

Utjecaj različitih režima toplinske obrade na kvalitetu kobiljeg mlijeka

Blažević, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:800475>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Ivana Blažević

**UTJECAJ RAZLIČITIH REŽIMA
TOPLINSKE OBRADJE NA
KVALITETU KOBILJEG MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Irene Barukčić Jurina te uz pomoć doc.dr.sc. Tamare Jurina i doc.dr.sc. Andreje Leboš Pavunc.

Projekt

Rad je izrađen u sklopu projekta SIRENA Modifikacija procesa zrenja sira i razvoj proizvoda na bazi sirutke, br. Ugovora KK .01. 1. 1. 04. 0096, sufinanciranom iz sredstava Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj, pod voditeljstvom izv.prof.dr.sc. Marijane Blažić, Veleučilište u Karlovcu.



ZAHVALA

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ireni Barukčić Jurina, svojoj mentorici, na strpljenju, razumjevanju i pruženim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Iskreno hvala i OPG Zoran Rebić na suradnji i donaciji kobiljeg mlijeka.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama na nezaboravnim studentskim danima.

Na kraju se želim zahvaliti svojoj obitelji, posebno sestri Mariji i mami Vesni. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i podršci.

Sve što jesam, dugujem tebi. Mama, hvala ti!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ RAZLIČITIH REŽIMA TOPLINSKE OBRADJE NA KVALITETU KOBILJEG MLIJEKA

Ivana Blažević, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058218752

Sažetak:

Kobilje mlijeko je oduvijek bilo cijenjena namirnica zbog brojnih terapijskih svojstava. Kako bi se očuvao jedinstven nutritivni sastav, kobilje mlijeko najčešće se konzumira sirovo ili se smrzava. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaje različitih toplinskih tretmana na kvalitetu kobiljeg mlijeka. Pri tom je praćena koncentracija hidrosimetilfurfurala (HMF) nastalog uslijed toplinske obrade, antioksidacijska aktivnost (AA) pomoću DPPH i FRAP metoda te udjel ukupnih fenola Folin Ciocalteu metodom. SDS-PAGE elektroforezom je praćena denaturacija proteina, dok je blisko-infracrvena spektrometrija (NIR) korištena za kvalitativnu analizu struktirnih promjena u uzorcima mlijeka. Dobiveni rezultati ukazuju kako povišenje temperature i/ili duže trajanje toplinske obrade uzrokuje povećanje koncentracije HMF-a, ukupnih fenola i AA mjerene FRAP metodom, dok je AA mjerena DPPH metodom padala. Nadalje, povećanjem intenziteta toplinskog režima smanjivale su se vrijednosti ukupnih otopljenih tvari i električne vodljivosti. SDS-PAGE elektroforeza je ukazala na denaturaciju nekih proteina. Analiza glavnih komponenata dobivenih NIR spektara pokazala je sličnosti među određenim uzorcima u odnosu na primijenjen toplinski režim.

Ključne riječi: *kobilje mlijeko, hidrosimetilfurfural, antioksidacijska aktivnost, fenolni spojevi, SDS-PAGE elektroforeza*

Rad sadrži: 59 stranica, 11 slika, 12 tablica, 71 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: izv. prof. dr. sc. Irena Barukčić Jurina

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović
2. izv. prof. dr. sc. Irena Barukčić Jurina
3. doc. dr. sc. Tamara Jurina
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković

Datum obrane: 27. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

INFLUENCE OF DIFFERENT HEAT TREATMENTS REGIMES ON MARE'S MILK QUALITY

Ivana Blažević, univ. bacc. ing. techn.
0058218752

Abstract:

Mare milk has always been a highly appreciated due to its therapeutic characteristics. In order to maintain a unique nutritive profile, mare milk is usually consumed raw or it is frozen. The aim of this study was to examine the effects of different heat treatments on mare milk quality. Thereby following parameters were determined: hydroxymethylfurfural (HMF) concentration, antioxidant activity (AA) by the DPPH and FRAP method, and the total phenol content by the Foline Ciocalteu method. SDS-PAGE electrophoresis was used to monitor protein denaturation while Near Infrared Spectroscopy (NIR) for qualitative analysis of structural changes in milk samples. According to the obtained results, with time and/or temperature increase the concentrations of HMF, AA (FRAP) and total phenols content increased too, while AA measured by the DPPH method, total dissolved solids and electrical conductivity decreased. SDS-PAGE electrophoresis indicated denaturation of some proteins. Principal Component Analysis of NIR spectra revealed similarities between the tested samples in relation to the applied thermal regime.

Keywords: mare milk, hydroxymethylfurfural, antioxidant activity, phenolic compounds, SDS-PAGE

Thesis contains: 59 pages, 11 figures, 12 tables, 71 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate professor

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

Reviewers:

1. Katarina Lisak Jakopović, PhD, Assistant professor
2. Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate professor
3. Tamara Jurina, PhD, Assistant professor
4. Ksenija Marković, PhD, Full professor

Thesis defended: September 27th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KOBILJE MLIJEKO	3
2.1.1. Sastav i svojstva kobiljeg mlijeka	3
2.1.2. Zdravstvena vrijednost kobiljeg mlijeka	6
2.1.3. Antioksidacijska aktivnost kobiljeg mlijeka	7
2.2. PROMJENE U KVALITETI MLIJEKA USLIJED TOPLINSKE OBRADJE	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.2. METODE RADA	14
3.2.1. Temperaturni režimi obrade mlijeka	14
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti mlijeka	14
3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti	15
3.2.4. Određivanje gustoće mlijeka laktodenzimetrom.....	15
3.2.5. Određivanje udjela mliječne masti butirometrijskom metodom po Gerberu	16
3.2.6. Određivanje proteina u mlijeku metodom po Kjeldahlu	16
3.2.7. Određivanje udjela laktoze metodom po Loof-Schoorlu	18
3.2.8. Određivanje indeksa boje	20
3.2.9. Određivanje udjela ukupnog i slobodnog hidrosimetilfurfurala	22
3.2.10. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te za određivanje udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu.....	24
3.2.10.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	24
3.2.10.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	26
3.2.10.3. Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin-Ciocalteu.....	28
3.2.11. Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza proteina	31
3.2.12. Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari mlijeka	33
3.2.13. Analiza uzoraka kobiljeg mlijeka blisko-infracrvenom spektroskopijom (engl. <i>Near Infrared Spectroscopy, NIRs</i>) i Analiza glavnih komponenata (engl. <i>Principal Component Analysis, PCA</i>)	34
3.2.14. Obada podataka	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	35

4.1.	ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA MLIJEKA	35
4.2.	ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA	37
4.3.	REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNOG I SLOBODNOG HMF-a.....	39
4.4.	REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	41
4.5.	REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM.....	42
4.6.	REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH FENOLA FOLIN CIOCALTEU METODOM.....	43
4.7.	REZULTATI SDS – PAGE ELEKTROFOREZE	45
4.8.	REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI I UKUPNIH OTOPLJENIH TVARI MLIJEKA	47
4.9.	BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KOBILJEG MLIJEKA I REZULTATI ANALIZE GLAVNIH KOMPONENATA	48
5.	ZAKLJUČCI	50
6.	LITERATURA	52

1. UVOD

Povijesno, kobilje mlijeko nema tradiciju uporabe i proizvodnje na području Europe, dok je u Aziji još od davnina u uporabi. Kobilje mlijeko kao hrana spominje se već u 8. stoljeću prije Krista u Homerovoj Ilijadi (Hanser, 1988). Prije 2500 godina zabilježeni su tragovi mužnje i pripreme fermentiranih mliječnih napitaka kod azijskih naroda razvijene konjogojske tradicije, Skita i Mongola (Ivanković, 2004). U putopisima iz 13. stoljeća Marko Polo spominje uporabu kobiljeg mlijeka kod Mongola i plemena u Južnoj Rusiji. U novijoj povijesti, Rusi su sredinom 19. stoljeća započeli s korištenjem kobiljeg mlijeka u terapijske svrhe. Do 1962. godine na području SSSR-a bilo je prisutno oko 50 lječilišta tzv. "Kumisnih bolnica" koja su provodila terapiju sa svježim i fermentiranim kobiljim mlijekom (Hanser, 1988). Stoga ne iznenađuje činjenica, da u današnjoj Mongoliji i Rusiji postoje farme isključivo za proizvodnju kobiljeg mlijeka (Ivanković, 2004). Osim u Mongoliji i Rusiji, mliječna stada kobila prisutna su na području: Kazahstana, Kirgistana, Tadžikistana, Uzbekistana i sjeverne Kine. S druge strane, u Europi se konjogojstvo nije razvijalo u tom smjeru. Mliječna stada kobila zastupljena su u manjoj mjeri u Istočnoj Europi (Bjelorusija, Ukrajina), Središnjoj Europi (posebno u Mađarskoj, Austriji i Njemačkoj), te u Zapadnoj Europi (Doreau i Martin-Rosset, 2002).

Međutim, u posljednja dva desetljeća i u Europi je poraslo zanimanje za mlijekom kopitara kao funkcionalnom hranom visoke prehrabene vrijednosti, bolje probavljivosti te većeg udjela pojedinih vitamina i mineralnih tvari u odnosu na kravlje mlijeko (Pieszka i sur., 2016). Procjenjuje se da oko 30 milijuna ljudi diljem svijeta konzumira kobilje mlijeko (Potočnik i Gantner, 2011), te taj broj iz godine u godinu sve više raste. Godišnja proizvodnja kobiljeg mlijeka u Mongoliji iznosi oko 9 milijuna litara, dok se u Europi proizvede između 1,0 i 1,13 milijuna litara godišnje (Uniacke-Lowe, 2011). Najveće tržište u Europi za kobilje mlijeko i njegove proizvode su Rusija i Francuska.

Blagotvorno djelovanje kobiljeg mlijeka proizlazi upravo iz njegova kemijskog sastava. Kobilje se mlijeko prije konzumiranja ne zagrijava iznad tjelesne temperature, kako bi se njegovi sastojci očuvali i izravno metabolizirali iz probavnog trakta u krv i tako djelovali na imunološki sustav (Brezovečki i sur., 2016). Kobilje mlijeko ne podliježe industrijskoj obradi (pasterizaciji), nego se mora koristiti u izvornom obliku (Avreliu i sur., 2009). Osim dokazanih terapijskih svojstava na zdravlje ljudi, kobilje se mlijeko odlikuje dobrom mikrobiološkom kvalitetom i niskim brojem somatskih stanica. Oprečno mišljenje Avreliu i sur. (2009) navode Czyzak-Runowska i sur. (2018)

koji smatraju da bez obzira na visoku mikrobiološku kvalitetu, kobilje mlijeko mora biti podvrgnuto toplinskom tretmanu prije konzumiranja.

Budući da se u proizvodnji kobilje mlijeko najčešće termički ne obrađuje, upravo zbog očuvanja njegovih blagotvornih svojstava, do sad nema objavljenih istraživanja o utjecaju toplinskih tretmana na parametre kvalitete kobiljeg mlijeka.

Stoga je cilj ovog rada bio istražiti kako uvrježeni toplinski tretmani koji imaju primjenu u proizvodnji drugih vrsta mlijeka, utječu na kvalitetu kobiljeg mlijeka. Nastojao se ispitati utjecaj različitih toplinskih tretmana na nastanak spojeva u kobiljem mlijeku uslijed toplinske obrade (slobodni i ukupni hidroksimetilfurfural), odrediti utjecaj toplinske obrade na antioksidacijski potencijal pomoću DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda te odrediti utjecaj toplinske obrade na sadržaj ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom. Nadalje, SDS-PAGE elektroforezom utvrđivan je stupanj denaturacije proteina pri različitim toplinskim tretmanima. Također, praćen je utjecaj toplinskih tretmana na promjene u indeksu boje, promjene u vodljivosti te u koncentraciji ukupnih otopljenih tvari u uzorcima mlijeka. Primjena analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) dobivenih NIR spektara korištena je za utvrđivanje sličnosti među testiranim uzorcima u odnosu na primijenjen toplinski režim. Na temelju dobivenih rezultata procijenit će se mogu li navedeni parametri poslužiti kao indikatori intenziteta toplinske obrade. Također, iz dobivenih rezultata utvrdit će se koji uvjeti toplinske obrade najviše utječu na antioksidacijsku aktivnost mlijeka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOBILJE MLIJEKO

2.1.1. Sastav i svojstva kobiljeg mlijeka

Kobilje mlijeko ubraja se u mlijeko kopitara, koje je kemijskim sastavom slično humanom mlijeku te je pogodno za prehranu male djece (Malacarne i sur., 2002). Karakterizira ga slatki okus, bijela boja, rijetka konzistencija, visok udio vode i niska energetska vrijednost. Koncentracije pojedinih sastojaka suhe tvari ovise o stupnju laktacije, dobi kobile, vrsti hranidbe. Period laktacije u kobila obično traje između pet i osam mjeseci, a može se dobiti 2000-3000 kg mlijeka (Salamon i sur., 2009). Proizvodnja kobiljeg mlijeka je sezonska i obično se proteže kroz proljeće i ljeto, ali period laktacije je uvjetovan razdobljem u kojem se ždrjebad drži uz majku (Samaržija, 2016). Tijekom prvih 25 dana laktacije, uvelike se smanjuje udjel proteina i mineralnih tvari, no nakon toga sastav kobiljeg mlijeka se stabilizira. Iz tablice 1 je vidljivo da kobilje mlijeko sadrži između 9,7-12,2 % suhe tvari, odnosno prosječno 2,14 % proteina, 1,21 % masti, 6,37 % laktoze te 4,2 % mineralnih tvari. Prema udjelu proteina i laktoze, kobilje i humano mlijeko je slično. Udjel masti u kobiljem mlijeku znatno je niži u odnosu na humano i kravlje mlijeko (Pieszka i sur., 2016).

Gustoća kobiljeg mlijeka približno je jednaka gustoći kravljeg mlijeka te iznosi između 1028 do 1035 kg m⁻³, dok je gustoća kobiljeg kolostruma veća od kobiljeg mlijeka i doseže vrijednost do 1080 kg m⁻³ (Uniacke-Lowe, 2011). Kobilje mlijeko ima točku leđišta -0,554 °C (Pagliarini i sur., 1993). Točka leđišta mlijeka izravno je povezana s koncentracijom tvari topljivih u vodi. Masne globule i proteini imaju zanemariv utjecaj na točku leđišta, dok glavni učinak proizlazi od laktoze i mineralnih tvari. Božanić i sur. (2016) navode da se prosječna pH vrijednost kobiljeg mlijeka kreće u rasponu od 6,9 do 7,2. Mlijeko hrvatskog hladnokrvnjaka ima pH 7,0 (Brezovečki i Čagalj, 2013). Različite pH vrijednosti kobiljeg mlijeka vjerojatno se odnose na razlike u koncentraciji proteina i soli u različitim pasmina konja (Samaržija, 2016; Brezovečki i sur., 2014; Kücükçetin i sur., 2003; Mariani i sur., 2001). Titracijska kiselost kobiljeg mlijeka je niža i kreće se u rasponu od 1,35 do 3,61 °SH (Mariani i sur., 2001).

Tablica 1. Usporedba kemijskog sastava kobiljeg, humanog i kravljeg mlijeka (Ivanković i sur., 2016; Pieszka i sur., 2016; Malacarne i sur., 2002)

Parametar	Kobilje mlijeko	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Suha tvar (%)	9,7-12,2	10,7-12,9	11,8-13,0
Proteini (%)	2,14 (1,5-2,8)	1,42 (0,9-1,7)	3,25 (3,1-3,8)
Proteini sirutke (%)	38,79	53,52	17,54
Kazein (%)	50,00	26,06	77,23
NPN (%)	11,00	20,42	5,23
Mast (%)	1,21 (0,5-2,0)	3,64 (3,5-4,0)	4,10 (3,2-5,5)
Triacilgliceroli (%)	81,1	98	97
Fosfolipidi (%)	5,0	1,3	1,5
Slobodne masne kiseline (%)	9,4	tragovi	tragovi
Laktoza (%)	6,37 (5,8-7,0)	6,7 (6,3-7,0)	4,88 (4,4-4,9)
Mineralne tvari (%)	4,2 (3-5)	2,2 (2-3)	7,6 (7-8)
Energentska vrijednost (kcal na 100 mL)	192 (156-220)	271 (260-280)	270 (260-285)

Proteini sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu od građe do reprodukcije. Kobilje mlijeko sadrži otprilike 1,5 do 2,8 % proteina. Od ukupnih proteina, sadrži 50 % kazeina i 39 % proteina sirutke (Brezovečki i sur., 2016). S obzirom na visok udjel proteina sirutke, zajedno s humanim mlijekom, kobilje mlijeko se ubraja u tzv. albuminska mlijeka. Kobilje mlijeko predstavlja bogat izvor esencijalnih aminokiselina zbog visokog udjela proteina mliječnog seruma te se smatra pogodnim za prehranu ljudi (Malacarne i sur., 2002). Prosječan udjel proteina sirutke kobiljeg mlijeka (oko 39 %) veći je u usporedbi s kravljim (oko 18 %), ali manji u usporedbi s humanim mlijekom (oko 54 %). Budući da kobilje mlijeko sadrži veću koncentraciju sirovih proteina (21,4 g kg⁻¹), koncentracija proteina sirutke veća je u kobiljem (8,3 g kg⁻¹) u usporedbi s humanim mlijekom (7,6 g kg⁻¹) (Brezovečki i sur., 2014).

