

# Utjecaj toplinske obrade na mlijeko magarice

---

**Komljenović, Antea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:137845>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Antea Komljenović**

**7229/PT**

**UTJECAJ TOPLINSKE OBRADJE NA MLIJEKO MAGARICE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

**Mentor:** Doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

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

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### UTJECAJ TOPLINSKE OBRADJE NA MLIJEKO MAGARICE

*Antea Komljenović, 0058208707*

**Sažetak:** Ljekovitost mlijeka magarice poznata je još od doba starih Egipćana, a danas se sve više preporuča u prehrani osjetljivije populacije, najčešće kao zamjena za kravlje mlijeko u prehrani dojenčadi. Posebnost mlijeka čine imunoaktivni sastojci te se zbog toga ne preporuča termička obrada već svježja konzumacija neposredno nakon mužnje. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih režima toplinske obrade na proteine mlijeka te odrediti fizikalna svojstva, kemijski sastav i mikrobiološku sliku mlijeka magarice. Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti kako prilikom toplinske obrade na 65 °C tijekom 30 minuta dolazi do većinske denaturacije proteina sirutke i takav tretman se ne preporuča, dok toplinska obrada na temperaturi od 72 °C tijekom 15 sekundi nema značajnijeg utjecaja i takav tretman se može preporučiti za obradu mlijeka magarice.

**Ključne riječi:** mlijeko magarice, proteini sirutke, toplinska obrada

**Rad sadržava:** 27 stranica, 6 slika, 8 tablica, 26 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

**Pomoć pri izradi:** Doc.dr.sc. Irena Barukčić, Snježana Šimunić, teh. sur., Darjan Pipić, teh.sur.

**Datum obrane:** 18. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology of Milk and Milk Products**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### INFLUENCE OF THERMAL TREATMENT ON DONKEY MILK

*Antea Komljenović, 0058208707*

**Abstract:** The healing ability of donkey milk has been known since the time of the ancient Egyptians, and nowadays is recommended in a sensitive population diet, usually as a substitute for cow's milk in the infant diet. Donkey milk is highly valuable milk regarded to its immunoactive ingredients, which includes proteins, and therefore heat treatment is not favorable, only consumption of fresh milk immediately after milking is recommended. This paper aimed to investigate the effect of different regimes of the heat treatment on milk proteins and to determine physical properties, chemical composition, and microbiological analysis of donkey milk. Based on research results, it can be concluded that heat treatment at 65 °C for 30 minutes results in denaturation of whey proteins and such treatment is not recommended; whereas heat treatment at 72 °C for 15 seconds has no significant effect on donkey milk and that treatment can be recommended for donkey milk processing.

**Keywords:** Donkey milk, heat treatment, Whey proteins

**Thesis contains:** 27 pages, 6 figures, 8 tables, 26 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Katarina Lisak Jakopović, PhD Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Irena Barukčić, PhD Assistant Professor, Snježana Šimunić, tech. assistant, Darjan Pipić, tech. assistant

**Defence date:** September 18<sup>th</sup> 2019

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Proizvodnja mlijeka magarice.....	2
2.2. Sastav i svojstva mlijeka magarice.....	3
2.2.1. Mliječna mast .....	4
2.2.2. Proteini .....	5
2.2.3. Laktoza .....	8
2.2.4. Mineralne tvari i vitamini .....	9
2.3. Higijenska kvaliteta i zdravstvena vrijednost mlijeka magarice.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. Materijali .....	12
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Određivanje kiselosti mlijeka .....	12
3.2.2. Određivanje titracijske kiselosti mlijeka.....	12
3.2.3. Određivanje ukupnog dušika u mlijeku po Kjeldahlu .....	13
3.2.4. Određivanje udjela laktoze u mlijeku.....	14
3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u mlijeku.....	14
3.2.6. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku.....	15
3.2.7. Određivanje gustoće mlijeka .....	15
3.2.8. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku.....	15
3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje boje mlijeka .....	16
3.2.10. Određivanje veličine čestica u mlijeku laserskom difrakcijom.....	16
3.2.11. Određivanje mikrobiološke slike mlijeka magarice .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Fizikalno - kemijske analize .....	18
4.2. Mikrobiološka analiza.....	19
4.3. Utjecaj toplinske obrade na proteine .....	19
4.4. Određivanje boje.....	22
5. ZAKLJUČCI .....	24
6. LITERATURA .....	25

# 1. UVOD

Konzumacija mlijeka magarice poznata je od davnina, a mlijeko je korišteno za liječenje, njegovanje ljepote i prehranu. Vrlo je poznata Kleopatrina „mliječna kupka“ za koju se uzgajalo i muzlo 700 magarica. Osim u doba starih Egipćana, i stari Grci su poznavali sve vrijednosti mlijeka magarice pa ga je tako Hipokrat koristio u tadašnjoj medicini za liječenje raznih bolesti kao što su otrovanja i otvorene rane. U Europi u devetnaestom stoljeću mlijeko magarice se koristilo kao zamjena za majčino mlijeko u prehrani dojenčadi. Kupovinu mlijeka magarice u trgovini mogli su si priuštiti imućniji ljudi, dok su primjerice u Francuskoj gradile farme magarica pokraj prihvatilišta za nezbrinutu djecu (Ivanković i sur., 2015).

Današnja upotreba mlijeka magarice u Europi prvenstveno je vezana uz zamjenu za humano mlijeko. Kao vrijedna zamjena u prehrani dojenčadi i djece koja su alergična na kravlje mlijeko, a napredak u istraživanju potvrđuje korištenje mlijeka magarice uz mlijeko kobile u liječenju humanih bolesti povezanih s imunskim sustavom te u prevenciji arterioskleroze. Osim toga, uz humano, mlijeko magarice i kobile smatra se najlakše probavljivim. Za takvu probavljivost odgovorna je mala veličina masnih globula koja omogućava veću površinu dostupnu za djelovanje lipaze te količina neprobavljenog kazeina koja je dvostruko manja u odnosu na kravlje mlijeko. Također, bogat je izvor esencijalnih nutrijenata te ima optimalan omjer kazeina i proteina sirutke, a u prehranbenom i alergološkom značenju mlijeka magarice doprinose biološka i funkcionalna svojstva specifičnih proteina (Samaržija, 2016).

Proizvodnja mlijeka magarice uvelike se razlikuje od proizvodnje konvencionalnih vrsta mliječnih proizvoda. Brojna istraživanja kroz tehniku mužnje, uzdržavanje životinja, praćenje prinosa i sastava mlijeka magarice usko povezana sa ispašom i mikrobiologijom, donose nove primjene u inovativnom sustava uzgoja magarica (Salimei, 2016). Posebnost mlijeka magarice čine imunoaktivni sastojci te se zbog toga ne preporuča termičko obrađivanje. Mlijeko magarice najbolje je konzumirati svježe neposredno nakon mužnje, a u slučaju viškova preporuča se zamrzavanje.

Stoga je cilj ovoga rada bio odrediti utjecaj različitih režima toplinske obrade na proteine mlijeka te odrediti fizikalna svojstva, kemijski sastav te mikrobiološku sliku mlijeka magarice.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Proizvodnja mlijeka magarice

Proizvodnja mlijeka magarice poprilično se razlikuje od tradicionalne proizvodnje drugih vrsta mlijeka. Od 2004. godine ispituje se isplativost proizvodnje mlijeka magarice, a zbog velike potražnje, sve je veći broj proizvođača mlijeka magarice diljem Europe. U Italiji su pokrenute prve farme mlijeka magarice, a nakon toga su se proširile i po drugim zemljama Europe i svijeta (Salimei, 2016). Općenito proizvodnja mlijeka kopitara u Hrvatskoj je zanemariva, u mediteranskom dijelu je učestalija dok je u kontinentalnom dijelu rjeđa. Ako uspoređujemo mlijeko magarice s kobiljim mlijekom, proizvodnja mlijeka magarice je zastupljenija u Hrvatskoj. Problem u razvoju proizvodnje je tržište koje ne pokazuje toliki interes za ovom vrstom mlijeka, te posljedično tomu ne postoji sustavan otkup, prerada i prodaja (Ivanković i sur., 2015).

Tehnologija proizvodnje mlijeka magarice treba se primarno usredotočiti na redovitu i pravilnu mužnju te održavanje higijenske kvalitete mlijeka. Za sintezu i sekreciju mlijeka nužna je prisutnost puleta koje magarica percipira vidom, mirisom i sluhom, ali mladunče ne smije imati mogućnost sisanja mlijeka. Ručna mužnja traje od jedne do dvije minute tijekom koje se uočava faza u kojoj se muze mlijeko iz cisterni, zatim faza „slijepe mužnje“ i „val“ alveolarnog mlijeka koje može biti zastupljeno do 30 % (Ivanković i sur., 2015). Mužnju i skladištenje mlijeka magarice treba provoditi na temperaturi ispod 6 °C u čistim opremljenim prostorijama tako da se mlijeko zaštiti od daljnjih kontaminacija (Salimei, 2016). Zapremnina magaričina vimena iznosi oko 1,5 L i zbog toga zahtjeva čestu mužnju. Mužnja magarica odvija se svaka 2 do 3 sata, a prinos mlijeka po mužnji iznosi od 150 do 250 mL. Prosječna količina dnevnog prinosa mlijeka varira od 0,5 do 3 L, što ovisi o pasmini, hranidbi, stadiju laktacije i načina mužnje (Prvanović i sur., 2014; Matruzi i sur., 2000). Zbog svega navedenog, na manjim farmama mlijeko magarice muze se po pojedinačnim upitima, dok veće farme sirovo mlijeko magarice zamrzavaju (Salimei i Fantuz, 2013).

