

Praćenje kvalitete kobiljeg mlijeka tijekom skladištenja u zamrznutom obliku

Miletić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:720793>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



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

Ivan Miletić

0058215696

**PRAĆENJE KVALITETE KOBILJEG MLIJEKA
TIJEKOM SKLADIŠTENJA U ZAMRZNUTOM
OBLIKU**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

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

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Praćenje kvalitete kobiljeg mlijeka tijekom skladištenja u zamrznutom obliku

Ivan Miletić, 0058215696

Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je odrediti kako skladištenje u zamrznutom obliku, u vremenskom periodu od 6 mjeseci, utječe na kvalitetu kobiljeg mlijeka; prije svega na fizikalno kemijska svojstva kao što su pH vrijednost, TDS i električna vodljivost, distribucija veličine čestica i strukturne promjene sastojaka te promjene u antioksidacijskoj aktivnosti (FRAP, DPPH) i sadržaju ukupnih fenola. Istraživanje je provedeno na uzorku svježeg kobiljeg mlijeka te na uzorcima skladištenim u zamrznutom stanju na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ svaki mjesec kroz 6 mjeseci skladištenja. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako skladištenjem u zamrznutom stanju dolazi do određenih promjena u kvaliteti kobiljeg mlijeka koje uključuju povišenje pH vrijednosti, električne vodljivosti i TDS vrijednosti, denaturaciju određenog dijela proteina zabilježenu NIR spektroskopijom i SDS-PAGE analizom te promjene u veličini čestica. Isto tako, zabilježen je pad antioksidacijskog potencijala provođenjem FRAP i DPPH metoda te smanjenje udjela ukupnih fenola u kobiljem mlijeku.

Ključne riječi: kobilje mlijeko, kvaliteta, skladištenje, zamrznuto mlijeko, antioksidativna aktivnost

Rad sadrži: 34 stranica, 18 slika, 4 tablica, 38 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Milk and Dairy Products Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Monitoring the quality of mare's milk during storage in frozen form

Ivan Miletić, 0058215696

Abstract:

The aim of this study was to determine how storage in the frozen state, for a period of 6 months, affects the quality of mare's milk; primarily on physicochemical properties such as pH, TDS and electrical conductivity, particle size distribution and structural changes of ingredients, and changes in antioxidant activity (FRAP, DPPH) and total phenol content. The research was conducted on a sample of fresh mare's milk and on samples stored in a frozen state at -18 °C every month for 6 months of storage. Based on the obtained results, it can be concluded that freezing storage causes certain changes in mare's milk quality, including increase in pH, electrical conductivity and TDS values, denaturation of protein recorded by NIR spectroscopy and changes in particle size. Also, a decrease in the antioxidant potential was recorded by implementing FRAP and DPPH methods and a decrease of total phenols in mare's milk.

Keywords: mare milk, quality, storage, frozen milk, antioxidant activity

Thesis contains: 34 pages, 18 figures, 4 tables, 38 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Irena Barukčić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: June 29, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. SASTAV I FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA KOBILJEG MLIJEKA.....	2
2.1. PROTEINI.....	3
2.2. MLIJEČNA MAST.....	5
2.3. LAKTOZA.....	6
2.4. MINERALNE TVARI.....	6
2.5. VITAMINI.....	7
3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST.....	7
4. ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST KOBILJEG MLIJEKA.....	8
5. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
5.1. MATERIJALI.....	9
5.2. METODE RADA.....	10
5.2.1. Određivanje pH vrijednosti.....	11
5.2.2. Određivanje ukupne otopljene tvati (TDS) i električne vodljivosti.....	11
5.2.3. Određivanje distribucije veličine čestica.....	12
5.2.4. Određivanje strukturnih promjena NIR spektroskopijom.....	12
5.2.5. Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza proteina (SDS-PAGE).....	12
5.2.6. Priprema uzorka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te udjela ukupnih fenola Folin Cioceltau reagensom.....	14
5.2.6.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	14
5.2.6.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	16
5.2.6.3. Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Cioceltau.....	17
6. REZULTATI I RASPRAVA	19
6.1. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI.....	19
6.2. ODREĐIVANJE UKUPNE OTOPLJENE TVARI (TDS) I EL. VODLJIVOSTI.....	20
6.3. ODREĐIVANJE DISTRIBUCIJE VELIČINE ČESTICA.....	22
6.4. ODREĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA NIR SPEKTROSKOPIJOM.....	23
6.5. SDS-PAGE ELEKTROFOREZA.....	25
6.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA DPPH METODOM.....	27
6.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA FRAP METODOM.....	27
6.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA S REAGENSOM PO FOLIN CIOCALETEAU...	29
7. ZAKLJUČCI.....	30
8. LITERATURA	31

1. UVOD

Mlijeko je biološka tekućina koja nastaje kao produkt lučenja mliječnih žlijezda složenih sisavaca u određenom vremenskom periodu nakon poroda. Mlijeko je složenog sastava, karakterističnog okusa i mirisa, bijele do žućkasto bijele boje, vrlo bogate nutritivne vrijednosti. Osim složenog sastava mlijeka, u koji ulaze proteini, masti, laktoza te mnogi vitamini i mineralne tvari, mlijeko odlikuje i visoko iskorištenje tih nutrijenata te odlična probavljivost. Stoga se mlijeko s nutritivnog aspekta smatra jednim od najvrjednijih prehrambenih sirovina koje pridonosi očuvanju čovjekova zdravlja i ulazi u kategoriju funkcionalne hrane (Božanić i sur. 2018). Kada se promatra proizvodnja i konzumacija mlijeka u Republici Hrvatskoj, kao i u cijeloj Europi, uvelike prednjači kravlje mlijeko dok su ostale vrste mlijeka, kao što je kobilje, u manjini. Do prije nekoliko godina, na policama hrvatskih trgovina teško se je moglo pronaći kobilje mlijeko ili njegovi proizvodi dok su u Aziji oni iznimno popularni od davnina. Novija istraživanja upućuju na to da se kobilje mlijeko koristilo na području današnjeg Kazahstana čak 3500 godina pr. Krista (Outram i sur. 2009). Poznato je i da su carevi kineske dinastije Ming nazivali kobilje mlijeko „božanskim nektarom“ zbog njegovih ljekovitih svojstava. Također, do polovice 20. stoljeća na području tadašnjeg SSSR-a osnovano je oko 50 lječilišta koja su u terapijske svrhe koristila kobilje mlijeko. Stoga se i dan danas na području Rusije i Mongolije nalaze mnoge farme konja sa svrhom proizvodnje kobiljeg mlijeka (Brezovečki i sur. 2014). U posljednja dva desetljeća povećanjem popularnosti funkcionalne hrane, porasla je i potražnja, kao i proizvodnja, za kobiljem mlijekom. Stoga se danas i u Europi mogu pronaći specijalizirane farme za uzgoj mliječnih kobila u zemljama kao što su Njemačka, Francuska, Mađarska i Belgija. Sama proizvodnja kobiljeg mlijeka je sezonska i proteže se kroz proljeće i ljeto te period laktacije obično traje između pet i osam mjeseci (Božanić i sur. 2018). Iz tog razloga svježe kobilje mlijeko nije dostupno kroz cijelu godinu, već se ono skladišti - najčešće u zamrznutom stanju. Uzevši u obzir sve veću popularnost i prisutnost kobiljeg mlijeka u hrvatskim trgovinama, cilj ovog završnog rada je prikazati promjene na kvaliteti kobiljeg mlijeka u vidu fizikalno kemijskih svojstava i antioksidativne aktivnosti mlijeka skladištenog u zamrznutom obliku kroz šest mjeseci skladištenja.

2. SASTAV I FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA KOBILJEG MLIJEKA

Sastav i svojstva kobiljeg mlijeka karakterizira visoki udio vode te omjer pojedinih sastojaka suhe tvari koji varira ovisno o faktorima kao što su stupanj laktacije, vrsta i način prehrane te dob kobile (Pieszka i sur., 2016; Pecka i sur., 2012.). Kao što se može vidjeti u Tablici 1., kobilje mlijeko je svojim sastavom vrlo slično majčinom mlijeku gdje se u oba slučaja ističe visoki udio laktoze te je iz tog razloga vrlo pogodno za prehranu novorođenčadi i djece. Usporedno s mlijekom ostalih preživača, kobilje mlijeko ima manji udio mliječne masti te ga omjer kazeina i proteina sirutke svrstava u albuminska mlijeka (Malacarne i sur., 2002).

Tablica 1. Kemijski sastav kobiljeg, majčinog i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2018; Kostić, 2015).

Parametar	Kobilje mlijeko	Majčino mlijeko	Kravlje mlijeko
Suha tvar (%)	10,95	11,80	12,40
Proteini (%)	2,15	1,30	3,45
Proteini sirutke (%)	38,79	53,52	17,54
Kazein (%)	50,00	26,06	77,23
NPN (%)	11,21	20,42	5,23
Mast (%)	1,25	3,75	4,35
Triacilgliceroli (%)	81,10	98,00	97,00
Fosfolipidi (%)	5,00	1,30	1,50
Slobodne masne kiseline	9,40	u tragovima	u tragovima
Laktoza (%)	6,40	6,65	4,65
Mineralne tvari (%)	4,00	2,50	7,50
Energijska vrijednost (Kj L ⁻¹)	1883	2843	2763

Kao posljedica prisutnosti pigmenta β -karotena, kobilje mlijeko je žućkasto bijele boje (Alatrović, 2017). Prosječna pH vrijednost iznosi 7,2 (Božanić i sur., 2018) dok točka leđišta iznosi $-0,532$ °C (Sekulić, 2018) najviše oviseći o udjelu mineralnih tvari i laktoze. Gustoća kobiljeg mlijeka ($1028-1035$ kg m⁻³) slična je gustoći kravljeg mlijeka ($1027-1033$ kg m⁻³) (Uniacke-Lowe, 2011).

Tablica 2. Fizikalna svojstva kobiljeg, majčinog i kravljeg mlijeka (Kostić, 2015).

Fizikalno svojstvo	Kobilje mlijeko	Majčino mlijeko	Kravlje mlijeko
pH (25 °C)	7,2	6,8	6,6
Točka leđišta (°C)	-0,540	-	-0,531



Slika 1. Svježe kobilje mlijeko (Anonymous 1, 2020).

2.1. PROTEINI

S obzirom na proteinski sastav, kobilje mlijeko je vrlo slično majčinom mlijeku te se oba zbog visokog udjela proteina sirutke ubrajaju u tzv. albuminska mlijeka. Također sadrži i visok udio proteina mliječnog seruma te je zbog toga bogat izvor esencijalnih aminokiselina i odličan izvor hranjivih sastojaka u prehrani ljudi (Malacarne i sur., 2002). Kobilje mlijeko sadrži sve osnovne frakcije proteina sirutke; α -laktalbumin (α -La), β -laktoglobulin (β -Lg), imunoglobulini (Ig), albumini krvnog seruma, laktoferin (LF) i lizozim (Lyz) (Malacarne i sur., 2002). Sve frakcije proteina su prisutne i u majčinom mlijeku izuzev β -laktoglobulina, dok kravlje mlijeko također sadržava sve navedene frakcije, ali u različitim udjelima. Tako kobilje mlijeko sadrži više lizozima, laktoferina, β -laktoglobulina i imunoglobulina od kravljeg. β -laktoglobulin je najveća frakcija proteina sirutke u kobiljem mlijeku (Tablica 3.) te se smatra odgovornim za alergijske reakcije na proteine mlijeka. Ta činjenica stvara poprilične probleme u industriji proizvodnje mliječnih formula i prehrane za dojenčad na bazi kravljeg mlijeka (Potočnik, 2010; Pieszka i sur. 2016). Kobilje mlijeko moglo bi se pokazati kao odlična alternativa kao izvor β -laktoglobulina s obzirom da su Inglingstaad i suradnici (2012) ustvrdili da se β -laktoglobulin porijeklom iz kobiljeg mlijeka učinkovitije i lakše razgrađuje

djelovanjem enzima probave, u odnosu na iste frakcije iz drugih vrsta mlijeka. Frakcija α -laktalbumin kobiljeg mlijeka sadrži 123 aminokiseline čime je strukturno sličan α -laktalbuminu iz kravljeg i majčinog mlijeka (Brezovečki i sur., 2014), te se nalazi u tri genetska oblika: A, B i C, koji se razlikuju u nekoliko pojedinačnih aminokiselina. Proteini sirutke su termolabilni, no β -Lg α -La su otporniji na visoke temperature, u usporedbi s β -Lg i α -La kravljeg mlijeka. Ta otpornost prema visokim temperaturama se može povezati s monomernim oblikom i odsutnošću slobodnih sulfhidrilnih (SH) skupina (Claeys i sur., 2014). Lizozim predstavlja glavnu antimikrobnu komponentu kobiljeg mlijeka zbog snažnog antivirusnog djelovanja koji posjeduje jer tvori netopljive komplekse s virusima inaktivirajući virusne toksine (Uniacke-Lowe, 2011; Potočnik, 2011). Stoga je glavna uloga lizozima i laktoferina borba protiv infekcija kod dojenčadi tijekom dojenja kao i zaštita mliječne žlijezde. Kao prirodna obrana od infekcija, u kobiljem mlijeku se također nalaze i tri vrste imunoglobulina - imunoglobulin A (IgA), G (IgG) i M (IgM). U kobiljem i kravljem mlijeku kao i kolostrumu prevladava IgG, dok u majčinom mlijeku i kolostrumu prevladava IgA (Brezovečki i sur., 2014).

