak da savlada intramolekularne sile formiraju se mali mjehurići koji se tijekom sljedeće ekspanzije/kompresije vrtloga šire i skupljaju. Taj fenomen se naziva **kavitacija**. Djelovanjem ultrazvuka niskog intenziteta nastaje „stabilna kavitacija“ koja uzrokuje nastanak mjehurića čija veličina neznatno oscilira tijekom nastajanja tisuću vrtloga. Međutim, prolaskom ultrazvuka visokog intenziteta kroz tekući medij, veličina mjehurića snažno oscilira. Dodirna površina mjehurića sve je veća tijekom uzastopnih ekspanzija i kompresija, što poboljšava i difuziju plina što dovodi do rasta mjehurića tijekom svakog ciklusa. Nakon što mjehurić postigne kritičnu veličinu, u sljedećem ciklusu kompresije para iznenada

kondenzira, a mjehurić implodira. Oko mjehurića se stvara mikropodručje s ekstremno visokom temperaturom (5 500 °C) i visokim tlakom (104-105 kPa), a to je posljedica snažnog sudaranja molekula koje se nalaze oko mjehurića. Ova pojava se naziva „kratkotrajna ili prijelazna kavitacija“ (Herceg i sur., 2009b).

Prag kavitacije ovisi o frekvenciji ultrazvučnih valova, amplitudi nastalog tlaka te o početnom polumjeru mjehurića, dok učinak ultrazvuka pri procesiranju hrane ovisi o broju mjehurića koji podliježu kavitaciji i o jačini njihove implozije (Herceg i sur., 2009b).

2.2.2. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji

Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji predmet je istraživanja posljednjih nekoliko desetaka godina. Usprkos primarnoj uporabi za čišćenje površina i pribora, ultrazvučni uređaji imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Radi širokog raspona mogućih frekvencija i snage ultrazvuk ima različite efekte što omogućuje široki raspon primjena. Ultrazvuk se može koristiti za rezanje, inaktivaciju mikroorganizama i enzima, homogenizaciju, emulgiranje, filtraciju, kristalizaciju i smrzavanje, sušenje, kuhanje, odzračivanje i ekstrakciju (Pingret i sur., 2013). Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji i industriji mliječnih proizvoda je novi i nadolazeći pristup obradi proizvoda s učinkom u poboljšanju učinkovitosti ultrafiltracije, promjene viskoznosti otopina, kristalizacije laktoze, očuvanja trajnosti voćnih napitaka, itd. (Gajendragadkar i Gogate, 2016). Također, u mljekarskoj industriji provedena su i brojna istraživanja prema kojima ultrazvuk utječe na inaktivaciju mikroorganizama, poboljšava homogenizaciju mlijeka, te poboljšava fermentaciju.

Prema nekim istraživanjima, dokazano je da ultrazvuk može utjecati na funkcionalna i senzorska svojstva proteina sirutke. Tako su Martini i sur. (2010) otkrili da sirutka; koja je sadržavala 25% suhe tvari; tretirana na 20 kHz i 15 W tijekom 15 minuta ima 90% manje zamućenje nakon tretmana u usporedbi s netretiranom sirutkom. Zisu i sur. (2010) su dokazali da je tretman ultrazvukom utjecao na smanjenje veličine čestica sirutke i viskoznosti. Nadalje, Jambrak i sur. (2008) su procijenili utjecaj djelovanja ultrazvuka na topljivost proteina sirutke i njihova svojstva pjenjenja. Otkriveno je da su oba svojstva poboljšana uz korištenje ultrazvuka te da učinak ovisi o frekvenciji. Pri nižoj frekvenciji (20 kHz) učinkovitost je bila veća.

U istraživanjima koje su proveli Zisu i sur. (2011) je pokazano da djelovanje ultrazvukom visokog intenziteta na rekonstituirani prah proteina sirutke može utjecati na

smanjenje sinereze i vremena stvaranja gela, te je daljnjim istraživanjima uočena bolja stabilnost gela u širem pH području.

Gajendragadkar i Gogate (2016) su u svom istraživanju otkrili da tretman ultrazvukom povećava otpornost proteina sirutke na povišenu temperaturu. Zatim, kombinacija ultrazvuka visokog intenziteta i toplinskog predtretmana smanjuje želiranje proteina u sirutki.

Ashokkumar i sur. (2009) su istraživali utjecaj tri različita tretmana na tri otopine proteina sirutke koje su pripravljene tako da je koncentrat proteina sirutke koji je sadržavao 80% proteina rekonstituiran s deioniziranom vodom. Sva tri uzorka su nakon predtretmana bila podvrgnuta djelovanju topline kako bi se ispitao učinak određenog predtretmana. Prvi uzorak je podvrgnut samo predgrijavanju, drugi predgrijavanju i ultrazvuku, a treći je korišten kao kontrola pa nije nikako tretiran. Potom su sva tri uzorka toplinski obrađena u vodenoj kupelji na 80°C u trajanju od 20 minuta. Pokazano je da uzorci koji nisu bili tretirani ultrazvukom imaju veću viskoznost nego uzorak tretiran ultrazvukom. Povećanje viskoznosti rezultat je agregacije proteina sirutke. Tijekom djelovanja ultrazvuka u kratkom vremenskom periodu dolazi do kavitacije, a sile koje nastaju ometaju nastajanje disulfidnih mostova, tj. agregaciju proteina sirutke.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za eksperimentalni dio ovog istraživanja korišteno je sirovo mlijeko s mljekomata. Prosječan kemijski sastav korištenog mlijeka prikazan je u tablici 4. pH vrijednost mlijeka svih uzoraka je iznosila između 6,78-6,86 pH jedinica. Za proizvodnju sirutke korišteno je sirilo jakosti 1:600. Dobivena sirutka podvrgnuta je toplinskom tretmanu i tretmanu ultrazvukom.

Tablica 4. Prosječan kemijski sastav mlijeka (%)

SASTOJAK	UDIO (%)
Voda	83,88-89,50
Suha tvar	10,54-16,12
Mliječna mast	3,5-5,2

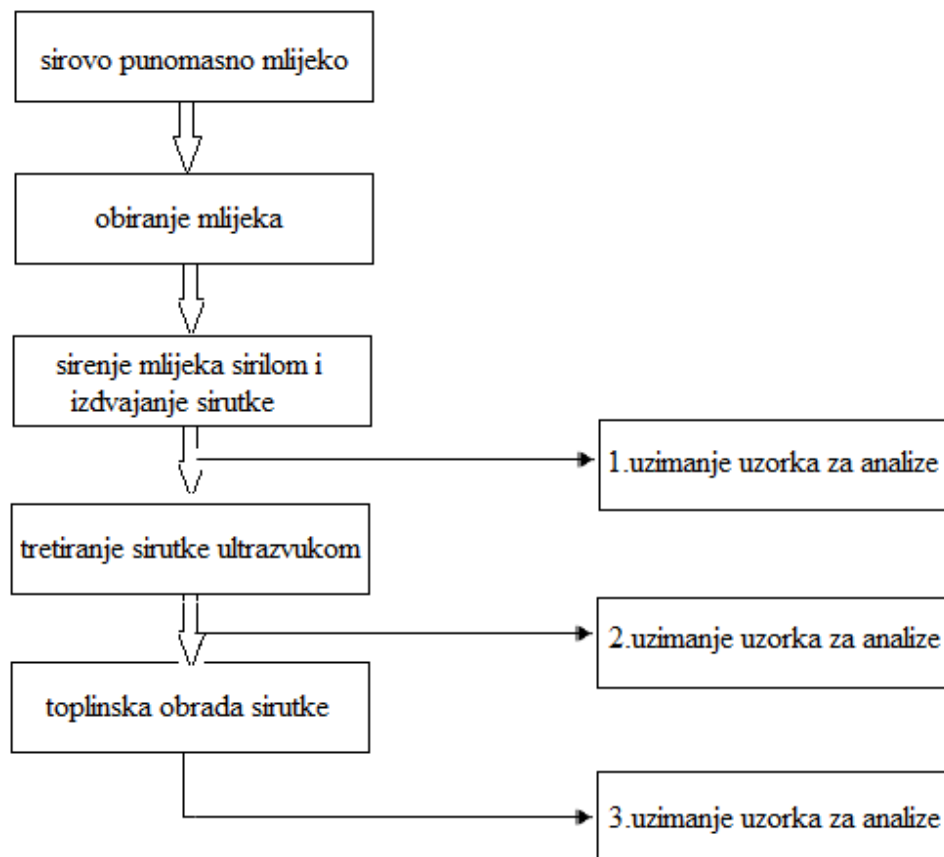
3.2. METODE RADA

Kako bi se standardizirala proizvodnja sirutke za sve analize u ovom istraživanju, dobiveno mlijeko je najprije podvrgnuto analizama, te je potom u potpunosti obrano, a mliječna mast nakon obiranja iznosila 0%.

3.2.1. Proizvodnja sirutke

Za jedan pokus korišteno je 5 litara mlijeka iz kojega je dobiveno 3,76 litara slatke sirutke. Shemom 1 je prikazan redoslijed provedbe pokusa.

Shema 1. Provedba pokusa



Obiranje mliječne masti

Mliječna mast odvaja se iz mlijeka u obliku vrhnja. Sirovo mlijeko s prethodno određenim udjelom mliječne masti se zagrije na temperaturu od 40°C kako bi se mliječna mast otopila. Zagrijano mlijeko se ulije u prihvatnu posudu separatora i nakon postizanja odgovarajućeg broja okretaja otvara se ručica separatora čime počinje proces obiranja. Mlijeko ulazi u bubanj u unutrašnjosti uređaja. Bubanj se sastoji od niza tanjura između kojih se raspoređuje mlijeko. Kako se bubanj okreće tako se na osnovu centrifugalne sile izdvajaju globule mliječne masti koje su manje gustoće i kreću se prema osi rotacije, a obrano mlijeko koje je veće gustoće prema obodu bubnja. Na jednom izlazu se izdvaja vrhnje, a na drugom obrano mlijeko. Potom se mlijeku određuje količina mliječne masti.

Sirenje mlijeka sirilom i izdvajanje sirutke

Sirenje mlijeka provodi se tako da se u obrano i temperirano mlijeko doda određena količina sirila koja se izračuna prema formuli 1:

$$V(\text{sirila}) = \frac{V(\text{mlijeka}) \times 40}{\text{jakost sirila} \times \text{vrijeme trajanja podsiravanja}} \quad [1]$$

Nakon dodavanja sirila, mlijeko se lagano promiješa i stavi u inkubator na temperaturu 30 °C. Inkubira se 35 minuta, odnosno, dok se ne postigne gruša dovoljno čvrst za rezanje. Nastali gruša se reže na kocke kako bi se izdvojila sirutka. Kad se sirutka izdvoji ocijedi se pomoću cjedila od gruša.

Tretiranje sirutke ultrazvukom

Za tretiranje sirutke ultrazvukom korišten je uređaj Misonix S-4000 (Misonix Sonicators, Newton, Connecticut, SAD). U čašu se ulije 300 mL sirutke te se potom u sirutku uroni sonda do dubine 1 cm. Korištene su sonde promjera 12,7 mm, 19 mm i 22 mm, a uzorci su tretirani frekvencijom od 20 kHz, amplitudama 40 i 60%, te u različitom vremenskom intervalu. Režimi obrade su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Režimi tretmana ultrazvukom

REŽIMI
20kHz/8min/40%
20kHz/5min/60%

Toplinska obrada sirutke

Toplinska obrada sirutke se provodi tako da se sirutka ulije u kotao i zagrijava na plameniku uz neprestano miješanje. Provodi se pasterizacija pri temperaturi od 72 °C u trajanju od 20 sekundi, te je dio uzoraka pasteriziran pri 95 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon provedene pasterizacije slijedi hlađenje sirutke.

3.2.2. Analize mlijeka i sirutke

Mlijeku su analizirani sljedeći parametri:

- Kiselost (pH)
- Suha tvar
- Mliječna mast (Butirometrijska metoda po Gerberu)

Svim dobivenim uzorcima sirutke analizirani su sljedeći parametri:

- Kiselost (pH, °SH)
- Laktoza
- Suha tvar
- Mliječna mast (Butirometrijska metoda po Gerberu)
- Ukupni proteini i proteinske frakcije (SDS-PAGE)
- Boja (Kolorimetar)
- Distribucija veličine čestica (Malvern Mastersizer)
- Senzorska analiza
- Količina taloga

3.2.2.1. *Određivanje kiselosti pH metrom*

Prije upotrebe pH metra potrebno je kalibrirati elektrodu prema uputama proizvođača, isprati je destiliranom vodom te obrisati staničevinom. Tako pripremljena elektroda se uranja u sirutku, a pH vrijednost se prikazuje na zaslonu pH metra. Nakon mjerenja elektroda se ponovno ispire destiliranom vodom, obriše staničevinom, a potom se uranja u otopinu KCl-a gdje se čuva do sljedećeg korištenja.

3.2.2.2. *Određivanje titracijske kiselosti po Soxhlet-Henkelu*

Najprije je potrebno pripremiti standardnu boja koja se pripravlja tako da se u jednu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira 20 mL sirutke, a zatim se doda 0,4 mL 5%-tne otopine kobaltova sulfata ($\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$). Boja koja je nastala predstavlja standardnu boju.

U drugu Erlenmeyerovu tikvicu se otpipetira 20 mL sirutke i doda se 1 mL fenolftaleina te se potom titrira sa 0,1 M NaOH do promjene boje u blijedo ružičastu, odnosno do postizanja boje jednake prethodno pripremljenoj standardnoj boji. Vrijednost kiselosti izražene u °SH stupnjevima se izračuna prema formuli 2:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times f \times 2 \quad [2]$$

a - mL 0,1M NaOH utrošene za neutralizaciju 20 mL sirutke

f - faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M = 1

3.2.2.3. Određivanje udjela laktoze

U tikvicu s brušenim grlom otpipetiran je 1 mL sirutke. Nakon toga dodano je 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključi na povratno hladilo i nakon što je prva kap kapnula u tikvicu, ostavi se da kuha 10 minuta. Nakon 10 minuta tikvica se skida s povratnog hladila i hladi se pod mlazom tekuće vode.. Nakon hlađenja dodano je 15 mL 20%-tne otopine kalij jodida, a potom oprezno, uz miješanje, 25 mL 25% -tne otopine sumporne kiseline. Izlučeni jod titriran je sa 0,1 mol/L Na-tiosulfata tako dugo dok boja uzorka nije prešla u žutu. Nakon toga je dodan 1 mL svježe pripremljene otopine škroba, te je ponovno započeta titracija Na-tiosulfatom sve do prijelaza boje iz tamnoplave u putenastu, koja je zadržana nekoliko minuta. U računu se uzima u obzir zbroj utrošenih mililitara tiosulfata u obje titracije. Usporedno je rađena slijepa proba, gdje je umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetirano 25 mL destilirane vode, a ostali postupak je isti kao s uzorkom sirutke (Božanić i sur., 2010).

Izračun:

Slijepa proba troši: X mL 0,1 mol/L Na₂SO₃

Uzorak troši: Y mL 0,1 mol/L Na₂SO₃

$$(X-Y) \cdot f (\text{Na}_2\text{SO}_3) = Z \text{ mL } 0,1 \text{ mol/L Na}_2\text{SO}_3 \quad [3]$$

Iz Tablice 6 se za Z mL Na₂SO₃ očitaju mg laktoze u 1 mL uzorka

Tablica 6. Izračunavanje šećera po Schoorl-Luffu

0,1N-tiosulfat (mL)	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Laktoza		Maltoza	
	mL	razlika	mg	razlika	mg	razlika
1	2,4		3,6		3,9	
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,2	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	4,0
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	43,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1
16	41,5	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	75,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

3.2.2.4. Određivanje udjela suhe tvari

Za određivanje udjela suhe tvari korištena je referentna direktna metoda navedena u Pravilniku, NN 133/07 koja se temelji na isparavanju vode iz uzorka u sušioniku na konstantnoj temperaturi od 102 ± 2 °C do konstantne mase.

Postupak:

U pripremljene metalne posudice se usipa kvarcni pijesak u 1/3 volumena posudice. Nakon toga se posudica zagrije u sušioniku uz poklopac naslonjen na nju te suši barem 30 minuta. Zatim se zatvorena posudica premješta se u eksikator gdje se hladi do sobne temperature. Naposljetku se posudica izvažuje na analitičkoj vagi (220-4NM, Kern & Sohn, Ballingen,

Njemačka), a rezultat se zapiše. U tu posudicu se odvažuje uzorak 10 mL mlijeka, odnosno 10 mL sirutke i stavlja se u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) zajedno s poklopcem naslonjenim na posudicu na dva sata. Nakon dva sata posudica s poklopcem se izvadi iz sušionika te se ostavi u eksikatoru da se ohladi do sobne temperature. Nakon hlađenja, posudica s poklopcem se izvažuje. Postupak se ponavlja do konstantne mase, odnosno dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg. Udio suhe tvari izračunava se po formuli 4:

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 \quad [4]$$

3.2.2.5. *Određivanje udjela mliječne masti butirometrijskom metodom po Gerberu*

Ova metoda određivanja mliječne masti u mlijeku se zasniva na kemijskom otapanju proteina mlijeka i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. U butirometar se otpipetira 10 mL sumporne kiseline, zatim 11 mL mlijeka, a na kraju 1 mL amilnog alkohola koji snizuje površinsku napetost mlijeka i na taj način omogućuje lakše odvajanje masti. Zatvoreni i izmučkani butirometar se centrifugira 5 minuta u centrifugi (Nova Safety, Funke-Gerber, Berlin, Njemačka) prethodno zagrijanoj na 65 °C čime se izdvaja mast. Nakon centrifugiranja rezultat se očitava na skali butirometra (Sabadoš, 1998).

3.2.2.6. *Određivanje boje sirutke*

Određivanje boje sirutke provedeno je na uređaju Hunter-Lab Mini ScanXE (A60-1010-615 Model Colorimeter, Hunter-Lab, Reston, VA, USA). Prilikom provedbe pokusa određivana su tri parametra boje: L , a i b . Hunter-ove L , a i b vrijednosti podudaraju se sa sljedećim rasponima boja: a^* : zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$), b^* : plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$), L^* : svijetlo ($L^* = 100$) ili tamno ($L^* = 0$). Određivana su tri parametra boje: L , a i b . Prije svakog mjerenja instrument je standardiziran s bijelom i crnom keramičkom pločom ($L^*0 = 93.01$, $a^*0 = -1.11$ i $b^*0 = 1.30$).

3.2.2.7. *Određivanje distribucije veličine čestica*

Distribucija veličine čestica mjerena je na uređaju Malvern Instruments Limited (Malvern, Worcestershire, UK, Hydro MU sample dispersion unit) te su rezultati obrađeni u Mastersizer

2000 software-u. Princip rada uređaja za određivanje raspodjele veličine čestica se bazira na odstupanju laserske zrake tijekom prolaska kroz vodenu suspenziju čestica ispitivanog materijala. Određivanje raspodjele veličine čestica provedeno je na osnovu volumena čestica.

3.2.2.8. Određivanje ukupnih proteina i proteinskih frakcija (SDS-PAGE)

SDS-elektroforeza se proteina se provodi na tankoj ploči poliakrilamida. Tok struje je od vrha prema dnu gela. 15 μ L svakog od pripremljenih uzoraka prokuhano je s 5 μ L reducirajućeg reagensa i naneseo na gel. Na gel je nanesen i standard. Po završetku elektroforeze proteini još uvijek nisu vidljivi pa je korištena tehnika bojanja. Gel je uronjen u kiselu, alkoholnu otopinu Comassie brilliant blue boje pri čemu dolazi do fiksiranja proteina u gelu zbog njihove denaturacije i vezanja boje na proteinsku molekulu. Višak boje se ispere otopinom za odbojavanje.

3.2.2.9. Određivanje profila mineralnih tvari i teških metala plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (F-AAS)

Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija je jedna od najčešćih metoda koja se koristi za analizu makro i mikroelemenata mlijeka i mliječnih proizvoda. Razlog tome je jednostavnost postupka, velika brzina određivanja, velika specifičnost, niska granica detekcije za veliki broj elemenata (osobito za elemente u tragovima), mogućnost određivanja većeg broja elemenata u istom uzorku i istim instrumentom.

Prilikom atomske apsorpcije, atom u osnovnom stanju apsorbira svjetlosnu energiju specifične valne duljine te prelazi u pobuđeno stanje tako da je količina apsorbirane svjetlosti proporcionalna broju atoma u uzorku. Mjereći količinu apsorbirane svjetlosti moguće je kvantitativno odrediti količinu analita. Korištenje specifičnih izvora svjetlosti i precizan odabir valnih duljina omogućuju specifično određivanje pojedinih elemenata u prisustvu drugih. U atomskoj apsorpciji, dovođenjem toplinske energije, kemijski spojevi u uzorku prevode se u slobodne atome pri čemu većina atoma ostaje u osnovnom stanju te su sposobni apsorbirati svjetlost iz izvora svjetlosti (Beaty i Kerber, 1993).

Kako bi došlo do atomske apsorpcije, potrebno je iz tekućeg uzorka dobiti atome koji imaju sposobnost apsorbiranja svjetlosti. Lampa sa šupljom katodom emitira svjetlost koja prolazi kroz plamenik. Uzorak se prvo raspršivanjem aspirira u plamenu komoru gdje se kao aerosol miješa s gorivom i oksidirajućim plinovima. Zatim slijedi proces isparavanja odnosno

desolvacije kojim se uklanja otapalo. Daljnjom primjenom topline dolazi do rastapanja, a potom i do isparavanja uzorka. Daljnjim zagrijavanjem dolazi do disocijacije molekule u individualne atome koji su sposobni apsorbirati svjetlost. Temperatura plamena je važan parametar u plamenoj tehnici te su najčešće korišteni plameni u F-AAS smjesa zrak/acetilen i N₂O/acetilen. Iza plamenika nalazi se monokromator koji izdvaja rezonantnu liniju te je registrira na detektoru (Đorđević i Maćej, 1982; Beaty i Kerber, 1993).

Prilikom analize makro i mikroelemenata u mlijeku i mliječnim proizvodima važna je dobra priprema uzorka kako bi se dobili pouzdani rezultati. To podrazumijeva uklanjanje organske tvari i potencijalnih interferenata. Dva osnovna postupka korištena za pripremu uzorka su suho i mokro spaljivanje, a standardna metoda kod određivanja mineralnog sastava mlijeka i mliječnih proizvoda je suho spaljivanje, tj. priprema pepela (Đorđević i Maćej, 1982).

3.2.2.10. Senzorska analiza sirutke

Senzorsku analizu u ovom istraživanju provodila je skupina od 5 panelista koja je procjenjivala native uzorke, uzorke tretirane ultrazvukom, te uzorke tretirane ultrazvukom i toplinski obrađene. Ocjenjivani su okus, miris, boja, bistroća i izgled prema obrascu prikazanom u tablici 7.

Tablica 7. Primjer obrasca za ocjenjivanje sirutke

DATUM:				
OCJENJIVAČ:				
OCJENJIVANO SVOJSTVO	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>			
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4
OKUS				
MIRIS				
BOJA				
BISTROĆA				
IZGLED				
UKUPNO				

Postupak:

Za svako svojstvo panelisti daju ocjenu od 1 do 5 s obzirom na kvalitetu tog svojstva. Ukoliko su uočene neke mane, ocjena se umanjuje s obzirom na stupanj izraženosti tih mana. U tablici 8 su prikazani opisni parametri pojedinih svojstava.

Tablica 8. Obrazac za senzorsku procjenu sirutke

SENZORSKO SVOJSTVO	OPISNI PARAMETRI	OCJENA
Okus	Jasno izražen, karakterističan za slatku sirutku, bez stranih okusa, dobro ili vrlo dobro izražena aroma i okus, dobro ili vrlo dobro izražena svježina, slatkoća	4-5
	Tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, tragovi stranih okusa	3
	Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, okus po plijesni	1-2
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan za slatku sirutku, bez ikakvih stranih mirisa	4-5
	Prenaglašen miris ili nedovoljno izražen, tragovi užglosti	3
	Potpuno nekarakterističan za slatku sirutku, stran, užegao, po plijesni	1-2
Boja	Boja karakteristična za slatku sirutku, jednolična, bez vidljivih nepravilnosti	4-5
	Dobra, ali prisutna prošaranost	3
	Neprihvatljiva ili netipična	1-2
Bistroća	Bez taloga	5
	Prisustvo taloga u manjim količinama	3-4
	Puno taloga, neprihvatljivo	1-2
Izgled	Odličan, tipičan za slatku sirutku, bez nepoželjnih karakteristika	4-5
	Manje izražene nepoželjne karakteristike	3
	Neprihvatljiv, strane boje, prisutna strana tijela	1-2

3.2.2.11. Određivanje količine taloga

Talog u svim uzorcima sirutke je određivan tako da se Falcon kivete od 50 mL najprije izvažu prazne, a potom se u njih otpipetira 25 mL netretiranog uzorka. Potom se kiveta s uzorkom centrifugira na 3500 okretaja u trajanju od 10 minuta nakon čega se talog istaloži na dnu. Supernatant se pažljivo ukloni pipetom, a kiveta s talogom se ponovno izvaže. Isti se postupak napravi i s tretiranim uzorcima, a na osnovu različitih masa taloga se izračuna postotak smanjenja taloga.

4.REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati utjecaja ultrazvuka na sprječavanje taloženja proteina u slatkoj sirutki, te utjecaj ultrazvuka na pojedina svojstva sirutke. Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su u MS Excel programu.

Rezultati su podijeljeni u 3 serije pokusa s obzirom na promjer korištene sonde pri tretmanu ultrazvukom (12,7 mm, 19 mm i 22 mm).

U tablici 9 navedene su kratice za nazive uzoraka.

Tablicama 10, 16 i 21 prikazani su režimi toplinske obrade i ultrazvučnog tretmana za svaku pojedinu sondu (12,7 mm, 19 mm i 22 mm).

Tablicama 11, 17 i 22 prikazane su pH i °SH vrijednosti za sve uzorke.

Tablicama 12, 13, 18, 19, 23 i 24 prikazan je postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka u odnosu na netretiranu sirutku.

Tablice 14, 20 i 25 prikazuju parametre boje svakog uzorka.

Tablicom 15 prikazan je sastav mineralnih tvari i teških metala.

Slikama 3, 8 i 13 prikazana je ukupna senzorska ocjena svih uzoraka.

Slikama 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19 prikazana je distribucija veličine čestica.

Slikama 14 i 15 prikazan je SDS-PAGE gel netretiranih i tretiranih uzoraka.

Prema Hramcov (1979) slatka sirutka sadrži 4,5-7,2 % suhe tvari, a 70% suhe tvari čini laktoza. Prosječna pH vrijednost iznosi 5,8-6,6, a prosječna °SH vrijednost iznosi između 4,5 i 8 °SH.

Proizvedena sirutka (n=3) korištena za ovo istraživanje je sadržavala između 6,89-6,99% suhe tvari, a udio laktoze u suhoj tvari je bio 4,67 %. Prosječna vrijednost pH iznosila je 6,78, a prosječna vrijednost °SH iznosila je 5,33 °SH.

U tablici 9. navedene su kratice za uzorke sirutke korištene tijekom ovog istraživanja.

Tablica 9. Oznake uzoraka

OZNAKA UZORKA	OPIS UZORKA
U	Sirutka tretirana ultrazvukom
UT	Sirutka tretirana ultrazvukom i toplinski obrađena
1, 2, 3,...	Brojevi uzoraka

4.1.TRETMAN SIRUTKE ULTRAZVUČNOM SONDOM PROMJERA 12,7 mm

U ovoj seriji pokusa uzorci sirutke su tretirani sondom promjera 12,7 mm, a provedeni režimi tretmana i toplinske obrade su prikazani tablicom 10.

Tablica 10. Režimi toplinske obrade i ultrazvučnog tretmana sondom promjera 12,7 mm

POKUS	UZORAK	REŽIMI (ultrazvuk - pasterizacija)
	NATIVNA SIRUTKA	-
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	72°C/20s
<i>Pokus 1</i>	1U	20kHz/8min/40%
	1UT	20kHz/8min/40% - 72°C/20s
<i>Pokus 2</i>	2U	20kHz/5min/60%
	2UT	20kHz/5min/60% - 72°C/20s

Prema rezultatima prikazanim u tablici 11 nije došlo do značajne promjene pH vrijednosti kod sirutke tretirane ultrazvukom, ali je došlo do blagih promjena vrijednosti °SH kod gotovo svih uzoraka.

Dobiveni rezultati se podudaraju s istraživanjima Režek-Jambrak i sur. (2008) koji su tretirali modalne otopine proteina sirutke ultrazvučnom sondom od 20 kHz, te ultrazvučnom kupelji (500 kHz i 40 kHz) pri čemu također nije došlo do značajne promjene pH vrijednosti bez obzira na to koji je tretman korišten.

Tablica 11. Aktivna (pH) i titracijska (°SH) kiselost uzoraka tretiranih sondom promjera 12,7 mm

POKUS	UZORAK	pH	SH°
	NATIVNA SIRUTKA	6,83	6,0
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	6,83	5,4
<i>Pokus 1</i>	1U	6,86	5,4
	1UT	6,82	5,6
<i>Pokus 2</i>	2U	6,86	5,8
	2UT	6,82	5,0

Zbog tretiranja sirutke toplinom dolazi do djelomične denaturacije proteina sirutke. Agregacijom denaturiranih proteina nastaju velike čestice koje se onda talože u sirutki. Nastali talog u sirutki je sa senzorske strane neprihvatljiv jer ga potrošači gotovo uvijek smatraju manom proizvoda. Istraživanja pokazuju kako se korištenjem ultrazvuka povećava topljivost proteina sirutke, a samim time se može utjecati na smanjenje količine taloga (Gajendragadkar i Gogate, 2016). Ultrazvuk visokog intenziteta povećava topljivost proteina na način da mijenja proteinsku strukturu i konformaciju tako da se hidrofilni ostaci aminokiselina okrenu iz unutrašnjosti prema vodi (Morel i sur., 2000).

Tablice 12 i 13 prikazuju rezultate postotaka smanjenja taloga u uzorcima tretiranim ultrazvukom. Najveći postotak smanjenja taloga i to za 22% u odnosu na samo toplinski obrađenu sirutku je imao uzorak 1UT koji je bio tretiran ultrazvukom (20kHz/8min/40%) i nakon toga toplinom (72°C/20s). Međutim, nijedno postignuto smanjenje taloga nije značajno u toj mjeri da bi se taj tretman sondom promjera 12,7 milimetara mogao koristiti u mljekarskoj industriji.

Tablica 12. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka ultrazvukom u odnosu na netretiranu sirutku

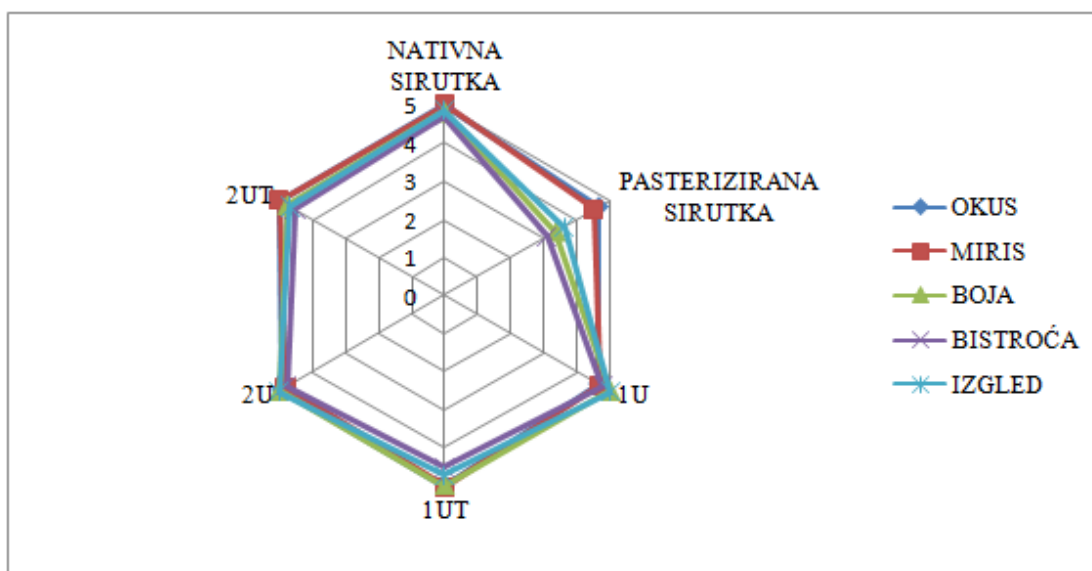
POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 1</i>	1U	16,66%
<i>Pokus 2</i>	2U	14,28%

Tablica 13. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka ultrazvukom i toplinski obrađenih u odnosu na toplinski obrađenu sirutku

POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 1</i>	1UT	22%
<i>Pokus 2</i>	2UT	11%

Slikom 3 prikazani su rezultati senzorske analize tretirane sirutke. Sve tretirane sirutke imale su bolja svojstva u odnosu na pasteriziranu sirutku. Kod pasterizirane sirutke javljao se okus i miris po kuhanom i talog, što nije bio slučaj s tretiranim sirutkama. Talog se ne javlja kod termosonificiranih uzoraka zbog povećanja topljivosti proteina (Režek Jambrak, 2008). Također, sve tretirane sirutke su dobile bolje ocjene za boju u odnosu na pasteriziranu sirutku jer se tretmanom ultrazvukom zadržala boja sličnija nativnoj sirutki.

Prema istraživanju Jeličić i sur. (2012) ultrazvuk i termosonifikacija poboljšavaju senzorska svojstva sirutke tako da održavaju prirodnu boju sirutke, utječu na punoću okusa, a homogenizacija i povećana topljivost proteina utječu na poboljšanje svih senzorskih svojstava. Prema tome, rezultati dobiveni u ovom istraživanju se podudaraju s rezultatima Jeličić i sur. (2012).



Slika 3. Ukupna senzorska ocjena native sirutke, pasterizirane sirutke, tretiranih sirutki (1U, 2U) i tretiranih i toplinski obrađenih sirutki (1UT, 2UT)

Tablicom 14 su prikazane L^* , a^* i b^* vrijednosti boje. Što je L^* vrijednost viša, to je analizirani uzorak svjetliji. Parametar a^* označava zelenu, odnosno crvenu boju. Ukoliko je vrijednost parametra a^* negativna označava zelenu boju, a ako je pozitivna crvenu boju. Parametar b^* označava plavu, odnosno žutu boju. Ukoliko je vrijednost parametra b^* negativna, analizirani uzorak se nalazi u plavom području, a ukoliko je vrijednost pozitivna u žutom području.

Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom (1U i 2U) je primijećeno povećanje L^* vrijednosti što znači da su ti uzorci bili svjetliji u odnosu na nativnu sirutku (tablica 13). Također, uzorci 1U i 2U imaju niže a^* vrijednosti čime se približavaju zelenom području. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom i toplinom (1UT i 2UT) zamijećen je pad L^* vrijednosti što znači da je nakon tretmana ultrazvukom i toplinom došlo do „laganog“ tamnjenja uzoraka.

Bermudez i sur. (2008) su u svome istraživanju određivali boju u tri uzorka mlijeka. Uzorci su bili sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko tretirano ultrazvukom. Nakon određivanja boje, nije uočena velika razlika između sirovog i toplinski obrađenog mlijeka. Međutim, mlijeko tretirano ultrazvukom je bilo svjetlije. Taj rezultat su povezali s boljom homogenizacijom mlijeka koje je podvrgnuto tretmanu ultrazvukom.

Tablica 14. Prosječne vrijednosti boje (L^* , a^* , b^*) za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 1U, 1UT, 2U i 2UT

NAZIV UZORKA	L^*	a^*	b^*
NATIVNA SIRUTKA	77,87	0,52	19,65
PASTERIZIRANA SIRUTKA	69,16	0,83	19,70
1U	78,1	0,54	19,43
1UT	67,16	1,01	20,59
2U	77,91	0,55	19,53
2UT	67,83	1,32	21,14

L^* : svjetlo ($L^* = 100$) ili tamno ($L^* = 0$)

a^* : zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$)

b^* :plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$)

Tehnološki problemi kod obrade sirutke javljaju se kod toplinske obrade, jer se smanjuje topljivost mineralnih tvari. Rezultat toga je da se smanjuje biološka vrijednost proizvoda i ekonomičnost. S druge strane kod povećane količine mineralnih tvari posebice Ca-fosfata javlja se problem konzistencije proizvoda (pjeskovitost, grudičavost) te nepoželjan okus. Da bi to spriječili poželjno je provesti demineralizaciju sirutke, ionskom izmjenom ili elektrodijalizom (Tratnik, 1998.).

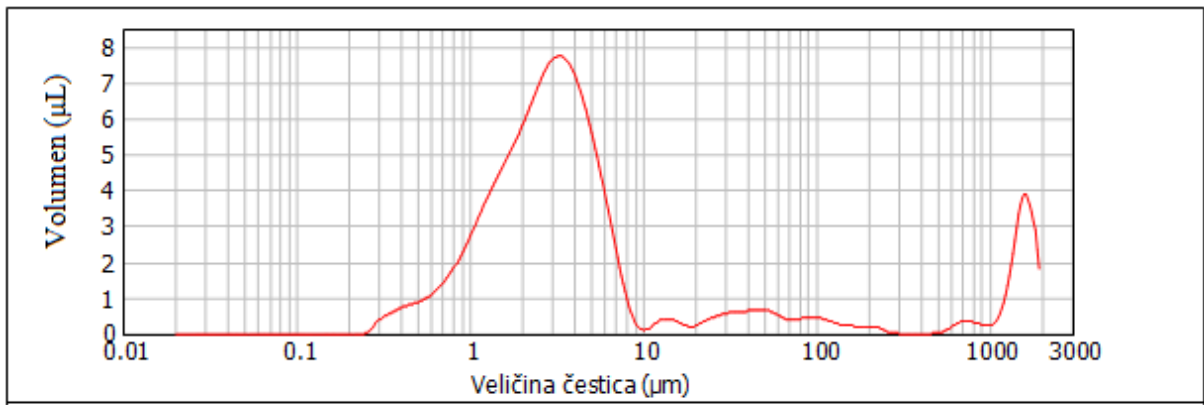
Tablicom 15 prikazan je sastav mineralnih tvari i teških metala u uzorcima 1U, 1UT, 2U i 2UT. Vidljivo je da je kod uzorka 1UT nakon toplinske obrade zabilježen porast koncentracije Na, Mg, K, Ca, Fe, Cu, Zn i Se dok je količina Al i Mo smanjena. Što se tiče uzorka 2UT nakon toplinske obrade došlo je smanjenja koncentracije Na, Mg, K, Ca, Fe, Mo, a povišena je koncentracija Al, Cu, Zn i Se.

Tablica 15. Koncentracije mineralnih tvari i teških metala u uzorcima sirutke

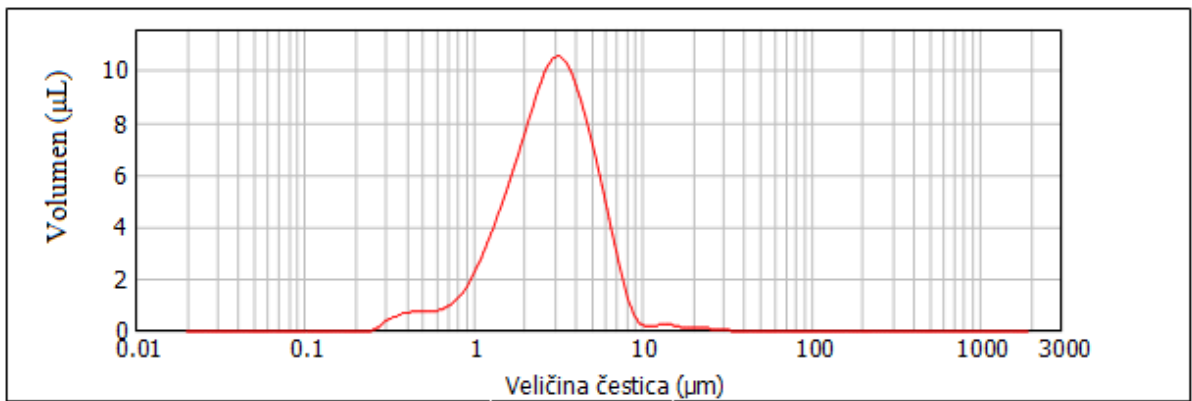
UZORAK	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	K (mg/kg)	Al (µg/kg)	Zn (µg/kg)	Fe (µg/kg)	Mo (µg/kg)	Cu (µg/kg)	Se (µg/kg)
1U	505,13	341,89	79,65	16,52	625,60	112,84	76,68	72,22	23,12	10,09
1UT	588,28	387,34	93,34	18,95	27,53	178,72	98,30	63,72	165,34	11,14
2U	569,24	376,72	89,70	18,30	69,06	134,88	147,96	66,08	24,92	11,10
2UT	567,07	375,03	88,93	18,24	121,78	189,39	69,19	57,01	127,52	11,58

Ultrazvučne vibracije mogu uzrokovati djelomičnu denaturaciju proteina koja značajno utječe na fizičke i strukturne značajke proteina. Također, ultrazvuk može razarati aglomerate koji se mogu stvoriti u sirutki (Režek Jambrak, 2008). Zisu i sur. (2010) su tretirali ultrazvukom rekonstituiranu sirutku s 12% proteina i uočili su smanjenje veličine čestica kod tretiranih uzoraka. Barukčić i sur. (2015) su tretirali slatku sirutku ultrazvukom snage 480 W pa je kod određivanja veličine čestica zamijećeno povećanje udjela većih čestica kod tretiranih uzoraka u usporedbi s nativnom i pasteuriziranom sirutkom. Pretpostavili su da je razlog tome agregacija denaturiranih proteina.

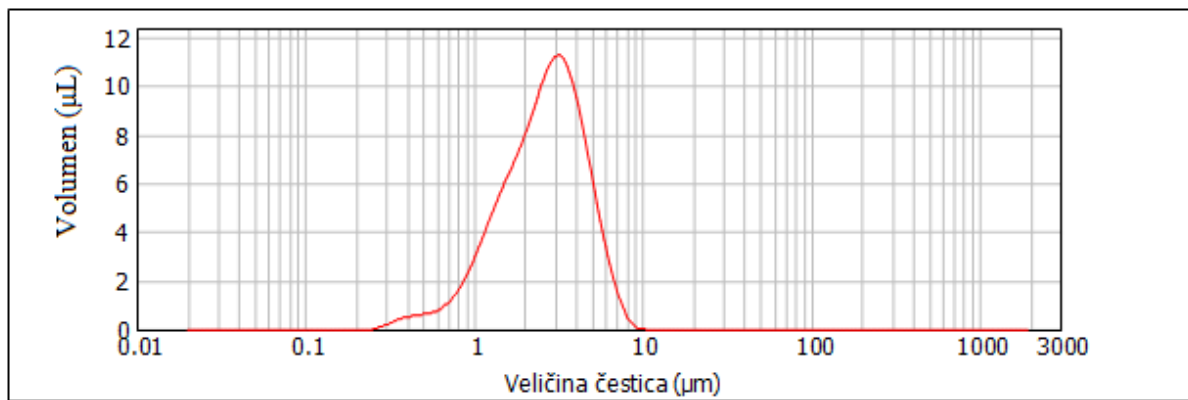
Na slikama 4-7 prikazani su grafovi raspodjele veličine čestica za nativnu i pasteuriziranu sirutku, te uzorke 1U i 1UT. Iz grafova pasteurizirane sirutke, te uzoraka 1U i 1UT je vidljivo da toplinskom obradom i tretmanom ultrazvukom dolazi do denaturacije proteina sirutke budući da nestaje pik oko 1000 µm koji je vidljiv na grafu raspodjele čestica nativne sirutke. Pik od 1000 µm odgovara veličini α-laktalbumina, koji nije denaturiran u nativnoj sirutki, a u tretiranim uzorcima se iz grafova može vidjeti da je α-laktalbumin denaturiran. Također, nativna sirutka ima širi raspon veličine čestica jer sadrži više većih čestica nego ostali uzorci.



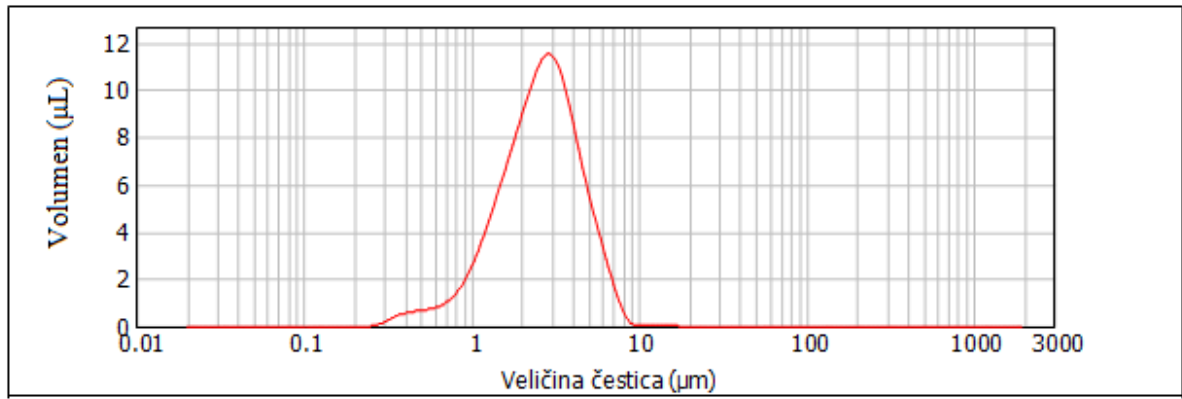
Slika 4. Raspodjela veličine čestica za nativnu sirutku



Slika 5. Raspodjela veličine čestica za pasteriziranu sirutku



Slika 6. Raspodjela veličine čestica za uzorak 1U



Slika 7. Raspodjela veličine čestica za uzorak 1UT

4.2. TRETMAN SIRUTKE ULTRAZVUČNOM SONDOM PROMJERA 19 mm

U ovoj seriji pokusa uzorci sirutke su tretirani sondom promjera 19 mm, a provedeni režimi tretmana i toplinske obrade su prikazani tablicom 16.