Osnovne frakcije proteina sirutke u kobiljem mlijeku su α -laktalbumin (α -La), β -laktoglobulin (β -Lg), albumini krvnog seruma, imunoglobulini (Ig), laktoferin (LF) i lizozim (Lyz) (Bell i sur., 1981). Kobilje mlijeko sadržava više laktoferina, lizozima, imunoglobulina i β -laktoglobulina u odnosu na kravlje mlijeko, ali manje količine α -laktalbumina u odnosu na humano i kravlje (Malacarne i sur., 2002). U usporedbi s kravljim, β -laktoglobulin kobiljeg mlijeka je hidrofilniji, ne sadrži slobodne sulfhidrilne skupine i ne tvori dimere (Uniacke-Lowe i sur., 2010). Inglingstaad i sur. (2012) navode kako se β -laktoglobulin prisutan u kobiljem mlijeku lakše razgrađuje djelovanjem probavnih enzima u odnosu na β -laktoglobuline iz drugih vrsta mlijeka, što predstavlja razlog bolje probavljivosti kobiljeg mlijeka. Proteini sirutke su jako termolabilni, no u usporedbi sa onim u kravljem mlijeku dokazano su α -laktalbumin i β -laktoglobulin iz kobiljeg mlijeka otporniji na visoke temperature. Ta otpornost povezana je s njihovim monomernim oblikom te odsutnošću slobodnih sulfhidrilnih skupina (Claeys i sur., 2014). Kobilje mlijeko sadrži veće količine imunoglobulina, u usporedbi s kravljim (Pieszka i sur., 2014). Glavna antimikrobna komponenta kobiljeg mlijeka je lizozim, koji tvori netopljive komplekse s virusima i inaktivira virusne toksine (Potočnik i sur., 2011). Kazein iz kobiljeg mlijeka, građen je u obliku micela, čija je veličina nešto veća u usporedbi s veličinama kazeinskih micela drugih vrsta mlijeka (Malacarne i sur., 2002). Približno jednake količine α_s -kazeina (oko 40 %) i β -kazeina (oko 50 %) prisutne su u kazeinu kobiljeg mlijeka, no dokazana je i prisutnost κ -kazeina (Potočnik i sur., 2011). U usporedbi s kravljim, kazein kobiljeg mlijeka ima nešto nižu izoelektričnu točku te je kobilje mlijeko manje podložno koagulaciji zbog djelovanje kiselina. Manja koncentracija kazeina te veća toplinska stabilnost β -laktoglobulina, čini kobilje mlijeko otpornijim na toplinsku koagulaciju (Uniacke-Lowe i sur., 2010).

Mliječna mast je u kobiljem mlijeku dispergirana u obliku globula prosječne veličine 2-3 μ m. Kobilje mlijeko sadrži nizak udio mliječne masti, a prosječna vrijednost iznosi 1,2 %. Uzimajući u obzir ukupan udjel masti, u kobiljem mlijeku prisutno je najviše triacilglicerola (80-85 %), zatim slijede slobodne masne kiseline (oko 10 %) te fosfolipidi i steroli (5-10 %). Problem većeg udjela slobodnih masnih kiselina je sklonost užglosti (Božanić i sur., 2018). Mliječna mast kobiljeg mlijeka sadrži znatno manje zasićenih masnih kiselina u odnosu na mlijeka preživača, iako su količinski zastupljene u odnosu na nezasićene masne kiseline (Ivanković i sur., 2016). U kobiljem mlijeku, u većim količinama zastupljene su srednjelančane masne kiseline, poput kaprilne (C_{8:0}),

kaprinske (C_{10:0}) i laurinske (C_{12:0}). U manjim količinama prisutne su kratkolančane i dugolančane zasićene masne kiseline (Uniacke-Lowe i sur., 2010).

Laktoza je najzastupljeniji ugljikohidrat u kobiljem mlijeku. Prosječan udjel laktoze u kobiljem mlijeku iznosi oko 6,4 % i sličan je udjelu laktoze prisutne u humanom mlijeku (Uniacke-Lowe i sur., 2010). Udjel laktoze je konstantan i nije podložan promjenama zbog utjecaja čimbenika kao što su pasmina, stadij laktacije i godišnje doba. Zbog visoke koncentracije laktoze, kobilje mlijeko je lako probavljivo (Ivanković i sur., 2016).

Mineralne tvari u kobiljem mlijeku prisutne su u znatno manjem udjelu, u usporedbi s kravljim mlijekom. Prosječna vrijednost mineralnih tvari u kobiljem mlijeku iznosi oko 0,37 % dok je najveći udjel zabilježen u kolostrumu mlijeka s vrijednošću oko 0,51 % (Ivanković i sur., 2016). Količinski su najzastupljeniji: kalij, natrij i magneziji, i to u obliku fosfata, klorida, karbonata i citrata. S obzirom na humano, kobilje mlijeko sadrži veće količine makroelemenata (osim kalija), ali sadrži manji udjel s obzirom na kravlje mlijeko. U usporedbi s kravljim, kobilje mlijeko sadrži manje kalcija i fosfora. Omjer kalcija i fosfora u kobiljem mlijeku je 1,5-1,6 :1 dok je u kravljem mlijeka taj omjer 1,2:1. Kako se omjer kalcija i fosfora od 2:1 smatra optimalnim za ljudsku prehranu, kobilje je mlijeko povoljnije u resorpciji kalcija, bez obzira na višu koncentraciju ovih mineralnih tvari u kravljem mlijeku (Ivanković i sur., 2016; Uniacke-Lowe, 2011).

Udjel vitamina je vrlo promjenjiv u svim vrstama mlijeka i ovisi o nizu čimbenika, poput zdravstvenog stanja jedinke, načina hranidbe, stadija laktacije itd. Kobilje mlijeko sadrži slične količine vitamina topljivih u mastima (A, D3, E) kao i kravlje mlijeko (Salamon i sur., 2009). S obzirom da kobilje mlijeko sadrži samo trećinu mliječne masti koja je prisutna u kravljem mlijeku, može se reći da je koncentracija vitamina topljivih u mastima veća u kobiljem mlijeku (Csapo-Kiss i sur., 1995). Međutim, koncentracija vitamina C može biti i do tri puta viša u kobiljem mlijeku u usporedbi s mlijekom preživača (Ivanković i sur., 2016; Claeys i sur., 2014).

2.1.2. Zdravstvena vrijednost kobiljeg mlijeka

Mlijeko je prirodan sekret mliječne žlijezde, bijele do žućkasto bijele boje, karakterističnog mirisa i okusa. Osnovna funkcija kobiljeg mlijeka, kao i funkcija drugih vrsta mlijeka, je osigurati mladunčetu potrebne hranjive tvari u prvim mjesecima života. Još od davnina, kobilje mlijeko pronašlo je svoju primjenu u azijskim zemljama. Međutim, u posljednja dva desetljeća i u Europi

raste zanimanje za kobiljim mlijekom. Kobilje mlijeko ima važna prehrambena i terapijska svojstva a zbog svoje sličnosti s humanim, smatra se pogodim za prehranu dojenčadi. Lako je probavljivo, zbog povoljnog omjera kazeina i proteina sirutke. Jedan od bitnih čimbenika u pojavi alergijskih reakcija na mlijeko, upravo je omjer kazeina i proteina sirutke (Salimei i Fantuz, 2013). U kobiljem mlijeku prisutno je manje α_{s1} –kazeina koji se smatra odgovornim za alergijske reakcije u djece mlađe od tri godine (Pieszka i sur., 2016; Malacarne i sur., 2002). U usporedbi s kravljim, kobilje mlijeko predstavlja bolji izvor esencijalnih aminokiselina (Brezovečki i sur., 2016). Blagotvorna svojstva kobiljeg mlijeka proizlaze iz njegovog kemijskog sastava. Kobilje mlijeko sadrži nizak udjel mliječne masti kao i nizak udjel zasićenih masnih kiselina i kolesterola. Zbog gore navedenih svojstava, te zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina, prije svega linolne i linoleinske kiseline, kobilje se mlijeko smatra pogodnim za očuvanje zdravlja srca i krvožilnog sustava (Pieszka i sur. 2016; Malacarne i sur., 2002). Kobilje mlijeko sadrži visok udjel laktoze te je zbog slatkog okusa više prihvatljivo kod djece, u usporedbi sa mliječnim formulama baziranim na proteinskim i sojinim hidrolizatima (Božanić i sur., 2016). Zbog visokog udjela laktoze, kobilje mlijeko utječe na održavanje uravnotežene i zdrave crijevne mikroflore, a visoke koncentracije laktoferina i lizozima povoljno utječu na zaštitu organizma od bakterija i virusa (Božanić i sur., 2016). Brezovečki i sur. (2014) navode kako redovita konzumacija kobiljeg mlijeka ublažava probleme uzrokovane alergijama, kožnim bolestima, bolestima probavnog i dišnog sustava i dr. Također, zabilježen je povoljan učinak na zdravlje ljudi na samom početku pojave bolesti, kao što su anemija, upala bubrega, dijareja i razni drugi gastrointestinalni poremećaji. Pozitivni učinci kobiljeg mlijeka, javljaju se kad se ono konzumira u svježem stanju bez prethodne obrade.

2.1.3. Antioksidacijska aktivnost kobiljeg mlijeka

Antioksidansi su kemijske tvari koje ublažavaju učinke oksidacijskog stresa tako što usporavaju ili inhibiraju oksidaciju drugih molekula, sprječavajući nastanak lančanih reakcija slobodnih radikala. Oksidacijski stres posljedica je prekomjernog stvaranja i gomilanjem slobodnih radikala uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko – redukcijских procesa u organizmu.

Usta i Yilmaz (2013) navode kako mlijeko sadrži različite spojeve koji imaju dokazana antioksidacijska svojstva među kojima su kazein, proteini sirutke, β -karoten, vitamini A, E i C, α -tokoferol, cink, selen, i laktoferin. Kemijski sastav različitih vrsta mlijeka varira, pa tako i različite vrste mlijeka imaju i različitu antioksidacijsku aktivnost. S obzirom na različit udjel i moguć

različit sastav gore navedenih spojeva, prije pripisivanja antioksidacijskih svojstava kobiljem mlijeku, potrebno je odrediti što je nositelj tog antioksidacijskog svojstava. Budući da frakcije α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ prisutne u kobiljem mlijeku sadrže fosfate, kazein kao glavni protein mlijeka djeluje kao antioksidans te inhibira autooksidaciju lipida kataliziranu lipooksigenazom. Visoko antioksidacijsko djelovanje proteina sirutke, posebno β -laktoglobulina u kravljem mlijeku povezano je sa visokim sadržajem aminokiselina koje sadrže sumpor, posebno cisteina, koji je neophodan za sintezu glutaciona (Stobiecka i sur., 2022). Međutim, β -laktoglobulin iz kobiljeg mlijeka ne sadrži sulfhidrilne skupine te se među slobodnim aminokiselinama u kobiljem mlijeku nalazi vrlo malo cisteina. S obzirom na navedeno može se pretpostaviti da proteini sirutke iz kobiljeg mlijeka nemaju utjecaj na njegovu antioksidacijsku aktivnost. Vitamin C je glavni predstavnik antioksidansa iz mlijeka koji je topljiv u vodi. Kobilje mlijeko može sadržavati čak tri puta veću koncentraciju vitamina C u usporedbi sa mlijekom preživača (Božanić i sur., 2018) Vitamin C ubraja se u najjače i najmanje toksične prirodne antioksidanse, može neutralizirati superoksidne (O_2^-) i alkoksilne ($RO\cdot$) radikale, singletni kisik te željezove i dušikove okside (Ilijanić, 2019). Također, može značajno inhibirati razgradnju vitamina B2 u mlijeku koje je izloženo svjetlu. Međutim, treba uzeti u obzir da je vitamin C termolabilan, te da prilikom potencijalnih toplinskih tretmana može doći do njegove razgradnje. Glavni predstavnici antioksidansa iz mlijeka koji su topljivi u mastima su vitamini A i E (tokoferoli, tokotrienoli), čiji je glavni zadatak zaštita polinezasićenih masnih kiselina. Također, kobilje mlijeko karakterizira visok sadržaj lizozima i laktoferina koji imaju inhibirajući efekt na razvoj patogenih bakterija (Pieszka i sur., 2016). Osim navedenog, laktoferin može imati vrlo važnu ulogu antioksidansa, sve u svrhu vezanja prooksidacijskih iona željeza, a time smanjenja pretvorbe vodikovog peroksida (H_2O_2) u hidroksilni radikal ($\cdot OH$) putem Fentonove reakcije (Ilijanić, 2019). Udjel laktoferina u kobiljem mlijeku se kreće od 0,2 do 2 g kg^{-1} mlijeka što je neznatno manje od udjela u humanom mlijeku te 10 puta veće od udjela u kravljem mlijeku (Pieszka i sur., 2016). Nadalje, konjugirana linoleinska kiselina prisutna u kobiljem mlijeku pokazuje antikancerogeno i antioksidacijsko djelovanje. No zbog manjeg udjela navedeno djelovanje nije toliko izraženo.

2.2. PROMJENE U KVALITETI MLIJEKA USLIJED TOPLINSKE OBRADJE

Toplinska obrada mlijeka uzrokuje razne reverzibilne i ireverzibilne promjene čiji nastanak ovisi o intenzitetu primijenjenog toplinskog tretmana. Navedene promjene uključuju: neznatne promjene pH-vrijednosti, smanjenje topljivosti mineralnih tvari (najčešće Ca-fosfata), promjenu udjela laktoze (nastanak laktuloze ili nastajanje hidrosimetilfurfurala u početnim fazama Maillardovih reakcija koji može uzrokovati trpki okus mlijeka), denaturaciju proteina sirutke ili interakciju s κ -kazeinom (uglavnom β -laktoglobulin), pojavu okusa po kuhanom, Maillardove reakcije posmeđivanja mlijeka (nastanak melanoidina, nakon serije reakcija uzrokovanih interakcijom laktoze s lizinom proteina, osobito lizinom kazeina), modifikaciju kazeina, promjenu strukture micela (hidratacije, elektronskog naboja, asocijacija ili disocijacija), djelomični gubitak hranjive vrijednosti (denaturacija proteina sirutke, smanjenje topljivosti mineralnih tvari, gubitak dostupnog lizina te nekih vitamina, osobito onih topljivih u vodi) te inaktivaciju većine enzima (Tratnik i Božanić, 2012).

Intenzitet fizikalno-kemijskih, enzimatskih, mikrobioloških i senzorskih promjena ovisi o kombinaciji temperature i trajanja zagrijavanja, sastavu i kvaliteti sirovog mlijeka, pH-vrijednosti, udjelu kisika te o mikrobiološkoj kvaliteti sirovog mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Povećanje temperature uzrokuje promjene na laktozi, pri čemu osim nastajanja laktuloze dolazi i do ireverzibilnih reakcija neenzimskog posmeđivanja, odnosno Maillardovih reakcija. Kao produkt Maillardovih reakcija nastaju „melanoidni pigmenti“ odgovorni za pojavu smeđe boje mlijeka te hidrosimetilfufural (HMF) kojem se pripisuje trpki okus mlijeka. HMF predstavlja jedan od najčešćih parametara za određivanje intenziteta toplinske obrade mlijeka, pri čemu je visoka koncentracija HMF-a povezana sa negativnim učincima na zdravlje ljudi (Francisquini i sur., 2018).

SDS-PAGE elektroforeza često se koristi za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka. Osim za dokazivanje patvorenje, SDS PAGE elektroforeza predstavlja pouzdanu metodu za detekciju i praćenje promjena koje nastaju na proteinima mlijeka uslijed primjene povišene temperature. Kobilje mlijeko sadrži visok udjel proteina sirutke, čije su osnovne frakcije β -laktoglobulin, α -laktalbumin, proteini krvnog seruma (BSA) i imunoglobulin (Ig). Iako su proteini sirutke kobiljeg mlijeka termolabilni, u usporedbi sa proteinima sirutke kravljeg mlijeka, pokazuju

značaju toplinsku stabilnost. Za razliku od proteina sirutke, kazein spada u skupinu toplinski stabilnih proteina jer ne koagulira kada je podvrgnut visokoj toplinskoj obradi. Kazein se sastoji od četiri frakcije: α_{s1} - kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein i κ -kazein. Tijekom toplinske obrade proteini mlijeka mogu stvarati komplekse, pa tako primjerice dolazi do stvaranja kompleksa između α -laktalbumina i β -laktoglobulina, α -laktalbumina i κ kazeina te β -laktoglobulina i κ -kazeina (Corredig i Dalgleish, 1996).