Tablica 3. Udjeli (%) pojedinih frakcija proteina sirutke u kobiljem, humanom i kravljem mlijeku (Pieszka i sur., 2016).

Frakcija (% od ukupnih proteina sirutke)	Kobilje mlijeko	Humano mlijeko	Kravlje mlijeko
α -laktalbumin	28,55	42,37	53,59
β -laktoglobulin	30,75	-	20,10
Imunoglobulini	19,77	18,15	11,73
Albumin krvnog seruma	4,45	7,56	6,20
Laktoferin	9,89	30,26	8,38
Lizozim	6,59	1,66	tragovi

Kazein kobiljeg mlijeka je spužvaste teksture, građen u obliku micela te je nešto veće prosječne veličine ($d = 225$ nm) u odnosu na većinu ostalih vrsta mlijeka. Kobilje mlijeko sadrži manji udio kazeina, nego kravlje mlijeko, no veći udio u usporedbi s humanim mlijekom (Tablica 1.). Kazein iz kobiljeg mlijeka je sastavljen uglavnom od jednakih količina α_s -kazeina i β -kazeina, ali je dokazana i prisutnost frakcija κ -kazeina i γ -kazeina (Malacarne i sur., 2002; Potočnik,

2011; Pieszka i sur., 2016). Različiti sastav proteina i različita struktura micela kazeina odražavaju razlike u reološkim svojstvima gruš dobivenog od različitih vrsta mlijeka. Uspoređujući kazein kravljeg mlijeka, kazein kobiljeg mlijeka ima u svome sastavu manje prolina i glutaminske kiseline, a više asparaginske kiseline. Frakcije β -kazeina i κ -kazeina karakteriziraju izraženija kiselost svojstva što utječe na nižu izoelektričnu točku (pH=4,2) kobiljeg mlijeka u usporedbi s kravljim mlijekom (pH=4,6), a to za posljedicu ima slabiju podložnost koagulacije odnosno slabiju sposobnost stvaranja pahulja gruš djelovanjem kiseline. Također, kobilje mlijeko je otpornije i na toplinsku koagulaciju zbog manje koncentracije kazeina i veće toplinske stabilnosti β -laktoglobulina (Uniacke-Lowe i sur., 2010). Zbog tih karakteristika preradom kobiljeg mlijeka se dobiva mekši i manje kompaktan gruš koji je vrlo probavljiv. Naime, kobilje se mlijeko u probavnom traktu čovjeka razgradi unutar dva sata, dok se probava kravljeg mlijeka odvija unutar tri do pet sati (Malacarne i sur., 2002; Pieszka i sur., 2016).

U sastavu kobiljeg mlijeka nalaze se i neproteinske dušične tvari (NPN), odnosno spojevi s dušikom koji se ne ubrajaju u proteine kao što su urea, amonijak, mokraćna kiselina, kreatinin i slobodne aminokiseline. Udio NPN u kobiljem mlijeku oduzima 10-16 % ukupnog dušika, slično kao i kod majčinog mlijeka. Količinski gledano, najzastupljenija je urea (40 – 50 % NPN) te se u kobiljem mlijeku pronalazi u koncentracijama od 20 do 30 mg na 100g uzorka, dok su sa nutritivnog stajališta najvrjedniji sastojak NPN frakcije slobodne masne kiseline koje se brže apsorbiraju u čovjekov organizam od onih u sastavu proteina. Udio tih slobodnih aminokiselina u NPN kod kobiljeg mlijeka iznosi 10-20 %, odnosno $1960 \mu\text{mol L}^{-1}$ što je čak tri puta veća vrijednost od one kod kravljeg mlijeka (Ivanković i sur., 2016; Uniacke-Lowe i sur., 2010). Vrijedi naglasiti kako kobilje mlijeko sadrži aminokiselinu taurin koju također sadrži i humano mlijeko te je esencijalna za dojenčad, dok je u sastavu kravljeg mlijeka nema (Uniacke-Lowe, 2011).

2.2. MLIJEČNA MAST

Udio mliječne masti kod kobiljeg mlijeka u prosjeku iznosi 1,2 % no ovisno o različitim čimbenicima, može se kretati od 0 do 7,9 % (Park i sur., 2006; Salomon i sur., 2009). Mliječna mast, odnosno lipidi, se u kobiljem mlijeku nalazi u formi masnih globula promjera 2-3 μm , što su nešto manje globule od onih kod majčinog (3-5 μm) i kravljeg mlijeka (3-4 μm). Sama struktura masne globule sastoji se od jezgre ispunjene triacilglicerolima i membrane sa tri sloja: unutarnji proteinski omotač, središnja fosfolipidna membrana te vanjski sloj bogat

glikoproteinima velike molekulske mase. Glikoproteini imaju oblik dugačkih niti koje se nalaze na površini globula mliječne masti te omogućuju njihovo prijanjanje na epitelne stanice crijeva i vezanje enzima lipaza što uvelike pridonosi probavi kobiljeg mlijeka. Glikoproteini se pod utjecajem topline razgrađuju, dok disocijiraju prilikom hladnog skladištenja (Božanić i sur., 2018). Profil mliječne masti kobiljeg mlijeka sastoji se od 80-85 % triacilglicerola, 5-10 % slobodnih masnih kiselina te oko 10 % sterola i fosfolipida. Uspoređujući mliječnu mast kobiljeg, humanog i kravljeg mlijeka, uočavamo kako humano i kravlje mlijeko sadrže više triacilglicerola, čak 97-98 %, dok kobilje mlijeko sadrži više fosfolipida (oko 5 %) i slobodnih masnih kiselina (oko 9 %) (Brezovečki i sur. 2014). Fosfolipidi kobiljeg mlijeka bogatiji su fosfatidilserinom i fosfatidiletanolaminom te sadrže manje sfingomijelina, fosfatidilkolina i fosfatidilinozitola (Malacarne i sur., 2002).

2.3. LAKTOZA

Laktoza ili mliječni šećer je disaharid koji je u kobiljem mlijeku najzastupljeniji od svih ugljikohidrata. Udio laktoze u kobiljem mlijeku je prilično visok te iznosi 6-7 % čime je vrlo sličan udjelu laktoze majčinog mlijeka dok kravlje mlijeko sadrži niži udio (Božanić i sur., 2018; Kostić, 2015). Taj visoki udio laktoze je konstantan i ne podliježe promjenama te daje kobiljem mlijeku slatkast okus i čini ga vrlo probavljivim. Laktoza također pomaže i u apsorpciji kalcija što je vrlo bitno kod mineralizacije kostiju, pogotovo kod novorođenčadi i djece u razvoju. Procesom fermentacije laktoza se prevodi u mliječnu kiselinu, etanol i ugljikov dioksid, a dobiveni mliječni proizvod postaje prihvatljiv izvor hrane za ljude koji su netolerantni na laktozu (Čagalj i Brezovečki, 2013).

2.4. MINERALNE TVARI

Udio mineralnih tvari u kobiljem mlijeku iznosi 0,3-0,5 % što je znatno manje u odnosu na kravlje mlijeko. S obzirom da je kolostrum u početku jedina hrana ždrijebeta koja mu osigurava dovoljno mineralnih tvari za rast i razvoj (Kostić, 2015), upravo se u kolostrumu pronalazi najveći udio mineralnih tvari od oko 0,51 %, dok tijekom vremena, odnosno laktacije, ta vrijednost opada na oko 0,37 % (Božanić i sur., 2018). U kobiljem su mlijeku količinski najzastupljeniji kalcij, fosfor, kalij i magnezij u obliku fosfata, karbonata, klorida i citrata (Claeys i sur., 2014). Također, i u mineralnom sastavu kobiljeg mlijeka očituje se njegova zdravstvena vrijednost s obzirom da kalcij i fosfor sudjeluju u izgradnji kostiju kao i sveopćem rastu i razvoju organizma. Sami omjer kalcija i fosfora u kobiljem mlijeku iznosi 1,5-1,6:1 dok

taj omjer u kravljem mlijeku iznosi 1,2:1 što čini kobilje mlijeko povoljnije s obzirom na aspekt resorpcije kalcija, iako su koncentracije tih mineralnih tvari u kravljem mlijeku veće (Božanić i sur., 2018). Kostić (2015) navodi kako se zbog nižeg udjela natrija, kobilje mlijeko preporuča bolesnicima krvožilnog sustava i onima s višim krvnim tlakom.

2.5. VITAMINI

Sadržaj vitamina je vrlo promjenjiv u sastavu svih vrsta mlijeka te ovisi o nizu faktora kao što su zdravstveno stanje, stadij laktacije, prehrana, godišnje doba i slično (Božanić i sur., 2018). Kobilje mlijeko sadrži vitamine topljive u vodi kao što su A, D, E i K, te vitamine topljive u masti kao što su B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂ i folnu kiselinu. Kobilje mlijeko u svome sastavu sadrži manje vitamina od mlijeka preživača gdje je jedina iznimka vitamin C koji se može pronaći u količinama čak i do tri puta većim od onih u mlijeku preživača (Claeys i sur., 2014).

3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Antioksidansi su kemijski spojevi koji mogu spriječiti ili usporiti oštećenja stanica tj., svaki spoj koji može donirati elektrone i neutralizirati na taj način slobodne radikale ima antioksidativna svojstva. Antioksidansi se mogu podijeliti na one koji reagiraju s lipidnim radikalom tvoreći stabilni produkt (fenoli, minerali, flavonoidi, vitamini) te na one koji mijenjaju funkciju slobodnog radikala čime dolazi do zaustavljanja lančane reakcije (propil galat). Vrijedi istaknuti i podjelu na enzimске i neenzimске antioksidanse, od kojih su mnogi dobiveni iz hrane, gdje su najpoznatiji predstavnici polifenoli. Što više antioksidansa sadrži neka namirnica u svome sastavu, ima veći antioksidativni kapacitet.