## 2.2. Sastav i svojstva mlijeka magarice

Mlijeko magarice je albuminsko mlijeko slatkastog okusa i rijetke konzistencije. U odnosu na kravlje mlijeko, sadrži znatan udio laktoze i manji udio proteina i mliječne masti, dok je bogato mineralnim tvarima i vitaminima (Ivanković i sur., 2015). Tablicom 1 prikazana je usporedba kemijskog sastava mlijeka magarice, kobiljeg, humanog te kravljeg mlijeka.

Tablica 1. Usporedba kemijskog sastava mlijeka magarice, kobiljeg, humanog i kravljeg mlijeka (Uniacke Lowe i sur. 2010; Potočnik i sur., 2011; Claeys i sur. 2014; Ivanković i sur., 2016)

Parametar	Mlijeko magarice	Kobilje mlijeko	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Proteini (%)	1,4 – 2,0	1,5 – 2,8	0,9 – 1,9	3,0 – 3,9
Mliječna mast (%)	0,3 – 1,8	0,5 – 2,0	2,1 – 4,0	3,3 – 5,4
Laktoza (%)	5,8 – 7,4	5,8 – 7,0	6,3 – 7,0	4,4 – 5,6
Mineralne tvari (%)	0,3 – 0,5	0,3 – 0,5	0,2 – 0,3	0,7 – 0,8
Suha tvar (%)	8,8 – 11,7	10,2	10,7 – 12,9	11,8 – 13,0
Omjer kazein:albumin	1,3:1	1,1:1	0,4:1	4,7:1
Energijska vrijednost (kJ/100 mL)	158,2	188,3	276,3	276,3

U usporedbi s mlijekom drugih životinja koje se koriste za humanu potrošnju, mlijeko magarice je najbližije humanom mlijeku pa se smatra pogodnim za prehranu male djece (Samaržija, 2016). Tablicom 1 je vidljivo da je u mlijeku magarice te u humanom mlijeku udio laktoze i proteina vrlo sličan, a udio mliječne masti znatno niži u odnosu na kravlje mlijeko (Constanzo, 2013). Gustoća mlijeka magarice u granicama je između 1029 i 1037 kg m<sup>-3</sup>, pri tome se vrijednost ustaljuje na 1032 kg m<sup>-3</sup>. Točka leđišta varira između -0,508 i -0,540 °C, pH vrijednost iznosi od 6,9 do 7,2 pH jedinica. Kravlje mlijeko sadrži veći udio kazeina i soli koji mu osiguravaju prirodnu kiselost zbog čega ima nižu pH vrijednost (Božanić i sur., 2018).



### 2.2.1. Mliječna mast

Mliječna mast je najpromjenjiviji sastojak mlijeka te utječe na ugodan okus mlijeka, aromu, teksturu i konzistenciju mliječnih proizvoda. Mliječna mast ima i najveću energetske vrijednosti te iznosi  $9 \text{ kcal g}^{-1}$ , a nalazi se u obliku globula različite veličine obavijene adsorpcijskim slojem ili membranom koja služi za stabilizaciju mliječne masti unutar mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012). Mlijeko magarice u odnosu na kravlje, humano i mlijeka drugih sisavaca siromašno je mliječnom mašću. Prosječno sadrži 1,2 % mliječne masti, a može sadržavati od 0,3 do 1,8 % što ovisi o raznim čimbenicima kao što su doba godine, pasmina i vrsta ishrane (Constanzo, 2013). Mlijeko magarice karakterizira prosječno niži udjel triacilglicerola (oko 80 %), nižu koncentraciju kolesterola ( $5,0 - 8,8 \text{ mg } 100 \text{ mg}^{-1}$  mlijeka) i viši udjel slobodnih masnih kiselina (10 % od ukupnog udjela masti) od kravljeg i humanog mlijeka (Samaržija, 2016). Globule mliječne masti mlijeka magarice vrlo su male te im je prosječna veličina  $1,92 \text{ }\mu\text{m}$ , za razliku od mlijeka drugih preživača čije su globule mliječne masti dvostruko veće. Mala veličina masnih globula omogućava veću površinu dostupnu za djelovanje lipaze i na taj način pridonosi većoj probavljivosti mlijeka magarice (Martini i sur. 2017).

Omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u mlijeku magarice iznosi 0,48 te je niži u odnosu na kobilje, ali i na ostale vrste mlijeka (Salimei i Fantuz, 2013). Mlijeko magarice sadržava manje zasićenih masnih kiselina (do 67 %) u odnosu na kravlje mlijeko, a više u usporedbi sa humanim i kobiljim mlijekom te su one dominantan sastojak globule mliječne masti. Najzastupljenije zasićene masne kiseline u mlijeku magarice su kaprilna ( $\text{C}_{8:0}$ ), kaprinska ( $\text{C}_{10:0}$ ), palmitinska ( $\text{C}_{16:0}$ ) te je u malim količinama zastupljena i miristinska ( $\text{C}_{14:0}$ ) (Doreu i Boulot, 1989), a one se u usporedbi sa dugolančanim masnim kiselinama brže razgrađuju i apsorbiraju u crijevima čovjeka i upravo je to jedan od razloga brže probavljivosti mlijeka magarice u odnosu na kravlje, koje sadržava veće količine dugolančanih zasićenih masnih kiselina (Constanzo, 2013).

Udjel mononezasićenih masti je od 15,3 do 35 %, a udjel polinezasićenih masnih kiselina je od 14,1 do 30,5 %. Mlijeko magarice bogato je polinezasićenim masnim kiselinama linolnom i linolesinskom, od toga je udjel linolne kiseline od ukupnog udjela lipida 6 – 15 %, a udjel linolenske kiseline 4 – 16 % (Ivanković i sur., 2016). Visoka nutritivna vrijednost mlijeka magarica povezana je s koncentracijama višestruko nezasićenih masnih kiselina omega 3 ( $7,4 - 9,6 \text{ g/ } 100 \text{ g}$  masnih kiselina) i omega 6 ( $10 - 13 \text{ g/ } 100 \text{ g}$  masnih kiselina), čiji su udjeli znatno veći u odnosu na druga mlijeka preživača, a njihovi uravnoteženi omjeri pridonose optimalnom iskorištenju u organizmu čovjeka (Salimei, 2011). Tablicom 2 prikazan

je profil masnih kiselina kao postotak ukupnih masnih kiselina mlijeka magarice, humanog i kravljeg mlijeka.

Tablica 2. Profil masnih kiselina (% ukupnih masnih kiselina) mlijeka magarice u usporedbi s humanim i kravljim mlijekom

Masne kiseline	Mlijeko magarice	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Zasićene	46,7 – 67,7	39,4 - 45	55,7 – 72,8
Jednostruko nezasićene	15,31 – 35,0	33,2 – 45,1	22,7 – 30,3
Višestruko nezasićene	14,17 – 30,5	8,1 – 19,1	2,4 – 6,3
Linolna (C <sub>18:2</sub> )	6 – 15,2	6,0 – 17,7	1,2 – 3,0
Linolenska	4 – 16,3	0,6 – 3,4	0,3 – 1,8
Omjer omega-6 : omega-3	0,9 – 6,1	7,4 – 8,1	2,1 – 3,7

### 2.2.2. Proteini

Prosječni ukupni sadržaj proteina u mlijeku magarice i humanom mlijeku vrlo je sličan (1,42 i 1,63 g/ 100 mL), dok je otprilike dvostruko manji u odnosu na kravlje mlijeko (3,25 g/ 100 mL) (Martini, 2017). Udjel ukupnog dušika u mlijeku magarice odnosi se na udjel dušika u pravim proteinima i neproteinskom dušiku. Kazein i proteini sirutke koji se sintetiziraju u mliječnoj žlijezdi i proteini seruma poput imunoglobulina i lizozima koji u mlijeko dopijaju iz krvi, čine prave proteine (Samaržija, 2016). Količina prisutnih proteina ovisi o broju mužnji, pasmini te je povezana s načinom hranidbe i laktacijom, količina proteina opada tijekom laktacije (Mariani i sur., 2001). Prema Constanzo (2013) mlijeko magarice izrazito je bogato proteinima u proljetnim i ljetnim mjesecima, točnije u razdoblju između ožujka i lipnja, a razlog tome je hranidba bogata proteinima koja se prvenstveno zasniva na ispaši. Mlijeko magarice sadrži 6,4 – 10,3 g L<sup>-1</sup> kazeina i 4,9 – 8,0 g L<sup>-1</sup> proteina sirutke što je u usporedbi s kravljim mlijekom znatno niže, ali odlikuje se znatno višim koncentracijama lizozima i imunoglobulina G što mu izražava antimikrobna svojstva u odnosu na kravlje mlijeko (Claeys i sur. 2014).

