

Praćenje kvalitete mlijeka magarice tijekom zamrzavanja i skladištenja

Zrnić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:094019>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Karla Zrnić

0058216186

**PRAĆENJE KVALITETE MLIJEKA MAGARICE
TIJEKOM ZAMRZAVANJA I SKLADIŠTENJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

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

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRAĆENJE KVALITETE MLIJEKA MAGARICE TIJEKOM ZAMRZAVANJA I SKLADIŠTENJA

Karla Zrnić, 0058216186

Sažetak:

Mlijeko magarice ima visoku zdravstvenu vrijednost zahvaljujući sastojcima koji su velikim dijelom termolabilni te se zbog toga ne preporuča termička obrada već svježa konzumacija mlijeka ili skladištenje zamrzavanjem. Stoga je cilj ovog rada bio pratiti utjecaj zamrzavanja mlijeka magarice, kroz 6 mjeseci, na fizikalno kemijska svojstva te antioksidacijski potencijal mlijeka. Istraživanje se provodilo na sirovom uzorku mlijeka magarice te na uzorcima skladištenim u zamrznutom stanju kroz period od 6 mjeseci. Istraživanje je pratilo promjenu: pH-vrijednosti, TDS (ukupne otopljene tvari) i električne vodljivosti, distribuciju veličine čestica i strukturne promjene sastojaka te promjene u antioksidacijskom potencijalu (FRAP, DPPH) te sadržaju ukupnih fenola. Kada se uzmu u obzir sve provedene analize, moguće je zaključiti da je skladištenje mlijeka magarice u zamrznutom obliku izuzetno prihvatljivo. Ne dolazi do narušavanja sastava i kvalitete mlijeka te se čak povećava aktivnost antioksidansa u mlijeku nakon zamrzavanja.

Ključne riječi: mlijeko magarice, skladištenje, zamrznuto mlijeko, antioksidacijski potencijal

Rad sadrži: 28 stranica, 11 slika, 5 tablica, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

MONITORING THE QUALITY OF DONKEY MILK DURING FREEZING AND STORAGE

Karla Zrnić, 0058216186

Abstract:

Donkey's milk has a high health value thanks to the ingredients that are mostly thermolabile and because of it, heat treatment is not recommended but fresh milk consumption or freezing storage. The aim of this study was to monitor the influence of freezing donkey's milk for 6 months, on the physicochemical properties and antioxidant potential of milk. The research was conducted on a raw donkey's milk sample and on samples stored in a frozen state over a period of 6 months. The research monitored changes in: pH, TDS (total dissolved solids), and electrical conductivity, the distribution of the particle sizes and structural ingredients changes, changes in antioxidative potential (FRAP, DPPH), as well as a total phenol content. All analysis considered, it's possible to conclude that the storage of donkey's milk in a frozen state is extremely acceptable. The composition and the quality of milk do not deteriorate, more so, the activity of antioxidants in the milk is rising after freezing.

Keywords: donkey's milk, storage, frozen milk, antioxidative potential

Thesis contains: 28 pages, 11 figures, 5 tables, 22 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Irena Brukčić, Associate Professor

Thesis defended: June 29, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. FIZIKALNA SVOJSTVA MLIJEKA MAGARICE	2
2.2. KEMIJSKA SVOJSTVA I SASTAV MLIJEKA MAGARICE.....	2
2.2.1. MLIJEČNA MAST	3
2.2.2. PROTEINI	4
2.2.3. LAKTOZA.....	5
2.3. PREHRAMBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST MLIJEKA MAGARICE	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.2. METODE	9
3.2.1. ODREĐIVANJE pH-VRIJEDNOSTI MLIJEKA	9
3.2.2. ODREĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA NIR SPEKTROSKOPIJOM	10
3.2.3. ODREĐIVANJE ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI I UKUPNIH OTOPLJENIH TVARI (TDS) MLIJEKA .	10
3.2.4. ODREĐIVANJE DISTRIBUCIJE VELIČINE ČESTICA	11
3.2.5. PRIPREMA UZORAKA MLIJEKA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA DPPH I FRAP METODOM TE ZA ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLA S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU	11
3.2.5.1. <i>POSTUPAK ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA DPPH METODOM</i>	11
3.2.5.2. <i>POSTUPAK ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA FRAP METODOM</i>	12
3.2.5.3. <i>POSTUPAK ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU</i>	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. pH VRIJEDNOSTI MLIJEKA MAGARICE	16
4.2. TDS I ELEKTRIČNA VODLJIVOST MLIJEKA MAGARICE	17
4.3. NIR SPEKTROSKOPIJA MLIJEKA MAGARICE.....	18
4.4. DISTRIBUCIJA VELIČINE ČESTICA MLIJEKA MAGARICE.....	20
4.5. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL MLIJEKA MAGARICE ODREĐEN DPPH METODOM.....	21
4.6. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL MLIJEKA MAGARICE ODREĐEN FRAP	

METODOM.....	22
4.7. UKUPNI FENOLI MLIJEKA MAGARICE ODREĐENI S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU	23
5. ZAKLJUČCI.....	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Mlijeko magarice ima svojstva koja ga čine visokokvalitetnom namirnicom, a koristi se i kao dodatak različitim pripravcima u kategoriji prehrambenih suplemenata te farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka. Konzumacija mlijeka, ljudima je poznata još iz davnina. U doba starih Egipćana, za Kleopatru se govorilo da se kupa u tom mlijeku što je koristila kao tretman za njegu kože. U današnje vrijeme, ovo se mlijeko pojavljuje kao jedan od ključnih sastojaka u kozmetici za njegu kože zahvaljujući odlučnoj reputaciji za hidrataciju. I stari Grci su poznavali vrijednosti tog mlijeka pa ga je Hipokrat koristio, u medicini, za liječenje raznih bolesti poput otrovanja i otvorenih rana. U usporedbi s ostalim vrstama mlijeka koja se koriste za ljudsku potrošnju, mlijeko magarice jer najbližnije humanom mlijeku prema svojem sastavu i svojstvima. Stoga je dobra zamjena za ljudsko mlijeko što se pokazalo i kroz povijest kada je mlijeko magarice bilo korišteno za hranjenje dojenčadi. Mlijeko magarice ima puno niži potencijal za izazivanje alergijskih reakcija, vrlo često, mogu piti ljudi koji ne podnose kravlje mlijeko. Osim što se smatra najlakše probavljivim mlijekom, ovo mlijeko ima i optimalan omjer kazeina i proteina sirutke te je bogat izvor esencijalnih nutrijenata. Istraživanja su potvrdila da mlijeko magarice pomaže u liječenju humanih bolesti povezanih s imunim sustavom jer stimulira stvaranje moćnih stanica imunološkog odgovora te tako pomaže smanjiti upalne reakcije u tijelu. Također su dokazana značajna baktericidna svojstva pa pozitivno utječe na smanjenje želučanih bolesti uzrokovanih bakterijama i virusima. Uz to može pomoći i u poticanju rasta bakterija pogodnih za crijeva i olakšanu probavu. Najveći nedostatak ovog mlijeka je cijena budući da su broj, a i veličina farmi koje uzgajaju magarice u tu svrhu ograničeni. Također, magarica tijekom laktacije, u dvije godine, može izdvojiti samo oko 40 litara mlijeka pa cijena seže od 200 do 600 kuna po litri. S druge strane najveću posebnost mlijeka magarice čine imunoaktivni sastojci, odnosno antioksidansi koji su osjetljivi na visoke temperature te im se zagrijavanjem u vidu pasterizacije ili sterilizacije sastav znatno narušava. Stoga to nije najbolja opcija za produljivanje trajnosti tog mlijeka. Mlijeko magarice preporuča se konzumirati svježe, neposredno nakon mužnje. U slučaju da to nije moguće, najbolje ga je zamrznuti. U skladu s tom pretpostavkom cilj ovog rada bio je pratiti utjecaj zamrzavanja mlijeka magarice, kroz 6 mjeseci, na fizikalno kemijska svojstva te antioksidacijski potencijal mlijeka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FIZIKALNA SVOJSTVA MLIJEKA MAGARICE

Gustoća mlijeka magarice varira između 1029 i 1037 kg m⁻³, no vrijednost se tijekom laktacije ustaljuje na otprilike 1032 kg m⁻³. Točka ledišta varira između -0,508 i -0,540 °C. Točka ledišta je izravno povezana s koncentracijom tvari topivih u vodi pa je utjecaj proteina i masnih globula na nju zanemariv tako da glavni utjecaj imaju laktoza i mineralne tvari. Mlijeko magarice ima pH vrijednost u prosjeku od 6,9 do 7,2 (Ivankovic i sur., 2016). U odnosu na njega, kravlje mlijeko ima nešto nižu pH vrijednost što se pripisuje većem udjelu kazeina i fosfatnih soli. Energetska vrijednost mlijeka magarice kreće se u rasponu 1607 – 1803 kJ/l što je manje od kravljeg i humanog zbog manjeg udjela mliječne masti (Ivanković i sur., 2014). U tablici 1 prikazana je usporedba fizikalnih svojstava različitih vrsta mlijeka. Senzorska svojstva mlijeka magarice dosta se razlikuju od kravljeg mlijeka: svjetlije je boje, rjeđe konzistencije, a okusom je slađe.