Promatrajući sastav kobiljeg mlijeka, uočavamo mnoge spojeve s dokazanim antioksidacijskim svojstvima. Neki od njih su svakako proteini sirutke, kazein, β-karoten, vitamini A, E i C, laktoferin, α-tokoferol, selen, cink te aminokiseline sa sumporom u svome sastavu (Usta i Yilmaz, 2013). Kao glavni protein mlijeka, kazein djeluje kao antioksidans i inhibira autooksidaciju lipida kataliziranu lipooksigenazom jer sadrži svoje frakcije (α₁-, α₂-, β- i κ-kazein) koje su bogate fosfatima. Kobilje mlijeko bogato je proteinima sirutke, a uočeno je kako proteini sirutke inaktiviraju oksidaciju lipida (Tong i sur., 2001) te kako svojim djelovanjem povećaju razinu glutation peroksidaze koji je zapravo još jedan antioksidans u mlijeku. Laktoferin karakterizira mogućnost vezanja prooksidacijskog iona željeza čime se smanjuje pretvorba vodikovog peroksida u hidroksilni radikal (Khan i sur., 2019). U

vitaminskom sastavu kobiljeg mlijeka ističe se velika količina vitamina C koji je topljivu vodi i koji neutralizira superoksidne radikale, okside željeza i dušika te inhibira razgradnju vitamina B2. Vitamini koji su topljivi u mastima (A i E) štite polinezasićene masne kiseline, gdje vitamin E također suprimira aktivnost proteolitičkog enzima – plazmina. Jedan od najjačih antioksidansa topljivih u mastima je α -tokoferol koji je prisutan u membrani masnih globula i ima preventivnu ulogu u nastanku slobodnih radikala. β -karoten sprječava fotooksidaciju vitamina B2 tako da apsorbira svjetlost umjesto vitamina, dok cink i selen izazivaju supresiju superoksidnog radikala.

S obzirom da antioksidativna aktivnost kobiljeg mlijeka ovisi o njegovom sastavu, posljedično ovisi o nizu faktora koji utječu na sam sastav mlijeka. Tako veliku ulogu ima način ishrane životinje. Kod mlijeka životinja koje su se hranile slobodnom ispašom zabilježena je veća koncentracija fenolnih spojeva za razliku od slučaja kada su životinje bile zatvorene i hranjene koncentratima. Razlog je u tome što svježem bilju nalazimo više bioaktivnih tvari koje pozitivno utječu na sastav mlijeka. Na ishranu, odnosno koncentraciju fenolnih spojeva u stočnoj hrani utječu godišnja doba kao i klimatski uvjeti. U sušnijim razdobljima povećava se koncentracija fenolnih spojeva u mlijeku jer dolazi do abiotičkog stresa kod biljaka čime se povećava proizvodnja sekundarnih metabolita, kojima pripadaju i fenolni spojevi (Chávez-Servín i sur., 2018).

4. ZDRAVSTVENA VRIJEDNOST KOBILJEG MLIJEKA

Kao što je već na više mjesta istaknuto u ovome radu, kobilje mlijeko odlikuje visoka zdravstvena vrijednost. Ono sadrži nisku razinu kolesterola kao i nizak udio mliječne masti dok je udio višestruko nezasićenih masnih kiselina izuzetno visok (28 %), te služe i za sintetiziranje omega-6 i omega-3 masnih kiselina. Povoljan omjer kazeina i proteina sirutke pridonosi vrlo dobroj probavljivosti kobiljeg mlijeka te zbog većeg udjela proteina sirutke nego kod kravljeg mlijeka, kobilje se mlijeko smatra boljim izvorom esencijalnih aminokiselina (Brezovečki i sur. 2014). Istraživanje provedeno od strane Businco i sur. (2000) ustvrdilo je kako 96 % ispitanika koji su patili od alergijskih reakcija na kravlje mlijeko, nisu pokazivali alergijske reakcije na kobilje mlijeko. Visoki udio laktoze pridonosi mineralizaciji i izgradnji kostiju jer potpomaže apsorpciju kalcija i drugih mineralnih tvari tako da izaziva blago kiselu reakciju u crijevima. Ukoliko se redovito konzumira, ono ublažava ili čak uklanja probleme uzrokovane alergijama, kožnim bolestima, bolestima dišnog i probavnog sustava. Ima povoljan učinak na

zdravlje ljudi oboljelih od anemije, upale bubrega, dijareje i drugih gastrointestinalnih poremećaja, kao i na ljude s kroničnim bolestima poput hepatitisa, čira na želucu, anemije i nefritisa. Smatra se kako je povoljan učinak u liječenju čireva rezultat visokog sadržaja vitamina A i fosfolipida (Brezovečki i sur., 2014). Kobilje se mlijeko od davnina koristilo u kozmetici te i dan danas pronalazi veliku ulogu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Nalazi se u mnogim kremama, sapunima i losionima te se koristi za njegovanje problematične kože s ekcemima, crvenila, svrbeži, a posjeduje i hidratizirajući učinak te sprečava starenje kože (Božanić i sur., 2018). U farmaceutskoj industriji kobilje mlijeko se najčešće koristi u svrhu preventivne terapije, a najčešće se dobiva u obliku dehidriranog kobiljeg mlijeka koje se može proizvesti u formi emulzija ili kapsula (Ivanković, 2004).

5. EKSPERIMENTALNI DIO

5.1. MATERIJALI

Kao sirovina u provođenju fizikalno-kemijskih analiza korišteno je kobilje mlijeko donirano od strane OPG Zoran Rebić (Veliko Trojstvo, Hrvatska). Mlijeko je razdijeljeno u plastične Falcon kivete volumena 50 mL, zamrznuto i čuvano pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju 6 mjeseci. Od laboratorijskog pribora, za izradu eksperimentalnog dijela ovog rada, korištene su odmjerne tikvice, menzure, staklene i falcon kivete s poklopcima, laboratorijske čaše, pipete i propipete, kivete, plastične lađice, metalne žličice, butirometar, boca špricaljka, staničevina te zaštitne rukavice.

Kemikalije:

Za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom:

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

Za određivanje antioksidacijskog potencijala FRAP metodom:

1. 10 mmol TPTZ – (2,4,6-tripiridil-s-triazin, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljen u 40 mmol HCl (B) (KEFO, Hrvatska)
2. 20 mmol željezo (III)-klorid heksahidrat, $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (C) (Lach-Ner, Hrvatska)
3. 0,3 M acetatni pufer (A) (Gram-Mol, Hrvatska)

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

Za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteau:

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

Za provođenje SDS-PAGE elektroforeze:

1. akrilamid (Sigma, SAD)
2. amonij-persulfat (Kemika, Hrvatska)
3. bromfenol plavo (Sigma, SAD)
4. coomassie Brilliant Blue (Sigma, SAD)
5. glicerol (Alkaloid, Makedonija)
6. glicin (Gram-Mol, Hrvatska)
7. izopropanol, (Kemika, Hrvatska)
8. kloridna kiselina (Kemika, Hrvatska)
9. kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, EDTA), (Kemika, Hrvatska)
10. natrijev dodecilsulfat (SDS), (Sigma, SAD)
11. octena kiselina (Carlo Erba, Italija)
12. standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor molekulske mase 4,6-315 kDa (Lonza, SAD)
13. TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen), (Sigma, SAD)
14. Tris (hidroksimetil)-aminometan (Carlo Erba, Italija)
15. β -merkaptoetanol (Sigma, SAD)

5.2. METODE RADA

Fizikalno-kemijske metode, kao i metode određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka, provedene su na uzorku svježeg kobiljeg mlijeka, te jednom svakog mjeseca u periodu od šest mjeseci skladištenja u zamrznutom stanju.

5.2.1. Određivanje pH vrijednosti

Za određivanje pH vrijednosti bio je potreban pH-metar (pH3110, WTW, Weilheim, Njemačka) i laboratorijska čaša. Prvi korak ovog postupka je kalibriranje elektrode pH-metra prema uputama proizvođača nakon čega se, prije samog mjerenja, ta elektroda ispere destiliranom vodom i suši korištenjem staničevine. Potom se elektroda uranja u čašu s uzorkom kobiljeg mlijeka i očita se dobivena pH vrijednost.

5.2.2. Određivanje ukupne otopljene tvari (TDS) i električne vodljivosti

TDS vrijednost, odnosno udio otopljenih čvrstih tvari i električna vodljivost određivani su pomoću konduktometra (TDS/Conductivity/°C meter with RS-232 CON 200 series, Oacton, Singapur). Postupak mjerenja sastoji se od uranjanja sonde u svježe pripremljeni uzorak i očitavanja vrijednosti na konduktometru. Nakon očitavanja, elektroda se ispere destiliranom vodom te posuši staničevinom. Električna vodljivost izražava se u $\mu\text{S cm}^{-1}$, dok se TDS izražava kao mg otopljenih tvari po litri uzorka. Svaki uzorak mjerio se u dvije paralele. Rezultati su obrađeni u programu Excel (Windows 10).

Postupak:

Uzorak se pripremi na način da se 1 mL kobiljeg mlijeka razrijedi s 9 mL destilirane vode. Nakon toga se u uzorak kvantitativno prenese u laboratorijsku čašu te se u njega uroni sonda konduktometra i očitaju rezultati.



Slika 2. Uzorci za određivanje TDS vrijednosti i električne vodljivosti – vlastita slika.

5.2.3. Određivanje distribucije veličine čestica

Distribucija veličine čestica određivana je pomoću Zetasizer UltraNano ZS (Malvern Malvern Panalytical Ltd, United Kingdom) uređaja, a podaci su obrađeni programom Zetasizer Ultra-Pro ZS Xplorer. Ovo je optička metoda te se princip rada uređaja za određivanje raspodjele veličine čestica bazira na odstupanju laserske zrake prilikom prolaska kroz vodenu suspenziju čestica uzorka. Određivanje distribucije veličine čestica provedeno je na osnovu intenziteta pojave čestica određene veličine u danom uzorku kobiljeg mlijeka te je iskazan u postocima. Uzorak se pripremi na način da se 1 mL kobiljeg mlijeka razrijedi s 9 mL destilirane vode.

5.2.4. Određivanje strukturnih promjena NIR spektroskopijom

U prehrambenoj industriji se *Near-infrared* (NIR) spektroskopija koristi za kontrolu kvalitete i sigurnosti hrane te se rutinski primjenjuje u analizi sastava te funkcionalnoj i senzorskoj analizi sastojaka hrane, međuprodukata proizvodnje i gotovih proizvoda. Ova metoda se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u području od 780 nm do 2500 nm pri čemu se pojavljuju vrpce viših tonova i kombinacijske vrpce među kojima su najistaknutije C-H, O-H, S-H i N-H veze, odnosno veze s vodikom koje pokazuju veliku neusklađenost i visoke frekvencije vibracija (Ozaki i sur., 2007). NIR spektroskopija je vrlo brza metoda, točna, jednostavna, ne zahtjeva posebnu pripremu uzoraka i ne oštećuje uzorak te se može provoditi i *on-line*.

NIR spektri svih pripremljenih uzoraka kobiljeg mlijeka snimljeni su u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm na NIR spektrometru Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m s instaliranim Control Development softverom SPEC 32.

Postupak:

Uzorak se pripremi na način da se 1 mL kobiljeg mlijeka razrijedi s 9 mL destilirane vode. Potom se u uzorak uroni sonda koja je sastavni dio NIR spektrometra te program bilježi apsorpcijski spektar uzoraka.

5.2.5. Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza proteina

Separacijska tehnika poliakrilamid gel elektroforeza ima značajnu ulogu u istraživanju mliječnih proteina. Jednostavna je i relativno kratkog vremena izvođenja te se elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE) često koristi za dokazivanje patvorenja mlijeka. Također, SDS-PAGE elektroforeza koristi se i kod određivanja

stupnja denaturacije proteinskih frakcija prisutnih u mlijeku, do koje dolazi prilikom obrade mlijeka na različitim temperaturama.

Priprema kemikalija i reagensa za analizu

U 15 μ L uzorka kobiljeg mlijeka doda se 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 se prokuhaju 2,5 min, a u međuvremenu se izvadi češljic iz prethodno pripremljenog 10 %-tnog poliakrilamidnog gela te se pripremi aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu se ulije 400 mL pufera za elektroforezu (1x). Nakon kuhanja, pomoću Hamilton igle 20 μ L uzorka se nanese na 10 %-tni poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provodi se u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 190 V tijekom 45 minuta. Korišten je standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Po završetku elektroforeze, gel se inkubira u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) tijekom 2 sata, a potom 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'-terametiletildiamin)	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'-terametiletildiamin)	5 μ L
10 % APS (amonijev persulfat)	22,5 μ L

Nakon što se doda TEMED u smjesu, gel za razdvajanje se izlije u kalup između dva stakalca, doda se izopropanol da se gel jednoliko rasporedi i ostavi da se polimerizira tijekom otprilike 45 minuta.