Udjel kazeina u ukupnim proteinima mlijeka magarice je otprilike 50 % i niži je u usporedbi s kazeinom u kravljem mlijeku čiji je udjel oko 80 %, te ga to čini pogodnim za zamjenu humanog mlijeka u prehrani dojenčadi (Guo i sur., 2007). Kazeinska micela mlijeka magarice sastoji se od četiri vrste kazeina ( $\alpha_{s1}$  -,  $\alpha_{s2}$  -,  $\alpha_{s3}$  -,  $\beta$  i  $\kappa$ - kazein), isto kao i kazeinska micela kravljeg mlijeka, ali zastupljenost pojedinačnih kazeina je različita kao što je prikazano

tablicom 3. Unutar kazeinske micela pojedinačni kazeini razlikuju se prema stupnju njihove fosforilacije i glikolizacije i upravo je po tome utvrđeno da je  $\kappa$ - kazein najviše heterogeni protein u mlijeku magarice (Samaržija, 2016). Kazein porijeklom iz kobiljeg, kravljeg, kozjeg, ovčjeg i mlijeka magarice razgrađuje se sličnim mehanizmima, ali količina neprobavljenog kazeina u kobiljem, humanom i mlijeku magarice dvostruko je manja u odnosu na kravlje i kozje mlijeko. To je još jedan od razloga zašto se mlijeko magarice dvostruko brže razgrađuje nego kravlje mlijeko (Dureau i Martin Rosset, 2011). Razlike u proporciji, strukturi i udjelu pojedinačnih kazeina i veličini kazeinske micela određuju koagulaciju kazeina induciranu toplinom ili lužinom. Kazeinske micela u mlijeku magarice manje su osjetljive na flokulaciju induciranu kiselinom od kazeinskih micela kravljeg mlijeka. Također, imaju nižu izoelektričnu točku precipitacije (pH 4,2) od kazeinskih micela kravljeg mlijeka (pH 4,6) zbog više kiselog karaktera  $\beta$  i  $\kappa$ - kazeina (Samaržija, 2016).

Tablica 3. Udjeli pojedinih frakcija kazeina u različitim vrstama mlijeka (Dureau i Martin Rosset, 2011)

Frakcija	Magarica	Kobilje	Humano	Kravlje
Ukupni kazeini (g/ 100 g)	0,76	1,10	0,48	2,60
$\alpha_{s1}$ – kazein (%)	Identificiran	17,9	32	41
$\alpha_{s2}$ – kazein (%)	Identificiran	1,4	Nije identificiran	10,8
$\beta$ – kazein (%)	Identificiran	78,5	maks. 85	33
$\kappa$ – kazein (%)	Identificiran	1,8	<15	12

Udjel proteina sirutke u ukupnim proteinima iznosi od 35 do 50 %, dok je taj udio u kravljem samo 20 % i upravo to čini jedno od najizraženijih razlika između mlijeka magarice i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2018). Količinski najzastupljeniji proteini sirutke su  $\beta$  – laktoglobulin ( $\beta$  – Lg) i  $\alpha$  - laktalbumin ( $\alpha$  - La) i svojim različitim postotnim udjelima se razlikuju od tih proteina u kravljem mlijeku. Proteine sirutke u nižoj koncentraciji čine serum albumin, imunoglobulini, lizozim, laktoferin i frakcija proteoza – peptona (Samaržija, 2016). Udjeli proteina sirutke u mlijeku magarice, humanom i kravljem mlijeku prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Količine ( $\text{g L}^{-1}$ ) pojedinih frakcija proteina sirutke u mlijeku magarica, humanom i kravljem mlijeku (Božanić i sur., 2018; Claeys i sur., 2014).

Frakcija	Mlijeko magarica	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Ukupni proteini sirutke	4,9 – 8,0	6,2 – 8,3	5,5 – 7,0
$\alpha$ - laktalbumin	1,9	1,9 – 3,4	1,2 – 1,3
$\beta$ - laktoglobulin	3,3	-	3,2 – 3,3
Imunoglobulini	1,30	0,96 – 1,3	0,5 – 1,0
Albumin krvnog seruma	0,4	0,4 – 0,5	0,3 – 0,4
Laktoferin	0,07 – 0,37	1,5 – 2,0	0,02 – 0,05
Lizozim	1,00 – 1,43	0,1 – 0,89	tragovi

Dosad je identificiran samo jedan genski tip mlijeka magarice  $\alpha$  - laktalbumina, za razliku od kobiljeg mlijeka gdje se javlja u tri genske varijante. Također, utvrđeno je da postoje dva izo oblika (A i B) koji su glikozilirani (Constanzo, 2013). Izoelektrična točka (pI)  $\alpha$  - laktalbumina mlijeka magarice iznosi 5,11 i malo je viša u odnosu na pI humanog i kravljeg  $\alpha$  - La koji se kreću oko 4,7 i 4,8. Također, s obzirom na visok stupanj homolognosti s kobiljim, smatra se da i magaričin  $\alpha$  - La ima četiri disulfidna mosta (Uniacke-Lowe i sur., 2010; Constanzo, 2013; Božanić i sur., 2018). U mlijeku magarice  $\beta$  - laktoglobulin nalazi se u obliku monomera i dosad su identificirana dva izo oblika  $\beta$  - Lg I i  $\beta$  - Lg II, dok je u kravljem mlijeku  $\beta$ - Lg prisutan u obliku dimera (Constanzo, 2013). Uz to,  $\beta$  - Lg I je dominantan i čini 80 % ukupne frakcije  $\beta$  - laktoglobulina u mlijeku magarica (Božanić i sur., 2018). Potvrđeno je da mlijeko magarice pokazuje drugačije mehanizme agregacije i denaturacije jer sadrži samo dva intramolekulska disulfidna mosta te sadrži manje sulfidrilnih skupina zbog čega ne tvori dimere (Sawyer, 2003).

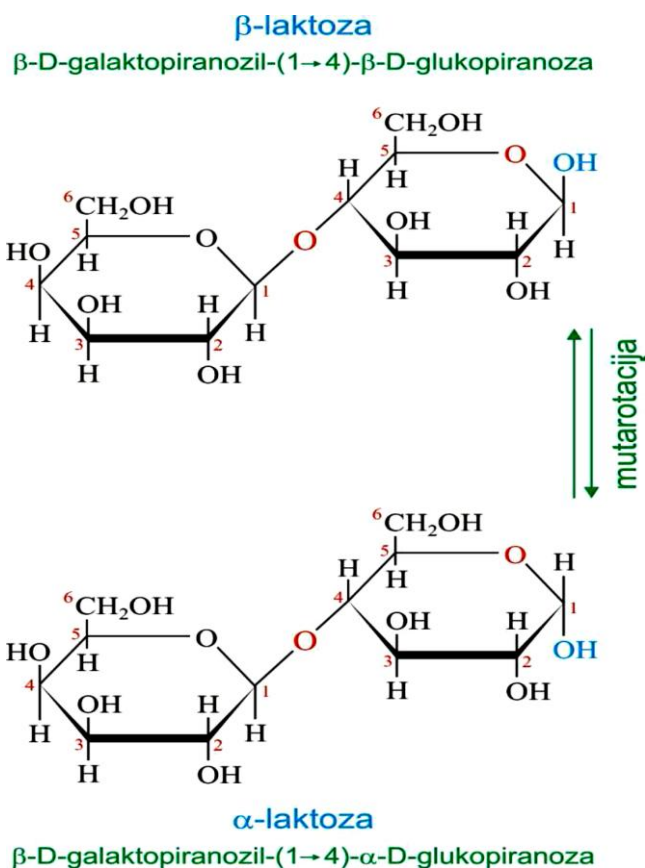
Mlijeko magarice je bogato laktoferinom i lizozimom koji čine velik udjel u ukupnim proteinima sirutke, te su oba poznata po antimikrobnom učinku (Fantuz i sur., 2001). Laktoferin u mlijeku magarice čini više od 2 % ukupne proteinske frakcije, u potpunosti se razgrađuje u probavnom traktu i ima jaku inhibicijsku aktivnost prema gram – pozitivnim i gram – negativnim bakterijama. Nedavna istraživanja potvrdila su da ima snažno djelovanje prema enterovirusu tip 5 koji je čest uzročnik infekcije humanog gastrointestinalnog sustava (Samaržija, 2016). Lizozim čini 21 % proteina sirutke (Fantuz i sur., 2001) i otporan je na djelovanje probavnih enzima (Salimej, 2016). U mlijeku magarice prisutan je u najmanje

dvije varijante (A i B), rezistentan je na kiseline i digestiju proteazama i dospijeva u crijevo u relativno intaktnom obliku (Samaržija, 2016).