Tablica 16. Režimi toplinske obrade i ultrazvučnog tretmana sondom promjera 19 mm

POKUS	UZORAK	REŽIMI (ultrazvuk/pasterizacija)
	NATIVNA SIRUTKA	-
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	72°C/20s
<i>Pokus 3</i>	3U	20kHz/8min/40%
	3UT	20kHz/8min/40% - 72°C/20s
<i>Pokus 4</i>	4U	20kHz/5min/60%
	4UT	20kHz/5min/60% - 72°C/20s

U ovoj seriji pokusa, tretmanom sondom promjera 19 mm, zabilježen je „lagani“ porast pH vrijednosti (tablica 17). Porast pH vrijednosti može biti posljedica povišenja temperature tijekom obrade pri čemu se izdvaja CO₂.

Barukčić i sur. (2015) su istraživali utjecaj ultrazvuka na fizikalno-kemijska svojstva slatke sirutke. U svom istraživanju koristili su ultrazvuk snage 280 W i 600 W kroz vrijeme od 6,5 min, 8 min i 10 min pri konstantnim temperatura od 45 °C i 55 °C. Prema njihovim saznanjima, nije došlo do velike promjene pH vrijednosti, ali je ipak pokazano da duljim tretmanom dolazi do laganog povišenja pH vrijednosti. Također, pH vrijednost tretiranih uzoraka na 45° C je bila niža u usporedbi s uzorcima tretiranim na 55° C.

Tablicom 17 su prikazane i °SH vrijednosti tretiranih uzoraka, ali nisu zabilježene značajne razlike između netretiranih i tretiranih uzoraka.

Barukčić i sur. (2015) su u svome istraživanju određivali i °SH vrijednosti, ali ni prema njihovim rezultatima nisu zabilježene značajne razlike između °SH vrijednosti uzoraka što znači da se rezultati dobiveni ovim istraživanjem podudaraju s rezultatima Barukčić i sur. (2015).

Tablica 17. Aktivna (pH) i titracijska (°SH) kiselost uzoraka tretiranih sondom promjera 19 mm

POKUS	UZORAK	pH	SH°
	NATIVNA SIRUTKA	6,70	5,0
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	6,75	5,4
<i>Pokus 3</i>	3U	6,83	5,0
	3UT	6,80	5,4
<i>Pokus 4</i>	4U	6,84	5,2
	4UT	6,81	5,4

Tablice 18 i 19 prikazuju rezultate postotka smanjenja taloga u uzorcima tretiranim ultrazvukom. Najveći postotak smanjenja taloga za 59,09% u odnosu na samo toplinski obrađenu sirutku imao je uzorak 3UT koje je bio tretiran ultrazvukom (20kHz/8min/40%), a potom toplinski obrađen (72°C/20s). Tretmanom ultrazvukom sondom promjera 19 mm postignut je veći postotak smanjenja taloga kod uzoraka koji su naknadno i toplinski obrađeni (tablica 19) nego što je to bio slučaj tretmanom ultrazvukom sondom promjera 12,7 mm (tablica 13) pri istim korištenim režimima.

S obzirom na to da su ultrazvučnim tretmanom (20kHz/8min/40%) sondom promjera 19 mm i naknadnom toplinskom obradom (72°C/20s), osim smanjenja taloga za 59,09% u odnosu na toplinski obrađenu sirutku, postignuta i zadovoljavajuća senzorska svojstva (slika 8), može se zaključiti kako bi ovi dobiveni rezultati mogli biti temelj za daljnja istraživanja u ovom području i moguću primjenu u mljekarskoj industriji.

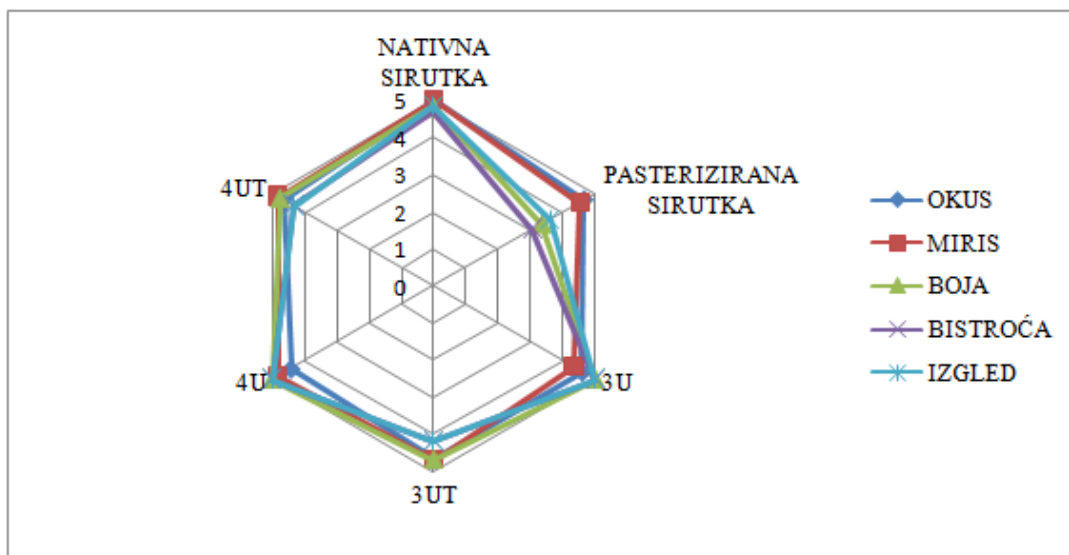
Tablica 18. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka ultrazvukom u odnosu na netretiranu sirutku.

POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 3</i>	3U	0%
<i>Pokus 4</i>	4U	20%

Tablica 19. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka ultrazvukom i toplinski obrađenih u odnosu na toplinski obrađenu sirutku.

POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 3</i>	3UT	59,09%
<i>Pokus 4</i>	4UT	31,81%

Slikom 8 su prikazani rezultati senzorske analize sirutke tretirane ultrazvukom sondom promjera 19 mm. Kao i tretmanom ultrazvukom sondom promjera 12,7 mm (slika 3) sve tretirane sirutke imale su bolju boju, bistroću i izgled u odnosu na pasteriziranu sirutku što je posljedica smanjenja taloga. Uzorci tretirani samo ultrazvukom su dobili bolje ocjene od native sirutke za boju, bistroću i izgled što je opet posljedica djelovanja ultrazvuka na homogenizaciju i topljivost proteina.



Slika 8. Ukupna senzorska ocjena native sirutke, pasterizirane sirutke, tretiranih sirutki (3U, 4U) i tretiranih i toplinski obrađenih sirutki (3UT, 4UT)

Tablicom 20 su prikazane L^* , a^* i b^* vrijednosti boje. U ovom slučaju, tretmanom ultrazvukom sondom promjera 19 mm, ultrazvuk nije djelovao tako da zbog bolje homogenizacije dođe do porasta vrijednosti L^* i posvjetljivanja sirutke kao što je bio slučaj ultrazvučnim tretmanom sondom promjera 12,7 mm (tablica 14) nego je kod svih uzoraka zamijećen „lagani“ pad L^* vrijednosti u odnosu na nativnu sirutku iz čega se može zaključiti da je nativna sirutka bila najsvjetlija. Uzrok pada vrijednosti L^* je vjerojatno zamućenje uzoraka koje nastaje uslijed denaturacije proteina djelovanjem ultrazvuka ili toplinskom obradom. Također, svi uzorci tretirani samo ultrazvukom imali su nižu a^* i b^* vrijednost nego uzorci koji su uz ultrazvuk i toplinski obrađeni.

Tablica 20. Prosječne L , a i b vrijednosti boje za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 3U, 3UT, 4U i 4UT

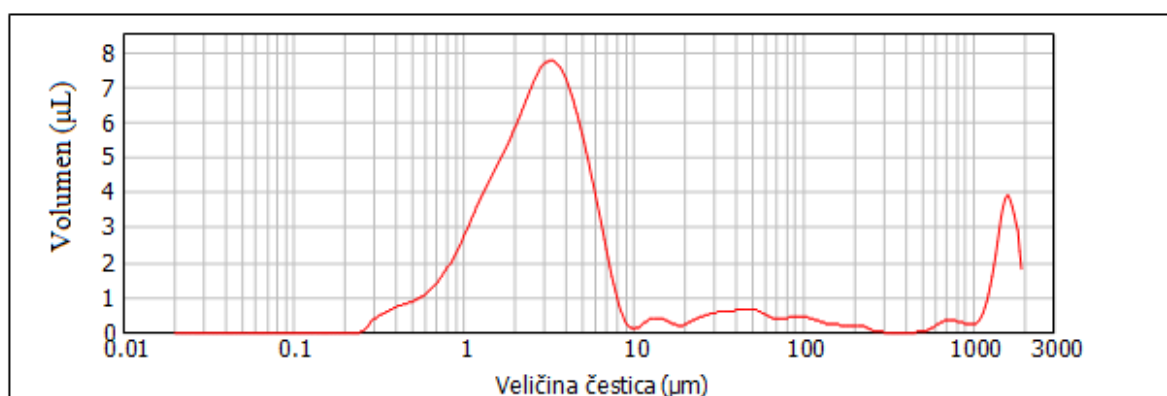
NAZIV UZORKA	L	a	b
NATIVNA SIRUTKA	80,37	0,51	20,11
PASTERIZIRANA SIRUTKA	79,01	0,92	21,68
3U	80,30	0,53	19,92
3UT	74,38	1,07	21,52
4U	80,25	0,58	20,13
4UT	69,82	1,50	22,09

L^* : svjetlo ($L^* = 100$) ili tamno ($L^* = 0$)

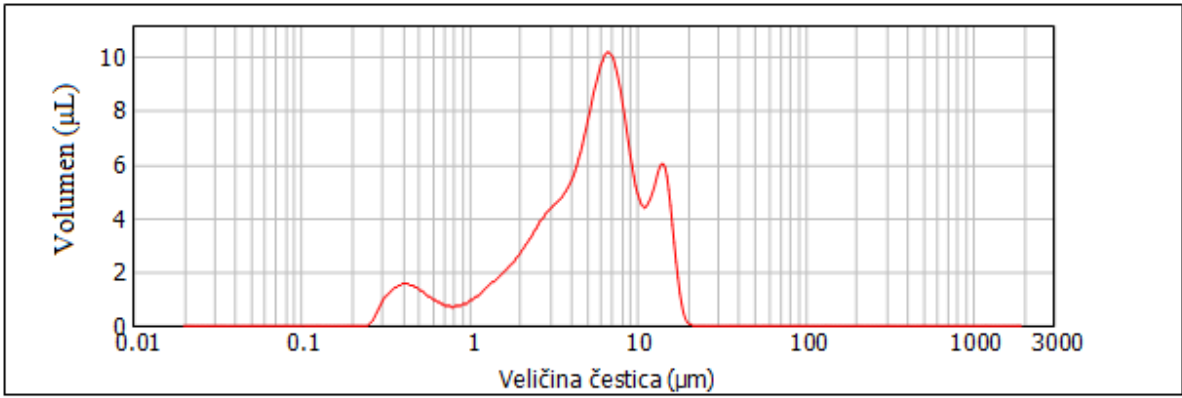
a^* : zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$)

b^* : plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$)

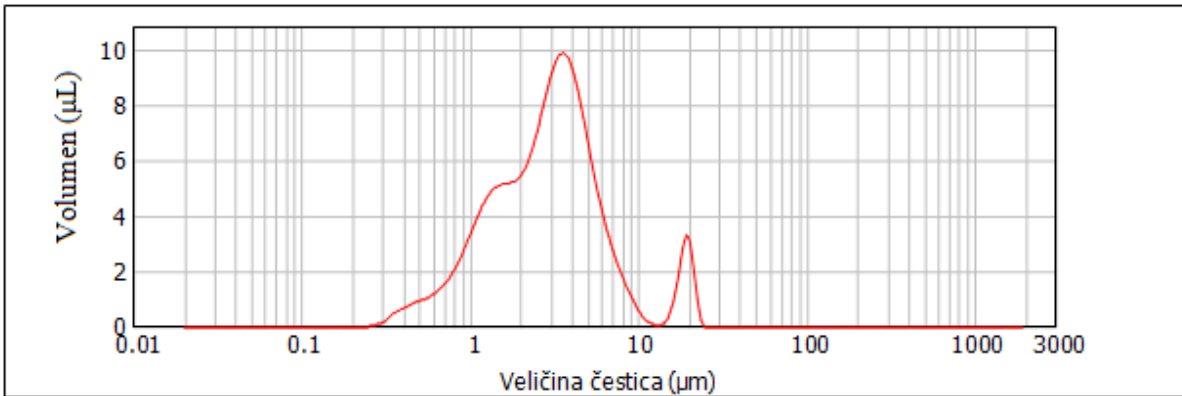
Na slikama 9-12 prikazana je raspodjela veličine čestica za nativnu i pasteriziranu sirutku, te za uzorke 3U i 3UT. Kao što je bio slučaj sa sondom od 12,7 mm djelovanjem ultrazvuka i toplinskom obradom došlo je do denaturacije proteina sirutke zbog nestanka pika oko 1000 μm koji odgovara veličini α -laktalbumina. Također, i u ovom slučaju, nativna sirutka ima najširi raspon veličine čestica jer sadržava više većih čestica nego ostali uzorci.



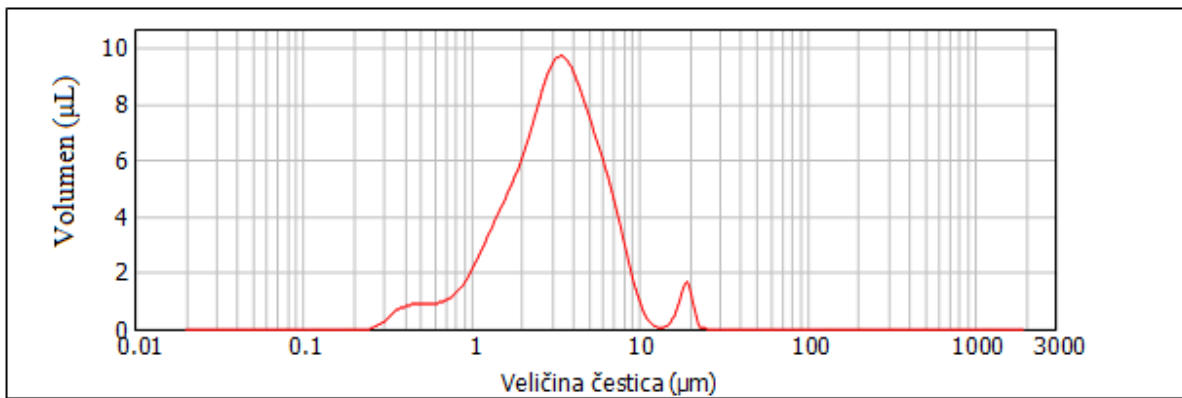
Slika 9. Raspodjela veličine čestica za nativnu sirutku



Slika 10. Raspodjela veličine čestica za pasteriziranu sirutku



Slika 11. Raspodjela veličine čestica za uzorak 3U



Slika 12. Raspodjela veličine čestica za uzorak 3UT

4.3.TRETMAN SIRUTKE ULTRAZVUČNOM SONDOM PROMJERA 22 mm

U ovoj seriji pokusa uzorci sirutke su tretirani sondom promjera 22 mm, a režimi tretmana i toplinske obrade su prikazani u tablici 21.

Tablica 21. Režimi toplinske obrade i ultrazvučnog tretmana sondom promjera 22 mm

POKUS	UZORAK	REŽIMI (ultrazvuk/toplinska obrada)
	NATIVNA SIRUTKA	-
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	72°C/20s
<i>Pokus 5</i>	5U	20kHz/8min/40%
	5UT	20kHz/8min/40% - 72°C/20s
<i>Pokus 6</i>	6U	20kHz/5min/60%
	6UT	20kHz/5min/60% - 72°C/20s
<i>Pokus 7</i>	7U	20kHz/8min/40%
	7UT	20kHz/8min/40% - 95°C/5min
<i>Pokus 8</i>	8U	20kHz/5min/60%
	8UT	20kHz/5min/60% - 95°C/5min

Prema rezultatima prikazanim u tablici 22 nema velike razlike u pH vrijednosti bilo da su uzorci podvrgnuti samo ultrazvuku ili i ultrazvuku i toplinskom tretmanu. U odnosu na nativnu sirutku kojoj je pH vrijednost iznosila 6,82 pH jedinica, odnosno pasteriziranu sirutku kojoj je pH vrijednost iznosila 6,72 pH jedinica dolazi do blagog pada pH vrijednosti kod svih uzoraka osim kod uzorka 6U čija je pH vrijednost iznosila 6,86 pH jedinica. Kod najvećeg pada pH vrijednosti je došlo kod uzorka 5U (pH vrijednost 6,46) i 5UT (pH vrijednost 6,49), a mogući razlog takvih rezultata je najduže vrijeme izloženosti tretmanu ultrazvukom (8 min).

Prema Režek Jambrak (2008) u čijem je istraživanju određivan utjecaj ultrazvuka na pH vrijednost hidrolizata proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom došlo je do blagog sniženja pH vrijednosti ili je ostala nepromijenjena ukoliko je korištena ultrazvučna sonda od 20 kHz, odnosno ultrazvučna kupelj (40 kHz).

Tablicom 22 prikazane su i °SH vrijednosti uzoraka. Prema rezultatima kod svih uzoraka došlo je do promjene u °SH vrijednosti, a najviše povišenje u odnosu na nativnu sirutku koja je imala °SH vrijednost 5,6 °SH je zabilježeno kod uzorka 5U i iznosi 9,0 °SH. Razlog tome je vjerojatno to što tijekom tretmana ultrazvukom dolazi do denaturacije proteina, ali i do narušavanja strukture ostalih sastojaka sirutke pa se oslobađaju kiseli dijelovi molekula, a samim time se povisi °SH vrijednost.

Tablica 22. Aktivna (pH) i titracijska (°SH) kiselost uzoraka tretiranih sondom promjera 22 mm

POKUS	UZORAK	pH	°SH
	NATIVNA SIRUTKA	6,82	5,6
	PASTERIZIRANA SIRUTKA	6,72	5,8
<i>Pokus 5</i>	5U	6,46	9,0
	5UT	6,49	6,0
<i>Pokus 6</i>	6U	6,86	5,2
	6UT	6,70	5,4
<i>Pokus 7</i>	7U	6,80	5,4
	7UT	6,67	6,4
<i>Pokus 8</i>	8U	6,77	4,6
	8UT	6,62	6,0

Tablice 23 i 24 prikazuju rezultate postotaka smanjenja taloga u uzorcima tretiranim ultrazvukom. Prema rezultatima prikazanim u tablici 23 najveći postotak smanjenja taloga u odnosu na nativnu sirutku je zabilježen kod uzorka 6U koji je tretiran ultrazvukom (20kHz/5min/60%) i iznosio je 64,28%. Uzrok smanjenja taloga nakon tretmana nativne sirutke ultrazvukom je vjerojatno povećanje topljivosti proteina.

Režek Jambrak i sur. (2008) ispitivali su utjecaj ultrazvuka na neka funkcionalna svojstva modalnih otopina proteina sirutke prilikom čega se pokazalo da ultrazvuk visokog

intenziteta (20 kHz) pozitivno djeluje na svojstva poput topljivosti i sposobnosti stvaranja pjene.

Prema rezultatima prikazanim u tablici 24 najveći postotak smanjenja taloga u odnosu na pasteriziranu sirutku je postignut kod uzorka 6UT koji je tretiran ultrazvukom (20kHz/5min/60%) i toplinski obrađen (72°C/20s) i iznosi 82,60%.

Prema Režek Jambrak (2008) povišena temperatura nakon tretmana ultrazvukom također pridonosi povećanoj topljivosti pošto je povećana topljivost povećana u intervalu između 40 °C i 50 °C, što je slučaj ukoliko se koristi tretman od 20 kHz.

Kod uzoraka 5U i 8UT (20kHz/5min/60% - 95°C/5min) uopće nema smanjenja taloga prema čemu bi se moglo zaključiti da je došlo do denaturacije proteina sirutke zbog visoke temperature tijekom toplinske obrade ili samog djelovanja ultrazvuka.

Villamiel i De Jong (2000) ispitivali su utjecaj ultrazvuka na proteine mlijeka te su na temelju dobivenih rezultata došli do zaključka kako ultrazvučni tretmani ne uzrokuju promjene na strukturi kazeina, dok su proteini sirutke puno osjetljiviji i podliježu procesu denaturacije.

Iako je ultrazvučnim tretmanom (20kHz/5min/60%) sondom promjera 22 mm i naknadnom toplinskom obradom (72°C/20s) došlo do najvećeg postotka smanjenja taloga od 82,60% daljnjim istraživanjima, odnosno senzorskom analizom (slika 13) je utvrđeno da ultrazvučnim tretmanom sondom promjera 22 mm dolazi do razvijanja negativnih senzorskih karakteristika, te ovakav tretman ne bi mogao naći primjenu u mljekarskoj industriji nego su potrebna dodatna istraživanja kojima bi se našao način da se taj razvoj negativnih senzorskih karakteristika smanji ili u potpunosti ukloni.

Tablica 23. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka u odnosu na netretiranu sirutku.

POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 5</i>	5U	0%
<i>Pokus 6</i>	6U	64,28%
<i>Pokus 7</i>	7U	14,28%
<i>Pokus 8</i>	8U	14,28%

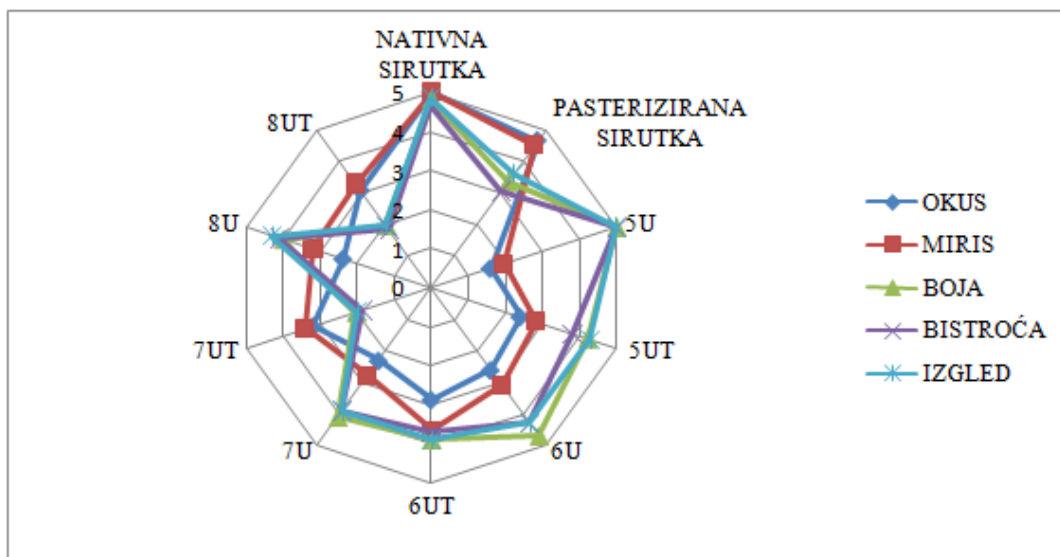
Tablica 24. Postotak smanjenja taloga tretiranih uzoraka i toplinski obrađenih u odnosu na toplinski obrađenu sirutku.