Nakon što se izopropanol ukloni pomoću filter papira, u kalup se doda gel za sabijanje, u koji se odmah uroni češljic za stvaranje jažica gela te se ostavi 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

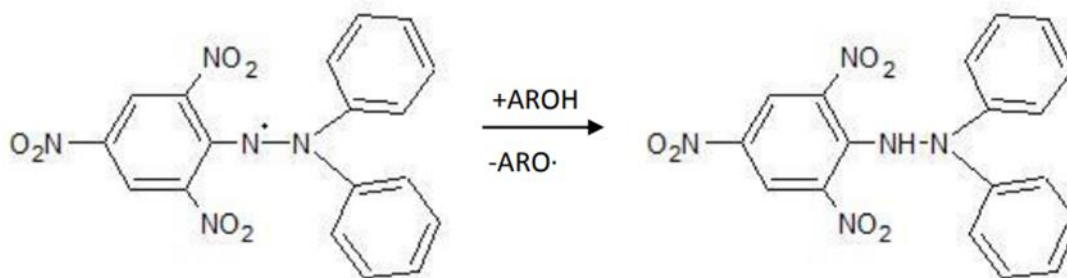
te nadopunjeno do 100 mL destiliranom vodom.

5.2.6. Priprema uzorka mlijeka za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te udjela ukupnih fenola Folin Ciocaltau reagensom

Prije provođenja protokola za određivanje antioksidacijske aktivnosti i udjela ukupnih fenola uzorci kobiljeg mlijeka pripremljeni su na odgovarajući način, kako su prethodno opisali Alyaqoubi i sur. (2014). U 1 g mlijeka dodano je 10 mL 1N HCl-a pripremljenog u 95 %-tnom etanolu (v/v, 15/85) u falcon epruveti nakon čega slijedi inkubacija u vodnoj kupelji (WNE 14, Memmert, Njemačka) na 30°C/1h uz uključenu tresilicu. Potom se smjesa centrifugira (ROTINA 380 R, Hettich zentrifugen, Njemačka) na 7800 g 15 min / 5°C te se nakon centrifugiranja supernatant pipetiranjem odvoji od nastalog taloga. Dobiveni supernatant moguće je čuvati u zamrzivaču na -20°C do daljnje upotrebe.

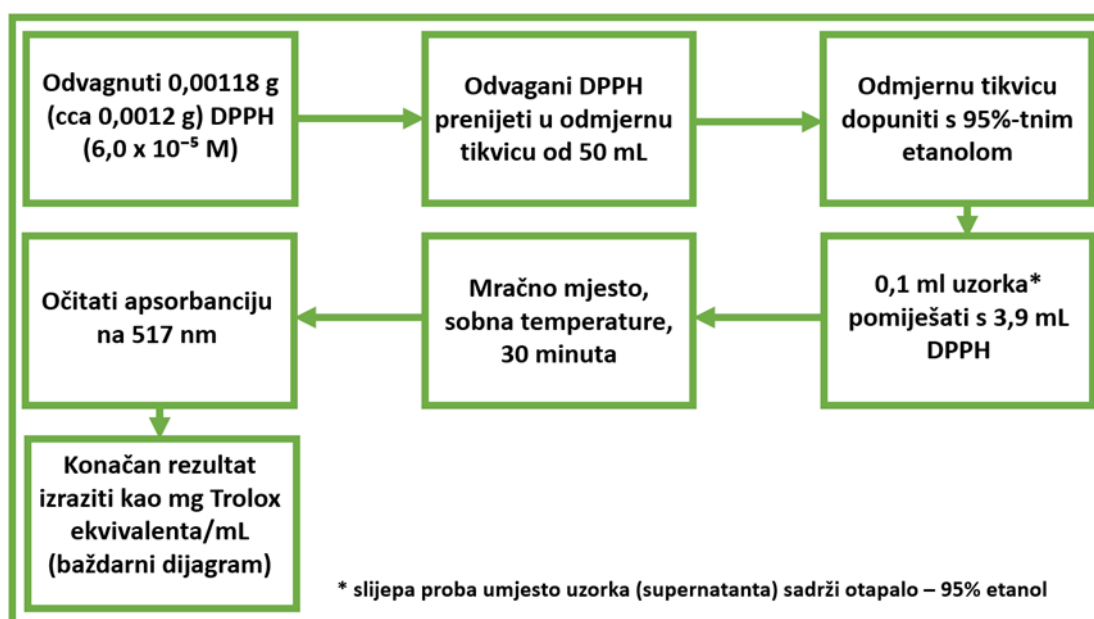
5.2.6.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Ova metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na sposobnosti uklanjanja radikala antioksidansom DPPH koji donira jedan vodik dušiku s jednim nesparenim elektrom odgovarajućeg hidrazina. DPPH ne dimerizira kao ostali slobodni radikali već je stabilan radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule. Upravo ta delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 520 nm u otopini etanola. Prednost ove metode je da DPPH reagira s antioksidansom u cjelini, a dovoljno dugi vremenski period omogućuje da DPPH reagira sporo i kod slabijih antioksidansa. Ova metoda je široko primjenjiva te se može koristiti za ispitivanje lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa, kao i vodenim i organskim otapalima. Metoda se provodi na sobnoj temperaturi da se izbjegne razgradnja antioksidansa (Pregiban, 2017).



Slika 3. Primjer reakcije DPPH radikala i antioksidansa ArOH prikazan strukturnim formulama (Izvor: Pregiban, 2017)

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom proveden je prema protokolu skupine autora Sangsopha i sur. (2019), a prikazan je shemom na Slici 4. Apsorbancija je određena na spektrofotometru VWR UV-1600PC Spectrophotometer. Analiza se provodila jednom mjesečno kroz period od 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju.



Slika 4. Shema provođenja DPPH metode (Izvor: vlastita slika).

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

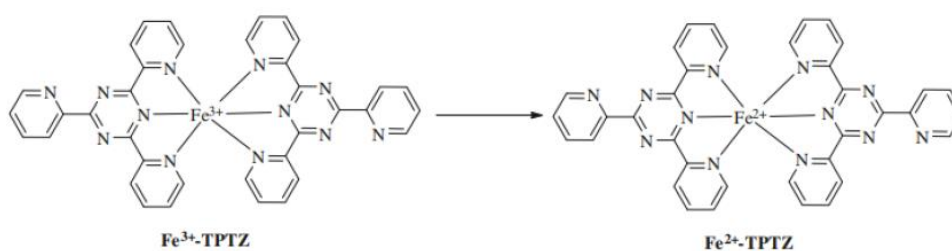
$$\% \text{ DPPH redukcije radikala} = (A_o - A_s)/A_o \times 100 \quad [1]$$

...gdje su A_o – A (517 nm) za slijepu probu (95 % etanol)

A_s – A (517 nm) za uzorak (Sangsopha i sur., 2019).

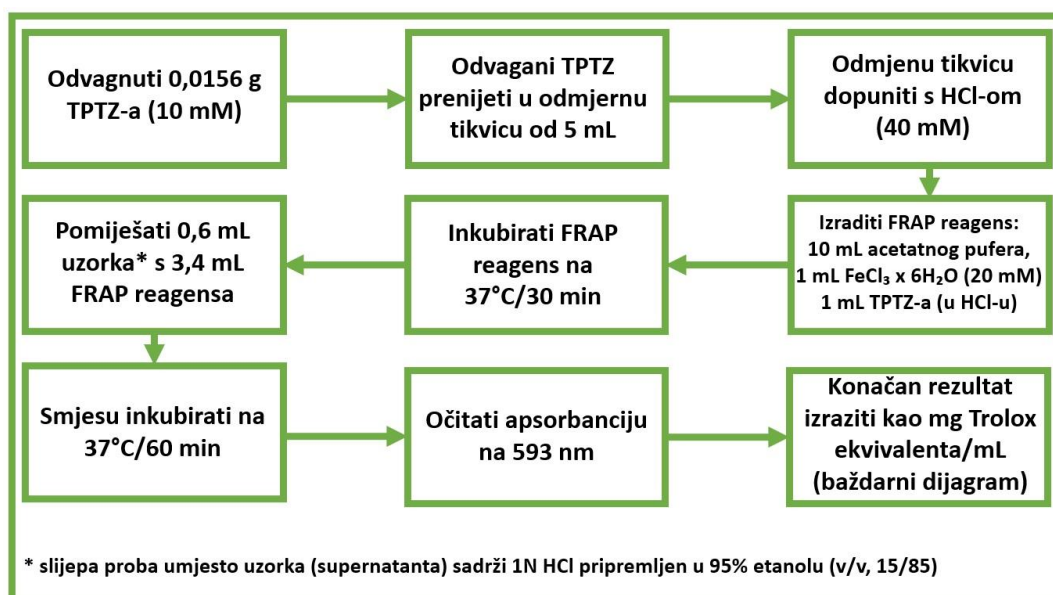
5.2.6.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda se temelji na reakciji redukcije Fe^{3+} iona - TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) u Fe^{2+} - TPTZ s antioksidansom. Kao rezultat te reakcije dolazi do formiranja intenzivno plave boje otopine s apsorbancijom na 550 nm. U svrhu standardnih antioksidanasa koriste se Trolox ili askorbinska kiselina. Rezultati ove metode variraju s obzirom na vrijeme analize i medij u kojim se provodi reakcija. Sama reakcija se izvodi u niskom pH kako bi se održala topljivost željeza, ali to za posljedicu ima smanjenje redoks potencijala sustava (Pregiban, 2017).



Slika 5. Oksidirani i reducirani oblik kompleksa željezo-TPTZ (Gülçin, 2012).

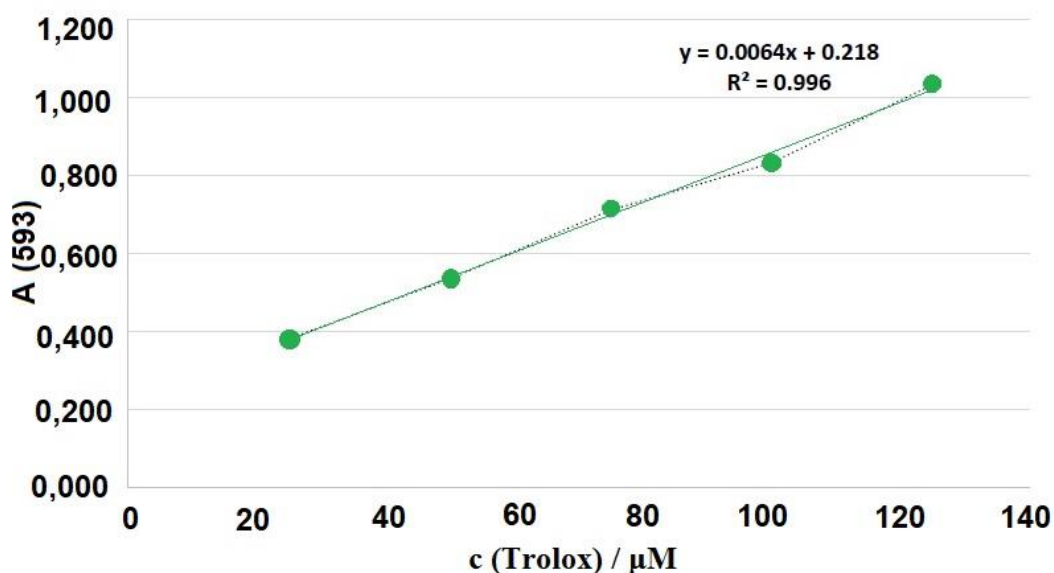
Postupak provođenja FRAP metode opisali su Benzie i Strain (1996), a shematski je prikazan na Slici 6. te se provodio jednom mjesečno kroz 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju.



Slika 6. Shema provođenja FRAP metode (Izvor: Vlastita slika).