Blisko-infracrvena spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIRs*) je jednostavna i brza metoda koja pronalazi primjenu za određivanje kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika složene emulzije kao što je uzorak mlijeka. Također, NIR spektroskopija predstavlja metodu za nedestruktivno praćenje uzoraka mlijeka u bilo kojem djelu procesa proizvodnje (Stojanović, 2011). Aernouts i sur. (2011) navode kako se odvajanje faza, stabilnost i kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda, mogu pratiti pomoću NIR spektroskopije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Pri izradi diplomskog rada, kao glavni materijal korišteno je sirovo kobilje mlijeko donirano od strane OPG Zoran Rebić (Veliko Trojstvo, Hrvatska). Svježe pomuzeno mlijeko dopremljeno je dan nakon mužnje, pri čemu je održavan hladni lanac, a odmah po primitku uzorci mlijeka tretirani su na sedam različitih temperaturnih režima kako je opisano u tablici 2.

Kemikalije korištene za određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henkelu su:

- 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).

Kemikalije korištene za određivanje udjela mliječne masti Butirometrijskom metodom po Gerberu su:

- H_2SO_4 (Gram-Mol, Hrvatska)
- Izoamilnialkohol (Lach-Ner, Hrvatska).

Kemikalije korištene za određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu su:

- H_2SO_4 (Gram-Mol, Hrvatska)
- 40 %-tna NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)
- 4 %- H_3BO_3 (T.T.T, Hrvatska)
- 0,1 M titrival HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- Metil crveno (Lach-Ner, Hrvatska)
- Bromkrezol zeleno (Alfa Aesar, SAD)
- Kjeldahlove tablete (Roth, Njemačka).

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

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Gram-Mol, Hrvatska)
- Limunska kiselina (T.T.T, Hrvatska)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (Gram-Mol, Hrvatska)
- Navedene kemikalije iskorištene su za pripremu Luffove otopine koja se pripremila na način da je 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ otopljeno se u 100 mL destilirane vode, 50 g limunske

kiseline otopljeno je u 50 mL destilirane vode, a 388 g kristalnog $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ u 400 mL tople destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 1 L, redom su dodane otopine natrijevog karbonata, limunske kiseline te bakrenog (II) sulfata te je ostatak do oznake nadopunjen destiliranom vodom.

- 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Gram-Mol, Hrvatska)
- 20 % otopina kalijevog jodida (Lach-Ner, Hrvatska)
- 25 % otopina sumporne kiseline (Gram-Mol, Hrvatska)
- 2 % otopina škroba (Gram-Mol, Hrvatska).

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a su:

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

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom su:

- $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil, Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom etanolu (KEFO, Hrvatska)
- 95 % etanol: u odmjernu tikvicu od 100 mL optipetirano je 1,041 mL 96 % etanola (Kefo, Hrvatska) i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom su:

- 0,3 M acetatni pufer (A) (Gram-Mol, Hrvatska)
- 10 mM TPTZ – (2,4,6-tripiridil-s-triazin, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljen u 40 mM HCl (B) (KEFO, Hrvatska)
- 20 mM željezo (III)-klorid heksahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (C) (Lach-Ner, Hrvatska)
- Navedene kemikalije iskorištene su za pripremu FRAP reagensa koji se sastojao od 25 mL 0,3 M acetatnog pufera (A), 2,5 mL 10 mM TPTZ-a pripremljenog u 40 mM HCl (B) i

2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (C), pomiješanih u omjeru A:B:C=10:1:1 (v/v)

- Standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, SAD): Pripremljena je početna (stock) otopina Trolox-a koncentracije 2 mM. Odvagnuto je 0,0501 g Trolox-a u plastičnoj lađici i kvantitativno prenešeno s 2 mL 96 %-tnog etanola (KEFO, Hrvatska) u odmjernu tikvicu volumena 0,1 L te se ostatak nadopunio destiliranom vodom do oznake. Radi homogenizacije tikvica je stavljena ultrazvučnu kupelj na 5 min. Od „stock“ otopine su pripremljena odgovarajuća razrjeđenja koncentracije 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM . Sve otopine su pripremljene neposredno prije uporabe i zaštićene od utjecaja svjetlosti omatanjem tikvice aluminijskom folijom.

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih fenola metodom po Folin Ciocalteu su:

- Folin Ciocalteu reagens – razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10 (SigmaAldrich, Njemačka)
- 7,5 % (w/v) Natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Gram-Mol, Hrvatska)
- Standard galne kiseline (3,4,5-trihidroksibezojeva kiselina, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, SAD) Za izradu baždarnog pravca korišten je standard galne kiseline (GAL) početne koncentracije 125 mg L^{-1} od koje su pripremljena točno određena razrjeđenja kako bi se dobile koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 125 mg L^{-1} .

Kemikalije korištene za SDS-PAGE elektroforezu su:

- akrilamid (Sigma, SAD)
- amonij-persulfat (Kemika, Hrvatska)
- bromfenol plavo (Sigma, SAD)
- coomassie Brilliant Blue (Sigma, SAD)
- glicerol (Alkaloid, Makedonija)
- glicin (Gram-Mol, Hrvatska)
- izopropanol, (Kemika, Hrvatska)
- kloridna kiselina (Kemika, Hrvatska)
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, EDTA), (Kemika, Hrvatska)

- natrijev dodecilsulfat (SDS), (Sigma, SAD)
- octena kiselina (Carlo Erba, Italija)
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor molekulske mase 4,6-315 kDa (Lonza, SAD)
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen), (Sigma, SAD)
- Tris (hidroksimetil)-aminometan (Carlo Erba, Italija)
- β -merkaptotanol (Sigma, SAD).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Temperaturni režimi obrade mlijeka

Svježe sirovo kobilje mlijeko razdijeljeno je na volumen od 60 mL te je zagrijavano na sedam različitih temperaturnih režima koji se najčešće koriste kao konvencionalni načini toplinske obrade mlijeka (Bylund, 2003; Morales i sur., 1996) koji su prikazani u tablici 2. Nakon završetka zagrijavanja, mlijeko je brzo ohlađeno pod mlazom hladne vode ili u hladnoj kupelji (s ledom).

Tablica 2. Temperaturni režimi (Bylund, 2003; Morales i sur., 1996)

Temperatura	Vrijeme	Oznaka uzorka
63-65 °C	15 s	63 °C/15 s
63-65 °C	30 min	63 °C/30 min
72 °C	20 s	72 °C/20 s
85 °C	30 s	85 °C/30 s
90 – 95 °C	7 min	90 °C/7 min
116 °C	16 min	116 °C/16 min
120 °C	5 min	120 °C/5 min

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti mlijeka

Za određivanje pH vrijednosti mlijeka korišten je laboratorijski pH-metar (WTW-ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka). Prije prvog korištenja elektroda pH-metra je kalibrirana na način da je uronjena u otopinu standarda poznate pH vrijednosti. Elektroda je zatim uronjena u čašu s mlijekom čiji je sadržaj lagano promiješan. Nakon što se pH vrijednost ustalila na zaslону

uređaja, očitana je pH. Elektrodu je nakon obavljenih očitavanja potrebno isprati destiliranom vodom, pobrisati staničevinom te uroniti u otopinu KCl-a gdje se čuva do sljedećeg korištenja (Božanić i sur., 2010).

3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti

Titracijska kiselost određuje se titracijom mlijeka s otopinom NaOH određenog molariteta uz indikator fenolftalein. Metoda po Soxlet-Henklu u Republici Hrvatskoj predstavlja referentnu titracijsku metodu za određivanje stupnja kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda. Metoda se zasniva na tome da se uzorak mlijeka titrira s 0,1 % NaOH uz indikator 2 % fenolftalein do pojave crvenkaste boje koja je stabilna 1 minutu. Međutim, prije određivanja titracijske kiselosti uzorka mlijeka potrebno je pripremiti standardnu boju koja predstavlja nijansu do koje je mlijeko potrebno titrirati. Priprema se na način tako što se u jednu Erlenmayerovu tikvicu otpipetira 20 mL istog uzorka i doda 1 mL 5 % otopine kobaltovog sulfata ($\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Božanić i sur., 2010).

Titracijska kiselost izračunata je prema izrazu:

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

gdje $^{\circ}SH$ predstavlja stupnjeve po Soxlet-Henklu, a je broj mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 20 mL mlijeka, a f faktor otopine 0,1 mol L⁻¹ natrijeve lužine (NaOH) koji iznosi 1.

3.2.4. Određivanje gustoće mlijeka laktodenzimetrom

Areometar (laktodenzimetar) služi za određivanje gustoće mlijeka po načelu Arhimedova zakona prema kojem svako tijelo uronjeno u tekućinu prividno gubi od svoje težine onoliko koliko teži tijelom istisnuta tekućina. Laktodenzimetar ima dvije skale, od kojih jedna pokazuje temperaturu, a druga gustoću. Postupak određivanja gustoće mlijeka odvija se tako da se mlijeko nalije do vrha menzure koja je položena u poklopac od Petrijeve zdjelice. Zatim se laktodenzimetar uroni u menzuru tako da pliva u mlijeku, a nakon otprilike 2 minute očitaju se temperatura i laktodenzimetarski broj (Bajt i sur., 1998).

Skala laktodenzimetra baždarena je pri 15° C, pa ako se temperatura razlikuje od 15° C provodi se korekcija:

$$T > 15^{\circ} \text{C} \rightarrow ^{\circ}\text{L korigirani} = ^{\circ}\text{L očitani} + \{ (^{\circ}\text{C} - 15^{\circ} \text{C}) \cdot 2 \} \quad [2]$$

$$T < 15 \text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{ }^{\circ}\text{L korigirani} = \text{ }^{\circ}\text{L očitani} - \{ (\text{ }^{\circ}\text{C} - 15 \text{ }^{\circ}\text{C}) \cdot 2 \} \quad [3]$$

Pomoću laktodenzimetarskog broja se dobije bezdimenzionalan veličina poznata kao relativna volumenska težina mlijeka (RVT) na način da $^{\circ}\text{L}$ korigirani predstavlja drugu i treću decimalu broja 1.

Dalje se pomoću poznatog odnosa RVT i gustoće računa gustoća mlijeka pomoću slijedećeg izraza (Božanić i sur., 2010):

$$\text{Gustoća (g cm}^{-3}\text{)} = \text{RVT} - 0,02 \quad [4]$$

3.2.5. Određivanje udjela mliječne masti butirometrijskom metodom po Gerberu

Metoda po Gerberu je butirometrijska metoda koja se zasniva na otapanju proteina mlijeka (kazeina) i zaštitne opne globule mliječne masti sumpornom kiselinom. Izoamilni alkohol dodaje se radi lakšeg odvajanja masti jer uzrokuje snižavanje površinske napetosti mlijeka. Mast se odvoji centrifugiranjem i količina se očita na skali butirometra.

Postupak određivanja udjela mliječne masti u mlijeku odvija se tako da se u butirometar otpipetira trbušastim pipetama 10 mL sumporne kiseline, nakon toga 11 mL mlijeka, te na kraju 1 mL izoamilnog alkohola. Butirometar se začepi tzv. „Gerberovim čepom“ i dobro promućka kako bi se mlijeko u potpunosti otopilo. Zatim se butirometar stavi u centrifugu koja je prethodno zagrijana na $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$, uz brzinu od 1200 okretaja po minuti na 5 minuta. Nakon centrifugiranja rezultat se očita na skali butirometra (Sabadoš, 1998).

3.2.6. Određivanje proteina u mlijeku metodom po Kjeldahlu

Metoda određivanja proteina po Kjeldahlu bazira se na tretiranju uzorka mlijeka koncentriranom sumpornom kiselinom, kalijevim sulfatom i bakrovim (II) sulfatom kao katalizatorom, prilikom čega dolazi do prevođenja dušika, koji potječe iz organskih spojeva, u amonijev sulfat. U slijedećem koraku dolazi do oslobađanja amonijaka dodavanjem otopine natrijevog hidroksida. Zatim se amonijak destilira i apsorbira u otopinu borne kiseline koja se na kraju titrira kiselom otopinom (Božanić i sur., 2010).

Postupak:

Spaljivanje

Spaljivanje je provedeno na bloku za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska) smještenom u digestoru (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska) prema slijedećoj proceduri.

Odvagne se 1 g (s točnošću $\pm 0,0001$ g) homogeniziranog uzorka i prebaci u kivetu od 500 mL, pazeći pri tom da grlo kivete ostane čisto. Nakon toga dodaje se 12 mL koncentrirane sumporne kiseline te dvije Kjeldah tablete kao katalizator. Kiveta se u digestoru zagrijava lagano u bloku za spaljivanje. Kad se reakcija smiri, grije se jače. Spaljivanje je završeno kada zaostane bistra plavo-zelena tekućina bez krutih crnih komadića uzorka. Kad se sadržaj u kiveti ohladi, oprezno se razrijedi destiliranom vodom te se kiveta postavlja u Kjeltec i Destiling Unit sustav za destilaciju.

Destilacija

Postupak destilacije provodi se u Kjeltec i Destiling Unit sustavu koji automatski vrši postupak destilacije. Na postolje u destilacijskoj jedinici stavi se Erlenmeyerova tikvica u koju je prethodno otpipetirano 25 mL 4 %-tne borne kiseline te se podigne u gornji položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova kiveta se stavi na svoje mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Dozira se 70 mL 40 % NaOH u Kjeldahlovu kivetu. Destilacija traje 4 minute. Destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka. Destilat mora biti hladan kako ne bi došlo do gubitka amonijaka.

Titracija

Titracija se provodi direktno u prihvatnoj tikvici s 0,1 M HCl. Titracija je gotova kada boja otopine postane ružičasta (kakva je bila borna kiselina prije destilacije).

Potpuno isti postupak provede se za tzv. "slijepu probu" u kojoj se nalaze svi reagensi osim uzorka.

Izračun:

$$\% N = \frac{(V - V_s) \cdot c(\text{HCl}) \cdot 14,007 \cdot 100}{m(\text{uzorak})[\text{mg}]} \quad [5]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N * F \quad [6]$$

gdje je V utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju uzorka, V_s utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju slijepe probe, a F faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode).

3.2.7. Određivanje udjela laktoze metodom po Loof-Schoorlu

Laktoza ili mliječni šećer spada u reducirajuće ugljikohidrate, zbog svoje slobodne aldehidne odnosno keto skupine ima sposobnost redukcije metala iz alkalnih otopina njihovih soli, što je u našem slučaju Luffova otopina. Kao posljedica te reakcije nastaje crveno-smeđi talog, netopljivi talog bakrovog oksidula (Cu_2O). Nakon nastanka taloga, količina laktoze, može se odrediti titracijom suviška nereduciranih iona bakra (Cu^{2+}) ili titracijom istaloženog i otopljenog bakrenog oksidula. Dodatkom otopine kalijevog jodida u suvišku, u kiseloj sredini koja se postiže dodatkom sumporne kiseline, dolazi do reakcije joda i suviška bakrenih iona pri čemu se oslobađa molekularni jod koji se titrira otopinom natrijevog tiosulfata uz škrob kao indikator (Božanić i sur., 2010).

U tikvicu s brušenim grlom stavljen je 1 mL uzorka mlijeka kojem se zatim dodalo 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključila na povratno hladilo i kuhala uz lagano vrenje točno 10 min. Vrijeme se mjeri nakon što prva kap kapne u tikvicu. Zatim se tikvica skinula, ohladila pod mlazom tekuće vode te je dodano 15 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida, a potom se oprezno i polako dodalo 25 mL 25 %-tne otopine sulfatne kiseline uz miješanje. Izlučeni jod titriran je s $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ natrijevim tiosulfatom tako dugo dok boja uzorka nije prešla u žutu boju. Zatim se dodao 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i lagano je nastavljena titracija natrijevim tiosulfatom sve do prijelaza tamnoplave boje u putenastu koja je trebala biti stabilna nekoliko minuta. Usporedno je odrađena i slijepa proba gdje se umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetiralo 25 mL destilirane vode, a ostalo je sve rađeno na isti način kao i s uzorkom. U račun je uzet ukupan broj utrošenih mL natrijeva tiosulfata iz obje titracije (Božanić i sur., 2010).

