

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Valentina Lukenda

**PROMJENE SVOJSTAVA I  
KVALITETE MLIJEKA  
MAGARICE OBRAĐENOG  
RAZLIČITIM REŽIMIMA  
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 izv.prof.dr.sc. Irene Barukčić Jurina, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc.dr.sc. Andreje Leboš Pavunc i doc.dr.sc. Tamare Jurina.

## *Projekt*

*Rad je izrađen u sklopu projekta SIRENA Modifikacija procesa zrenja sira i razvoj proizvoda na bazi sirutke, br. Ugovora KK.01.1.1.04.0096, sufinanciranom iz sredstava Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj, pod voditeljstvom izv.prof. Marijane Blažić, Veleučilište u Karlovcu.*



## ZAHVALE

Veliko hvala mojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ireni Barukčić Jurina za svaku sugestiju, komentar, mišljenje, te strpljenju prilikom izrade diplomskog rada.  
Također, zahvaljujem se OPG-u Cvetan Mladen koji mi je omogućio uzorke mlijeka magarice kako bih mogla odraditi svoj diplomski rad.  
Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je bila podrška kroz cijelo moje školovanje.

# 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

**Diplomski sveučilišni studij:** Upravljanje sigurnošću hrane

## PROMJENE STVOJSTAVA I KVALITETE MLIJEKA MAGARICE OBRADENOG RAZLIČITIM REŽIMIMA TOPLINSKE OBRADJE

*Valentina Lukenda, univ.bacc.ing.techn.aliment.*  
0113145082

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih temperaturnih režima na kvalitetu mlijeka magarice; formiranje ukupnog i slobodnog hidroksimetilfurfurala, utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (DPPH i FRAP metoda), na količinu ukupnih fenola, kao i na promjene u boji mlijeka magarice, količini ukupnih topljivih tvari i električnoj vodljivosti, te raspodjeli veličine čestica. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima na sirovom mlijeku magarice, te na uzorcima mlijeka magarice tretiranim različitim temperaturnim režimima (63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, 116 °C/15 min). Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da povećanjem temperature dolazi do povećanja koncentracije ukupnog i slobodnog hidroksimetilfurfurala, koncentracije ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom. Povećava se i količina ukupnih otopljenih tvari i električna vodljivost, a najveće promjene u boji mlijeka izražene su kod uzorka tretiranog pri 116 °C. Također, blisko infracrvena spektroskopija ukazuje na određene kvalitativne promjene strukture pri različitim temperaturnim režimima. Povišenjem temperature dolazi do denaturacije proteina, što pokazuju rezultati SDS elektroforeze.

**Ključne riječi:** mlijeko magarice, toplinska obrada, hidroksimetilfurfural, antioksidacijska aktivnost, blisko infracrvena spektroskopija

**Rad sadrži:** 48 stranica, 13 slika, 9 tablica, 35 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Irena Barukčić Jurina

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc i doc.dr.sc. Tamara Jurina

### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc.dr.sc. Tamara Jurina (predsjednik)
2. izv.prof.dr.sc. Irena Barukčić Jurina (mentor)
3. doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović (član)
4. doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 28. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotenical Sciences

**Scientific filed:** Food Technology

**Graduate university studies:** Food safety menagment

### **CHANGES IN THE PROPERTIES AND QUALITY OF DONKEY MILK PROCESSED WITH DIFFERENT HEAT TREATMENT REGIMES**

*Valentina Lukenda, univ.bacc.ing.techn.aliment*

0113145082

**Abstract:** The goal of this paper was to research the influence of different temperature regimes on the quality of donkey milk; formation of total and free Hydroxymethylfurfural, influence on antioxidant activity (DPPH and FRAP method), on the amount of total phenols, as well as on changes in the color of donkey milk, amount of total dissolved solids and electrical conductivity, and particle size distribution. The research was conducted in laboratory conditions on raw donkey milk, and on samples of donkey milk treated at different temperature regimes (63-65 °C/ 15 sec, 72 °C/ 20 sec, 90-95 °C/5 min, 116 °C/15 min. Based on the experimental results, it can be concluded that temperature increase leads to an increase in the concentration of total and free Hydroxymethylfurfural, concentration of total phenols and increase of antioxidant activity measured by the FRAP method. Total dissolved solids and electrical conductivity also increases, and the biggest changes in the color of milk can be seen in samples treated at 116 °C. Likewise, the Near Infrared Spectroscopy shows certain qualitative changes in structure at different temperature regimes. An increase in temperature leads to denaturation of proteins, which has been proven by the results of SDS electrophoresis.

**Key words:** donkey milk, heat treatment, Hydroxymethylfurfural , antioxidant activity, Near Infrared Spectroscopy

**Thesis contains:** 48 pages, 13 figures, 9 tabels, 35 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic form (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Irena Barukčić Jurina, Associate professor

**Technical support and assistance:** Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor and Tamara Jurina, Assistant proffesor

#### **Reviewers:**

1. Tamara Jurina, PhD, Assistant Professor (president)
2. Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate Professor (mentor)
3. Katarina Lisak Jakopović, PhD, Assistant Professor (member)
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant Professor (substitute)

**Thesis defended:** September 28<sup>th</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2.TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. SASTAV I SVOJSTVA MLIJEKA MAGARICE.....	2
2.2. ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST MLIJEKA MAGARICE .....	5
2.3. VRSTE TOPLINSKIH TRETMANA I MOGUĆE PROMJENE U MLIJEKU NASTALE POD UTJECAJEM TOPLINE.....	6
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>8</b>
3.1. MATERIJALI.....	8
3.2. METODE.....	10
3.2.1. Određivanje pH vrijednosti mlijeka magarice .....	10
3.2.2. Određivanje mliječne masti metodom po Gerberu .....	11
3.2.3. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahu .....	11
3.2.4. Određivanje udjela laktoze metodom po Loof- Schoorlu.....	13
3.2.5. Određivanje indeksa boje.....	15
3.2.6. Određivanje ukupnog i slobodnog HMF-a .....	17
3.2.7. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te za određivanje udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu.....	18
3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	18
3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	19
3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih fenola s reagensom Folin Ciocalteu.....	21
3.2.11. Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) u mlijeku magarice.....	22
3.2.12. Snimanje spektra u blisko infracrvenom području (NIR spektra) na uzorku mlijeka magarice.....	23
3.2.13. Raspodjela veličine čestica .....	23
3.2.14. Natrij dodecil sulfat- poliakrilamidna gel elektroforeza proteina (SDS PAGE) ..	24
3.2.15. Obrada podataka .....	26
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
4.1. SASTAV MLIJEKA MAGARICE .....	27



4.2. ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA NA UZORCIMA TRETIRANIM RAZLIČITIM TEMPERATURNIM REŽIMIMA.....	28
4.3. ELEKTRIČNA VODLJIVOSTI I UKUPNE OTOPLJENE TVARI MLIJEKA MAGARICE.....	29
4.4. ODREĐIVANJE UKUPNOG I SLOBODNOG HIDROKSIMETILFURFURALA...	30
4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	32
4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM.....	33
4.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLA .....	35
4.8. NIR SPEKTRI .....	36
4.9. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA .....	37
4.10. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA .....	38
4.11. SDS-PAGE ELEKTROFOREZA .....	40
<b>5.ZAKLJUČCI .....</b>	<b>43</b>
<b>6.LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## 1.UVOD

Mlijeko je prirodni sekret mliječne žlijezde, dobiven mužnjom zdravih životinja koje su pravilno hranjene. U ljudskoj prehrani se smatra da je mlijeko kobile i magarice najlakše probavljivo, a osim toga su bogat izvor esencijalnih nutrijenata.

Mlijeko magarice kao i kobilje ima ograničenu sposobnost koagulacije i daje rastresit i nježan gruš pa se zbog toga proizvode samo fermentirano mlijeko nalik kumisu, te probiotički napitci koji sadržavaju laktobacile.

Mlijeko magarice se danas najviše koristi u zamjenu za humano mlijeko i vrijedna su zamjena u prehrani djece koja su alergična na kravlje mlijeko. Istraživanja su pokazala da korištenje mlijeka magarice može biti korisno u liječenju humanih bolesti koje su povezane s imunološkim sustavom, a koriste se i u liječenju bolesti dišnih sustava (Božanić i sur., 2018).

Enzimi prisutni u mlijeku magarice u usporedbi s drugim vrstama mlijeka imaju značajna baktericidna svojstva. U novije vrijeme mlijeko magarice koristi se i u kozmetičke svrhe zbog visoke koncentracije višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Mlijeko magarice se koristi u ograničenim količinama jer je teško osigurati dostatne količine mlijeka u kontinuitetu, a još uvijek nema status hrane za posebne medicinske potrebe (Božanić i sur., 2018).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih režima toplinske obrade na kvalitetu mlijeka magarice; mjerenjem ukupnog i slobodnog HMF-a (hidroksimetilfurfurala), sadržaj ukupnih fenola, određivanjem antioksidacijskog potencijala (DPPH i FRAP metodom), te promjenama u indeksu boje, električnoj vodljivosti, ukupne otopljene tvari i distribuciji veličine čestica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SASTAV I SVOJSTVA MLIJEKA MAGARICE

Mlijeko magarice se kemijskim sastavom znatno razlikuje od kravljeg mlijeka, ali je vrlo slično kobiljem i humanom pa se smatra izrazito pogodnim za prehranu male djece. U usporedbi s kravljim mlijekom, mlijeko magarice sadrži manje količine mliječne masti, anorganskih soli i proteina, a više laktoze (Božanić i sur., 2018).

Svojim senzorskim svojstvima mlijeko magarice se bitno razlikuje od kravljeg mlijeka. Mlijeko magarice je svijetlije i slađe, a konzistencija mu je rjeđa. Kemijski sastav mlijeka magarice kao i kobiljeg, kravljeg i humanog prikazan je u tablici 1.

Količina proteina ne ovisi o pasmini i broju mužnji, nego je povezana sa načinom hranjenja i stadijem laktacije. Najveći udio proteina je u proljetnim i ljetnim mjesecima (između ožujka i lipnja) zbog toga što je hranidba bogata proteinima jer se zasniva uglavnom na ispaši. Isto tako, sadržaj mliječne masti varira (0,20 %-1,82 %) ovisno o pasmini, načinu hranidbe i mužnje. Gustoća mlijeka magarice kreće se od 1029 do 1037 kg/m<sup>3</sup>, a točka ledišta mlijeka iznosi - 0,508 °C do - 0,540 °C. pH vrijednost mlijeka magarice u prosjeku iznosi 6,9 do 7,2 što je nešto više u odnosu na kravlje mlijeko, koje ima višu pH vrijednost zbog većeg udjela kazeina i fosfatnih soli (Ivanković i sur., 2016).

**Tablica 1.** Prikaz kemijskog sastava mlijeka magarice, kobiljeg, kravljeg i humanog (Božanić i sur., 2018)

Parametar	Mlijeko magarice	Kobilje mlijeko	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Suha tvar (%)	8,8-11,7	10,2	10,7-12,9	11,8-13,0
Proteini (%)	1,4-2,0	1,5-2,8	0,9-1,9	3,0-3,9
Odnos kazeina: albumina	1,3:1,0	1,1:1,0	0,4:1,0	4,7:1,0
Mast (%)	0,3-1,8	0,5-2,0	2,1-4,0	3,3-5,4
Laktoza (%)	5,8-7,4	5,8-7,0	6,3-7,0	4,4-5,6
Mineralne tvari (%)	0,3-0,5	0,3-0,5	0,2-0,3	0,7-0,8
Energetska vrijednost (kJ/1000 mL)	158,2	188,3	276,3	276,3

Iz tablice 1 je vidljiva sličnost humanog mlijeka i mlijeka magarice jer je udio laktoze i proteina sličan, a udio masti je niži nego u kravljem mlijeku. Zbog toga je mlijeko magarica cijenjeno i dobra je zamjena humanom mlijeku, a zbog većeg udjela antimikrobnih tvari (visoke koncentracije lizozima i imunoglobulina G) osigurava korištenje mlijeka u terapijske svrhe (Božanić i sur., 2018).

U odnosu na kravlje mlijeko, mlijeko magarice ima visoku koncentraciju proteina sirutke u ukupnim proteinima (35 %-50 %), od čega najviše frakcije laktoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -laktalbumina i imunoglobulina (Ig). Veliki udio u ukupnim proteinima sirutke čini već spomenuti lizozim (čak 21 %) koji je otporan na djelovanje probavnih enzima i laktoferin koji se razgrađuje u probavnom traktu. Laktoferin ima sposobnost inhibicije gram negativnih i gram pozitivnih bakterija, a prosječan udio u mlijeku magarice iznosi više od 2 % ukupne proteinske frakcije. Istraživanja su pokazala kako laktoferin ima snažno djelovanje protiv eneterovirusa tipa 5 koji je česti uzročnik humanog gastrointestinalnog sustava (Samardžija, 2016). Prosječan udio ukupnih proteina u mlijeku magarice iznosi 1,42 g na 100 mL, što je otprilike dvostruko manje u odnosu na kravlje mlijeko koje sadrži 3,25 g na 100 mL ukupnih proteina u mlijeku (Martini, 2017).

Kazein u mlijeku magarice, kao i u kravljem, kobiljem, te kozjem razgrađuje se sličnim mehanizmom, ali količina neprobavljenog kazeina u mlijeku magarice, humanom i kobiljem dvostruko je manja nego u kravljem i kozjem mlijeku. To potvrđuje činjenicu da se mlijeko magarice razgrađuje dvostruko brže nego kravlje (Dureau i Martin Rosset, 2011). Udio kazeina u mlijeku magarice iznosi oko 50 % što ga čini izvrsnom zamjenom za humano mlijeko u prehrani dojenčadi. Kazein mlijeka magarice je rastresit i nježan i zbog toga se ovo mlijeko ne prerađuje u sir i druge mliječne proizvode (Božanić i sur., 2018).

Udio neproteinskih dušičnih tvari poput kreatinina, uree i aminokiselina je znatno veći u mlijeku magarice u odnosu na kravlje mlijeko. Prosječan udio neproteinskih dušičnih tvari iznosi oko 15,76 %. Posebno je izražen veći udio uree tijekom ljetnih mjeseci kada je hranidba bogata proteinima, a količina frakcije iznosi između 40 % i 50 %. Osim uree, veliku važnost imaju i slobodne aminokiseline, te biogeni amini, spermin, spermedin i putrescin koji su važni za biosintezu tkiva.

Udio mliječne masti u mlijeku magarica je izrazito nizak, a kreće se od 0,3 % do 1,8 % i zbog toga ni energetska vrijednost mlijeka nije velika, iznosi oko 158 kJ na 100 mL mlijeka. Na udio

mliječne masti utječe nekoliko faktora kao što su pasmina, vrsta podneblja, ispaša i način mužnje. U mlijeku magarica prevladavaju triacilgliceroli, nalazi se oko 9,5 % slobodnih masnih kiselina, te 5 %–10 % fosfolipida, a u odnosu na kravlje mlijeko manji je udio zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina, a veći višestruko nezasićenih masnih kiselina (Božanić i sur., 2018).

Omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je manji u odnosu na kravlje mlijeko i ostale vrste mlijeka. Na sastav mliječne masti u mlijeku veliku ulogu ima hranidba i opće stanje magarice. Najzastupljenije zasićene masne kiseline su kaprilna, kaprinska i palmitinska, te u malim količinama miristinska (Doreu i Boulot, 1998). Najveći dio su srednjolančane masne kiseline i palmitinska, što je bitno jer se one brže razgrađuju i apsorbiraju nego dugolančane zasićene masne kiseline. Zbog toga je mlijeko magarice probavljivije od kravljeg mlijeka. Mlijeko magarice sadrži i više omega-3 i omega-6 masnih kiselina u odnosu na druge vrste mlijeka pa je zbog toga i visoke nutritivne vrijednosti (Božanić i sur., 2018). Od ukupnih nezasićenih masnih kiselina najviše je zastupljena linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina (Samardžija, 2016).

Prosječan udio laktoze iznosi oko 6,88 g na 100 g mlijeka što je više u odnosu na druge vrste mlijeka, posebice kravljeg. Udio laktoze u mlijeku ne ovisi o drugim čimbenicima poput hranidbe, mužnje nego je više – manje konstantan. Zbog većeg udjela laktoze, mlijeko magarice je izrazito slatko, a ima potencijal da se koristi za uzgoj probiotičkih bakterija mliječne kiseline koje se nalaze u našim crijevima. Bez obzira na veći udio laktoze u mlijeku, energetska vrijednost znatno je niža u usporedbi sa drugim vrstama mlijeka zahvaljujući niskom udjelu mliječne masti (Salimei, 2016). Laktoza potiče crijevnu apsorpciju kalcija i fosfora što je važno u prevenciji osteoporoze (Martini i sur., 2017).

Udio mineralnih tvari je nešto niži u mlijeku magarice u odnosu na kravlje, ali veći u odnosu na humano mlijeko. U prosjeku udio mineralnih tvari kreće se od 3,9 – 4,1 g na 100 g mineralnih tvari. Udio mineralnih tvari varira, najveći je u kolostralnom mlijeku što je i logično jer je kolostrum glavna hrana u prvim tjednima mladuncu, dok nakon 28 dana količina mineralnih tvari opada do određene razine nakon čega se ustaljuje. Količina kalcija i fosfora je tri puta veća nego u humanom mlijeku, ali dvostruko niže u odnosu na kravlje mlijeko. Od ostalih minerala, količina magnezija, kalija i natrija vrlo je slična humanom mlijeku (Božanić i sur., 2018).

Udio vitamina prije svega ovisi o načinu hranidbe životinja. S obzirom da je udio mliječne masti niži u odnosu na druga mlijeka, povezano s time manji je udio i vitamina topljivih u mastima. Udio ostalih vitamina sličan je udjelu vitamina drugih vrsta mlijeka.

## **2.2. ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST MLIJEKA MAGARICE**

Ljekovitost mlijeka magarice poznata je još od vremena Egipćana. Danas je ono izrazito cijenjeno zbog svog antimikrobnog djelovanja, a za koje je zaslužna visoka koncentracija termostabilnog lizozima, ali i laktoferina i laktoperoksidaze. Tidona i sur. (2011), istražili su kako je lizozim iz mlijeka otporan na djelovanja proteaza i želučane kiseline, pa zbog toga ima važnu ulogu u stimulaciji imunološkog odgovora u crijevima čovjeka. Isto tako, utvrdili su kako mlijeko magarice ima jak antimikrobni učinak prema sojevima *E.coli* i *L.monocytogenes* (Božanić i sur., 2018).

Antioksidacijska aktivnost je jedan od ključnih pokazatelja kojim možemo pratiti zdravstvenu vrijednost mlijeka. Antioksidansi su spojevi koji su prisutni u malim količinama, a imaju tendenciju da lako oksidiraju i tako sprječavaju i usporavaju oksidaciju drugih molekula. Mehanizam se temelji na prijenosu elektrona ili vodika na oksidacijsko sredstvo pri čemu nastaju reaktivni slobodni radikali koji potiču lančanu reakciju u stanici. Uklanjanjem intermedijera nastalih u lančanim reakcijama, antioksidansi time usporavaju i sprječavaju oksidacijske reakcije. Dokazano je da antioksidacijska aktivnost mlijeka ovisi o načinu ishrane, pa životinje koje se hrane slobodnom ispašom u pravilu imaju veću količinu fenolnih spojeva u mlijeku (Chávez-Servín i sur., 2018).

Kako bi se sačuvala sve prehrambena i zdravstvena vrijednost mlijeka magarice, bitan je način skladištenja mlijeka nakon mužnje. Zbog toplinske osjetljivosti visokovrijednih sastojaka, najbolje ga je konzumirati svježe. Može se kratko vrijeme čuvati pri temperaturi hladnjaka, a u slučaju da se ne konzumira odmah najbolje ga je zamrznuti.

U otprilike 3 % djece u dobi od 3 godine javlja se alergijska reakcija na proteine mlijeka (kazein i  $\beta$ -laktoglobulin) i zbog toga djeca ne mogu konzumirati kravlje mlijeko. Mlijeko magarice je svojim sastavom slično humanom mlijeku, zbog čega se može koristiti kao zamjena u djece koja su alergična na proteine mlijeka. Ključne uloge esencijalnih masnih kiselina u ljudskom organizmu su izgradnja staničnih membrana, sudjelovanje u regulaciji enzimskog sustava, regulacija metabolizma kolesterola, kontrakcija krvnih žila, regulacija osjeta boli itd. S obzirom

na navedeno, kako je mlijeko magarice bogato esencijalnim masnim kiselinama, može se zaključiti da sudjeluje u prevenciji autoimunih i krvožilnih bolesti (Božanić i sur., 2018).

U smrznutom mlijeku magarice pronađeni su bioaktivni peptidi kao što su faktor rasta sličan inzulinu, grelin i trijodtironin, a oni se sve više istražuju zbog potencijanih učinaka na metabolizam i općeg stanja djece.

Zbog niskog atrogenog i trombogenog indeksa, mlijeko magarica se preporučuje za oporavak imunološkog sustava.

### **2.3. VRSTE TOPLINSKIH TRETMANA I MOGUĆE PROMJENE U MLIJEKU NASTALE POD UTJECAJEM TOPLINE**

Mlijeko se toplinski obrađuje s ciljem smanjenja i uništenja mikroorganizama, bakterija i spora, te inaktivacije enzima. Za uništenje vegetativnih stanica patogenih bakterija dovoljna je i niska temperatura pasterizacije (63 °C kroz 30 min ili 72 °C kroz 15 sek). Za uništenje svih mikroorganizama pa tako i spora dovoljne su određene kombinacije vremena i temperature (npr. 110 °C/30 min, 130 °C/30 sek ili 140 °C/1 sek) postupka sterilizacije. Pri tome, stanice i spore nekih kvasaca i plijesni imaju manju otpornost na visoke temperature. Nekoliko je vrsta toplinske obrade mlijeka koje su prikazane u tablici 2.

**Tablica 2.** Vrste toplinskih tretmana (Ban, 2016)

Vrsta procesa	Temperatura (°C)	Trajanje
Termalizacija	63-65	15 sek
Niska pasterizacija mlijeka	63-65	30 min
Srednje kratkotrajna pasterizacija mlijeka	72-75	15-20 sek
Visoka kratkotrajna pasterizacija	>> 80	1-5 sek
Ultrapasterizacija	125-138	2-4 sek
Sterilizacija u protoku	135-140	Nekoliko sek
Sterilizacija u ambalaži	115-120	20-30 min

Termalizacija je postupak zagrijavanja mlijeka na određenu temperaturu i vremenski period pri čemu se privremeno inhibira rast bakterija, ali se enzimi fosfataze ne inaktiviraju (Tratnik i Božanić, 2012). Proces može poslužiti kao zamjena za pasterizaciju. Pasterizacija je toplinski tretman koji služi uništavanju patogenih bakterija i inaktiviranju enzima, a da se pritom hranjiva vrijednost mlijeka ne mijenja. Postoji nekoliko vrsta pasterizacije; niska dugotrajna pasterizacija, srednje kratkotrajna pasterizacija, visoko kratkotrajna pasterizacija i ultrapasterizacija. Niska dugotrajna pasterizacija se uglavnom ne primjenjuje jer dugo traje, srednje kratkotrajna pasterizacija se primjenjuje u proizvodnji konzumnog pasteriziranog mlijeka, visoka pasterizacija se provodi uglavnom za pasterizaciju vrhnja, dok se ultrapasterizacija provodi kada je potrebno dobiti poseban rok trajanja (Ban, 2016).

Toplina može uzrokovati određene reverzibilne i ireverzibilne promjene u mlijeku što ovisi o samom intenzitetu djelovanja topline kao i o vrsti procesa. Tijekom toplinskog tretmana može doći do malih neznatnih promjena u pH vrijednosti mlijeka, promjena u količini laktoze kao i količini mineralnih tvari. Osim toga, može doći do denaturacije proteina sirutke, gubitka lizina i drugih vitamina, a samim time i do promjene hranjive vrijednosti mlijeka (Milić, 2021). Osim promjena na laktozi, dolazi do stvaranja laktuloze, te odvijanja Maillardovih reakcija, odnosno reakcija neenzimskog posmeđivanja. Kao produkt takvih reakcija, nastaju „melanoidni pigmenti“ koji su odgovorni za pojavu smeđe boje mlijeka, te hidrosimetilfurfural (HMF) koji daje trpki okus mlijeka. Upravo HMF predstavlja jedan od najčešćih parametara za određivanje toplinske obrade mlijeka (Francisquini i sur., 2018).

Intenzitet nastajanja navedenih promjena u mlijeku ovisi o sastavu i kvaliteti mlijeka, intenzitetu topline i njegovom trajanju, pH vrijednosti i udjelu kisika u mlijeku, kao i mikrobiološkoj stabilnosti mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIRs*) predstavlja jednostavnu brzu tehniku koja se primjenjuje za određivanje kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika složene emulzije kao što je mlijeko. Također, Aernouts i sur. (2011) navode kako se odvajanje faza, stabilnost i kvaliteta mlijeka mogu pratiti pomoću NIR spektroskopije.

Važno je naglasiti da se djelovanjem topline neke od funkcionalnih komponenti u mlijeku magarice ireverzibilno oštećuju, te se stoga mlijeko magarice toplinski ne obrađuje. Upravo je i cilj ovoga rada istražiti kako različiti režimi toplinske obrade utječu na kvalitetu mlijeka magarice.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Pri izradi diplomskog rada korišteno je svježe sirovo mlijeko magarice s OPG-a Cvetan Mladen (Jastrebarsko, Hrvatska), tretirano na različitim temperaturnim režimima.

Kemikalije korištene prilikom određivanja ukupnog i slobodnog HMF- a:

0,3 N oksalna kiselina (Gram-Mol, Hrvatska)

40 % trikloroetena kiselina (TCA, Fisher-Scientific, UK)

0,05 M TBA (2- tiobarbiturna kiselina, Alfa Aesar, UK)

Standard HMF: (5-hidroksimetil-2-furaldehid, 5-(hidroksimetil)furfural, 5-hidroksimetil-2-furankarboksaldehid (Sigma-Aldrich, Njemačka): Pripremljene su otopine koncentracije od 5 do 10  $\mu$ M.

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom:

$6,0 \cdot 10^5$  mol/L (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 % etanolu

95 % etanol: u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano je 1,041 mL 96 % etanola (Kefo, Hrvatska) i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom:

0,3 M acetatni pufer (A) (Gram-Mol, Hrvatska)

10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljen u 40 mmol HCl (klorodvodične kiseline) (B) (Kefo, Hrvatska)

20 mmol željezo (III)- klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) (C) (Lach-Ner, Hrvatska)

FRAP reagens (sastoji se od 0,3 M acetatnog pufera (A), 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol HCl (B) i 20 mmol  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (C) u omjeru 10:1:1 v/v (A:B:C)

Standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD): Pripremljena je početna (stock) otopina Trolox-a

koncentracije 2 mM. Odvagnuto je 0,0501 g Trolox-a u plastičnu laduicu i kvantitativno preneseno s 2 mL 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu volumena 0,1 L te se ostatak nadopunio destiliranom vodom do oznake. Radi homogenizacije tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 5 min. Od „stock“ otopine su pripravljena odgovarajuća razrjeđenja koncentracije 20, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{M}$ . Sve otopine su pripravljene neposredno prije uporabe i zaštićene od utjecaja svjetlosti omatanjem tikvice aluminijskom folijom.

Kemikalije korištene za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin-Ciocalteu:

Folin Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, Njemačka) razrjeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10

7,5 % (w/v) natrijev karbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Gram-Mol, Hrvatska)

Standard galne kiseline (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD). Za izradu baždarnog pravca korišten je standard galne kiseline (GAL) početne koncentracije 125 mg/L od koje su pripravljena točno određena razrjeđenja kako bi se dobile koncentracije od 25,50,75,100 i 125 mg/L.

Kemikalije korištene za određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahu:

$\text{H}_2\text{SO}_4$  (Gram-Mol, Hrvatska)

40 %-tna NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)

4 %-H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (T.T.T, Hrvatska)

0,1 M titrival HCl (Gram-Mol, Hrvatska)

Metil-crveno (Lach-Ner, Hrvatska)

Bromkrezol zeleno (Alfa Aesar, SAD)

Kjeldahlove tablete (Roth, Njemačka)

Kemikalije korištene za određivanje udjela laktoze metodom po Loof-Schoorlu:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Gram-Mol, Hrvatska)

Limunska kiselina (T.T.T, Hrvatska)

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (Gram-Mol, Hrvatska)

Navedene kemikalije iskorištene su za pripremu Luffove otopine koja se pripremila na način da je 25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  otopljeno u 100 mL destilirane vode, 50 g limunske kiseline otopljeno je u 50 mL destilirane vode, a 388 g kristalnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  u 400 mL tople destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 1 L, redom su dodane otopine natrijevog karbonata, limunske kiseline te bakrovog (II) sulfata te je ostatak do oznake nadopunjen destiliranom vodom.

0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Gram-Mol, Hrvatska)

20 % otopina kalijevog jodida (Lach-Ner, Hrvatska)

25 % otopina sumporne kiseline (Gram-Mol, Hrvatska)

2 % otopina škroba (Gram-Mol, Hrvatska)

### 3.2. METODE

Svježe sirovo mlijeko magarice zagrijavano je na četiri različita temperaturna režima prikazana u tablici 3. Mlijeko je razdijeljeno u volumene od po 40 mL i zagrijavano na temperaturu od 63-65 °C kroz 15 sek, 72 °C kroz 20 sek, 90-95 °C kroz 5-10 min, te na 116 °C u autoklavu stimulirajući šaržnu sterilizaciju. Nakon zagrijavanja mlijeka na navedenu temperaturu, uzorak je brzo ohlađen pod mlazom hladne vode.