Izrada baždarnog dijagrama FRAP metode

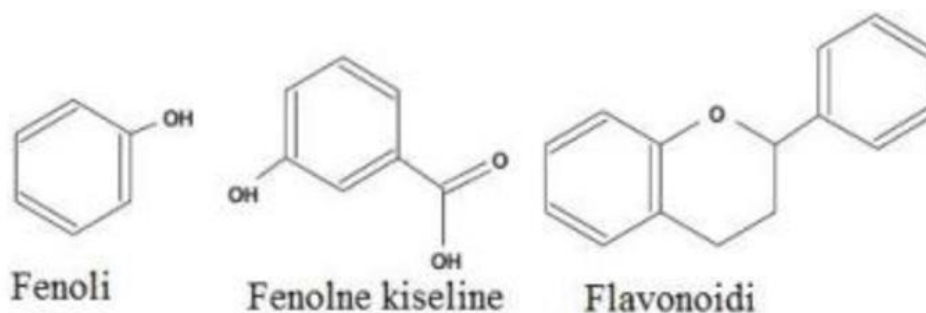
U svrhu izrade baždarnog pravca (Slika 9.) koristi se standard Trolox-a početne koncentracije 2 mmol L^{-1} od kojeg se pripreme odgovarajuća razrjeđenja koncentracije 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i $1500 \mu\text{M}$. Tako dobivena razrjeđenja koriste se u prethodno prikazanom protokolu (Slika 7.) za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom tako što se umjesto 0,6 mL ekstrakta reakcijskoj smjesi dodaje po 0,6 mL otopine Troloxa poznate koncentracije. Konačni rezultati se izražavaju kao mg Trolox ekvivalenta mL^{-1} (Sangsopha i sur., 2019), a za svaki uzorak izračuna se srednja vrijednost dvaju mjerenja.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593 nm (A_{593}) o koncentraciji Troloxa (μM) za izračun antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi

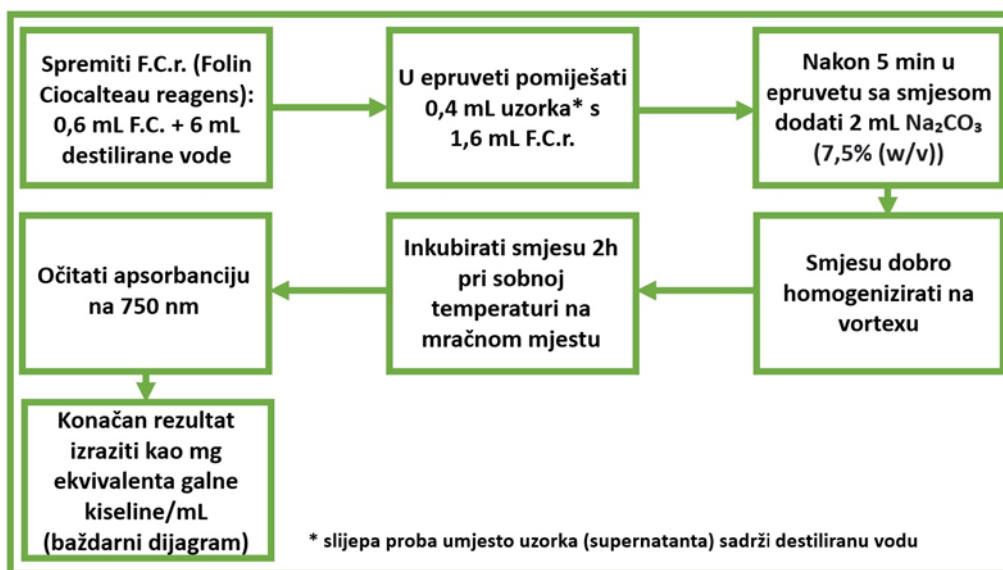
5.2.6.3. Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

S obzirom na kemijsku strukturu fenolni spojevi se dijele na flavonoide i fenolne kiseline te njima srodne spojeve (Slika 8). Ti spojevi mogu vezati slobodne radikale, odnosno reaktivne kisikove oblike jer je redukcijski potencijal elektrona fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala elektrona reaktivnog kisikovog oblika. Folin-Ciocalteu reagens je zapravo smjesa fosfomolibden i fosfovolframove kiseline. Prilikom oksidacije fenolnih sastojaka te se kiseline reduciraju u molibdenov oksid i volframov oksid što za posljedicu ima plavo obojenje uzorka. Stoga, mjerenjem intenziteta nastalog plavog obojenja pri valnoj duljini 750 nm, možemo odrediti ukupne fenole u uzorku (Spajić, 2019).



Slika 8. Struktura jednostavnih fenolnih spojeva (Anonymous 2, 2017)

Postupak određivanja ukupnih fenola Folin Ciocalteu reagensom prikazan je shemom na slici 9. te se provodio jednom mjesečno kroz 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju. Kemikalije i reagensi se pripremaju prema Singleton i sur. (1999) te je potrebno prije svakog određivanja pripremiti svježi Folin Ciocalteu reagens.

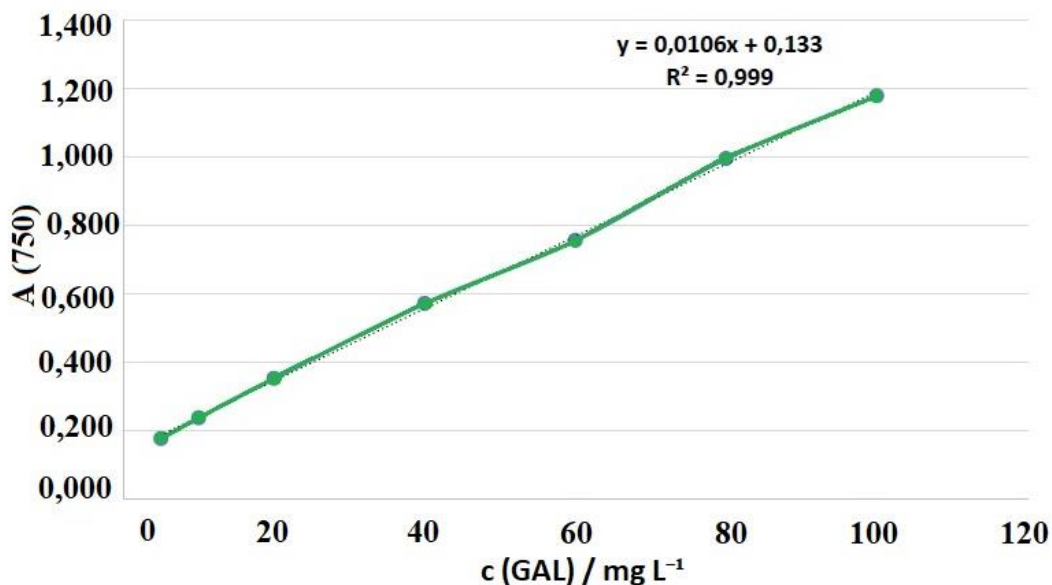


Slika 9. Shema određivanja ukupnih fenola Folin Ciocalteu reagensom (Izvor: Vlastita slika).

Izrada baždarnog dijagrama za metodu sa reagensom po Folin Ciocalteu

U svrhu izrade baždarnog pravca (Slika 12.) koristi se standard galne kiseline (GAL) početne koncentracije 125 mg L^{-1} od koje se pripreme točno određena razrjeđenja kako bi se dobile koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 125 mg L^{-1} . Potom se slijedi prikazani protokol (Slika 10.) za određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu. Jedina razlika u ovom slučaju

je u tome što se umjesto 0,4 mL ekstrakta, dodaje po 0,4 mL galne kiseline poznate koncentracije. Na temelju očitanih vrijednosti kreira se baždarni dijagram i dobije se jednadžba pravca pomoću koje se računaju udjeli ukupnih fenola u uzorcima kobiljeg mlijeka.



Slika 10. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm (A_{750}) o koncentraciji galne kiseline (mg GAL L^{-1}) za određivanje ukupnih fenola.

6. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti kako skladištenje u zamrznutom stanju kroz šest mjeseci utječe na kvalitetu kobiljeg mlijeka. Promatrana su fizikalno-kemijska svojstva unutar kojih pH vrijednost, električna vodljivost i TDS vrijednost, distribucija veličine čestica, NIR spektri, SDS-PAGE analiza te promjene u antioksidativnoj aktivnosti (FRAP i DPPH metode) kao i promjene u sadržaju ukupnih fenola.

6.1. Određivanje pH vrijednosti

Rezultati određivanja pH vrijednosti prikazani su u Tablici 4. kojima je zabilježen porast pH vrijednosti u vremenskom razdoblju od šest mjeseci. Izmjerena pH vrijednost svježeg kobiljeg mlijeka iznosila je prosječno 6,96 dok je vrijednost za mlijeko nakon šest mjeseci skladištenja u zamrznutom stanju iznosila prosječno 7,24. Takvi rezultati podudaraju se sa rezultatima istraživanja kojeg su proveli Mariani i sur. (2001) gdje je određena pH vrijednost kobiljeg mlijeka 4 dana nakon partusa iznosila 6,6, dvadeset dana nakon partusa 6,9 te 180 dana nakon partusa 7,1.

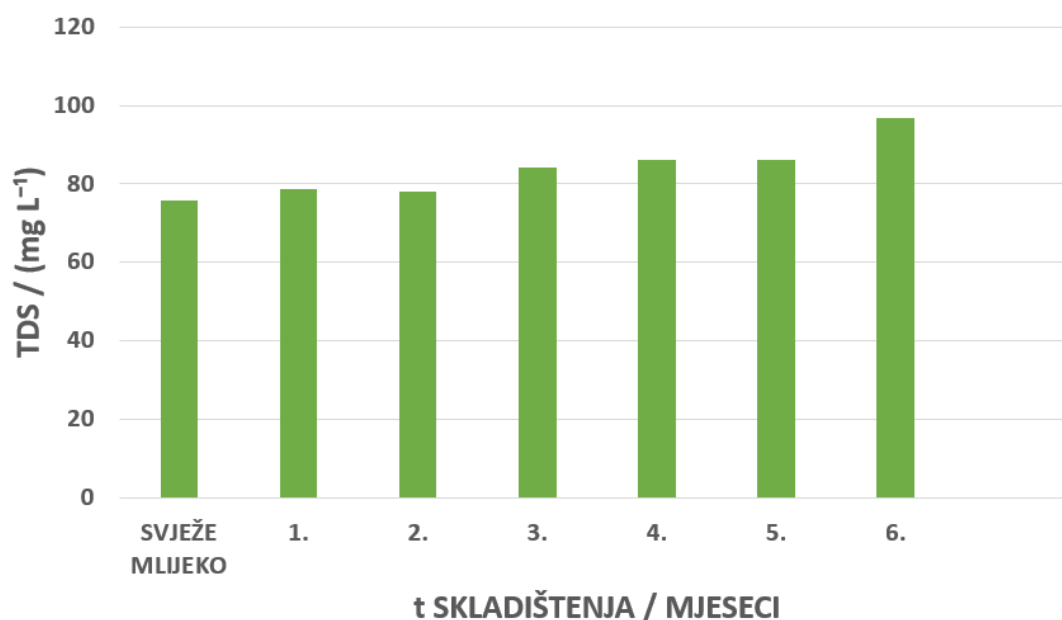
Tablica 4. Određivanje pH vrijednosti kobiljeg mlijeka kroz 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku.

Vrijeme skladištenja	pH vrijednost
Svježe kobilje mlijeko	6,96
1. mjesec	7,02
2. mjesec	7,09
3. mjesec	7,1
4. mjesec	7,18
5. mjesec	7,21
6. mjesec	7,24

S obzirom da je zabilježen porast pH vrijednosti kobiljeg mlijeka, možemo pretpostaviti da je tijekom skladištenja došlo do disocijacije kiselih soli (fosfati, nitrati) čime se oslobađaju H^+ ioni koji se detektiraju prilikom određivanja pH vrijednosti pH-metrom. Drugi mogući razlog je i fermentacija laktoze uslijed koje dolazi do razlaganja laktoze na produkte među kojima je i mliječna kiselina. Međutim, kako je uzorak čuvan pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, do fermentacije nije moglo doći pa je razlog promjene u pH vrijednosti vjerojatno prethodno spomenuta disocijacija na što ukazuju i rezultati za TDS i električnu vodljivost.