Izračun:

Slijepa proba troši x mL $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Uzorak troši y mL $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$$(x - y) \cdot f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = Z \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [7]$$

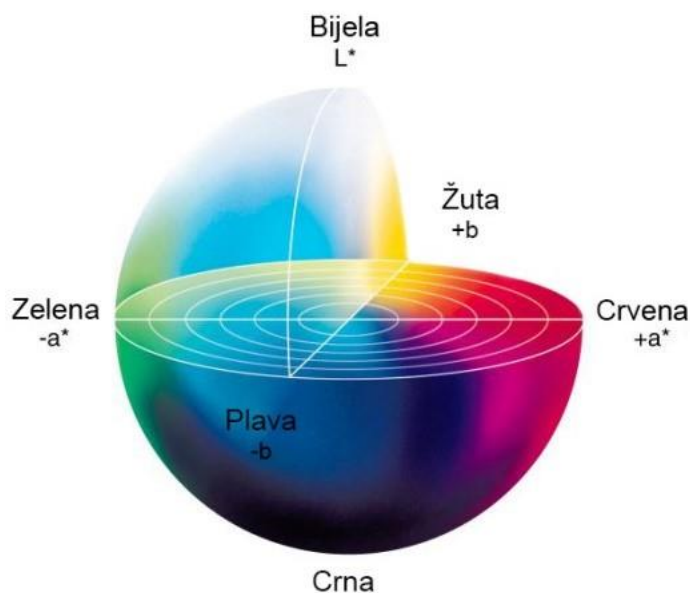
Iz tablice se za Z mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ očitaju mg maltoze u 1 mL uzorka.

Tablica 3. Izračunavanje šećera po Loof-Schoorlu

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

3.2.8. Određivanje indeksa boje

CIELAB je najpotpuniji sustav boja prihvaćen od strane francuske Međunarodne komisije za rasvjetu (slika 1). Predstavlja trodimenzionalni prostor boja temeljen na objektivnom vrednovanju boja te je najbliži vizualnoj percepciji. Mjerenje boje temelji se na parametrima trodimenzionalnog spektra boja (L^* , a^* , b^*) korištenjem kolorimetara koji rade na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. L^* je mjera svjetline, a iskazuje se vrijednostima od nula (crno) do sto (bijelo), a^* ukazuje na zastupljenost boja od zelene ($-a^*$) do crvene ($+a^*$), dok b^* ukazuje na zastupljenost boja od plave ($-b^*$) do žute ($+b^*$) (McGuire, 1992).



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

Određivanje boje uzoraka mlijeka i promjena nastalih nakon toplinskih tretmana provodilo se difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru CM-3500d (Konica Minolta, Japan). Izvor svjetla pulsirajuća je ksenon lampa, dizajnirana na način da daje standardni izvor svjetla D65. Neovisno o valnoj duljini, svjetlo reflektirano od uzorka se sakuplja u integrirajućoj sferi te se normalizira prema svjetlu izvora reflektancije. Iz tog je razloga prije svakog mjerenja, potrebno kalibrirati uređaj za to za to predviđenim originalnom bijelim standardom (100 %-tna refleksija) te crnim valjkom (0 % refleksije). U programu Spectramagic NX se podešavaju sve potrebne postavke. Mjerenje se provodilo tako da se svaki uzorak ulio u posudicu koja se poklopila s crnim

valjkom maksimalne apsorpcije svjetlosti. Kao rezultat dobivene su L^* , a^* i b^* vrijednosti za svaki uzorak.

Vrijednost ΔE^* , koristi se za izračun promjene boje mlijeka nakon toplinskog tretmana. Ova vrijednosti pokazuje koliko se boja tretiranog uzorka mlijeka razlikuje od referentnog uzorka mlijeka (tablica 4). Kako bi se dobila vrijednost promjene boje, vrijednosti L^* , a^* , b^* (izmjerene vrijednosti tretiranog uzorka mlijeka) te vrijednosti L^*_{ref} , a^*_{ref} , b^*_{ref} (izmjerene vrijednosti referentnog uzorka) uvrštene su u formulu:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2} \quad [8]$$

gdje je L^* svjetlina boje ispitivanog uzorka u $L^*a^*b^*$ sustavu,

a^* – parametar boje ispitivanog uzorka,

b^* – parametar boje ispitivanog uzorka,

L^*_{ref} – svjetlina boje referentnog uzorka,

a^*_{ref} – parametar boje referentnog uzorka te

b^*_{ref} – parametar boje referentnog uzorka.

Tablica 4. Značenje razlika između izmjerene ΔE^* vrijednosti i referentne (Mokrzycki i Tatol, 2011)

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

3.2.9. Određivanje udjela ukupnog i slobodnog hidroksimetilfurfurala

Posljedica termičke obrade mlijeka stvaranje je mnogih nepoželjnih spojeva koji se javljaju u paralelnim i uzastopnim reakcijama, poznatim pod zajedničkim nazivom Maillardove reakcije. Jedan od spojeva koji nastaje kao produkt u Maillardovim reakcijama je hidroksimetilfurfural (HMF). Hidroksimetilfurfural predstavlja ciklički aldehid i često se koristi kao indikator toplinskog tretmana mlijeka. Faktori koji su važni za formiranje hidroksimetilfurfurala su: temperatura, vrijeme trajanja toplinskog tretmana, uvjeti u kojima se mlijeko skladišti te moguća upotreba metalne ambalaže. Kao posljedica Maillardovih reakcija, povećanje temperature i trajanja toplinskog tretmana utječu na povećanje koncentracije hidrokismetilfurfurala (Özdal i sur., 2018). Maillardove reakcije odvijaju se u tri faze: inicijalna ili početna fazu, fazu stvaranja međuprodukata i finalna faza. U inicijalnoj fazi, reducirajući šećer, poput glukoze, reagira sa spojem koji posjeduje slobodnu amino skupinu, stvarajući pritom N-supstituirani glikosilamin, koji se preuređuje u Amadorijev proizvod preslagivanja (ARP). Pri pH 7 ili nižem, ARP se podvrgava se 1,2-enolizaciji sa stvaranjem furfurala (kada su prisutne pentoze) ili hidroksimetilfurfurala (kada su prisutne heksoze). U završnoj fazi nastaju heterociklični dušični spojevi, melanoidini, koji su obojeni i odgovorni za nastanak specifične arome (Martins i sur., 2001).

Za određivanje hidroksimetilfurfurala, potrebno je poznavati razliku između slobodnog i ukupnog hidroksimetilfurfurala. Ukupni HMF predstavlja zbroj prekursora HMF-a (laktulozilizin, 1-2 enolizirani proizvodi, itd.) i slobodnog HMF-a (Ritota i sur., 2017).

Postupak određivanja ukupnog HMF-a

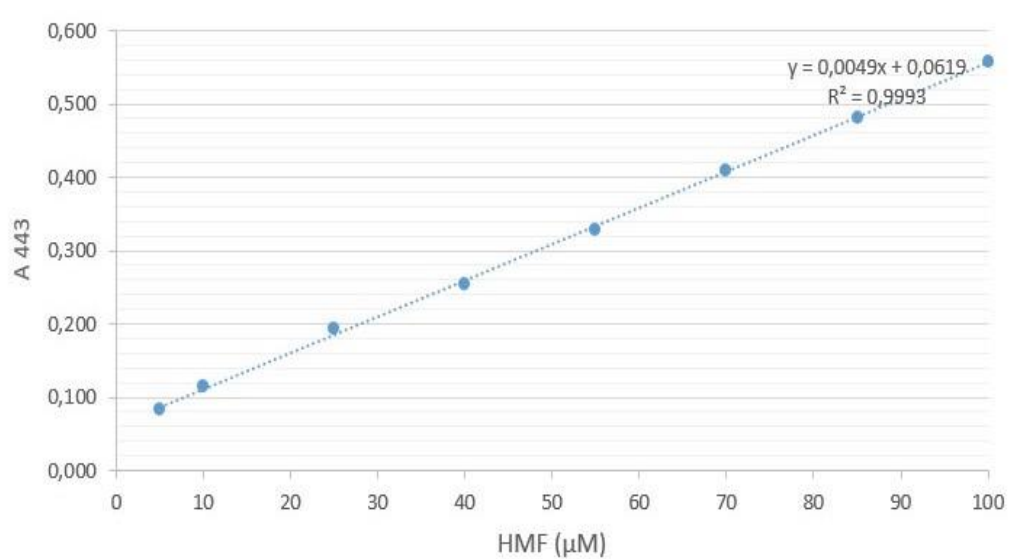
10 mL svakog uzorka mlijeka pomiješano je s 5 mL 0,3 M oksalne kiseline uz zagrijavanje na temperaturi od 100 °C u trajanju od jednog sata. Za zagrijavanje uz konstantno miješanje koristila se magnetna miješalica. Potom su se tretirani uzorci mlijeka naglo ohladili u hladnoj kupelji i deprotenizirali dodatkom 5 mL 40 % (w/v) trikloroctene kiseline. Nakon dodatka trikloroctene kiseline slijedila je filtracija kroz Whatmann filter papir broj 42. Zatim je 4 mL prethodno dobivenog filtrata inkubirano na 40 °C uz dodatak 1 mL 0,005 M TBA. Potom je izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 443 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba sadrži destiliranu vodu umjesto uzorka mlijeka, ali prolazi sve faze pripreme uzorka (Morales i sur., 1996). Dobivene vrijednosti prikazane u rezultatima predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja.

Postupak određivanja slobodnog HMF-a

10 mL svakog uzorka mlijeka pomješano je s 5 mL 0,3 M oksalne kiseline te se potom dodalo 5 mL 40 % TCA. Otopina se zatim filtrira kroz Whatmann filter papir broj 42. Nakon toga 4 mL prethodno dobivenog filtrata inkubiralo na 40 °C uz dodatak 1 mL 0,005 M TBA. Potom je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 443 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba sadrži destiliranu vodu umjesto uzorka mlijeka ali prolazi sve faze pripreme uzorka (Francisquini i sur., 2018).

Izrada baždarenog dijagrama za metodu određivanja udjela HMF-a

Za izradu baždarenog dijagrama (slika 2) korištene su različite koncentracije standarda HMF-a od 5 do 100 μM pri čemu su te različite koncentracije očitane na valnoj duljini od 443 nm. Na temelju očitanih vrijednosti izrađen je baždarni dijagram te je 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 (μM)

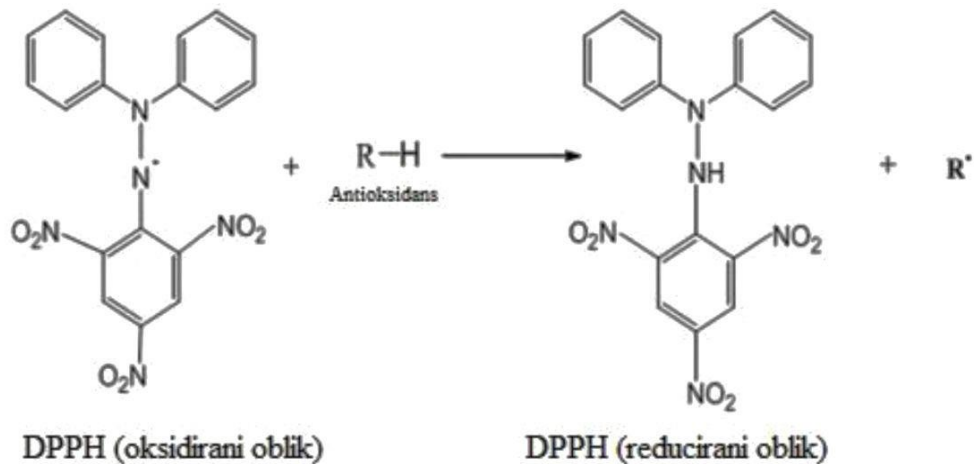
3.2.10. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te za određivanje udjela ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

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

3.2.10.1. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom*

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

Osim za određivanje antioksidacijske aktivnosti mlijeka i mliječnih proizvoda, ova se metoda često koristi za mjerenje antioksidansa u povrću, začinskom bilju, brašnu, koristeći pritom različita otapala kao što su etanol, aceton, metanol, benzen. U sredini DPPH molekule prisutan je nespareni elektron dušikovog atoma koji se reducira primanjem protona od strane antioksidansa, stvarajući pritom odgovarajući hidrazin (Contreras-Guzman i Srong, 1982). DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), molekulske formule $C_{18}H_{12}N_5O_6$ je slobodan radikal, stabilnih svojstava u otopini dok u metanolu daje ljubičasto obojenje koje apsorbira svjetlost na 517 nm. Metoda se zasniva na tome da se ion DPPH reducira iz $DPPH\cdot$ u $DPPH_2$ prilikom primanja protona (H) iz antioksidansa, a ljubičasto obojenje prelazi u žuto što je popraćeno smanjenjem apsorbancije na 517 nm. Promjena boje prati se spektrofotometrijski a dobivene apsorbancije koriste se za određivanje promjene antioksidacijske aktivnosti (Mishra i sur., 2012). Izgled molekule DPPH kao i mehanizam redukcije prikazan je na slici 3.



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

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom potrebno je svaki put pripremiti svježu $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ otopinu DPPH reagensa. Za pripremu otopine potrebno je otopiti 0,00237 g DPPH u 100 mL 95 %-tnog etanola.

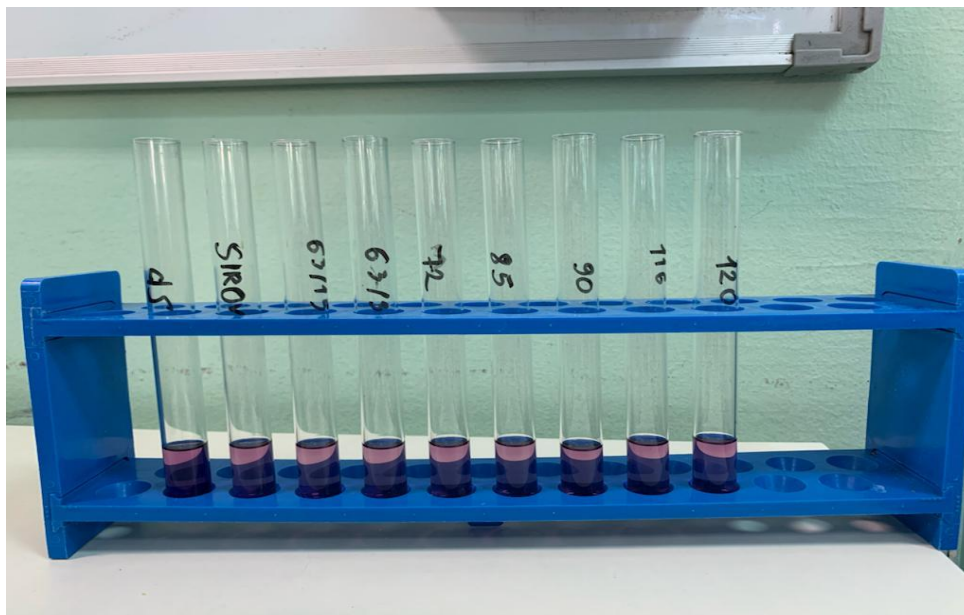
Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

0,1 mL prethodno dobivenog uzorka pomiješano je s 3,9 mL DPPH. Smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi, na mračnom mjestu tijekom 30 minuta, nakon čega je očitana apsorbancija na 517 nm (slika 4). Slijepa proba sadrži umjesto uzorka otapalo, odnosno 95 %-tni etanol (Sangsopha i sur., 2019). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost tri mjerenja.

Postotak redukcije slobodnih radikala u otopini proporcionalan je smanjenju apsorbancije mjerene otopine (uzorak + DPPH) i računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ DPPH redukcije radikala} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \cdot 100 \quad [9]$$

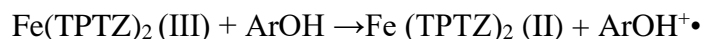
gdje je $A_o - A_{517}$ za slijepu probu (95 % etanol), a $A_s - A_{517}$ za uzorak.



Slika 4. Intenzitet nastalog obojenje primjenom DPPH metode (*vlastita fotografija*)

3.2.10.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je brza, jednostavna i jeftina kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Glavna reakcija odvija se između supstrata (donor elektrona) i iona Fe^{3+} (akceptor elektrona), pri čemu dolazi do nastajanja iona Fe^{2+} . Reakcija prijenosa elektrona između kompleksa željeza i TPTZ-a (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) tj. između $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2$ i molekule donora elektrona ArOH odvija se prema jednadžbi (Ou i sur., 2002):



Gore navedena reakcija redukcije popraćene je promjenom boje otopine Fe^{3+} s TPTZ-om koja iz žute postaje plava i apsorbira zračenje pri valnoj duljini od 593 nm (Martins i sur., 2012). FRAP analiza provodi se u kiselom mediju, pri pH 3,6, s ciljem osiguravanja dobre topljivosti željeza. Zbog niže pH vrijednosti smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije $\text{Fe}(\text{III})/\text{Fe}(\text{II})$ iznosi 0,77 V. S obzirom da reakcija nije selektivna, bilo koja druga redoks reakcija, s nižim redoks potencijalom od 0,77 V ulazit će u reakciju redukcije željeza te će tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijske aktivnosti

(Štolar, 2017). Budući da je oksidans u suvišku, jedini ograničavajući faktor nastajanja kompleksa produkta Fe^{2+} -TPTZ je reducirajuća moć uzorka (Benzie i Strain, 1999). Samim time, promjena vrijednosti apsorbancije direktno je povezana s ukupnom sposobnošću reduciranja u uzorku, odnosno elektron donorskom antioksidacijskom aktivnošću (Benzie i Strain, 1999). Za provođenje FRAP metode uzorak nije potrebno prethodno pripremiti i obraditi, stehiometrijski čimbenici su stalni, nije potrebna visoko specijalizirana oprema a reproducibilnost i osjetljivost je visoka (Benzie i Strain, 1999).