Tablica 1. Usporedba fizikalnih svojstava različitih vrsta mlijeka (Čagalj i Brezovečki, 2013; Brezovečki, 2014)

	Mlijeko magarice	Kobilje mlijeko	Kravlje mlijeko	Humano mlijeko
Točka ledišta (°C)	od -0,508 do -0,540	od -0,525 do -0,554	od -0,512 do -0,550	/
pH (pri 25 °C)	6,9 – 7,2	7,2	6,6	6,8

2.2. KEMIJSKA SVOJSTVA I SASTAV MLIJEKA MAGARICE

Mlijeko magarice je albuminsko mlijeko slatkastog okusa i rijetke konzistencije. Sadrži znatan udio laktoze, no manje proteina i mliječne masti nego mlijeko preživača, a bogato je vitaminima i mineralima (Ivanković i sur., 2015). Laktoza, uz vrlo mali udio glukoze i galaktoze, glavni je ugljikohidrat ovog mlijeka te mu daje specifičan, slatkast okus. Karakterizira ga nizak udio masti, a masnokiselinski sastav odlikuje povoljnim omjerom zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Udio proteina u mlijeku je nizak, ali koncentracija lizozima, u mlijeku magarice, znatno je veća nego u kravljem, kozjem ili humanom mlijeku.

Tablica 2. Usporedba prosječnih vrijednosti kemijskog sastava mlijeka magarice, kobiljeg, kravljeg, kozjeg i humanog mlijeka (Fox i sur. 2000; Salimei i Fantuz 2012; Claeys i sur. 2014)

	Suha tvar (%)	Mliječna mast (%)	Ukupni proteini (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)
Mlijeko magarice	10,8	1,5	2,0	7,4	0,5
Kobilje mlijeko	10,8	1,8	2,5	6,2	0,5
Kravlje mlijeko	12,2	3,3 - 4,7	3,4	4,6 – 4,8	0,7
Kozje mlijeko	12,3	4,1 – 4,5	2,9	4,3 – 4,7	0,8
Humano mlijeko	12,5	3,46	0,9 – 1,9	6,3 – 7,0	0,2 – 0,3

Kemijski sastav svakog mlijeka je, u principu, jednak, ali razlikuje se prema udjelu osnovnih komponenata. Mlijeko magarice gotovo je jednakog sastava i s jednakim udjelima kao i kobilje mlijeko. U odnosu na ostala mlijeka koja se koriste za ljudsku potrošnju, velika je sličnost sastava mlijeka magarice s humanim mlijekom. Stoga se humano mlijeko smatra prikladnim za prehranu male djece. Iz tablice 2 vidljivo je da je udio laktoze i proteina u mlijeku magarice i humanom mlijeku vrlo sličan. S druge strane udio mliječne masti u mlijeku magarice znatno je manji nego u humanom ili kravljem mlijeku. Također, mlijeko magarice uz kobilje, u odnosu na ostala mlijeka, ima niži postotak suhe tvari. Suhu tvar čine sastojci koje mlijeku daju nutritivne i energetske karakteristike. Mlijeko magarice sadrži nešto manje mineralnih tvari u odnosu na kravlje mlijeko što je vidljivo iz postotaka pepela u mlijeku.

2.2.1. Mliječna mast

Mliječna mast se smatra najvažnijom komponentom mlijeka zbog svoje hranjive vrijednosti te senzorskih i fizikalnih svojstava. Uz to proizvodima daje bogat okus i glatkoću strukture. Mliječna mast je izvor energije, esencijalnih masnih kiselina i vitamina topivih u mastima (A, D, E, K). Unutar određene vrste, moguće su varijacije u udjelima mliječne masti u mlijeku

ovisno o periodu i redosljedju laktacije, hranidbi, načinu mužnje, okolišnim uvjetima i individualnim karakteristikama životinja. Mlijeko magarice sadrži nizak udio mliječne masti, ujedno i najniži od svih drugih vrsta muznih životinja, no odlikuje ga vrlo povoljan omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. U prosjeku udio mliječne masti u mlijeku magarice iznosi 1,5 %. Struktura mliječne masti nalikuje obliku globula čiji je promjer 2 – 3 μm . Mlijeko magarice karakterizira niža koncentracija kolesterola u usporedbi s ostalim vrstama mlijeka, u prosjeku 5,0 – 8,8 mg 100 g⁻¹ mlijeka, niži udio triacilglicerola (oko 80 %) te viši udio slobodnih masnih kiselina, u ukupnom udjelu masti, koji iznosi oko 10 % (Samaržija, 2016). Također sadrži manje zasićenih masnih kiselina (do 67 %) u odnosu na kravlje mlijeko, a više u usporedbi s humanim i kobiljim mlijekom. Najzastupljenije zasićene masne kiseline u mlijeku magarice su kaprilna (C_{8:0}), kaprinska (C_{10:0}), palmitinska (C_{16:0}) te u malim količinama miristinska (C_{14:0}) (Doreu i Boulot, 1989). Od ukupnih nezasićenih masnih kiselina osobito je bogato linolnom (C_{18:2}) ili ω -6 i α -linolenskom kiselinom (ALA; C_{18:3-3}) ili ω -3 kiselinama (Samaržija, 2016). Istraživanja su potvrdila da je linolna kiselina (C_{18:2}) u ljudskom organizmu prekursor prostaglandina E koji prevenira gastrične ulkuse.

2.2.2. Proteini

Proteini mlijeka mogu se podijeliti u dvije skupine. Jednoj skupini pripadaju kazeini, a drugoj proteini sirutke. Prema udjelu kazeina i proteina sirutke razlikuju se kazeinska mlijeka s približno 80 % kazeina (kravlje, kozje, ovčje mlijeko) te albuminska mlijeka gdje je udio kazeina oko 50 %, a proteina sirutke do 40 % (mlijeko magarice i kobile). Prosječni sadržaj ukupnih proteina u mlijeku magarice iznosi 1,42 g 100 mL⁻¹ što je vrlo slično humanom mlijeku u kojem taj sadržaj iznosi oko 1,63 g 100 mL⁻¹. To je otprilike dvostruko manje u odnosu na kravlje mlijeko koje sadrži oko 3,25 g 100 mL⁻¹ ukupnih proteina u mlijeku (Martini, 2017). Prosječni udio ukupnih proteina, kazeina te proteina sirutke u mlijeku magarice, kobiljem, kravljem i humanom mlijeku prikazan je u tablici 3. Kazeinska micela mlijeka magarice građena je od pet vrsta kazeina (α_{s1} , α_{s2} , α_{s3} , β i κ - kazein). Kazein iz kobiljeg, kravljeg, kozjeg, ovčjeg te mlijeka magarice razgrađuje se sličnim mehanizmima, no količina neprobavljenog kazeina u mlijeku magarice, humanom i kobiljem mlijeku dvostruko je manja u odnosu na kravlje i kozje mlijeko. To potvrđuje činjenicu da se mlijeko magarice razgrađuje dvostruko brže nego kravlje mlijeko (Dureau i Martin Rosset, 2011). Proteini sirutke sadrže veći udio esencijalnih aminokiselina, a najvrjednijim se smatra α -laktalbumin koji je glavni protein majčinog mlijeka te je vrlo bitan za rast dojenčadi i rani razvoj mozga (Božanić i sur.,

2017; Tratnik, 2013). Mlijeko magarice sadrži i β -laktoglobulin, kojeg humano mlijeko ne sadrži, albumine krvnog seruma, imunoglobuline (Ig), laktoferine (LF) i lizozime (Liz).