6.2. Određivanje ukupne otopljene tvari (TDS) i električne vodljivosti

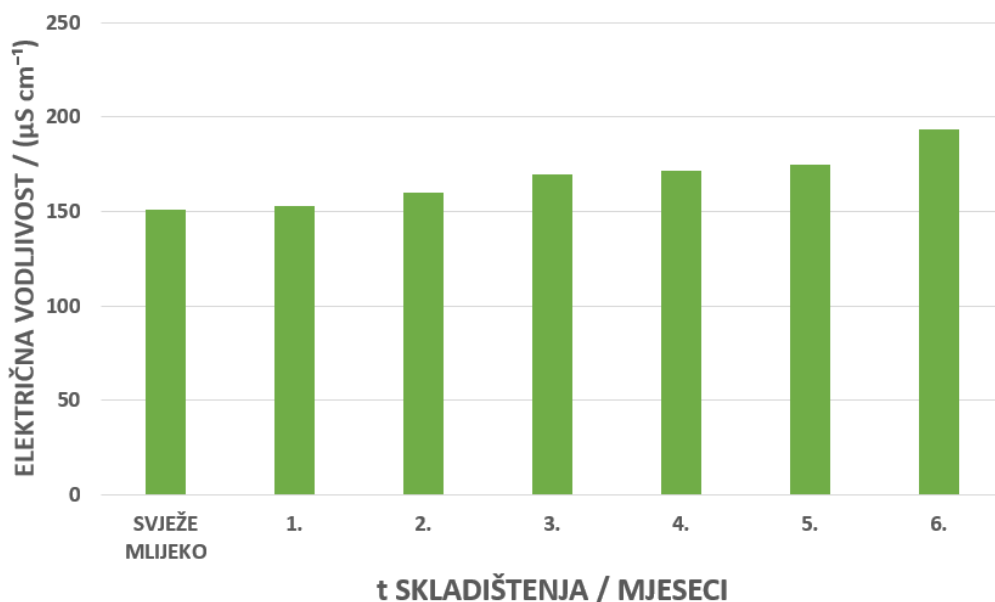
Određivanjem TDS vrijednosti kroz 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom obliku, ustanovljen je porast koncentracije otopljenih tvari u uzorcima kobiljeg mlijeka. Tako je najniža TDS vrijednost zabilježene u uzorku svježeg kobiljeg mlijeka i iznosila je $75,7\text{ mg L}^{-1}$, dok je najviša ($96,75\text{ mg L}^{-1}$) zabilježena u uzorku starom 6 mjeseci. Rezultati su prikazani u obliku grafa Slikom 11.



Slika 11. Prikaz porasta TDS vrijednosti u kobiljem mlijeku kroz 6 mjeseci skladištenja.

Povećanje koncentracije ukupno otopljenih tvari podudara se sa pretpostavkom da je tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka došlo do disocijacije soli jer disocijacijom jedne soli nastaje više iona.

Budući da električna vodljivost ovisi o koncentraciji otopljenih tvari u nekom uzorku, sukladno tome zabilježen je i porast električne vodljivosti u kobiljem mlijeku kroz 6 mjeseci skladištenja. Točnije, disocijacijom soli oslobađaju se ioni koji su nositelji pozitivnog ili negativnog električnog naboja. Najniža zabilježena vrijednosti električne vodljivosti iznosila je $150,75 \mu\text{S cm}^{-1}$ i to za svježe kobilje mlijeko, dok je najviša vrijednosti od $193,175 \mu\text{S cm}^{-1}$ zabilježena za kobilje mlijeko skladišteno 6 mjeseci. Rezultati su prikazani u obliku grafa kao Slika 12.



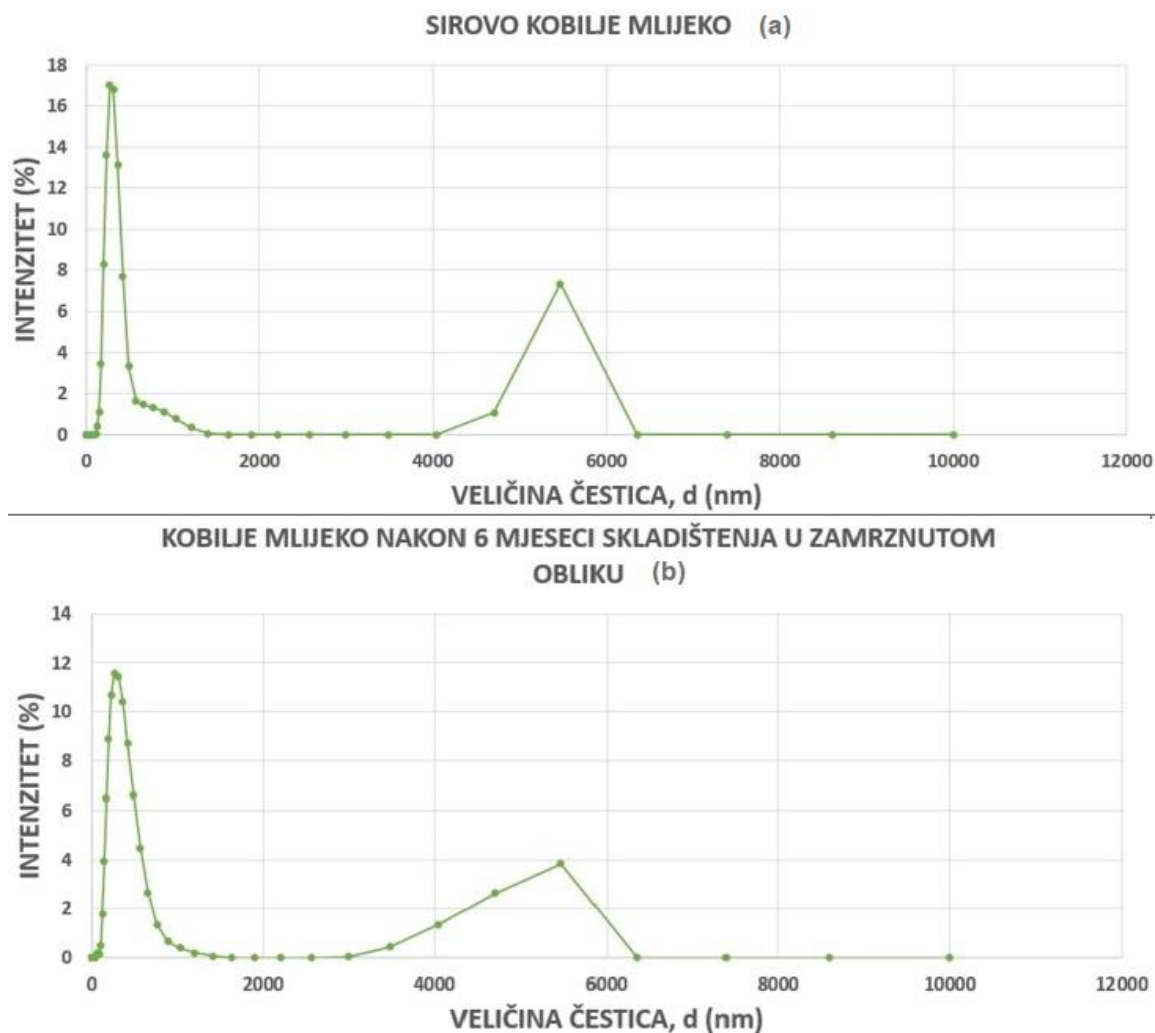
Slika 12. Prikaz porasta električne vodljivosti u kobiljem mlijeku kroz 6 mjeseci skladištenja

6.3. Određivanje distribucije veličine čestica

Na Slici 13. prikazani su grafovi distribucije veličine čestica za uzorak svježeg kobiljeg mlijeka (a) i za uzorak kobiljeg mlijeka koje je skladišteno 6 mjeseci u zamrznutom obliku (b). Uspoređujući grafove, uočavamo kako je nakon 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku došlo do smanjenja intenziteta veličine čestica na području od oko 300 nm (1. pik) i od oko 5400 nm (2. pik). Također, može se primijetiti da se nakon 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom obliku pojavio širi raspon veličine čestica što se najbolje vidi na području od 4000 nm.

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

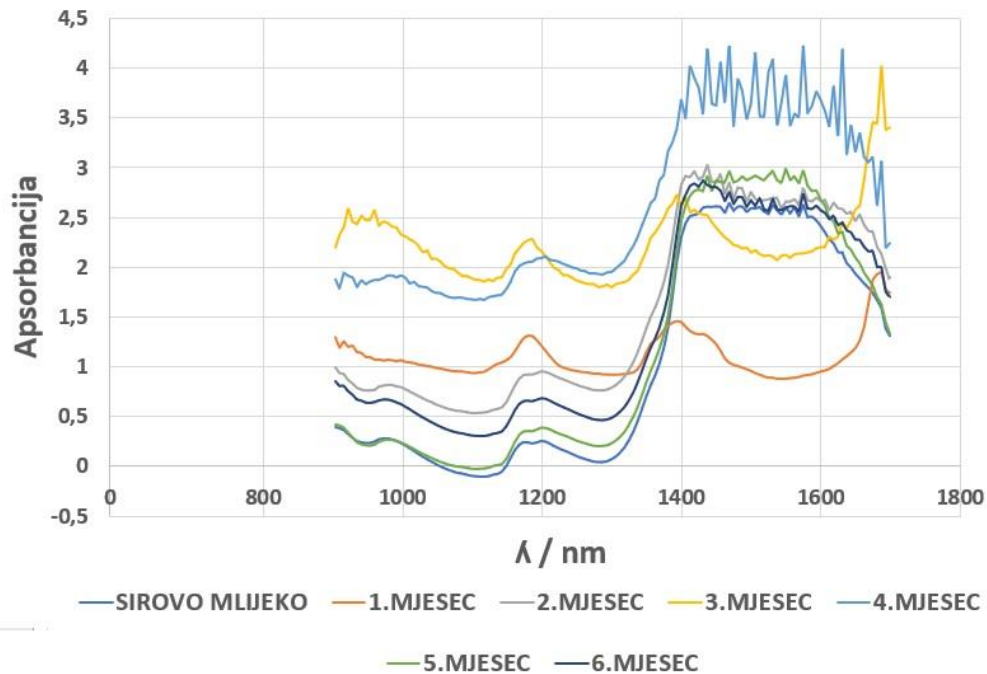
Uzevši u obzir navedenu podjelu i dobivene rezultate, zaključujem kako je tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka došlo do disocijacije soli uključujući i kazein – kalcijev fosfat. Takav zaključak se podudara sa rezultatima određivanja ukupno otopljenih tvari, električne vodljivosti i pH vrijednosti. Također može se uočiti kako je došlo i do homogenizacije mliječne masti, odnosno usitnjavanja velikih masnih globula na više manjih globula.



Slika 13. Usporedba grafova distribucije veličine čestica za uzorak svježeg kobiljeg mlijeka (a) i za uzorak kobiljeg mlijeka koje je skladišteno 6 mjeseci u zamrznutom obliku (b).

6.4. Određivanje strukturnih promjena NIR spektroskopijom

Rezultat snimanja uzoraka je NIR spektar u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm u ovisnosti o apsorbanciji za uzorke kobiljeg mlijeka kroz 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku. U nastavku su prikazani dobiveni NIR spektri kao Slika 14.



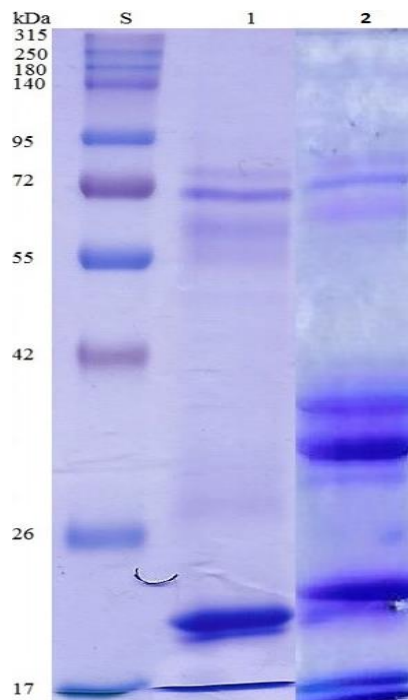
Slika 14. NIR spektri za uzorke kobiljeg mlijeka skladištenih 6 mjeseci u zamrznutom obliku.

Vidljivo je da dolazi do znatnog skoka apsorbancije na valnom području od 904-1000 nm, 1160-1220 nm i 1400-1690 nm. Na području valnih duljina 904 – 1000 nm zabilježene su vibracije C – H veza u trećoj regiji (eng. *overtone*) i O – H veza u drugoj regiji te se mogu povezati s sastojcima kobiljeg mlijeka koji sadrže atome C, H i O kao što je to šećer laktoza. U području valnih duljina 1160 – 1220 nm pojavljuju se vibracije C – H veza u drugoj regiji i vibracije C = O. Vibracije C – H i C = O veza u području valnih duljina 1160 – 1220 nm možemo povezati sa mliječnom masti koja se nalazi u sastavu kobiljeg mlijeka. Vibracije N – H, O – H i C – H veza u prvoj regiji zabilježene su u području valnih duljina 1400 – 1690 nm i možemo ih povezati sa udjelom proteina u kobiljem mlijeku. Na dobivenom spektru se ističe lagani pad apsorbancije između valnih duljina 1400-1690 nm za uzorke nakon 1. mjeseca i 3. mjeseca skladištenja što se može pripisati denaturaciji određenog dijela proteina. Tome zaključku idu u prilog i dobiveni rezultati u ovom radu prema kojima je tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka došlo do povećanja pH vrijednosti, električne vodljivosti i promjene veličina čestica. Naime, tijekom denaturacije proteina dolazi do pucanja nekovalentnih veza u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi čime se formira naboj na pobočnim ograncima strukture proteina što dovodi do promjena u električnoj vodljivosti i pH vrijednosti sustava.

6.5. SDS-PAGE elektroforeza

Primjenom toplinskih tretmana dolazi do brojnih fizikalno-kemijske promjena na sastojcima mlijeka, ali treba napomenuti kako trenutno nije dostupan veliki broj radova o njihovom utjecaju na proteine kobiljeg mlijeka. Proteini sirutke čine 50 % ukupnih proteina kobiljeg mlijeka te se uvrstavaju u termolabilne proteine. Frakcija proteina sirutke ima sljedeća četiri glavna proteina: β -laktoglobulin, α -laktalbumin, proteine krvnog seruma (BSA) i imunoglobulin (Ig). Od navedenih vrsta proteina u frakciji proteina sirutke, β -laktoglobulin i α -laktalbumin kobiljeg mlijeka su u usporedbi sa kravljim otporniji na visoke temperature, što se povezuje s njihovim monomernim oblikom te odsutnošću sulfhidrilnih skupina (Claeys i sur., 2014). Za razliku od proteina sirutke, kazein je toplinski stabilan protein jer ne koagulira prilikom visoke toplinske obrade.

Slikom 15. prikazani su rezultati provođenja SDS-PAGE elektroforeze na sirovom kobiljem mlijeku i na kobiljem mlijeku koje je skladišteno 6 mjeseci u zamrznutom obliku. Kolona označena slovom S na Slici 15. predstavlja otopinu standarda u kojoj su označene molekulske mase pojedinih proteinskih frakcija koje se kreće od 17 do 315 kDa, dok kolona 1 predstavlja uzorak sirovog kobiljeg mlijeka, a kolona 2 uzorak kobiljeg mlijeka skladištenog 6 mjeseci u zamrznutom obliku.



Slika 15. SDS-PAGE elektroforeza sirovog mlijeka (1) i mlijeka skladištenog 6 mjeseci u zamrznutom obliku (2).

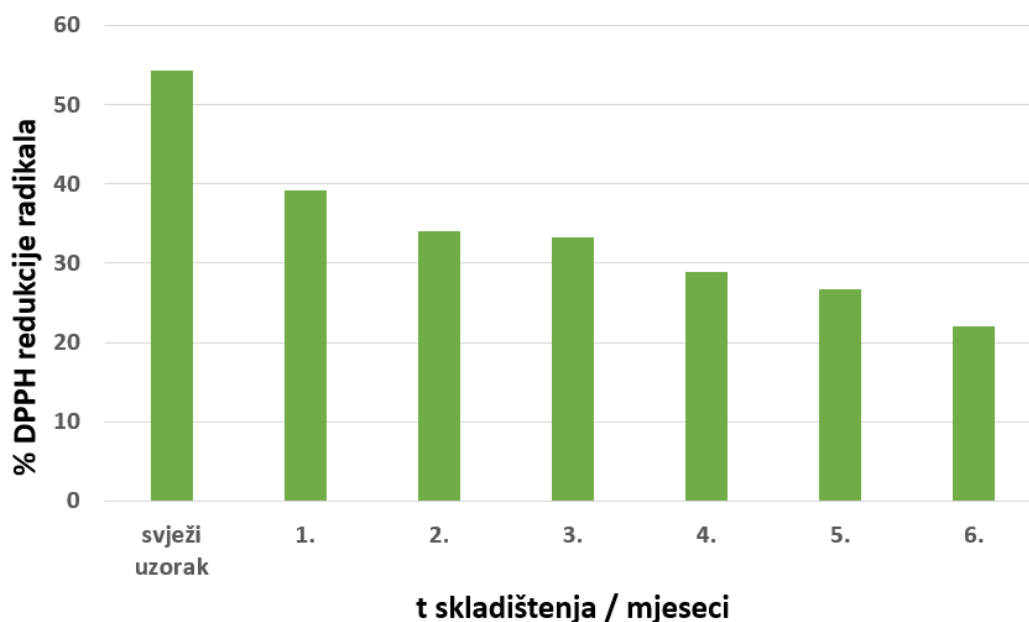
Provođenjem SDS-PAGE elektroforeze detektirana su 4 glavna banda: α -laktalbumin, β -laktoglobulin, kazein i albumini krvnog seruma.

Na Slici 15. može se vidjeti da prva pruga na gelu odgovara molekulskoj masi od 17 kDa, koja se odnosi na α -laktalbumin koja ne odgovara teoretskoj molekulskoj masi α -laktalbumina koja iznosi 14 kDa. Skladištenje od 6 mjeseci na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ uzrokovalo je denaturaciju α -laktalbumina što je uočljivo jer je došlo do nestanka jasno ocrtanog banda, a formirao se mutniji i širi band. Sljedeća pruga na gelu odnosi se na β -laktoglobulin te odgovara molekulskoj masi 20 kDa što je nešto više od teoretske molekulske mase β -laktoglobulina u kobiljem mlijeku, koja iznosi 19,5 kDa. Band je nešto širi i mutniji u koloni 2, nego li je u koloni 1, što upućuje na denaturaciju β -laktoglobulina nakon 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku. Sljedeća pruga na gelu odgovara molekulskoj masi od 29 do 38 kDa i označava kazein što se ne podudara s teoretskom molekulskom masom kazeina koja se kreće od 19 do 25 kDa. Band na koloni 1 (sirovo mlijeko) je vrlo mutan i slabo vidljiv dok je na koloni 2 intenzivniji i uočljiv. S obzirom da kazein ne može tijekom skladištenja nastati iz drugih sastojaka, moguća je pogreška prilikom provođenja metode ili se denaturirani kazein iz sirovog mlijeka renaturirao tijekom skladištenja. Najveća molekulska masa od 55 do 73 kDa detektirana je za albumine krvnog seruma koji su denaturirali tijekom skladištenja pošto je band u koloni 2 nešto širi i mutniji od onog u koloni 1. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima NIR spektroskopije kojom je također određena denaturacija proteina tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka 6 mjeseci u zamrznutom obliku.

Prema istraživanju koje su proveli Civardi i sur. (2007), α -laktalbumin, lizozim i β -laktoglobulin kobiljeg mlijeka pokazuju veliku toplinsku stabilnost u uzorku koji je zagrijavan do temperature od $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 14 minuta. Međutim, promatrajući kinetiku, denaturacija α -laktalbumina i β -laktoglobulina se međusobno razlikuje. Na početku zagrijavanja α -laktalbumin je jako otporan na toplinsku denaturaciju no primjenom temperature od $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 20 minuta uočena je njegova brza destabilizacija. S druge strane, β -laktoglobulin karakterizira veća toplinska stabilnost prilikom cijelog procesa zagrijavanja te predstavlja jedinu frakciju proteina sirutke koja je prisutna u uzorku (s udjelom od 38,5 % od početne vrijednosti) nakon primjene temperature od $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 30 minuta.

6.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Preciznost i pouzdanost DPPH metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti ovisi o dobroj simulaciji reaktivnosti kisikovih i dušikovih oblika prisutnih u biološkim sustavima (Arnao, 2000). Velika prednost ove metode određivanja antioksidacijskih svojstava je u tome što će s vremenom DPPH reagirati s cijelim uzorkom, a reagirat će čak i sa relativno slabim antioksidansima. Ova metoda provedena je spektrofotometrijski gdje se mjerila apsorbancija tamno-plavog do ljubičastog obojenja, nastalog uslijed reakcije, kod valne duljine od 517 nm. Dobiveni rezultati preračunati su u % DPPH redukcije radikala te su kao takvi prikazani na Slici 16.



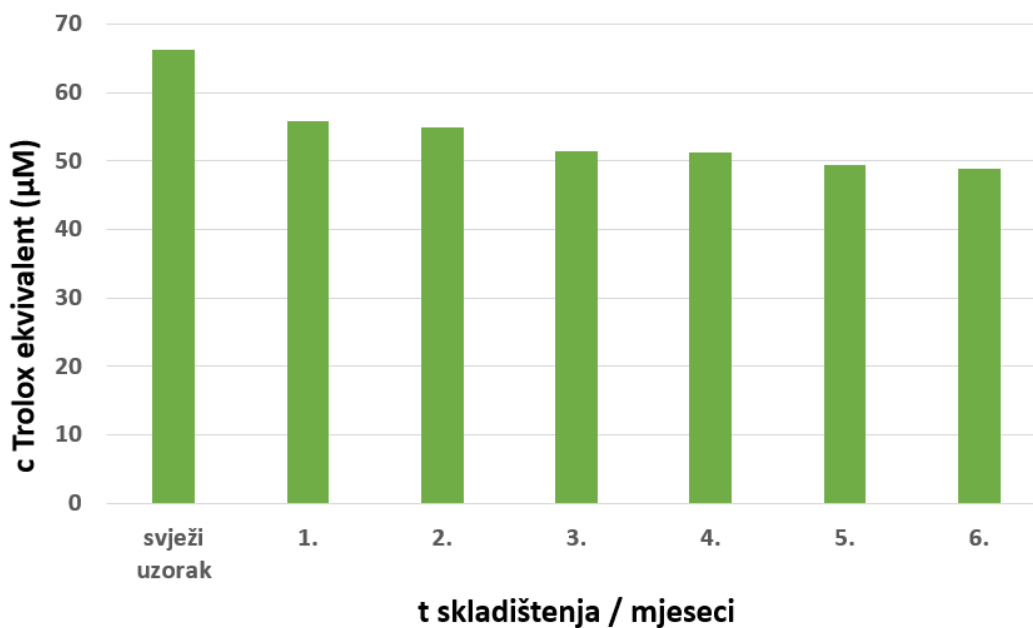
Slika 16. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom i izražena kao % DPPH redukcije radikala za uzorak svježeg kobiljeg mlijeka i uzorke skladištene kroz 6 mjeseci.

Rezultati ukazuju na smanjenje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima kobiljeg mlijeka tijekom skladištenja u zamrznutom stanju kroz šest mjeseci. Najveći postotak DPPH redukcije radikala određen je u uzorku svježeg kobiljeg mlijeka, a najmanji postotak je zabilježen kod uzorka koji je skladišten šest mjeseci. Najdrastičniji pad rezultata zabilježen je između uzoraka svježeg kobiljeg mlijeka i onog skladištenog u vremenu od jedan mjesec.

6.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je spektrofotometrijski gdje se mjerio intenzitet plavog obojenja kod valne duljine od 593 nm. Dobivene vrijednosti

apsorbancije uzoraka uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca nakon čega su preračunate u koncentraciju izraženu kao μmol Trolox ekvivalenata. Konačni rezultati su prikazani u obliku grafa kao Slika 17.



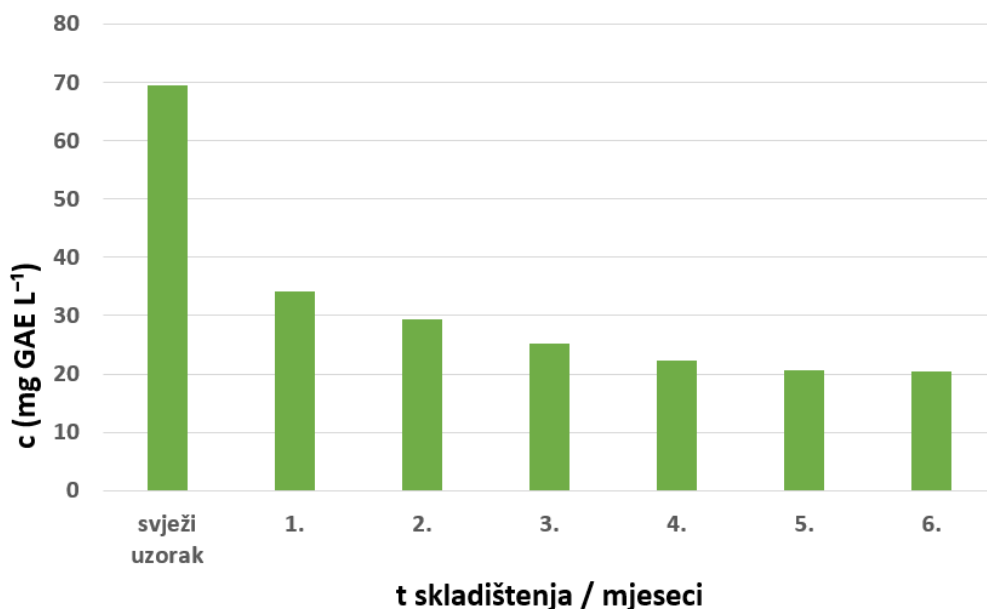
Slika 17. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom i izražena kao ekvivalent Troloxa za uzorak svježeg kobiljeg mlijeka i uzorke skladištene kroz 6 mjeseci.

Prikazani rezultati ukazuju na smanjenje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima kobiljeg mlijeka koji su skladišteni u zamrznutom stanju u vremenskom periodu od šest mjeseci. Najveća koncentracija Trolox ekvivalenta određena je kod svježeg kobiljeg mlijeka, dok je najmanja vrijednost određena za uzorak koji se skladištio šest mjeseci u zamrznutom stanju. Najveći pad u rezultatima primijećen je između uzorka svježeg kobiljeg mlijeka i uzorka skladištenog u vremenu od jedan mjesec, a potom je slijedio sporiji pad vrijednosti.

Dobiveni rezultati smanjenja antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom podudaraju se sa istraživanjem koje su proveli Abarshi i sur. (2021). Provođenjem FRAP i DPPH metode kroz 3 tjedna skladištenja kobiljeg mlijeka na 4°C također su zabilježili kako je došlo do smanjenja antioksidacijske aktivnosti u tom vremenskom periodu. Navode kako razlog ovakvih rezultata može biti gubitak, odnosno raspad određenih komponenti sastava kobiljeg mlijeka kao i inaktivacija bioaktivnih peptida.

6.8. Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

Određivanje ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu provedeno je spektrofotometrijski tako da se mjerio intenzitet plavog obojenja kod valne duljine od 750 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije uzoraka uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca te su preračunate u koncentraciju izraženu kao mg ekvivalenta galne kiseline po mL. Konačni rezultati su prikazani u obliku grafa kao Slika 18.



Slika 18. Određivanje ukupnih fenola izraženih kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE L⁻¹) s reagensom po Folin Ciocalteu za svježe kobilje mlijeko i uzorke skladištene kroz 6 mjeseci.

Rezultati određivanja ukupnih fenola u vremenskom periodu od šest mjeseci ukazuju na smanjenje ukupnih fenola u uzorcima. Najveća koncentracija ekvivalenta galne kiseline očitana je u uzorku svježeg kobiljeg mlijeka, dok je najmanja vrijednost koncentracije ekvivalenta galne kiseline očitana u uzorku koji je skladišten šest mjeseci. Najdrastičniji pad rezultata zabilježen je između uzoraka svježeg kobiljeg mlijeka i onog skladištenog u vremenu od jedan mjesec nakon čega slijedi sporiji pad vrijednosti rezultata. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da fenoli ne mogu nastati iz sastojaka, već samo mogu biti prisutni u mlijeku te se njihova koncentracija ne može povećavati ali može biti konstantna ili se smanjivati uslijed raspada tijekom skladištenja uzoraka.

7. ZAKLJUČCI

1. Tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju u vremenskom periodu od 6 mjeseci došlo je do povećanja pH vrijednosti s početnih 6,96 na konačnih 7,24. Porast pH vrijednosti može biti rezultat disocijacije soli ili denaturacije proteina.
2. Skladištenje kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju uzrokuje povećanje koncentracije otopljenih tvari što posljedično uzrokuje i povećanje električne vodljivosti kobiljeg mlijeka. To ukazuje na disocijaciju soli, raspad fenolnih spojeva te denaturaciju proteina prisutnih u kobiljem mlijeku.
3. Nakon 6 mjeseci skladištenja kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju došlo je do smanjenja intenziteta pojave čestica veličine od oko 300 nm i 5400 nm te se povećao raspon veličine čestica koji se mogao detektirati na području od oko 4000 nm. Ti rezultati ukazuju na disocijaciju soli prisutnih u kobiljem mlijeku, kao i na homogenizaciju mliječne masti.
4. NIR spektri uzoraka kobiljeg mlijeka dobiveni za svaki mjesec skladištenja kroz 6 mjeseci u zamrznutom obliku, drastično se ne razlikuju, izuzev uzoraka za 1. i 3. mjesec skladištenja kod kojih je zabilježena denaturacije određenog dijela proteina.
5. SDS-PAGE analizom utvrđeno je da je tijekom skladištenja kobiljeg mlijeka 6 mjeseci u zamrznutom obliku došlo do denaturacije proteina koji su u sastavu tog mlijeka.
6. Provođenjem DPPH i FRAP metode utvrđen je pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kobiljeg mlijeka nakon 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku.
7. Određivanjem koncentracije ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteau zabilježen je pad koncentracije tih spojeva u kobiljem mlijeku nakon 6 mjeseci skladištenja u zamrznutom obliku.
8. Uzevši u obzir sve dobivene rezultate, može se zaključiti kako je skladištenjem kobiljeg mlijeka u zamrznutom stanju na -18 °C kroz 6 mjeseci došlo do određenog pada kvalitete, a time i do smanjenja prehrambene i zdravstvene vrijednosti tog mlijeka.

8. LITERATURA

- Abarshi M. M., Mada S. B., Umar U. A., Abdulazeez M. (2021) Fermented horse milk exhibits antioxidant activity in vitro **6 (2)** 397-403. Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria
- Alatrović I. (2017) Mogućnosti proizvodnje kobiljeg mlijeka u kontinentalnoj Hrvatskoj. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- 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. doi: [dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.8.648.656](https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.8.648.656)
- Anonymous 1 (2020), < <https://www.foodanddrinktechnology.com/news/32031/horse-milk-is-better-for-us-than-cows-milk-research-reveals/> >. Pristupljeno 23. siječanj 2022.
- Anonymous 2 (2017), < <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound> >. Pristupljeno 20. ožujka 2022.
- Arnao, M.B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 419-421. doi: [doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- 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. doi: [doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Božanić R., Lisak Jakopović K., Barukčić I. (2018) Vrste mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.
- Brezovečki A., Čagalj M., Antunac N., Mikulec N., Bendelja Ljoljić D. (2014): Proizvodnja, sastav i svojstva kobiljeg mlijeka, *Mljekarstvo* **64 (4)**, 217-227 doi: doi.org/10.15567/mljekarstvo.2014.0401
- Businco L, Giampietro P.G, Lucenti P., Lucaroni F., Pini C., Di Felice G., Iacovacci P., Curadi C., Orlandi M. (2000) Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 1031-1034. doi: doi.org/10.1067/mai.2000.106377
- Chávez-Servín, J.L., Andrade-Montemayor, H.M., Velázquez-Vázquez, C., Aguilera-Barreyro, A., García-Gasca, T., Ferríz-Martínez, R.A., Olvera-Ramírez, A.M., de la Torre-Carbot, K. (2018) Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and

antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Res.* **160**, 54-58. doi: doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.011

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 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. doi: doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045

Čagalj M., Brezovečki A. (2013) Kemijski sastav, fizikalna svojstva i higijenska kvaliteta kobiljeg mlijeka Hrvatskog hladnokrvnjaka. Rad za Rektorovu nagradu, Sveučilište u Zagrebu.

Gülçin, I. (2012) Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview. *Archives of Toxicology*, **86**, 345-391. doi: doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2

Inglingstad. RA., Devold. TG, Eriksen, EK. Holm, H., Jacobsen, M., Liland, KH, Rukke, E O. Veqarud, E O (2010) Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science and Technology* **90**, 549-563. doi: doi.org/10.1051/dst/2010018

Ivanković, A. (2004): Konjogojstvo. Sveučilišni udžbenik. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.

Khan, I., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., Hayat Jaspal, M. (2019) Antioxidant properties of Milk and dairy product. *Lipids Health Dis.* **18**, 41. doi: doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8

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

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. *International Dairy Journal* **12**, 869–877. doi: [dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00120-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00120-6).

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

Outram, A.K, Stear, NA., Bendrey, R, Sandra Olsen, S., Kasparov, A., Zaibert, V., Thorpe,

- N., Evershed, R.P. (2009): The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science* **323**, 1332-1335
doi: doi.org/10.1126/science.1168594
- Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A. (2007) Near-infrared spectroscopy in Food Science and Technology, John Wiley & Sons, New Jersey. doi: doi.org/10.1177/0960336018817135
- Park, Y.W., Zhang, H., Zhang, B., Zhang, L. (2006): Mare milk U: Handbook of milk on non-bovine mammals. (ur: Park, Y.W, Haenlein, G.F.W) Blackwell Publishing, Iowa, SAD. 275-296.
- Pecka E., Dobrzański Z., Zachwieja A., Szulc T., Czyż K. (2012) Studies on composition and major protein level in milk and colostrum of mares. *Animal Science Journal* **83** (2), 162-168.
doi: doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00930.x
- Pieszka M., Łuszczynski J., Zamachowska M., Augustyn R., Długosz B., Hędrzak M. (2016) Is mare milk an appropriate food for people?- a review. *Annals of Animal Science* **16** (1), 33-51. doi: doi.org/10.1515/aoas-2015-0041
- Potočnik, K. (2001): Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo* **61** (2), 107-113.
- Pregiban K. (2017) Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Salamon, R.V., Salamon, S., Csapó-Kiss, Z., Csapó, J. (2009): Composition of mare's colostrum and milk 1. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents. *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria* **2** (1), 119-131.
- Samaržija D. (2016) Korištenje mlijeka kobile i magarice u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Sangsopha, J., Moongngarm, A., Pratheepawanit Johns, N., Grigg, N.P. (2019) Optimization of pasteurized milk with soymilk powder and mulberry leaf tea based on melatonin, bioactive compounds and antioxidant activity using response surface methodology. doi: 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. doi: [doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Spajić T. (2019) Određivanje udjela ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti cvjetnog meda sezona 2018. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., Decker, E.A., (2000) Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J Food Sci.* **8**, 1325-1329. doi: doi.org/10.1111/j.1365-

2621.2000.tb10606.x

Uniacke-Lowe T. (2011) Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. PhD Thesis, University College Cork.

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

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

Izjava o izvornosti

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

Ivan Miletić

Vlastoručni potpis