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom kemikalije i reagensi pripremaju se prema Benzie i Strain (1996). Prije svakog određivanja FRAP reagens se svježe priprema, na način da se pomiješa 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mM TPTZ-a pripremljenog u 40 mM HCl i 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ u omjeru 10:1:1. Za pripremu acetatnog pufera, potrebno je odvagati 3,1 g natrijevog acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijeti pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Željezo (III) klorid heksahidrat priprema se na način da se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom. Acetatni pufer i željezo (III) klorid heksahidrat nije potrebno svaki puta svježe pripremati.

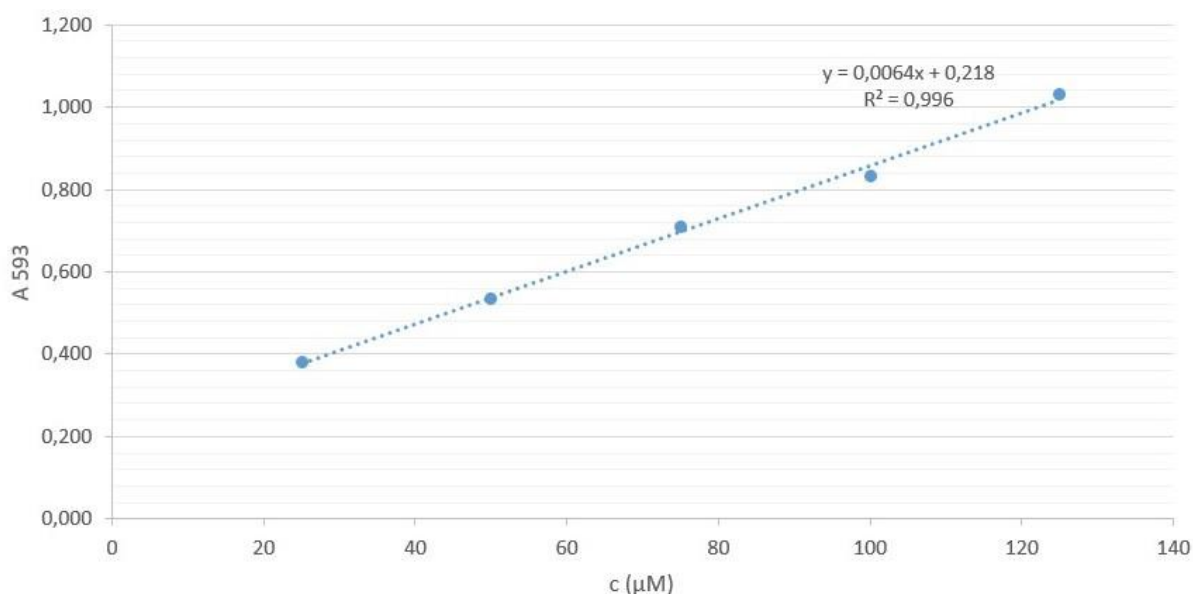
Za pripremu TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) potrebno je odvagati 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuniti do oznake s 40 mM HCl. Prije svakog mjerenja, TPTZ mora biti svježe pripremljen. FRAP reagens se inkubira na temperaturi od 37 °C u trajanju od 30 minuta.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Nakon inkubacije, 3,4 mL FRAP reagensa pomiješano je sa 0,6 mL prethodno dobivenog ekstrakta. 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 umjesto kojeg se stavlja otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran, odnosno stavio se 1 M HCl pripremljeni u 95 %-tnom etanolu. Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost tri mjerenja, izražena kao ekvivalent koncentracije standarda Trolox (μM).

Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu

Za pripremu baždarnog pravca pripremila se 2 mmol L⁻¹ otopina Trolox-a od koje su se pripremila razrjeđenja u koncentracijama: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetiralo: 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvot (stock) otopine Trolox-a te do oznake nadopunilo destiliranom vodom. Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 10 μL uzorka dodaje 10 μL otopine troloxa poznate koncentracije. Rezultati se izražavaju u konačnici kao mg Trolox ekvivalenta po mL (Sangsopha i sur., 2019). Baždarni dijagram za kvantifikaciju antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom prikazan je na slici 5.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593nm (A_{593}) o koncentraciji Troloxa (μM)

3.2.10.3. Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin-Ciocalteu

Fenolni spojevi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju spojeve različite kemijske strukture, od jednostavnih hidrokscimetnih kiselina, antocijanina (biljni pigmenti), do onih složenijih flavonoida i tanina (Berend i Grabarić, 2008). Njihovo glavno obilježje je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstena. Vazquez i sur. (2014) navode kako fenolni spojevi provode širok spektar

metaboličkih aktivnosti, posjedujući protuupalno, protualegrijsko i protukancerogeno i antioksidativno djelovanje.

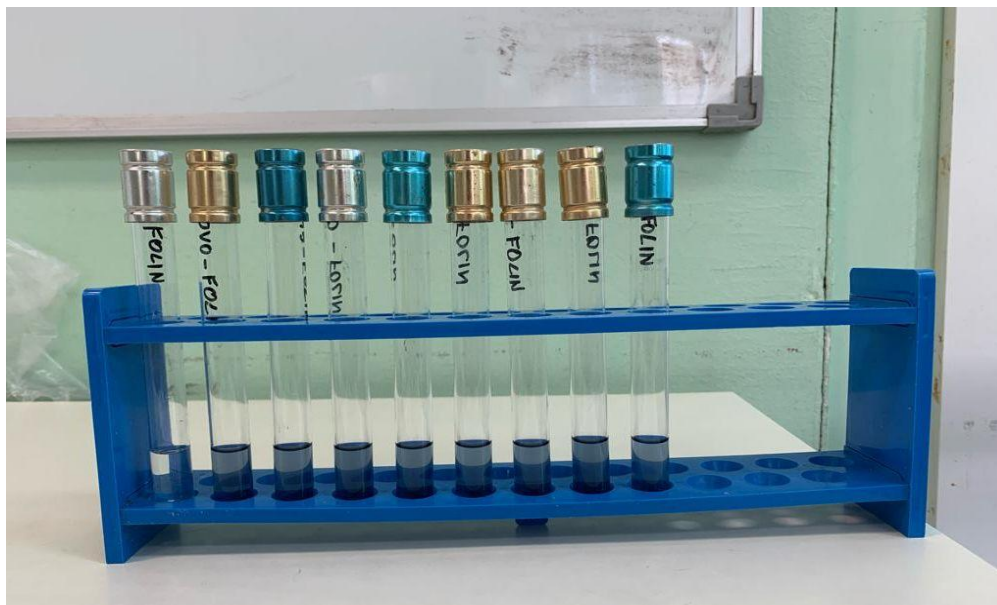
Određivanje koncentracije ukupnih polifenola je analitička metoda koja se svakodnevno primjenjuje u prehrambenoj industriji a dobiveni podaci o ukupnim polifenolima imaju važnu teorijsku primjenu za određivanje antioksidacijske aktivnosti namirnice (Berend i Grabarić, 2008). Folin-Ciocalteu metoda, predstavlja praktičnu, široko korištena metoda za kvantificiranje ukupnih fenolnih spojeva u različitim ekstraktima. Ova metoda zasniva se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućava mjerenja u vidljivom djelu spektra (Antolovic i sur., 2002). Reakcijom između polifenola i smjese fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline (Folin-Ciocalteu reagens) u blago bazičnom mediju dolazi do nastanka relativno stabilnog plavo obojanog kompleksa. Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 750 nm (Singleton i sur., 1999). Folin-Ciocalteu reagens se dodaje u suvišku, kako bi u potpunosti reagirao sa svim fenolnim spojevima, a spojevi kao što su: taninska kiselina, galna kiselina, tirozin, katehin se koriste kao standardi za prikazivanje rezultata, kao njihov maseni ekvivalent po masi ili volumenu uzorka (Singleton i sur., 1999).

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje ukupnih fenola, sve kemikalije i reagensi pripremljeni su prema Singleton i sur. (1999). Folin-Ciocalteu reagens potrebno je svaki puta svježe pripremiti na način da se razrijedi sa destiliranom vodom u omjeru 1:10. Za ovu metodu korištena je i 7,5 %-tna otopina natrijevog karbonata pripremljena u destiliranoj vodi.

Postupak određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

U epruveti je redom dodano: 0,4 mL prethodno dobivenog ekstrakta, zatim 1,6 mL Folin Ciocalteu reagensa te nakon otprilike 5 minuta 2 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Dobivena smjesa se zatim dobro homogenizirala na vortexu i inkubirala na sobnoj temperaturi na mračnom mjestu u trajanju od 2 sata. Nakon 2 sata očitana je apsorbancija na 750 nm (slika 6). Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, a umjesto uzorka sadržava destiliranu vodu. Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost tri mjerenja izražena kao ekvivalent koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}).

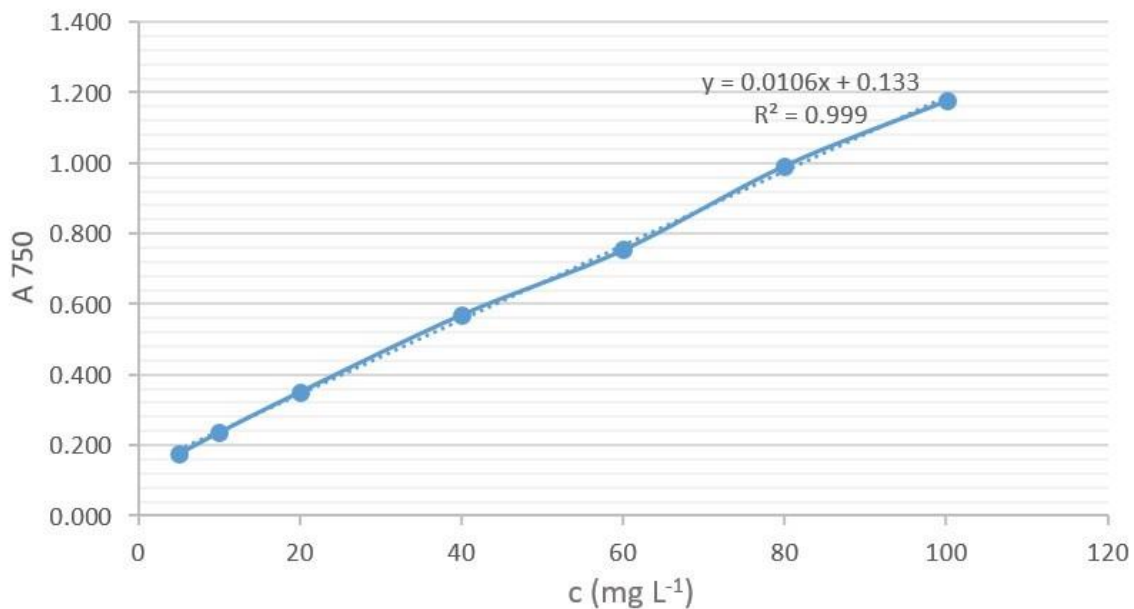


Slika 6. Intenzitet nastalog obojenja s Folin-Ciocalteu reagensom (*vlastita fotografija*)

Postupak izrade baždarnog dijagrama za metodu sa reagensom po Folin Ciocalteu

Za pripremu baždarnog pravca, 0,5 g prethodno odvagane galne kiseline otopljeno je u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL te je nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Od otopine galne kiseline pripravljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se redom otpipetiralo 0,4, 0,8, 2, 4, 6 i 8 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunilo do oznake destiliranom vodom. U konačnici koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznosile su 50, 50, 75, 100 i 125 mg L⁻¹.

Postupak mjerenja apsorbancije za svaku koncentraciju standardne otopine je isti kao što je opisano za uzorke, samo što se umjesto uzorka dodaje 0,4 mL galne kiseline. Na temelju dobivenih vrijednosti apsorbancije izrađen je baždarni dijagram prikazan na slici 7 te dobivena jednadžba pravca pomoću koje su izračunati udjeli ukupnih fenola u uzorcima mlijeka.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm (A_{750}) o koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1})

3.2.11. Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza proteina

Poliakrilamid gel elektroforeza predstavlja separacijsku tehniku koja ima značajnu ulogu u istraživanju mliječnih proteina. Zbog jednostavnosti i relativno kratkog vremena analize, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE) se često koristi za dokazivanje patvorenja mlijeka. Osim navedenog, SDS PAGE elektroforeza koristi se i za određivanje stupnja denaturacije proteinskih frakcija prisutnih u mlijeku, do koje dolazi obradom mlijeka na različitim temperaturama.

Primjena toplinskih tretmana uzrokuje brojne fizikalno-kemijske promjene na sastojcima mlijeka, no trenutno nije dostupan veliki broj radova o njihovom utjecaju na proteine kobiljeg mlijeka. Proteini sirutke koji čine 50 % ukupnih proteina kobiljeg mlijeka, predstavljaju termolabilne proteine. Frakcija proteina sirutke sadrži četiri glavna proteina: β -laktoglobulin, α -laktalbumin, proteini krvnog seruma (BSA) i imunoglobulin (Ig). Iako su proteini sirutke termolabilni, β -laktoglobulin, α -laktalbumin kobiljeg mlijeka su u usporedbi sa kravljim otporniji na visoke temperature, što je povezano s njihovim monomernim oblikom i odsutnošću sulfhidrilnih skupina (Claeys i sur., 2014). Kazein je u toplinski stabilan protein jer ne koagulira kada je podvrgnut visokoj toplinskoj obradi a sastoji se od četiri frakcije: α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein i κ -kazein.

S obzirom na dostupnu literaturu, Civardi i sur. (2007) navode kako α -laktalbumin, lizozim i β -laktoglobulin kobiljeg mlijeka pokazuju značajnu toplinsku stabilnost u uzorku koji je zagrijavan do temperature od 75 °C u trajanju od 14 minuta. Međutim kinetika denaturacije α -laktalbumina i β -laktoglobulina se razlikuje. α -laktalbumin je na početku procesa zagrijavanja jako otporan na toplinsku denaturaciju ali primjenom temperature od 85 °C u trajanju od 20 minuta počinje njegova brza destabilizacija. Za razliku od α -laktalbumina, β -laktoglobulin ima veću toplinsku stabilnost tijekom cijelog procesa zagrijavanja i predstavlja jedinu frakciju proteina sirutke koja je prisutna u uzorku (s udjelom od 38,5 % od početne vrijednosti) nakon primjene temperature od 100 °C u trajanju od 30 minuta.

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

U 15 μ L uzorka mlijeka je dodano 15 μ L 2 x koncentriranog Laemmli pufera (1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL SDS (10 % (w/v)), 2 mL glicerol (100 % (v/v)), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo, 0,2 mL β -merkaptotanol). Tako priređeni uzorci su prokuhani 2,5 min. U međuvremenu je izvađen češljic iz prethodno pripremljenog 10 %-tnog poliakrilamidnog gela te je pripremljena aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu je ulito 400 mL pufera za elektroforezu (1x). Nakon kuhanja, 20 μ L uzorka je pomoću Hamilton igle nanešeno na 10 %-tni poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 190 V tijekom 45 minuta. Pritom je korišten standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praša, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) tijekom 2 sata, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.

Priprema 10 %-tnog poliakrilamidnog gela

GEL ZA RAZDVAJANJE (DONJI GEL)

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 8,8	2,5 mL
30 % akrilamid	3 mL
destilirana voda	2,5 mL

TEMED (N, N, N', N'-terametiletilendiamin)	5 μ L
10 % APS (amonijev persulfat)	38 μ L

GEL ZA SABIJANJE (GORNJI GEL)

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 6,8	2,13 mL
30 % akrilamid	0,3 mL
TEMED (N, N, N', N'-terametiletilendiamin)	5 μ L
10 % APS (amonijev persulfat)	22,5 μ L

Nakon dodatka TEMED-a u smjesu, gel za razdvajanje je izliven u kalup između dva stakalca, dodan je izopropanol da se gel jednoliko rasporedi, te je ostavljen da se polimerizira tijekom otprilike 45 minuta.

Nakon uklanjanja izopropanola pomoću filter papira, u kalup je dodan gel za sabijanje, u koji je odmah uronjen češljic za stvaranje jažica gela te ostavljen da se polimerizira.

Priprema pufera za elektroforezu (10 x koncentrirana otopina):

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

te nadopunjeno do 100 mL destiliranom vodom.