**Tablica 3.** Prikaz različitih temperaturnih režima primijenjen na mlijeko magarice (Bylund, 2003; Morales i sur., 1996)

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme
63/15 sek	63-65	15 sek
72/20 sek	72	20 sek
90/5 min	90-95	5-10 min
116/15 min	116	15 min

#### 3.2.1. Određivanje pH vrijednosti mlijeka magarice

pH vrijednost se izražava koncentracijom vodikovih iona ili vrijednošću pH koja se odnosi na negativan logaritam koncentracije vodikovih iona (Čuklić, 2014).

Za mjerenje pH vrijednosti korišten je laboratorijski pH metar (WTW- ProfiLine pH 3110 tvrtke Xylem Analytics (Weitheim, Njemačka)). Prije samog mjerenja elektroda pH metra se

mora kalibrirati tako da se uroni u otopinu standarda poznate pH vrijednosti, a nakon toga elektroda se ispere destiliranom vodom i osuši staničevinom. Nakon toga, elektroda se uroni u čašu s uzorokom mlijeka magarice, pričekava se trenutak dok se vrijednost ne ustali, te nakon toga se očitava pH vrijednost na zaslonu uređaja. Nakon završenog mjerenja, elektroda se ispere destiliranom vodom, obriše staničevinom i uroni u otopinu kalijeva klorida gdje se čuva do sljedećeg mjerenja (Božanić i sur., 2010).

### 3.2.2. Određivanje mliječne masti metodom po Gerberu

Metoda se temelji na kemijskom otapanju kazeina i zaštitne opne kuglica mliječne masti dodatkom sumporne kiseline. Kako bi došlo do lakšeg odvajanja mliječne masti, dodaje se izoamilni alkohol koji snižava površinsku napetost mlijeka. Mliječna mast se odvaja centrifugiranjem, a količina se očitava na skali butirometra pri određenoj temperaturi (Božanić i sur., 2010).

#### *Postupak*

U butirometar je dodana sumporna kiselina, uzorak mlijeka te izoamilni alkohol. Zatvori se butirometar i snažno protrese. Nakon toga se butirometar stavlja u vodenu kupelj (65 °C/5 min) kako bi se podigla mliječna mast u vrat butirometra, nakon čega se briše i stavlja u centrifugu (1100 okr/5 min), te nakon toga u vodenu kupelj 5 minuta. Udio mliječne masti se očitava na skali vrata butirometra gdje volumen masti odgovara postotku mliječne masti (%).

### 3.2.3. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahu

Metoda određivanja udjela proteina po Kjeldahu se temelji na tretiranju uzoraka mlijeka koncentriranom sumpornom kiselinom, kalijevim jodidom i bakrovim (II) sulfatom kao katalizatorom čime se prevodi dušik u amonijev sulfat. Nakon toga, dolazi do oslobađanja amonijaka dodatkom natrijeva hidroksida, nakon čega se amonijak destilira u otopinu borne kiseline koja se tretira kiselom otopinom.

#### *Postupak*

##### *Spaljivanje*

Spaljivanje je provođeno na bloku za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska) smještenom u digestoru (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska). Odvagne se 1 g (s točnošću  $\pm 0,0001$  g) homogeniziranog uzorka i prebaci u kivetu od 500 mL, pazeći da grlo kivete ostane

čisto. Nakon toga je dodano 12 mL koncentrirane sumporne kiseline te dvije Kjeldah tablete kao katalizator. Kiveta se u digestoru zagrijava u bloku za spaljivanje. Zagrijava se polagano, a nakon što se reakcija smiri grije se jače. Spaljivanje je završeno kada ostane bistra plavo-zelena tekućina bez krutih crnih komadića uzorka. Nakon što se sadržaj u kivetu ohladi, razrijedi se destiliranom vodom, te se postavlja u Kjeltex i Destiling sustav za destilaciju.

### Destilacija

Destilacija se provodi u Kjeltex i Destiling Unit sustavu koji automatski vrši postupak destilacije. Na postolje destilacijske jedinice stavi se Erlenmeyerova tikvica u koju je otpipetirano 25 mL 4 %-tne borne kiseline, te se postavi u gornji položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova kiveta se stavi na svoje mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Nakon toga, dozira se 70 mL 40 % NaOH u Kjeldahlovu kivetu. Postupak destilacije traje 4 minute, a dobiveni destilat je zelene boje što je posljedica prisustva amonijaka. Destilat mora biti hlađen da ne bi došlo do gubitka amonijaka.

### Titracija

Titracija se provodi direktno u prihvatnoj tikvici s 0,1 M HCl, a gotova je kada boja otopine postane ružičasta. Isti postupak provodi se i za „slijepu probu“, u kojem se nalaze svi reagensi osim uzorka.

Izračun :

$$\% N = (V - V_s) * c(\text{HCl}) * 14,007 * 100 / m(\text{uzorak}) \text{ [mg]} \quad [1]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N * F \quad [2]$$

gdje je:

V- utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju uzorka

V<sub>s</sub> - utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju slijepa probe

N- postotak dušika

m- masa uzorka [mg]

F- faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode)

#### 3.2.4. Određivanje udjela laktoze metodom po Loof- Schoorlu

Laktoza je reducirajući ugljikohidrat koji zbog slobodne aldehidne odnosno keto skupine ima sposobnost redukcije metala iz alkilnih otopina njihovih soli (Luffova otopina). Kao posljedica toga, nastaje netopljivi crveno-smeđi talog bakrovog (I) oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Nakon što je nastao talog, količina laktoze se može odrediti titracijom suviška nereduciranih iona bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ili titracijom istaloženog i otopljenog bakrenog (I) oksida. Dodatkom otopine kalijevog jodida u suvišku, dolazi do reakcije joda i suviška bakrovih iona pri čemu se oslobađa molekularni jod. Molekularni jod se titrira otopinom natrijevog tiosulfata uz dodatak škroba kao indikatora (Božanić i sur., 2010).

##### Postupak

U tikvicu s brušenim grlom dodano je 1 mL uzorka mlijeka, 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključila na povratno hladilo i lagano kuhala točno 10 minuta. Vrijeme se mjeri nakon što prva kap padne u tikvicu. Tikvica se ohladi pod mlazom hladne vode, te je dodano 15 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida i 25 mL 25 %-tne otopine sulfatne kiseline uz miješanje. Izlučeni jod titriran je s 0,1 mol/L natrijevim tiosulfatom toliko dugo dok boja uzorka nije prešla žutu boju. Nakon toga je dodano 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i nastavljena je titracija natrijevim tiosulfatom sve dok boja nije prešla iz tamnoplave u žutu koja treba biti stabilna nekoliko minuta. Određena je i slijepa proba, gdje je umjesto uzorka dodano 1 mL destilirane vode, a ostatak je napravljen isto kao i s uzorkom. U izračun je uzet ukupan broj utrošenih mL natrijeva tiosulfata iz obje titracije (Božanić i sur., 2010).

Izračun:

Utrošak mL 0,1 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za slijepu probu –  $x$

Utrošak mL 0,1 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za uzorak –  $y$

$$(x - y) * f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = z \text{ mL } 0,1 \text{ mol/L } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [3]$$

Iz tablice 4 se za  $z$  mL  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  očitaju mg maltoze u 1 mL uzorka.

**Tablica 4. Izračun šećera metodom po Loof- Schorlu**

0,1 N-tiosulfat mL	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Laktoza		Maltoza	
	mg	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	3,9
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

### 3.2.5. Određivanje indeksa boje

Najčešće korištena metoda za određivanje boje je CIELAB metoda gdje se boja mjeri u trodimenzionalnom sustavu ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) pomoću kolorimetra CM- 350d (Konica Minolta, Japan). Dobivene vrijednosti izražavaju se u  $L^*a^*b^*$  vrijednostima, gdje  $L$  predstavlja svjetlinu odnosno skalu sive boje (vrijednost 0 predstavlja crnu boju, a vrijednost 100 bijelu boju),  $a^*$  vrijednost ima raspon od -100 do +100 gdje -100 predstavlja zelenu boju, a približavanje vrijednosti +100 znači da se približavamo crvenoj boji. Vrijednost  $b^*$  također ima vrijednost od -100 do +100, pri čemu -100 označava plavu boju, a +100 žutu boju. Pomoću navedenih vrijednosti ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) može se dobiti ukupna promjena boje (Lović, 2018).

Određivanje boje mlijeka magarice izmjereno je na uređaju PCE-CSM3 kolorimetru (PCE Instruments, Njemačka) prikazanom na slici 1.

Kako bi se dobio izračun promjene boje kod različitih uzoraka mlijeka koristi se vrijednost  $\Delta E^*$ , koja prikazuje kolika je promjena boje u odnosu na sirovo mlijeko (Milić, 2021);

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{\text{ref}}^*)^2 + (a^* - a_{\text{ref}}^*)^2 + (b^* - b_{\text{ref}}^*)^2} \quad [4]$$

gdje je:

$L^*$  - svjetlina boje ispitivanog uzorka u CIELab prostoru boja

$L_{\text{ref}}^*$  - svjetlina boje referentnog sirovog uzorka mlijeka

$a^*$ - parametar boje tretiranog uzorka mlijeka

$a_{\text{ref}}^*$  - parametar boje referentnog sirovog uzorka mlijeka

$b^*$ - parametar boje tretiranog uzorka mlijeka

$b_{\text{ref}}^*$  - parametar boje referentnog sirovog uzorka mlijeka

Pri čemu je značenje promjene boje ( $\Delta E^*$ ) prikazano u tablici 5.



**Tablica 5.** Značenje promjene boje (Mokrzycki i Tatol, 2011)

$\Delta E^*$	Značenje
$0 < \Delta E^* < 1$	Promatrač ne vidi razliku
$1 < \Delta E^* < 2$	Razliku primjećuje iskusni promatrač
$2 < \Delta E^* < 3,5$	Razliku primjećuje i neiskusni promatrač
$3,5 < \Delta E^* < 5$	Jasno uočljiva razlika boja
$5 < \Delta E^*$	Promatrač uočava dvije različite boje



**Slika 1.** Prikaz kolorimetra PCE-CSM3 (PCE Instruments, Njemačka) za mjerenje parametra boje (vlastita fotografija)

### 3.2.6. Određivanje ukupnog i slobodnog HMF-a

HMF (hidroksimetilfufural) je ciklički aldehid koji nastaje dehidracijom fruktoze i glukoze u kiselom mediju. HMF može nastati i u Maillardovim reakcijama (Vidaković, 2016). Ukupni HMF predstavlja zbroj prekursora HMF-a i slobodnog HMF-a (Francisquini i sur., 2018).

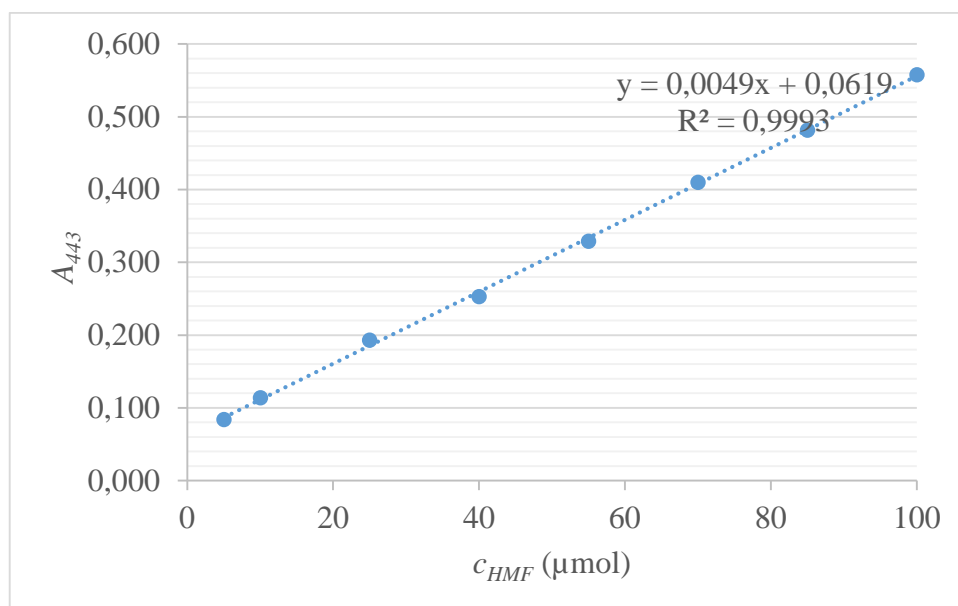
#### *Mjerenje slobodnog HMF-a*

10 mL svakog od prethodno tretiranih uzorka pomiješa se s 5 mL 0,3 N oksalne kiseline i nakon toga doda se 5 mL 40 % trikloroctene kiseline. Dobivena otopina filtrira se kroz Whatmann filter papir br. 42. Uzme se 4 mL dobivenog filtrata i inkubira na 40 °C kroz 30 minuta uz dodatak 1 mL 0,05 M tiobarbiturne kiseline. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 443 nm u odnosu na slijepu probu koja sadržava sve navedeno, samo je umjesto uzorka destilirana voda (Francisquini i sur., 2018).

#### *Mjerenje ukupnog HMF-a*

10 mL svakog od prethodno tretiranih uzoraka pomiješa se s 5 mL 0,3 N oksalne kiseline i kuha na 100 °C/1 h. Nakon toga se naglo hladi i deprotenizira s 5 mL 40 % (w/v) trikloroctene kiseline, te filtrira uz pomoć Whatmann filter papira br. 42. Uzme se 4 mL dobivenog filtrata i inkubira na 40 °C kroz 30 minuta uz dodatak 1 mL 0,05 M tiobarbiturne kiseline. Nakon toga, mjeri se apsorbancija pri 443 nm u odnosu na slijepu probu koja sadržava sve navedeno, samo umjesto uzorka dodana je destilirana voda (Morales i sur., 1996).

Za određivanje udjela HMF-a potrebno je napraviti baždarni dijagram. Na slici 2 je prikazan baždarni dijagram za kojeg su korištene otopine standarda različite koncentracije HMF-a, od 5-10 µm. Koncentracije standarda izmjerene su pri valnoj duljini od 443 nm, a na temelju dobivenih vrijednosti izrađen je baždarni dijagram, te dobivena jednadžba pravca pomoću kojeg su izračunate vrijednosti za uzorak mlijeka magarice (Morales i sur., 1996).



**Slika 2.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 443 nm ( $A_{443}$ ) o koncentraciji HMF-a ( $\mu\text{M}$ )

3.2.7. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te za određivanje udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

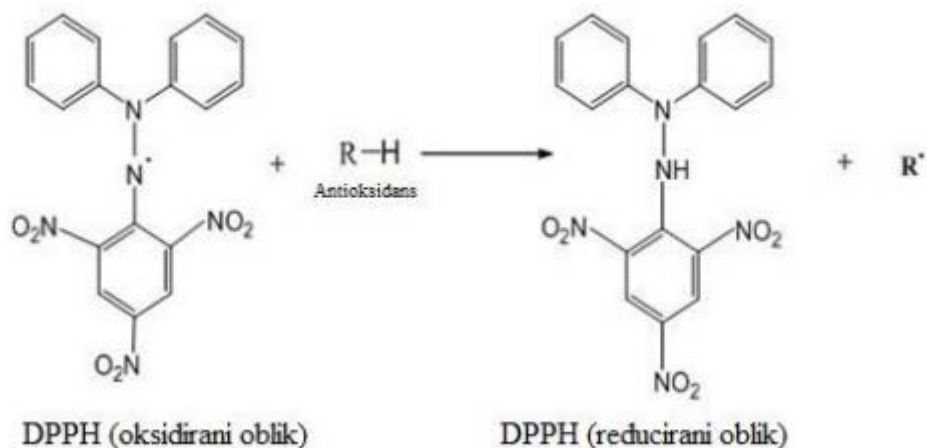
1g tretiranog mlijeka pomiješan je s 10 mL 1M HCl ranije pripremljenog u 95 % etanolu (v/v, 15/85). Tako dobivena smjesa inkubirala se na temperaturi od 30 °C u trajanju od jednog sata, uz uključenu tresilicu u vodenoj kupelji. Potom se smjesa centrifugirala na 7800 g, na temperaturi od 5 °C u tajanju od 15 minuta. Tako dobiveni supernatant čuva se u zamrzivaču na – 20 °C do daljnje uporabe (Alyaqoubi i sur., 2014).

3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je brza, jednostavna i često korištena metoda za određivanje sposobnosti spojeva da djeluju kao „hvatači“ slobodnih radikala ili donor vodika (Škarić, 2021). Često se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti jer dobro simulira reaktivne kisikove i dušikove oblike koji se nalaze u biološkim sustavima.

DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ) daje stabilne radikalne ione, a u metanolu daju ljubičasto obojenje. Apsorbira svjetlost valne duljine od 515 nm. Ion DPPH prilikom primanja protona od strane antioksidansa, reducira iz  $\text{DPPH}\cdot$  u  $\text{DPPH}_2$  pri čemu ljubičasto obojenje prelazi u žuto i dolazi do smanjenja apsorbancije pri 515 nm (slika 3). Ta promjena intenziteta boje mjeri se spektrofotometrijski i služi za određivanje količine reduciranog DPPH (Štolar, 2017).

Reakcija uzorka s DPPH se provodi u metanolu/vodi čime se olakšava ekstrakcija spojeva koji su odgovorni za antioksidacijsku aktivnost, a rezultati se mogu uspoređivati sa rezultatima dobiveni ostalim metodama određivanja antioksidacijske aktivnosti.



**Slika 3.** Prikaz redukcije DPPH (Štoler, 2017)

#### *Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom*

0,1 mL uzorka pomiješa se s 3,9 mL DPPH, ostavi na mračnom mjestu pri sobnoj temperaturi 30 min, te nakon toga očita se apsorbancija na 517 nm. Slijepa proba sadržava sve, samo umjesto uzorka sadrži 95 % etanol. Za svaki uzorak mlijeka izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja, a rezultati su izraženi kao mg Trolox ekvivalenta/mL. Izračun se provodi pomoću izraza:

$$\% \text{ DPPH redukcije potencijala} = (A_0 - A_S)/A_0 * 100 \quad [5]$$

gdje je

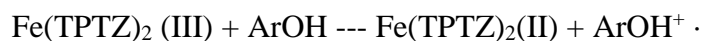
$A_0$  apsorbancija za slijepu probu izmjerena na valnoj duljini od 517 nm

$A_S$  apsorbancija uzorka izmjerena na valnoj duljini od 517 nm

#### 3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP je brza i jednostavna kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Metoda se temelji na prijenosu elektrona između kompleksa željeza i TPTZ-a (2,4,6-Tris (2-piridil)-1,3,5-triazin) i molekule donora elektrona ArOH.

Prikaz reakcije:



Prilikom reakcije dolazi do promjene boje otopine  $\text{Fe}^{3+}$  s TPTZ-om u plavu i pritom apsorbira zračenje valne duljine 593 nm. Metoda se koristi pri kiselim uvjetima, gdje pH iznosi 3,6 kako bi se održala dobra topivost željeza. Pri takvim uvjetima smanjuje se ionizacijski potencijal, a povećava se redoks potencijal koji će omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal  $\text{Fe(III)/Fe(II)}$  iznosi 0,77 V, te će svi spojevi koji imaju niži redoks potencijal ulaziti u reakciju redukcije željeza i tako utjecati na konačni rezultat antioksidacijskog kapaciteta. U FRAP metodi rezultati prikazuju linearnost u širokom području dok su reproducibilnost i osjetljivost visoki (Štoler, 2017).

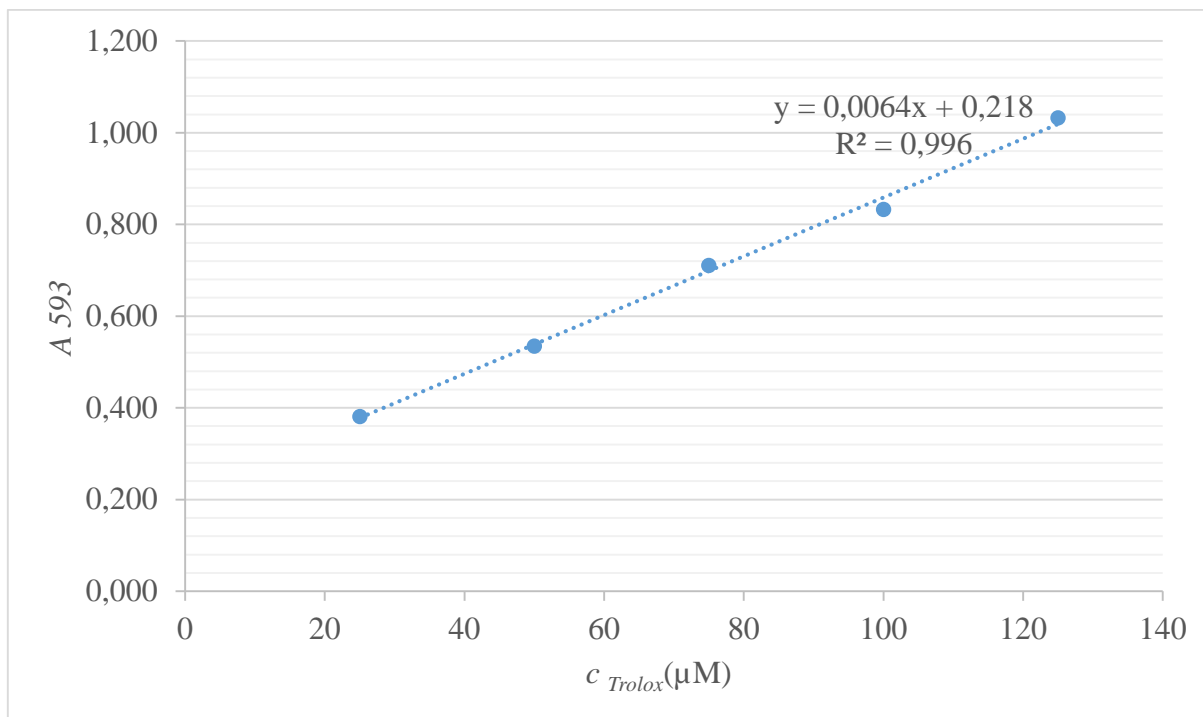
Za FRAP metodu kemikalije i reagensi se pripremaju prema Benzie i Stran-u (1996). Prije svakog mjerenja pripremljen je svježi FRAP reagens koji se sastoji od 0,3 M acetatnog pufera (A), 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol (HCl) (B) i 20 mmol  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (C) u omjeru 10:1:1 v/v (A:B:C).

Pripremljeni FRAP reagens se inkubira na 37 °C kroz 30 min. Nakon toga se pomiješa sa 0,6 mL prethodno dobivenog ekstrakta i 3,4 mL FRAP reagensa. Takva smjesa se inkubira na 37 °C/60 min i nakon toga se očitava apsorbancija na 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto čega se koristi 1N HCl pripremljen u 95 % etanolu (v/v, 15/85) (Sangsopha i sur., 2019). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja, a rezultati se izražavaju kao mg Trolox ekvivalenta/mL, te je potrebno napraviti baždarni dijagram.

#### *Izrada baždarnog dijagrama za FRAP metodu*

Za izradu baždarnog dijagrama (slika 4) korištena je standardna otopina Trolox-a početne koncentracije 2 mmol/L od kojeg su pripremljena razrjeđenja koncentracije 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{M}$ . 0,6 mL otopine Trolox-a poznate koncentracije dodavano je u reakcijsku smjesu umjesto ekstrakta uzorka, pri čemu su rezultati izraženi kao mg Trolox ekvivalenta/mL, (Sangsopha i sur., 2019), a za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopine Trolox-a nacrtat će se baždarni dijagram pomoću programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije Trolox ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati.



**Slika 4.** Prikaz baždarnog dijagrama; ovisnosti apsorbancije pri 593 nm ( $A_{593}$ ) o koncentraciji Trolox-a ( $\mu\text{M}$ )

### 3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih fenola s reagensom Folin Ciocalteau

Fenolni spojevi imaju hidroksilnu skupinu vezanu na benzenski ili aromatski prsten uz prisutnost drugih supstituenata. Prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide, a najčešća metoda koja se koristi prilikom određivanja fenolnih spojeva je spektrofotometrijska. Za određivanje ukupnih fenola najčešća metoda je s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforwolframove i fofomolibdenske kiseline (Lovrić, 2018). Dolazi do oksido-redukcijskih procesa između hidroksilnih skupina fenolnih spojeva i Folin-Ciocalteu reagensa, te kompleksnog iona molibdena i wolframa. Reakcija se odvija u lužnatom mediju dodatkom natrijevog karbonata u reakcijsku smjesu. Najprije dolazi do deprotonacije hidroksilnih skupina fenolnih spojeva, koji se onda oksidiraju Folin-Ciocalteu reagensom uz njegovu redukciju, a kao posljedica dolazi do promjene boje iz žute u plavu (Kovačić, 2020).

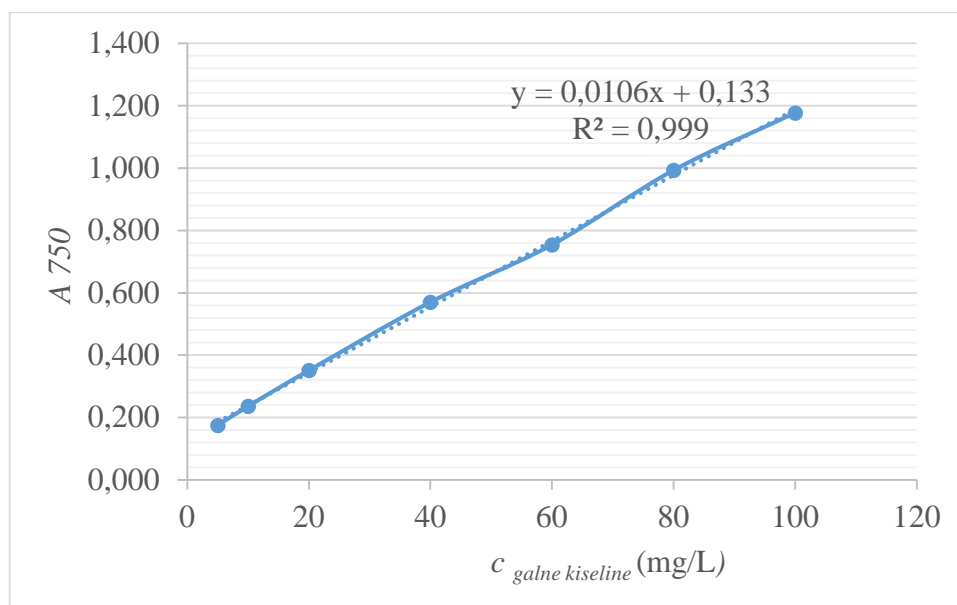
#### *Određivanje ukupnih fenola reagensom Folin-Ciocalteu*

U epruvetu je potrebno dodati 0,4 mL prethodno dobivenog ekstrakta, 1,6 mL pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa, ostaviti 5 minuta te dodati 2 mL natrijevog karbonata. Tako

dobivena smjesa se homogenizira na vortex mješalici i ostavi inkubirati 2 h na sobnoj temperaturi u mračnom mjestu. Nakon inkubacije očita se apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 750 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka, umjesto kojeg je dodana voda.

Potrebno je napraviti baždarni dijagram, a dobiveni rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline/mL.

#### *Izrada baždarnog dijagrama*



**Slika 5.** Prikaz baždarnog dijagrama za metodu s Folin –Ciocalteu reagensom

Baždarni dijagram (slika 5) je dobiven uz pomoć standarda galne kiseline (GAL) početne koncentracije 125 mg/L od koje su pripremljena razrjeđenja poznate koncentracije; 25, 50, 75, 100 i 125 mg/L. Umjesto ekstrakta dodavano je 0,4 mL galne kiseline određene koncentracije zajedno sa 1,6 mL Folin Ciocalteu reagensa, te nakon 5 minuta dodano je 2 mL natrijevog karbonata. Inkubirano je 2h na sobnoj temperaturi te očitana apsorbancija na spektrofotometru pri 750 nm. Na temelju dobivenih vrijednosti izrađen je baždarni dijagram, te je dobivena jednadžba pravca uz pomoć koje su izračunati udjeli ukupnih fenola u uzorcima mlijeka magarice. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pri čemu se na apscisi nanese koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 750 nm.

3.2.11. Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) u mlijeku magarice  
Ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*) i električna vodljivost mjere se pomoću konduktometra (TDS/Conductivity/°C meter with RS-232 CON 200 series, Oacton, Singapur)

tako što se sonda uređaja uroni u uzorak koji je prethodno razrijeđen destiliranom vodom deset puta, te se očitaju vrijednosti prikazane na uređaju, a izražene su u  $\mu\text{S}/\text{cm}$  za električnu vodljivost, dok su vrijednosti otopljenih tvari izražene kao  $\text{mg}/\text{L}$ . Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja (Milić, 2021).

### 3.2.12. Snimanje spektra u blisko infracrvenom području (NIR spektra) na uzorku mlijeka magarice

Vibracijska spektroskopija u infracrvenom području se temelji na sposobnosti molekula da apsorbiraju zračenje one valne duljine koja odgovara energiji koja je potrebna za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razine. Neka molekula može apsorbirati zračenje samo ako tijekom vibracije dolazi do promjene dipolnog momenta. Atom vodika ima najjače vibracije jer mu je masa mala, te zbog toga glavne vrpce NIR spektra odgovaraju upravo vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome kao što je C- H, N- H, O- H I S- H (Pavlinić, 2018).

Uzorci mlijeka magarice razrijeđeni su 10 puta destiliranom vodom, a kontinuirani NIR spektri svih pripremljenih uzoraka snimljeni su u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm na NIR spektrometru Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  s instaliranim Control Development softverom SPEC 32. Uzorci su snimani u kivetama koje su se pozicionirale u postolje za snimanje tekućih uzoraka. Za svaki uzorak su snimljena tri spektra te se kao rezultat uzimala njihova srednja vrijednost.

### 3.2.13. Raspodjela veličine čestica

Distribucija veličine čestica određivana je pomoću Zetasizer UltraNano ZS (Malvern Panalytical Ltd, United Kingdom) uređaja, a podaci su obrađeni programom Zetasizer Ultra-Pro ZS Xplorer. To je neinvazivna metoda koja se temelji na principu dinamičkog raspršenja svjetlosti, a koristi se za mjerenje veličine čestica i molekula u disperziji. Metoda se temelji na Brownovom gibanju koji označava nasumično gibanje čestica kao posljedica sudara s molekulama otapala (Pezo, 2018).

Dinamičko raspršenje svjetlosti upravo mjeri brzinu Brownovog gibanja na koju utječu veličina čestice, viskoznost uzorka, te temperatura. Prema Stokes-Einstein relaciji brzina Brownovog gibanja je određena translacijskim difuzijskim koeficijentom (Šafarik, 2018).

Komponente DLS sustava su:



- Izvor svjetlosti koji je najčešće laser
- Čelija za uzorak (najčešće kiveta) sa termostatom
- Detektor (fotomultiplikatorska cijev ili alavanche photo diode), te povezana optika
- Harward komponentne koje su povezane na detektor, a koriste se za obradu signala (Šafarik, 2018).

Veličina čestica i temperatura utječu na brzinu gibanja; što je veličina čestica manja one će se gibati brže, dok će se veće čestice gibati sporije, a povećanjem temperature brzina gibanja čestica se povećava.

Uređaj za mjerenje distribucije veličine čestica radi na principu da čestice obasijava monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, a nastalo raspršeno zračenje pada na detektor. U principu se mjeri stupanj fluktuacije intenziteta raspršenog zračenja koji će pokazivati uzorak s obzirom na konstruktivnu odnosno destruktivnu interferenciju raspršenog zračenja čestica (Pezo, 2018).

U radu je korišten instrument Zetasizer Nano ZS Malvern koji ima zeleni laser (512 nm), te je određen intenzitet pojave čestica određene veličine u uzorku izražen u postotku (%).

#### 3.2.14. Natrij dodecil sulfat- poliakrilamidna gel elektroforeza proteina (SDS PAGE)

Poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata je jednostavna tehnika koja se često koristi za dokazivanje patvorenja mlijeka, ali i kod određivanja stupnja denaturacije proteinskih frakcija u mlijeku do koje dolazi prilikom tretiranja mlijeka različitim temperaturnim režimima (Miletić, 2022). Natrij dodecil sulfat je jako denaturirajuće sredstvo koje se veže na polipeptidne lance i uzrokuje cijepanje intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza. Kao rezultat toga, poništavaju se hidrofobne interakcije i odmotavaju polipeptidni lanci. Na takve polipeptidne lance se veže SDS, te nastaje kompleks negativnog električnog naboja koji migrira prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Razdvajanje makromolekula temelji se na relativnoj molekulskoj masi (Milić, 2021).

#### Priprema kemikalija i reagensa za analizu

U 15  $\mu$ L uzorka mlijeka dodano je 15  $\mu$ L 2 x koncentriranog Leammli pufera (sastoji se od 1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL SDS (10 % (w/v)), 2 mL glicerol (100 % (v/v)), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo i 0,2 mL  $\beta$ -merkaptioetanol) te prokuha 150 sek. Iz 10 %-tnog

poliakrilamidnog gela izvađen je češljic i pripremljena aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu je stavljeno 400 mL pufera za elektroforezu (1x), a nakon što je završeno kuhanje 20  $\mu$ L uzorka je pomoću Hamilton igle nanešeno na 10 %-tni poliakrilamidni gel.

Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu uz napon od 190 V kroz 45 minuta. Tijekom elektroforetskog razdvajanja korišten je standard ProSieve QuadColor Protein Marker, koji sadrži proteine poznate molekulske mase (4,6-315 kDa). Nakon završene elektroforeze gel je inkubiran u otopinu za bojanje (0,02 % Commassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) u vremenskom periodu od dva sata, a nakon toga u otopinu octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine (Milić, 2021).

#### Priprema 10 %-tnog poliakrilamidnog gela

Gel za razdvajanje (donji gel):

- Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 8,8 2,5 mL
- 30 % akrilamid 3,0 ml
- Destilirana voda 2,5 mL
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) 5,0  $\mu$ L
- 10 % APS (amonijev persulfat) 38,0  $\mu$ L

Gel za sabijanje (gornji gel)

- Tris (hidroksimetil aminometan)- HCl pufer, pH 6,8 2,13 mL
- 30 % akrilamid 0,3 mL
- TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletildiamin) 5,0  $\mu$ L
- 10 % APS 22,5  $\mu$ L

Nakon dodavanja TEMED-a u smjesu, gel za razdvajanje se izlije u kalup između dva stakalca, doda se izopropanol, te se gel ravnomjerno rasporedi i ostavi da se polimerizira tijekom 45 minuta. Izopropanol se ukloni pomoću filter papira, a u kalup se doda gel za sabijanje u koju se uroni češljic za stavranje jažica gela i ostavi se da se polimerizira.

Priprema pufera za elektroforezu (10 x koncentrirana otopina)

- Tris 3,0 g
- Glicin 14,4 g

- SDS 1,0 g
- Te do 100 mL nadopunjeno vodom.

### 3.2.15. Obrada podataka

Svi rezultati u ovom radu obrađeni su u računalnom programu Microsoft Excel (2013 godina, verzija 15), a izraženi su kao srednja vrijednost dva mjerenja uz standardnu devijaciju.

Analiza glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*) je metoda multivarijantne statističke analize koja se koristi u obradi NIR spektra kako bi se smanjila dimenzionalnost skupa podataka. NIR spektar daje veliku količinu podataka o jednom uzorku te je stoga razvijena PCA analiza koja prepoznaje i izdvaja najvažnije podatke iz izmjerenih spektara i kao rezultat daje manju količinu podataka. Primjena je ponajviše u kvalitativnoj analizi za prepoznavanje uzoraka u skupu podataka, grupiranju podataka i u konačnici u procjeni strukture podataka (Pavlinić, 2018).

Podaci se prikazuju u n-dimenzionalnom prostoru gdje svaka točka predstavlja apsorbanciju NIR zračenja pri nekoj valnoj duljini. Uz pomoć PCA metode mogu se formirati nove varijable koje se nazivaju glavnim komponentama, a nastaju linearnim kombinacijama izvornih varijabli. Prva glavna komponenta predstavlja najveću varijabilnost u podacima, a svaka sljedeća komponenta je ortogonalna projekcija u odnosu na prethodnu i predstavlja sljedeću najveću varijaciju u podacima (Pavlinić, 2021).

PCA analiza omogućuje procjenu strukture podataka prije same analize fizikalno-kemijskih parametara, a obrada podataka provedena je u programskom paketu Statistica 14.0 (TIBCO®, Statistica SAD).

## 4.REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada je bio odrediti kako različiti režimi toplinske obrade utječu na kvalitetu mlijeka magarice na način da je praćeno:

- Formiranje ukupnog i slobodnog HMF-a (slika 6)
- Antioksidacijska aktivnost (metoda DPPH, FRAP metoda) (slika 7 i slika 8)
- Koncentracija ukupnih fenola (slika 9)
- Elektrićnu vodljivost i ukupne otopljene tvari (tablica 9)
- Promjena boje mlijeka (tablica 8)
- Distribucija velićine ćestica (slika 12)

### 4.1. SASTAV MLIJEKA MAGARICE

U tablici 6 su prikazani fizikalno-kemijski parametri sirovog mlijeka. Dobivena vrijednost je srednja vrijednost dva mjerenja uz standardnu devijaciju.

**Tablica 6.** Fizikalno – kemijski parametri sirovog mlijeka magarice

Parametar	Sirovo mlijeko magarice
pH	7,35±0,08
Laktoza (%)	4,03±0,00
Mlijećna mast (%)	0,1
Proteini (%)	1,60±0,08
Elektrićna vodljivost (µs/cm)	335,75±14,75
TDS (mg/L)	168,13±4,38

TDS-ukupne otopljene tvari

pH sirovog mlijeka magarice iznosila je 7,35±0,08 pH jedinica što je u skladu sa vrijednostima navedenim u literaturi (Božanić i sur., 2018) prema kojoj se prosjećna pH vrijednost mlijeka magarice kreće u rasponu 6,6-7,6. Općenito mlijeko magarica ima nešto viši pH u odnosu na kravljje mlijeko koji ima niži pH zbog većeg udjela soli i kazeina (Kostić, 2015).

Mlijeko magarice ima nizak udio mlijećne masti, a u skladu s time i nisku energetsku vrijednost. Razna istraživanja pokazala su kako je udio mlijećne masti izrazito promjenjiv (0,20-1,82 %), a ovisi o dobu dana, vrsti pasmine, načinu hranidbe, načinu mužnje, te opada tijekom perioda laktacije (Božanić i sur., 2018). Udio mlijećne masti u uzorku mlijeka magarice iznosi 0,1 %

što je nešto niže u odnosu na podatke u literaturi, a niži udio se može povezati sa mogućnošću laktacije ili razdoblju dana kada je mlijeko muzeno.

Zbog visokog udjela laktoze mlijeko magarice ima slatkast okus, no unatoč tome energetska vrijednost je znatno niža u usporedbi s drugim vrstama mlijeka. Udio laktoze u testiranom uzorku iznosi 4,03 % što je nešto niže u odnosu na podatke u literaturi (prosjeck 6,8 %).

Mlijeko magarice ima visok udio proteina sirutke zbog čega se ubraja u tzv. albuminska mlijeka, a čiji udio u ukupnim proteinima iznosi 35 % do 50 %, za razliku od kravljeg koji iznosi svega 20 %. Količina proteina u mlijeku ne ovisi o vrsti pasmine i broju mužnji nego je povezana sa stadijem laktacije i načinom hranidbe. Udio proteina iznosio je 1,6 % u testiranom uzorku što je u skladu s navodima u literaturi gdje prosječan udio proteina iznosi 1,4 %-2,0 %.

**Tablica 7.** Promjene pH vrijednosti mlijeka magarice obrađenog različitim temperaturnim režimima u odnosu na uzorak sirovog mlijeka

Uzorak	Temperatura (°C)	pH vrijednost
63/15sek	63-65	7,39±0,05
72/20sek	72	7,57±0,07
90/5min	90-95	8,37±0,06
116/15min	116	7,43±0,09

U tablici 7 prikazane su pH vrijednosti mlijeka magarice obrađenog različitim režimima toplinske obrade. U njoj je vidljivo blago povećanje pH vrijednosti prilikom toplinske obrade mlijeka, pri čemu je najveće povećanje pH vrijednosti izraženo pri temperaturi 90-95 °C. Takvi rezultati u skladu su s literaturom, te su očekivane vrijednosti s obzirom da povišenjem temperature dolazi do disocijacije soli koja ima utjecaj na pH vrijednost.

#### **4.2. ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA NA UZORCIMA TRETIRANIM RAZLIČITIM TEMPERATURNIM REŽIMIMA**

U tablici 8 prikazane su izračunate  $\Delta E$  vrijednosti koje predstavljaju promjenu boje toplinski tretiranih uzoraka mlijeka magarice u odnosu na referentni uzorak, odnosno sirovo mlijeko. Najveće odstupanje je vidljivo kod uzoraka tretiranih na višim temperaturama, odnosno 90-95 °C, te 116 °C pri čemu je na toj temperaturi vidljiva veća promjena boje. S druge strane, najniža

promjena boje uočena je kod uzoraka tretiranim na nižim temperaturama, pri čemu je najniža promjena boje kod uzorka tretiran 72 °C/20 sek u odnosu na referentni uzorak.

Do promjene boje tijekom zagrijavanja uzoraka dolazi zbog već spomenutih Maillardovih reakcija u kojima kao produkt nastaju „melanoidni pigmenti“, a promjena boje je veća što je veća koncentracija nastalog pigmenta.

**Tablica 8.** Prikaz promjene boje ( $\Delta E$ ) uzoraka mlijeka magarice na različitim temperaturnim režimima

Uzorak	$\Delta E$
63/15sek	0,51
72/20sek	0,11
90/5min	2,47
116/15min	7,86

#### 4.3. ELEKTRIČNA VODLJIVOSTI I UKUPNE OTOPLJENE TVARI MLIJEKA MAGARICE

Vrijednosti električne vodljivosti prije svega ovise o količini otopljenih iona, ponajviše kloridnih iona. Vrijednosti električne vodljivosti su u proporcionalnom odnosu sa količinom iona, dok su obrnuto proporcionalne s količinom mliječne masti (Milić, 2021).

**Tablica 9.** Prikaz električne vodljivosti i TDS-a u uzorcima sirovog mlijeka i mlijeka tretiranog na različitim temperaturama

Uzorak mlijeka	Električna vodljivost ( $\mu\text{S/cm}$ )	TDS (mg/L)
Sirovo	335,75±14,75	168,13±4,38
63/15sek	351,1±20,50	174,95±10,80
72/20sek	361,25±6,25	183,55±0,55
95/5min	351,25±29,25	175,35±15,00
116/15min	338,75±0,25	170,03±0,53

TDS-ukupno otopljene tvari

U tablici 9 su prikazani rezultati određivanja električne vodljivosti i TDS-a. Iz tablice je vidljivo da je došlo do povećanja električne vodljivosti kao i TDS-a s obzirom na sirovo mlijeko

magarice. Povećanje nije linearno, no vidljivo je da su najveće promjene električne vodljivosti kod uzoraka mlijeka tretiranog pri 72 °C/20 sek i 90-95 °C/5 min u odnosu na sirovo mlijeko.

Također, je vidljivo je povećanje TDS vrijednosti u odnosu na sirovo mlijeko. Pri tome, najveće promjene vidljive su kod uzorka mlijeka tretiranog pri 72 °C/20 sek, ali i 90-95 °C /5 min.

Takvi rezultati posljedica su djelovanja topline zbog čega dolazi do disocijacije soli, odnosno oslobađaju se ioni koji su nositelji pozitivnog i negativnog električnog naboja, zbog čega dolazi do povećanja ukupnih otopljenih tvari i električne vodljivosti, što je u skladu sa očekivanjima.

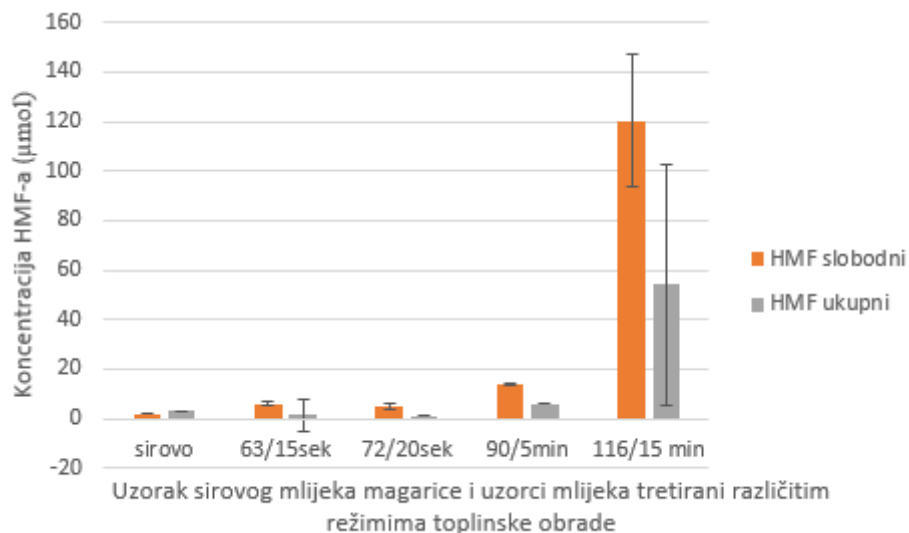
Dakle, povećanjem temperature povećava se koncentracija ukupnih otopljenih tvari, a samim time i vrijednost električne vodljivosti.

#### **4.4. ODREĐIVANJE UKUPNOG I SLOBODNOG HIDROKSIMETILFURFURALA**

Prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnog i slobodnog HMF-a dobiveni su rezultati očitani na spektrofotometru pri valnoj duljini od 443 nm. Rezultati su dobiveni pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama prikazani na slici 6.

Već je spomenuto da prilikom toplinskih tretmana u mlijeku i mliječnim proizvodima dolazi do odvijanja Maillardovih reakcija, a kao produkt nastaje hidroksimetilfurfural (HMF).

Zbog toga, HMF može poslužiti kao parametar intenziteta postupka toplinske obrade. Količina HMF-a ovisi o nekoliko faktora; nutritivni sastav mlijeka, uvjeti skladištenja, te intenzitet toplinske obrade.



**Slika 6.** Koncentracija ukupnog i slobodnog HMF-a ( $\mu\text{M}$ ) u sirovom mlijeku, te u uzorcima tretiranim različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, 116°C/15 min

S obzirom da se mlijeko magarice toplinski ne obrađuje, te stoga nema dostupnih istraživanja u učincima toplinskih tretmana na tvorbu HMF-a u mlijeku magarice, dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima dobiveni primjenom toplinskog tretmana na drugim vrstama mlijeka.

Dobiveni rezultati slobodnog i ukupnog HMF-a prikazani su na slici 6 gdje je vidljivo da je najniža koncentracija ukupnog HMF-a izmjerena u uzorku tretiranom pri 72 °C/20 sek, dok je najniža koncentracija slobodnog HMF-a izmjerena u sirovom uzorku. Sirovi uzorak također sadrži određenu koncentraciju HMF-a zbog korištenja temperature te kiselih uvjeta (Morales, 2000). Promatrajući dobivene rezultate, vidljivo je da je došlo do najvećeg povećanja udjela slobodnog i ukupnog HMF-a u uzorku mlijeka koji je tretiran pri 116 °C/15 min, odnosno pri sterilizaciji mlijeka. Analizirajući dobivene rezultate može se zaključiti da primijenjeni toplinski tretmani povećavaju koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a.

Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjem Morales i sur. (1996) gdje su najmanje koncentracije slobodnog HMF-a u pasteriziranim uzorcima kravljeg mlijeka iznosile  $2,1 \pm 1,0 \mu\text{M}$ , dok su najveće koncentracije zabilježene u steriliziranom mlijeku iznosile  $17,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$ .

U prethodnim istraživanjima (Milić, 2021; Popadić, 2021), osim utjecaja temperature na tvorbu HMF-a ima i trajanje toplinskog tretmana. On je u svom radu uspoređivao koncentraciju HMF-

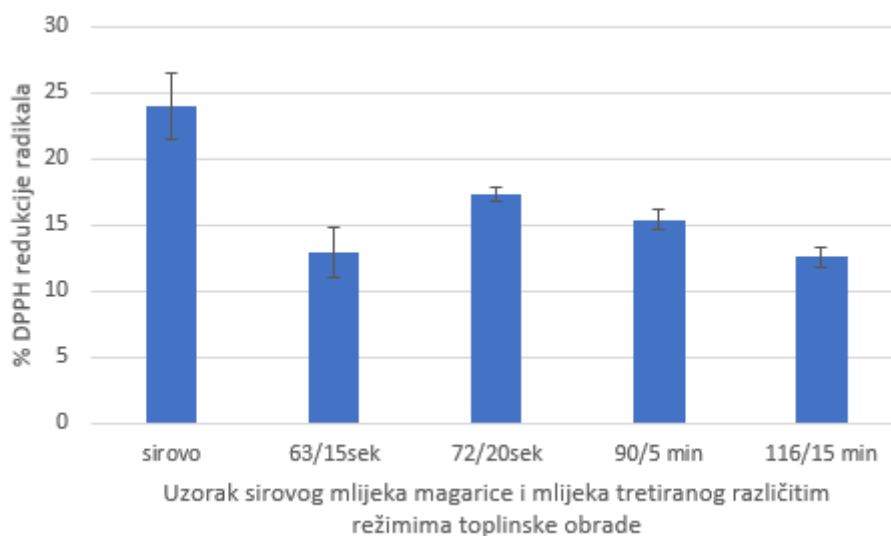


a u kravljem mlijeku pri 63-65 °C/15 sek i 63- 65 °C/30 min gdje je veća koncentracija izmjerena kod uzorka koji je tretiran tijekom dužeg vremenskog perioda.

#### 4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Antioksidansi su tvari koji sprječavaju oksidaciju spojeva, a u biološkim sustavima sprječavaju djelovanje slobodnih radikala kada im je koncentracija velika da sprječavaju odvijanje normalnih fizioloških funkcija. Mehanizam se temelji na tome da inaktiviraju slobodne radikale i tako sprječavaju lančanu reakciju nastanka novih radikala i njihovog štetnog djelovanja (Popadić, 2021).

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom određen je spektrofotometrijski tako što se mjerio intenzitet ljubičastog obojenja na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm. Rezultati su dobiveni pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama, a izraženi su kao postotak redukcije radikala.



**Slika 7.** Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i postotka redukcije slobodnih radikala u sirovom mlijeku magarice, te u uzorcima mlijeka tretiranim na različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, 116 °C/15 min

Na temelju dobivenih rezultata (slika 7) može se zaključiti da je antioksidacijska aktivnost smanjena kod uzoraka mlijeka tretiranih na različitim temperaturnim režimima u odnosu na sirovo mlijeko magarice. Najveći pad zabilježen je na uzorku mlijeka tretiran pri 116 °C/15

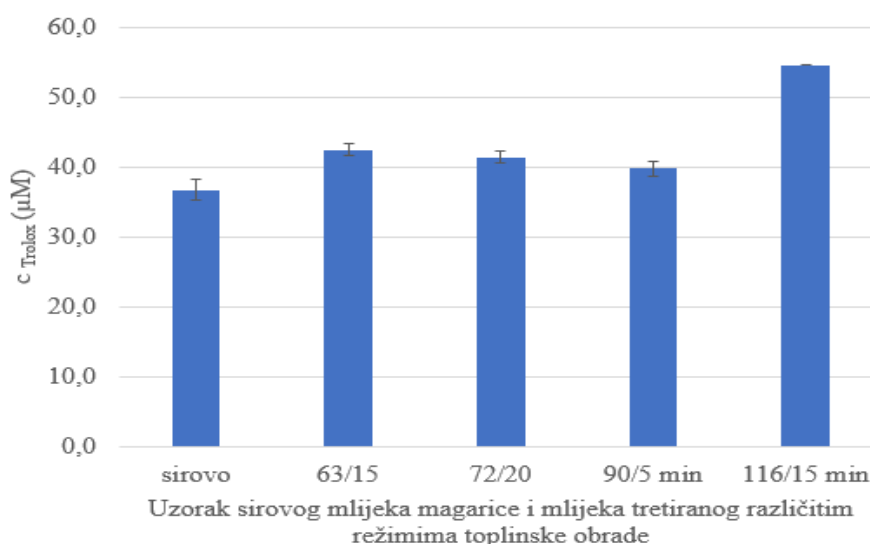
min, dok je najmanji pad antioksidacijske aktivnosti kod uzorka mlijeka tretiran pri 72 °C/20 sek. Može se zaključiti da se toplinskom obradom mlijeka smanjuje antioksidacijska aktivnost, a ponajviše na to utječe povećanje temperature pa je nakon režima sterilizacije utvrđena najočitija promjena.

Niža antioksidacijska aktivnost toplinski tretiranih uzoraka pokazuje na smanjenje udjela fenola i flavonoidnih spojeva u toplinski obrađenim uzorcima mlijeka. Ranija istraživanja pokazuju da toplina negativno utječe na ukupnu koncentraciju polifenola zbog mogućnosti denaturacije fenola i katabolizma aminokiselina (Alyaqoubi i sur., 2014).

Dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pasteriziranih i steriliziranih uzoraka ne razlikuju se značajno što je u skladu sa ranijim istraživanjima (Alyaqoubi i sur., 2014). Nadalje, srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti tretiranih uzoraka znatno su niže od vrijednosti sirovog mlijeka.

#### 4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je spektrofotometrijski tako što se mjerio intenzitet plavog obojenja na spektrofotometru pri valnoj duljini od 593 nm (slika 8). Dobivene vrijednosti apsorbancije uvrštene su u jednadžbu pravca baždarnog dijagrama, te preračunate u koncentraciju izraženu kao  $\mu\text{mol Trolox ekvivalenta}$ .



**Slika 8.** Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorku sirovog mlijeka magarice, te u uzorcima mlijeka tretiranim pri različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/ 20 sek, 90-95 °C/5 min, te 116 °C/15 min

Iz slike 8 vidljivo je da se tretiranjem uzorka mlijeka na različitim temperaturama antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom povećava u odnosu na sirovo mlijeko. Pri tome je najveća koncentracija Trolox ekvivalenta izmjerena kod uzorka tretiran pri temperaturi 116 °C/15 min, dok je kod ostalih uzoraka koncentracija Trolox ekvivalenta neznatno veća od koncentracije Trolox ekvivalenta sirovog mlijeka magarice. Dobiveni rezultati u skladu su sa ranijim istraživanjima u kojima se pokazalo da su najveće promjene antioksidacijske aktivnosti pri temperaturama sterilizacije odnosno na temperaturama većim od 100 °C, dok na nižim temperaturama promjene nisu toliko značajne (Callgaric i sur., 2004).

Također, El-Fattah i sur. (2020) u svome radu navode kako povećanjem temperature tijekom pasterizacije i sterilizacije dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama mlijeka.

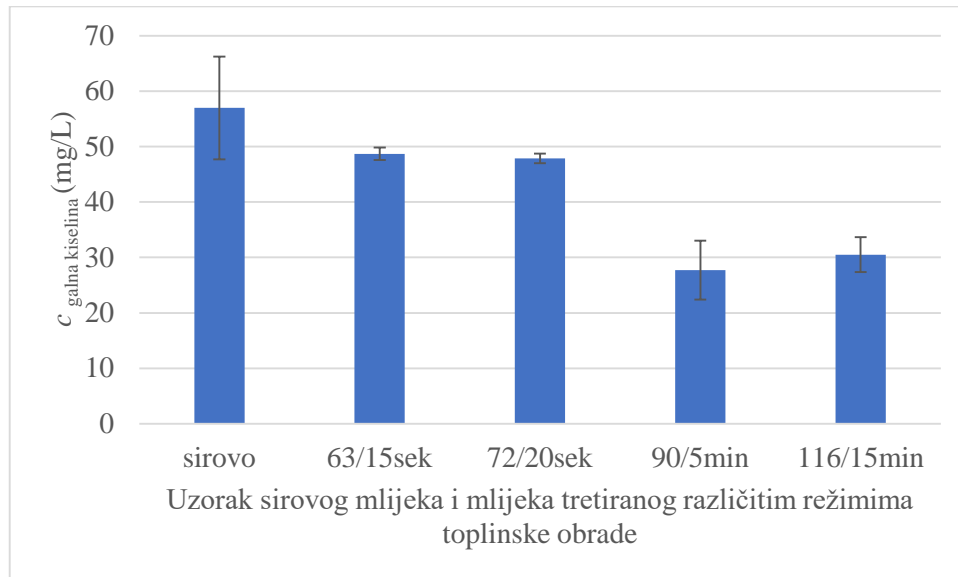
Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su dvije metode: DPPH metoda i FRAP metoda. Objе reakcije temelje se na izmjeni elektrona, a razlika između njih je u tome što u DPPH metodi antioksidansi imaju sposobnost da se vežu za slobodne radikale, dok u FRAP metodi antioksidansi imaju sposobnost redukcije iona željeza,  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ . To je razlog zbog kojeg kod DPPH metode dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, a u FRAP metodi se antioksidacijska aktivnost povećava povećanjem temperature (Milić, 2021).

Povećanje antioksidacijske aktivnosti u FRAP metodi povezano je sa produktima Maillardovih reakcija neenzimskog posmeđivanja koji imaju određeni antioksidacijski potencijal. Pad antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom povezana je sa antioksidacijskom aktivnosti sastojaka u mlijeku zbog čega se povećanjem temperature smanjuje antioksidacijska aktivnost (Popadić, 2021).

Thaipong i sur. (2006) proveli su istraživanje gdje su uspoređivali antioksidacijsku aktivnost metanolnog ekstrakta guava voća pomoću DPPH i FRAP metode i zaključili su da rezultati ne pokazuju značajna odstupanja (Popadić, 2021). Isto tako, Yilmaz- Ersan i sur. (2018) svojim istraživanjem utvrdili su kako toplinska obrada kravljeg i ovčijeg mlijeka uzrokuje smanjenje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom što je u skladu sa dobivenim rezultatima na mlijeku magarice.

#### 4.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLA

Određivanje koncentracije ukupnih fenola u uzorcima mlijeka magarice dobivena je spektrofotometrijski, mjerenjem intenziteta plavog obojenja pri valnoj duljini od 750 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije preračunate su uz pomoć jednadžbe pravca baždarnog dijagrama, a izražene su kao mg ekvivalenta galne kiseline (mg/L).



**Slika 9.** Određivanje ukupnih fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg<sub>GAL</sub>/L) s Folin-Ciocalteu reagensom u uzorcima sirovog mlijeka magarice, te u uzorcima tretiranim na različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, 116 °C/15 min

Na temelju prikazanih rezultata (slika 9) može se zaključiti da je došlo do smanjenja koncentracije ukupnih fenola u svim uzorcima tretiranim na različitim temperaturama u odnosu na sirovo mlijeko. Najveći pad koncentracija ukupnih fenola je u uzorku tretiran pri 90-95 °C/5 min, kao i u uzorku tretiran pri 116 °C/15 min, dok je najmanji pad koncentracije ukupnih fenola u uzorcima tretiranim pri nižim temperaturama; 63 °C-65 °C/15 sek i 72 °C/20 sek. Također je vidljivo da sirovo mlijeko magarice sadrži veliku koncentraciju fenolnih spojeva.

Iz svega navedenog vidljivo je da je najmanja antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom kao i koncentracija ukupnih fenola u uzorku mlijeka magarice tretiranom pri 116 °C/15 min, dok je najveća antioksidacijska aktivnost kao i koncentracija ukupnih fenola u uzorku mlijeka tretiran na 72 °C/ 20 sek.

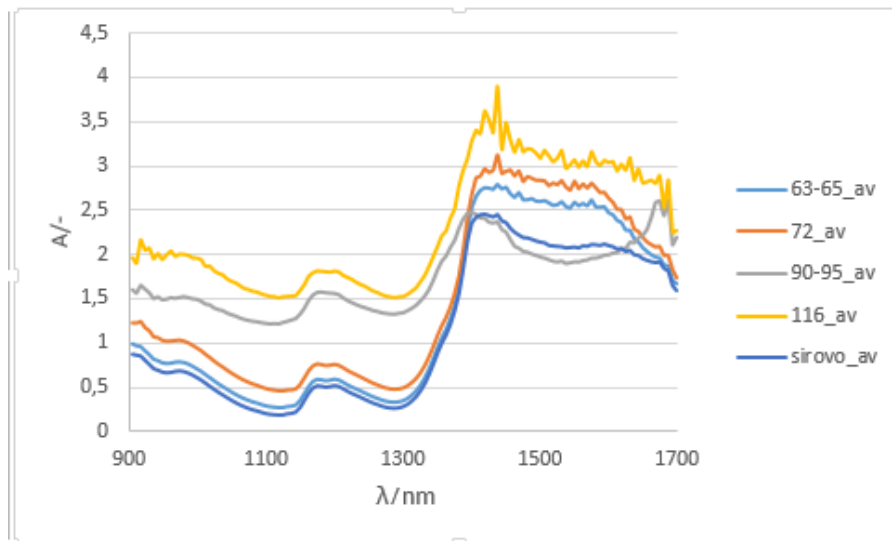
Dobivene vrijednosti mogu se objasniti činjenicom da fenolni spojevi ne mogu nastati iz sastojaka, već su prisutni u mlijeku, te tijekom toplinske obrade njihova koncentracija se ne

može povećavati, ali može biti konstantna ili se može smanjivati kao posljedica raspada zbog utjecaja toplinskog tretmana.

Everette i sur. (2010) su proveli istraživanje u kojem navode kako Folin Ciocalteu reagens ima određenu reaktivnost sa drugim spojevima kao što su proteini, ugljikohidrati, organske kiseline, amini, aminokiseline itd., te je predloženo da se metoda osim za određivanje ukupnih fenola, koristi i kao metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti.

#### 4.8. NIR SPEKTRI

Slika 10 prikazuje rezultate NIR spektra u uzorku sirovog mlijeka magarice kao i u uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade.



**Slika 10.** Snimljeni NIR spektri uzoraka sirovog mlijeku magarice, te uzoraka mlijeka magarice tretiranim na različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, te 116 °C/15 min

Na temelju prikazanih rezultata (slika 10) može se zaključiti da do naglog skoka apsorbancije dolazi pri valnim duljinama 904-1000 nm, 1150-1250 nm, te 1350-1450 nm. U području valnih duljina 904-1000 nm pojavljuju se vibracije C-H veza u trećoj regiji, te O-H veza u drugoj regiji, a mogu se povezati sa prisutnošću laktoze u mlijeku magarice. Zatim dolazi do vibracija C-H i C=O veza u području valnih duljina 1150-1250 nm što može se kvalitativno povezati sa prisutnošću mliječne masti u mlijeku magarice. U valnom području 1350-1450 nm dolazi do vibracija N-H, O-H i C-H veza u prvoj regiji, a može se povezati sa udjelom proteina u mlijeku magarice. Promjene valnih duljina u rasponu 1350-1699 nm posljedica su pristupstva vode iz

razloga što su uzorci za snimanje bili razrijeđivani. U tom području također dolazi do vibracija N-H, O-H i C-H veza u prvoj regiji (Badr Eldin, 2011).

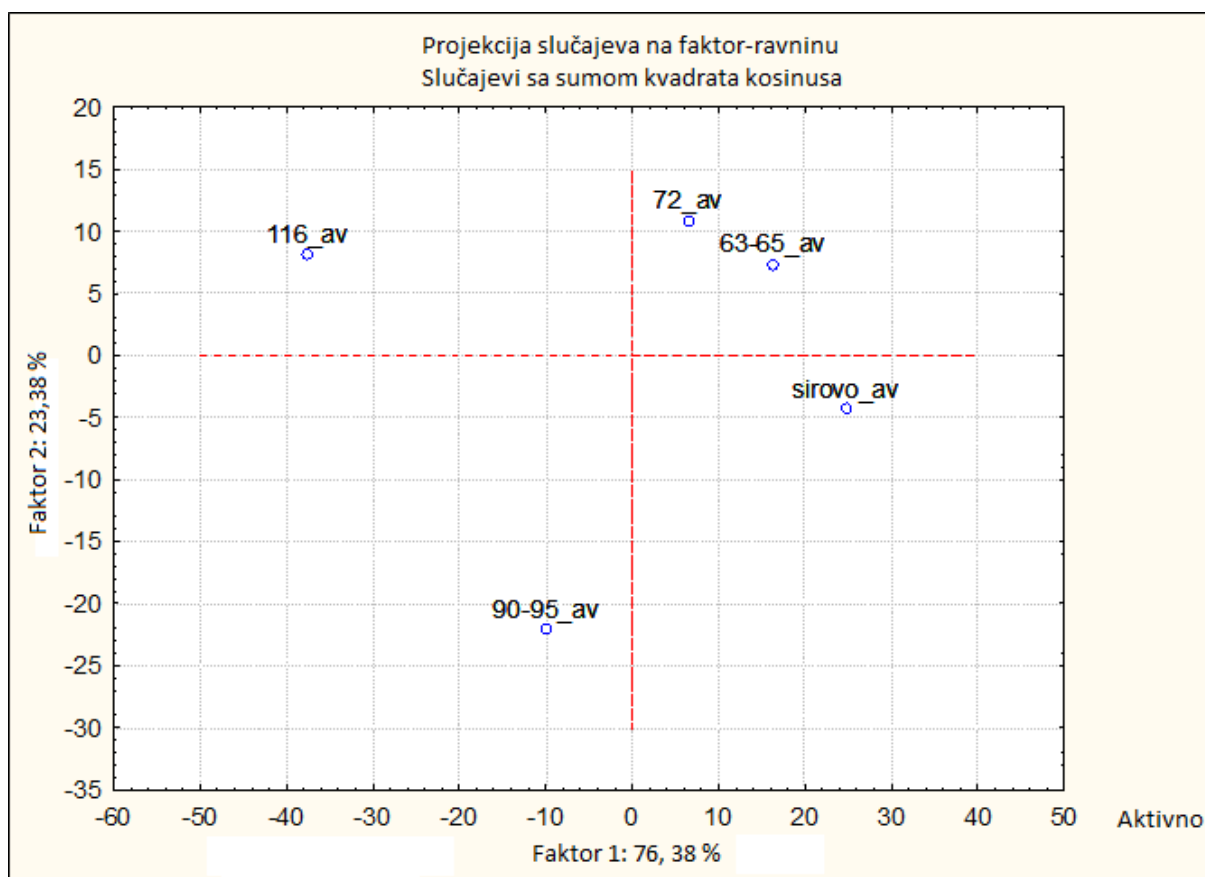
Na području valnih duljina 1450-1699 nm vidljiv je lagani pad apsorbancije kao posljedica denaturacije proteina zbog toplinske obrade kojim je mlijeko magarice bilo podvrgnuto. Najveća vrijednost apsorbancije uočljiva je kod mlijeka tretiranom pri 116 °C/15 min upravo zbog denaturacije proteina odnosno nastankom kompleksa između  $\kappa$ -kazeina i proteina sirutke dok je najmanja vrijednost apsorbancije izmjerena kod sirovog uzorka mlijeka.

Upravo zbog denaturacije proteina do koje je došlo prilikom toplinske obrade mlijeka, došlo je do povećanja pH vrijednosti, električne vodljivosti i promjene veličine čestica. Naime, tijekom denaturacije proteina dolazi do kidanja nekovalentnih veza u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi zbog čega se formira naboj na pobočnim ograncima proteina čime dovodi do određenih promjena u električnoj vodljivosti, te pH vrijednosti mlijeka (Miletić, 2022).

#### **4.9. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA**

Analiza glavnih komponenata (PCA) korištena je u obradi snimljenih NIR spektara s ciljem da se smanji količina podataka, te prepoznaju najbitnije informacije iz dobivenih spektara (Abdi i Williams, 2010). Prikazani koordinatni sustav (slika 11) sastavljen je od vektora PC-1 i PC-2. PC 1 prikazuje prvu glavnu komponentu kojoj pripada najveći dio varijacije uzorka i linearna je kombinacija podataka koji imaju najveću varijaciju (Abdi i Williams, 2010). Nakon toga slijede PC-2, PC-3, PC-4 itd., od kojih svaka sljedeća ima sve manji iznos varijacija u setu podataka koji se analiziraju.

PCA analiza prikazuje sličnosti odnosno različitosti između sirovog uzorka i uzoraka mlijeka tretiranih na različitim temperaturnim režimima. Na slici 11 je prikaz PCA analize NIR spektra sirovog mlijeka magarice i mlijeka tretiranog pri različitim temperaturnim režimima. Uzorci tretirani 72 °C/20 sek, 63-65 °C/15 sek te pri 116 °C/15 min nalaze se u prvom i drugom kvadrantu, dok se u trećem i četvrtom nalaze tretirano pri 90-95 °C kroz 5 minuta i sirovo mlijeko. Na temelju dobivenog rezultata može se zaključiti da su uočljiva razdvajanja između uzoraka mlijeka magarice. S obzirom da se mlijeko magarice tretirano pri 63-65 °C i 72 °C nalaze u istom kvadrantu, ta dva uzorka su vrlo slična s obzirom na ispitivane faktore. Uzorci mlijeka tretirani pri 116 °C i 90-95 °C nalaze se u drugom (116 °C) i trećem (90-95 °C) kvadrantu što znači da je temperatura imala utjecaj na razdvajanje tih uzoraka u odnosu na uzorke tretirane na nižim temperaturama (63-65 °C i 72 °C). Stoga, prema PCA analizi ukupno se može pojasniti 99,76 % varijance u promatranom skupu podataka (76,38 % + 23,38%).



**Slika 11.** Analiza glavnih komponenta (PCA) NIR spektra uzorka sirovog mlijeka, te uzorka mlijeka magarice tretiranih različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sek; 72 °C/20 sek; 90-95 °C/5 min; 116 °C/15 min)

#### 4.10. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA

Sirovo mlijeko magarice, te uzorci tretirani na različitim temperaturnim režimima su homogenizirani te je izmjerena veličina čestica pomoću uređaja Zetasize (Malvern instruments, UK). Homogenizirani uzorci se nose u uređaj koji prolazi kroz mjernu ćeliju na koju je usmjerena laserska zraka. Čestice raspršuju svjetlost pod određenim kutom koji je obrnuto proporcionalan veličini čestica. Detektor uređaja je sastavljen od više manjih optičkih detektora koji prikupljaju podatke pod različitim kutovima odbijene svjetlosti (Tretnjak, 2017).

Rezultati su prikazani grafički, gdje je na osi x prikaz čestica određene veličine, a na y os intenzitet pojave čestica izražen u postotku (slika 12).

Dobiveni rezultati (slika 12) prikazani su grafički u ovisnosti veličine čestica o intenzitetu pojavljivanja. Iz rezultata je vidljivo kako sirovo mlijeko magarice ima jedan dominantan pik

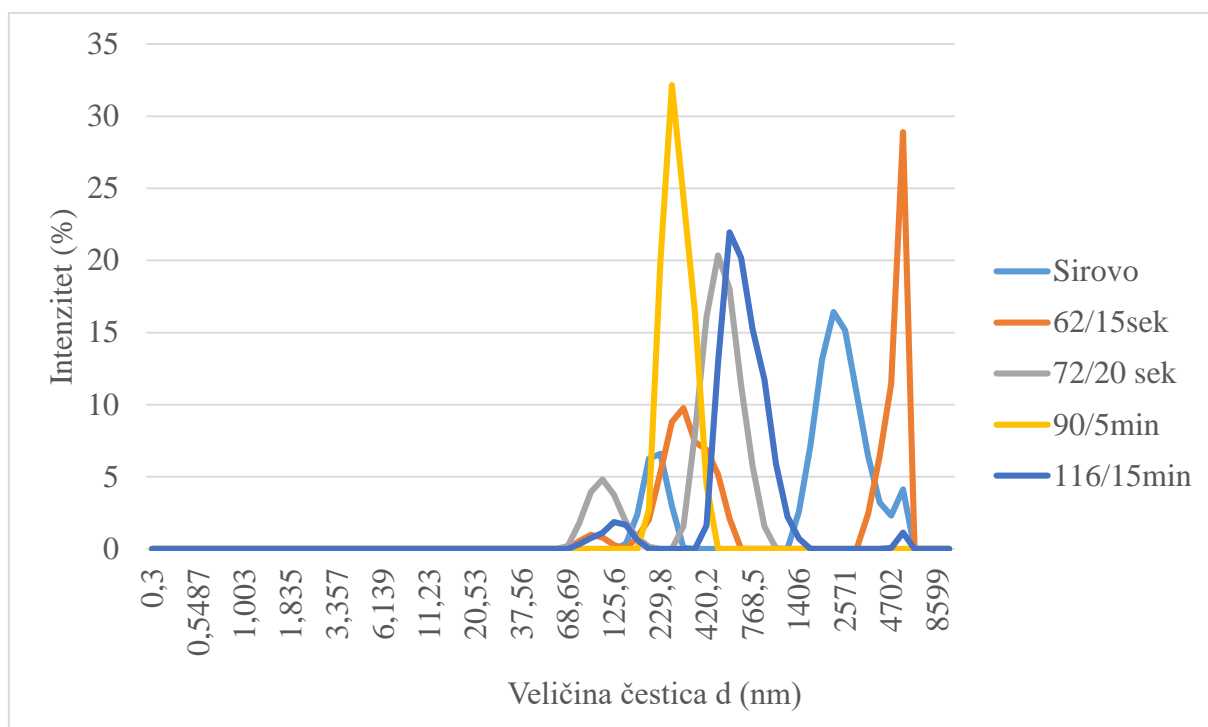
u rasponu veličina čestica 1800-2500 nm u intenzitetu pojavljivanja od 16 %. Uzorak mlijeka tretiran pri 60-65 °C/15 sek ima dva izražena pika; pri veličini čestica 260-350 nm, te 4500-6000 nm. Nadalje, uzorak mlijeka tretiran pri 72 °C/20 sek ima dominantan pik pri veličini čestica 400-700 nm, te jedan manji pik u rasponu veličina čestica od 80-110 nm, dok uzorak mlijeka tretiran pri 90-95 °C ima dominantan jedan pik u rasponu veličine čestica 180-400 nm, ujedno uz najveći intenzitet pojavljivanja od 32 %. Uzorak mlijeka koji je tretiran pri najvećoj temperaturi, 116 °C ima dominantan pik pri veličini čestica od 450-1000 nm.

Samardžija (2016) kategorizira čestice veličine 1 nm kao pravu otopinu u koju svrstava laktozu, soli i druge tvari, čestice veličine 1-200 nm kategorizira kao koloidnu otopinu i u nju svrstava proteine sirutke, čestice iznad 200 nm opisuje kao koloidnu suspenziju te u nju svrstava kazein-kalcijev fosfat, te čestice veličine 2000-6000 nm kategorizira kao koloidnu emulziju u koju svrstava masne globule.