Neproteinske dušične tvari (NPN) čine kreatinin, urea i aminokiseline. Najveći udjel NPN potvrđen je u humanom mlijeku i iznosi oko 20 %, a iza njega je mlijeko magarice s udjelom NPN od 15,76 % i to je znatno više nego u kravljem mlijeku (5,23 %) (Potočnik, 2011; Ivanković i sur., 2016; Božanić i sur., 2018). Urea je jedan od glavnih sastojaka frakcije NPN i udjel joj iznosi od 40 do 50 % (Salimei i sur., 2004), a važan udio NPN čine i slobodne aminokiseline (10 – 20 %) (Božanić i sur., 2018).

### 2.2.3. Laktoza

Prosječan udjel laktoze u mlijeku magarice je 7,4 %, a to je značajno više od udjela laktoze u mlijeku drugih mliječnih pasmina životinja. Sličan udjel laktoze sadržan je u humanom mlijeku (oko 7 %). Udjel laktoze je u obrnutoj korelaciji s udjelom masti i proteina (Samaržija, 2016). Laktoza je važan izvor galaktoze, ključan izvor energije i ključni strukturni element u složenim molekulama što je prvenstveno važno za rani ljudski razvoj. Također, laktoza je jedan od prehrambenih čimbenika koji potiču crijevnu apsorpciju kalcija i fosfora što je važno za mineralizaciju kostiju i prevenciju osteoporoze (Martini i sur., 2017). Laktoza potiče rast crijevne mikroflore te može djelovati kao prebiotik (Yvon i sur., 2016). Iako mlijeko magarice sadrži visok udjel laktoze, energijska vrijednost znatno je niža u usporedbi s drugim vrstama mlijeka, a to se pripisuje maloj količini mliječne masti (Salimei, 2016). Zbog visokog udjela laktoze, mlijeko magarice je slatkastog okusa, a smatra se i dobrim supstratom za uzgoj probiotičkih bakterija mliječne kiseline koje se inače nalaze u crijevima čovjeka (Coppola i sur., 2002). Slikom 1 prikazana je struktura laktoze odnosno njezin  $\alpha$  i  $\beta$  – oblik.



Slika 1. Struktura α i β – oblika laktoze (Generalić, 2018)

#### 2.2.4. Mineralne tvari i vitamini

Udjel mineralnih tvari u mlijeku magarice je 0,36 % i vrlo je sličan udjelu humanog mlijeka (0,22 %), a različit od kravljeg mlijeka (0,76 %) (Martini i sur., 2017). Mineralne tvari kalcij, fosfor i magnezij utječu na stabilnost kazeinske micelle u mlijeku. Omjer kalcija i fosfora (Ca:P) u mlijeku magarice je niži (oko 0,93) u odnosu na kravlje mlijeko (oko 1,23) i kobilje mlijeko (oko 1,72) (Samaržija, 2016). Iako mlijeko magarice sadrži manje količine mineralnih tvari u odnosu na kravlje, njihova iskoristivost u ljudskom organizmu je skoro optimalna (1,48:1) jer je bliža idealnom omjeru Ca:P od 2:1 (Ivanković i sur. 2016). Usporedba mineralnog sastava mlijeka magarice, kravljeg i humanog mlijeka prikazana je tablicom 5.

Tablica 5. Usporedba mineralnog sastava (mg/100 mL) mlijeka magarice, humanog i kravljeg mlijeka (Claeys i sur., 2014; Božanić i sur., 2018)

Mineralna tvar	Mlijeko magarice	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
Kalcij (Ca)	33 – 115	28 – 34	112 – 123
Fosfor (P)	32 – 73	14 – 43	59 – 119
Kalij (K)	24 – 75	53 – 62	106 – 163
Magnezij (Mg)	2 – 8	3 – 4	7 – 12
Natrij (Na)	10 – 27	10 – 18	58
Klor (Cl)	14 – 50	60 – 63	100 – 119
Željezo (Fe)	0,024 – 0,26	0,04 – 0,20	0,03 – 0,10

Dostupnih podataka o koncentraciji vitamina u mlijeku magarice relativno je malo. Koncentracija vitamina topljivih u mastima niža je u mlijeku magarice koje sadrži niži udjel mliječne masti u usporedbi s mlijekom kobile. Sadrži višu koncentraciju vitamina B<sub>12</sub>, ali dvostruko manju koncentraciju vitamina B<sub>3</sub> u odnosu na kobilje i humano mlijeko (Samaržija, 2016).

### 2.3. Higijenska kvaliteta i zdravstvena vrijednost mlijeka magarice

Prema EU propisima o sigurnosti sirovog mlijeka u prometu (EC 852 i 853/04) zemlje članice se moraju pridržavati tih općih i specifičnih zahtjeva definiranih nacionalnim propisima i za mlijeko magarice. Iako ne postoji određeni standard za higijensku kvalitetu mlijeka magarice, ono se u praksi smatra higijenski ispravnim ako sadrži ukupan broj bakterija između 25 000 do najviše 500 000 cfu mL<sup>-1</sup> (Samaržija, 2016). Papademas i sur. (2015) u svojem istraživanju utvrdili su nizak početni broj bakterija (3 – 4 log cfu mL<sup>-1</sup> svih aerobnih bakterija) i odsutnost patogenih bakterija (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterbacteriaceae*), kvasaca i plijesni. Broj somatskih stanica je pokazatelj kvalitete mlijeka i zdravlja vimena, a ima veliku ulogu u patogenezi mastitisa. Izmjerene srednje vrijednosti broja somatskih stanica u mlijeku istarskih magarica (3,2 log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup>) niže su u usporedbi sa srednjim vrijednostima ovčjeg (<1x10<sup>6</sup> SS mL<sup>-1</sup>), kravljeg (<400 000 SS mL<sup>-1</sup>) i kozjeg mlijeka (<1x10<sup>6</sup> SS mL<sup>-1</sup>) (Cvrtila Fleck i sur.,2016).

Mlijeko magarice izrazito je cijenjeno zbog svojeg antimikrobnog djelovanja, razlog tomu je visoka koncentracija termostabilnog lizozima ( $100 - 400 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ali i znatni udjel laktoferina i laktoperoksidaze (Coppola i sur., 2002; Salimei i Fantuz, 2012, Božanić i sur., 2018). Proteini kravljeg mlijeka uzrok su alergija u 3 % djece u dobi do tri godine (najčešće kazein i  $\beta$  – laktoglobulin), a alergija na te proteine može ostati i tijekom cijelog života. Po svojem sastavu i svojstvima, mlijeko magarice sličnije je humanom nego kravljem mlijeku (Guo i sur., 2007) te se zbog tog saznanja povećao interes za alternativnim izvorima hrane za djecu koja imaju problema s konzumacijom kravljeg mlijeka (Samaržija, 2016). Kako je već spomenuto, mlijeko magarice sadrži puno veće koncentracije nezasićenih masnih kiselina, prvenstveno esencijalne, višestruko nezasićene masne kiseline kao što su linolna i linolenska. Uloge esencijalnih masnih kiselina su izgradnja staničnih membrana, sudjelovanje u regulaciji enzimskih sustava, sudjelovanje u regulaciji metabolizma kolesterola, sudjelovanje u sintezi prostaglandina odgovornih za proizvodnju hormona, kontrakcije krvnih žila itd. Mlijeko magarice zbog svog sastava masnih kiselina, neposredno sudjeluje u prevenciji autoimunih i krvožilnih bolesti, pospješuje cirkulaciju, djeluje protuupalno i potiče oporavak kože i imunološki odgovor (Constanzo, 2013; Salimei, 2016; Božanić i sur., 2018)



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

U ovom završnom radu je korišteno svježe mlijeko magarice s lokalne farme te svježe kravlje mlijeko sa zagrebačkog mljekomata. Tijekom provedbe analiza korišteni su izoamilni alkohol, koncentrirana sumporna kiselina (90 – 91 %-tna otopina), natrijeva lužina (0,1 M otopina), 2 %-tna alkoholna otopina fenolftaleina, destilirana voda, 5 %-tna otopina kobaltovog sulfata, Luffova otopina, natrijev sulfit (0,1 M), 25 %-tna otopina sumporne kiseline te 2 %-tna otopina škroba.

### 3.2. Metode rada

#### 3.2.1. Određivanje kiselosti mlijeka

Aktivna kiselost uzoraka mlijeka određivala se potenciometrijski pH-metrom (WTW pH3110, Njemačka) (Božanić i sur., 2010). pH vrijednost je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini i mjerilo je za aktivnu kiselost svježeg mlijeka. Prije početka mjerenja, elektroda pH-metra ispere se destiliranom vodom te kalibrira. Elektroda se zatim polako uroni u čašu s mlijekom, polagano miješa te očita kad se pH vrijednost na zaslonu ustali. Nakon obavljenih mjerenja, elektroda se ispere destiliranom vodom i uroni u otopinu KCl-a te tako čuva do sljedeće upotrebe.