3.2.12. Određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari mlijeka
 Za određivanje električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (engl. *Total Dissolved Solids, TDS*) u mlijeku korišten je konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska). Prije svakog

mjerenja, uzorak je razrijeđen destiliranom vodom (10 puta) te su potom homogenizirani na vorteksu. (BiosanVortex V1 Plus, Latvija). Mjerenje se vrši na način da se elektroda uroni u uzorak i očitaju se vrijednosti električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari. Nakon završetka mjerenja, elektroda je isprana destiliranom vodom i posušena staničevinom. Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost dva mjerenja.

3.2.13. Analiza uzoraka kobiljeg mlijeka blisko-infracrvenom spektroskopijom (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIRs*) i Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*)

Svi uzorci kobiljeg mlijeka snimani su u blisko-infracrvenom području ($\lambda = 904 - 1699$ nm) primjenom NIR instrumenta (NIR – 128 – 1.7 – USB/6.25/50 μ m Control Development Inc., SAD) sa instaliranim programom Control Development Spec32 (Control Development Inc., SAD). Uzorci su snimani u kivetama koje su se pozicionirale u postolje za snimanje tekućih uzoraka. Za sve uzorke izračunata je srednja vrijednost tri snimljena spektra, pri čemu su svi uzorci prije mjerenja razrijeđeni 10 puta s destiliranom vodom.

Kako bi se interpretirali snimljeni NIR spektri uzoraka kobiljeg mlijeka, primijenjena je Analiza glavnih komponenata (PCA). PCA predstavlja jednu od metoda multivarijatne statistike koja omogućuje analizu multidimenzionalnih podataka, s ciljem pronalaska 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 14.0 (TIBCO® Statistica, SAD).

3.2.14. Obrada podataka

Obrada rezultata laboratorijskih analiza odrađena je u Microsoft Office Excel 2013. Svi dobiveni rezultati prikazani su tablično i predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ponavljanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je utjecaj različitih režima toplinskih obrade na parametre kvalitete kobiljeg mlijeka. U tablici 5 prikazani su rezultati osnovnih fizikalno kemijskih analiza koje su određivane prije primjene samih toplinskih tretmana. Nadalje, u tablicama 6 i 7 prikazani su rezultati promjene boje mlijeka nastale usljed primjene toplinske obrade. Slijedi slika 8, koja prikazuje vidljivu promjenu boje tretiranih uzoraka mlijeka. U tablici 8 prikazana je koncentracija slobodnog i ukupnog hidrosimetilfurfurala nastalog usljed primjene toplinske obrade. Tablica 9 prikazuje antioksidacijsku aktivnost uzoraka mlijeka primjenom DPPH metode dok tablica 10 prikazuje antioksidacijsku aktivnost uzoraka mlijeka primjenom FRAP metode. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva određena Folin-Ciocalteu metodom, prikazana je u tablici 11. Slika 9 daje uvid u stupanj denaturacije proteina, koji je određivan primjenom SDS-PAGE elektroforeze. Slika 10 prikazuje rezultate blisko-infracrvene (NIR) spektroskopije, pomoću koje se pratila se kvalitativna analiza strukturnih promjena uzoraka mlijeka. Analizom glavnih komponenata nastojalo se utvrditi postoje li sličnosti odnosno razlike među testiranim uzorcima u odnosu na odabrani toplinski režim, što je prikazano na slici 11.

4.1. ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA MLIJEKA

U tablici 5 prikazane su dobivene vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara kobiljeg mlijeka.

Tablica 5. Fizikalno-kemijski parametri svježeg kobiljeg mlijeka

Parametar	Sirovo mlijeko
pH	7,01
°SH	2,20
Gustoća (g L ⁻¹)	1034,50
Mliječna mast (%)	1,20
Laktoza (%)	6,42
Proteini (%)	1,63

Očitana pH vrijednost sirovog uzorka kobiljeg mlijeka iznosila je 7,01. Dobivena vrijednost je u skladu sa vrijednostima navedenim u literaturi (Božanić i sur., 2016) prema kojima se prosječna vrijednost kreće između 6,9 i 7,2. Zbog puferskih svojstava aktivna kiselost svježeg mlijeka je u užim granicama, a predstavlja broj molova kiseline ili lužine potreban da se pH vrijednost uzorka promijeni za jedinicu.

Uz aktivnu kiselost, određena je i titracijska kiselost mlijeka koja je izražena u stupnjevima po Soxhlet-Henkelu ($^{\circ}\text{SH}$). Titracijskom kiselosti mjerimo latentnu kiselost koja potječe iz trenutno ne disociranih kiselih sastojaka mlijeka, a koji imaju veliki puferski kapacitet. Titracijska kiselost mlijeka, određena je titracijom mlijeka uz indikator fenolftalein. Dobivena vrijednost iznosila je 2,2 $^{\circ}\text{SH}$ i u skladu je sa vrijednosti titracijske kiselosti navedenim u literaturi (Mariani i sur., 2001).

Božanić i sur. (2016) navode kako se gustoća zrelog kobiljeg mlijeka kreće između 1028 do 1035 g L^{-1} . Dobivena vrijednost gustoće iznosila je 1034,5 g L^{-1} , što je u skladu sa literaturom.

Najznačajnijim svojstvom kobiljeg mlijeka smatra se nizak udio mliječne masti, čija se vrijednost smanjuje tijekom laktacije. S obzirom na niži udio mliječne masti, u odnosu na kravlje i humano mlijeko, kobilje mlijeko ima nižu energetska vrijednost. Udio mliječne masti u testiranom uzorku iznosi 1,2 % te je taj parametar u skladu sa navodima u literaturi (1,2 %) (Božanić i sur., 2016).

Kobilje mlijeko bogato je laktozom, čiji je udjel više ili manje konstantan i nije podložan promjenama zbog utjecaja pasmine, godišnjeg doba ili stadija laktacije. Udjel laktoze iznosi oko 6,4 %, a dobivena vrijednost od 6,42 % je u skladu sa literaturom (Božanić i sur., 2016).

Zbog visokog udjela proteina sirutke, kobilje mlijeko se ubraja u tzv. albuminska mlijeka. Osim visokog udjela proteina sirutke, kobilje mlijeko sadrži visok udjel i proteina mliječnog seruma te predstavlja bogat izvor esencijalnih aminokiselina. Udjel proteina iznosio je 1,63 % što je u skladu sa vrijednostima literature prema kojim udjel proteina iznosi 1,5 do 2,8 %. Količina proteina i masti uvelike se mijenja tijekom laktacije, čiji se udjel smanjuje prema kraju laktacije.

4.2. ODREĐIVANJE BOJE MLIJEKA

U tablici 6 prikazane su izmjerene vrijednosti parametara boje CIELAB sustava.

Tablica 6. Rezultati određivanja boje sirovog i toplinski obrađenog kobiljeg mlijeka

Uzorak	L*	a*	b*
Sirovo mlijeko	81,56±0,01	-4,09±0,01	0,01±0,00
63 °C/15 s	81,57±0,00	-1,62±0,00	-0,97±0,00
63 °C/30 min	84,37±0,00	-1,71±0,00	-0,35±0,01
72 °C/20 s	83,68±0,02	-1,62±0,01	-0,13±0,01
85 °C/30 s	82,72±0,00	-1,64±0,02	-0,99±0,00
90–95 °C/7 min	81,59±0,00	-1,65±0,01	-1,49±0,01
116 °C/16 min	73,02±0,08	4,12±0,02	18,22±0,06
120 °C/ 5min	76,66±0,01	1,20±0,00	13,05±0,01

Parametar L* predstavlja mjeru za svjetlinu, koja se kreće u rasponu od 0 (crno) do 100 (bijelo). Promatrajući izmjerene vrijednosti možemo zamijetiti da kod svih pasteuriziranih uzoraka dolazi do povećanja L* vrijednosti u odnosu na uzorak sirovog mlijeka, iz čega možemo zaključiti da toplinski tretman utječe na promjenu boje. Najveća L* vrijednost izmjerena je kod uzoraka koji je tretiran na temperaturi od 63 °C u trajanju od 30 minuta (84,37±0,00), a najmanja L* vrijednost izmjerena je kod uzorka koji je steriliziran primjenom temperature od 116 °C u trajanju od 16 minuta (73,02±0,08). U oba sterilizirana uzorka (116 °C odn. 120 °C) došlo je do smanjenja L* vrijednosti, iz čega možemo zaključiti da primjena toplinskih tretmana na temperaturama iznad 100 °C utječe negativno na boju kobiljeg mlijeka.

Parametar a* ima raspon od -100 do +100, kada je pozitivna vrijednost (+a*) to odgovara smjeru crvene boje a kada je negativna (-a*) to odgovara smjeru zelene boje. Iz tablice 6. je vidljivo kako svi pasteurizirani uzorci zajedno sa uzorkom sirovog mlijeka imaju negativne vrijednosti, što ukazuje na približavanje zelenoj boji. Najnižu a* vrijednost ima upravo uzorak sirovog mlijeka čime je njegovo približavanje zelenoj boji najveće. Međutim, sterilizirani uzorci mlijeka imaju

pozitivne vrijednosti, što ukazuje na približavanje crvenoj boji. Najveću izmjerenu a^* vrijednost pokazuje uzorak tretiran na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta, čime je njegovo približavanje crvenoj boji najveće, što je vidljivo i na slici 6.

Parametar b^* ima isti raspon vrijednosti od -100 do + 100 pri čemu pozitivna b^* vrijednost ($+b^*$) odgovara smjeru žute, a negativna b^* vrijednost ($-b^*$) smjeru plave boje. Svi pasterizirani uzorci mlijeka imaju negativne b^* vrijednosti, pri čemu je najveće približavanje plavoj boji uočeno kod uzorka tretiranog na temperaturi od 90-95 °C u trajanju od 7 minuta. Najviše vrijednosti parametra b^* izmjerene su u steriliziranim uzorcima, pri čemu je najveće približavanje žutoj boji uočeno kod uzorka tretiranog na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta. Na slici 8 prikazani su uzorci mlijeka tretirani različitim toplinskim tretmanima pri čemu je kod steriliziranih uzoraka došlo do vidljive promjene boje dok su pasterizirani uzorci očuvali bijelu boju mlijeka.



Slika 8. Promjena boje tretiranih uzoraka mlijeka (*vlastita fotografija*)

U tablici 7 prikazane su izračunate ΔE^* vrijednosti koje predstavljaju odstupanje boje tretiranih uzoraka mlijeka u odnosu na referentni uzorak tj. sirovo mlijeko. Najveća odstupanja zapažena su kod steriliziranih uzoraka, točnije kod uzorka tretiranog na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta. Najmanje odstupanje boje u odnosu na referentnu zabilježeno je kod uzorka koji je zagrijavan na temperaturi od 63 °C/15 s.

Tablica 7. Odstupanje boje (ΔE^*) uzoraka mlijeka obrađenih različitim temperaturnim režimima u usporedbi s uzorkom sirovog mlijeka

UZORAK	ΔE^*
63-65 °C/15 s	2,65
63-65 °C/30 min	3,69
72 °C/20 s	3,25
85 °C/30 s	2,88
90 °C/7 min	2,86
116 °C/16 min	21,72
120 °C/5 min	14,90

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNOG I SLOBODNOG HMF-a

U tablici 8 prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnog i slobodnog HMF-a u uzorcima sirovog kobiljeg mlijeka i u uzorcima koji su tretirani različitim toplinskim režimima.

Tablica 8. Koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a u sirovom kobiljem mlijeku i uzorcima obrađenim različitim temperaturnim režimima

UZORAK	SLOBODNI HMF (μM)	UKUPNI HMF (μM)
Sirovo	2,36 \pm 1,01	4,40 \pm 3,60
63 °C/15 s	2,78 \pm 1,15	6,75 \pm 0,86
63 °C/30 min	3,98 \pm 0,74	10,53 \pm 0,86
72 °C/20 s	1,44 \pm 0,28	3,68 \pm 1,43
85 °C/30 s	3,81 \pm 0,28	4,50 \pm 1,73
90 °C/7 min	3,08 \pm 0,56	4,10 \pm 1,84
116 °C/16 min	38,79 \pm 4,90	67,26 \pm 16,30
120 °C/5 min	28,48 \pm 9,38	35,12 \pm 5,81

Maillardove reakcije su ireverzibilne reakcije neenzimskog posmeđivanja koje predstavljaju jednu od čestih pojava promjene laktoze u mlijeku koja se događa pod utjecajem visoke toplinske obrade. Maillardove reakcije su reakcije između proteina i šećera, točnije između amino skupine lizina i aldehidne skupine laktoze, uz nastajanje aminošećera, pri čemu posljedično dolazi do pojave smeđkaste boje mlijeka. Hidroksimetilfurfural (HMF) kao produkt Maillardovih reakcija, često se koristi kao indikator toplinskog tretmana mlijeka. Za mjerenje koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a u uzorcima mlijeka korišten je test s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA). U usporedbi sa suvremenim instrumentalnim metodama poput HPLC ili LC-MS, test s TBA je manje pouzdan ali i dalje omogućuje procjenu intenziteta toplinske obrade te procjenu varijabli skladištenja proizvoda (Popadić, 2021).

S obzirom da se kobilje mlijeko najčešće termički ne obrađuje, trenutno nema dostupnih istraživanja o učincima toplinskih tretmana na tvorbu HMF-a u kobiljem mlijeku. Stoga su dobiveni rezultati uspoređeni sa rezultatima dobivenim primjenom toplinske tretmana na drugim vrstama mlijeka.

Dobiveni rezultati prikazani u tablici 8 u skladu su sa navodima da povećanje temperature i trajanja procesa uzrokuje porast koncentracija HMF-a (Özdal i sur., 2018). Najniže vrijednosti slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerene su u uzorku tretiranom na temperaturi od 72 °C/20 s. Sirovo mlijeko također sadrži HMF, koji je nastao uslijed analitičkog postupka te zbog kiselih uvjeta i primjenjen temperature (Morales, 2000). Promatrajući dobivene vrijednosti u tablici 8. možemo zaključiti da je do najveće tvorbe slobodnog a i ukupnog HMF-a došlo u steriliziranim uzorcima mlijeka, točnije najveća koncentracija slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerena je u uzorku koji je tretiran na temperaturi od 116 °C/16 min. Uspoređujući sterilizirane uzorke mlijeka, veća koncentracija slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerena je kod uzoraka mlijeka koji je duže tretiran, što ukazuje da osim same temperature na tvorbu HMF-a značajan učinak ima i trajanje toplinskog tretmana (Calligaris i sur., 2004). Analizirajući dobivene vrijednosti pasteuriziranih uzoraka mlijeka, može se zaključiti da su najveće koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerene kod uzorka mlijeka koji je tretiran najduže, točnije kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 63 °C/30 min. Iz svega navedenog proizlazi da su najveće koncentracije u pasteuriziranim i steriliziranim uzorcima izmjerene upravo kod onih koji su tretirani tijekom najdužeg vremenskog intervala. Do istog zaključka došli su Milić (2021) i Popadić (2021), kod kojih su najveće koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-s u uzorcima kravljeg i kozjeg mlijeka izmjerene u onom koji je steriliziran na 116

°C u trajanju od 16 minuta. Od pasteriziranih uzoraka najveće vrijednosti također su pokazali uzorci tretirani na temperaturi od 63 °C u trajanju od 30 minuta. U usporedbi sa koncentracijama HMF-a u steriliziranim uzorcima, koncentracija HMF-a u pasteriziranim uzorcima znatno su niže, što je u skladu sa navodima Moralesa i sur. (2000), gdje koncentracija HMF-a u pasteriziranom mlijeku iznosi 2,49 μM, dok u steriliziranom iznosi 22 μM.

4.4.REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH

METODOM

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka kobiljeg mlijeka određene DPPH metodom prikazane su u tablici 9. Veća redukcija označava veću prisutnost antioksidansa u uzorku.

Tablica 9. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti sirovog i toplinski obrađenog kobiljeg mlijeka DPPH metodom

UZORAK	% DPPH REDUKCIJE
Sirovo	31,73±2,62
63 °C/15 s	28,33±5,83
63 °C/30 min	28,90±8,74
72 °C/20 s	26,90±3,78
85 °C/30 s	29,06±2,70
90 °C/7 min	28,94±3,34
116 °C/16 min	29,91±8,39
120 °C/5 min	29,43±9,23

Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena je u uzorku sirovog kobiljeg mlijeka, dok je u svim ostalim termički tretiranim uzorcima mlijeka zamijećen pad postotka DPPH redukcije radikala, pri čemu nije došlo do velikih razlika u vrijednostima postotka redukcije.

Najveći pad antioksidacijske aktivnosti izmjeren je kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 72 °C/20 s, dok je najveća antioksidacijska aktivnost kod tretiranih uzoraka zamijećena kod steriliziranih uzoraka, točnije kod onog uzorka koji je tretiran na temperaturi od 116 °C/16 min. Dobivene vrijednosti pasteriziranih i steriliziranih uzoraka ne razlikuju se značajno što je u skladu

sa istraživanjem Alyaqoubi i sur. (2014) koji navode da nisu pronađene značajne razlike između srednjih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti steriliziranih i pasteuriziranih uzoraka mlijeka. Nadalje, dobiveni rezultati su u skladu sa istraživanjem kojeg su proveli Khan i sur. (2017) prema kojima pasteurizacija i sterilizacija kravljeg i bivoljeg mlijeka uzrokuju neznatno smanjenje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na sirovo mlijeko primjenom DPPH metode.

4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, mjerene FRAP metodom, izražene kao μmol Trolox ekvivalenata, prikazane su u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti sirovog i toplinski obrađenog kobiljeg mlijeka FRAP metodom

UZORAK	Trolox ekvivalent (μM)
Sirovo	35,85 \pm 3,20
63 °C/15 s	35,93 \pm 3,49
63 °C/30 min	38,906 \pm 2,65
72 °C/20 s	35,15 \pm 2,81
85 °C/30 s	39,21 \pm 4,33
90 °C/7 min	41,621 \pm 4,78
116 °C/16 min	65,15 \pm 15,55
120 °C/5 min	63,58 \pm 13,27

Promatrajući dobivene rezultate prikazane u tablici 10 može se zaključiti da je povišenje temperature u primijenjenim toplinskim tretmanima uzrokovalo povećanja antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka, u odnosu na uzorak sirovog mlijeka. Odstupanje je zamijećeno jedino kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 72 °C u trajanju od 20 sekundi, pri čemu je došlo do neznatnog pada antioksidacijske aktivnosti. Najmanja antioksidacijska aktivnost zamijećena je upravo kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 72 °C u trajanju od 20 sekundi, dok su najveće vrijednosti izmjerene kod steriliziranih uzoraka. Kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 116

°C u trajanju od 16 minuta izmjerena je najveća antioksidacijska aktivnost. Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjem kojeg su proveli Musa i sur. (2021) prema kojima pasterizacija kobiljeg mlijeka uzrokuje povećanje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na sirovo mlijeko, primjenom FRAP metode. El-Fattah i sur. (2020) u svom radu navode kako porastom temperature koja je primijenjena prilikom pasterizacije i sterilizacije dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama mlijeka.

Uspoređujući dobivene rezultate primjenom DPPH i FRAP metode, vidljivo je da kod FRAP metode dolazi do porasta antioksidacijske aktivnosti u većini uzoraka, dok kod DPPH metode dolazi do smanjena antioksidacijske aktivnosti uslijed primjene toplinskih tretmana. Yilmaz- Ersan i sur. (2018) navode kako toplinska obrada ovčjeg i kravljeg mlijeka uzrokuje smanjenje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na sirovo mlijeko primjenom DPPH metode, dok je porast antioksidacijske aktivnosti zamijećen primjenom FRAP metode, što je u skladu sa dobivenim rezultatima na kobiljem mlijeku. Porast antioksidacijske aktivnosti može se djelomično objasniti kroz to da primjena toplinskih tretmana dovodi do proizvodnje melanoidinskih spojeva kao produkata Maillardovih reakcija neenzimskog posmeđivanja, koji pokazuju određenu antioksidacijsku aktivnost (Štoler, 2017).

Razlike između rezultata metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti mogu se objasniti drugačijim principima na kojima se metode zasnivaju. Iako su obje reakcije temeljene na mehanizmu izmjene elektrona (redoks reakcije), DPPH metoda uključuje sposobnost vezanja slobodnih radikala od strane antioksidansa, dok FRAP metoda uključuje sposobnost antioksidansa da reducira ion željeza (mjeri redukcijski kapacitet) (Milić, 2021).

4.6. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH FENOLA FOLIN CIOCALTEU METODOM

Koncentracije ukupnih fenola određene Folin–Ciocalteu metodom, izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline, prikazane su u tablici 11.

Tablica 11. Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola (UF) sirovog i toplinski obrađenog kobiljeg mlijeka Folin–Ciocalteu metodom

UZORAK	UF/mg GAE L⁻¹
Sirovo	42,08±2,71
63 °C/15 s	43,79±5,40
63 °C/30 min	44,12±0,664
72 °C/20 s	41,19±0,79
85 °C/30 s	46,23±5,67
90 °C/7 min	42,42±2,11
116 °C/16 min	58,55±11,20
120 °C/5 min	49,75±0,35

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 11 zamijećeno je povećanje koncentracije fenola kod tretiranih uzoraka mlijeka, u odnosu na uzorak sirovog mlijeka. Najveće povećanje koncentracije izmjereno je kod steriliziranih uzoraka, točnije kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta, dok je najmanja koncentracija izmjerena kod uzorka koji je tretiran na temperaturi od 72 °C u trajanju od 20 sekundi.

Porast antioksidacijske aktivnosti u tretiranim uzorcima može se djelomično objasniti prisutnošću drugih biološki aktivnih komponenata uključujući vitamine (A, E i C), enzime, laktoferin koji dokazano ulaze u reakcije s Folin Ciocalteu reagensom jer poput fenolnih spojeva, imaju antioksidacijsko djelovanje (Vázquez i sur., 2015). U istraživanju, Everette i sur. (2010) navode kako Folin Ciocalteu reagens pokazuje reaktivnost i sa proteinima, aminokiselinama, ugljikohidratima, tiolima, nezasićenim masnim kiselinama, aminima, organskim kiselinama, zbog čega je predloženo da se metoda koristi i za određivanje antioksidacijske aktivnosti a ne samo za određivanje sadržaja ukupnih fenola.

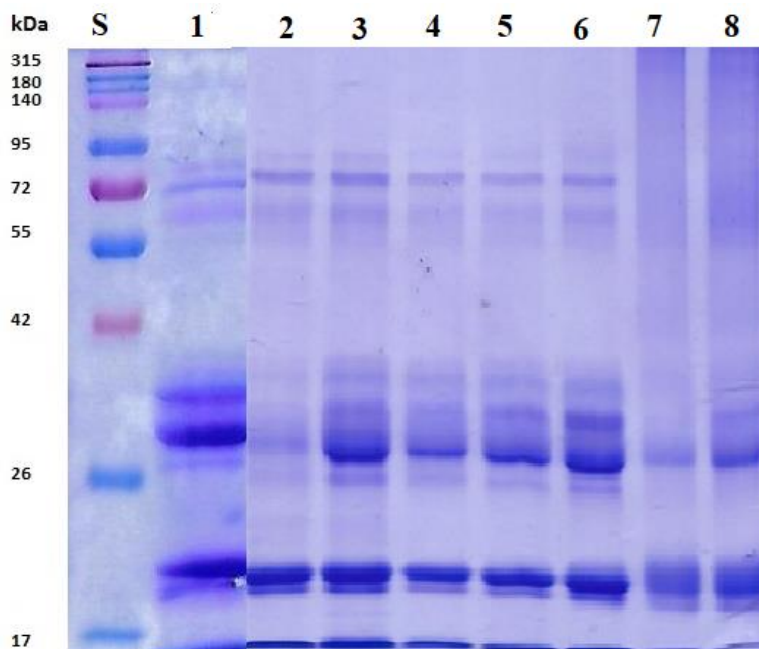
Promatrajući sve dobivene rezultate, uočena je pozitivna korelacija između određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH i FRAP metode te određivanja ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je najveća antioksidacijska aktivnost i najveća koncentracija fenola izmjerena u uzorku tretiranom na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta. Najmanje vrijednosti u sve tri navedene metode

izmjerene su u uzorku koji je tretiran na temperaturi od 72 °C u trajanju od 20 sekundi, što ukazuje na najmanju antioksidacijsku aktivnost odnosno najmanju koncentraciju fenola. Pozitivnu korelaciju između FRAP metode i metode s Folin-Ciocalteu reagensom, u svojem istraživanju potvrdili su i Alyaquobi i sur. (2014) koji su određivali antioksidacijsku aktivnost kozjeg mlijeka različitim metodama.

Uzorak tretiran na temperaturi od 116 °C u trajanju od 16 minuta osim najveće antioksidacijske aktivnosti sadrži i najveće koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a. Usprkos, prethodno objavljenim istraživanjima o negativnim biološkim učincima HMF-a, u posljednje vrijeme sve je veći broj istraživanja koji dokazuje upravo suprotno, pripisujući pritom antioksidacijsku aktivnost HMF-u. U istraživanju Zhao i sur. (2013) navode kako je HMF pokazao antioksidacijsku aktivnosti uklanjanjem slobodnih radikala primjenom DPPH i ABTS metode. S obzirom na navedeno, postoji mogućnost da je tvorba HMF u tretiranim uzorcima mlijeka imala pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost.

4.7. REZULTATI SDS – PAGE ELEKTROFOREZE

Na slici 9 prikazani su rezultati provođenja SDS-PAGE elektroforeze na sirovom i tretiranim uzorcima mlijeka. Kolona označena slovom S na slici 9 predstavlja otopinu standarda u kojoj su jasno označene molekulske mase pojedinih proteinskih frakcija koje se kreće od 17 do 315 kDa, dok kolone od 1 do 8 predstavljaju uzorke mlijeka od sirovog do steriliziranih uzoraka.



Slika 9. SDS PAGE elektroforeza sirovog mlijeka i toplinskih tretiranih uzoraka kobiljeg mlijeka (S–standard; 1 – sirovo mlijeko; 2– 63-65 °C/30 min; 3 – 63-65 °C/15 s; 4 -72 °C/20 s; 5 -85 °C/30 s; 6 – 90-95 °C/7 min; 7 – 116 °C/16 min; 8 – 120 °C/5 min)

SDS-PAGE elektroforezom detektirana su četiri glavna banda: α -laktalbumin, β -laktoglobulin, kazein i albumini krvnog seruma. Bandovi su bolje vidljivi u prvom i trećem uzorku, sirovom i uzorku tretiranom na temperaturi 63 °C/15 s , kod kojih nije došlo do osjetljivije denaturacije proteina.

Na slici 9 može se vidjeti da najslabija pruga na gelu odgovara molekulskoj masi od 17 kDa, koja se odnosi na α -laktalbumin. Međutim, ne odgovara teoretskoj molekulskoj masi α -laktalbumina koja iznosi 14 kDa. Primjena temperature od 72 °C/20 s uzrokovala je denaturaciju α -laktalbumina što je uočljivo jer je došlo do nestanka jasno ocrtanog banda. Sljedeća pruga na gelu odgovara molekulskoj masi 20 kDa što je neznatno više od teoretske molekulske mase β -laktoglobulina u kobiljem mlijeku, koja iznosi 19,5 kDa. Denaturacija β -laktoglobulina primijećena je u uzorcima 4 i 6, pri kojima su korištene temperature od 72 °C/20 s i 90 °C/7 min. Rezultati denaturacije u skladu su sa prethodnim navodima prema kojima α -laktalbumin i β -laktoglobulin kobiljeg mlijeka posjeduju veću toplinsku stabilnost, u usporedbi sa frakcijama kravljeg mlijeka, čija denaturacija već počinje na temperaturi od 60 °C. Sljedeća pruga na gelu odgovara molekulskoj masi od 29 do 38 kDa i označava kazeinu. Ovaj položaj pruge ne odgovara teoretskoj molekulskoj masi kazeina koja se kreće od 19 do 25 kDa. Iako je kazein termostabilni protein, do njegove je denaturacije

došlo već pri temperaturi od 63-65 °C/30 min. Do znatne denaturacije kazeina došlo je i u steriliziranim uzorcima mlijeka. Iz navedenog može se zaključiti da na denaturaciju kazeina značajan utjecaj osim primijenjene temperature ima i trajanje toplinskog tretmana.

Proteini kojima je detektirana najveća molekulska masa od 55 do 72 kDa su albumini krvnog seruma koji se u pasteuriziranim uzorcima nisu značajno denaturirali. Do denaturacije svih proteina došlo je u steriliziranim uzorcima mlijeka, pri čemu je osim denaturacije došlo i do međusobne agregacije, uz nastajanje kompleksa velike molekularne mase koja doseže čak 315 kDa.

4.8. REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI I UKUPNIH OTOPLJENIH TVARI MLIJEKA

U usporedbi sa kozjim mlijekom, kobilje ima znatno manju električnu vodljivost (Cais-Sokolińska, 2017), što se može povezati sa manjom koncentracijom mineralnih tvari odnosno koncentracijom ukupnih otopljenih iona koji su predstavljaju nositelje električne vodljivosti. Osim utjecaja otopljenih iona na povećanje električne vodljivosti manji utjecaj pokazuju proteini i peptidi dok na smanjenje električne vodljivost dokazano utječe povećanje udjela mliječne masti (Časek, 2010). U tablici 12 prikazani su rezultati određivanja električne vodljivost i TDS-a.

Tablica 12. Rezultati određivanja električne vodljivosti i TDS-a sirovog i toplinski obrađenog kobiljeg mlijeka

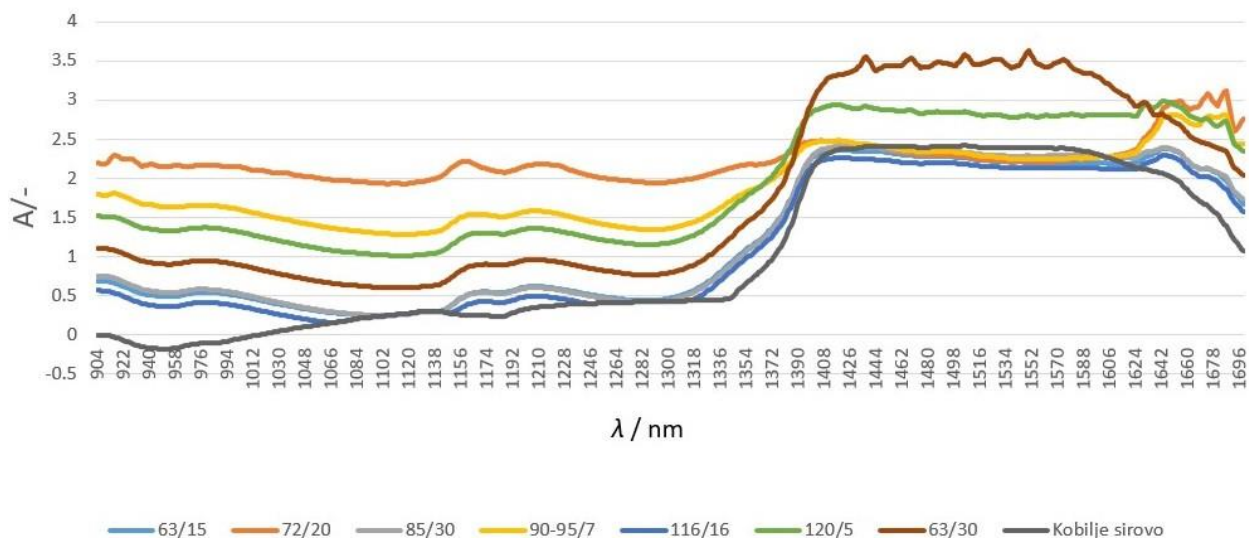
UZORAK	TDS (mg L ⁻¹)	ELEKTRIČNA VODLJIVOST (μS cm ⁻¹)
Sirovo	290,50±2,12	579,00±4,24
63 °C/15 s	239,00±12,72	476,00±25,45
63 °C/30 min	278,00±1,41	555,50±3,53
72 °C/20 s	270,00±9,89	535,00±24,04
85 °C/30 s	274,50±7,77	547,00±14,14
90 °C/7 min	280,00±2,82	556,00±4,24
116 °C/16 min	271,50±6,36	536,50±17,67
120 °C/5 min	274,50±3,53	539,50±16,26

Iz dobivenih rezultata može se zamijetiti da je primjena toplinskih tretmana u tretiranim uzorcima uzrokovala smanjenje koncentracije otopljenih tvari kao i smanjenje električne vodljivosti, u odnosu na uzorak sirovog mlijeka. Najmanja električna vodljivost i najmanja koncentracija ukupnih otopljenih tvari izmjerena je kod uzoraka koji je tretiran na temperaturi od 63 °C u trajanju od 15 sekundi dok su najveće vrijednosti zabilježene u uzorku sirovog mlijeka. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da toplinskih tretmani uzrokuju određeno smanjenje koncentracije ukupnih otopljenih tvari, te posljedično tome smanjuje se električna vodljivost uzoraka tretiranih različitim toplinskim tretmanima.

4.9. BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KOBILJEG MLIJEKA I REZULTATI ANALIZE GLAVNIH KOMPONENATA

Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija korištena je za kvalitativnu analizu strukturnih promjena na sirovom i toplinski obrađenom kobiljem mlijeku. Na temelju rezultata prikazanih na Slici 10. 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, 2011) te se mogu povezati s udjelom proteina u mlijeku (Ottavian i sur., 2012).