Tablica 3. Usporedba udjela (%) ukupnih proteina, kazeina i proteina sirutke mlijeka magarice, kobiljeg, humanog i kravljeg mlijeka (Walstra i sur. 1999; Fox i sur. 2000)

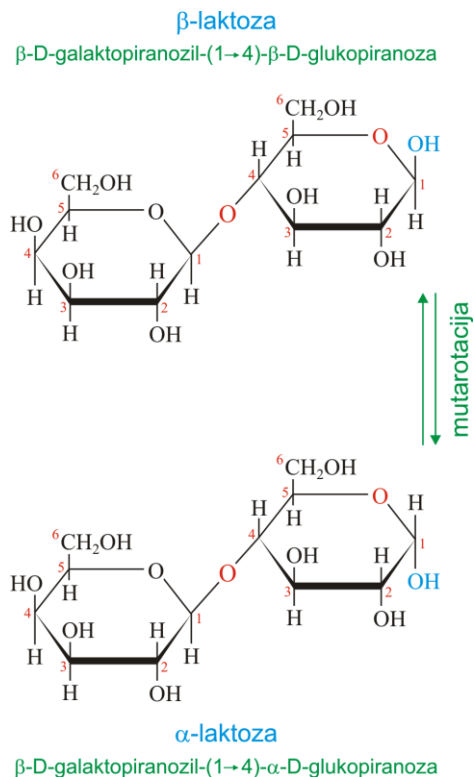
	Ukupni proteini (%)	Kazein (%)	Proteini sirutke (%)
Mlijeko magarice	2,0	1,0	1,0
Kobilje mlijeko	2,5	1,3	1,2
Humano mlijeko	0,9 – 1,9	0,5	0,8
Kravlje mlijeko	3,4	2,7	0,6

U mlijeku magarice laktoferin čini više od 2 % ukupne proteinske frakcije. On je prema svojoj kemijskoj građi glikoprotein, a u strukturi sadrži željezo. Kapacitet laktoferina za vezanje Fe u mlijeku magarice sličan je kao i u humanom mlijeku, a veći je u usporedbi s kapacitetom kravljeg mlijeka. Nedavna istraživanja su potvrdila da laktoferin, uz ostale proteine sirutke, ima snažno djelovanje protiv enterovirusa tipa 5 koji je česti uzročnik infekcije humanog gastrointestinalnog sustava. Također je utvrđena i jaka inhibicijska aktivnost laktoferina prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama (Samaržija, 2016). Uz to postoji još jedan važan protein u mlijeku magarice s jakim antimikrobnim djelovanjem, a to je lizozim. On čini čak 21 % proteina sirutke (Fantuz i sur., 2001) Zahvaljujući svojem enzinskom, ali i neenzimskom djelovanju, lizozim djeluje antimikrobno na bakterije, virusi i gljivice. Ima pozitivan učinak na proces regeneracije tkiva nakon upala i antialergijsko djelovanje u smislu prepoznavanja i izlučivanja alergena iz organizma što smanjuje alergijsku reakciju.

2.2.3. Laktoza

Laktoza ili mliječni šećer glavni je disaharid mlijeka sastavljen od D-glukoze i D-galaktoze. Prisutna je u dva izomerna oblika (α -laktoza i β -laktoza). Često ta konfiguracija nije stabilna te dolazi do mutarotacije iz jednog izomera u drugi (slika 1). Udio laktoze u mlijeku magarice u prosjeku iznosi 7,4 %, slično kao u humanom mlijeku, što je značajno više od udjela laktoze u mlijeku ostalih mliječnih životinja. Bez obzira na to energetska vrijednost znatno je niža u

usporedbi s drugim vrstama mlijeka, a to se pripisuje maloj količini mliječne masti (Salimei, 2016). Zahvaljujući visokom udjelu laktoze, mlijeko magarice ima izraženo slatkasti okus. Laktoza je važan izvor galaktoze u ljudskom organizmu, potiče rast crijevne mikroflore te može djelovati kao probiotik (Yvon i sur., 2016). Također potiče crijevnu apsorpciju kalcija i fosfora što je važno za mineralizaciju fosfora i prevenciju osteoporoze (Martini i sur., 2017).



Slika 1. Mutarotacija laktoze u mlijeku (Generalić, 2013)

2.3. PREHRAMBENA I ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST MLIJEKA MAGARICE

Mlijeku magarice pripisuju se mnogi terapijski i blagotvorni učinci. Visoka nutritivna vrijednost mlijeka magarice potječe od bogatstva višestruko nezasićenih masnih kiselina, posebno omega-3 i omega-6, a njihov unos pridonosi očuvanju zdravlja srca, krvožilnog sustava, prevenciji nastanka upalnih procesa i ateroskleroze, poboljšava cirkulaciju, snižava razinu kolesterola u krvi, potiče oporavak kože i imunosti odgovor. Zbog visokog udjela nutritivno najvrjednijih proteina sirutke u ukupnim proteinima mlijeka magarice i optimalnog

omjera kazeina i proteina sirutke, mlijeko magarica kraće se zadržava u želucu te se brže probavlja u odnosu na druga mlijeka. Visoku probavljivost mlijeka magarice uz to pomaže i velika količina laktoze, koja uravnotežuje crijevnu mikrofloru te potpomaže apsorpciju kalcija pa tako posredno poboljšava mineralizaciju kostiju. Najistaknutiji zdravstveni učinak mlijeka magarice očituje se u izraženu antimikrobnom djelovanju zahvaljujući visokoj koncentraciji lizozima, laktoferina i laktoperoksidaze, koji pokazuju jako inhibitorno djelovanje na gram pozitivne te čak i neke patogene bakterije. Antioksidacijski potencijal jedan je od ključnih pokazatelja kojim možemo pratiti zdravstvenu vrijednost mlijeka, a očituje se količinom i aktivnošću antioksidansa u mlijeku. Antioksidansi su spojevi koji vrlo lako oksidiraju te sprječavaju i usporavaju oksidaciju drugih molekula, a u organizmima su prisutni u vrlo maloj količini u odnosu na tvar koja se oksidira. Reakcije oksidacije su neophodne za stvaranje energije, no ponekad zbog njih dolazi do neravnoteže unutar organizma i stvaranja takozvanog oksidativnog stresa koji potom uzrokuje nepoželjne promjene unutar organizma, a posljedično i različite bolesti. Zbog toga je vrlo važna uloga antioksidansa koji to mogu spriječiti i tako pozitivno utjecati na organizam. Mehanizam reakcije oksidacije temelji se na prijenosu elektrona ili vodika na oksidacijsko sredstvo pri čemu nastaju vrlo reaktivni slobodni radikali koji potiču lančanu reakciju u stanici. Uklanjanjem intermedijera tih lančanih reakcija, antioksidansi usporavaju ili sprječavaju oksidacijske reakcije. Mnogi antioksidansi u organizam se unose iz hrane, od kojih su najpoznatiji polifenoli, fenoli, vitamini, minerali, flavonoidi. Također, velik broj spojeva prisutnih u mlijeku ima dokazana antioksidacijska svojstva. Neki od njih su kazein, proteini sirutke, vitamini A, E i C, laktoferin, aminokiseline koje sadrže sumpor. Dokazano je da antioksidacijski potencijal mlijeka ovisi o načinu ishrane životinje pa tako životinje koje se hrane slobodnom ispašom, u većini slučajeva, imaju veću koncentraciju fenolnih spojeva u mlijeku jer se u svježem bilju nalaze bioaktivni spojevi koji pozitivno utječu na sastav mlijeka. Osim načina ishrane, na koncentraciju fenolnih spojeva u mlijeku utječe i godišnje doba, odnosno sušno ili kišno razdoblje. U razdoblju suše, dolazi do abiotičkog stresa kod biljaka, povećava se proizvodnja sekundarnih metabolita, kojima pripadaju i fenolni spojevi te konzumacijom hrane u vrijeme suše, posljedično u mlijeku raste koncentracija fenola (Chávez-Servín i sur., 2018). Također, da bi se sačuvala sva prehrambena i zdravstvena vrijednost mlijeka magarice, vrlo je bitan način čuvanja, odnosno skladištenja mlijeka nakon mužnje do trenutka konzumiranja. Zbog toplinske osjetljivosti visokovrijednih sastojaka, najbolje ga je konzumirati svježe, neposredno nakon mužnje ili u što kraćem roku nakon mužnje. Kraće vrijeme može se čuvati u zatvorenim spremnicima pri temperaturi

hladnjaka uz održavanje odgovarajuće čistoće i higijene. U slučaju da se ne konzumira odmah, najbolje ga je zamrznuti. Ako je namijenjeno uporabi neposredno nakon mužnje treba ga profiltrirati kroz višeslojnu mljekarsku maramu radi uklanjanja eventualno prisutnih nečistoća. Ako se mlijeko planira skladištiti, obično se pakira u plastične ili staklene posude koje moraju biti sterilne. Proces punjenja mora se odvijati uz pridržavanje pravila hladnog lanca uz propisanu higijenu. Trajnost takvog mlijeka je tri dana, a za duže čuvanje se zamrzava na temperature od -18 °C. Prije konzumacije mlijeko se treba odmrzavati postupno, a odmrznuto mlijeka preporuča se potrošiti u što kraćem roku.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Pri izradi ovog završnog rada, kao glavna i osnovna sirovina, koristilo se mlijeko magarice donirano od strane OPG Cvetan Mladen. Sirovo mlijeko magarice razdijeljeno je u 6 kiveta tako da je u svaku odmjerenom 10 mL mlijeka te su se ti uzorci mlijeka zamrznuli i svakih mjesec dana provodile su se analize. Osim toga, na početku istraživanja su sve planirane analize provedene i na uzorku sirovog mlijeka. Od laboratorijskog pribora, za izradu eksperimentalnog dijela ovog rada, korištene su odmjerne tikvice, menzure, staklene i falcon kivete s poklopcima, laboratorijske čaše, pipete i propipete, kivete, plastične lađice, metalne žličice, butirometar, boca špricaljka, staničevina te zaštitne rukavice.

Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu:

Za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom:

1. $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil, Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom etanolu (KEFO, Hrvatska)

Za određivanje antioksidacijskog potencijala FRAP metodom:

1. 10 mmol TPTZ – (2,4,6-tripiridil-s-triazin, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljen u 40 mmol HCl (B) (KEFO, Hrvatska)
2. 20 mmol željezo (III)-klorid heksahidrat, FeCl₃ x 6 H₂O (C) (Lach-Ner, Hrvatska)
3. 0,3 M acetatni pufer (A) (Gram-Mol, Hrvatska)

4. Navedene kemikalije iskorištene su za pripremu FRAP reagensa koji se sastojao od 25 mL 0,3 M acetatnog pufera (A), 2,5 mL 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol HCl (B) i 2,5 mL 20 mmol $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (C), pomiješanih u omjeru A:B:C=10:1:1 (v/v).

Za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteau:

1. Folin Ciocalteau reagens – razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10 (SigmaAldrich, Njemačka)
2. 7,5 % (w/v) Natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Gram-Mol, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje pH-vrijednosti mlijeka

Za mjerenje kiselosti uzorka mlijeka magarice, odnosno pH vrijednosti, korišten je laboratorijski pH-metar WTW-ProfiLine pH 3110 tvrtke Xylem Analytics (Weilheim, Njemačka), prikazan na slici 2. Prije početka mjerenja, potrebno je kalibrirati elektrodu pH metra, uranjanjem u otopinu standarda poznate pH vrijednosti te potom isprati destiliranom vodom te osušiti staničevinom. Zatim se elektroda uroni u čašu s uzorkom mlijeka te se očita vrijednost s ekrana, nakon što se ista ustali. Nakon završenog mjerenja, elektroda se ponovno ispere destiliranom vodom i obriše staničevinom te se uroni u otopinu kalijeva klorida gdje se čuva do sljedećeg mjerenja.



Slika 2. Laboratorijski pH-metar WTW-ProfiLine pH 3110 tvrtke Xylem Analytics (Weilheim, Njemačka (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje strukturnih promjena NIR spektroskopijom

Uzorci mlijeka magarice snimani su blisko-infracrvenom spektroskopijom (eng. Near Infrared Spectroscopy) u blisko-infracrvenom području ($\lambda = 904 - 1699$ nm) primjenom NIR instrumenta (NIR – 128 – 1.7 – USB/6.25/50 μm Control Development Inc., SAD) s instaliranim programom Control Development Spec32 (Control Development Inc., SAD). Prije snimanja, uzorak je potrebiti razrijediti 10 puta s destiliranom vodom.

3.2.3. Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) mlijeka

Za određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari korišten je konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska). Prije svakog mjerenja uzorci su razrijeđeni destiliranom vodom 10 puta. Mjerenje se provodi na način da se elektroda uroni u uzorak te se s uređaja očita vrijednost električne vodljivosti, izražene kao $\mu\text{S cm}^{-1}$ i TDS-a, izraženog u mg L^{-1} . Nakon uporabe, elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom i osušiti staničevinom.

3.2.4. Određivanje distribucije veličine čestica

Distribucija veličine čestica mjerena je na uređaju Zetasizer Ultra ZS (Malvern Panalytical Ltd, United Kingdom), a podaci su obrađeni programom Zetasizer Ultra-Pro ZS Xplorer. To je optička metoda slična spektrofotometru, a princip rada uređaja za određivanje raspodjele veličine čestica bazira se na odstupanju laserske zrake tijekom prolaska kroz vodenu suspenziju čestica mlijeka. Određivanje raspodjele veličine čestica provedeno je s obzirom na intenzitet pojave čestica određene veličine u uzorku. (Marinčić, M., 2017).

3.2.5. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH i FRAP metodom te za određivanje udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

U 1 g mlijeka dodano je 10 mL 1M HCl-a pripremljenog u 95%-tnom etanolu (v/v, 15/85) u falcon epruveti nakon čega slijedi inkubacija u vodnoj kupelji (WNE 14, Memmert, Njemačka) na 30°C/1h uz uključenu tresilicu. Potom se smjesa centrifugira (ROTINA 380 R, Hettich zentrifugen, Njemačka) na 7800 g 15 min / 5°C te se nakon centrifugiranja supernatant pipetiranjem odvoji od nastalog taloga. Dobiveni supernatant moguće je čuvati u zamrzivaču na -20°C do daljnje upotrebe.

3.2.5.1. *Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala DPPH metodom*

DPPH metoda je široko primjenjivana metoda koja služi za određivanje potencijala hvatanja slobodnih radikala od strane antioksidativnih spojeva. Metoda je razvijena 1958. godine a danas predstavlja standardnu i jednostavnu kolorimetrijsku metoda za određivanje antioksidativnih svojstava čistih spojeva (Mishra i sur., 2012).

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom potrebno je svaki put pripremiti svježju $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ otopinu DPPH reagensa. Za pripremu otopine potrebno je otopiti 0,00237 g DPPH u 100 mL 95 %-tnog etanola.

Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala DPPH metodom

0,1 ml prethodno dobivenog uzorka pomiješano je s 3,9 mL DPPH. Smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi, na mračnom mjestu tijekom 30 minuta, nakon čega je očitana apsorbancija na 517 nm. Slijepa proba sadrži umjesto uzorka otapalo, odnosno 95 %-tni etanol (Sangsopha i sur., 2019).

Postotak redukcije slobodnih radikala u otopini proporcionalan je smanjenju apsorbancije mjerene otopine, a računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ DPPH redukcije radikala} = (A_0 - A_S) / A_0 \times 100 \quad [1]$$

gdje je A_0 – apsorbancija izmjerena na valnoj duljini 517 nm za slijepu probu

A_S – apsorbancija izmjerena na valnoj duljini 517 nm za uzorak



Slika 3. Svježe pripremljen DPPH reagens (vlasita fotografija)

3.2.5.2. Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala FRAP metodom

FRAP je brza, jednostavna i jeftina kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje antioksidacijskog potencijala. Glavna reakcija odvija se između supstrata (donor elektrona) i iona Fe^{3+} (akceptor elektrona), pri čemu dolazi do nastajanja iona Fe^{2+} .

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

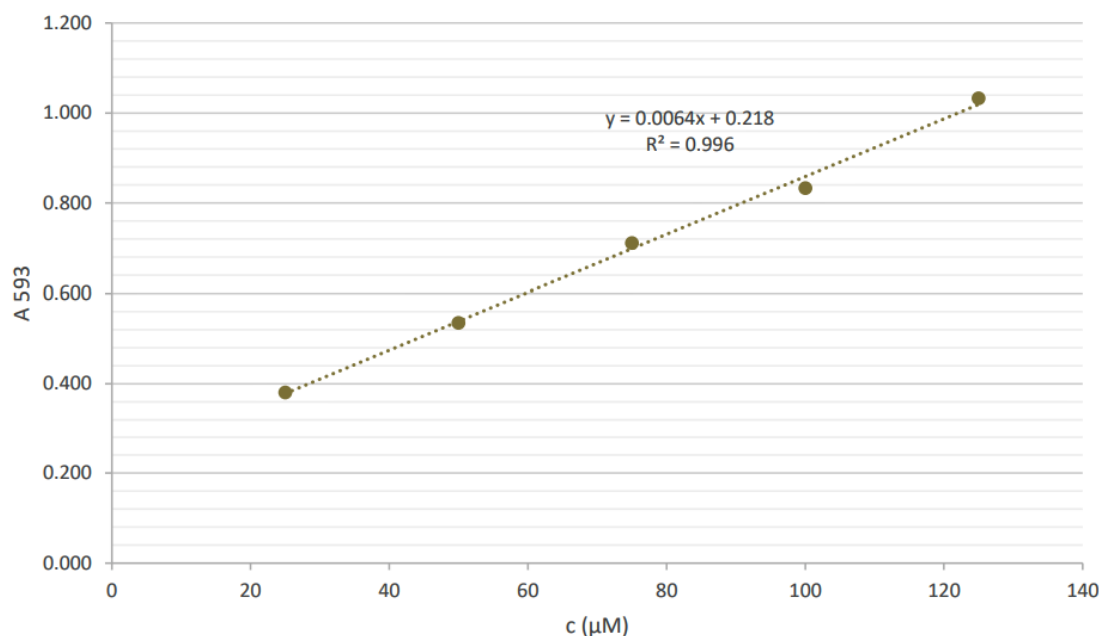
Svaki put, prije analize, potrebno je pripremiti svježi FRAP reagens koji se sastoji od 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol HCl i 2,5 mL 20 mmol $FeCl_3 \times 6 H_2O$ u 10:1:1. Za pripremu TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) potrebno je odvagati 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuniti do oznake s 40 mM HCl. Acetatni pufer i željezo (III) klorid heksahidrat nije potrebno svaki put svježe pripremati. FRAP reagens se zatim inkubira na 37 °C/30 minuta.

Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala FRAP metodom

Po završetku inkubacije 0,6 mL supernatanta pomiješa se s 3,4 mL FRAP-a. Takva smjesa ponovno se inkubira na 37 °C/60 minuta. Nakon toga se očita apsorbancija pri valnoj duljini 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim supernatanta umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. U ovom slučaju je to otopina 1M HCl pripremljena u 95 % etanolu (v/v, 15/85). Rezultati mjerenja u konačnici su izraženi kao ekvivalent koncentracije standarda Trolox (μM).

Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu

Za izradu baždarnog dijagrama pripremila se otopina 2 mmol L^{-1} Trolox-a od koje su se pripremila razrjeđenja u koncentracijama: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetiralo: 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 1,25; 5; 7,5 mL alikvot otopine Trolox-a te se do oznake nadopunilo destiliranom vodom. Daljnji postupak određivanja je identičan protokolu za određivanje antioksidacijskog potencijala FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 0,6 mL uzorka dodalo 0,6 mL prethodno pripremljene koncentracije Troloxa. Rezultati se, u konačnici, izražavaju kao mg Trolox ekvivalenta mL^{-1} (Sangsopha i sur., 2019). Baždarni dijagram za kvantifikaciju antioksidacijskog potencijala FRAP metodom prikazan je na slici 4.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji Troloxa (μM) za određivanje antioksidacijskog potencijala prema FRAP metodi

3.2.5.3. Postupak određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

Folin-Ciocalteu metoda, predstavlja praktičnu, široko korištenu metodu za kvantificiranje ukupnih fenolnih spojeva u različitim ekstraktima. Ova metoda zasniva se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućava mjerenja u vidljivom djelu spektra (Antolovic i sur., 2002).

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu, kemikalije i reagensi se pripremaju prema Singleton i sur. (1999). Folin Ciocalteu reagens potrebno je svaki put svježe pripremiti na način da se pomiješa s destiliranom vodom u omjeru 1:10, prikazan je na slici 5. Također je potrebno pripremiti i 7,5 % (w/v) otopinu Na-karbonata.

Postupak određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

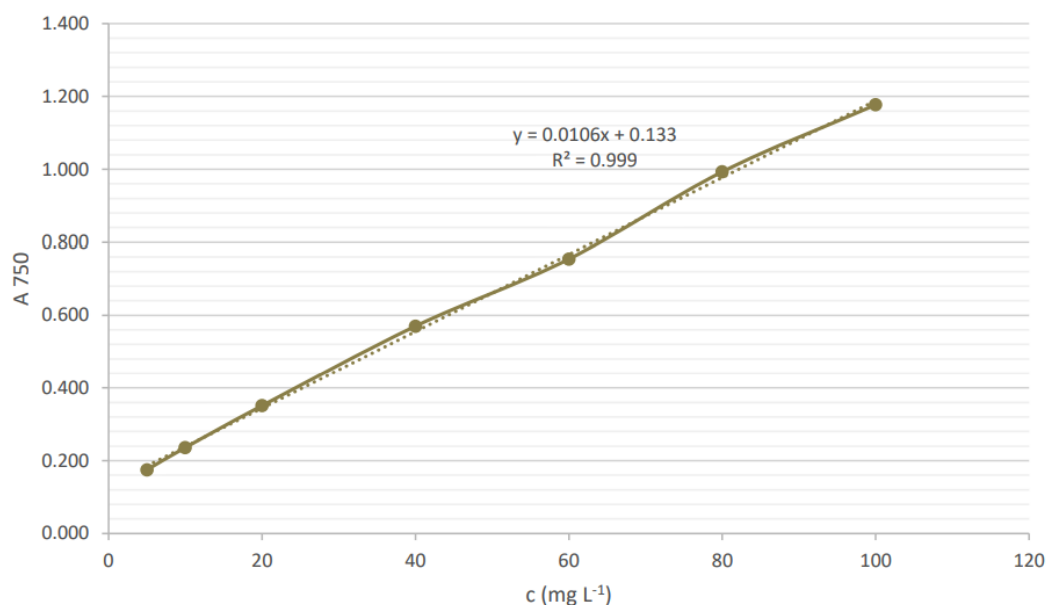
Nakon toga se u epruvetu redom dodaje 0,4 mL dobivenog supernatanta, 1,6 mL Folin Ciocalteu reagensa te nakon otprilike 5 minuta 2 mL natrijeva karbonata (7,5 % (w/v)). Smjesa se potom homogenizira na vortexu i ostavi inkubirati na sobnoj temperaturi 2 sata. Zatim se očita apsorbancija na 750 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka mlijeka odnosno supernatanta, a umjesto njega se dodaje voda. Rezultati se u konačnici izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline po mL.



Slika 5. Svježe pripremljen Folin Ciocalteu reagens (vlastita fotografija)

Postupak izrade baždarnog dijagrama za metodu sa reagensom po Folin Ciocalteu

Za izradu baždarnog dijagrama korišten je standard galne kiseline (GAL) početne koncentracije 125 mg L^{-1} od kojeg su pripremljena točno određena razrjeđenja kako bi se dobile koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 125 mg L^{-1} . Sljedeće faze izrade baždarnog dijagrama jednake su navedenom protokolu za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocaltau. Jedina razlika jest što je umjesto 0,4 mL ekstrakta dodavano 0,4 mL galne kiseline poznate koncentracije. Na temelju očitanih vrijednosti kreiran je baždarni dijagram, prikazan na slici 6, te je dobivena jednadžba pravca pomoću koje su izračunati udjeli ukupnih fenola u uzorcima mlijeka.



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm o koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1}) za određivanje ukupnih fenola

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu cilj je bio ispitati na koji način se mijenjaju fizikalno kemijska svojstva (pH, TDS i električna vodljivost, NIR, gustoća i veličina čestica) i antioksidacijski potencijal mlijeka magarice koje je skladišteno zamrzavanjem u vremenskom razdoblju od 6 mjeseci. Kroz tih 6 mjeseci svakih mjesec dana ponavljala su se ista mjerenja i analize te će na taj način biti prikazani rezultati u ovom poglavlju.

4.1. pH-VRIJEDNOSTI MLIJEKA MAGARICE

U tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja kiselosti mlijeka magarice, odnosno pH vrijednosti izmjerene u svježem mlijeku i u zamrznutim uzorcima mlijeka koji su skladišteni kroz određena razdoblja.

Tablica 4. Promjena u pH vrijednosti mlijeka magarice ovisno o duljini čuvanja (1-6 mjeseci) u zamrzivaču

Uzorak	pH
SVJEŽE	7,35
1. MJ	7,46
2. MJ	7,52
3. MJ	7,62
4. MJ	7,64
5. MJ	7,75
6. MJ	7,79

Iz eksperimentalno izmjerenih podataka vidljivo je da pH-vrijednost mlijeka magarice, kroz duže razdoblje skladištenja, bilježi blagi porast. Najveći skok u vrijednostima je između svježeg mlijeka i mlijeka koje je skladišteno mjesec dana u zamrznutom obliku. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem nalaze se nešto iznad granica literaturnih vrijednosti za mlijeko magarice koje su u rasponu od 6,9 do 7,2 (Constanzo, 2013; Salimei i Fantuz, 2013; Ivanković i sur., 2016). Na temelju svi rezultata može se zaključiti da se mlijeko magarice, prije smrzavanja i tijekom skladištenja u zamrzivaču u trajanju od 6 mjeseci, kreće između pH 7 i 8 što se uvrštava u neutralno, odnosno blago lužnato područje. Relativno uzak interval pH vrijednosti koje mlijeko mora zadovoljiti je zbog puferskog kapaciteta mlijeka, a predstavlja broj molova kiseline ili lužine, potreban da se pH vrijednost uzorka promijeni za jedinicu. Iz tog razloga, najveći nositelji titracijske kiselosti, odnosno puferskog kapaciteta su proteini i soli u mlijeku, konkretno kazein te topljivi fosfati i citrati (Božanić i sur., 2010). Porast pH vrijednosti mlijeka nakon skladištenja zamrzavanjem upućuje na to da je došlo do disocijacije soli kiselina (nitrata, fosfata) te oslobađanja H⁺ iona koje pH-metar detektira prilikom mjerenja pH-vrijednosti.

4.2. TDS I ELEKTRIČNA VODLJIVOST MLIJEKA MAGARICE

Vrijednosti električne vodljivosti ovise o količini otopljenih tvari, posebno kloridnih iona čija je koncentracija proporcionalna tim vrijednostima. S druge strane električna vodljivost obrnuto je proporcionalna s udjelom mliječne masti. TDS i električna vodljivost u korelaciji su sa sastavom mlijeka te svako odstupanje u odnosu na pravilnike ili uobičajene vrijednosti ukazuje na određenu vrstu neispravnosti odnosno nesigurnosti mlijeka. U tablici 5 su prikazani rezultati električne vodljivosti i TDS-a u svježem mlijeku magarice te u mlijeku koje je bilo zamrznuto.

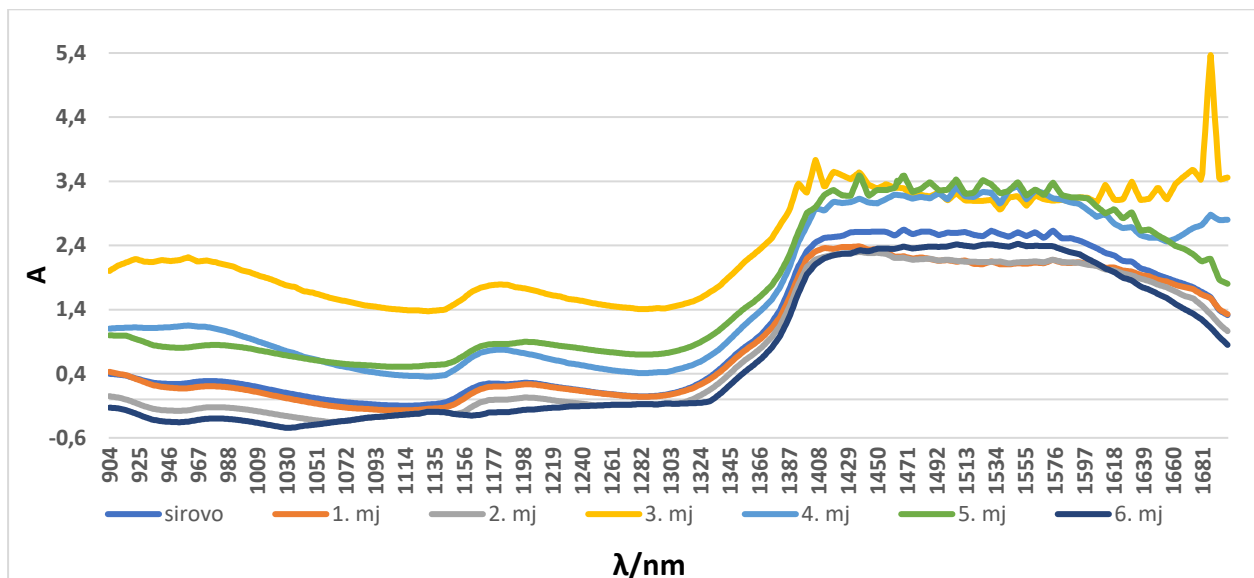
Tablica 5. Izmjerene vrijednosti TDS (mg L^{-1}) i električne vodljivosti ($\mu\text{S cm}^{-1}$) u mlijeku magarice čuvanom u zamrzivaču tijekom 6 mjeseci

Uzorak	TDS (mg L^{-1})	Električna vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
SVJEŽE	172,50	350,50
1. MJ	163,75	321,00
2. MJ	122,55	254,00
3. MJ	155,20	321,50
4. MJ	151,48	304,25
5. MJ	150,80	296,75
6. MJ	190,58	386,75

Ukupne otopljene tvari ili TDS uglavnom čine anorganske soli dok je električna vodljivost sposobnost otopine da provodi električnu energiju, a ta sposobnost ovisi o koncentraciji iona tih soli u otopini. Iz rezultata prikazanih u tablici 5 vidljivo je da smrznuto mlijeko magarice u odnosu na svježe bilježi pad električne vodljivosti i TDS-a. Pad tih vrijednosti bilježi se sve do 6. mjeseca zamrzavanja kada je uslijedio rast pa je vrijednost TDS-a i električne vodljivosti bila viša nego u ishodišnom uzorku svježeg mlijeka. Također je iz rezultata moguće zaključiti da porastom TDS-a raste i električna vodljivost u uzorku što je i očekivano jer s porastom koncentracije otopljenih anorganskih soli u vodi, koje ujedno i provode električnu energiju, raste i električna vodljivost. Porast TDS-a i električne vodljivosti može se povezati i s porastom pH-vrijednosti u mlijeku magarice koje je bilo skladišteno u zamrzivaču 6 mjeseci. Budući da električna vodljivost ovisi o koncentraciji otopljenih tvari u nekom uzorku, porastom disocijacije kiselih soli došlo je do povećanja koncentracije otopljenih tvari u mlijeku, električne vodljivosti te shodno tome i pH-vrijednosti mlijeka magarice skladištenog u zamrzivaču tijekom 6 mjeseci.

4.3. NIR SPEKTROSKOPIJA MLJEKA MAGARICE

NIR spektroskopija nedestruktivna je metoda koja se koristi za detekciju pojedinih spojeva u hrani. Također je moguće promatrati odvajanje faza, stabilnost i kvalitetu emulzije mlijeka i mliječnih proizvoda. Smatra se jednom od najučinkovitijih metoda u otkrivanju patvorenja namirnica. Na slici 6 su prikazani NIR spektri mlijeka magarice koje je bilo skladišteno određeni period u zamrznutom obliku u odnosu na svježi uzorak mlijeka magarice.



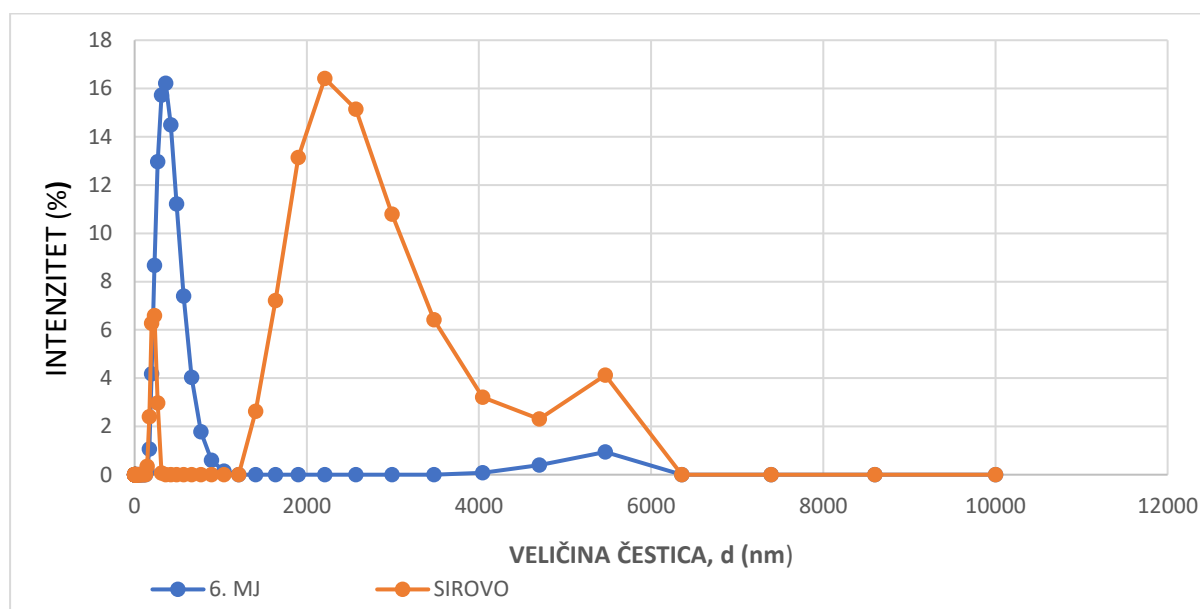
Slika 7. NIR spektri u sirovom mlijeku magarice i u zamrznutim uzorcima mlijeka

Uspoređujući NIR spektre svakog od ovih uzoraka može se zaključiti da su poprilično slični. Svi uzorci bilježe pikove u istom rasponu valnih duljina, bez većih odstupanja. Prvi skok vidljiv je u području valnih duljina od 904 do 980 nm. U tom području pojavljuju se vibracije C – H veza u trećoj regiji (engl. overtone) te O – H veza u drugoj regiji. Sljedeći vidljivi pik na NIR spektrima ovih uzoraka pojavljuje se u valnom području od 1140 do 1240 nm. U području valnih duljina 1140 – 1240 nm pojavljuju se vibracije C – H veza u drugoj regiji te C = O veza u četvrtoj regiji. Vibracije C – H i C = O veza u tom području valnih duljina mogu se povezati s mliječnom masti koja je jedna od glavnih sastojaka mlijeka. Posljednji i najveći skok u prikazanom NIR spektru vidljiv je u području valnih duljina od 1360 do 1696 nm za koje je karakteristično da se pojavljuju vibracije N – H, O – H i C – H veza u prvoj regiji (Badr-Eldin, 2011). Područje tih valnih duljina može se povezati s udjelom proteina u mlijeku (Ottavian i

sur., 2012).

4.4. DISTRIBUCIJA VELIČINE ČESTICA MLIJEKA MAGARICE

Na slici 8 grafički je prikazan intenzitet pojave čestica određene veličine u uzorku, iskazan u postocima.