#### 3.2.2. Određivanje titracijske kiselosti mlijeka

Titracijska kiselost određuje se titracijom svježeg mlijeka s otopinom NaOH uz indikator fenolftalein (Božanić i sur., 2010). Prije samog postupka, potrebno je pripremiti standardnu boju koja predstavlja nijansu do koje je potrebno titrirati mlijeko natrijevom lužinom. U Erlenmeyerovu tikvicu se otpipetira 20 mL mlijeka koje je prethodno zagrijano na 20 °C te se doda 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina. Smjesa se promiješa i titrira s 0,1 M natrijevom lužinom dok se ne postigne blijedo ružičasta boja koja mora trajati 1 minutu. Kiselost mlijeka izražena u stupnjevima po Soxhlet – Henkelu (°SH) izračuna se prema izrazu:

$$^{\circ}SH = a * 2 * f$$

[1]

gdje je  $a$  broj mL 0,1 M NaOH utrošenih za titraciju uzorka, a  $f$  faktor otopine natrijeve lužine.

### 3.2.3. Određivanje ukupnog dušika u mlijeku po Kjeldahlu

Metoda se temelji na razgradnji organskih tvari sulfatnom kiselinom u prisutnosti katalizatora na visokoj temperaturi pri čemu se oslobađaju alkalni produkti, destilaciji i titraciji oslobođenog amonijaka. Izvagano je 5 g uzorka sira na analitičkoj vagi, umotano u aluminijsku foliju i prebačeno u Kjeldahlovu kivetu. Dodane su dvije tablete katalizatora i 25 mL koncentrirane  $H_2SO_4$ , te je sve lagano miješano dok se uzorak u potpunosti nije navlažio kiselinom. Tikvice su stavljene na nosač i na njih je montirana vakuum-kapa te je otvoren maksimalan protok vode. Sve zajedno je stavljeno na blok za spaljivanje, prethodno zagrijan na 400 °C. Postupak spaljivanja zbog sigurnosnih razloga provodio se u digestoru. Prvih 10 minuta spaljivanja proveden je uz maksimalan protok vode, nakon čega je protok vode smanjen. Spaljivanje se provodilo dok otopina nije postala bistra, bez promjene boje i bez ne izgorenih crnih komadića uzorka. Obično je dovoljno 40-60 minuta. Nakon toga tikvice su zajedno s nosačem maknute te ostavljene na hlađenju kroz najmanje 15-20 minuta.

U ohlađeni uzorak zatim je dodano 80 mL destilirane vode te je kiveta postavljena na svoje mjesto u sustavu za destilaciju. U Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 50 mL 4 % borne kiseline (uz indikator bromkrezol zeleno / metilno crvenilo) te je tikvica postavljena na podignuto postolje u destilacijskom sustavu tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Zatim su spuštene sigurnosna vratašca i pokrenut je destilacijski sustav, koji najprije dozira 65-70 mL 40 % NaOH u kivetu s uzorkom, a potom počinje destilacija koja traje otprilike 4 minute. Pred kraj destilacije postolje za Erlenmeyerovu tikvicu je spušteno i destilacija je nastavljena još par sekundi da se ispere cjevčica. Destilat u Erlenmeyerovoj tikvici je zelene boje što ukazuje na prisutnost amonijaka. Dobiveni destilat se titirao s 0,1 M otopinom HCl-a do promjene zelene boje u nježno ružičastu boju. U svakoj seriji ispitivanja provodila se i slijepa proba, tako da su u kivetu stavljene 2 tablete katalizatora i 25 ml koncentrirane  $H_2SO_4$ . Postupak je dalje proveden na isti način kao i za uzorak. Udio dušika izračunat je prema formuli 2

$$\%N = \frac{[(U-S) \times N \times 1,4007]}{m} \quad [2]$$

gdje je  $U$  volumen HCl-a utrošen za titraciju uzorka,  $S$  je volumen HCl-a utrošena za titraciju slijepa probe,  $N$  je molaritet kiseline (na 4 decimale) i  $m$  je masa uzorka u g.

### 3.2.4. Određivanje udjela laktoze u mlijeku

Udjel laktoze u mlijeku određivan je metodom prema Loof-Schoorlu, koja se izvodi po principu sposobnosti redukcije metala iz alkalne otopine njihove soli, reducirajućim ugljikohidratima, u koje spada i laktoza (Božanić i sur., 2010). U tikvicu s brušenim grlom otpipetira se 1 mL uzorka mlijeka. Zatim se otpipetira 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se kuha priključena na povratno hladilo 10 minuta, potom se tikvica hladi te se u smjesu otopine otpipetira 15 mL 20 %-tne otopine sumporne kiseline. Izlučeni jod titrira se sa 0,1 mol L<sup>-1</sup> Na- tiosulfatom dok boja uzorka ne prijeđe u žutu, a zatim se otpipetira 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i nastavi titracija Na-tiosulfatom sve do prijelaza u putenastu boju. Usporedno se radi slijepa proba gdje se umjesto 1 mL mlijeka doda 1 mL destilirane vode.

Primjer izračuna: slijepa proba troši: X mL 0,1 M natrijevog tiosulfata  
uzorak troši: Y ml 0,1 M natrijevog tiosulfata

$$(X-Y) \cdot f = Z \text{ mL } 0,1 \text{ M natrijevog tiosulfata} \quad [3]$$

gdje je  $X$  broj mililitra Na-tiosulfata utrošenih za slijepu probu, a  $Y$  broj mililitara Na-tiosulfata utrošenih za uzorak.

Rezultat se očitava iz tablice za izračunavanje šećera po Schoorl-Looffu.

### 3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u mlijeku

Pepeo u mlijeku je određen na način da se mlijeko upari i mineralizira na 550 °C (Božanić i sur., 2010). Mineralizacija se olakšava tako što se doda Mg-acetat, a također se vežu sastojci poput klora, fosfora i sumpora. Porculanski lončić prvo se žari u Mufovoj peći pri temperaturi

od 650 °C. U ohlađeni lončić važe se 10 mL mlijeka. U mlijeko se doda kap octene kiseline koja grušta kazein te se uzorak stavlja u sušionik na temperaturu od 105 °C dok se sasvim ne osuši. Osušeni uzorak se spaljuje na plamenu dok ne posivi. Lončić se potom stavlja na žarenje u Mufovu peć na temperaturu od 550 °C dok sadržaj ne pobijeli. Lončić se hladi u eksikatoru, važe i ponovno žari do konstantne mase te se izračuna postotak pepela u uzorku. Račun:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} * 100 = \% \text{ pepela} \quad [4]$$

### 3.2.6. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku

Metoda po Gerberu kojom se određuje mliječna mast zasniva se na kemijskom otapanju kazeina i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom (Božanić i sur., 2010). Mast se odvoji centrifugiranjem, a količina se očitava na skali butirometra. U butirometar se otpipetira 10 mL sumporne kiseline, zatim 11 mL mlijeka i na kraju 1 mL izoamilnog alkohola. Butirometar se začepi čepom i promućka, a zatim se stavi u centrifugu temperiranu na 65 °C i centrifugira 5 minuta na 2000 okretaja u minuti. Butirometar se izvadi iz centrifuge i direktno očitava količina mliječne masti u postotcima sa skale butirometra.

### 3.2.7. Određivanje gustoće mlijeka

Metoda određivanja gustoće laktodenzimetrom određuje se po načelu Arhimedovog zakona, a izvedbom metode se omogućuje direktno očitavanje rezultata (Božanić i sur., 2010). Mlijeko se nalije do vrha menzure te se nakon toga laktodenzimetar uroni u mlijeko tako da pliva u njemu. Kad se laktodenzimetar umiri, očitava se relativna težina mlijeka. Na očitavanje se ne smije čekati dulje od dvije minute da ne dođe do odjeljivanja masti.

### 3.2.8. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku

Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari temelji se na isparavanju vode iz uzorka za analizu sušenjem u sušioniku pri konstantnoj temperaturi od  $102 \pm 2$  °C do konstantne mase (Božanić i sur., 2010).

Uzorak mlijeka zagrije se na temperaturu od 20 – 25 °C te se temeljito promiješa kako bi se osigurala ravnomjerna distribucija masti u cijelom uzorku. Posudica i poklopac zagriju se u sušioniku na  $102 \pm 2$  °C, barem 30 minuta. Poklopac se stavi na posudicu i premjesti u eksikator te ostavi da se ohladi na sobnu temperaturu. 10 mL mlijeka otpipetira se u pripremljenu posudicu, zagrijava u sušioniku dva sata na temperaturi od 102 °C, stavi poklopac na posudicu i izvadi. Posudica s uzorkom se ostavi u eksikatoru da se ohladi do sobne temperature te se nakon toga izvaže. Postupak sušenja se ponavlja dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg te se zabilježi najniža masa.

Izračun udjela suhe tvari vrši se prema formuli:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} * 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [5]$$

### 3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje boje mlijeka

Određivanje boje uzorka vršilo se CM- 3500d kolorimetrom (Konica Minolta, Japan).

Određivanje boje mlijeka provedeno je uz masku otvora 30 mm, a mjerenja su provedena u SCE modu. Mlijeko je izliveno u kivetu te umetnuto u uređaj koji je potom mjerio transmitanciju u vidljivom području, te  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Prije početka mjerenja kalibriran je uređaj za masku otvora 30 mm.

### 3.2.10. Određivanje veličine čestica u mlijeku laserskom difrakcijom

Uzorci mlijeka prvo se homogeniziraju pa im se nakon toga mjeri veličina čestica laserskim sensorom Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). Uzorak se stavlja i homogenizira u disperznoj jedinici uređaja. Homogeni uzorak prolazi kroz mjernu ćeliju na koju je usmjerena laserska zraka. Čestice raspršuju svjetlost pod kutom koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Detektor optičkog sustava sastavljen je od više manjih optičkih detektora gdje svaki od njih prikuplja pod različitim kutovima odbijenu svjetlost. Rezultati su prikazani grafički kao odnos udjela čestica određene veličine u postocima i veličine čestica u  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.11. Određivanje mikrobiološke slike mlijeka magarice

Mikrobiološka analiza uzoraka provedena je primjenom direktne metode nacjepljivanja decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge i inkubacijom na prikladnim temperaturama. Ispitana je prisutnost ukupnog broja bakterija, enterobakterija, kvasaca i plijesni te koagulaza pozitivnih stafilocoka. Decimalna razrjeđenja pripremljena su tako da je 1 mL uzorka mlijeka sterilnim nastavkom mikropipete prenesen u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Dobiveno razrjeđenje u epruveti dobro je promiješano na rotacijskoj miješalici (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka). Novim sterilnim nastavkom mikropipete izuzet je 1 mL pripremljenog razrjeđenja i prenesen u slijedeću epruvetu koja sadrži 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavljao dok nije dobiven željeni broj decimalnih razrjeđenja. Pipetom je uzet 1 mL decimalnog razrjeđenja mlijeka i otpušten u Petrijevu zdjelicu. Nakon pipetiranja razrjeđenja na Petrijeve zdjelice, u svaku zdjelicu doliveno je 10-12 mL hranjivog supstrata (agara), prethodno rastopljenog u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 °C, te ohlađenog i držanog u vodenoj kupelji na temperaturu od 43-45 °C. Odmah nakon dolijevanja agara zdjelice su jednolično promiješane blagim kružnim pokretima. Petrijeve zdjelice ostavljene su nekoliko minuta na vodoravnoj površini, dok nisu krute. Zdjelice su zatim stavljene u termostat na 30 °C. Rezultati su očitani tako da su Petrijeve zdjelice stavljene na brojač s povećalom. Izabrane su one zdjelice na kojima je poraslo 30 – 300 kolonija. Po završetku je izračunat broj naraslih kolonija po mL odnosno CFU po formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nasaden volumen}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [7]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu analizirano je mlijeko magarice te uspoređeno s kravljim mlijekom. Određivana su fizikalno – kemijska svojstva mlijeka te mikrobiološka analiza mlijeka magarice i kravljeg mlijeka. Osim toga, mlijeko magarice i kravlje mlijeko je podvrgnuto različitim režimima toplinske obrade te se pratio utjecaj topline na termolabilne proteine mlijeka.

### 4.1. Fizikalno - kemijske analize

U tablici 6 prikazani su rezultati analiza mlijeka magarice i svježeg kravljeg mlijeka. Uspoređujući dobivene rezultate za gustoću, udio mliječne masti, laktozu, suhu tvar i pepeo može se ustvrditi kako analizirano mlijeko magarice i kravlje mlijeko zadovoljavaju prosječne vrijednosti dostupne u literaturi. Prema literaturi, gustoća mlijeka magarice iznosi od 1029 do 1037 kg m<sup>-3</sup>, udjel mliječne masti 0,20 do 1,82 %, udjel laktoze od 5,8 do 7,4 %, udjel suhe tvari od 8,1 do 11 %, a udjel pepela od 0,3 do 0,5 % (Božanić i sur., 2018). Iz rezultata u tablici 6 vidljivo je da su dobivene vrijednosti za mlijeko magarice u skladu s literaturom. Isto tako, ako usporedimo dobivene vrijednosti analiza kravljeg mlijeka može se reći kako mlijeko zadovoljava prosječni kemijski sastav dostupan u literaturi, a to je: gustoća 1,028-1,034 g cm<sup>-3</sup>, udio mliječne masti 3,2-5,5 %, udio laktoze 4,6-4,9 %, udio suhe tvari 11-14 % te udio pepela 0,6-0,8 % (Tratnik i Božanić, 2012). pH vrijednost analiziranog mlijeka magarice iznosi 7,66 i nalazi se nešto više od granica normalnih vrijednosti od pH 6,9 do pH 7,2 (Constanzo, 2013; Salimei i Fantuz, 2013; Ivanković i sur., 2016). pH svježeg kravljeg mlijeka iznosi 6,78 i spada u zadovoljavajuće granice kiselosti mlijeka. Kravlje mlijeko ima nižu pH vrijednost u usporedbi s mlijekom magarice jer ima i veći udjel kazeina i soli (najviše fosfatnih) koji mu osiguravaju prirodnu kiselost (Božanić i sur., 2018).

Tablica 6. Rezultati fizikalno – kemijskih analiza mlijeka magarice i kravljeg mlijeka

	pH	°SH	Proteini (%)	Gustoća (kg/m <sup>3</sup> )	Mliječna mast (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)	Suha tvar (%)
Mlijeko magarice	7,66	0,6	1,6	1,0305	0,35	5,32	0,48	7,75
Kravlje mlijeko	6,78	6,6	3,4	1,0330	4,10	4,70	0,70	12,09

## 4.2. Mikrobiološka analiza

Rezultati mikrobiološke analize mlijeka magarice prikazane su u tablici 7. Iz tablice je vidljivo kako mlijeko magarice sadrži ukupan broj poraslih kolonija  $40 \text{ CFU mL}^{-1}$ . Broj enterobakterija iznosi  $5 \text{ CFU mL}^{-1}$ , dok broj kvasaca i plijesni iznosi  $50 \text{ CFU mL}^{-1}$ . Koagulaza pozitivni stafilocoki nisu pronađeni. Dobiveni rezultati pokazuju jako dobru mikrobiološku kvalitetu mlijeka magarice te dobre higijenske uvjete prilikom mužnje i manipulacije tek pomuzenim mlijekom.

Tablica 7. Prosječne vrijednosti ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) parametara mikrobioloških analiza mlijeka magarice

Mikroorganizmi			
Ukupan broj	Kvasci i plijesni	Enterobakterije	Koagulaza pozitivni stafilocoki
40	50	5	0

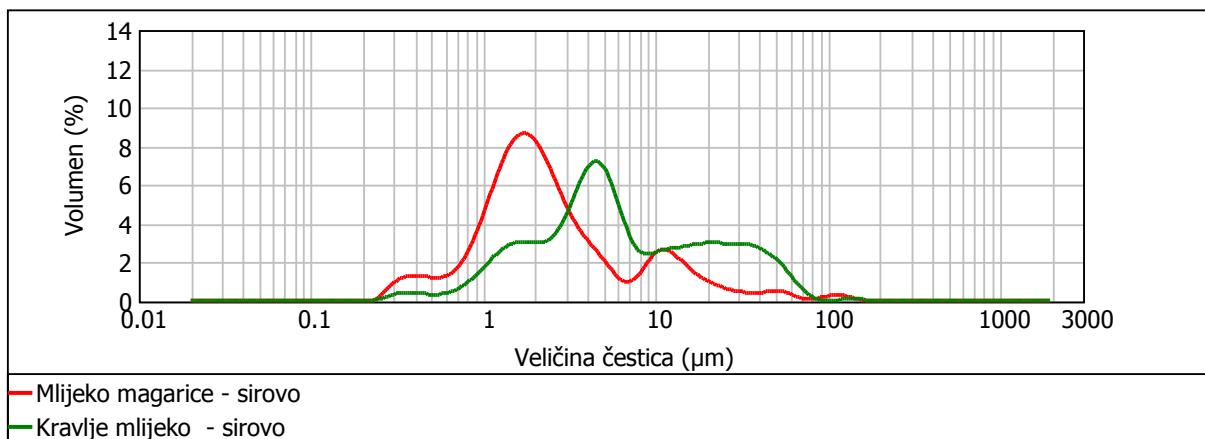
## 4.3. Utjecaj toplinske obrade na proteine

U svrhu utvrđivanja razlike veličine čestica između mlijeka magarice i kravljeg mlijeka, određena je distribucija veličina čestica. Metoda je provedena na sirovom mlijeku, termički obrađenom mlijeku pri temperaturi od  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 30 minuta (LTLT – postupak) i termički obrađenom mlijeku pri temperaturi od  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 sekundi (HTST – postupak). Prikaz svih prosječnih distribucija veličine čestica nalazi se na slikama 2, 3, 4, 5 i 6.

Slikom 2 prikazana je distribucija veličina čestica sirovog mlijeka magarice i kravljeg mlijeka. Iz grafa je vidljivo kako je najveći pik kod mlijeka magarice na oko  $1 \mu\text{m}$  što odgovara veličini čestica za proteine sirutke, odnosno  $\alpha$ -laktalbuminu i  $\beta$ -laktoglobulinu, a drugi manji pik na oko  $10 \mu\text{m}$  prikazuje kazein. Graf za sirovo kravlje mlijeko je nešto drugačiji te se može vidjeti kako je u istom volumenu zastupljeno manje proteina sirutke, a više kazeina. Ovi rezultati su u skladu s

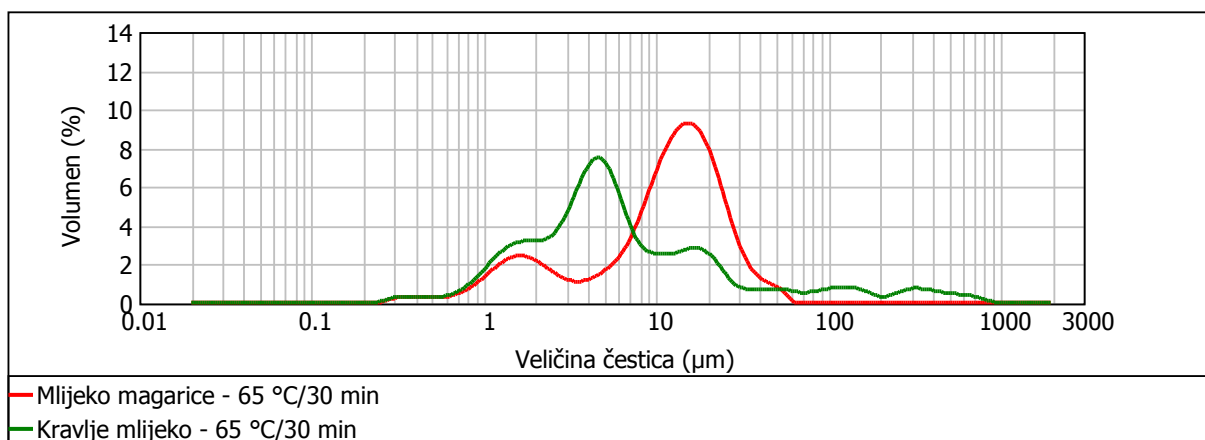


rezultatima za količine proteina u mlijeku magarice odnosno u kravljem mlijeku (tablice 3 i 4) (Božanić i sur., 2018).



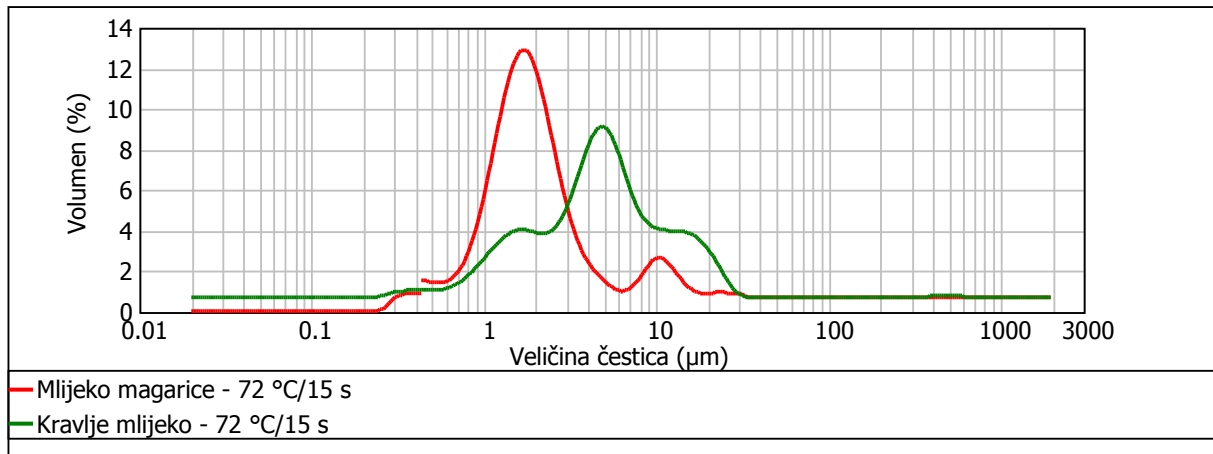
Slika 2. Distribucija veličine čestica – sirovo mlijeko magarice i kravlje mlijeko

Slikom 3 prikazani su rezultati distribucije veličine čestica mlijeka magarice i kravljeg mlijeka termički obrađenih pri temperaturi od 65 °C tijekom 30 minuta. Pri termičkoj obradi došlo je do denaturacije proteina sirutke. Denaturacijom proteini sirutke gube svoj nativni oblik, nastaju manji fragmenti, odnosno peptidi koji imaju sposobnost agregacije. Nadalje, kada je kravlje mlijeko u pitanju, temperaturni režim od 65 °C nema tolikog utjecaja na proteine sirutke kao što je to slučaj kod mlijeka magarice (slika 3).



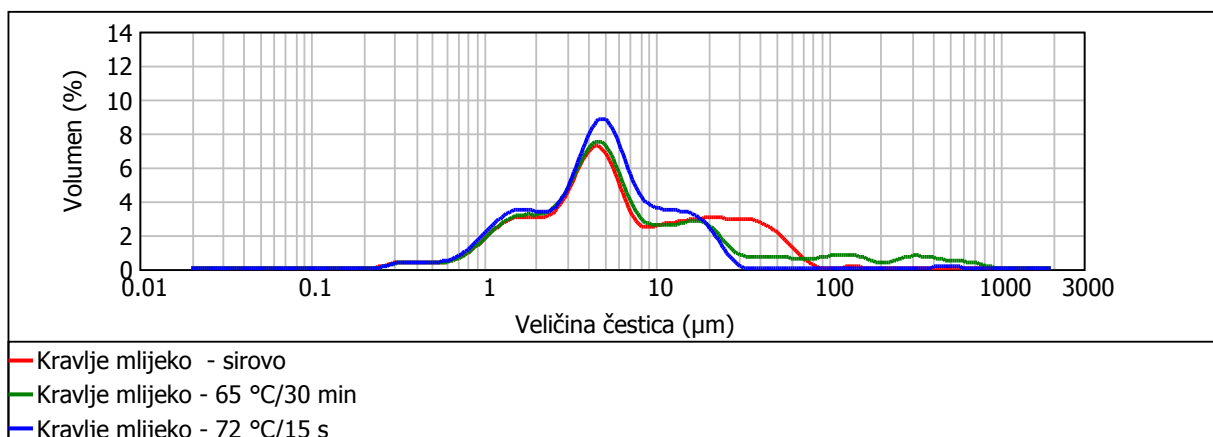
Slika 3. Distribucija veličine čestica – mlijeko magarice i kravlje mlijeko obrađeno na 65 °C/30 minuta

Slikom 4 prikazana je distribucija veličina čestica mlijeka magarice i kravljeg mlijeka termički obrađenih pri temperaturi od 72 °C tijekom 15 sekundi. Pri ovom temperaturnom režimu nije došlo do značajnije denaturacije proteina sirutke kod mlijeka magarice, a ni kod kravljeg mlijeka u usporedbi sa sirovim mlijekom (slika 3).

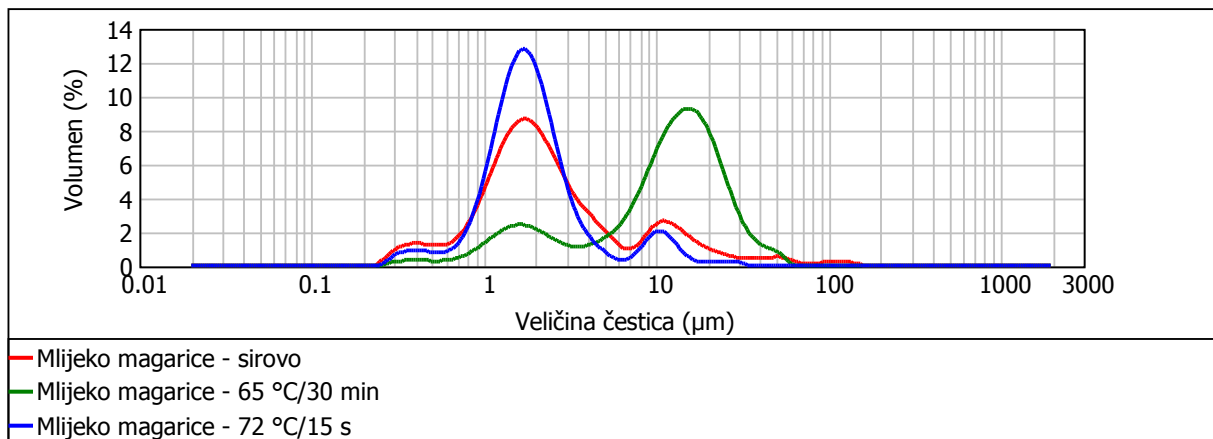


Slika 4. Distribucija veličina čestica – mlijeko magarice i kravlje mlijeko termički obrađeno pri temperaturi od 72 °C/15 sekundi

Slikom 5 prikazana je distribucija veličina čestica sirovog kravljeg mlijeka, termički obrađenog pri temperaturi od 65 °C tijekom 30 minuta i termički obrađenog pri temperaturi od 72 °C tijekom 15 sekundi. Uspoređujući pikove oko 1 μm, koji predstavljaju proteine sirutke, odnosno α-laktalbumin i β-laktoglobulin, vidljivo je kako različiti režimi toplinske obrade nisu utjecali na proteine sirutke, te nije došlo do značajne denaturacije i agregacije.



Na slici 6 prikazana je distribucija veličina čestica sirovog mlijeka magarice, termički obrađenog pri temperaturi od 65 °C tijekom 30 minuta i termički obrađenog pri temperaturi od 72 °C tijekom 15 sekundi. Ako se usporede pikovi koji predstavljaju proteine sirutke (oko 1 μm), može se vidjeti kako pri termičkoj obradi od 65 °C tijekom 30 minuta dolazi do značajne denaturacije proteina sirutke. Denaturirani proteini sirutke agregiraju u veće čestice, a maksimum je na veličini od oko 10 μm. Pri termičkoj obradi od 72 °C tijekom 15 s ne dolazi do značajnije denaturacije proteina sirutke mlijeka magarice te se može reći da je ta temperatura pogodna za toplinsku obradu.



Slika 6. Distribucija veličina čestica – sirovo mlijeko magarice, termički obrađeno na 65 °C/30 minuta i termički obrađeno na 72 °C/15 sekundi

#### 4.4. Određivanje boje

Tablicom 8 su prikazane  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti boje sirovog i toplinski obrađenog mlijeka magarice te kravljeg mlijeka. Vrijednosti  $L^*$  predstavlja svjetlinu uzorka ( $L^*= 100$ , potpuno bijelo). Parametar  $a^*$  označava raspon boja, ako je  $a^*$  vrijednost negativna prevladava zelena boja, a ako je vrijednost pozitivna u uzorku prevladava crvena boja. Isto tako, parametar  $b^*$  označava raspon boja, ako je vrijednost negativna u uzorku prevladava plava boja, dok ako je vrijednost pozitivna u uzorku prevladava žuta boja.

Tablica 8. Prikaz L, a i b vrijednosti boje sirovog i toplinski obrađenog mlijeka magarice i kravljeg mlijeka.

		Mlijeko magarice	Kravlje mlijeko
<b>L*</b>	sirovo	42,97	21,5
	65°C/30 min	41,73	22,3
	72°C/15 s	36,97	22,93
<b>a*</b>	sirovo	0,55	5,83
	65°C/30 min	0,36	5,72
	72°C/15 s	0,31	5,43
<b>b*</b>	sirovo	9,38	34,88
	65°C/30 min	8,7	36,32
	72°C/15 s	11	37,13

Rezultati kolorimetrijske analize boje mlijeka magarice i kravljeg mlijeka pokazuju značajne razlike između ta dva mlijeka. Parametar L\* koji pokazuje svjetlinu uzorka je kod mlijeka magarice gotovo za 50% veći u odnosu na kravlje mlijeko te se može reći da je mlijeko magarice bjelje u odnosu na kravlje mlijeko jer što je L\* bliža 100 to je uzorak bjelji (tablica 8). Toplinskom obradom mlijeka magarice L\* vrijednost pada, a raste u slučaju toplinske obrade kravljeg mlijeka. Parametar boje a\* mlijeka magarice koji pokazuje raspon crvene nijanse kada je u plusu značajno se razlikuje u odnosu na kravlje mlijeko. Toplinskom obradom za obje vrste mlijeka a\* vrijednost pada. Parametar boje b\* mlijeka magarice se također značajno razlikuje u odnosu na kravlje mlijeko, a on predstavlja žutu nijansu kada je u plusu. Toplinskom obradom parametar b\* u obje vrste mlijeka raste. S obzirom na dobivene rezultate, može se reći da je mlijeko magarice značajno bjelje u odnosu na kravlje mlijeko, a to se poklapa s dostupnom literaturom (Božanić i sur., 2018).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Mlijeko magarice sadrži manju količinu proteina, mliječne masti i mineralnih tvari, a veću količinu laktoze u odnosu na kravlje mlijeko.
2. Mlijeko magarice ima nižu pH vrijednost od kravljeg mlijeka, a razlog tome je što kravlje mlijeko ima veći udio kazeina i soli koji mu osiguravaju prirodnu kiselost.
3. Mikrobiološka analiza mlijeka magarice je pokazala dobru higijenu prilikom mužnje i rukovanja mlijekom jer su sve vrijednosti bile ispod graničnih vrijednosti.
4. Sirovo mlijeko magarice sadrži veću količinu proteina sirutke, a manju količinu kazeina u odnosu na sirovo kravlje mlijeko.
5. Prilikom toplinske obrade mlijeka magarice na 65 °C tijekom 30 minuta dolazi do većinske denaturacije proteina sirutke i njihove aglomeracije te se taj tretman ne preporuča za mlijeko magarice.
6. Prilikom toplinske obrade na temperaturi od 72 °C tijekom 15 sekundi nije došlo do značajnije denaturacije proteina sirutke mlijeka magarice te se taj temperaturni režim može preporučiti za obradu mlijeka.

## 6. LITERATURA

- Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.
- Božanić R., Lisak Jakopović K., Barukčić I. (2018) Vrste mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, str. 78 – 92.
- Claeys W.L., Verraes C., Cardoen S., De Block J., Huyghebaert A., Raes K., Dewettinck K., Herman L. (2014) Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* **42**: 188 – 201.
- Constanzo, A. (2013) Characterization of donkey milk proteins by a proteomic approach. – A dissertation. University of Naples Federico II, Napulj.
- Coppola R., Salimei E., Succi M., Sorrentino E., Nannni M., Ranieri P. (2002) Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology* **52**: 55 – 60.
- Dureau M., Martin-Rosett W. (2011) Animals that produce dairy foods: Horse. Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol 1, Fuqay, J.W., Fox, P.F. & McSweeny, P.L.H., ur., Oxford, Velika Britanija. str. 365 – 373.
- Fantuz F., Vincenzetti S., Polidori P., Vita A., Polidori F., Salimei E. (2001): Study on the protein fractions of donkey milk. Proceedings of the ASPA Congress – Recent Progress in Animal Production Science, str. 635 – 637.
- Generalić E. (2017) "Laktoza." Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar, <<https://glossary.periodni.com>> Pristupljeno 1. rujna 2019.
- Guo H.Y., Pang K., Zhang X.Y., Zhao L., Chen S.W., Dong M.L., Ren F.Z. (2007) Composition, Physiochemical properties, nitrose fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science* **90**: 1635 – 1643.
- Ivanković A., Potočnik K., Baban M., Ramljak J. (2015) Mlijeko kopitara, tehnologija proizvodnje i plasmana. Sveučilište u Osijeku Poljoprivredni fakultet, Osijek. str. 45 – 53.
- Ivanković A., Potočnik K., Ramljak J., Baban M., Anutnac N. (2016) Mlijeko kobilica i magarica. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.

Mariani P., Summer A., Martuzzi F., Formaggioni P., Sabbioni A., Catalano A.L. (2001) Physicochemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of Halfinger nursing mare milk throughout 6 lactation months. *Animal Research* **50**: 415 – 425.

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

Martruzzi F., Tirelli A., Summer A., Catalano A.L., Mariani P. (2000) Ripartizione delle sieroproteine nel latte dei primi due mesi di lattazione in giumente Sella Italiano. *Rivista di Ippatria e Ippologia* **6**: 21-27.

Papademas P., Parmaxi I., Aspri M. (2015) Probiotic, Antimicrobial, Antioxidant and Sensory Properties of Fermented donkey milk with *Lactobacillus fermentum* ME-3 and *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356). *BAOJ Microbiology* **1**: 4 – 12.

Potočnik K. (2011) Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo* **61**: 107 – 113.

Prvanović Babić N., Bačić G., Efendić M., Mačević N., Karadjole T., Brkljača Bottegaro, N., Getz I., Samardžija M., Folnožić I., Vince S., Seletković M., Šlogar K., Dobranić T. (2014) Najčešći reproduktivni poremećaji u istarskih magaraca. Zbornik radova. Harapin I., ur., Zagreb. Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu. str. 199-207.

Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G. (2004) Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Research* **53**: 67 – 78.

Salimei E. (2011) Donkey U: Animals that Produce Dairy Foods, Encyclopedia of Dairy Sciences. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., ur., Academic Press – Elsevier, Oxford, Velika Britanija. str. 365 – 373.

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

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

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

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

Sawyer L. (2003)  $\beta$  – Lactoglobulin. U: Advanced Dairy Chemistry, 3. izd., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., ur., Springer, New York, SAD, str. 319 – 386.

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

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



Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

## Izjava o izvornosti

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

Antea Komljenović

ime i prezime studenta