Dobiveni NIR spektri uzoraka sirovog kobiljeg mlijeka te uzoraka tretiranih pri različitim temperaturama (slika 10) ne pokazuju značajnu sličnost, za razliku od uzoraka kravljeg mlijeka, čiji su dobiveni NIR spektri slični (Milić, 2021). S obzirom da NIR spektri uzoraka kobiljeg mlijeka ne pokazuju značajnu sličnost, navedeno ukazuje na razlike u strukturi uzoraka. Međutim, određeno spektralno preklapanje uočeno je kod uzoraka tretiranih na temperaturi od 63 °C u trajanju od 15 s i 85 °C u trajanju od 30 s, u području valnih duljina od 1019-1410 nm. Viša vrijednost apsorbancije uočava se kod kobiljeg mlijeka tretiranog na temperaturi od 63 °C u trajanju od 30 minuta, u odnosu na ostale uzorke (slika 10), što se može povezati s denaturacijom proteina, koja je i dokazana primjenom SDS-PAGE elektroforeze. Također, raspon od 1350 do 1600 nm, za sve uzorke, značajno se razlikuje od ostalih.



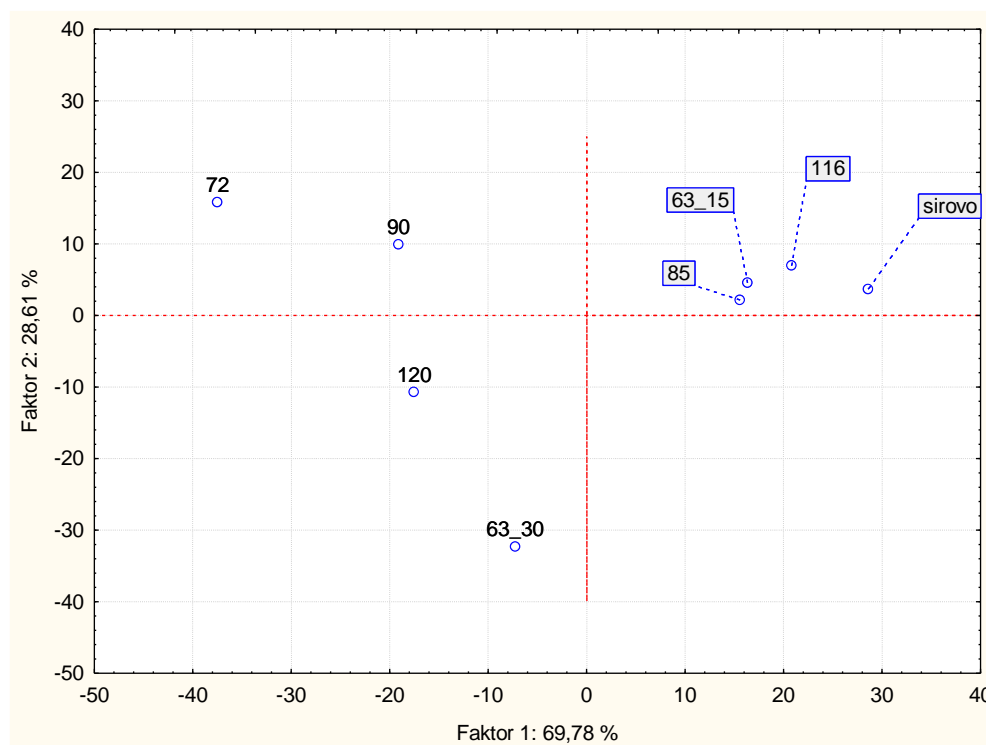
Slika 10. NIR spektri sirovog kobiljeg mlijeka te uzoraka mlijeka tretiranih različitim režimima toplinske obrade (63-65 °C/15 s; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 s; 85 °C/30s; 90-95 °C/7 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min)

Analiza glavnih komponenata (PCA) korištena je u obradi dobivenih NIR spektara s ciljem smanjenja količine podataka i prepoznavanja najbitnijih informacija iz snimljenih spektara (Abdi i Williams, 2010). Veliki broj izvornih varijabli smanjuje se na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli koje nazivamo glavnim komponentama (engl. *Principal Components, PC*). Uvođenjem glavnih komponenti smanjuje se dimenzionalnost, pri čemu glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način te na taj način pokazuje neke skrivene povezanosti, međuodnose podataka (Filipović, 2018).

Prikazani koordinatni sustav sastavljen je od vektora PC-1 i PC-2, pri čemu PC-1 predstavlja prvu glavnu komponentu kojoj pripada najveći dio varijacije uzoraka te je ona linearna kombinacija podataka koji imaju najveću varijancu (Abdi i Williams, 2010). Redom ju slijede, PC-2, PC-3 itd., od kojih svaka sljedeća obuhvaća sve manji iznos varijacija u setu podataka koji se analiziraju.

U ovom istraživanju, PCA analiza korištena je kako bi se prikazale sličnosti odnosno različitosti uzoraka kobiljeg mlijeka ovisno o primijenjenim tretmana pri različitim temperaturama. Na slici 11 vidljivo je da su se uzorci kobiljeg mlijeka tretiranog na temperaturi 63 °C/15 s, 72 °C, 85 °C, 90 °C, 116 °C grupirani su u prvom i drugom kvadrantu, dok su uzorci 63 °C/30 sekundi i 120 °C

smješteni u trećem kvadrantu. Iz slike 11 možemo zaključiti da su PCA analizom uočljiva razdvajanja ovisno o primijenjenom tretmanu te prema navedenoj blizini uzoraka možemo zaključiti da su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore. Budući da se uzorci tretirani na temperaturi od 63 °C/30 min i 120 °C/5 min smjestili u trećem kvadrantu može se pretpostaviti da je na njihovo izdvajanje imala utjecaj najveća primijenjena temperatura od 120 °C odnosno najduži primijenjen tretman u trajanju od 30 minuta. Primjenom PCA analize, ukupno se može pojasniti preko 90 % varijance u promatranom skupu podataka (69,78 % + 28,61 %).



Slika 11. Analiza glavnih komponenata NIR spektra uzorka sirovog kobiljeg mlijeka (sirovo) te uzoraka mlijeka tretiranih različitim režimima toplinske obrade u laboratorijskim uvjetima (63-65 °C/15 s; 63-65 °C/30 min; 72 °C/20 s; 85 °C/30 s; 90-95 °C/7 min; 116 °C/16 min; 120 °C/5 min)

5. ZAKLJUČCI

1. Primjena toplinskih tretmana uzrokovala je promjenu boje mlijeka, pri čemu su najvidljivije promjene boje zamjećene kod steriliziranih uzoraka mlijeka
2. Porast intenziteta toplinske obrade uzrokovao je porast koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a u uzorcima mlijeka. Osim same temperature na tvorbu HMF-a značajan učinak ima i trajanje toplinskog tretmana.
3. DPPH metodom utvrđen je pad antioksidacijske aktivnosti kod svih pasteriziranih i steriliziranih uzoraka mlijeka, što ukazuje da toplinski tretmani imaju negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost kobiljeg mlijeka.
4. Primjena toplinskih tretmana u kobiljem mlijeku povećava koncentracije ukupnih fenola kao i porast u povećanja antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Navedene promjene mogu se pripisati drugim biološki aktivnim komponentama do čijeg nastanka dolazi uslijed primjene toplinski tretmana, prije svega HMF.
5. Denaturacija proteina uzrokovana je povećanjem temperature što je vidljivo iz rezultata prikazanih SDS-PAGE elektroforezom. U steriliziranim uzorcima zabilježen je najviši stupanj denaturacije gdje je došlo i do agregacije denaturiranih proteina.
6. Toplinski tretmani uzrokuju smanjenje vrijednosti ukupnih otopljenih tvari, a i električne vodljivosti uzoraka kobiljeg mlijeka.
7. PCA analizom uočljiva su razdvajanja tretiranih uzoraka prema režimu toplinske obrade a prema navedenoj blizini uzoraka može se zaključiti da su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore.
8. S obzirom na sve dobivene rezultate, može se zaključiti kako koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a, vrijednosti indeksa boje, TDS-a, električne vodljivosti, prikaz SDS-PAGE elektroforeze, koncentracije antioksidacijske aktivnosti mogu poslužiti kao indikatori režima toplinske obrade kojim je kobilje mlijeko obrađeno.
9. Iz svih dobivenih rezultata se pokazalo da režim obrade pri 63-65 °C/15 s koji predstavlja termalizaciju uzrokuje najmanje promjene na sastavu i svojstvima kobiljeg mlijeka.

6. LITERATURA

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

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

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

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *R Soc Chem* **127**, 183–198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>

Avreljo D, Baban M, Mijić P, Antunović Z, Ernoić M, Antunović B (2009) Mogućnosti proizvodnje i korištenja kobiljeg mlijeka. *Krmiva* **51**, 343-350.

Badr E (2011) Near Infra Red Spectroscopy. U: Akyar I (ured.) *Wide Spectra of Quality Control*, IntechOpen, London, 238-248.

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

Bay BH, Lee YK, Tan BKH, Ling EA (1999) Lipid peroxidative stress and antioxidative enzymes in brain of milk-supplemented rats. *Neuroscience Letters* **277**, 127-130. [https://doi.org/10.1016/S03043940\(99\)00872-1](https://doi.org/10.1016/S03043940(99)00872-1)

Bell K, McKenzie HA, Muller V, Roger C, Shaw DC (1981) Equine whey proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology – B* **68**, 225-236. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90092-4)

Benzie IFF, Strain JJ (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. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

Berend S, Grabarić Z, (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok 59, 205-212. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-59-2008-1868>

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

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

Brezovečki A, Čagalj M, Antunac N, Mikulec N, Bendelja Ljoljić D (2014) Proizvodnja, sastav i svojstva kobiljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **64**, 217-227.

<https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2014.0401>

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

Cais-Sokolińska D, Wójtowski J, Pikul J, Lasik-Kurdyś M (2017) Analysis of metabolic activity of lactic acid bacteria and yeast in model kefir made from goat's milk and mixtures of goat's milk with mare's milk based on changes in electrical conductivity and impedance. *Mljekarstvo* **67**, 277-282. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0405>

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

Casanovas EM, Fasciglione G, Barassi CA (2015) *Azospirillum* spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Cassán F, Okon Y, Creus (ured.) Handbook for *Azospirillum*, Springer International Publishing Switzerland, Cham, str. 447-467.

Civardi G, Curadi MC, Orlandi M, Cattaneo TMP, Giangiacomo R (2007) Mare's milk: monitoring the effect of thermal treatments on whey proteins stability by SDS capillary electrophoresis (CE-SDS). *Milchwissenschaft* **62**, 32-35.

Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, Block J, Huyghebaert A, Raes K, i sur. (2014) Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* **42**, 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>

Contreras-Guzman ES, Strong FC, (1982) Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. *J Assoc Of Ana Chem* **65**, 1215–1222. <https://doi.org/10.1021/jf00114a026>

Corredig M, Dalgleish DG (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. <https://doi.org/10.1017/S0022029900031940>

Csapó-Kiss Zs, Stefler J, Martin TG, Makray S, Csapó J (1995) Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro- elements. *Int Dairy J* **5**, 403-415. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00014-G](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00014-G)

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.

Czyżak-Runowska, G, Wójtowski, J, Niewiadomska A, Markiewicz-Keszycka M (2018) Quality of fresh and stored mares milk. *Mljekarstvo* **68**, 108-115. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0204>

Časek, D (2010) Sastav, svojstva i primjena kozjeg mlijeka (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Doreau M, Martin-Rosset W (2002) Dairy-Animals/Horse. U: McSweeney PLH, McNamara JP (ured.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3 izd., Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès Champanelle, 630-637.

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

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

Filipović M (2018) Procjena pekarske kvalitete kultivara ozime pšenice primjenom kemometrijske analize glavnih komponenata (diplomski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Osijeku, 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. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000353>

Hanser S (1988) Grundlagen zur chemisch-physikalischen und hygienischen Beschaffenheit von Österreichischer Stutenmilch sowie deren Vermarktung (Diplomarbeit), Institut für Milchforschung und Bakteriologie an der Universität für Bodenkultur Wien, Wien.

Inglingstad RA, Devold TG, Eriksen EK, Holm H, Jacobsen M, Liland KH, i sur. (2010) Comparison of the digestion of casein and whey protein in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci Technol* **90**, 549-563. <https://doi.org/10.1051/dst/2010018>

Ivanković A (2004) Konjogojstvo, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.

Khan IT, Nadeem M, Imran M, i sur. (2017) Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids Health Dis* **16**, 163. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0553-z>

Küçükçetin A, Yaygın H, Hinrichs J, Kulozik U (2003) Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture. *Int Dairy J* **13**, 945-951. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00143-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00143-2)

Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC, Rangel AOSS (2006) Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *J. Agric. Food Chem* **54**, 5241-5246. <https://doi.org/10.1021/jf060324s>

Malacarne M, Martuzzi F, Summer A, Mariani P (2002) Protein and fat composition of mare's milk some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *Int Dairy J* **12**, 11, 86-87. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00120-6)

Mariani P, Summer A, Martuzzi, F, Formaggioni P, Sabbioni A, Catalano AL (2001) Physico-chemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of Halflinger nursing mare milk throughout 6 lactation months. *Anim Res* **50**, 415-425. <https://doi.org/10.1051/animres:2001140>

Martins AC, Bukman L, Vargas AMM, Barizão É, Moraes JCG, Visentainer JV, i sur. (2012) The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology, *Food Chem* **138**, 574-580. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>

Martins SIFS, Jongen WMF, van Boekel MAJS (2001) A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci Technol* **11**, 364-373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)

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

Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. *Food Chem* **130**, 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>

McGuire R G (1992) Reporting of objective colour measurements. *HortScience* **27**, 1254 - 1255. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254>

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

Morales FJ, Romero C, Jiménez-Pérez S (2000) Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *Int J Food Sci Tech* **35**, 193-200. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00334.x>

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

Ottavian M, Facco P, Barolo M, Berzaghi P, Segato S, Novelli E, i sur. (2012) Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevo cheese. *J Food Eng* **113**, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.037>

Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK (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* **50**, 3122-3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>

Özdal HR, Yıldız B, Arkun G (2018) Hydroxymethylfurfural (HMF) Formation in Milk and Dairy Products. *Int. J. Food Eng* **4**, 13-23.

Pagliarini E, Solaroli G, Peri C (1993) Chemical and physical characteristics of mare's milk. *Ital J Food Sci* **4**, 323-332

Pieszka M, Łuszczynski J, Zamachowska M, Augustyn R, Długosz B, Hędrzak M (2016) Is mare milk an appropriate food for people? - A review. *Ann Anim Sci* **16**, 33-51. <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0041>

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

Potočnik K, Gantner V, Kuterovac K, Cividini A (2011) Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo* **61**, 107-113.

Ritota M, Di Costanzo MG, Mattera M, Manzi P (2017) New Trends for the Evaluation of Heat Treatments of Milk. *J anal methods chem* **2017**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/1864832>

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

Salamon RV, Salamon S, Csapo-Kiss, Csapo J (2009) Composition of mare's colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents. *Acta Univ Sapientiae Alimentaria* **2**, 119-131.

Salimei E, Fantuz F (2013) Horse and donkey milk. U: Park YW, Haenlein GFW (ured.) Milk and dairy products in human health. Production, composition and Health, Wiley-Blackwell Publishnig, West Sussex, 111-123.

Samaržija D (2016) Korištenje mlijeka kobile i magarice u proizvodnji u rpoizvodnji fermentiranih mlijeka (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Sangsopha J, Moongngarm A, Johns NP, Grigg NP (2019) Optimization of pasteurized milk with soymilk powder and mulberry leaf tea based on melatonin, bioactive compounds and antioxidant activity using response surface methodology. *Heliyon* **5**, 11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02939>

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent . *Methods in Enzymology* **299**, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Stobiecka M, Król J, Brodziak A (2022) Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals* **12**, 245. <https://doi.org/10.3390/ani12030245>

Stojanović M (2011) Model praćenja kakvoće mlijeka primjenom NIR spektroskopije (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Uniacke-Lowe T (2011) Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems.(doktorski rad), School of Food and Nutritional Science, University College Cork, Cork.

Uniacke-Lowe T, Huppertz T, Fox PF (2010) Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *Int Dairy J* **20**, 609-629. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007>

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. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University* **27**,123-130.

Velázquez Vázquez C, Villa Rojas MG, Alvarez Ramírez C, Chávez-Servín JL, Garcia Gasca T, Ferriz-Martínez RA, i sur. (2015) Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chem* **176**, 480-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>

Yam KL, Papadakis SE (2004) A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J Food Eng* **61**, 137-142. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00195-X)

Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpinar-Bayizit A, Sahin S (2018) Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir. *J Dairy Sci* **101**, 3788-3789. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13871>

Zhao L, Chen J, Su J, Li L, Hu S, Li B, i sur. (2013) In vitro antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural. *J Agric Food Chem* **61**, 10604-11. <https://doi.org/10.1021/jf403098y>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis