

# Praćenje kvalitativnih promjena mlijeka obrađenog različitim toplinskim režimima

---

Milić, Jakov David

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:994511>

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

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Jakov David Milić

1371/PI

**PRAĆENJE KVALITATIVNIH  
PROMJENA MLIJEKA  
OBRAĐENOG RAZLIČITIM  
TOPLINSKIM REŽIMIMA**

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 doc.dr.sc. Irene Barukčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc.dr.sc. Katarine Lisak Jakopović, doc.dr.sc. Tamare Jurina i doc.dr.sc. Andreje Leboš Pavunc.

## ZAHVALE

Veliko hvala dugujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Ireni Barukčić na ukazanom povjerenju, strpljenju te neizmjernom razumijevanju prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem i doc.dr.sc. Katarini Lisak Jakopović te prof.dr.sc. Rajki Božanić što su zajedno s kolegicom Irenom, imale veliki utjecaj na odabir Laboratorija u kojem će ovaj diplomski biti izrađen. Njihov pristup, odnos prema studentima i način predavanja učinili su kolegij Kemije i tehnologije mlijeka i mliječnih proizvoda jednim posebnim mjestom.

Pinu, svim prijateljima i kolegama na studentskim danima, na druženjima, smijehu i velikoj pomoći bez kojih ne bih mogao doći u priliku izraditi diplomski rad.

I na kraju, posebna zahvala obitelji što mi je omogućila da imam sve potrebno za školovanje, što je tijekom cijelog obrazovanja bila uz mene i kada je bilo lagano i kada je bilo teže, ali na kraju je sve kako treba biti.

Vrijedilo je...

# 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

## PRAĆENJE KVALITATIVNIH PROMJENA MLIJEKA OBRAĐENOG RAZLIČITIM TOPLINSKIM REŽIMIMA

*Jakov David Milić, 1371/PI*

### Sažetak:

*Cilj ovog rada bio je odrediti kako različiti toplinski tretmani koji se primjenjuju u proizvodnji mlijeka utječu na kvalitetu kravljeg mlijeka; prije svega na formiranje hidrosimetilfurfurala (HMF), promjene u antioksidacijskoj aktivnosti (DPPH, FRAP) i sadržaju ukupnih fenola, stupanj denaturacije proteina, promjene u indeksu boje, vodljivosti, ukupne otopljene tvari. Istraživanje je provedeno na uzorcima sirovog mlijeka obrađenog različitim toplinskim režimima u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min), na uzorcima mlijeka u prahu te na uzorcima kupovnog konzumnog svježeg i trajnog mlijeka. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako povišenjem temperature i trajanja obrade dolazi do povećanja koncentracije HMF-a, antioksidacijskog potencijala mjenog FRAP metodom te izmjerenih vrijednosti ukupnih fenola, dok sposobnost redukcija radikala pomoću DPPH pada. Isto tako, povećanjem intenziteta toplinskog režima povećavaju se vrijednosti ukupnih otopljenih tvari i električna vodljivost. Povećanje temperature uzrokuje denaturaciju proteina što je vidljivo provođenjem SDS PAGE elektroforeze, a najveća promjena boje zabilježena je kod steriliziranih uzoraka. Primjenom analize glavnih komponenata (Principal Component Analysis, PCA) utvrđene su sličnosti među testiranim uzorcima u odnosu na primijenjen toplinski režim. Navedeni parametri mogu poslužiti kao indikatori intenziteta toplinske obrade mlijeka te poslužiti u detekciji patvorenja mlijeka dodatkom mlijeka u prahu.*

**Ključne riječi:** *mlijeko, HMF, antioksidacijska aktivnost, fenolni spojevi, PCA*

**Rad sadrži:** 59 stranica, 19 slika, 8 tablica, 67 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Irena Barukčić*

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović*

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Tamara Jurina*
2. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić*
3. Doc.dr.sc. *Katarina Lisak Jakopović*
4. Doc.dr.sc. *Andreja Leboš Pavunc* (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujna 2021.

## 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:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### MONITORING OF QUALITATIVE CHANGES IN MILK PROCESSED AT DIFFERENT THERMAL TREATMENTS

*Jakov David Milić, 1371/PI*

#### **Abstract:**

*The aim of this study was to investigate the effect of different heat treatments on the quality of milk; formation of hydroxymethylfurfural (HMF), to determine the effect of heat treatments on antioxidant activity (DPPH, FRAP), total phenols content, the degree of protein denaturation, color changes, electric conductivity, total dissolved solids. The research was conducted on samples of raw milk treated with different temperatures in laboratory conditions (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min), on samples of milk powder and on samples of fresh and Ultra-High Temperature (UHT) milk from the supermarkets. Based on the conducted research, it can be concluded that by increasing the temperature and duration of processing, there is an increase in the concentrations of HMF, antioxidant activity (FRAP) and total phenols content, while DPPH values decrease. In addition, there is an increase in total dissolved solids and electrical conductivity. The degree of protein denaturation in different heat treatments of milk was determined by SDS-PAGE electrophoresis; due to higher heat treatment, protein denaturation occurred and the largest color change was measured on samples of UHT milk. Principal Component Analysis (PCA) revealed similarities between the tested samples in relation to the applied thermal regime. These parameters can be used as indicators of the intensity of heat treatment of milk and for determination of milk adulteration by the addition of powdered milk.*

**Keywords:** *milk, HMF, antioxidant activity, phenolic compounds, PCA*

**Thesis contains:** 59 pages, 19 figures, 8 tables, 67 references, supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Irena Barukčić, Assistant professor*

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

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor
2. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
3. PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor
4. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 28 September 2021

<b>SADRŽAJ</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1 SASTAV I SVOJSTVA MLIJEKA .....	3
2.1.1 Antioksidacijski kapacitet mlijeka .....	6
2.2 PREHRAMBENA VRIJEDNOST MLIJEKA .....	8
2.3 PROMJENE U MLIJEKU NASTALE KAO POSLJEDICA PRIMJENE RAZLIČITIH TOPLINSKIH TRETMANA.....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1 MATERIJALI.....	13
3.2 METODE RADA .....	15
3.2.1 Režimi toplinske obrade mlijeka.....	15
3.2.2 Određivanje pH vrijednosti mlijeka.....	16
3.2.3 Određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henkelu.....	16
3.2.4 Određivanje osnovnog sastava mlijeka metodom infracrvene spektroskopije (MilkoScan).....	17
3.2.5 Određivanje indeksa boje.....	17
3.2.6 Određivanje udjela ukupnog i slobodnog HMF-a.....	19
3.2.7 Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH i FRAP metodom te udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu .....	20
3.2.7.1 Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom.....	21
3.2.7.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	22
3.2.7.3 Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu .....	25
3.2.8 Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza proteina (SDS-PAGE).....	27
3.2.9 Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari mlijeka.....	28
3.2.10 Analiza uzoraka kravljeg mlijeka blisko-infracrvenom spektroskopijom (eng. Near Infrared Spectroscopy, NIRs).....	29
3.2.11 Analiza glavnih komponenata (eng. Principal Component Analysis, PCA).....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>29</b>
4.1 ODREĐIVANJE OSNOVNOG SASTAVA I FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOSTAVA MLIJEKA	30
4.2 ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA .....	32
4.3 ODREĐIVANJE UDJELA HMF-A.....	34
4.4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM .....	37
4.5 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM .....	39
4.6 ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU .....	41
4.7 ODREĐIVANJE ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI I TDS-a MLIJEKA.....	42
4.8 SDS PAGE ELEKTROFOREZA.....	43
4.9 NIR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KRAVLJEG MLIJEKA.....	46
4.10 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA.....	48
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>51</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>53</b>



# 1. UVOD

Mlijeko se naziva najkompletnijom prirodnom tekućinom jer u svom sastavu ima sve tvari koje su neophodne za normalno funkcioniranje i očuvanje zdravlja. O važnosti mlijeka u prehrani najbolje svjedoči izjava najpoznatijeg antičkog grčkog liječnika Hipokrata iz 400. godine prije Krista: „Mlijeko je najsavršenija prirodna hrana.“

Osim što se konzumira zasebno, mlijeko se koristi i kao sirovina za daljnju preradu te proizvodnju brojnih mliječnih proizvoda. Kravlje, kozje i ovčje najznačajnije su vrste mlijeka na hrvatskom tržištu pri čemu u posljednje vrijeme dolazi do pada količine proizvedenog kravljeg mlijeka, a povećanja proizvodnje kozjeg i ovčjeg mlijeka.

Navedeni pad, odnosno povećanje proizvodnje drugih vrsta mlijeka, može se pripisati sve većem broju dostupnih znanstvenih radova te povećanju razine informiranosti potrošača, koji se pri odabiru mlijeka, sve više odlučuju za mlijeka s bogatijim i nutritivno kvalitetnijim sastavom.

Međutim, kravlje mlijeko i dalje ima uvjerljivo najvažniju ulogu te ga se količinski najviše proizvodi pa tako prema Državnom zavodu za statistiku i podacima iz 2020. godine, godišnja proizvodnja kravljeg mlijeka u Hrvatskoj iznosila je 434 220 tona, ovčjeg 2821 tona te kozjeg 4055 tona. Na globalnoj razini, u 2018. godini proizvedeno je ukupno 810 milijuna tona mlijeka (FAO, 2019).

S obzirom na veoma složen sastav, brojne su komponente mlijeka izložene vanjskim utjecajima, poput svjetla i topline, koji uzrokuju neželjene promjene mlijeka te je pri proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda, iznimno važno detektirati kritične točke u proizvodnji te smanjiti intenzitet reakcija koje posljedično dovode do smanjivanja nutritivne vrijednosti mlijeka.

Cilj ovog rada bio je odrediti kako različiti toplinski tretmani koji se primjenjuju u proizvodnji mlijeka utječu na kvalitetu kravljeg mlijeka; prije svega na formiranje hidrosimetilfurfurala (HMF), promjene u antioksidacijskoj aktivnosti (DPPH, FRAP) i sadržaju ukupnih fenola, stupanj denaturacije proteina kao i promjene u indeksu boje, vodljivosti, ukupnoj otopljenoj tvari. Temeljem dobivenih rezultata će se također napraviti procjena mogu li navedeni parametri poslužiti kao indikatori intenziteta toplinske obrade

mlijeka, a pomoću NIR spektra, koji su korišteni za PCA analizu, odrediti sličnosti i razlike između uzoraka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 SASTAV I SVOJSTVA MLIJEKA

Mlijeko je biološka tekućina, složena i promjenjiva sastava, bijele do žućkasto bijele boje, karakterističnog okusa i mirisa, a izlučuje ga mliječna žlijezda ženki sisavaca. Različite vrste mlijeka većinom sadrže iste sastojke, no udjeli u kojima su ti sastojci prisutni u mlijeku su drugačiji (pogotovo proteini i masti), a posljedično se vrste mlijeka razlikuju po hranjivoj i energetskej vrijednosti, fizikalno-kemijskim te tehnološkim svojstvima.

Prema važećem Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (Pravilnik, 2020) koje se stavlja u promet, mlijeko mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- sadržavati najmanje 3 %, a najviše 5,5 % mliječne masti,
- sadržavati najmanje 2,5 %, a najviše 4 % bjelančevina,
- sadržavati najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti,
- imati gustoću višu od  $1,028 \text{ g cm}^{-3}$  pri temperaturi od 20 °C,
- imati kiselinski stupanj od 6,0 do 6,8 °SH i pH vrijednost između 6,5 i 6,7
- imati točku ledišta ispod -0,517 °C (da je bez dodane vode)
- imati negativan rezultat probe sa 72 %-tnim etilnim alkoholom.

Mliječna mast je najpromjenjiviji sastojak mlijeka, njezin udio varira od 2,5 do 6,0 %, a nositelj je okusa, arome, konzistencije i teksture mlijeka i mliječnih proizvoda. Od svih sastojaka mlijeka, mast najviše pridonosi energetskej vrijednosti, budući da 1 g masti oslobađa energiju od 36 kJ ili 9 kcal. Osim energetske, mliječna mast ima i značajnu ekonomsku vrijednost, posebno u proizvodnji maslaca i vrhnja. Mast se u mlijeku nalazi u globulama različitih veličina (najčešće od 1 do 5  $\mu\text{m}$ ), no zajednička karakteristika im je da su znatno veće od drugih sastojaka u mlijeku. Globule su složenog sastava, a lipidne tvari raspoređene su u jezgri, membrani globule te u manjem udjelu u plazmi mlijeka.

U jezgri su najzastupljeniji triacilgliceroli, pri čemu se u središtu nalaze gliceridi niske temperature topljenja, bogati oleinskom kiselinom, dok su u vanjskom dijelu unutar globule masti gliceridi visoke temperature topljenja, bogati palmitinskom kiselinom. U membrani su najzastupljeniji fosfolipidi, kod kojih su hidrofobne skupine okrenute prema masnoj fazi te su povezane s teško topljivim triacilglicerolima iz središta globule. S druge strane, hidrofilne

skupine su okrenute prema vodenoj fazi i povezuju se s proteinima. Osim spomenutih triacilglicerola i fosfolipida, mliječnu mast mlijeka čine i cerebrozidi, steroli, slobodne masne kiseline te sastojci zastupljeni u veoma niskim koncentracijama, ali su bitni za senzorska svojstva te hranjivu vrijednost mlijeka. To su vitamini topljivi u mastima (A, D, E i K), tvari arome (aldehidi, ketoni), karotenoidni pigmenti (zaslužni za zlatno žućkastu boju mliječne masti), glikoproteini, proteini iz plazme mlijeka, endogeni enzimi, mineralne tvari te voda vezana na hidrofilne sastojke fosfolipida i proteina u masti.

Pravilno skladištenje mlijeka važan je korak u manipulaciji mlijekom i mliječnim proizvodima jer prisustvo svjetla i zraka mogu potaknuti oksidaciju nezasićenih masnih kiselina pri čemu kao produkti reakcije nastaju aldehidi i ketoni što posljedično dovodi do nastanka neugodnog mirisa i okusa. Međutim, u odnosu na ostale sastojke sirovog mlijeka, mliječna mast je relativno stabilna, čemu pridonose zasićene masne kiseline i prirodno prisutni antioksidansi (tokoferol i  $\beta$ -karoten, a toplinska obrada pri višim temperaturama dodatno povećava stabilnost jer dolazi do inaktivacije enzima (Tratnik i Božanić, 2012).

Laktoza, odnosno mliječni šećer, sintetizira se u mliječnoj žlijezdi većine sisavaca, a sastavljena je od  $\alpha$ -D-glukoze i  $\beta$ -D-galaktoze ( $\beta$ -galaktozil-1,4-glukoza). Za sintezu laktoze iz galaktoze i glukoze zaslužan je  $\alpha$ -laktalbumin, regulatorna jedinica galaktozil-transferaze (Kamau i sur., 2010). U mlijeku se laktoza pojavljuje kao strukturni izomer dvaju oblika -  $\alpha$ -oblika i  $\beta$ -oblika.

Laktoza je podložna promjenama koje nastaju povećanjem temperature, a jedna od najčešćih je ireverzibilna reakcija neenzimskog posmeđivanja, odnosno Maillardove reakcije pri čemu dolazi do reakcije proteina i šećera. Kao produkt reakcije nastaju i „melanoidni pigmenti“ odgovorni za pojavu smeđe boje mlijeka te hidroksimetilfufural (HMF) kojem se pripisuje trpki okus mlijeka. Maillardove reakcije odvijaju se i pri nižim temperaturama, ali ne nižim od 5 °C zbog čega se mlijeko skladišti na 4 °C. Spomenuto posmeđivanje može biti i poželjna reakcija i to u proizvodnji pekarskih proizvoda, gdje se laktoza dodaje radi kontroliranog posmeđivanja. No, najveće promjene laktoze nastaju djelovanjem mikroorganizama koji dovode do vrenja, odnosno fermentacije laktoze te posljedično zakiseljavanja i kvarenja mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

U mlijeku je pronađeno više od 200 različitih proteina, ali ih je većina u iznimno niskim koncentracijama ili čak u tragovima. Od ukupnih tvari mlijeka koje sadržavaju dušik, 95 % je proteina, a oko 5 % neproteinskih tvari, odnosno peptida, slobodnih aminokiselina, amonijaka, aminošećera, kreatina i drugih. Mlijeko sadržava dva tipa potpuno različitih proteina, kazein koji čini oko 80 % te proteine sirutke, zastupljenih oko 20 %. Osim po zastupljenosti, kazein i proteini sirutke razlikuju se po kemijskom sastavu i strukturi, veličini, obliku, funkcionalnim i tehnološkim svojstvima te hranjivoj i zdravstvenoj vrijednosti. Kazein je najzastupljeniji protein mlijeka, heterogenog sastava i složene strukture, koja je i danas predmet istraživanja brojnih znanstvenika. Međutim, poznato je kako je u sirovom mlijeku kazein prisutan u obliku sitnih koloidnih čestica, koje se nazivaju micelama, a sastoje se od kazeinskih frakcija. Kod svježeg uzorka sirovog mlijeka, micelle su stabilne na povišenje temperature, sve do 140 °C, a navedena se termostabilnost pripisuje fosfatima u mlijeku.

Proteini sirutke su nutritivno najvrijedniji proteini mlijeka, a najzastupljeniji su  $\beta$ -laktoglobulini i  $\alpha$ -laktalbumini. Za razliku od kazeina, proteini sirutke su hidrofilniji i stabilniji na djelovanje kiseline ili enzima sirila, ali su s druge strane veoma termolabilni. Već pri temperaturama višim od 60 °C dolazi do denaturacije proteina sirutke.

U mlijeku je otkriveno oko 40 različitih mineralnih tvari, koje se prema udjelu dijele na makroelemente te mikroelemente. Makroelementi u mlijeku se uglavnom nalaze kao topljive i netopljive anorganske ili organske soli, ali i ionskom, molekularnom te koloidnom obliku. Najpoznatiji makroelement mlijeka je kalcij, koji može biti vezan za citrate (55 %), u ionskom obliku (35 %) te vezan za fosfate (10 %). Količina kalcija koja je iskoristiva ovisi o topljivoj količini, količini vitamina D te o koncentraciji fosfora. Ukoliko je koncentracija fosfora prevelika, dolazi do nastanka netopljivog Ca-fosfata te hipokalcemije. Također, važna je i koncentracija laktoze koja pospješuje peristaltiku crijeva i razgradnju kazeina, donatora znatnih količina kalcija i fosfora, koji je uz kalcij najvažnija mineralna tvar. Od ostalih makroelemenata u značajnijim količinama su prisutni fosfor, magnezij, natrij, kalij, klor i sumpor (Tratnik i Božanić, 2012). U odnosu na makroelemente, mikroelemenata (Zn, Si, Se, Al, Fe, Cu) je puno više, ali ih je većina prisutna samo u tragovima. Međutim, njihova je zastupljenost važna zbog fizioloških, hranjivih i biokemijskih reakcija.

Mineralne tvari utječu na: osmotski tlak (najviše K, Na i Cl u obliku soli ili iona), elektrovodljivost (samo oni u ionskom obliku), temperaturu zamrzavanja i ključanje mlijeka

(topljive soli), titracijsku kiselost i pH vrijednost (najviše fosfati i citrati), puferski kapacitet (fosfati), disperznost kazeina te gustoću i viskoznost mlijeka.

Najvažniji vitamini u mlijeku su oni topljivi u mastima, vitamini A, D, E i K, a njihova koncentracija ovisi o udjelu u hrani muzne životinje te o količini masti u mlijeku. S druge strane, koncentracija minerala topljivih u vodi potječe od mikroflore buraga u kojoj se sintetiziraju.

Od vitamina topljivih u vodi, najpoznatiji su vitamini B kompleksa i vitamin C, pri čemu se može reći kako je mlijeko bogato vitaminima B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub> jer litra mlijeka sadržava dnevnu potrebu organizma, dok vitamina C najviše ima u svježe pomuzenom mlijeku, ali zbog termolabilnosti i osjetljivosti na svjetlost, dolazi do razgradnje i opadanja koncentracije (Tratnik i Božanić, 2012).

#### 2.1.1 Antioksidacijski kapacitet mlijeka

Antioksidansi su spojevi čija je funkcija sprječavanje i usporavanje oksidacije drugih molekula, a definiraju se i kao tvari koje već pri malim koncentracijama usporavaju oksidaciju tvari, koje relativno lako oksidiraju, odnosno kao tvar koja je prisutna u manjoj koncentraciji u odnosu na oksidiranu tvar te sprječava njezinu oksidaciju. Iako su reakcije oksidacije neophodne za stvaranje energije, u organizmima dolazi do raznih poremećaja pri čemu nastaje oksidativni stres te posljedično neželjene promjene (bolesti) unutar organizma (Ilijanić, 2019).

Mehanizam reakcije oksidacije temelji se na prijenosu elektrona ili vodika na oksidacijsko sredstvo, pri čemu nastaju izrazito reaktivni slobodni radikali, koji započinju lančanu reakciju u stanici te tako prouzrokuju oksidaciju lipida, DNA i proteina. Uklanjanjem intermedijara spomenutih lančanih reakcija, antioksidansi usporavaju te sprječavaju oksidacijske procese (Talhoui i sur., 2018). Antioksidansi se dijele na one koji reagiraju s lipidnim radikalom te tako tvore stabilni produkt (fenoli, vitamini, minerali, flavonoidi) i one koji mijenjaju funkciju slobodnog radikala što zaustavlja lančanu reakciju (propil galat). Također, mogu se podijeliti na enzimске i neenzimске, od kojih su mnogi dobiveni iz hrane, a najpoznatiji predstavnici su polifenoli. Također, iznimno je važno razlikovati antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Antioksidacijska aktivnost podrazumijeva sposobnost antioksidansa da uspori oksidaciju

tvari, dok antiradikalna aktivnost predstavlja sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalom te tako prekine lančanu reakciju (Antolovich i sur., 2002).

Mnogi spojevi prisutni u mlijeku, kao što su kazein, proteini sirutke,  $\beta$ -karoten, vitamini A, E i C,  $\alpha$ -tokoferol, cink, selen, laktoferin te aminokiseline koje sadrže sumpor imaju dokazana antioksidacijska svojstva (Usta i Yilmaz, 2013), a istraživanja pokazuju kako antioksidansi iz mlijeka pojačavaju zaštitu od oksidativnog stresa (Bay i sur., 1999).

Zahvaljujući svojim frakcijama ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein) koje su bogate fosfatima, kazein kao glavni protein mlijeka djeluje kao antioksidans te inhibira autooksidaciju lipida kataliziranu lipooksigenazom. Drugi najzastupljeniji proteini mlijeka, proteini sirutke inaktiviraju oksidaciju lipida (Tong i sur., 2001) te svojim djelovanjem povećaju razinu glutation peroksidaze, još jednog antioksidansa mlijeka. Ovisno o koncentraciji,  $\beta$ -karoten sprječava fotooksidaciju vitamina B<sub>2</sub> i to na način da apsorbira svjetlost umjesto vitamina čime ne dolazi do narušavanja kvalitete mlijeka. Iako zastupljen u relativno malim količinama, kao predstavnik vitamina topljivih u vodi, vitamin C neutralizira superoksidne radikale, okside željeza i dušika te inhibira razgradnju vitamina B<sub>2</sub>. Vitamini topljivi u mastima (A i E) predstavljaju zaštitu za polinezasićene masne kiseline, a vitamin E suprimira aktivnost proteolitičkog enzima – plazmina.  $\alpha$ -tokoferol prisutan je u membrani masne globule te ima preventivnu ulogu u nastanku slobodnih radikala i smatra se jednim od najjačih antioksidansa topljivih u mastima (Cacho i Lawrence, 2017), a cink i selen izazivaju supresiju superoksidnog radikala. Iako je u kravljem mlijeku prisutan u relativno niskim koncentracijama, laktoferin može imati važnu ulogu jer veže prooksidacijski ion željeza, a time se smanjuje pretvorba vodikovog peroksida u hidroksilni radikal (Khan i sur., 2019).

Antoksidacijska aktivnost mlijeka ovisi i o načinu ishrane životinja pa je tako u mlijeku životinja koje su se hranile slobodnom ispašom zabilježena veća koncentracija fenolnih spojeva, nego što je slučaj kod životinja koje su bile zatvorene i hranjene koncentratima jer se u svježem bilju nalazi više bioaktivnih spojeva 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).

## 2.2 PREHRAMBENA VRIJEDNOST MLIJEKA

Mlijeko ima iznimno važnu ulogu u prehrani ljudi kroz sve faze života, a posebno u prvoj fazi kada je mlijeko jedina hrana za dojenče jer svojim sastavom zadovoljava hranjive i imunološke potrebe organizma. Konzumira se prvenstveno zbog biološke vrijednosti proteina te doprinosi mineralnih tvari, ali i zbog svih ostalih sastojaka, od kojih neki potpomažu peristaltiku i probavu, apsorpciju hranjivih tvari, a neki predstavljaju izvor energije.

Proteini mlijeka sadrže sve esencijalne aminokiseline koje su potrebne za građu tkiva, enzima i hormona, a imunološki sustav predstavlja zaštitu organizma od virusa, štetnih bakterija te uzročnika zaraznih bolesti. Također, biološka vrijednost proteina mlijeka veća je od primjerice proteina mesa ili ribe. Međutim, treba istaknuti i kako postoje osobe koje ne podnose kravlje mlijeko, pri čemu je jedan uzročnik laktoza, odnosno nedostatak enzima laktaze, a drugi su proteini mlijeka, kazein ili  $\beta$ -laktoglobulin. Navedeni proteini mlijeka mogu uzrokovati alergijske pojave, kao što su kožne tegobe ili astma. Alergijske pojave mogu se ublažiti denaturacijom proteina, primjenom povišene temperature ili hidrolizom proteina, koja je i djelotvornija metoda (Tratnik i Božanić, 2012).

Mliječna mast predstavlja najveći izvor energije u mlijeku ( $37 \text{ kJ g}^{-1}$ ), a utječe na okus, aromu i teksturu mlijeka. U usporedbi s uljima i mastima biljnog podrijetla, sadrži više zasićenih masnih kiselina te esencijalnu arahidonsku kiselinu koje nema u biljnim mastima. Lecitin je najvažniji fosfolipid mlijeka, djeluje kao stabilizator, a steroli su važni prekursori hormona. Zbog povoljnog udjela kalcija i vitamina D u mlijeku, mlijeko se ne smatra izvorom kolesterola, već zahvaljujući kalciju i vitaminu D ima hipokolesterolni učinak.

U odnosu na ostale šećere, laktoza je relativno slabo topljiva u vodi, no prisutnost kalcijevih soli (u mlijeku) i povišenje temperature, povećavaju topljivost. Isto tako, laktoza je 3-4 puta manje slatka od saharoze. Osim što doprinosi povećanju energetske vrijednosti mlijeka ( $3,75 \text{ kcal g}^{-1}$ ), mlijeko potiče peristaltiku, olakšava probavu masti i proteina, pomaže pri apsorpciji kalcija i fosfora, a osigurava i optimalnu razinu magnezija. Iako je laktoza za većinu lako probavljiva (99,71 %), osobe s nedostatkom enzima  $\beta$ -galaktozidaze teško je podnose i njezino konzumiranje dovodi do zdravstvenih tegoba, glavobolje, dijareje, nadimanja, ovisno o količini nerazgrađene laktoze. Upravo iz tog razloga na tržištu se pojavljuje sve više



mliječnih, ali i općenito proizvoda koji ne sadrže laktozu, koja se dodatkom enzima, razgrađuje na glukozu i galaktozu. Osobe koje su intolerantne na laktozu, češće oboljevaju od osteoporoze, što potvrđuje činjenicu kako laktoza pomaže pri apsorpciji kalcija u organizmu (Tratnik i Božanić, 2012).

Vitamini A i D važni su u prehrani ljudi i zbog toga se dodaju konzumnom mlijeku koje se može pronaći na tržištu. Vitamin A, odnosno retinol se u mlijeku nalazi u obliku vitamina te provitamina  $\beta$ -karotena, od kojeg potječe svijetložučkasta boja mlijeka. Mlijeko je relativno siromašno vitaminom D, koji se nalazi u obliku provitamina, pri čemu ljetno mlijeko, zbog utjecaja svjetla i sunca sadržava više vitamina D, stabilnog pri preradi, a pomaže pri apsorpciji kalcija te mineralizaciji kostiju (Barukčić, 2017).

Dakle, iz svega prethodno navedenog nedvojbeno je kako mlijeko sadržava brojne sastojke potrebne za održavanje zdravlja, a to potvrđuje činjenica kako je mlijeko prva hrana živih bića (sisavaca) po dolasku na svijet, a konzumira se kako bi se zadovoljile hranjive i imunološke potrebe. Proteini sadrže esencijalne aminokiseline, koje su gradivna jedinica tkiva, enzima te hormona, a konzumiranjem jedne litre mlijeka dnevno, odrasla osoba zadovolji dnevnu potrebu za proteinima životinjskog podrijetla. Mineralne tvari imaju važnu hranjivo-fiziološku ulogu, a uspostavljaju aktivnost enzima, održavaju pH vrijednost i osmolalnost. Kalcij je potreban za rast kostiju, grušanje krvi, kontrakciju mišića i rad srca te prijenos živčanih impulsa. Laktoza pomaže apsorpciju kalcija i fosfora, a osigurava i optimalnu razinu magnezija. Mliječna mast primarni je izvor energije te pridonosi vitaminskom sadržaju mlijeka, za proteine topljive u masti.

### 2.3 PROMJENE U MLIJEKU NASTALE KAO POSLJEDICA PRIMJENE RAZLIČITIH TOPLINSKIH TRETMANA

Toplinskoj obradi mlijeka pristupa se zbog uništenja patogenih, ali i mikroorganizama, prisutnih spora te zbog inaktivacije enzima koji uzroku (neželjene) promjene mlijeka, a glavne vrste obrade vidljive su u Tablici 1. Jedan od glavnih ciljeva toplinske obrade mlijeka, ali i općenito namirnica je produljenje roka trajnosti, poštujući sve pravilnike o sigurnosti krajnjeg proizvoda za potrošače. Pravilnici o korištenju sirovog mlijeka razlikuju se od države do države, u nekima je konzumacija termički neobrađenog mlijeka strogo zabranjena, dok je u

drugima dozvoljena, ali uz poštivanje strogih pravila tijekom svih faza proizvodnje, od mužnje sve do pakiranja i skladištenja.

Toplinska obrada mlijeka pri kojoj temperatura tretmana ne prelazi 100 °C naziva se pasterizacija, dok je sterilizacija naziv za postupke obrade kod kojih je temperatura viša od 100 °C. Postizanjem optimalnog odnosa temperature i vremena trajanja pasterizacije, osigurava se mikrobiološka kvaliteta mlijeka, uz očuvanje okusa, boje i nutritivne vrijednosti. Uvjeti pasterizacije razlikuju se među državama, ali se najčešće koristi HTST-postupak (eng. High Temperature Short Time) kako bi se sačuvala kvaliteta mlijeka. Iako je njezina primjena relativno skupocjena te se zbog dugotrajnosti više ne primjenjuje u industriji, niska, dugotrajna (eng. Low Temperature Long Time) pasterizacija koristi se za manje šarže te u laboratorijskim uvjetima. Za proizvodnju pasteriziranog konzumnog mlijeka, preporuča se srednja, kratkotrajna pasterizacija, koja se provodi pri temperaturi od 72 °C, u trajanju od najmanje 15 sekundi (Tratnik i Božanić, 2012).

Kako bi se inaktivirale spore, mlijeko treba biti sterilizirano, odnosno podvrgnuto toplinskoj obradi višoj od 100 °C. Sterilizacija u protoku, tj. UHT-postupak (eng. Ultra High Temperature) provodi se u intervalu od 135 °C do 140 °C, u trajanju od nekoliko sekundi. Osim sterilizacije u protoku, može se provesti i sterilizacija u ambalaži, gdje je temperatura između 115 °C i 120 °C, a trajanje zagrijavanja od 5 do 16 minuta (Morales i sur., 1996).

S obzirom na relativno veliku razliku u temperaturama, pasterizirano i sterilizirano mlijeko se mogu razlikovati prema izgledu i okusu, pri čemu potrošači navode kako sterilizirano mlijeko ima okus po kuhanom, dok boja takvog mlijeka poprima nijanse smeđe boje (Manners, 2003).

Budući da nije standardizirana metoda, temperature termalizacije su između 57 °C i 68 °C, a traju tijekom 15 sekundi do jedne minute pri čemu će samo privremeno inhibirati rast bakterija. S obzirom da neće inaktivirati enzime fosfataze, termalizacija ne može zamijeniti pasterizaciju (Miletić, 1994).

Tablica 1. Glavne vrste toplinske obrade mlijeka (Bylund, 2003; Morales i sur., 1996)

Vrsta procesa	Temperatura (°C)	Trajanje
<b>Termalizacija</b>	63 – 65	15 s
<b>LTLT, niska, dugotrajna pasterizacija</b>	63 – 65	30 min
<b>HTST, srednja kratkotrajna pasterizacija</b>	72 – 75	15 – 20 s
<b>HTST, visoka, kratkotrajna pasterizacija</b>	>80	1 – 5 s
<b>Ultra pasterizacija (ESL)</b>	125 – 138	2 – 4 s
<b>Sterilizacija u protoku (UHT)*</b>	135 – 140	nekoliko sekundi
<b>Sterilizacija u ambalaži**</b>	116 - 120	5 – 16 minuta

\*izravno zagrijavanje (mlijeko u paru ili para u mlijeko)

\*\*šaržna u autoklavu

Ovisno o intezitetu toplinskog režima, u mlijeku nastaju reverzibilne i ireverzibilne promjene kao što su: neznatne promjene pH-vrijednosti, promjena udjela laktoze (nastanak laktuloze ili nastajanje hidroksimetilfurfurala u početnim fazama Maillardovih reakcija koji može uzrokovati trpki okus mlijeka), denaturaciju proteina sirutke ili interakciju s  $\kappa$ -kazeinom, pojava okusa po kuhanom (slobodne  $-SH$  skupine denaturiranih proteina sirutke), Maillardove reakcije posmeđivanja mlijeka (nastanak melanoidina, nakon serije reakcija uzrokovanih interakcijom laktoze s lizinom proteina, osobito lizinom kazeina), inaktivacija većine enzima, a sve navedene promjene ovisne su o odnosu temperature i trajanja tretmana, sastavu i kvaliteti sirovog mlijeka, pH-vrijednosti, udjelu kisika i o mikrobiološkoj kvaliteti sirovog mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Pasterizacija može uzrokovati neznatne promjene nutritivnog sastava mlijeka pa tako tijekom pasterizacije gubitak vitamina B<sub>6</sub> iznosi 1-5 %, vitamina B<sub>9</sub> 3-5 %, vitamina B<sub>12</sub> je nešto veći, od 1-10 %, dok je najznačajniji gubitak vitamina zabilježen kod B<sub>1</sub> od 10 % te vitamina C, 5-20 %. S druge strane, gubitak vitamina A i D je gotovo zanemariv. Također, dolazi i do denaturacije proteina (3-5 %), a najveća promjena koju uzrokuje pasterizacija je Maillardova reakcija (Meunier i Goddik, 2002).

Denaturacija  $\beta$ -laktoglobulina uzrokovana sterilizacijom iznosi 50-85 %, a posljedica sterilizacije je i formiranje kompleksa s  $\kappa$ -kazeinom na površini micide. Povećana temperatura

uzrokuje reakciju laktoze s amino ostacima proteina, posebice s lizinom tijekom Maillardove reakcije.

Kao i kod postupka pasterizacije, Maillardova reakcija predstavlja reakciju amino skupine lizina i aldehidne skupine laktoze, uz nastajanje aminošćera, pri čemu posljedično dolazi do spomenute pojave smeđkaste boje mlijeka te okusa po kuhanome (Rosenberg, 2002).

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklički aldehid nastao dehidracijom fruktoze i glukoze u kiseloj sredini, nastaje kao produkt Maillardovih reakcija, neenzimatskog posmeđivanja, a te se reakcije odvijaju, pod određenim uvjetima, u mlijeku. Često se koristi kao indikator toplinskog tretmana mlijeka, a uvjeti koji su važni za nastanak hidroksimetilfurfurala su: temperatura, vrijeme trajanja toplinskog tretmana, uvjeti u kojima se mlijeko skladišti te eventualna upotreba metalne ambalaže. Povećanje temperature i trajanja toplinskog tretmana utječu na povećanje koncentracije hidrokismetilfurfurala, kao posljedica Maillardovih reakcija (Özdal i sur., 2018).

Navedene reakcije odvijaju se u tri faze: inicijalna ili početna, faza stvaranja međuprodukata te finalna faza. U početnoj fazi, reducirajući šećer, poput glukoze, reagira sa spojem koji sadrži slobodnu amino skupinu, pri čemu nastaje N-supstituirani glikozilamin, koji se potom mijenja, tvoreći Amadorijev produkt preslagivanja (ARP). Daljnja razgradnja Amadorijevih produkata ovisi o pH vrijednosti, a pri pH vrijednosti 7 ili nižoj, podvrgava se 1,2-enolizaciji s nastajanjem furfurala (kada su prisutne pentoze) ili hidroksimetilfurfurala (HMF) (kada su u reakciju uključene heksoze). U završnoj fazi dolazi do nastanka smeđe obojanih heterocikličnih dušičnih spojeva, odnosno melanoidina koji uzrokuju obojenje te su zaslužni za specifičnu aromu (Martins i sur., 2001).

Negativne posljedice posmeđivanja mlijeka i hrane općenito, vežu se za destrukciju i redukciju esencijalnih aminokiselina čime je koncentracija HMF-a povezana s oštećenjima DNK, povećanjem inhibitornog, citotoksičnog te kancerogenog učinka, a posljedično se koristi kao jedan od najčešćih parametara za određivanje inteziteta toplinske obrade mlijeka (Francisquini i sur., 2018).

SDS PAGE elektroforeza jedna je od najpouzdanijih metoda za detekciju proteina mlijeka i praćenje promjena koje nastaju povišenjem temperature, ali i drugim utjecajima (O'donnell i sur., 2004). Proteini sirutke su termolabilniji od kazeina, koji je pri povećanju temperature relativno otporan na denaturaciju i koagulaciju. Kod proteina sirutke redom denaturiraju:

proteoze-peptoni,  $\alpha$ -laktalbumini,  $\beta$ -laktoglobulini, albumini krvnog seruma te imunoglobulini, a temperatura denaturacije ovisi ponajprije o  $\beta$ -laktoglobulinima, budući da su najzastupljeniji proteini sirutke (Donovan i Mulvihill, 1987). Toplinski režimi utječu na interakciju i tvorbu kompleksa među proteinima i njihovim frakcijama pa tako primjerice dolazi do stvaranja kompleksa između  $\alpha$ -laktalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina,  $\alpha$ -laktalbumina i  $\kappa$ -kazeina te  $\beta$ -laktoglobulina i  $\kappa$ -kazeina (Corredig i Dalgleish, 1996).

Za određivanje patvorenja, odnosno detekciju pojedinih spojeva u hrani koriste se razne metode, a u posljednje vrijeme se sve češće koriste nedestruktivne metode, poput NIR spektroskopije (eng. Near Infrared Spectroscopy, NIRs), koji predstavlja važnu i pouzdanu alternativu u određivanju patvorenja različitih namirnica (Shao i sur., 2019), a posebno mlijeka i mliječnih proizvoda (Azad i Ahmed, 2016). Prethodna istraživanja (Aernouts i sur., 2011) su pokazala kako se odvajanje faza, stabilnost i kvaliteta emulzije, ponajprije kod mlijeka i mliječnih proizvoda, mogu pratiti pomoću NIR spektroskopije.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 MATERIJALI**

Pri izradi diplomskog rada, kao glavna sirovina, odnosno materijal korišteno je sirovo kravlje mlijeko nabavljeno na mljekomatu. Uzorak mlijeka tretiran je pri sedam različitih režima toplinske obrade, kako je navedeno u Tablici 2.

Uz sirovo kravlje mlijeko, korišteno je i mlijeko u prahu (Dukat d.d. i Ledo d.d., Hrvatska) različitih udjela mliječne masti (Dukat mlijeko u prahu 26 % m.m, Dukat mlijeko u prahu 1,5 % m.m., Ledo mlijeko u prahu 1,0 % m.m.) te uzorci komercijalno dostupnog svježeg (Dukat 3,2 % m.m, Vindija 3,2 % m.m, Veronika 3,2 % m.m, Alpsko 3,9 % m.m.) i trajnog (Dukat 3,8 % m.m. te 2,8 % m.m., Vindija 3,5 % m.m., Alpsko 3,5 % m.m.) mlijeka označenih kako je navedeno u Tablici 2.

Tablica 2. Oznake uzoraka komercijalno dostupnih mlijeka

Oznaka uzorka	Uzorak
MUP 26	Mlijeko u prahu, Dukat, 26 % m.m.
MUP 1,5	Mlijeko u prahu, Dukat, 1,5 % m.m.
MUP 1,0	Mlijeko u prahu, Ledo, 1 % m.m.
T.M. 3,8 - D	Trajno mlijeko, Dukat, 3,8 % m.m.
T.M. 3,5 - V	Trajno mlijeko, Vindija, 3,5 % m.m.
T.M.3,5 - A	Trajno mlijeko, Alpsko, 3,5 % m.m.
T.M. 2,8 - D	Trajno mlijeko, Dukat, 2,8 % m.m.
S.M. 3,2 - D	Svježe mlijeko, Dukat, 3,2 % m.m.
S.M. 3,2 - Vi	Svježe mlijeko, Vindija, 3,2 % m.m.
S.M. 3,2 - Ver	Svježe mlijeko, Veronika, 3,2 % m.m.
S.M. 3,9 - A	Svježe mlijeko, Alpsko, 3,9 % m.m.

Za određivanje titracijske kiselosti mlijeka metodom po Soxhlet-Henkelu, korištene su sljedeće kemikalije:

- 2 %-tni fenolftalein (Gram-Mol, Hrvatska)
- kobaltov sulfat  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lach-Ner, Hrvatska)
- 0,1 M NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)

Za određivanje koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a, korištene su sljedeće kemikalije:

- 0,3 M oksalna kiselina (Gram-Mol, Hrvatska)
- 40 %-tna TCA (Trikloroctena kiselina, Fisher Scientific, UK)
- 0,05 M TBA (2-tiobarbiturna kiselina, Alfa Aesar, UK)
- 1 M HCl (Gram-Mol, Hrvatska) pripremljen u 95 % etanolu (v/v, 15/85, KEFO, Hrvatska).

Za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom korišten je:

- $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  DPPH (Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom etanolu (KEFO, Hrvatska)

Prilikom određivanja antioksidacijskog potencijala FRAP metodom korištene su sljedeće kemikalije:

- 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 (B) (KEFO, Hrvatska)
- 20 mmol željezo (III)-klorid heksahidrat,  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (C) (Lach-Ner, Hrvatska)
- navede kemikalije iskorištene su pri pripremi FRAP reagensa, koji se sastojao od 25 mL acetatnog pufera (A), 2,5 mL otopine TPTZ-a (B) i 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (C), pomiješanih u omjeru 10:1:1 v/v (A:B:C)

Za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu korišteni su:

- Folin Ciocalteu reagens – razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10 (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 7,5 % (w/v) Natrijev karbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Gram-Mol, Hrvatska)

## 3.2 METODE RADA

### 3.2.1 Režimi toplinske obrade mlijeka

Svježe sirovo mlijeko (iz mljekomata) razdijeljeno je u volumene od 100 mL, nakon čega je zagrijavano na sedam različitih temperaturnih režima (Tablica 3). Uzorci mlijeka koji su tretirani na temperaturnim režimima od 63 – 65 °C/15 sec, 63 – 65 °C/30 min, 72 °C/20 sec, 85 °C/30 sec i 90 – 95 °C/5 - 10 min, uz konstantno su miješanje zagrijavani na magnetskom grijaču. Simulacija šaržne sterilizacije provedena je u autoklavu (Inko, Zagreb) na 116 °C te 120 °C. Nakon što je dosegnuta zadana temperatura, uzorak mlijeka brzo je ohlađen pod mlazom tekuće hladne vode i u hladnoj kupelji s ledom.

Tablica 3. Primijenjeni režimi toplinske obrade mlijeka i pripadajuće oznake uzoraka

Oznaka uzorka	Temperatura	Vrijeme
63/15	63 – 65 °C	15 sec
63/30	63 – 65 °C	30 min
72/20	72 °C	20 sec
85/30	85 °C	30 sec

90-95/5-10	90 – 95 °C	5 – 10 min
116/16	116 °C	16 min
120/5	120 °C	5 min

### 3.2.2 Određivanje pH vrijednosti mlijeka

Za mjerenje pH vrijednosti uzoraka korišten je laboratorijski pH-metar WTW-ProfiLine pH 3110 tvrtke Xylem Analytics (Weilheim, Njemačka). Prije početka samog mjerenja, potrebno je kalibrirati elektrodu pH metra (uranjanjem u otopinu standarda poznate pH vrijednosti) te potom isprati destiliranom vodom i osušiti staničevinom. Elektroda se zatim uroni u čašu s uzorkom mlijeka, sadržaj se lagano promiješa, te se na zaslonu očita pH vrijednost, nakon što se ista ustali. Elektroda se nakon završene analize ispere destiliranom vodom, obriše staničevinom te uroni u otopinu kalijeva klorida, gdje se čuva do sljedećeg mjerenja (Bajt i sur., 1998).

### 3.2.3 Određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henkeli

Metoda po Soxhlet-Henkeli je službena titracijska metoda za određivanje kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda u Republici Hrvatskoj. Zasniva se titraciji uzorka mlijeka s 0,1 M NaOH uz indikator 2 % fenolftaleina. Titracija se provodi do nastanka crvenkaste boje, čija je prisutnost stabilna u trajanju od jedne minute. Prije određivanja titracijske kiselosti uzorka mlijeka potrebno je pripremiti standardnu boju koja služi kao referentna nijansa do koje se provodi titracija natrijevom lužinom. Standardna boja priprema se dodatkom 0,4 mL 5 % otopine kobaltovog sulfata u 20 mL uzorka mlijeka (Božanić i sur., 2010).

Izračun stupnja titracijske kiselosti mlijeka metodom po Soxhlet- Henkeli provodi se prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \cdot 2 \cdot f \quad [1]$$

gdje „a“ označava volumen, tj. mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 20 mL mlijeka, „f“ predstavlja faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) = 0,1 mol L<sup>-1</sup> = 1.



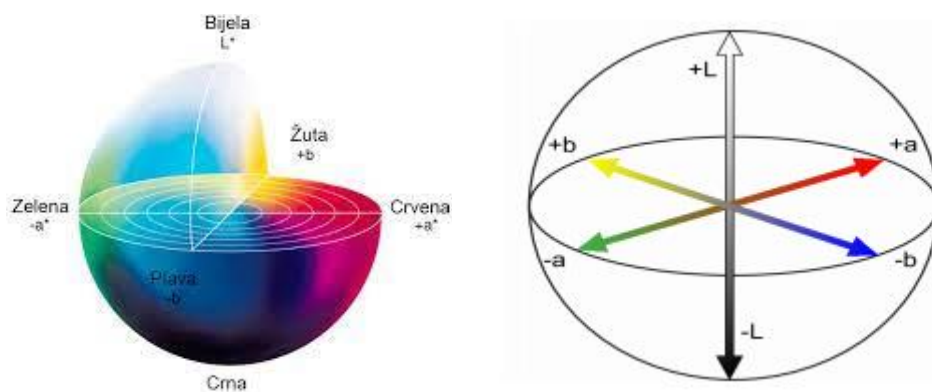
### 3.2.4 Određivanje osnovnog sastava mlijeka metodom infracrvene spektroskopije (MilkoScan)

Ispitivanje osnovnog kemijskog sastava mlijeka provodi se metodom infracrvene spektrofotometrije (IR), sukladno normi HRN ISO 9622:2001, na uređaju MilkoScan™ FT1 (Foss, Danska). Uređaj pruža do 120 pouzdanih mjerenja po satu, omogućuje brzu analizu fizikalno-kemijskih parametara poput pH i SH vrijednosti, gustoće, udjela mliječne masti, proteina, laktoze, glukoze, suhe tvari i suhe tvari bez masti. Rezultati su iznimno precizni i pohranjuju se u računalo zbog sljedivosti. Široki radni raspon temperatura (5-55 °C) omogućuje izravnu analizu čak i hladnih, ali homogenih uzoraka. Za analizu je potrebno 8 mL uzorka, a ukoliko su u uzorku prisutne anomalije u odnosu na propisani sastav, uređaj šalje obavijest o razlikama. Analiza osnovnog sastava mlijeka napravljena je u Dukat d.d. mliječnoj industriji u Zagrebu.

### 3.2.5 Određivanje indeksa boje

CIELAB je trodimenzionalni prostor boja baziran na percepciji boje standardnog promatrača, a ne na mogućnostima uređaja i zbog toga se navedeni prostor boja smatra neovisnim o uređaju. Kratica Lab, označava tri komponente ovog modela koje prikazuje Slika 1. Prednost ovog sustava je i uvođenje svjetline kao treće dimenzije. Numeričke vrijednosti u CIELAB sustavu opisuju sve boje koje može razlikovati svako zdravo ljudsko oko.

Boje su opisane pomoću tri komponente: svjetlina L (luminance) koja je akromatska komponenta i dvije kromatske komponente, a (crvena i zelena, gdje negativne vrijednosti označavaju zelenu, a pozitivne crvenu boju) i b (negativne vrijednosti za plavu, a pozitivne za žutu boju). Svjetlina se mjeri od 1 do 100 po vertikalnoj osi, gdje je 1 vrijednost za crnu, a 100 za bijelu.



Slika 1. CIELAB prostor boja (Yam i Papadakis, 2004)

Određivanje boje uzoraka i nastalih promjena nakon toplinskih tretmana, provodilo se difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru CM-350d (Konica Minolta, Japan). Izvor svjetla pulsirajuća je ksenon lampa, dizajnirana na način da daje standardni izvor svjetla D65. Svjetlo reflektirano od uzorka se sakuplja u integrirajućoj sferi, neovisno o valnoj duljini te se normalizira prema svjetlu izvora reflektancije. Iz tog je razloga prije svakog mjerenja, potrebno kalibrirati uređaj s čisto bijelim standardom (100 %-tna refleksija) te crnim valjkom čija refleksija iznosi 0 %. Sve potrebne postavke vršene su u programu Spectramagic NX (Konica Minolta, Japan), a mjerenje se provodilo unošenjem svakog uzorka mlijeka u posudicu, koja se zatim poklopila s crnim valjkom maksimalne apsorpcije svjetlosti. U konačnici, kao rezultat su dobivene  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti za svaki uzorak mlijeka (Konica-Minolta, 1998).

Za izračun promjene boje mlijeka nakon toplinskog tretmana, koristi se vrijednost  $\Delta E^*$ , koja pokazuje koliko se boja tretiranog uzorka razlikuje od referentne boje (Tablica 4.), odnosno sirovog mlijeka (Mokrzycki i Tatol, 2011):

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

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

$a^*$  - parametar boje tretiranog uzorka mlijeka

$b^*$  - parametar boje tretiranog uzorka mlijeka

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

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

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

Tablica 4. Značenje promjene boje, vrijednosti  $\Delta E$  (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

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

Kod određivanja hidroksimetilfurfurala (HMF) potrebno je razlikovati dva pojma, slobodni HMF i ukupni HMF pri čemu ukupni HMF predstavlja zbroj prekursora HMF-a (laktulozil-lizin, 1-2 enolizirani proizvodi, itd.) i slobodnog HMF-a (Ritota i sur., 2017).

#### *Priprema uzorka mlijeka*

Volumenu od 10 mL svakog od prethodno pripremljenih (tretiranih) uzoraka mlijeka dodano je 5 mL 0,3 M oksalne kiseline, te je dobivena smjesa zagrijavana 100 °C/1 h uz konstantno miješanje. Nakon sat vremena, uzorci mlijeka su naglo ohlađeni u hladnoj kupelji s ledom, potom su deproteinizirani dodatkom 5 mL 40 % (w/v) trikloroctene kiseline (TCA) te filtrirani kroz Whatmannov filter papir broj 42. Dobiveni filtrat je korišten u daljnjem postupku određivanja koncentracije HMF-a (Morales i sur., 1996).

Za određivanje slobodnog HMF-a, 10 mL svakog tretiranog uzorka mlijeka miješano je s 5 mL 0,3 M oksalne kiseline uz dodatak 5 mL 40 % (w/v) TCA. Otopina je potom filtrirana kroz Whatmannov filter papir broj 42, a tako dobiveni filtrat je korišten dalje u postupku određivanja (Francisquini i sur., 2018).

#### *Postupak određivanja ukupnog HMF-a*

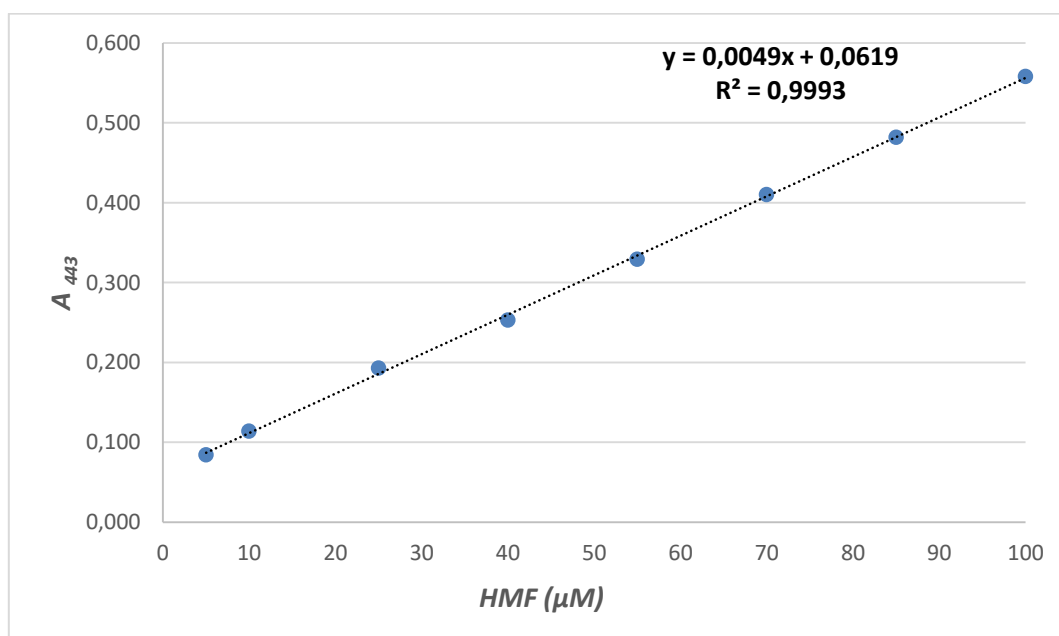
4 mL dobivenog filtrata inkubirano je na 40 °C u trajanju od 30 min, uz dodatak 1 mL 0,05 M TBA. Potom je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 443 nm u odnosu na slijepu probu koja sadržava destiliranu vodu umjesto uzorka, ali prolazi sve faze pripreme uzorka, kuhanje s oksalnom kiselinom, hlađenje i dodatak TCA, inkubiranje uz dodatak TBA te filtriranje (Morales i sur., 1996). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

### *Postupak određivanja slobodnog HMF-a*

4 mL dobivenog filtrata inkubirano je na 40 °C u trajanju od 30 min, uz dodatak 1 mL 0,05 M TBA. Potom je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 443 nm u odnosu na slijepu probu, koja sadržava destiliranu vodu umjesto uzorka te prolazi sve faze pripreme uzorka (Francisquini i sur. 2018). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

### *Baždarni dijagram za određivanje udjela HMF-a*

Za određivanje udjela HMF-a potrebno je napraviti baždarni dijagram (Slika 2.), a pri izradi su korištene različite koncentracije standarda HMF-a, od 5 do 100 µM. Koncentracije standarda izmjerene su na valnoj duljini od 443 nm. Na temelju očitanih vrijednosti kreiran je baždarni dijagram te dobivena jednadžba pravca pomoću koje su izračunati udjeli HMF-a u uzorcima mlijeka (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 Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH i FRAP metodom te udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

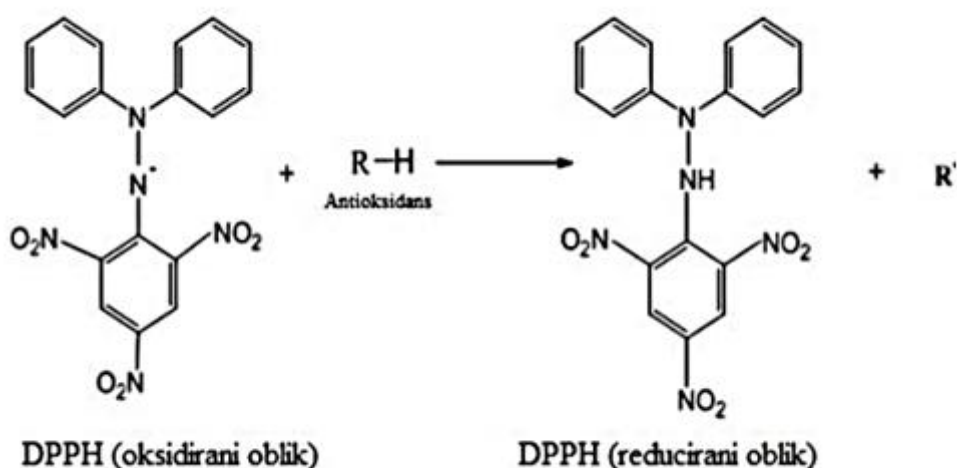
#### *Priprema uzorka mlijeka*

Uz prethodni izračun potrebnog volumena, 1 g tretiranog mlijeka pomiješan je s 10 mL 1 M HCl ranije pripremljenog u 95 % etanolu (v/v, 15/85). Dobivena smjesa inkubirana je na 30

°C, u vodenoj kupelji uz konstantno uključenu tresilicu, u trajanju od jednog sata. Potom je smjesa centrifugirana na 7800 g, u trajanju od 15 minuta na 5 °C. Tako dobiveni supernatant koristio se u daljnjim postupcima, a ukoliko se neće koristiti odmah, može se i čuvati na -20 °C, na mračnom mjestu do daljnje uporabe (Alyaqoubi i sur., 2014).

### 3.2.7.1 Određivanje antioksidacijskog potencijala 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) te je vidljiv na Slici 3. DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) 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  $DPPH\cdot$  u  $DPPH_2$ , prilikom primanja vodikovog protona (H) od strane antioksidansa, a 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 antioksidacijske aktivnosti (Mishra i sur., 2012).



Slika 3. Reakcija redukcije DPPH (Casanovas i sur., 2015)

*Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom*

0,1 mL prethodno pripremljenog uzorka mlijeka pomiješa se s 3,9 mL DPPH i ostavi na mračnom mjestu pri sobnoj temperaturi, tijekom 30 minuta nakon čega se očitava apsorbancija na 517 nm. Uzorak slijepe probe umjesto uzorka mlijeka sadrži 95 % etanol (Sangsopha i sur., 2019). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

Izračun se provodi na temelju slijedećeg izraza:

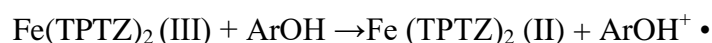
$$\% \text{ DPPH redukcije radikala} = (A_0 - A_s) / A_0 \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je  $A_0$  - apsorbancija izmjerena na valnoj duljini 517 nm ( $A_{517}$ ) za slijepu probu

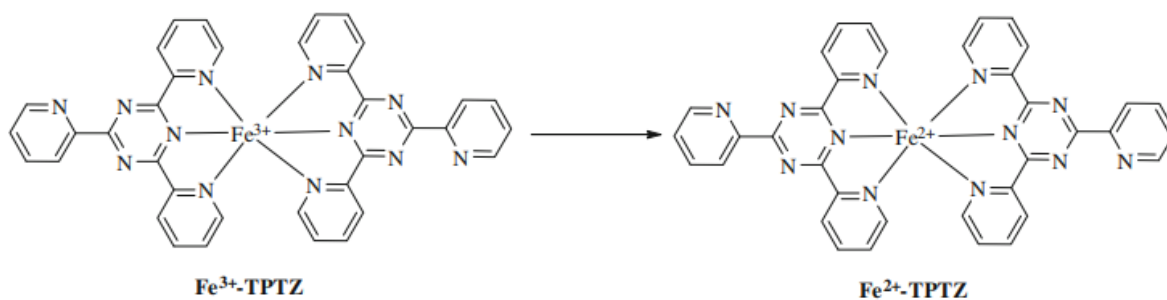
$A_s$  - apsorbancija izmjerena na valnoj duljini 517 nm ( $A_{517}$ ) za uzorak

### 3.2.7.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se smatra relativno brzom, jeftinom te jednostavnom kolorimetrijskom metodom za određivanje antioksidacijske aktivnosti, a glavna reakcija je između supstrata (donor elektrona) i iona  $\text{Fe}^{3+}$  (akceptor elektrona), pri čemu dolazi do stvaranja iona  $\text{Fe}^{2+}$  (Slika 4.), odnosno prijenos elektrona između kompleksa željeza i TPTZ-a (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) prema jednadžbi (Ou i sur., 2002):



Navedena reakcija redukcije dovodi do promjene boje otopine  $\text{Fe}^{3+}$  s TPTZ-om koji postaje plav te apsorbira zračenje pri valnoj duljini od 593 nm (Martins i sur., 2012). FRAP metoda provodi se pri kiselim pH vrijednostima (pH = 3,6), u cilju održavanja dobre topivosti željeza, a obzirom da reakcija nije selektivna, bilo koja druga redoks reakcija, koja ima niži redoks potencijal od redoks reakcije promatranog kompleksa željeza i TPTZ-a, dovest će do redukcije  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ . Oksidans je u suvišku, stoga je jedini ograničavajući faktor nastajanja kompleksa produkta  $\text{Fe}^{2+}$  -TPTZ, reducirajuća moć uzorka. Posljedično, promjena vrijednosti apsorbancije izravno je povezana s ukupnom sposobnošću reduciranja u uzorku, odnosno elektron donorskom antioksidacijskom aktivnošću. Također, FRAP metodi nije potrebno prethodno pripremiti i obraditi uzorak, stehiometrijski čimbenici su konstantni, reproducibilnost i osjetljivost su visoki, a nije potrebna niti visoko specijalizirana oprema ili vještina (Benzie i Strain, 1999).



Slika 4. Oksidirani i reducirani oblik kompleksa željezo-TPTZ (Gülçin, 2012)

#### *Priprema kemikalija i reagensa za analizu*

Za određivanje antioksidacijskog potencijala FRAP metodom, kemikalije i reagensi se pripremaju prema Benzie i Strain (1996). Prije svakog određivanja/ponavljanja pripremljen je svježi FRAP reagens (25 mL 0,3 M acetatnog pufera (A), 2,5 mL 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol HCl (B) te 2,5 mL 20 mmol  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (C), u omjeru 10:1:1 (A:B:C).

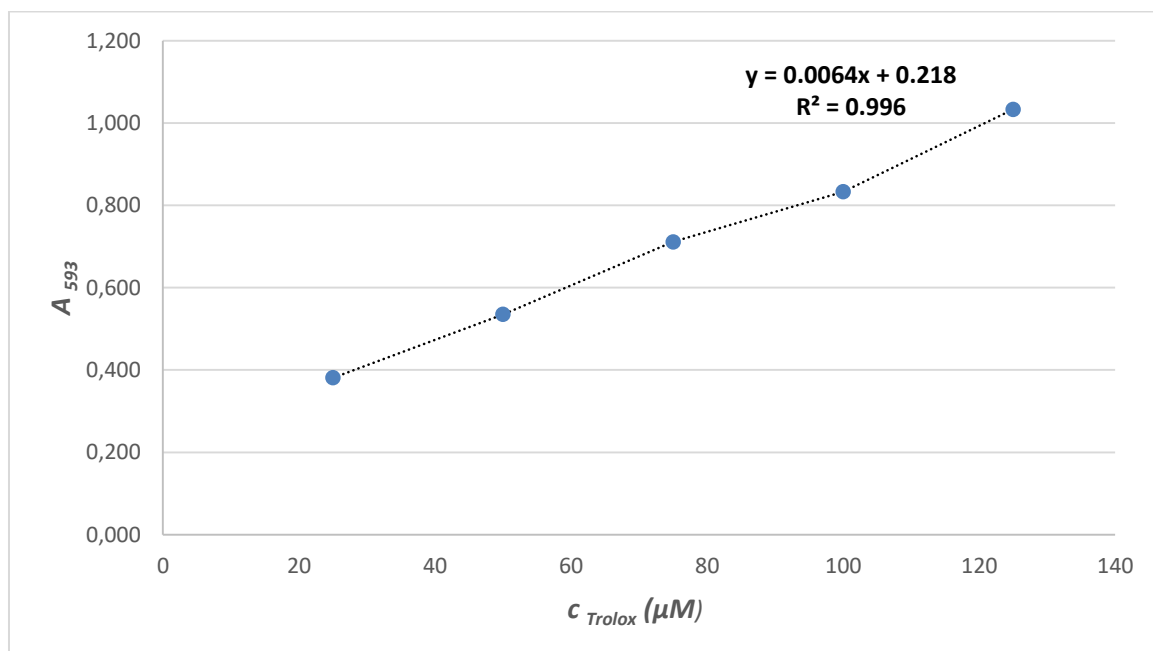
#### *Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom*

Po 3,4 mL FRAP reagensa optipetirano je u kivete i inkubirano na 37 °C u trajanju od 30 minuta. Potom je po 0,6 mL prethodno dobivenog ekstrakta dodano u kivete s 3,4 mL FRAP reagensa. Dobivena smjesa je zatim inkubirana na 37 °C u trajanju od 60 minuta, nakon čega je očitana apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm ( $A_{593}$ ). Slijepa proba sadrži sve osim uzorka/ekstrakta, umjesto kojeg se FRAP reagensu dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahirano, odnosno u ovom slučaju 1 M HCl pripremljen u 95 % etanolu (v/v, 15/85) (Sangsopha et al., 2019). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja, izražena kao ekvivalent koncentracije standarda Trolox ( $\mu\text{M}$ ).

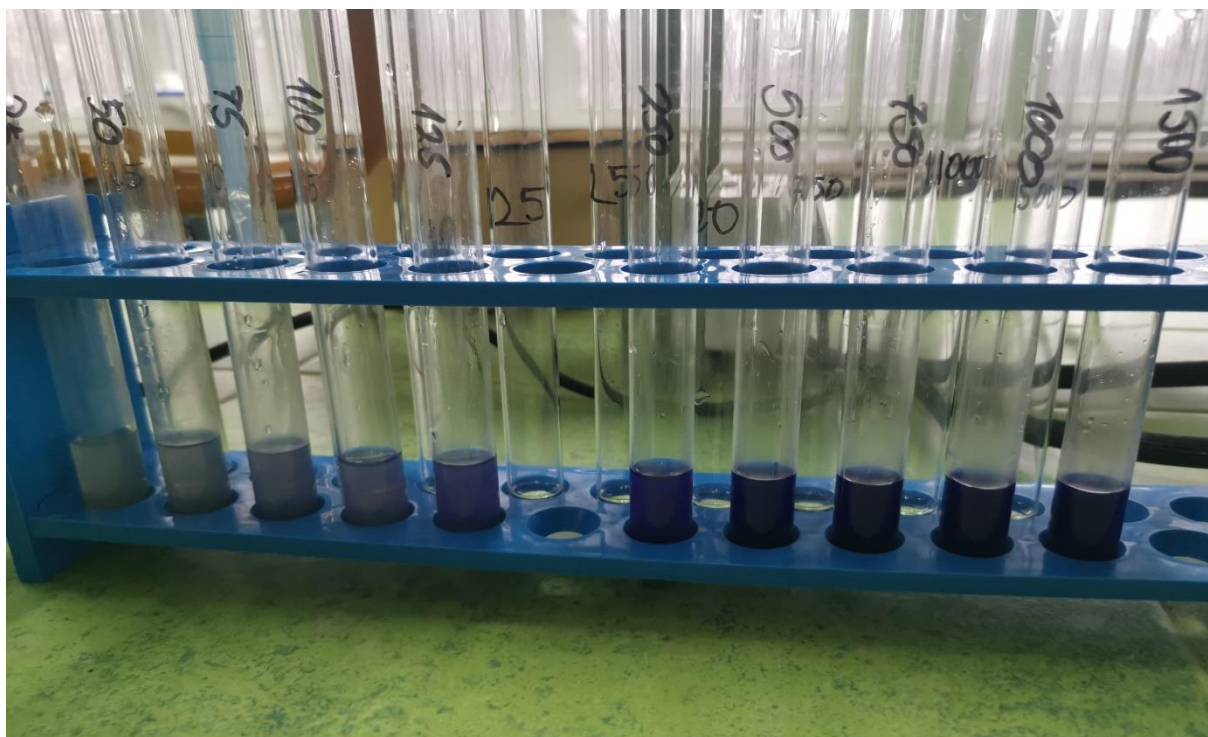
#### *Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu*

Za izradu baždarnog pravca (Slika 5.) korišten je standard Trolox-a početne koncentracije 2 mmol  $\text{L}^{-1}$  od kojeg su pripremljena odgovarajuća razrjeđenja koncentracije 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{M}$ . Tako dobivena razrjeđenja korištena su u prethodnom opisanom protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom tako što se umjesto 0,6 mL ekstrakta reakcijskoj smjesi dodavalo dodavano po 0,6 mL otopine Troloxa

poznate koncentracije (Slika 6). Rezultati su u konačnici izraženi kao mg Trolox ekvivalenta  $\text{mL}^{-1}$  (Sangsopha i sur., 2019), a za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593 nm ( $A_{593}$ ) o koncentraciji Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) za izračun antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi

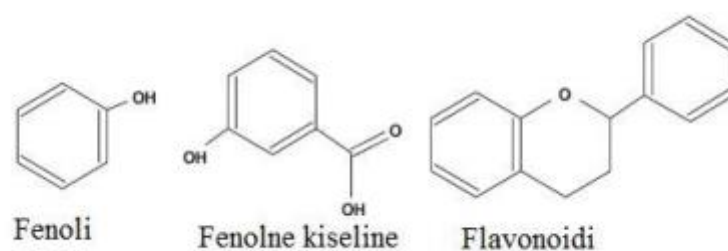


Slika 6. Postupak izrade baždarnog pravca za FRAP metodu (vlastita fotografija)



### 3.2.7.3 Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

Fenolni spojevi se po svojoj kemijskoj strukturi dijele na flavonoide i fenolne kiseline te njima srodne spojeve (Slika 7). Molekule mogu biti jednostavne strukture, ali mogu biti i visoko polimerizirani spojevi. Navedeni spojevi imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala, odnosno reaktivnih kisikovih oblika jer je redukcijski potencijal elektrona fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala elektrona reaktivnog kisikovog oblika.



Slika 7. Struktura jednostavnih fenolnih spojeva (Anonymous, 2017)

Metoda određivanja ukupnih fenola reagensom po Folin Ciocalteu temelji se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom koji omogućava mjerenja u vidljivom području spektra. Konkretno, dolazi do prijenosa elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdenske/fosfovolframatne kiseline u blago bazičnom mediju što dovodi do nastanka plavog obojenja. Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 750 nm (Singleton i sur., 1999).

Folin Ciocalteu se dodaje u suvišku kako bi se osigurala reakcija sa svim fenolnim spojevima, a spojevi koji se koriste kao standardi za prikazivanje rezultata, kao njihov maseni ekvivalent po masi ili volumenu uzorka su: taninska kiselina, galna kiselina, tirozin, katehin i ostali, a najčešće se koristi galna kiselina (Singleton i sur., 1999).

#### *Priprema kemikalija i reagensa za analizu*

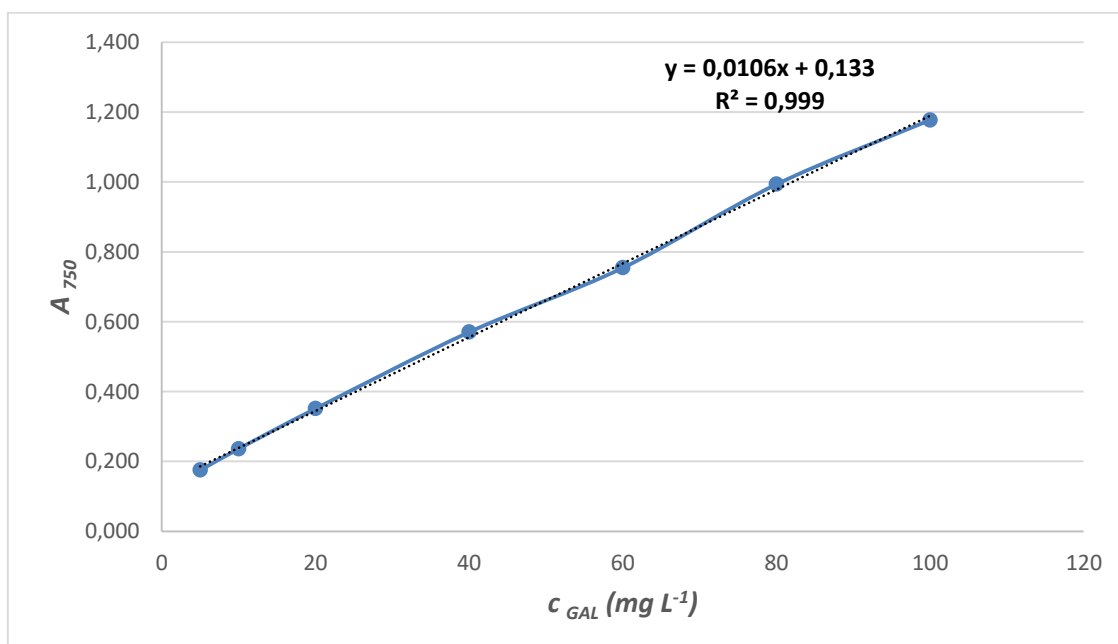
Za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu, kemikalije i reagensi se pripremaju prema Singleton i sur. (1999). Prije svakog seta mjerenja potrebno je pripremiti svježi Folin Ciocalteu reagens, na način da se razrijedi s destiliranom vodom u omjeru 1:10 (v/v). Uz Folin Ciocalteu reagens, potrebno je i pripremiti i 7,5 % (w/v) otopinu Na-karbonata.

### *Postupak određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu*

Pri određivanju ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu, redom su dodani: 0,4 mL prethodno dobivenog ekstrakta, 1,6 mL Folin Ciocalteu reagens, a nakon otprilike pet minuta i 2 mL otopine Na- karbonata. Nakon što su dodani ekstrakt, reagens te Na-karbonat, smjesa se dobro homogenizirala na vortexu i potom na mračnom mjestu inkubirala na sobnoj temperaturi u trajanju od dva sata. Nakon perioda inkubacije, očitana je apsorbancija na valnoj duljini od 750 nm ( $A_{750}$ ). Slijepa proba sadržava sve kemikalije i reagense osim uzorka umjesto kojeg je dodana destilirana voda (Sangsopha i sur., 2019). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja izražena kao ekvivalent koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

### *Postupak izrade baždarnog dijagrama za metodu sa reagensom po Folin Ciocalteu*

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



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm ( $A_{750}$ ) o koncentraciji galne kiseline (GAL,  $\text{mg L}^{-1}$ ) za određivanje ukupnih fenola

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

Provođenje SDS PAGE elektroforeze omogućuje detekciju denaturacije proteina te prikazuje na kojoj je temperaturi došlo do denaturacije pojedine proteinske frakcije. Natrijev dodecilsulfat (SDS) kao anionski deterdžent jako je denaturirajuće sredstvo te se veže na polipeptidne lance pri čemu uz redukciju disulfidnih veza, dolazi do cijepanja intramolekulskih te intermolekulskih vodikovih veza. Posljedično, poništavaju se hidrofobne interakcije te se odmotavaju polipeptidni lanci uz narušavanje sekundarne strukture.

Nakon što dođe do razmotavanja polipeptidnih lanaca, na njih se veže SDS te nastaje kompleks negativnog električnog naboja. Okvirno, dolazi do vezanja 1,4 grama SDS-a na 1 gram proteina. Nastali, negativno nabijeni kompleks polipeptid-SDS migrira prema pozitivno nabijenoj elektrodi, a razdvajanje makromolekula zasniva se na relativnoj molekularnoj masi jer je gustoća negativnog električnog naboja jednaka (Piljac, 2006).

Kod mlijeka, mjerljive promjene na sastojcima odvijaju se pri temperaturama višima od 60 °C, kada pri zagrijavanju dolazi do denaturacije proteina (sirutke) što je i vidljivo provođenjem SDS PAGE elektroforeze.

#### *Priprema kemikalija i reagensa za analizu*

U 15  $\mu\text{L}$  uzorka mlijeka dodano je 15  $\mu\text{L}$  2 x koncentriranog Laemmlia pufera, a koji se sastoji od: 1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL SDS (10 % (w v<sup>-1</sup>)), 2 mL glicerol (100 % (v v<sup>-1</sup>)), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo i 0,2 mL  $\beta$ -merkaptoetanol. Tako priređeni uzorci prokuhani su u trajanju od 150 sekundi. Iz prethodno pripremljenog 10 %-tnog poliakrilamidnog gela, izvađen je češljčić te je pripremljena aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu je uneseno 400 mL pufera za elektroforezu (1x), a po završetku kuhanja, 20  $\mu\text{L}$  uzorka je pomoću Hamilton igle nanešeno na 10 %-tni poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu uz konstantni napon od 190 V tijekom 45 minuta. Pri elektroforetskom razdvajanju korišten je standard ProSieve QuadColor Protein Marker, koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Po završetku elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02

% Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) u trajanju od dva sata, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.

10 %-tni poliakrilamidne gel sastoji se od:

#### GEL ZA RAZDVAJANJE (DONJI GEL)

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 8,82	5 mL
30 % akrilamid	3 mL
destilirana voda	2,5 mL
TEMED (N, N, N', N'-terametiletilendiamin)	5 µL
10 % APS (amonijev persulfat)	38 µL

#### GEL ZA SABIJANJE (GORNJI GEL)

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 6,82	13 mL
30 % akrilamid	0,3 mL
TEMED (N, N, N', N'-terametiletilendiamin)	5 µL
10 % APS (amonijev persulfat)	22,5 µL

Dodavanjem TEMED-a u smjesu, donji gel, odnosno gel za razdvajanje izliven je u kalup, u prostor između dva stakalca, a dodan je izopropanol kako bi se gel jednoliko rasporedio te je ostavljen da se polimerizira tijekom otprilike 45 minuta.

Izopropanol je uklonjen pomoću filter papira, u kalup je dodan gel za sabijanje, uronjen je I češljic za stvaranje jažica gela te ostavljen da se polimerizira.

Pufer za elektroforezu (10 x koncentrirana otopina) sastoji se od:

Tris	3,0 g
Glicin	14,4 g
SDS (natrijev dodecil sulfat)	1,0 g

te je nadopunjen do 100 mL s destiliranom vodom.

### 3.2.9 Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari mlijeka

Za mjerenje ukupnih otopljenih tvari (eng. Total Dissolved Solids, TDS) i vodljivosti korišten je konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska). Mjerenje se provodi na način da se sonda uroni u uzorak pri čemu se očitaju vrijednosti vodljivosti izražene kao  $\mu\text{S cm}^{-1}$  te

vrijednosti TDS-a izražene kao  $\text{mg L}^{-1}$ . Prije svakog mjerenja uzorci su razrijeđeni destiliranom vodom (10x) i homogenizirani na vorteksu (BiosanVortex V1 Plus, Latvija). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

### 3.2.10 Analiza uzoraka kravljeg mlijeka blisko-infracrvenom spektroskopijom (eng. Near Infrared Spectroscopy, NIRs)

Spektri uzorka sirovog kravljeg mlijeka, uzoraka kravljeg mlijeka tretiranih pri različitim temperaturnim režimima, te uzoraka mlijeka u prahu s različitim udjelima mliječne masti (1 %, 1,5 %, 25 %) snimani su u blisko-infracrvenom području ( $\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$ ) primjenom NIR instrumenta (NIR – 128 – 1.7 – USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  Control Development Inc., SAD) sa instaliranim programom Control Development Spec32 (Control Development Inc., SAD). Uzorci su, prije snimanja u kivetu, prethodno razrijeđeni 10 puta s destiliranom vodom, te je za svaki uzorak izračunata srednja vrijednost tri snimljena spektra.

### 3.2.11 Analiza glavnih komponenta (eng. Principal Component Analysis, PCA)

Podaci dobiveni NIR spektroskopijom (snimljeni spektri) upotrijebljeni su za provođenje Analize glavnih komponenta (eng. Principal Component Analysis, PCA). PCA je jedna od metoda multivarijantne statistike koja omogućuje analizu multidimenzionalnih podataka u svrhu pronalaženja njihovih sličnosti i različitosti, bez postavljenog fizičkog modela. Primjenom PCA metode procjenjuje se struktura podataka prije same kvantifikacije ili analize fizikalno-kemijskih parametara (Cvetković, 2017). PCA analiza provedena je u programskom paketu Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti kako različiti toplinski tretmani koji se primjenjuju u proizvodnji mlijeka utječu na kvalitetu kravljeg mlijeka; prije svega na formiranje hidrosimetilfurfurala (HMF), promjene u antioksidacijskoj aktivnosti (DPPH, FRAP) i sadržaju ukupnih fenola, stupnju denaturacije proteina kao i promjene u indeksu boje, vodljivosti, vrijednostima ukupnih otopljenih tvari. Primjenom blisko-infracrvene (NIR)

spektroskopije pratila se kvalitativna analiza strukturnih promjena na uzorcima sirovog kravljeg mlijeka, uzorcima kravljeg mlijeka tretiranih pri različitim toplinskim tretmanima te uzorcima mlijeka u prahu. Primjenom analize glavnih komponenata nastojale su se utvrditi sličnosti među testiranim uzorcima u odnosu na primijenjeni toplinski režim, odn. s obzirom na udio mliječne masti kod mlijeka u prahu. Na Slikama 9. i 10. prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a, na Slikama 11. i 12. rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala DPPH, odnosno FRAP metodom, dok su na Slici 13. prikazani rezultati određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocaleteu.

#### 4.1 ODREĐIVANJE OSNOVNOG SASTAVA I FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOSTAVA MLIJEKA

Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva mlijeka

PARAMETAR	SIROVO MLIJEKO
pH	6,61±0,04
°SH	6,60±0,00
GUSTOĆA (g L <sup>-1</sup> )	1032,40±2,83
Točka ledišta (°C)	-0,527±0,00
Bezmasna suha tvar (g 100 g <sup>-1</sup> )	9,14±0,03
Mliječna mast (%)	4,46±0,42
Proteini (g 100 g <sup>-1</sup> )	3,64±0,06
Laktoza (%)	4,58±0,05

Izmjerena aktivna kiselost, odnosno pH vrijednost sirovog uzorka kravljeg mlijeka bila je 6,61 te je dobivena vrijednost u skladu s propisima i literaturom (Božanić i sur. 2018) po kojima prosječna pH vrijednost iznosi 6,68 te je u granicama od 6,5 do 6,7. 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).

Osim aktivne kiselosti izražene u pH vrijednosti mlijeka, izmjerena je i titracijska kiselost, koja se određuje titracijom mlijeka s otopinom NaOH, uz indikator fenolftalein, a može se izražavati u stupnjevima prema Dornicu, Thörneru te Soxhlet-Henkelu. Za razliku od

određivanja kiselosti pH-metrom, gdje se mjeri aktivna kiselost, kod titracijskih se metoda mjeri i latentna kiselost, a potječe od nedisociranih kiselih sastojaka koji imaju značajan puferski kapacitet. U ovom je radu titracijska kiselost izražena u kiselinskim stupnjevima po Soxlet-Henkeli, pri čemu se koristila 0,25 molarna otopina NaOH, a izmjerena vrijednost iznosila je 6,60 °SH što je u skladu s Pravilnikom i literaturom (Božanić i sur. 2018). Prema propisima, svježe sirovo mlijeko koje se stavlja na tržište mora imati kiselinski stupanj od 6,6 do 6,8 °SH.

Gustoća mlijeka, kao i općenito gustoća neke tvari, predstavlja omjer mase i volumena. Ukoliko se gustoća definira kao omjer gustoće tvari i gustoće referentne tvari, tada se naziva relativnom gustoćom, koja kod pojedinih krava može biti u intervalu od 1,015 do 1,045, no interval gustoće skupnog mlijeka ipak je nešto uži te se kreće u vrijednostima od 1,028 do 1,034 što je bio i slučaj kod testiranog sirovog mlijeka u ovom radu (Tablica 5). Gustoća je iznosila 1032,40 g L<sup>-1</sup>, a vrijedi istaknuti kako ukupnu gustoću mlijeka čine gustoće pojedinih sastojaka mlijeka, od kojih neki imaju relativno veliku gustoću, poput soli i proteina, dok s druge strane, mliječna mast ima gustoću nižu od vode (0,915).

Temperatura ledišta označava temperaturu pri kojoj dolazi do zamrzavanja mlijeka, a iako voda čini 86-89 % sastava mlijeka, temperatura ledišta je nešto niža, a razlog su otopljene tvari, ponajprije laktoza, koja je najstabilnija konstanta. Stadij laktacije, laktacija, dob krava i sezona su čimbenici koji utječu na temperaturu ledišta, a ona se najčešće kreće u intervalu od -0,517 °C do 0,530 °C. Temperatura ledišta jedan je od najosjetljivijih fizikalno - kemijskih parametara pa već i mali dodatak vode uzrokuje povišenje temperature ledišta (Kirst i sur., 2000). Izmjerena vrijednost ledišta iznosila je -0,527 °C što je, prema Pravilniku (2020) zadovoljavajuća vrijednost.

Sastojci koji čine bezmasnu suhu tvar mlijeka su laktoza, proteini te pepeo, a u mlijeku se nalaze u rasponu od otprilike 8 do 9,5 %. Taj interval se smatra prosječnom graničnom vrijednošću, a izmjerena vrijednost uzorka sirovog mlijeka iznosila je 9,14 %, što je u skladu s literaturom (Tratnik i Božanić, 2012).

Udio mliječne masti je najpromjenjiviji od svih sastojaka suhe tvari, a vrijednosti su od 2,5 do 6,0 %. Mliječna mast utječe na okus, aromu, konzistenciju i teksturu mlijeka i mliječnih proizvoda, a nekada je njezin udio bio glavni parametar pri određivanju otkupne cijene mlijeka. Gustoća mliječne masti (0,915-0,930 g cm<sup>-3</sup>) manja je od gustoće mlijeka te zbog toga, nakon duljeg stajanja, dolazi do spontanog izdvajanja mliječne masti na površini

mlijeka. Udio mliječne masti u testiranom uzorku iznosi 4,46 % te se i taj parametar poklapa s literaturom (3-5,5 %).

Uz laktozu, proteini mlijeka su najzastupljeniji sastojak bezmasne suhe tvari, a u mlijeku ih je identificirano više od 200. Međutim, većina ih je u neznatnim koncentracijama ili tek u tragovima, dok su dva glavna tipa proteina, kazein te proteini sirutke, koji su veoma različiti. Kazein čini otprilike 80 % proteina mlijeka, ujedno je i najsloženiji te u prisutnosti kiseline ili enzima lako koagulira (proizvodnja sira). S druge strane, proteini sirutke manje su osjetljivi na djelovanje kiseline ili enzima, ali su osjetljivi na povišenje temperature pa se denaturiraju već pri temperaturama višima od 60 °C. Kravlje mlijeko sadrži najmanje 2,5 % i najviše 4 % proteina, a izmjerena vrijednost proteina kod testiranog uzorka iznosila je 3,64 % (Pravilnik 2020).

Laktoza, odnosno mliječni šećer nalazi se u mlijeku većine sisavaca, a kravlje mlijeko u prosjeku sadrži 4,5-4,8 %, dok se prosječna vrijednost kreće oko 4,6 %, a dobivena vrijednost od 4,58 % je u skladu s literaturom. Ukoliko se analizom utvrdi kako je udio laktoze ispod 4,5 %, postoji vjerojatnost kako je u pitanju mastitično mlijeko, koje se ne smije koristiti, kako u daljnjoj preradi, tako ni za konzumaciju (Zlatar, 2018). Od svih sastojaka suhe tvari, najzastupljenija je upravo laktoza (Muir, 1998). Osim laktoze, u mlijeku se nalaze i monosaharidi, glukoza i galaktoza, koji kao gradivne komponente laktoze, predstavljaju njezine razgradne produkte.

## 4.2 ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA

Boja predstavlja psihofizički doživljaj, a ovisi o izvoru svjetla, psihološkim i fiziološkim uvjetima promatrača i karakteristikama promatranog objekta. Za potrošača, boja označava jedno od najvažnijih svojstava jer se tim putem uspostavlja prvi kontakt s prehrambenim proizvodom, nakon čega se donosi zaključak o kvaliteti samog proizvoda. Boja koje ljudsko oko percipira u stvarnosti je reflektirana svjetlost s površine nekog predmeta, a upravo je iz tog razloga, karakteriziranje i opisivanje svjetlosti važno za znanost o bojama, kao i korištenje boje u računalnom vidu (Filko, 2013).

Tablica 6. Određivanje boje mlijeka

Uzorak	L*	a*	b*
--------	----	----	----



<b>Sirovo mlijeko</b>	80,56±0,11	-6,40±0,06	3,89±0,03
<b>63/15</b>	78,53±0,08	-6,16±0,04	0,80±0,06
<b>63/30</b>	80,18±0,09	-6,41±0,09	3,01±0,04
<b>72/20</b>	83,01±0,04	-6,99±0,01	5,39±0,04
<b>85/30</b>	79,62±0,08	-6,26±0,06	0,80±0,01
<b>90–95/5–10</b>	81,38±0,13	-6,63±0,01	2,49±0,02
<b>116/16</b>	83,01±0,15	-4,29±0,09	7,66±0,05
<b>120/5</b>	83,59±0,24	-4,86±0,08	6,26±0,07
<b>MUP 26</b>	85,57±0,42	-2,60±0,17	2,11±0,14
<b>MUP 1,5</b>	86,10±0,16	-4,56±0,09	3,86±0,11
<b>MUP 1,0</b>	83,34±0,11	-4,32±0,01	2,14±0,14

Analizirajući izmjerene vrijednosti iz tablice 6. može se zaključiti kako toplinski tretman izaziva povećanje L\* vrijednosti kod uzoraka koji su tretirani temperaturom većom od 90 °C te na temperaturi od 72 °C. Najveće L\* vrijednosti izmjerene su kod uzoraka mlijeka u prahu, različitog udjela mliječne masti. S druge strane, najmanja L\* vrijednost dobivena je kod uzorka mlijeka koji je u trajanju od 15 sekundi tretiran na temperaturi od 63 °C. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako kratkotrajan tretman na relativno nižim temperaturama toplinske obrade ima negativan utjecaj na bijelu boju kravljeg mlijeka.

Parametar a\* ima interval vrijednosti od -100 do +100, pri čemu negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji, a pozitivne vrijednosti parametra a\* približavanje crvenoj boji. Iz tablice 6. je vidljivo kako su kod svih uzoraka zabilježene negativne vrijednosti (približavanje zelenoj boji), a najniža vrijednost, odnosno najveće približavanje zelenoj boji zabilježeno je kod uzorka tretiranog pri 72 °C tijekom 20 sekundi. S druge strane, sterilizirani uzorci, kao i oni mlijeka u prahu, zabilježili su relativno značajno povećanje parametra a\*, čime se približavaju vrijednosti 0 te poprimaju nijanse roze boje.

Parametar b\* također ima raspon vrijednosti od -100 do + 100, pri čemu negativne vrijednosti označavaju približavanje plavoj, a pozitivne vrijednosti žutoj boji. Zajednička karakteristika svih uzoraka je pozitivno izmjerena vrijednost parametra b\*, što znači da se približavaju žutoj boji. Najveće približavanje zabilježeno je kod steriliziranih uzoraka, na temperaturi od 116 °C, odnosno 120 °C.

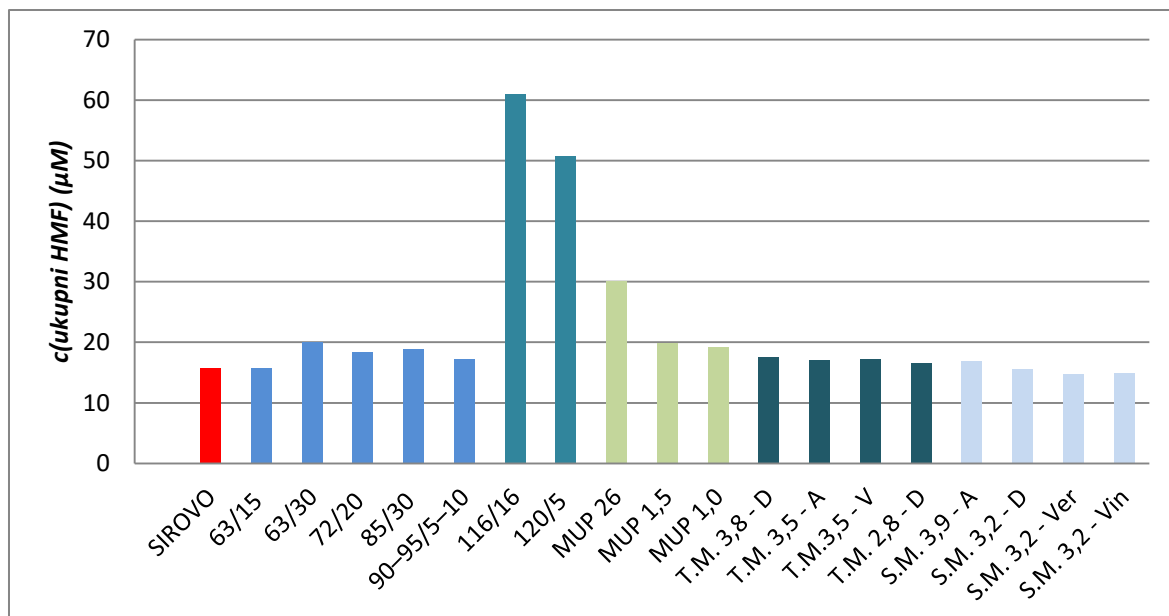
Tablica 7. Promjena boje ( $\Delta E^*$ ) uzoraka mlijeka obrađenih različitim temperaturnim režimima u usporedbi s uzorkom sirovog mlijeka

<b>UZORAK</b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>
<b>63/15</b>	3,70±0,09
<b>63/30</b>	0,97±0,14
<b>72/20</b>	2,94±0,10
<b>85/30</b>	3,23±0,02
<b>90–95/5–9</b>	1,64±0,01
<b>116/16</b>	4,97±0,20
<b>120/5</b>	4,15±0,03
<b>MUP 26</b>	6,54±0,22
<b>MUP 1,5</b>	5,84±0,04
<b>MUP 1,0</b>	3,90±0,05

U tablici 7. izračunate su  $\Delta E^*$  vrijednosti, koje prikazuju odstupanje boje kod uzoraka koji su toplinski tretirani, u odnosu na boju sirovog kravljeg mlijeka. Analizirajući izračunate vrijednosti, može se zaključiti kako su najveće promjene, odnosno odstupanja boje zabilježeni kod steriliziranih uzoraka te uzoraka mlijeka u prahu, dok je s druge strane, najmanje odstupanje boje u odnosu na referentnu, prisutno kod uzorka tretiranog na 63 °C u trajanju od 30 minuta.

#### 4.3 ODREĐIVANJE UDJELA HMF-A

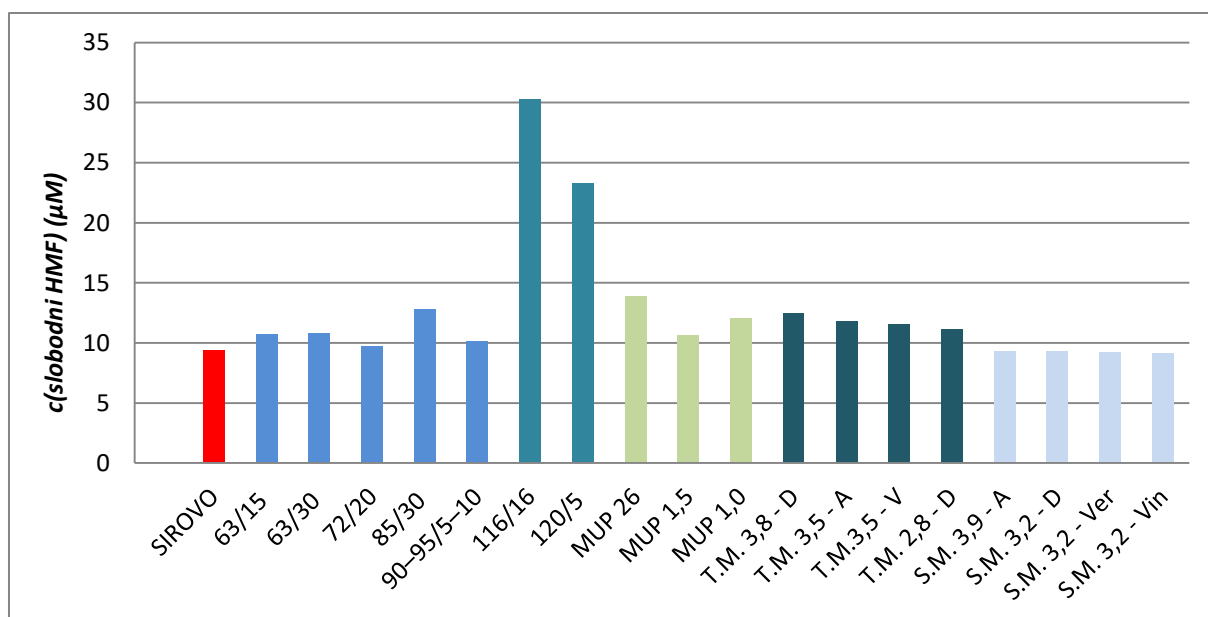
Prethodno tretiranim i pripremljenim uzorcima mlijeka izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru, pri valnoj duljini od 443 nm, nakon čega su pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama izračunate koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a, a rezultati su prikazani u Slikama 9. i 10.



**Slika 9.** Određivanje koncentracije ukupnog HMF-a ( $\mu\text{M}$ ) u sirovom mlijeku (SIROVO), uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min) i uzorcima konzumnih mlijeka (MUP 26; MUP 1,5; MUP 1,0; T.M 3,8 – D; T.M 3,5-A; T.M 3,5-V; T.M 2,8-D; S.M 3,9–A; S.M 3,2–Ver; S.M 3,2–V )<sup>\*1</sup>

Hidroksimetilfurfural (HMF) ubraja se u indikatore toplinskih tretmana koji su provedeni na mlijeku. Kao produkt Maillardovih reakcija nalazi se u mlijeku te se njegovom prisutnošću može procijeniti kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda. Također, koncentracija HMF-a može ukazati na kvalitetu toplinskog tretmana koji je primijenjen, a isto tako i na uvjete skladištenja. Već je spomenuto kako je koncentracija HMF-a u proporcionalnom odnosu s primijenjenom temperaturom za vrijeme toplinskog tretmana, odnosno povećanjem temperature i trajanja procesa, raste i koncentracija HMF-a, što je jasno vidljivo na Slici 9. koja prikazuje koncentraciju ukupnog HMF-a čija vrijednost je najveća u uzorcima steriliziranih mlijeka.

<sup>1</sup> MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.; T.M 3,8 – D Dukat trajno mlijeko 3,8 % m.m.; T.M 3,5-A Alpsko i T.M 3,5-V Vindija trajno mlijeko 3,5 % m.m.; T.M 2,8-D Dukat trajno mlijeko 2,8 % m.m.; S.M 3,9–A Alpsko svježe mlijeko 3,9 % m.m.; S.M 3,2–Ver Veronika i S.M 3,2–V Vindija svježe mlijeko 3,2 % m.m)



**Slika 10.** Određivanje koncentracije slobodnog HMF-a ( $\mu\text{M}$ ) u sirovom mlijeku (SIROVO), uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min) i uzorcima konzumnih mlijeka (MUP 26; MUP 1,5; MUP 1,0; T.M 3,8 – D; T.M 3,5-A; T.M 3,5-V; T.M 2,8-D; S.M 3,9–A; S.M 3,2–Ver; S.M 3,2–V )<sup>2</sup>

Najveće koncentracije HMF-a, kako ukupnog, tako i slobodnog, zabilježene su kod steriliziranih uzoraka mlijeka. Kada se uspoređuju dvije najveće izmjerene vrijednosti, one kod uzoraka tretiranih na 116 °C u trajanju od 16 minuta te 120 °C/5 minuta, veća količina HMF-a prisutna je kod uzorka koji je duže tretiran, što upućuje na zaključak kako je osim temperature, važan parametar tretmana i intezitet, odnosno vrijeme trajanja samog tretmana (Calligaris i sur., 2004). Jednak je zaključak i nakon analize u koju se ne uvrštavaju uzorci tretirani pri temperaturama sterilizacije, već samo oni na temperaturama nižima od 100 °C, gdje kod određivanja ukupnog HMF-a, najveću koncentraciju hidroksimetilfurfurala ima uzorak koji je tretiran pri najnižoj temperaturi, ali tijekom najdužeg vremenskog perioda, tj. pri 63 °C i trajanju od 30 minuta.

S druge strane, najniže vrijednosti koncentracija HMF-a, izmjerene su kod uzoraka svježih mlijeka, različitih udjela mliječne masti, a koji se mogu pronaći na tržištu u slobodnoj prodaji.

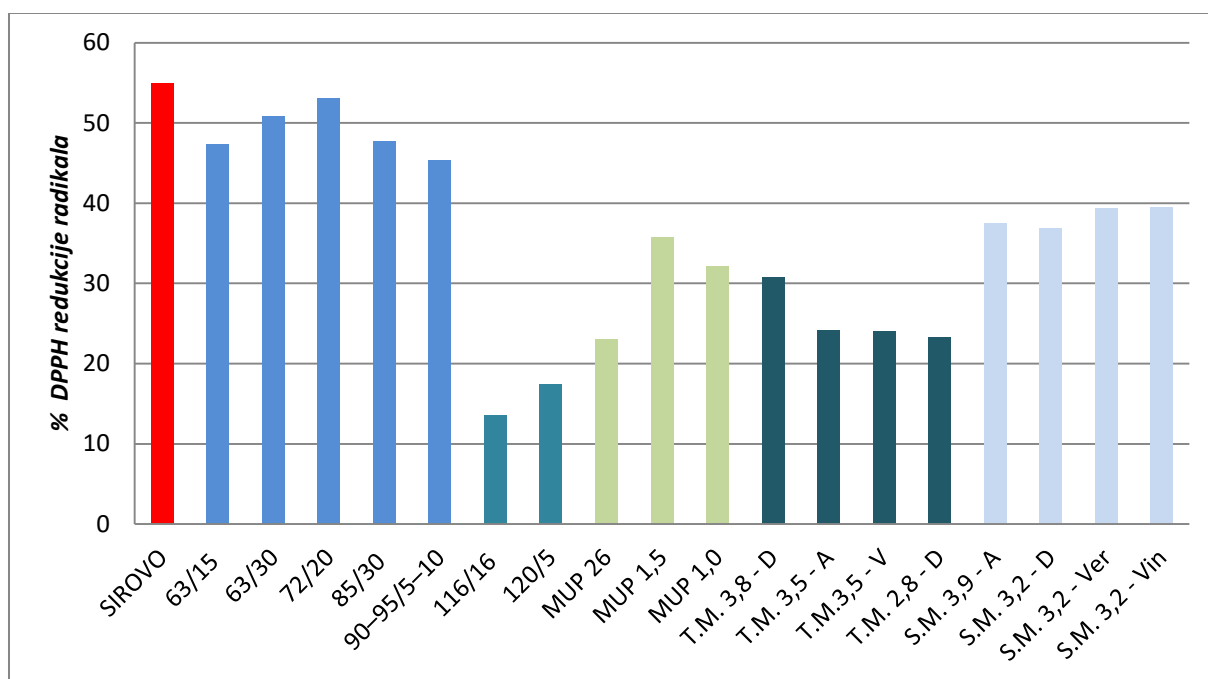
<sup>2</sup> MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.; T.M 3,8 – D Dukat trajno mlijeko 3,8 % m.m.; T.M 3,5-A Alpsko i T.M 3,5-V Vindija trajno mlijeko 3,5 % m.m.; T.M 2,8-D Dukat trajno mlijeko 2,8 % m.m.; S.M 3,9–A Alpsko svježe mlijeko 3,9 % m.m.; S.M 3,2–Ver Veronika i S.M 3,2–V Vindija svježe mlijeko 3,2 % m.m)

Također, kod istih je uzoraka zabilježeno i minimalno smanjenje koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a u odnosu na sirovi uzorak mlijeka s mljekomata. Analizirajući dobivene rezultate pri određivanju udjela HMF-a, možemo zaključiti kako toplinski tretmani, primijenjeni na uzorke mlijeka, povećavaju koncentracije ukupnog i slobodnog hidrosimetilfurfurala, a osim povećanja temperature, važan čimbenik je vrijeme trajanja toplinskog tretmana. Do jednakog zaključka došli su i drugi istraživači (Pereda i sur., 2009), koji su potvrdili kako koncentracija ukupnog HMF-a može biti parametar koji upućuje na režim kojim je mlijeko tretirano. Oni su u svom radu uspoređivali koncentracije HMF-a kod sirovog uzorka mlijeka, uzoraka mlijeka koji su tretirani povišenim tlakom i pasteriziranim uzorcima mlijeka te je najveće povećanje HMF-a zabilježeno kod uzoraka tretiranih najvišom temperaturom (pasterizirani).

Uz dodavanje vode, patvorenje mlijeka najčešće se događa kao posljedica dodavanja mlijeka u prahu. O učestalosti patvorenja mlijeka najbolje govori podatak kako se mlijeko nalazi među sedam najčešće patvorenih namirnica (Moore i sur., 2012, Azad i Ahmed, 2016). Do patvorenja najčešće dolazi zbog isteka roka trajanja mlijeka, nakon čega se mlijeko u prahu rekonstituirano te prodaje kao pasterizirano ili sterilizirano mlijeko, bez pravilnog označavanja čime dolazi do nepoštivanja tržišne konkurencije. Kao referentan parametar pri određivanju patvorenja dodatkom mlijeka u prahu, koristi se koncentracija hidrosimetilfurfurala u mlijeku (Rehman i sur., 2000). U svom su istraživanju izmjerili kako je koncentracija HMF-a u sirovom mlijeku 7,66  $\mu\text{M}$ , u pasteriziranom mlijeku vrijednosti su od 10,52 do 16,01  $\mu\text{M}$ , dok je kod mlijeka u prahu koncentracija HMF-a iznosila 28,0  $\mu\text{M}$ . Uspoređujući izmjerene vrijednosti koncentracije ukupnog HMF-a kod uzoraka svježeg mlijeka koji se mogu pronaći na tržištu (15,02 – 16,96  $\mu\text{M}$ ) te uzoraka mlijeka u prahu (19,92 – 30,12  $\mu\text{M}$ ) korištenih u ovom radu, možemo zaključiti kako uzorcima svježeg mlijeka najvjerojatnije nije dodavano mlijeko u prahu. Naime, koncentracija HMF-a odgovaraju ranijim istraživanjima, a razlike između vrijednosti su dovoljno mjerljive kako bi se moglo zaključiti da nije došlo do patvorenja. Zorić (2019) je zaključio jednako, nakon provedenog istraživanja patvorenosti 15 uzoraka konzumnog mlijeka iz trgovačke mreže, pri čemu je dodatak mlijeka u prahu ispitivan modificiranom spektrofotometrijskom metodom, nijedan analizirani uzorak konzumnog mlijeka nije bio patvoren dodatkom mlijeka u prahu.

#### 4.4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Pouzdanost DPPH metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na dobroj simulaciji reaktivnosti kisikovih i dušikovih oblika prisutnih u biološkim sustavima (Arnao, 2000). Oksidirani oblik DPPH, odnosno dušikov atom iz središta molekule reducira se primanjem protona od strane antioksidansa (Kedare i Singh, 2011). Temeljna prednost određivanja antioksidacijskih svojstava po DPPH metodi je što će tijekom vremena, DPPH reagirati s cijelim uzorkom, a reagira čak i sa relativno slabim antioksidansima.



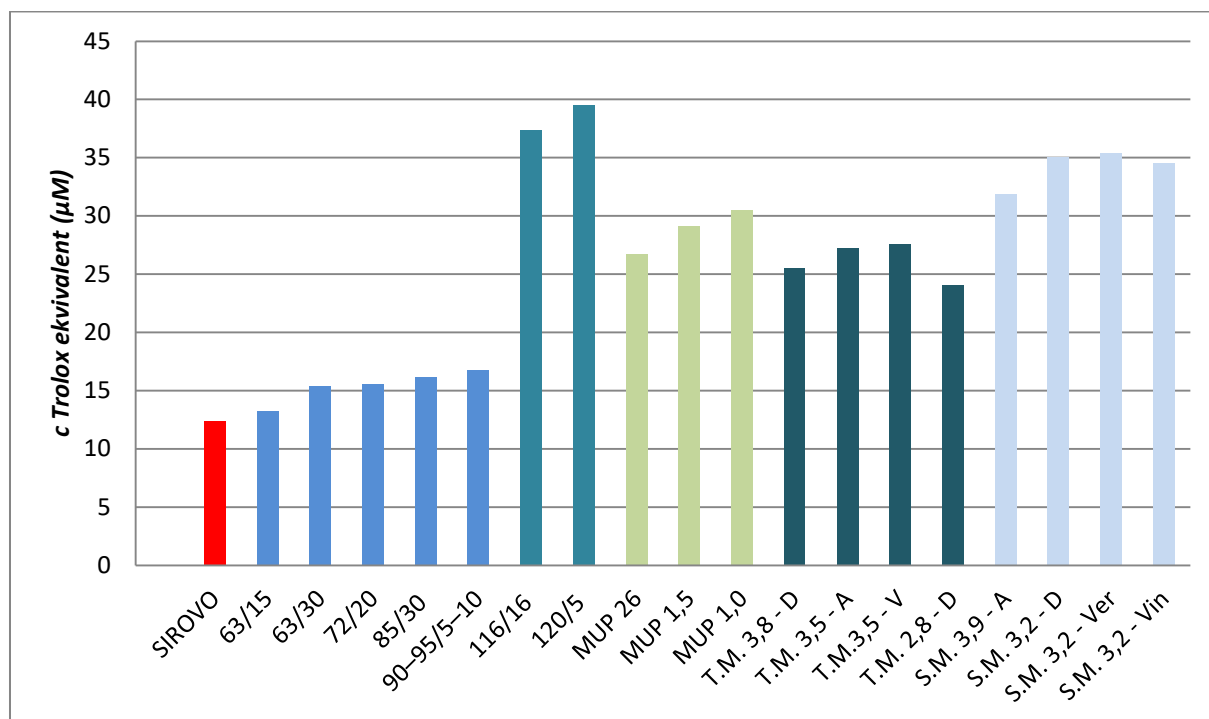
**Slika 11.** Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom te postotka redukcije slobodnih radikala u sirovom mlijeku (SIROVO), uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min) i uzorcima konzumnih mlijeka (MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.; T.M 3,8 – D Dukat trajno mlijeko 3,8 % m.m.; T.M 3,5-A Alpsko i T.M 3,5-V Vindija trajno mlijeko 3,5 % m.m.; T.M 2,8-D Dukat trajno mlijeko 2,8 % m.m.; S.M 3,9–A Alpsko svježe mlijeko 3,9 % m.m.; S.M 3,2–Ver Veronika i S.M 3,2–V Vindija svježe mlijeko 3,2 % m.m.)

Analizirajući Sliku 11. s dobivenim rezultatima, svi toplinski tretirani uzorci mlijeka bilježe pad postotka DPPH redukcije radikala u odnosu na uzorak sirovog mlijeka. Najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena je kod uzorka tretiranog na 72 °C u trajanju od 20 sekundi, dok je najveći pad aktivnosti izmjeren kod steriliziranih uzoraka te trajnih mlijeka

različitih proizvođača. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima nekih ranijih istraživanja u kojima povišenje temperature obrade te postupci pasterizacije i sterilizacije smanjuju antioksidacijsku aktivnost kravljeg mlijeka mjerenu pomoću DPPH radikala (El-Fattah i sur., 2020; De Feo i sur., 2006).

#### 4.5 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je spektrofotometrijski pri čemu se mjerio intenzitet nastalog plavog obojenja pri valnoj duljini od 593 nm. Očitane vrijednosti apsorbancije uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca te su potom preračunate u koncentraciju, izraženu kao  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenata.



**Slika 12.** Antioksidacijski potencijal FRAP metodom izražen kao ekvivalenti Troloxa (u sirovom mlijeku (SIROVO), uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min) i uzrocima konzumnih mlijeka (MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.; T.M 3,8 – D Dukat trajno mlijeko 3,8 % m.m.; T.M 3,5-A Alpsko i T.M 3,5-V Vindija trajno mlijeko 3,5 % m.m.; T.M 2,8-D Dukat trajno mlijeko 2,8 % m.m.; S.M

3,9–A Alpsko svježe mlijeko 3,9 % m.m.; S.M 3,2–Ver Veronika i S.M 3,2–V Vindija svježe mlijeko 3,2 % m.m.)

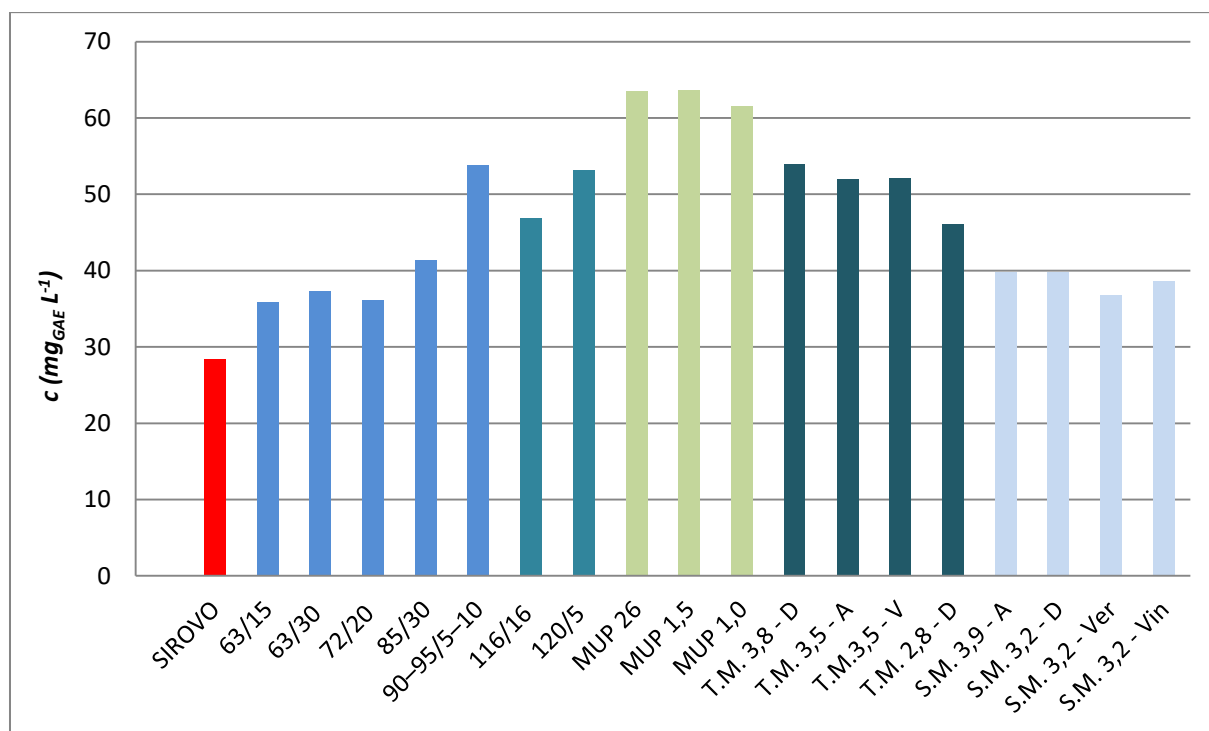
Analiza rezultata dobivenih pri određivanju antioksidacijskog potencijala FRAP metodom (Slika 12.) pokazuje kako je povišenjem temperature došlo do povećanja antioksidacijskog potencijala testiranih uzoraka, u odnosu na sirovo mlijeko. Najveća koncentracija Trolox ekvivalenta izmjerena je kod steriliziranih uzoraka, tretiranih na 116 °C i 120 °C, dok je najmanja vrijednost zabilježena kod uzorka koji je tretiran pri najnižoj temperaturi i najkraćem vremenu tretmana, odnosno pri 63 °C, u trajanju od 15 sekundi.

Minimalne promjene antioksidacijskih svojstava kod pasteriziranih uzoraka u skladu su s prijašnjim istraživanjima (Calligaris i sur., 2004), u kojima je dokazano kako ne dolazi do značajnijih promjena antioksidacijskog kapaciteta mlijeka pri zagrijavanju do 100 °C, dok se pri temperaturama iznad 100 °C vrijednosti značajnije razlikuju. Dobiveni trendovi u skladu s istraživanjem kojeg su proveli El-Fattah i sur. (2020) prateći antioksidacijsku aktivnost različitih vrsta mlijeka obrađenih pasterizacijom i sterilizacijom. Navedena skupina autora je također utvrdila kako porastom temperature obrade dolazi povećanja antioksidacijske aktivnosti mlijeka.

Uz FRAP metodu, za određivanje antioksidacijskog potencijala, korištena je i DPPH 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  $\text{Fe}^{3+}$  iona u  $\text{Fe}^{2+}$  ion pa različite sposobnosti mogu biti razlog zbog kojeg kod DPPH metode dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, dok se kod FRAP metode ona povećava s povišenjem temperature.



#### 4.6 ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALTEU



**Slika 13.** Određivanje ukupnih fenola izraženih kao ekvivalent galn kiseline ( $\text{mg}_{\text{GAE}}\text{L}^{-1}$ ) s reagensom po Folin Ciocalteu u sirovom mlijeku (SIROVO), uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30 sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min) i uzorcima konzumnih mlijeka (MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.; T.M 3,8 – D Dukat trajno mlijeko 3,8 % m.m.; T.M 3,5-A Alpsko i T.M 3,5-V Vindija trajno mlijeko 3,5 % m.m.; T.M 2,8-D Dukat trajno mlijeko 2,8 % m.m.; S.M 3,9–A Alpsko svježe mlijeko 3,9 % m.m.; S.M 3,2–Ver Veronika i S.M 3,2–V Vindija svježe mlijeko 3,2 % m.m.)

Pri određivanju ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu, zabilježeno je povećanje udjela fenola kod tretiranih i testiranih uzoraka mlijeka, u odnosu na referentni, odnosno sirovi uzorak mlijeka (Slika 13). Najveće povećanje zabilježeno je kod uzoraka mlijeka u prahu, različitih proizvođača i različitih udjela mliječne masti, dok je najmanje povećanje izmjereno kod 63 °C/15 sec i 72 °C/20 sec. Osim uzoraka mlijeka u prahu (MUP 26, MUP

1,5, MUP 1,0), značajno povećanje udjela ukupnih fenola izmjereno je kod steriliziranog uzorka od 120 °C/5 min kao i kod uzoraka trajnih mlijeka nabavljenih u maloprodaji.

Budući da fenoli ne mogu nastati iz sastojaka, već samo mogu biti prisutni u mlijeku, njihova se koncentracija ne može povećavati kako bi dobiveni rezultati indicirali. Mogući razlog zbog kojeg je ipak došlo do povećanja izmjerenih vrijednosti apsorbancije je prisutnost i drugih biološki aktivnih komponenata u mlijeku, kao što su vitamini (A, E i C), enzimi i laktoferin, koji dokazano ulaze u reakcije s Folin Ciocalteu reagensom jer poput fenolnih spojeva, imaju antioksidacijsko djelovanje (Vázquez i sur., 2015).

Također, antioksidacijskim svojstvima fenolni spojevi pridonose i kelatnim vezanjem dvovalentnih iona željeza, bakra, cinka i magnezija, aktiviranje antioksidacijskih enzima (Kazazić, 2004) te inhibicijom enzima, kao što su lipooksigenaze, ciklooksigenaze, monooksigenaze, protein kinaze itd. (Cao i sur., 1997).

Everette i sur. (2010) u svom radu navode kako s Folin Ciocalteu reagensom mogu reagirati i proteini, aminokiseline, ugljikohidrati, tioli, nezasićene masne kiseline, amini, organske kiseline, anorganski ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{I}^-$  i  $\text{SO}_3^{2-}$ ), aldehidi i ketoni zbog čega se i predlagalo da se navedena metoda koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, a ne samo sadržaja ukupnih fenola. U prilog tomu idu i rezultati ovog istraživanja koji jasno ukazuju kako povećanjem intenziteta temperaturnog režima dolazi do porasta izmjerenih vrijednosti koncentracije fenolnih sastojaka u uzorcima mlijeka (Slika 13), što prati i trend zabilježen kod određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom (Slika 12). Pozitivnu korelaciju ovih dvaju metoda utvrdili su i Alyaquobi i sur. (2014) koji su određivali antioksidacijsku aktivnost kozjeg mlijeka različitim metodama.

#### 4.7 ODREĐIVANJE ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI I TDS-a MLIJEKA

Izmjerene vrijednosti pojedinih fizikalnih svojstava mlijeka, u korelaciji su sa sastavom mlijeka, a svako odstupanje u odnosu na uobičajene vrijednosti, ali i vrijednosti propisane pravilnicima, ukazuju na nesigurnost konzumiranja takvog mlijeka. Najveća prednost takvih metoda su brzina i relativna jednostavnost u izvođenju, što omogućuje brz uvid u kvalitetu određenog uzorka. Konkretno, vrijednosti električne vodljivosti ovise o koncentracijama otopljenih iona, a posebno kloridnih iona s čijom je koncentracijom u proporcionalnom

odnosu. Ukoliko mlijeko potječe od bolesnog vimena, ta će informacija odmah biti poznata pri određivanju električne vodljivosti jer će vrijednost biti znatno viša od uobičajenih (Newlander i sur., 1977). Međutim, električna vodljivost pokazuje obrnuto proporcionalan odnos prema udjelu mliječne masti (Časek, 2010). Rezultati ispitivanja električne vodljivosti i TDS-a mlijeka te podaci dobiveni mjerenjem, prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati određivanja električne provodnosti i TDS-a mlijeka

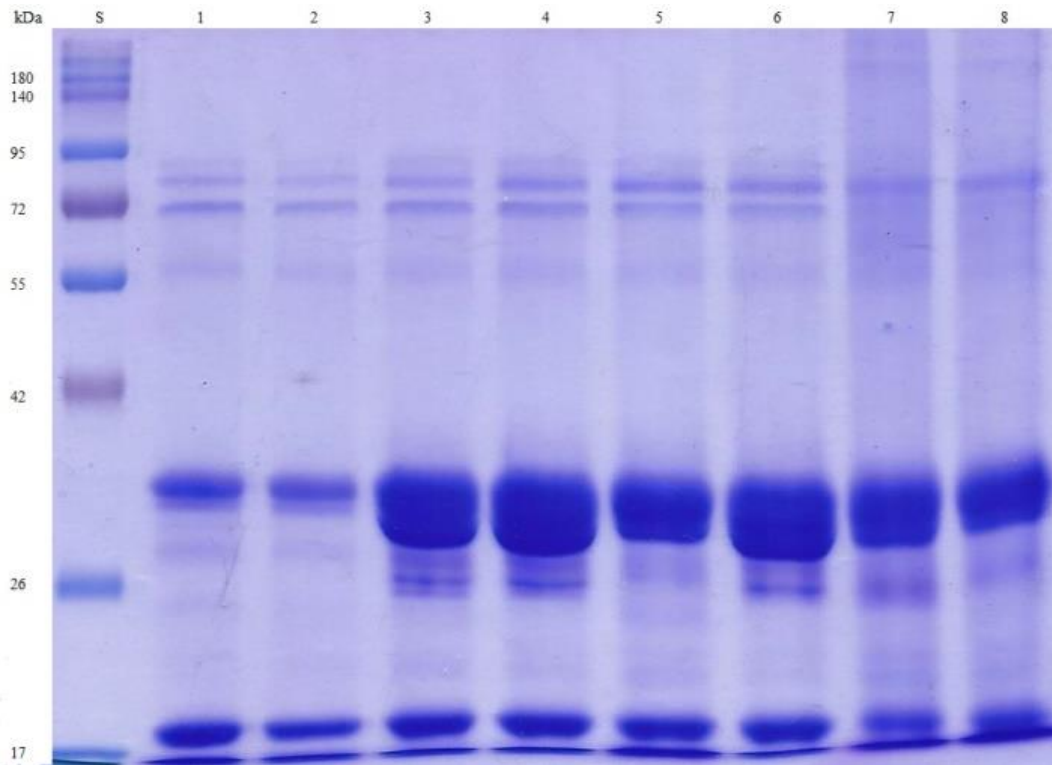
Uzorak	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	Električna vodljivost (μS cm <sup>-1</sup> )
Sirovo	244,23±11,66	516,75±4,95
63/15	256,98±12,67	523,50±15,56
63/30	279,00±6,73	567,00±12,02
72/20	250,25±2,97	489,00±2,83
85/30	253,43±8,54	502,00±12,02
90–95/5-10	296,00±7,87	608,25±4,95
116/16	297,00±2,31	595,50±13,44
120/5	299,50±2,89	606,50±17,68

Kod svih tretiranih uzoraka mlijeka došlo je do povećanja koncentracije otopljenih tvari, a iako navedeno povećanje nije linearno, vidljivo je kako su najveće vrijednosti TDS-a zabilježene kod steriliziranih uzoraka te onih uzoraka mlijeka kod kojih je toplinski tretman trajao relativno duže, 63 °C/30 min te 90–95 °C/5–10 min.

Analizirajući rezultate električne vodljivosti također su najveće izmjerene vrijednosti vidljive kod uzoraka tretiranih na relativno višim temperatura, odnosno 90 °C i višima (sterilizirani uzorci mlijeka) te kod onih uzoraka gdje je toplinski tretman duže trajao. Kao što je bilo navedeno i prije same analize, povećanjem koncentracije otopljenih tvari, raste i vrijednost električne vodljivosti, a povećanje je u ovom slučaju uzrokovano toplinskim tretmanima kojima su podvrgnuti sirovi uzorci mlijeka.

#### 4.8 SDS PAGE ELEKTROFOREZA

Pri detekciji proteina mlijeka SDS PAGE elektroforezom, korištena je otopina standarda u kojem su jasno označene molekulske mase pojedinih proteinskih frakcija (na slici kolona označena sa slovom S), dok su brojevima od 1 do 8 označene kolone sirovog mlijeka te tretiranih uzoraka i to redom prema intezitetu tretmana.



**Slika 14.** SDS PAGE elektroforeza sirovog mlijeka (1) i uzoraka tretiranih različitim režimima toplinske obrade (2 - 63-65 °C/15 sec; 3 - 63-65 °C/30 min; 4 -72 °C/20 sec; 5 -85 °C/30 sec; 6 - 90-95 °C/5-10 min; 7 - 116 °C/16 min; 8 - 120 °C/5 min)

Na slici 14. je vidljivo devet kolona koje prikazuju rezultate SDS PAGE elektroforeze. Kolona označena slovom S predstavlja otopinu poznatog standarda, u kojem su detektirane proteinske frakcije koje imaju relativne molekulske mase od 17 do 180 kDa. Frakcije su prikazane bandovima, koji se jasnije detektiraju u prva dva uzorka, sirovom i onom tretiranom na 63 °C u trajanju od 15 sekundi, kod kojih nije došlo do osjetljivije denaturacije proteina.

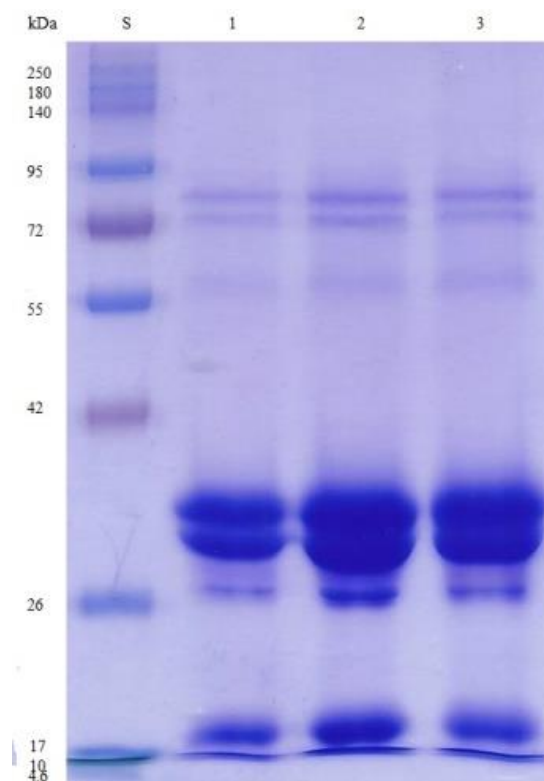
Kod proteina sirutke denaturacija je prisutna na temperaturama od 60 °C, a pojačava se povišenjem temperature što je i vidljivo na slici.  $\beta$ -laktoglobulin ima molekulska masu od oko 18 kDa te je vidljivo kako su ti proteini prvi denaturirani jer su i najosjetljiviji na povećanje

temperature. Denaturacija se očituje kroz nestanak jasno ocrtanog banda te pojavu zamućenja (nijansa plave boje).

Ovi su rezultati u skladu s ranije provedenim istraživanjima (Lin i sur., 2010) u kojima je pri temperaturama pasterizacije došlo do denaturacije 23 % proteina sirutke, dok pri temperaturama sterilizacije gubitak proteina sirutke iznosi više od 85 %. Istraživači su također zaključili kako se SDS PAGE elektroforeza može pouzdano koristiti kao relativno jeftina metoda određivanja denaturacije proteina mlijeka.

Nakon bandova koji pripadaju proteinima sirutke na 18 kDa, sljedeće pruge koje su jasno vidljive su one u području od 25 do 35 kDa, a pripadaju kazeinu. Kazeinske pruge su relativno stabilne, sve do uzoraka u kojima je mlijeko tretirano na temperaturama sterilizacije što je u skladu s očekivanjima jer je kazein termostabilan te do njegove denaturacije dolazi tek pri višim temperaturama.

U području između 66 i 72 kDa detektirani su i albumini krvnog seruma, koji su kao i kazein, stabilni kod pasteriziranih uzoraka mlijeka, dok do denaturacije dolazi tek pri temperaturama od 116 °C, odnosno 120 °C.



**Slika 15.** SDS PAGE elektroforeza uzoraka mlijeka u prahu (1 – MUP 26; 2 – MUP 1,5; 3 – MUP 1,0)

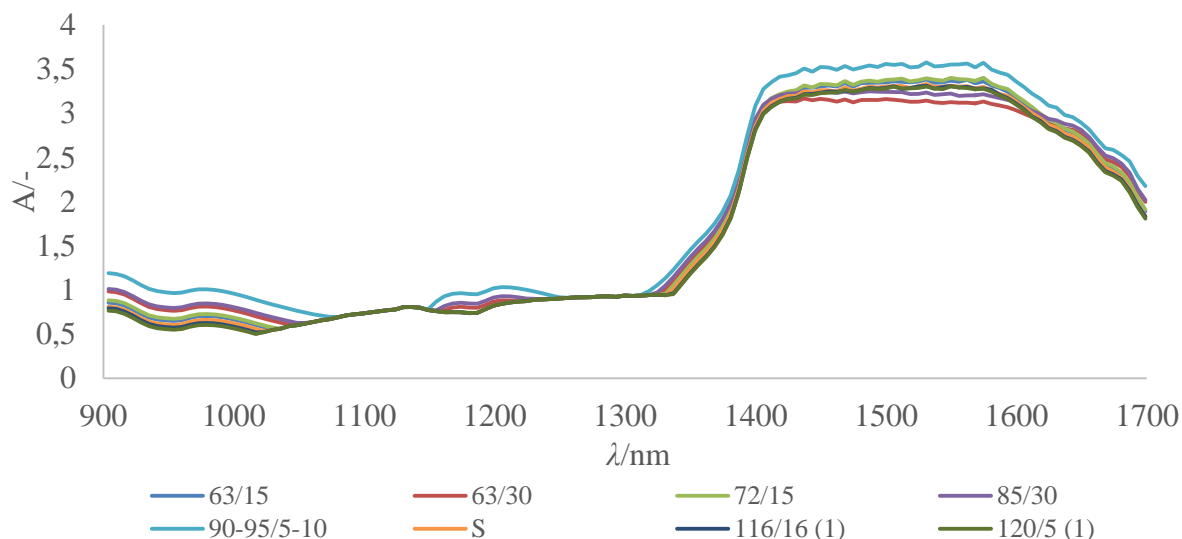
Na slici 15. su prikazani rezultati SDS PAGE elektroforeze za uzorke mlijeka u prahu, koji su u skladu s rezultatima tretiranih uzoraka mlijeka. Međutim, na ovoj je slici vidljiv i  $\alpha$ -laktalbumin, čija relativna molekulska masa iznosi 14 kDa te je vidljiv kao najniža pruga na slici.

Budući da se mlijeko u prahu sastoji od pasteuriziranog obranog mlijeka, pruge koje pripadaju kazeinu su relativno stabilne jer nisu primijenjene temperature više od 100 °C na kojima dolazi do denaturacije. Oko 70 kDa vidljivi su i albumini krvnog seruma, koji su također relativno stabilni jer denaturiraju tek pri višim temperaturama.

#### 4.9 NIR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KRAVLJEG MLIJEKA

Za kvalitativnu analizu strukturnih promjena na uzorcima sirovog kravljeg mlijeka, uzoraka kravljeg mlijeka tretiranih pri različitim temperaturama te uzoraka mlijeka u prahu koristila se blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija (Slika 16. i Slika 17). Na temelju rezultata prikazanih na Slici 16. vidljivo je da do znatnog skoka apsorbancije dolazi pri valnom području od 904 – 985 nm, 1150 – 1250 nm te 1350 – 1699 nm. U području valnih duljina 904 – 985 nm pojavljuju se vibracije C – H veza u trećoj regiji (eng. overtone) te O – H veza u drugoj regiji. U području valnih duljina 1150 – 1250 nm pojavljuju se vibracije C – H veza u drugoj regiji te C = O veza u četvrtoj regiji. Vibracije N – H, O – H i C – H veza u prvoj regiji pojavljuju se u području valnih duljina 1350 – 1699 nm (Badr-Eldin, 2011). Vibracije C – H i C = O veza u području valnih duljina 1150 – 1250 nm mogu se povezati sa mliječnom masti kao jednom od glavnih komponenata mlijeka dok se vibracije N – H, C – H i O – H veza, u području valnih duljina 1350 – 1699 nm, mogu povezati sa udjelom proteina u kravljem mlijeku (Ottavian i sur., 2012).

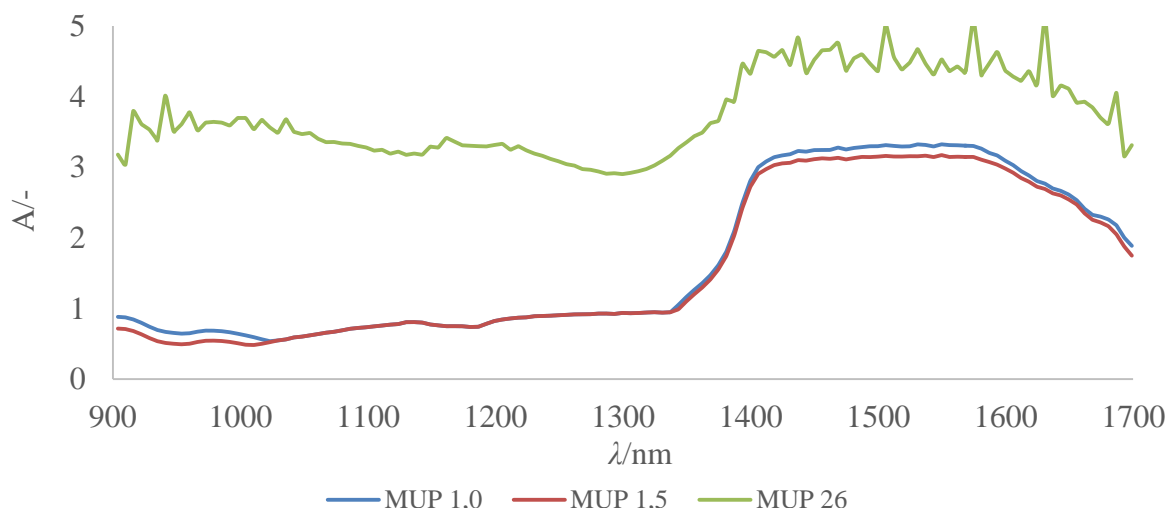
NIR spektri uzorka sirovog kravljeg mlijeka te uzoraka tretiranih pri različitim temperaturama su slični. Kod uzorka kravljeg mlijeka tretiranog pri 90 °C uočava se viša vrijednost apsorbance, u odnosu na ostale uzorke (Slika 16.), što se može povezati s denaturacijom proteina, odnosno nastankom kompleksa između  $\kappa$ -kazeina i proteina sirutke (Corredig i Dalgleish, 1996), a koja je vidljiva i na slici 14.



**Slika 16.** NIR spektri u sirovom mlijeku (S) te uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min)

Na temelju rezultata prikazanih na Slici 17. vidljivo je da do skoka apsorbancije dolazi pri valnom području od 904 – 985 nm te 1350 – 1699 nm. U području valnih duljina 904 – 985 nm pojavljuju se vibracije C – H veza u trećoj regiji (eng. overtone) te O – H veza u drugoj regiji. Vibracije N – H, O – H i C – H veza u prvoj regiji pojavljuju se u području valnih duljina 1350 – 1699 nm (Badr-Eldin, 2011). Vibracije N – H, C – H i O – H veza, u području valnih duljina 1350 – 1699 nm, mogu se povezati s udjelom proteina u kravljem mlijeku (Ottavian i sur., 2012).

Također je vidljivo da do spektralnog preklapanja uzoraka mlijeka u prahu s 1 % odn. 1,5 % mliječne masti dolazi u području valnih duljina 1030 – 1350 nm. NIR spektri navedenih uzoraka su slični što ukazuje na sličnost u strukturi navedenih uzoraka. S druge strane NIR spektar uzorka mlijeka u prahu s 26 % mliječne masti značajno se razlikuje od uzoraka s niskim postotkom dodanog mlijeka u prahu.



**Slika 17.** NIR spektri konzumnih mlijeka (MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.)

#### 4.10 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA

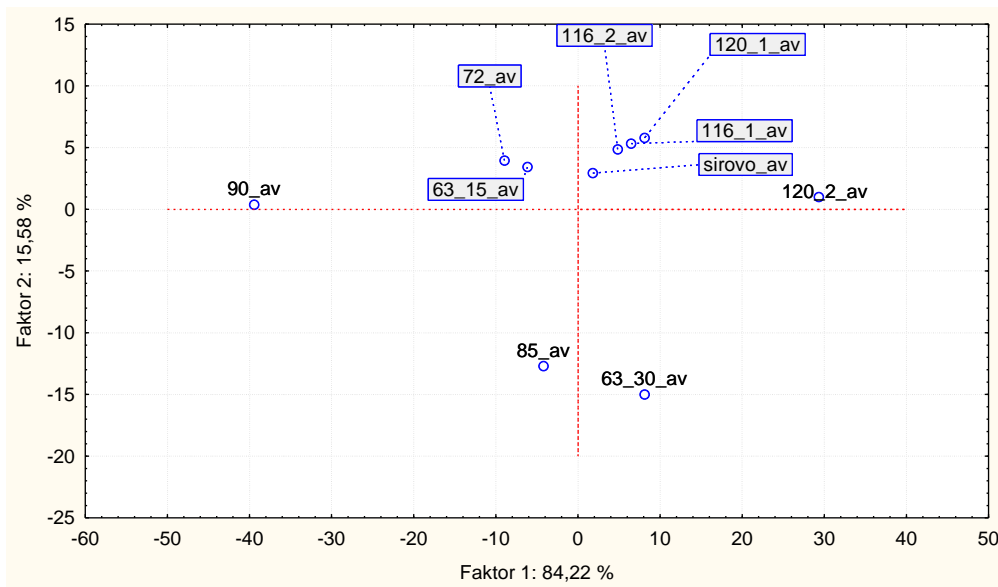
Analiza glavnih komponenata (PCA) jedna je od najjednostavnijih metoda multivarijantne statistike koja se primjenjuje u slučajevima opsežnog broja varijabli. PCA se definira kao statistički postupak za reduciranje dimenzije podataka, a koristi se za smanjenje dimenzionalnosti podatkovnog skupa, uz zadržavanje karakteristika podataka koje najviše doprinose varijanci (Kim, 2002).

Ciljevi PCA su redukcija podataka, odnosno smanjenje broja izvornih varijabli na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli i koji se zovu glavne komponente te njihova interpretacija pri čemu glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način te na taj način pokazuje neke skrivene povezanosti, međuodnose podataka (Filipović, 2018). PCA predstavlja svojevrsnu transformaciju podataka na način da bira novi koordinatni sustav za skup podataka, gdje najveća varijanca bilo koje projekcije skupa podataka leži na prvoj osi (prva glavna komponenta), druga najveća varijanca na drugoj osi itd.

Analiza glavnih komponenata (PCA) je upotrebljena kako bi se prikazale sličnosti odnosno različitosti uzoraka kravljeg mlijeka prema tretmanima koji su provedeni pri različitim temperaturama. Slika 18. prikazuje PCA analizu NIR spektara uzorka sirovog mlijeka te

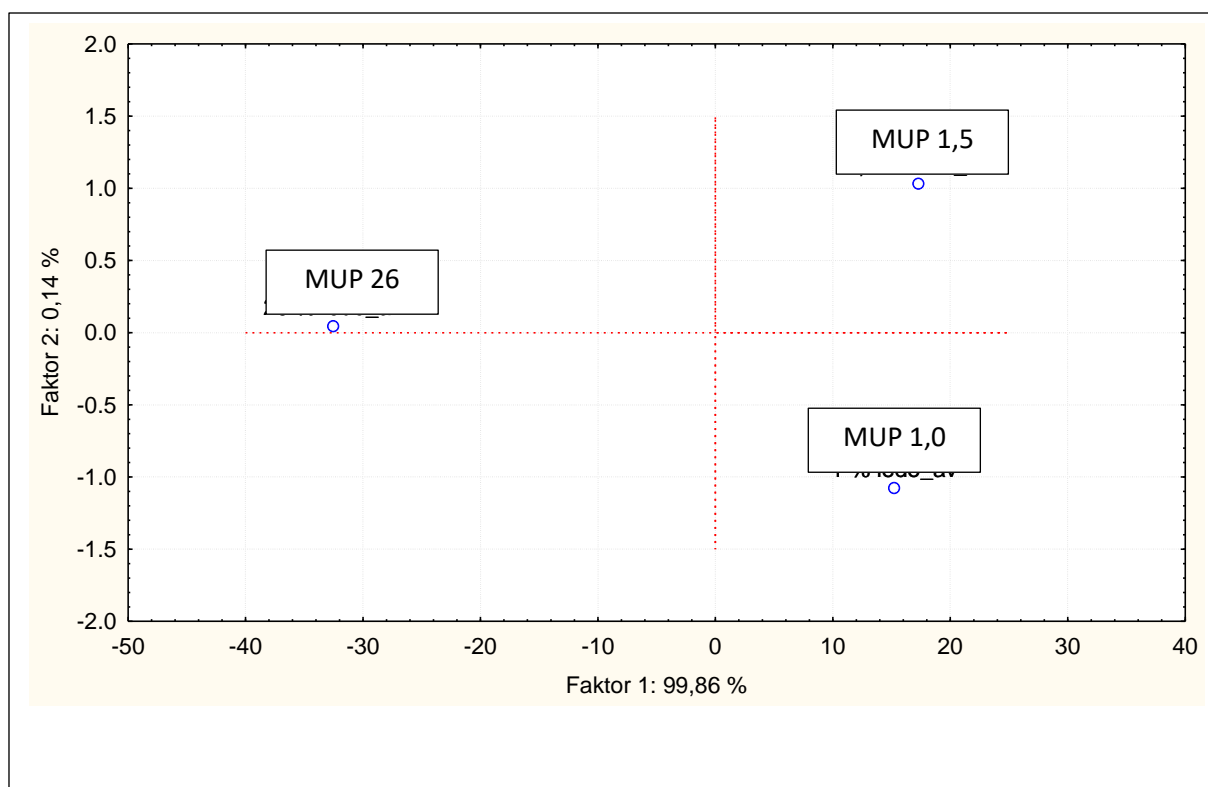


uzoraka mlijeka tretiranih pri različitim temperaturama. Uzorak sirovog mlijeka te uzorci kravljeg mlijeka koji su tretirani pri temperaturama 63 °C/15 sec, 72 °C, 90 °C, 116 °C i 120 °C grupirani su u prvom i drugom kvadrantu dok su uzorci kravljeg mlijeka koji su tretirani pri temperaturama 63 °C/30 min i 85 °C smješteni u četvrtom i trećem kvadrantu. Na temelju slike 18. može se zaključiti da su PCA analizom uočljiva razdvajanja prema tretmanu te prema navedenoj blizini uzoraka možemo zaključiti da su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore. Budući da se uzorak kravljeg mlijeka tretiran pri 63 °C/30 min smjestio u četvrtom kvadrantu, može se pretpostaviti da je vrijeme trajanja tretmana imalo utjecaj na razdvajanje u odnosu na ostale tretmane. Primjenom PCA analize, ukupno se može pojasniti preko 90 % varijance u promatranom skupu podataka (84,22 % + 15,58 %).



**Slika 18.** Analiza glavnih komponentata (PCA) NIR spektara uzorka sirovog mlijeka (sirovo) te uzorcima mlijeka tretiranim različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 sec; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 sec; 85 °C/30sec; 90-95 °C/5-10 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min)

Slika 19. prikazuje PCA analizu NIR spektara uzorka mlijeka u prahu s različitim udjelima mliječne masti. Na temelju provedene analize može se zaključiti da je došlo do razdvajanja uzoraka kravljeg mlijeka s obzirom na udio mliječne masti.



**Slika 19.** Analiza glavnih komponenata (PCA) NIR spektara konzumnih mlijeka u prahu (MUP 26 - mlijeko u prahu 26 % m.m.; MUP 1,5 - mlijeko u prahu 1,5 % m.m.; MUP 1,0 - mlijeko u prahu 1 % m.m.)

Uzorak s 1 % mliječne masti rasporedio se u četvrtom kvadrantu dok su preostala dva uzorka smještena u prvi (uzorak s 1,5 % mliječne masti) te u drugi kvadrant (uzorak s 26 % mliječne masti). S obzirom da su grupirani u prvom i četvrtom kvadrantu, vidljivo je kako su uzorci s 1,0 % i 1,5 % sličniji s obzirom na ispitivane faktore u odnosu na uzorak s 26 % mliječne masti. Primjenom PCA analize, ukupno se može pojasniti preko 90 % varijance u promatranom skupu podataka (99,86 % + 0,14 %).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Najveće koncentracije HMF-a, kako ukupnog, tako i slobodnog, zabilježene su kod steriliziranih uzoraka mlijeka. S druge strane, najmanje koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a izmjerene su kod uzoraka svježih mlijeka koja se mogu pronaći na tržištu te uzoraka sirovog mlijeka koji su tretirani pri najnižim temperaturama (63 °C) te su najkraće bili izloženi toplinskom tretmanu (63-65 °C/15 sec i 72 °C/20 sec). Na povećanje koncentracije HMF-a osim povećanja temperature utječe i trajanje toplinskog režima.
2. Najveći pad antioksidacijskog kapaciteta mjerenog DPPH metodom utvrđen je kod svih steriliziranih uzoraka (116 °C/16 min i 120 °C/5 min te komercijalno dostupnog trajnog mlijeka), dok je najmanji pad zabilježen kod uzorka tretiranog na 72 °C u trajanju od 20 sekundi.
3. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjerenog FRAP metodom pokazuju kako je povišenjem temperature došlo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta testiranih uzoraka u odnosu na sirovo mlijeko. Najveća koncentracija Trolox ekvivalenta izmjerena je kod steriliziranih uzoraka tretiranih na 116 °C (37,34 µM) i 120 °C (39,53 µM), dok je najmanja vrijednost (13,28 µM) zabilježena kod uzorka tretiranog pri najnižoj temperaturi i najkraćem vremenu tretmana (63 °C/15 sec).
4. Određivanjem koncentracije ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteau, zabilježeno je povećanje izmjerenih vrijednosti kod svih tretiranih i komercijalnih uzoraka mlijeka u odnosu na sirovi uzorak mlijeka. Najveća vrijednost izmjerena je kod steriliziranih uzoraka što se može pripisati drugim biološki aktivnim komponentama koje nastaju uslijed toplinskih promjena na mlijeku te također imaju antioksidacijsko djelovanje i ulaze u reakcije s Folin Ciocalteau reagensom.
5. Kod svih tretiranih uzoraka mlijeka došlo je do povećanja koncentracije otopljenih tvari (TDS). Iako navedeno povećanje nije linearno, najveće vrijednosti TDS-a zabilježene su kod steriliziranih uzoraka te uzoraka mlijeka podvrgnutih duljim toplinskim tretmanima (63 °C/30 min, 90–95°C/5–10 min).
6. Vrijednosti električne vodljivosti također su najveće kod uzoraka tretiranih na višim temperaturama ( $\geq 90$  °C) te kod uzoraka podvrgnutih duljim toplinskim tretmanima. Također, utvrđeno je da povećanjem koncentracije otopljenih tvari raste i vrijednost električne vodljivosti.

7. Povećanje temperature uzrokuje denaturaciju proteina što je vidljivo iz rezultata SDS PAGE elektroforeze. Proteini sirutke,  $\alpha$ -laktalbumin i  $\beta$ -laktoglobulin su denaturirani pri nižim temperaturama (72 °C) u usporedbi s albuminima krvnog seruma i kazeinom, koji su se pokazali termostabilnijim te su denaturirani tek pri temperaturama sterilizacije (116 °C i 120 °C).
8.  $\Delta E^*$  vrijednosti dobivene mjerenjem indeksa boje ukazuju kako su najveće promjene boje zabilježene kod steriliziranih uzoraka (116 °C/16 min i 120 °C/5 min) te uzoraka mlijeka u prahu, dok je s druge strane, najmanje odstupanje boje u odnosu na referentnu, prisutno kod uzorka tretiranog na 63 °C u trajanju od 30 minuta.
9. Na temelju svih dobivenih rezultata, može se zaključiti kako koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a, vrijednosti indeksa boje, TDS-a, električne vodljivosti i antioksidacijskog kapaciteta mogu poslužiti kao kvalitativni indikatori inteziteta toplinskog režima kojim je sirovo mlijeko obrađeno.
10. Uspoređujući izmjerene vrijednosti koncentracije HMF-a kod uzoraka svježeg konzumnog mlijeka koji se mogu pronaći na tržištu (15,02 – 16,96  $\mu$ M) te uzoraka mlijeka u prahu (19,92 – 30,12  $\mu$ M) korištenih u ovom radu, može se zaključiti kako uzorcima konzumnog mlijeka nije dodavano mlijeko u prahu.
11. NIR spektri uzorka sirovog kravljeg mlijeka te uzoraka tretiranih pri različitim temperaturama su slični. Kod uzorka kravljeg mlijeka tretiranog pri 90 °C uočava se viša vrijednost apsorbancije, u odnosu na ostale uzorke što se može povezati s denaturacijom proteina, odnosno nastankom kompleksa između  $\kappa$ -kazeina i proteina sirutke vidljivih i kod SDS elektroforeze.
12. Na temelju PCA analize uočljiva su razdvajanja tretiranih uzoraka prema režimu toplinske obrade te prema navedenoj blizini uzoraka možemo zaključiti da su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore. Kod uzoraka mlijeka u prahu uočljivo je razdvajanje uzoraka s obzirom na različite udjele mliječne masti.

## 6. LITERATURA

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**, 5315–5329.

Alyaqoubi, S., Abdullah, A, Samudi, M., Abdullah, N, Radhi Addai, Z., Al-ghazali, M. (2014) Effect of Different Factors on Goat Milk Antioxidant Activity. *Int. J. Chemtech Res.* **6**, 3091-3196.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *R. Soc. Chem.* **127**, 183–198.

Arnao, M.B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 419-421.

Azad, T., Ahmed, S. (2016) Common milk adulteration and their detection techniques. *Food Contam.* **3**, 22

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

Bajt, N., Golc-Teger, S., Pirkmajer, E. (1998) Mleko in mlečni izdelki, Zavod Republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana

Barukčić, I. (2017) Osigurava li konzumacija mlijeka zdraviji život? *Mljekarska revija Mlijeko i ja*, **26**, 4-6

Bay, B. H., Lee, Y. K., Tan, B. K. H., & Ling, E. A. (1999) Lipid peroxidative stress and antioxidative enzymes in brains of milk-supplemented rats. *Neuroscience Letters*, **277**, 127-130.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999) Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15-27.

Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, 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, 76-77, 88.
- Cacho, N.T., Lawrence, R.M. (2017) Innate immunity and breast milk. *Front. Immunol.* **8**, 584
- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C. (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant and prooxidant activity of milk. *Int. Dairy J.* **14**, 421–427.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749-760
- Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) *Azospirillum* spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for *Azospirillum*, (Cassan i sur., ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.
- Chávez-Servín, J.L., Andrade-Montemayor, H.M., Velázquez-Vázquez, C., Aguilera-Barreyro, A., García-Gasca, T., Ferríz-Martínez, R.A., Olvera-Ramírez, A.M., 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.
- Corredig, M., Dalgleish, D. G. (1996) Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *J. Dairy Res.* **63**, 441-449.
- Cvetković, A. (2017) Modeliranje i optimiranje fizikalno-kemijskih karakteristika i UV spektara vodenih ekstrakata lavande i melise. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Časek, D. (2010) Sastav, svojstva i primjena kozjeg mlijeka, Zagreb.
- De Feo V., Quaranta E., Fedele V., Claps S., Rubino R., Pizza C. (2006) Flavonoids and terpenoids in goat milk in relation to forage intake. *Italian J. of Food Sci.* **1**, 85-92

- Donovan, M.; Mulvihill, D. M. (1987) Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish J. Food Sci. Techn.* **11**, 87-100.
- El-Fattah, A.A., 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)**, 1-9.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B. (2010) A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem.* **58**, 8139-8144.
- FAO (2019) Overview of global dairy market developments in 2018. < <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf>. > Pristupljeno 25. srpnja 2021.
- Filipović, M. (2018) Procjena pekarske kvalitete kultivara ozime pšenice primjenom kemometrijske analize glavnih komponenata. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
- Filko, D. (2013) Robusna lokalizacija mobilnog robota zasnovana na vizualnim obilježjima ravninskih segmenata. Doktorska disertacija. Elektrotehnički fakultet, Osijek
- 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.
- Ilijanić, V. (2019) Antioksidacijska aktivnost mliječnog proizvoda dobivenog pomoću kefirnih zrnaca. Diplomski rad. Medicinski fakultet, Rijeka.
- Kamau, S.M., Cheison, S.C., Chen, W., Liu, X.-M., Lu, R.-R. (2010) Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Sci. and Food Saf.* **9**, 197-212.
- Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* **48**, 412-422.
- Khan, I., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., Hayat Jaspal, M. (2019) Antioxidant properties of Milk and dairy product. *Lipids Health Dis.* **18**, 41.

Kirst, E., Jacobi, U., Elschner, M., Rottger, K., Huth, R. (2000) Der Gefrierpunkt der Rohmilch: Ursachen nicht fremdwasserbedingter Abweichungen des Gefrierpunkt der Milch. *DMZ*. **17**, 732-738.

Manners, J., Craven, H. (2003) Processing of Liquid Milk. *J. Food Sci. Technol.* **2**, 3951-3957.

Martins, S.I.F.S, Jongen, W.M.F, van Boekel, M.A.J.S. (2001) A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 364-373.

Meunier-Goddik, L., Sandra, S. (2002) Liquid milk products/Pasteurized Milk. U: Encyclopedia of Dairy Science (Ed. Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F.), Academic Press, 1627-1632.

Miletić, S. (1994): Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb, 104-114.

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

Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M. (2012): Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci. Technol.* **77**, 118–126.

Morales, F.J., Romero, C., Jimenez-Perez, S. (1996) Evaluation of heat-induced changes in Spain comercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *J. Food Sci. Technol.* **31**, 411-418.

Muir, D.D., (1998) Milk chemistry and nutritive value, U: The Technology od Dairy Products, ured. Early, R.y Blackie Academic & Professional, London, 353-367

Newlander, J.A., Atherton, H.V. (1997) The Chemistry of tasting of diary products, Madison

Lin, S., Sun, J., Cao, D., Cao, J., Jiang, W. (2010) Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chem.* **3**, 803–808.



O'donnell, R., Holland, J.W., Deeth, H.C., Alewood, P. (2004) Milk proteomics. *Int Dairy J.* **14**, 13-23.

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'allevato cheese. *J. Food Eng.* **113**, 289–298.

Ou, B., Huang, D, Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002) Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 3122-3128.

Özdal, H.R., Yıldız, B, Arkun, G. (2018) Hydroxymethylfurfural (Hmf) Formation in Milk and Dairy Products. *Int. J. Food Eng.* 13-23.

Pereda J, Ferragut V, Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2009) Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocoll.* **23**, 1974–1979

Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2020) *Narodne novine* **136**, Zagreb.

Piljac, I. (2006) Elektroforeza, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Rehman, Z.U., Saeed, A., Zafar, S.I., (2000) Hydroxymethylfurfural as an indicator for the detection of dried powder in liquid milk. *Milchwissenschaft.* **5**, 256-257

Ritota, M., Di Costanzo, M.G., Mattera, M., Manzi, P. (2017) New Trends for the Evaluation of Heat Treatments of Milk. *J. anal. methods chem.* 1-12.

Rosenberg, M. (2002): Liquid milk products/Sterilized Milk. U: Encyclopedia of Dairy Science (Ed. Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F.), Academic Press, str. 1637- 1643.

Sabadoš, D., (1998) Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

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.

Shao, Y., Xuan, G., Hu, Z., & Wang, Y. (2019) Detection of adulterants and authenticity discrimination for coarse grain flours using NIR hyperspectral imaging. *J. Food Process Eng.* **42**, e13265.

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.

Talhaoui, N., Trabelsi, N., Taamalli, A., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Arraez-Roman, D. (2018) *Olea europaea* as Potential Source of Bioactive Compounds for Diseases Prevention. U: *Studies in Natural Products Chemistry*, 1. Izd., **57** (Rahman, A., ured.), Elsevier Applied Science, Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 389-411.

Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., Decker, E.A., (2001) Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J Food Sci.* **8**, 1325–1329.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Usta, B., Yilmaz-Ersan, L. (2013) Antioxidant enzymes of milk and their biological effects. *J Agric Faculty of Uludag University.* **2**, 123–130.

Vázquez, C.V., Rojas, M.G., Ramírez, C.A., Chávez-Servín, J.L., García-Gasca, T., Ferriz-Martínez, R.A., García, O.P., Rosado, J.L., López-Sabater, C.M., Castellote, A.I., Montemayor, H.M., 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.* **176**, 480-486.

Yam, K.L., Papadakis, S.E. (2004) A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J Food Eng.* **61**, 137-142

Zlatar, F. (2018) *Fizikalno kemijska usporedba sastava kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka*, Zagreb.

Zorić, L. (2019) Utvrđivanje patvorenja konzumnog mlijeka dodatkom mlijeka u prahu modificiranom spektrofotometrijskom metodom, Zagreb.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Milić', is written above a solid horizontal line.

Jakov David Milić