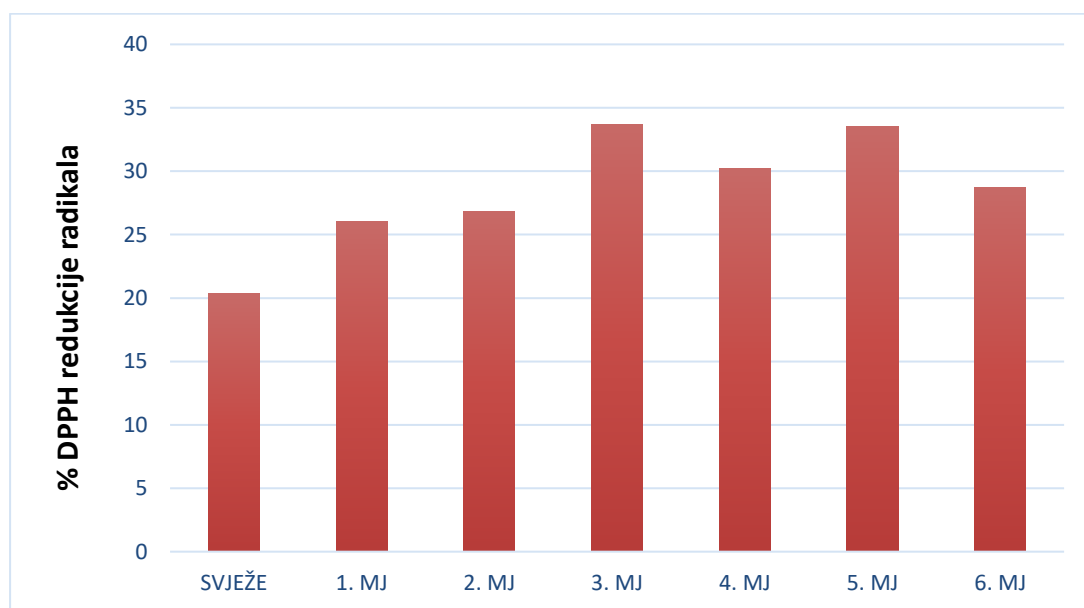
Slika 8. Distribucija veličine čestica u mlijeku koje je bilo zamrznuto 6 mjeseci i u svježem mlijeku magarice

Prvi pik za sirovo mlijeko magarice, na grafičkom prikazu slike 8, vidljiv je u rasponu veličina čestica od 50 do 300 nm u intenzitetu pojavljivanja od 7 %. Veličina tih čestica, u usporedbi s drugim makromolekulama i njihovim promjerima, pripada micelama kazeina te proteinima sirutke. Drugi pik, za sirovo mlijeko magarice, koji je ujedno i najjačeg intenziteta pojavljivanja, pripada česticama veličine od 1500 do 4000 nm. Ta veličina čestica odgovara prosječnim veličinama globula mliječne masti u mlijeku. Plavom bojom na grafičkom prikazu slike 8, prikazan je odnos veličine čestica i njihovog intenziteta pojavljivanja, ali u uzorku mlijeka magarice nakon 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku. Uspoređujući graf za sirovo mlijeko s mlijekom koje je bilo zamrznuto 6 mjeseci, vidljivo je da sirovo mlijeko ima veći raspon veličine čestica i njihovog intenziteta pojavljivanja u odnosu na zamrznuto mlijeko. Na grafičkom prikazu mlijeka magarice nakon 6 mjeseci zamrzavanja pojavljuje se jedan

dominantan pik koji ukazuje na porast udjela čestica manjeg promjera u odnosu na svježe mlijeko. Intenzitet pojavljivanja ostalih veličina čestica je snižen u usporedbi sa svježim mlijekom.

4.5. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL MLIJEKA MAGARICE ODREĐEN DPPH METODOM

DPPH metoda je među najčešće korištenim metodama za određivanje antioksidacijskog potencijala mlijeka i mliječnih proizvoda. DPPH radikal reducira se sparivanjem nesparenog elektrona dušikovog atoma s atomom vodika antioksidansa. Kao produkt reakcije neutralizacije nastaje novi radikal R, a navedeni proces ponavlja se sve do trenutka nastanka neradikalnog produkta (Kedare i sur., 2011). DPPH se smatra stabilnim u otopini te se u metanolu pojavljuje ljubičasto obojenje koje apsorbira svjetlost pri 517 nm. Metoda se zasniva na principu redukcije iona DPPH iz DPPH• u DPPH₂, prilikom primanja vodikovog protona (H) od strane antioksidansa, ljubičasto obojenje prelazi u žuto, pri čemu se smanjuje apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm. Promjena boje prati se spektrofotometrijski i koristi se za određivanje promjene antioksidacijskog potencijala (Mishra i sur., 2012). Temeljna prednost određivanja antioksidacijskih svojstava po DPPH metodi je što će tijekom vremena, DPPH reagirati s cijelim uzorkom, a reagira čak i s relativno slabim antioksidansima.

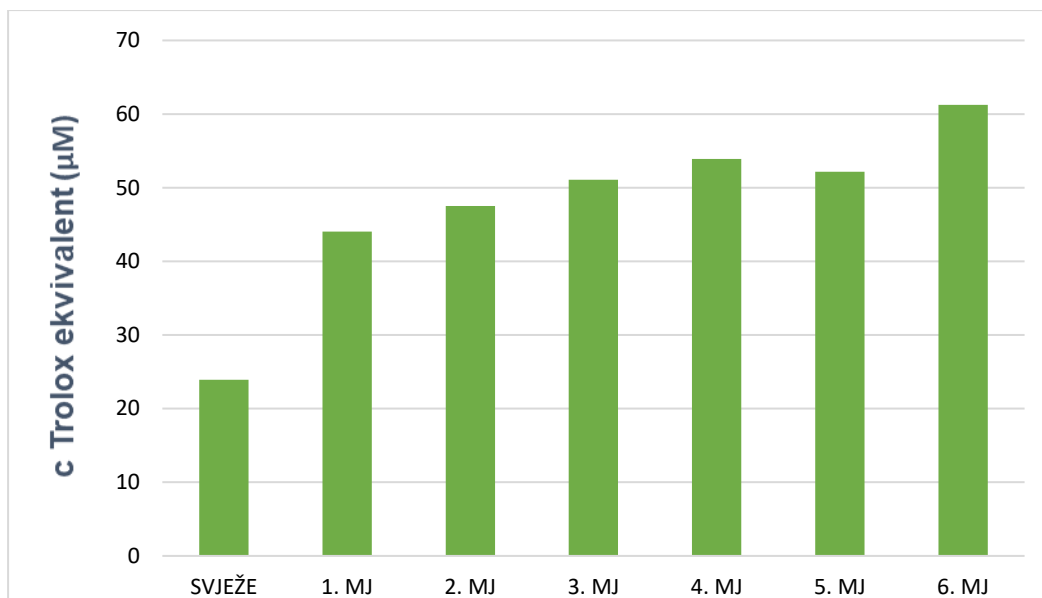


Slika 9. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala mlijeka magarice DPPH metodom izraženi postotkom redukcije slobodnih radikala u svježem mlijeku i u zamrznutom mlijeku tijekom perioda od 6 mjeseci

Analizirajući sliku 9 vidljivo je da se povećava postotak DPPH redukcije slobodnih radikala mlijeka skladištenog zamrzavanjem u odnosu na svježe mlijeko magarice. Rast tog postotka nije linearan, no nisu ni velike razlike u rezultatima. Najviši postotak DPPH redukcije radikala zabilježen je u trećem i u petom mjesecu skladištenja. Uspoređujući svježe mlijeko s mlijekom na kraju skladištenja, odnosno nakon 6 mjeseci zamrzavanja i dalje je veći postotak DPPH redukcije radikala na strani zamrznutog uzorka mlijeka magarice.

4.6. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL MLIJEKA MAGARICE ODREĐEN FRAP METODOM

Uz DPPH metodu, za određivanje antioksidacijskog potencijala, korištena je i FRAP metoda. Zajednička karakteristika dviju navedenih metoda je zasnivanje na mehanizmu redoks reakcija, odnosno izmjeni elektrona. Međutim, razlikuju se po tome što se DPPH metoda temelji na sposobnosti antioksidansa da veže slobodne radikale, a FRAP metoda na sposobnosti antioksidansa da reducira ion željeza, iz Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion. FRAP metoda se smatra relativno brzom, jeftinom te jednostavnom kolorimetrijskom metodom za određivanje antioksidacijskog potencijala. Navedena reakcija redukcije dovodi do promjene boje otopine Fe^{3+} s TPTZ-om koji postaje plav te apsorbira zračenje pri valnoj duljini od 593 nm (Martins i sur., 2012).



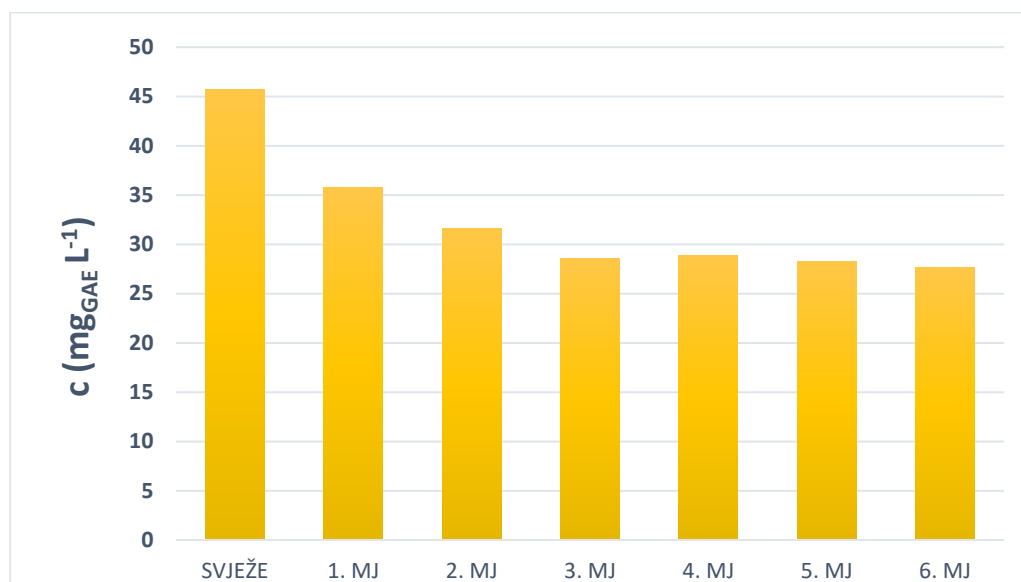
Slika 10. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala mlijeka magarice FRAP metodom izraženi kao ekvivalenti Troloxa u svježem mlijeku i u zamrznutom mlijeku tijekom perioda od 6 mjeseci

Kod određivanja antioksidacijskog potencijala mlijeka magarice FRAP metodom došlo je do porasta koncentracije Troloxa u zamrznutim uzorcima u odnosu na uzorak svježeg mlijeka. Koncentracija Troloxa je u ovom slučaju ekvivalent, što samim time ukazuje na porast antioksidacijskog potencijala u zamrznutom mlijeku magarice. Uspoređujući rezultate dobivene DPPH metodom i FRAP metodom, vidljivo je da su u oba slučaja rezultati slični, odnosno i u jednom i u drugom slučaju došlo je do povećanja antioksidacijskog potencijala zamrzavanog mlijeka magarice u usporedbi sa svježim. Razlikuje ih to što se rezultati kod DPPH metode izražavaju preko postotka, dok se kod FRAP metode izražavaju kao ekvivalenti koncentracije standarda Trolox (μM). Koristeći FRAP metodu vidljivo je da je razlika antioksidacijskog potencijala između svježeg mlijeka i mlijeka magarice koje je bilo zamrznuto 6 mjeseci čak trostruko veća.

4.7. UKUPNI FENOLI MLIJEKA MAGARICE ODREĐENI S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU

Metoda određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu temelji se na reakcije

fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom koji omogućava mjerenje u vidljivom području spektra. U samoj reakciji dolazi do prijenosa elektrona s fenolnih spojeva popraćenog nastankom plavog obojenja otopine čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 750 nm. Folin Ciocalteu se dodaje u suvišku kako bi se osigurala reakcija sa svim fenolnim spojevima, a najčešći spoj koji se koristi kao standard za prikazivanje rezultata je galna kiselina.



Slika 11. Rezultati određivanja ukupnih fenola mlijeka magarice s reagensom po Folin Ciocalteu izraženi kao ekvivalent galne kiseline ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{L}^{-1}$) u svježem mlijeku i u zamrznutom mlijeku tijekom perioda od 6 mjeseci

Iz rezultata prikazanih na slici 11 vidljivo je da zamrznuto mlijeko magarice bilježi pad koncentracije galne kiseline, odnosno pad koncentracije fenola u odnosu na svježe mlijeko. Najveća razlika u koncentraciji fenola je između mlijeka koje je zamrzavano mjesec dana u usporedbi sa svježim mlijekom. Ostali uzorci zamrzanog mlijeka u periodima od dva do šest mjeseci približno su izjednačeni po izmjerenoj koncentraciji galne kiseline koja je ekvivalent fenola, uz blagi pad te koncentracije u ovisnosti o duljini skladištenja zamrznutog mlijeka magarice. Uspoređujući svježe mlijeko magarice s mlijekom koje je bilo zamrznuto 6 mjeseci, pad izmjerene koncentracije galne kiseline, odnosno fenola, je značajniji.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata iz provedenog istraživanja, moguće je zaključiti sljedeće:

1. Tijekom skladištenja mlijeka magarice u zamrznutom obliku, kroz 6 mjeseci, dolazi do povećanja pH-vrijednosti u odnosu na svježe mlijeko magarice
2. Dolazi do porasta vrijednosti ukupne otopljene tvari (TDS) i električne vodljivosti zamrznutog mlijeka magarice skladištenog 6 mjeseci u usporedbi sa svježim mlijekom. Također, porastom TDS-a popratno se povećava i električna vodljivost mlijeka magarice.
3. NIR spektri zamrznutih uzoraka mlijeka gotovo se ne razlikuju od spektra svježeg mlijeka magarice što upućuje na to da nije došlo do promjene sastava mlijeka te do nastanka novih spojeva u mlijeku.
4. Tijekom skladištenja mlijeka magarice u zamrznutom obliku dolazi do povećavanja postotka redukcije slobodnih radikala što je utvrđeno DPPH metodom za određivanje antioksidacijskog potencijala u mlijeku. To upućuje na povećanje aktivnosti antioksidansa u mlijeku magarice nakon zamrzavanja.
5. FRAP metodom je utvrđeno da u zamrznutim uzorcima mlijeka magarice dolazi do povećanja koncentracije Troloxa koja je ekvivalent za antioksidanse u mlijeku što ujedno upućuje na povećanje aktivnosti antioksidansa u mlijeku magarice tokom zamrzavanja.
6. Uz reagens po Folin Ciocalteu utvrđeno je da je u uzorcima mlijeka magarice, koji su skladišteni zamrzavanjem, došlo do smanjenja koncentracije ukupnih fenola u odnosu na svježe mlijeko.
7. Kada se uzmu u obzir sve provedene analize, moguće je zaključiti da je skladištenje mlijeka magarice u zamrznutom obliku izuzetno prihvatljivo. Ne dolazi do narušavanja sastava i kvalitete mlijeka te se čak povećava aktivnost antioksidansa u mlijeku nakon zamrzavanja. Mlijeko magarice, u zamrznutom obliku, moguće je skladištiti 6 mjeseci bez većih promjena na mlijeku uz očuvanje kvalitete i ispravnosti mlijeka.

6. POPIS LITERATURE

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

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

Božanić R., Lisak Jakopović K., Barukčić I. (2018) *Vrste mlijeka*, Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, str. 78 – 92.

Dureau M., Martin-Rosett W. (2011) *Animals that produce dairy foods: Horse*. Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol 1, Fuqay, J.W., Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H., ur., Oxford, Velika Britanija. str. 365 – 373.

Fantuz F., Vincenzetti S., Polidori P., Vita A., Polidori F., Salimei E. (2001): *Study on the protein fractions of donkey milk*. Proceedings of the ASPA Congress – Recent Progress in Animal Production Science, str. 635 – 637.

Ivanković A., Potočnik K., Baban M., Ramljak J. (2015) *Mlijeko kopitara, tehnologija proizvodnje i plasmana*. Sveučilište u Osijeku Poljoprivredni fakultet, Osijek. str. 45 – 53.

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

Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. J Food Sci Technol. 48, 412-422.

Marinčić, M. (2017) *Utjecaj ultrazvuka na taloženje proteina u slatkoj sirutki nakon toplinske obrade*. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb.

Martini M., Altomonte I., Licitra R., Salari F. (2017) *Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk*. Journal of Equine Veterinary Science 65: 33 – 37.

Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. (2011) *Estimation of antiradical properties of*

antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. *Food Chem.* 1036–1043.

Mokrzycki, W.S., Tatol, M. (2011) Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20, 383- 411.

Ottavian, M., Facco, P., Barolo, M., Berzaghi, P., Segato, S., Novelli, E., Balzan, S. (2012) Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevo cheese. *J. Food Eng.* 113, 289–298.

Salimei E. (2016) Animals that Produce Dairy Foods: Donkey, Reference module in Food Sciences Elsevier, str. 1 – 10.

Salimei E., Fantuz F. (2013) Horse and Donkey milk U: Milk and Dairy Products in Human health Production, Composition and Health Park, Y.W., Haenlein, G.F.W., ur., Wiley – Blackwell Publishing, West Sussex, Velika Britanija. str. 594 – 613.

Samaržija D. (2016) Korištenje mlijeka kobile i magarice u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. str. 24 – 50.

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

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299, 152-178.

Tratnik Lj., Božanić R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 23 – 69.

Uniacke-Lowe T., Huppertz T., Fox P.F. (2010) Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal* 20: 609 – 629.

Vázquez, C.V., Villa Rojas, M.G., Ramírez, C.A., Chávez-Servín, J.L., García-Gasca, T., Ferriz 47 Martínez, R.A., García, O.P., Rosado, J.L., López-Sabater, C.M., Castellote, A.I., Montemayor, H.M.A., de la Torre Carbot, K. (2015) Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chem.* 480-486.

Yvon S., Olier M., Leveque M., Jard G., Tormo H., Haimoud-Lekhal D.A. (2018) Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition* 57: 155 – 166.

Izjava o izvornosti

Ja Karla Zrnić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Karla Zrnić

Vlastoručni potpis