POKUS	UZORAK	Postotak smanjenja taloga
<i>Pokus 5</i>	5UT	44,44%
<i>Pokus 6</i>	6UT	82,60%
<i>Pokus 7</i>	7UT	5,79%
<i>Pokus 8</i>	8UT	0%

Prilikom tretiranja tekuće namirnice ultrazvukom visoke snage dolazi do povišenja temperature tretiranog medija, a to povišenje temperature može negativno djelovati na pojedine komponente u namirnici. Najveće promjene koje izravno utječu na nutritivne i senzorske značajke proizvoda zbivaju se na mastima i proteinima. U slučajevima nepravilnog odabira promjera sonde, frekvencije i snage ultrazvuka može doći do neželjenih promjena (Riener i sur., 2009). Riener i suradnici (2009) su pomoću masene spektrometrije i plinske kromatografije identificirali nekoliko hlapljivih spojeva koji nastaju u mlijeku prilikom obrade ultrazvukom. To su uglavnom bili aldehidi. Pretpostavlja se da ti aldehidi nastaju kao posljedica ultrazvukom prouzročene oksidacije lipida prisutnih u mlijeku, dok aromatski ugljikovodici vjerojatno nastaju cijepanjem bočnih lanaca aminokiselina poput fenilalanina. Nastali hlapivi spojevi bili su benzen, toluen, 1,3-butadien, itd. Tvari arome koje potječu od tih spojeva su miris i okus na gumu te metalni miris (Jeličić i sur., 2010).

Slikom 13 je prikazana ukupna senzorska ocjena za uzorke sirutke tretirane ultrazvukom sondom promjera 22 mm. Iz slike 13 je vidljivo da su tretirani uzorci dobili znatno niže ocjene u odnosu na netretirane uzorke jer je primijećen okus i mirisa po metalu i gumi. Iako su uzorci 5UT i 6UT dobili bolje ocjene od pasterizirane sirutke za boju, bistroću i izgled zbog utjecaja ultrazvuka, negativna svojstva okusa i mirisa koja su se pojavila nakon tretmana su rezultirala time da se zaključi kako tretman ultrazvukom sondom promjera 22 mm nije pogodan za postizanje željenih rezultata u cilju sprječavanja taloženja proteina u sirutki.

Uzorci 7UT i 8UT su dobili jako niske ocjene za boju, bistroću i izgled zbog visoke temperature tijekom toplinske obrade čime je došlo do denaturacije proteina sirutke koji su uzrokovali zamućenje i stvaranje taloga.



Slika 13. Ukupna senzorska ocjena native sirutke, pasterizirane sirutke, tretiranih sirutki (5U, 6U, 7U, 8U) i tretiranih i toplinski obrađenih sirutki (5UT, 6UT, 7UT, 8UT)

Tablicom 25 su prikazane L^* , a^* i b^* vrijednosti boje. Kod svih UT uzoraka, koji su tretirani ultrazvukom i toplinski obrađeni, prikazanih u tablici 25 zabilježen je pad L^* vrijednosti, što znači da su uzorci nakon tretmana ultrazvukom i toplinom manje svijetli u odnosu na nativnu sirutku. Najveći pad L^* vrijednosti zabilježen je kod uzoraka 7UT i 8UT koje ujedno imaju i najnižu L^* vrijednost u ovom istraživanju. Uzrok najniže L^* vrijednosti je vjerojatno visoka temperatura toplinske obrade kojoj su bili podvrgnuti navedeni uzorci, a koja je iznosila 95 °C što je uzrokovalo denaturaciju proteina čime je došlo do zamućenja uzoraka i nastanka taloga, a samim time je i uzorak postao tamniji u odnosu na nativnu sirutku.

Također, kod uzoraka 7UT i 8UT je zabilježena promjena a^* vrijednosti čime su ušli u zeleno područje.

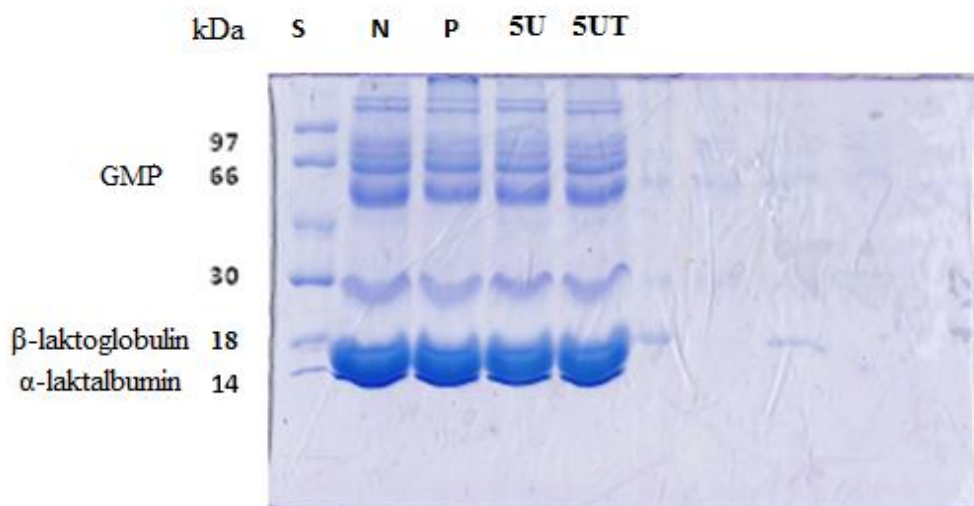
Kod svih U uzoraka, koji su tretirani ultrazvukom, je zamijećeno lagano povećanje L^* vrijednosti u odnosu na nativnu sirutku, što znači da se djelovanjem ultrazvuka postiže svjetlija boja sirutke.

Tablica 25. Prosječne L , a i b vrijednosti boje za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 1U, 1UT, 2U, 2UT, 3U, 3UT, 4U i 4UT

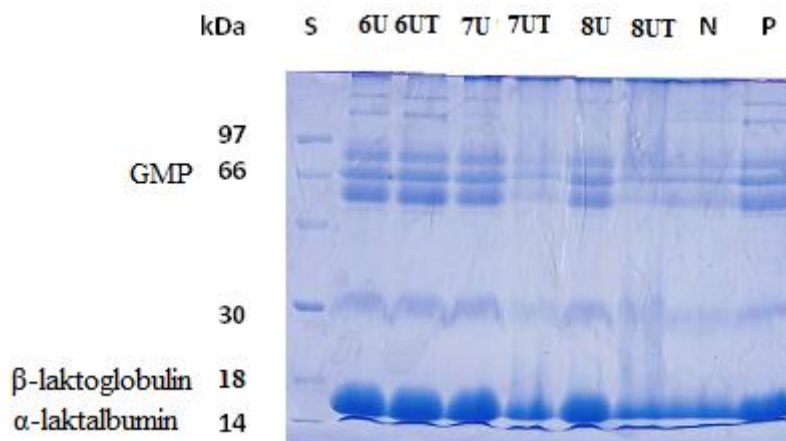
NAZIV UZORKA	L^*	a^*	b^*
NATIVNA SIRUTKA	81,30	0,49	20,24
PASTERIZIRANA SIRUTKA	61,65	1,97	23,66
1U	81,55	0,66	20,13
1UT	70,88	1,90	22,71
2U	81,36	0,85	19,81
2UT	79,33	0,93	20,98
3U	82,77	0,59	19,19
3UT	51,90	-1,08	22,15
4U	81,31	0,83	19,95
4UT	51,22	-1,29	23,24

Na slikama 14 i 15 prikazan je SDS-PAGE gel s pripadajućim proteinskim vrpčama. Vrpca S prikazuje udjel pojedinog standarda, odnosno proteina određene molekulske mase (14 kDa- α -laktalbumin, 16 kDa- β -laktoglobulin, 66 kDa-glikomakropeptid (GMP)). Na ostalim vrpčama se mogu jasno vidjeti pripadajuće proteinske frakcije. Nakon tretmana ultrazvukom nije došlo do značajnih promjena u cijepanju proteinskih lanaca kod većine uzoraka pa samim time ni do nastanka novih frakcija. Kod uzoraka 7UT i 8UT došlo je do smanjenja intenziteta obojenja frakcija α -laktalbumina, β -laktoglobulin i GMP-a te su tako sličniji nativnoj sirutki.

Zisu i sur. (2011) su tretirali otopine koncentrata i izolata proteina sirutke ultrazvučnom sondom od 20 kHz. Potom su tretirane ultrazvuke analizirali gel elektroforezom. Pokazano je da što je dulje vrijeme tretmana ultrazvukom to su veći bandovi, što je bio rezultat agregacije proteina sirutke. Također, s produljenjem vremena tretmana ultrazvukom band sa GMP-om je nestajao. Za razliku od gel elektroforeze, SDS-page istih proteina nije pokazao nikakve promjene bez obzira na duljinu trajanja tretmana ultrazvukom što znači da nije došlo do promjene molarnih masa proteina.

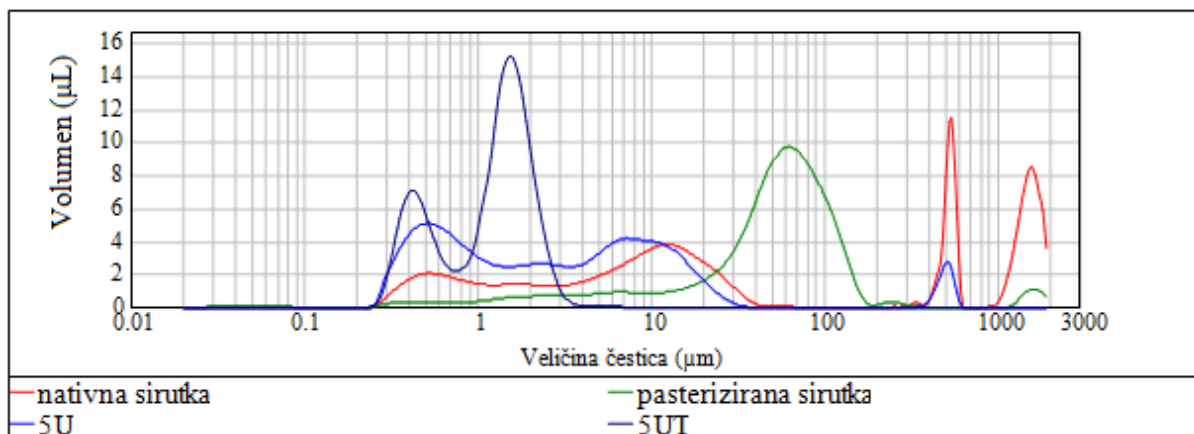


Slika 14. SDS-PAGE gel netretiranih i tretiranih uzoraka (standard (S), nativna sirutka (N), pasterizirana sirutka (P), 5U, 5UT)



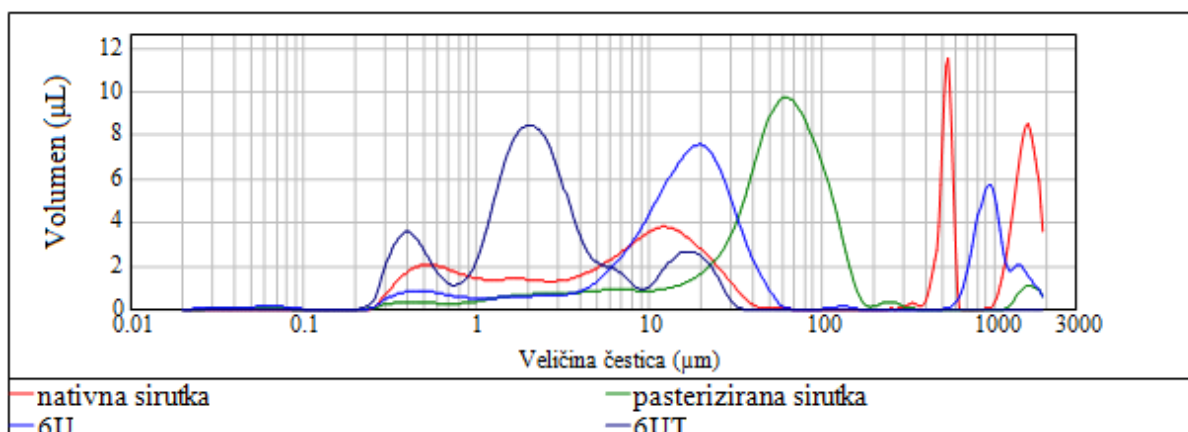
Slika 15. SDS-PAGE gel netretiranih i tretiranih uzoraka (standard (S), nativna sirutka (N), pasterizirana sirutka (P), 6U, 6UT, 7U, 7UT, 8U, 8UT)

Slikom 16 prikazana je raspodjela veličine čestica za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 5U i 5UT. Uzorak nativne sirutke pokazuje pikove oko 1000 μm što ukazuje na prisutnost proteina sirutke, odnosno α -laktalbumina. Međutim, kod uzoraka pasterizirane sirutke i 5U pokazano je smanjenje tih pikova u volumenu što znači da je došlo do denaturacije proteina sirutke tijekom obrade. Iz Slike 16 je također vidljivo da nativna sirutka ima najširi raspon veličine čestica, a kod uzorka 5UT došlo do najvećeg smanjenja veličine čestica i taj uzorak ima najuži raspon veličine čestica u usporedbi sa svim uzorcima u ovoj seriji pokusa (Slike 16-19).



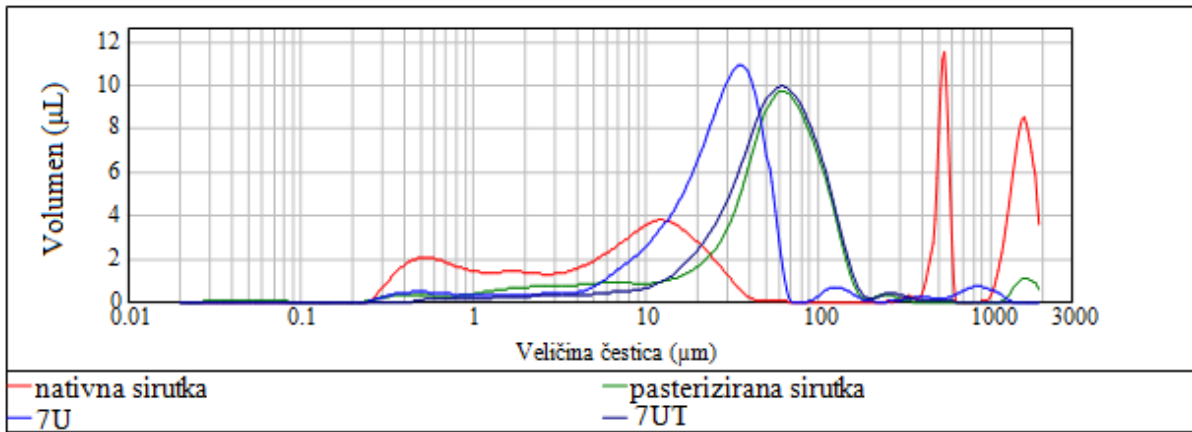
Slika 16. Raspodjela veličine čestica (nativna i pasterizirana sirutka, 5U i 5UT)

Slikom 17 prikazana je raspodjela veličine čestica za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 6U i 6UT. Kod svih uzoraka na slici 17 zamijećen je porast udjela čestica manjeg promjera u odnosu na nativnu sirutku. Uzorak 6UT ne pokazuje pik oko vrijednosti 1000 μm koji odgovara proteinima sirutke iz čega se može zaključiti da su proteini sirutke denaturirali tijekom obrade.

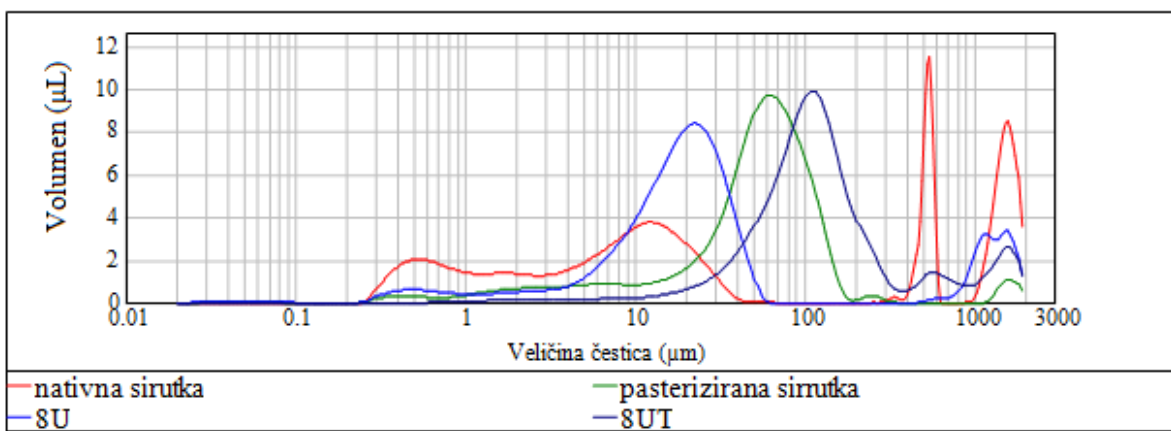


Slika 17. Raspodjela veličine čestica (nativna i pasterizirana sirutka, 6U i 6UT)

Slikom 18 i 19 prikazana je raspodjela veličine čestica za nativnu i pasteriziranu sirutku, te uzorke 7U, 7UT, 8U i 8UT. Kod svih uzoraka na slikama 18 i 19 zabilježen je porast udjela manjih čestica u odnosu na nativnu sirutku, te smanjenje udjela proteina sirutke.



Slika 18. Raspodjela veličine čestica (nativna i pasterizirana sirutka, 7U i 7UT)



Slika 19. Raspodjela veličine čestica (nativna i pasterizirana sirutka, 8U i 8UT)

5. ZAKLJUČCI

S obzirom na provedeno istraživanje može se zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvuk utječe na posvjetljivanje boje sirutke nakon tretmana, ima pozitivan utjecaj na topljivost proteina, te njegovim djelovanjem dolazi do smanjenja veličine čestica i suženja njihove raspodjele.
2. Prema rezultatima na SDS-PAGE-u nakon tretmana ultrazvukom nije došlo do nastanka novih frakcija.
3. UZV tretmanom sondom promjera 22 mm i režimom 20kHz/5min/60% te pasterizacijom pri 72°C/20s postiže se najveći postotak smanjenja taloga u sirutki (82,60 %), ali taj tretman nije pogodan za primjenu u mljekarskoj industriji jer uzrokuje negativne senzorske karakteristike kao što su okus i miris po metalu i gumi.
4. Najbolji rezultati u smanjenju nastanka taloga proteina u slatkoj sirutki postignuti su tretiranjem sondom promjera 19 mm i režimom 20kHz/8min/40% te pasterizacijom pri 72°C/20s (postotak smanjenja taloga 59,09%)s obzirom na to da su postignuta zadovoljavajuća senzorska svojstva tretirane sirutke.

6. LITERATURA

- Ashokkumar, M. (2014) Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrason. Sonochem.* **25**, 17-23.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., Kentish, S. (2009) Sonication increases the heat stability of whey proteins. *J. Dairy Sci.* **92**, 5353-5356.
- Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., Herceg, Z., Karlović, S., Božanić, R. (2015) Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innov. Food Sci. Emerg.* **27**, 94-101.
- Beaty R. D., Kerber J. D. (1993) Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry, 2. izd., The Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT, U.S.A.
- Bermudez, A.D., Mawson, R., Barbosa, C.G.V. (2008) Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *J. Food. Sci.* **73**, 325-332.
- Beucler, J., Drake, M., Foegeding, E. A. (2005) Design of a beverage from whey permeate. *J. Food Sci.* **70**, 277-285.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.
- De Wit, J.N. (1998) Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* **81** 597-608.
- Đorđević J., Maćej O. (1982) Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka. *Mljekarstvo.* **32 (8)**, 233-242.
- Fox, P.F. (1980) Egzogene proteinaze u mljekarskoj tehnologiji. *Mljekarstvo.* **30 (12)**, 363-378.

- Gajendragadkar, C.N., Gotage, P.R. (2016) Intensified recovery of valuable products from whey by use of ultrasound in processing steps - A review. *Ultrason. Sonochem.* **32**, 102-118.
- Herceg, Z., Lelas, V., Režek, A. (2004) Funkcionalna svojstva α -laktalbumina i β -Laktoglobulina. *Mljekarstvo.* **54 (3)**, 195-208.
- Herceg, Z., Režek, A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo.* **56 (4)**, 379-396.
- Herceg, Z., Režek, A., Rimac Brnčić, S. (2008) Molekularna osnova funkcionalnosti proteina sirutke, *Mljekarstvo.* **58 (2)**, 181-193.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009a) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo.* **59 (1)**, 65-69.
- Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009b) Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.
- Hramcow, A.G. (1979) Moločnaja Sivorotka, Piščevaja promišlenost, Moskva.
- Jeličić, I., Božanić, R., Brnčić, M., Tripalo, B. (2012) Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo.* **62 (3)**, 165-178.
- Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, Lj., Lisak, K. (2010) Mogućnosti primjene netradicionalnih postupaka procesiranja u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo.* **60 (2)**, 113-126.
- Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O. (2005) Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo.* **55**, 215-233.
- King, L. (1996) Whey protein concentrates as ingredients. *Food Tech. Eur.* **3**, 88-89.
- Markus, C.R., Olivier, B., de Haan, E.H. (2002) Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**, 1051-1056.

Marošević, S., Peraković, K. (1981) Potrebe i mogućnosti iskorištavanja proteina sirutke kod nas. *Mljekarstvo*. **31**, 10-22.

Martini, S., Potter, R., Walsh, M. K. (2010) Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. *Food Res. Int.* **43**, 2444–2451.

Martini, S., Walsh, M.K. (2012) Sensory characteristics and functionality of sonicated whey. *Food Res. Int.* **49**, 694-701.

Mason, T.J., Riera, E., Vercet, A., Buesa Lopez, P. (2005) U: Application of ultrasound, Emerging Technologies for Food Processing (Sun, D.W., ured.) Academic Press, 323-351.

Morel, M., -H., Dehlon, P., Autran, J.C., Leygue, J.P., Bar-L'Helgouac'h, C. (2000) Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* **77**, 685-691.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A-S., Chemat, F. (2013) Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control.* **31**, 593-606.

Pravilnik o metodama analiza toplinski obrađenog mlijeka za prehranu ljudi (2007) Narodne novine 133, Zagreb

Renner, E. (1983) Milk and dairy products in human nutrition, Volkswirtschaftlicher Verlag, München.

Režek Jambrak, A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža, M. (2009) Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo*. **59** (4), 267-281.

Režek Jambrak, A., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., Ljubić Herceg, I. (2008) Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *J. Food Eng.* **86** (2), 281-287.

- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A, Morgan, D.J., Lyng, J.G. (2009) Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *Int. Dairy J.* **19**, 269-272.
- Sabadoš, D. (1998) Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Souza, R.R., Bergamasco, R., Costa, S.C., Feng, X., Faria, S.H.B., Gimenes, M.L. (2010) Recovery and purification of lactose from whey. *Chem. Eng. Process.* **49**, 1137-1143.
- Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Tratnik, Lj. (2003) Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo.* **53 (4)**, 325-352.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Wijayanti, H.B., Bansal, N., Deeth, H.C. (2014) Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 1235-1251.
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010) Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 1075–1081.
- Zisu, B., Lee, J., Chandrapala, J., Bhaskaracharya, R., Palmer, M., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2011) Effect of ultrasound on the physical and functional properties of reconstituted whey protein powders. *J. Dairy Res.* **78**, 226-232.