Iz toga je vidljivo da veličina čestica u sirovom mlijeku u usporedbi s drugim makromolekulama pripada masnim globulama, u uzorku mlijeka tretiranog pri temperaturi 63-65 °C veličina čestica odgovara veličini čestica kazein-kalcijev fosfat u nešto manjem intenzitetu, te veličini čestica masne globule. Nadalje, u uzorku mlijeka tretiranog pri temperaturi 72 °C veličina čestica odgovara veličini čestica kazein-kalcijev fosfat, te manji pik u rasponu veličina čestica od 80-100 nm odgovara prosječnoj veličini čestica laktoze. U uzorcima mlijeka tretiranim pri višim temperaturama; 90-95 °C i 116 °C veličina čestica (200-1000 nm) odgovara prosječnoj veličini čestica kazein-kalcijev fosfat.

Na temelju navedenog, može se zaključiti kako povišenjem temperature dolazi do disocijacije soli uključujući kazein-kalcijev fosfat što se podudara sa dobivenim rezultatima određivanja ukupnih otopljenih tvari, kao i električne vodljivosti i pH vrijednosti.

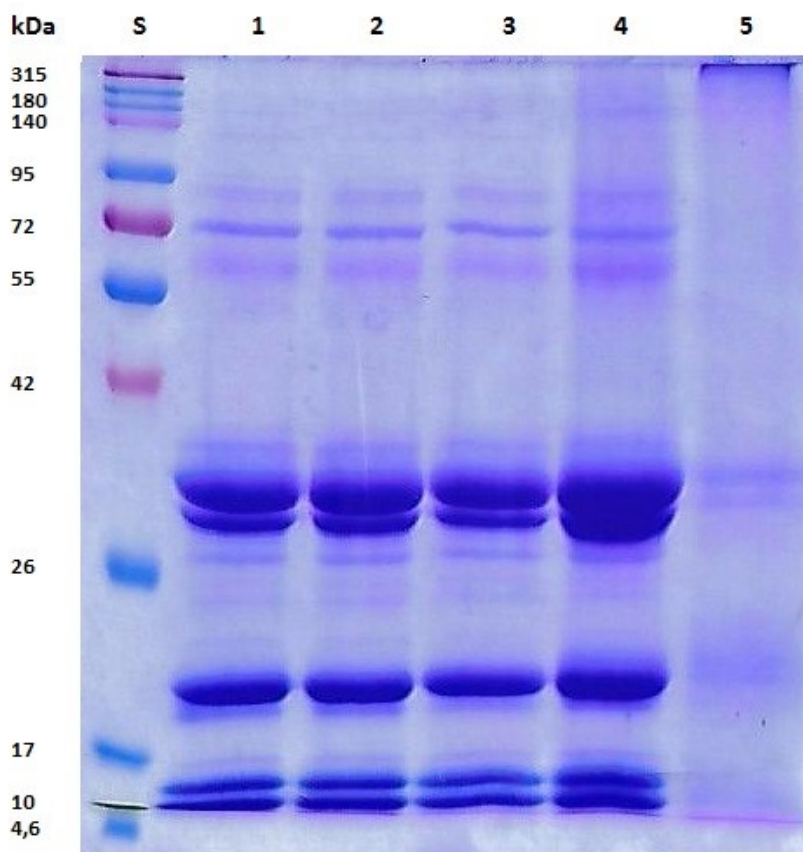




**Slika 12.** Raspodjela veličine čestica sirovog mlijeka magarice i mlijeka tretiranog na različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek, 72 °C/20 sek, 90-95 °C/5 min, te 116 °C/15 min

#### 4.11. SDS-PAGE ELEKTROFOREZA

Prilikom detekcije proteina mlijeka magarice SDS PAGE elektoroforezom koristila se otopina standarda u kojoj su jasno označene molekulske mase pojedinih proteinskih frakcija, a na slici 13 je označena slovom S, dok broj jedan označava sirovo mlijeko magarice, a ostatak brojeva od 2-5 uzorke mlijeka tretirane toplinskim režimima poredani prema intenzitetu od najniže do najviše temperature.



**Slika 13.** SDS PAGE elektroforeza sirovog mlijeka (1) i uzoraka mlijeka tretiranog na različitim temperaturnim režimima; 63-65 °C/15 sek (2), 72 °C/20 sek (3), 90-95 °C/5 min (4), 116 °C/15 min (5)

U otopini standarda detektirane su proteinske frakcije čije relativne molekulske mase iznose od 4,6 do 315 kDa. Provođenjem SDS elektroforeze detektirana su 4 glavna banda;  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, kazein i albumini krvnog seruma.

Rezultati prikazuju četiri jasne pruge, od kojih prva značajnija pruga odgovara molekulskoj masi od oko 10 kDa i odnosi se na  $\alpha$ -laktalbumin čija molekulska masa ne odgovara prosječnoj molekulskoj masi  $\alpha$ -laktalbumina. Frakcije koje prikazuje taj band se jasnije detektiraju u sirovom uzorku i uzorcima mlijeka tretiranim pri 63-65 °C i 72 °C što znači da nije došlo do osjetljivije denaturacije, dok bandovi u uzorcima tretiranim pri 90-95 °C i 116 °C su širi i mutniji čime prikazuju denaturacija  $\alpha$ -laktalbumina. Sljedeća pruga na gelu odgovara molekulskoj masi od oko 14 kDa, a odnosi se na  $\beta$ -laktoglobuline čija teoretska molekulska masa iznosi 19,5 kDa (Milić, 2021). Kao i  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin je također izražanije denaturirao u uzorcima mlijeka tretiranim na višim temperaturama nego na nižim. Sljedeća pruga odgovara molekulskoj masi od 19 kDa i označava kazein, te se podudara s teoretskom

molekulskom masom koja se kreće od 16 kDa do 25 kDa (Milić, 2021). Frakcije toga banda su u svim uzorcima jasno uočljive, osim u uzorku tretiranom pri 116 °C/15 min gdje je došlo do denaturacije kazeina. Iz rezultata su vidljivi i albumini krvnog seruma kojima odgovara molekulska masa od oko 70 kDa, a denaturacija je prisutna kod uzorka tretiran pri temperaturama sterilizacije, odnosno pri 116 °C. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenim NIR spektrometrijom u kojoj je također vidljiva denaturacija proteina u uzorku tretiranom pri 116 °C kroz 15 minuta.

Iz svega navedenog može se zaključiti kako su rezultati u skladu sa ranijim istraživanjima u kojima  $\alpha$ -laktalbumini i  $\beta$ -laktoglobulini mlijeka magarice posjeduju veću toplinsku stabilnost u odnosu sa navedenim frakcijama kravljeg mlijeka gdje denaturacija započinje već pri 60 °C.

## 5.ZAKLJUČCI

1. Promjena boje mlijeka magarice rasla je porastom intenziteta toplinske obrade. Tako je najveća razlika u odnosu na sirovo mlijeko zabilježena u uzorku mlijeka tretiranom pri 116 °C/15 min, dok je najmanja razlika utvrđena u uzorku mlijeka tretiranom pri 63-65 °C/15 sek.
2. Vrijednosti električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari u toplinski tretiranim uzorcima povećavale su se u usporedbi sa sirovim mlijekom, te su najveće vrijednosti električne vodljivost kao i ukupnih otopljenih tvari utvrđene kod uzorka tretiranog pri 72 °C.
3. Povišenjem temperature i intenziteta toplinske obrade utvrđen je proporcionalni porast koncentracije slobdnog i ukupnog HMF-a. U skladu s time, najveće koncentracije HMF-a utvrđene su u uzorku mlijeka tretiranog režimom pri 116 °C/15 min, dok je najniža koncentracija HMF-a utvrđena u uzorku mlijeka tretiranom pri 72 °C/20 sek.
4. Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom opada porastom temperature i intenziteta toplinske obrade. Najmanju vrijednost u odnosu na sirovo mlijeko pokazao je uzorak mlijeka tretiran na 116 °C/15 min, dok se uzorak tretiran pri 72 °C/20 sek bio pokazao najsličniji sirovom mlijeku.
5. Antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom pokazala je suprotan trendu odnosu na DPPH metodu, odnosno povećavala se porastom temperature i intenziteta toplinske obrade, što bi se moglo pripisati uočenom porastu koncentracije HMF-a i mogućim interakcijama s FRAP reagensom. Tako su najveće vrijednosti utvrđene kod uzoraka mlijeka tretiranog na 116 °C/15 min, dok na ostalim temperaturnim tretmanima nije došlo do većih promjena.
6. Koncentracija ukupnih fenola se povišenjem temperature i intenziteta toplinske obrade smanjuje, pa su u usporedbi sa sirovim mlijekom najniže vrijednosti utvrđene u uzorcima mlijeka tretiranim na 90-95 °C, te na 116 °C, a najviše pri temperaturi 63-65 °C te 72 °C.
7. Analizom NIR spektra vidljivo je da je najveća promjena apsorbancije uvrđena kod uzorka mlijeka tretiranog pri 116 °C, dok je apsorbancija kod sirovog mlijeka i uzorka tretiranog 63-65 °C vrlo slična što ukazuje na sličnosti u strukturi između uzoraka.
8. Temeljem PCA analize može se zaključiti da su uočljiva razdvajanja između uzoraka mlijeka magarice obrađenog različitim režimima toplinske obrade. Uzorci mlijeka tretirani na 63-65 °C i 72 °C su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore, dok

povišenjem temperature dolazi do razdvajanja uzoraka što ukazuje na povećanje stupnja različitosti između uzoraka.

9. Raspodjela veličine čestica ukazala je na to da kod sirovog uzorka mlijeka i uzorka tretiranim pri nižim temperaturama dominiraju veće veličine čestica, dok pri višim temperaturama dominiraju manje veličine čestica.
10. Iz rezultata SDS elektroforeze vidljivo je da povećanje temperature uzrokuje denaturaciju  $\alpha$  i  $\beta$  laktoglobulina već pri temperaturi od 60 °C, dok do denaturacije kazeina dolazi pri nešto višim temperaturama.
11. Obzirom na sve dobivene rezultate, vidljivo je kako niske temperature toplinske obrade imaju najmanje negativan utjecaj na prehrambenu i zdravstvenu vrijednost mlijeka, dok povišenjem temperature dolazi do različitih negativnih i ireverzibilnih promjena koje itekako utječu na ovu nutritivno vrijednu namirnicu. Ako bi se mlijeko magarice obrađivalo toplinskom obradom, niže temperature toplinske obrade imale bi znatno manji utjecaj na nutritivni sastav mlijeka.

## 6.LITERATURA

Abdi H, Williams LJ (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat* **2**, 433-459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>

Aernouts B, Polshin E, Lammertyn J, Saeys W (2011) Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: reflectance or transmittance? *J Dairy Sci* **94**, 5315–532. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4354>

Alyaqoubi S, Abdullah A, Samudi M, Abdullah N, Radhi Addai Z, Al-ghazali M, i sur. (2014) Effect of Different Factors on Goat Milk Antioxidant Activity. *Int J Chemtech Res* **6**, 3091-3196. <https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1622941>

Badr Eldin A (2011) Near Infra Red Spectroscopy. U: Wide Spectra of Quality Control, (Akyar, I.,ured), InTech, Rijeka, str. 238-248.

Ban D (2016) Toplinska obrada mlijeka (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Barukčić I (2020) Mlijeko magarice za jačanje organizma, *Mlijeko i ja*, 32, 30-32.

Božanić R, Jeličić I, Bilušić T (2010) Anlize mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.

Božanić R, Lisak Jakopović K, Barukčić I (2018) Vrste mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Bylund G (2003) Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden, str. 76-77.

Calligaris S, Manzocco L, Anese M, Nicoli MC (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant and prooxidant activity of milk, *Int Dairy J* **14**, 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.001>

Chávez-Servín JL, Andrade-Montemayor HM, Velázquez-Vázquez C, Aguilera-Barreyro A, García-Gasca T, Ferríz-Martínez RA, Olvera-Ramírez AM, de la Torre-Carbot K (2018) Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Res* **160**, 54-58.

[doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.011)

Čuklić D (2014) Mljekarstvo i sirarstvo- Praktikum, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.

El-Fattah AA, Azzam M, Elkashef H, Elhadydy A (2020) Antioxidant properties of milk: Effect of milk species, milk fractions and heat treatments. *Int J Dairy Sci* **15**, 1-9. <https://doi.org/10.3923/ijds.2020.1.9>

Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB (2010) A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem* **58**, 8139-8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>

Francisquini J, Neves L, Torres J, Carvalho A, Perrone I, Da Silva P (2018) Physico- chemical and compositional analyses and 5-hydroxymethylfurfural concentration as indicators of thermal treatment intensity in experimental dulce de leche. *J of Dairy Res* **85**, 476-481. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000353>

Ivanković A, Potočnik K, Ramljak J, Baban M, Antunac N (2016) Mlijeko kobilica i magarica, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kostić G (2015) Karakteristike magarećeg i kobiljeg mlijeka te njegovo potencijalno terapijsko djelovanje na humano zdravlje (specijalistički diplomski stručni), Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.

Kovačić P (2020) Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u vrstama *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić i *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Lović K (2018) Utjecaj dodataka ekstrakta majčine dušice i cvjetova bazge na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Martini M, Altomonte I, Licitra R, Salari F (2017) Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *J Equine Vet Sci* **65**, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.10.020>

Miletić I (2022) Praćenje kvalitete kobiljeg mlijeka tijekom skladištenja u zamrznutom obliku (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Milić JD (2021) Praćenje kvalitativnih promjena mlijeka obrađenog različitim toplinskim režimima (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Collor difference Delta E – A survey. *Machine Graphics and Vision*, **20**, 383- 411.

Morales FJ, Romero C, Jimenez-Perez S (1996) Evaluation of heat- included changes in Spain comercial milk: Hydroxymethylfurfural and available lysine content, *J Food Sci Technol* **31**, 411-418. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00357.x>

Pavlinić M ( 2018) Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u detekciji akrilamida u hrani (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Pezo A (2018) Karakterizacija nanočestica srebra i njihova interakcija s alfa kiselim glikoproteinom (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Popadić E (2021) Utjecaj različitih režima toplinske obrade na kvalitetu kozjeg mlijeka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Salimei E (2016) *Animals that Produce Dairy Foods, Donkey*, Reference module in Food Science Elseiver, str. 1-10.

Samardžija D ( 2016) Korištenje mlijeka kobile i magarice u proizvodnji fermentiranih mlijeka, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Sangsopha J, Moongngarm A, Pratheepawanit Johns N, Grigg NP (2019) Optimization of pasteurized milk with soymilk powder and mulberry leaftea based on melatonin, bioactive compounds and antioxidant activity usingresponse surface methodology.

Šafarik T (2018) Sinteza i kemijska modifikacije silikatnih i biorazgradivih nanočestica (diplomski rad), Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.



Škarić L (2021) Određivanje antioksidacijske aktivnosti derivata iktonske kiseline (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Štoler I (2017) Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tretnjak K (2017) Određivanje antioksidacijske aktivnosti u kiseloj i slatkoj sirutki (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Vidaković S (2016) Kemijska analiza bagremovog meda (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (VALENTINA LUKENDA) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis