

# Utjecaj različitih režima toplinske obrade na kvalitetu kozjeg mlijeka

---

Popadić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:376047>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Elena Popadić

1344/PI

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

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda, na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uz pomoć doc. dr. sc. Irene Barukčić.

## **ZAHVALA**

*U prvom redu veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović koja mi je omogućila svu potrebnu opremu i pomogla sa svojim korisnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem se doc. dr. sc. Ireni Barukčić na stručnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Hvala mojem Davoru na pružanoj velikoj podršci prilikom pisanja rada i mojeg studiranja u Zagrebu.*

*I na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima bez kojih sve ovo što sam do sad postigla ne bi bilo moguće i koji su uvijek bili tu uz mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ RAZLIČITIH REŽIMA TOPLINSKE OBRADJE NA KVALITETU KOZJEG MLIJEKA

*Elena Popadić, 1344/PI*

#### Sažetak:

*Kozje mlijeko ima visoko antioksidativno djelovanje koje štiti potrošače od izloženosti oksidacijskom stresu. Također, bogato je brojnim fenolnim spojevima koji su zaslužni za niz metaboličkih aktivnosti. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih toplinskih tretmana na tvorbu spojeva nastalih u kozjem mlijeku uslijed toplinske obrade (ukupni i slobodni hidrosimetilfurfural), odrediti utjecaj toplinske obrade na antioksidacijski potencijal pomoću DPPH i FRAP metoda te odrediti utjecaj toplinske obrade na udjel ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom. Osim toga, pomoću SDS- PAGE elektroforeze je određivan stupanj denaturacije proteina pri različitim toplinskim tretmanima mlijeka. Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da uslijed povećanja intenziteta toplinske obrade dolazi do povećanja koncentracije hidrosimetilfurfurala. Također, uslijed toplinske obrade nastaju spojevi slične strukture kao fenoli i ulaze u reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom i FRAP reagensom. Dok s druge strane, aktivnost mjerena DPPH metodom je padala što je vezano uz antioksidacijsku aktivnost sastojaka koji su prisutni od početka i dolazi do očekivanog – povećanjem intenziteta toplinske obrade smanjuje se antioksidacijska aktivnost svojstvena mlijeku. Ono što je i bilo za očekivati jest da uslijed toplinske obrade dolazi do denaturacije proteina*

**Ključne riječi:** *kozje mlijeko, DPPH, FRAP, antioksidacijska aktivnost, fenolni spojevi*

**Rad sadrži:** 47 stranica, 11 slika, 13 tablica, 44 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Irena Barukčić*

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić*
2. Doc.dr.sc. *Katarina Lisak Jakopović*
3. Doc.dr.sc. *Maja Repajić*
4. Doc.dr.sc. *Tamara Jurina* (zamjena)

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF DIFFERENT HEAT TREATMENTS REGIMES ON GOAT MILK QUALITY

*Elena Popadić, 1344/PI*

#### **Abstract:**

*Goat's milk has a high antioxidant effect that protects consumers from exposure to oxidative stress. It is also rich in numerous phenolic compounds that are responsible for a number of metabolic activities. The aim of this study was to examine the effect of different heat treatments on the formation of compounds formed in goat milk due to heat treatment (total and free hydroxymethylfurfural), to determine the effect of heat treatment on antioxidant potential using DPPH and FRAP methods and to determine the effect of heat treatment on total Ciocalteu method. In addition, the degree of protein denaturation in various heat treatments of milk was determined by SDS-PAGE electrophoresis. Based on the conducted research, it can be concluded that due to the increase in the heat treatment intensity, the concentration of hydroxymethylfurfural increases. Also, due to heat treatment, compounds with a similar structure as phenols are formed and react with Folin-Ciocalteu reagent and FRAP reagent. While on the other hand, the activity measured by the DPPH method decreased, which is related to the antioxidant activity of the ingredients that are present from the beginning and comes to the expected - increasing the intensity of heat treatment reduces the antioxidant activity inherent in milk. Expectations were that due to heat treatment, protein denaturation occurs*

**Keywords:** *goat milk, DPPH, FRAP, antioxidant activity, phenolic compounds*

**Thesis contains:** 47 pages, 11 figures, 13 tables, 44 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. *Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** PhD. *Irena Barukčić, Assistant professor*

#### **Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 28 September 2021.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. KOZJE MLIJEKO</b> .....	<b>3</b>
2.1.1.    Kemijski sastav kozjeg mlijeka.....	3
2.1.2.    Zdravstvena vrijednost kozjeg mlijeka .....	7
2.1.3.    Antioksidacijski kapacitet kozjeg mlijeka.....	8
<b>2.2. UKUPNI I SLOBODNI HMF</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST - DPPH METODA</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST - FRAP METODA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5. UKUPNI FENOLI</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6. SDS-PAGE ELEKTROFOREZA</b> .....	<b>15</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>18</b>
3.2.1.    Priprema uzorka .....	18
3.2.2.    Određivanje fizikalno – kemijskih parametara kozjeg mlijeka .....	18
3.2.3.    Određivanje udjela ukupnog i slobodnog HMF-a.....	22
3.2.4.    Priprema supernatanta za određivanje antioksidacijske aktivnosti i udjela ukupnih fenola .....	23
3.2.5.    Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom.....	23
3.2.6.    Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	24
3.2.7.    Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	26
3.2.8.    Natrij dodecil sulfat-poliakrilamidne gel elektroforeza proteina (SDS-PAGE).....	27
3.2.9.    Određivanje električne provodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) mlijeka i salamure .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. FIZIKALNO – KEMIJSKI PARAMETRI KOZJEG MLIJEKA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNOG I SLOBODNOG HMF-a</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA FENOLA FOLIN–CIOCALTEU METODOM</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6. REZULTATI SDS – PAGE ELEKTROFOREZE</b> .....	<b>39</b>
<b>4.7. REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTRIČNE PROVODLJIVOST I TDS-aMLIJEKA I SALAMURE</b> .....	<b>41</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>



# 1. UVOD

„Mlijeko je prirodna najsavršenija hrana!“, rekao je oko 400. godine prije Krista, Hipokrat, „otac medicine“.

U današnje vrijeme kozjem mlijeku se pridodaje sve veća pažnja zbog njegovog nutritivnog sastava i ljekovitih svojstava. Na svijetu postoji gotovo 500 pasmina koza, međutim samo se nekolicina uzgaja zbog mlijeka, a u svijetu je prisutno oko 600-700 milijuna muznih koza. Od 1990. godine interes za mliječne koze neprestano raste, što se očituje porastom proizvodnje mlijeka s oko 10 milijuna t u 1990. na oko 15,2 milijuna t u 2008. godini (FAOSTAT, 2008). Svjetski trendovi razvoja populacije koza i njihovih proizvoda između 1969. i 2010. pokazuju kontinuirani i brzi porast u odnosu na goveda ili ovce, posebno u zemljama u razvoju.

Više od 95 % populacije koza nalazi se u zemljama u razvoju, a najveća proizvodnja kozjeg mlijeka prisutna je u Aziji i većina se koristi za izravnu konzumaciju. Najveći proizvođač kozjeg mlijeka je Indija koja proizvede 6 milijuna t kozjeg mlijeka godišnje (Statista, 2017). U Europi, najveći proizvođači su Grčka (30 %), Francuska (28 %) i Španjolska (25 %), a većina tog mlijeka koristi se za proizvodnju sira.

Kozje mlijeko je bogato fiziološki funkcionalnim komponentama kao što su proteini, vitamini (E i C), flavonoidi i karotenoidi koji posjeduju antioksidativna svojstva. Stoga se smatra da kozje mlijeko ima visoko antioksidativno djelovanje koje štiti konzumente od oksidativnog stresa, što je važna činjenica prilikom tretmana brojnih akutnih i kroničnih bolesti. Također, kozje mlijeko je bogato brojnim fenolnim spojevima koji provode širok spektar metaboličkih aktivnosti kao što su: antioksidacijsko, protuupalno, protualergijsko i protukancerogeno djelovanje, inhibicija agregacije trombocita i imunološke funkcije te sudjeluju u izravnoj zaštiti DNA i u promicanju apoptoze. Toplinska obrada kozjeg mlijeka je neophodna u industrijskoj proizvodnji konzumnog mlijeka i sira. Međutim, tijekom toplinske obrade, može doći do pojave nepoželjnih spojeva kao što je hidroksimetilfurfural (HMF) te može doći do denaturacije proteina mlijeka i gubitka vitamina. Također, povišena temperatura uslijed toplinske obrade može utjecati na antioksidacijski potencijal određenih sastojaka mlijeka, kao što su fenolni spojevi.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj različitih toplinskih tretmana na tvorbu spojeva nastalih u kozjem mlijeku uslijed toplinske obrade (ukupni i slobodni HMF), odrediti utjecaj toplinske obrade na antioksidacijski potencijal pomoću DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda te odrediti utjecaj toplinske obrade

na udjel ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom. Također, pomoću SDS-PAGE elektroforeze je određivan stupanj denaturacije proteina pri različitim toplinskim tretmanima mlijeka. Osim toga, pomoću dobivenih rezultata utvrditi će se pri kojim uvjetima toplinskog tretiranja kozjeg mlijeka dolazi do najmanjeg stvaranja štetnih sastojaka, a pri kojima kozje mlijeko ima najveći antioksidacijski potencijal te dolazi do najmanje denaturacije proteina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOZJE MLIJEKO

#### 2.1.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka

U mnogim zemljama diljem svijeta više se preferira konzumacija kozjeg mlijeka od kravljeg (Getaneh i sur., 2016). Sastav kozjeg i kravljeg mlijeka je vrlo sličan što se može vidjeti u tablici 1. Gustoća kozjeg mlijeka oscilira u granicama od 1,026 do 1,042 g mL<sup>-1</sup> ili prosječno iznosi oko 1,030 g mL<sup>-1</sup> po čemu je kozje mlijeko slično kravljem. Titracijska kiselost kozjeg mlijeka nešto je viša od kiselosti kravljeg mlijeka i prosječno iznosi 6,72 °SH, a kreće se između 6,5 i 7,5 °SH. Aktivna kiselost (pH) kozjeg mlijeka, također je nešto viša od kiselosti kravljeg mlijeka i najčešće se kreće između pH 6,4 i 6,8 (Božanić i sur., 2018).

Tablica 1. Prosječan sastav, svojstva i energijska vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2002)

PARAMETAR	KOZJE MLIJEKO	KRAVLJE MLIJEKO
Suha tvar (%)	11,94	12,89
Mliječna mast (%)	3,60	4,10
Proteini (%)	3,10	3,38
Laktoza (%)	4,60	4,60
Pepeo (%)	0,77	0,79
Gustoća (g L <sup>-1</sup> )	1030,10	1029,40
pH-vrijednost	6,72	6,68
Titracijska kiselost (°SH)	6,80	6,70
Slobodne masne kiseline (mg L <sup>-1</sup> )	8,10	7,50
Energijska vrijednost (kJ 100 mL <sup>-1</sup> )	293,10	288,90
Kolesterol (mg 100 g <sup>-1</sup> )	10,00	13,00

Sastav kozjeg mlijeka ovisi o nekoliko čimbenika kao što su: veličina i težina tijela, dob, veličina i oblik vimena, rast, veličina legla, sezona jarenja, prehrana, temperatura, bolesti i pasmina te redoslijedu i stadiju laktacije i godišnjem dobu (Getaneh i sur., 2016).

Koze koje imaju veću tjelesnu težinu, a samim time su starije, imaju razvijeniji probavni sustav koji može probaviti i iskoristiti veću količinu voluminozne hrane i na taj način proizvesti veću količinu mlijeka. Vrhunska mliječnost postiže se kada koza ima između četiri i osam godina. Glavnim nedostatkom smatra se slabo vezivanje vimena, ali čim je volumen vimena veći, to je i mliječnost veća. Smatra se da do neke mjere i sezona jarenja utječe na mliječnost koze. Prinos od laktacije koja počinje početkom godine (siječanj, veljača i ožujak) niži je od prinosa koji započinje kasnije u godini (listopad, studeni i prosinac). Učestalo sisanje većeg broja jaradi potiče lučenje mlijeka što je važno za nastavak laktacije. Koze koje imaju jedno jare proizvode znatno manje mlijeka u usporedbi s kozama s više jaradi u leglu. Smanjenjem unosa hrane brzo se smanjuje mliječnost, jer se u tijelu nalazi vrlo malo glukoze koja je potrebna mliječnoj žlijezdi kako bi stvorila laktozu. Na smanjeno izlučivanje mlijeka utječe i izlaganje koze u laktaciji hladnoći (Getaneh i sur., 2016). Ovisno o godišnjem dobu, dužina laktacije može varirati od 150 do 300 dana, a mliječnih pasmina 210 do 300 dana (Božanić i sur., 2018). Uobičajena dužina laktacije traje 305 dana (Getaneh i sur., 2016). Na sastav kozjeg mlijeka i na smanjenje količine najviše utječe pojava mastitisa, odnosno upala mliječne žlijezde uslijed infekcije. Uslijed mastitisa dolazi do porasta broja somatskih stanica koje su kombinacija limfocita, neutrofila (polimorfonuklearnih leukocita) i epitelnih stanica. Mlijeko iz neinficiranog vimena koza sadrži od 360.000 do više od 1.000.000 somatskih stanica mL<sup>-1</sup> mlijeka. Veliki broj somatskih stanica u mlijeku uzrokuje povećanje proteina sirutke, lipaze, natrija i klora, a uzrokuje smanjenje mliječne masti, suhe tvari, kazeina, kalcija, fosfora i kalija (Božanić i sur., 2018).

Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka uvjeti kojima mora udovoljavati sirovo mlijeko su sljedeći:

- Sirovo kozje mlijeko ne smije imati točku ledišta višu od - 0,540 °C
- Sirovo kozje mlijeko ne smije imati gustoću nižu od 1,024 g cm<sup>-3</sup> na temperaturi od 20 °C
- Sirovo kozje mlijeko ne smije imati suhu tvar bez masti nižu od 7,5 %
- Sirovo kozje mlijeko mora zadovoljavati da mlijeko ima kiselinski stupanj od 6,5 do 8,0 °SH, a pH vrijednost od 6,4 do 6,7.

- Sirovo kozje mlijeko mora potjecati od životinja u laktaciji kod kojih je od poroda prošlo minimalno osam dana ili je do poroda najmanje trideset dana.
- Sirovo kozje mlijeko mora imati svojstven izgled, boju i miris zavisno od vrste životinje od koje potječe.
- Sirovo kozje mlijeko ne smije sadržavati rezidue ili druge kontaminante u količinama većim od najvećih dopuštenih, ostatke nedopuštenih tvari, detergente i druge tvari koje mogu imati štetan učinak za zdravlje ljudi ili koje mijenjaju organoleptička svojstva mlijeka (Pravilnik, 2020).

**Proteini** sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu od građe do reprodukcije. Udjel proteina u kozjem mlijeku iznosi najmanje 2,5, a najviše 4,5 %. Relativni postotak proteina u kravljem i kozjem mlijeku je sličan, a proteini kozjeg mlijeka su lakše probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka te je efikasnija apsorpcija aminokiselina. Količina ukupnih aminokiselina podjednaka je u oba mlijeka. Međutim udio histidina, arginina, cisteina, valina, asparagina i leucina je veći u kozjem mlijeko, dok je udio serina, tirozina i glutamina manji. Kozje mlijeko sadrži veliku količinu slobodnih aminokiselina, od kojih sadrži najviše taurina. Taurin je esencijalna aminokiselina koja je osobito važna u prehrani male djece i beba jer sudjeluje u rastu i razvoju mozga. Količina taurina u kozjem mlijeku slična je količini taurina u humanom mlijeku (Božanić i sur., 2018).

Kazeinske micelle kozjeg mlijeka su manje u odnosu na kazeinske micelle kravljeg mlijeka, dok je udio proteina sirutke (albumina i globulina) u kozjem mlijeku veći. U kravljem mlijeku  $\alpha_{s1}$ -kazein je glavna frakcija kazeina, dok je u kozjem  $\beta$ -kazein. S obzirom da je u kozjem mlijeku prisutna jako mala količina  $\alpha_{s1}$ -kazeina omogućena je identifikacija patvorenja kozjeg mlijeka kravljim s količinama i od 1 % (Božanić i sur., 2002).

**Mliječna mast** utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Mliječna mast je najpromjenjiviji sastojak kozjeg mlijeka te njegov udio može varirati od 2,5 do 6,0 %. Kao što je prethodno navedeno, kozje mlijeko je lakše probavljivo od kravljeg mlijeka, a razlog tomu su kratki lanci masnih kiselina i mast sastavljena od sitnijih globula. Kratki lanci masnih kiselina omogućuju izvanrednu probavljivost, brzu apsorpciju, a mliječna mast opskrbljuje organizam esencijalnim masnim kiselinama i u masti topljivim vitaminima (A, D, E i K). S obzirom da je mast sastavljena od sitnijih globula, veća je dodirna površina te ih lipaze u crijevima lakše razgrađuju. Za probavu kozjeg mlijeka potrebno je oko 40 min dok je za probavu kravljeg mlijeka potrebno oko 2,5 h. Mliječna mast sadrži konjugiranu

linolnu kiselinu te u masti topljive vitamine i fosfolipide koji sadrže kolin. Kozje mlijeko (10 mg kolesterola 100 g<sup>-1</sup>) sadrži puno manje kolesterola od kravljeg (13 mg kolesterola 100 g<sup>-1</sup>) (Babić, 2009). Najznačajnije niže masne kiseline nazvane su po kozama (lat. *capra*=koza), a one su: kapronska (C<sub>6</sub>), kaprilna (C<sub>8</sub>) i kaprinska (C<sub>10</sub>) i čine oko 20 % masnih kiselina kozjeg mlijeka. Te masne kiseline karakteriziraju specifičan "kozji miris". Metaboliziraju se više poput šećera nego poput masti, odnosno puno brže se konvertiraju u energiju te se ne nakupljaju u obliku tjelesnih zaliha (Božanić i sur., 2002).

**Laktoza** ili mliječni šećer je vrijedna hranjiva tvar jer pogoduje crijevnoj apsorpciji kalcija, magnezija i fosfora te iskorištavanju vitamina D. Laktoza je disaharid koji se sastoji od molekula glukoze i galaktoze. Sadržaj laktoze u kozjem mlijeku iznosi oko 4,6 %. Od velike je važnosti za održavanje osmotske ravnoteže između krvotoka i alveolarnih stanica mliječne žlijezde tijekom sinteze mlijeka (Kalyankar i sur., 2016). Uspoređujući udjel laktoze u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku nema gotovo nikakve razlike i kod svih je oko 4,5 - 4,7 %. Također, kod svih vrsta mlijeka količina laktoze opada tijekom laktacije. Ono što može utjecati na značajan pad laktoze (do 2 %) je mastitis (upala mliječne žlijezde), ali se takvo mlijeko ne smije koristiti ni kao konzumno niti u proizvodnji (Zlatar, 2018).

Od **mineralnih tvari** najprisutniji u kozjem mlijeku su Ca, Na, Mg, P, K i Zn, Mn, Se, Co, Cu, Fe (Getaneh i sur., 2016). Kozje mlijeko sadržava veći udjel mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, i to je razlog za njegov blago slan okus. Potkraj laktacije mlijeko sadržava više mineralnih tvari pa je ta slanost izraženija (Kalyankar i sur., 2016). Zakiseljavanjem kozjeg mlijeka, pri pH-vrijednosti 5,3 dolazi do potpune disocijacije koloidnog kalcijeva fosfata koja je praćena ekstenzivnom topljivosti kazeina. Kozje mlijeko sadrži oko 40 % manje citrata u odnosu na kravlje mlijeko. Prema istraživanjima kozje je mlijeko bolji izvor biorazgradivog željeza u odnosu na kravlje (Časek, 2010).

**Enzimi** kozjeg mlijeka slični su enzimima kravljeg. Od velike važnosti pokazalo se da je razina alkalne fosfataze nešto niža od one kod mliječnih goveda, ali enzim pokazuje isti stupanj osjetljivosti na toplinu i samim time služi kao dokaz neispravne pasterizacije. Aktivnost peroksidaze u mlijeku obje vrste je u svim pogledima jednaka, dok je razina ksantin oksidaze niža u mlijeku koze (Kalyankar i sur., 2016).

Kozje mlijeko sadrži veće količine **vitamina A** od kravljeg zato što se fiziološkim procesima sav β-karoten pretvori u vitamin A u mlijeku i to je razlog zašto je kozje mlijeko bjelje od kravljeg. Kozje mlijeko sadržava odgovarajuće količine vitamina A i niacina te višak tiamina, riboflavina i pantotenata za ljudsko dojenče. Ipak, kozje mlijeko je siromašno folnom kiselinom i vitaminom E (Kalyankar i sur., 2016).

### 2.1.2. Zdravstvena vrijednost kozjeg mlijeka

Mlijeko je složena biološka tekućina koju proizvodi mliječna žlijezda koja ima tri glavne funkcije: nutritivnu, imunološku i fiziološku. Mlijeko predstavlja bogat izvor raznovrsnih esencijalnih hranjivih sastojaka poput mineralnih tvari, vitamina i lako probavljivih proteina s uravnoteženim aminokiselinskim profilima, važnim za potporu većine tjelesnih funkcija. Kozje mlijeko je vrlo važno za ljude koji su alergični na kravlje mlijeko. 40 do 100 % osoba koje su alergične na kravlje mlijeko, toleriraju kozje. Najvjerojatnije su te osobe osjetljive na kravlji  $\alpha_{s2}$ -kazein koji je specifičan za vrstu ili na proteine sirutke kao što je laktalbumin koji najčešće uzrokuje kožne alergijske reakcije (Božanić i sur., 2002). U stvari, naše tijelo može probaviti kozje mlijeko za samo 20 min dok za probavu kravljeg treba 2-3 h (Getaneh i sur., 2016).

Kao što je prethodno opisano, kozje mlijeko je lakše probavljivo od kravljeg. Potrebno je 20 % manje vremena za probavu kozjeg mlijeka zbog sitnih globula mliječne masti od 0,1 do 10  $\mu\text{m}$ . Također, prirodna homogenizacija kozjeg mlijeka je puno bolja naspram mehaničke homogenizacije kravljeg mlijeka. Uslijed mehaničke homogenizacije dolazi do oslobađanja enzima ksantin oksidaze koja je vezana za mliječnu mast. Enzim prodire kroz intestinalni zid u krvotok te može prouzročiti oštećenja na srcu i arterijama, što uzrokuje da tijelo oslobodi kolesterol u krv kako bi zaštitilo oštećena područja (Božanić i sur., 2018).

Kao što je već navedeno kozje mlijeko sadrži više srednjelančanih masnih kiselina ( $C_6$ - $C_{14}$ ). Tri masne kiseline koje su nazvane po kozama su: kapronska ( $C_6$ ), kaprilna ( $C_8$ ) i kaprinska ( $C_{10}$ ) te čine oko 20 % masnih kiselina kozjeg mlijeka. Ove masne kiseline koriste se u tretmanima sindroma malapsorpcije, intestinalnih poremećaja, koronarnih bolesti, cističnih fibroza, prehrane prerano rođene dojenčadi te žučnih kamenaca. Koriste se zbog svoje sposobnosti da daju energiju, dok u isto vrijeme snižavaju, inhibiraju i otapaju zalihe kolesterola. Također, kozje mlijeko ima puno veći udio glicerol etera koji je važan u prehrani novorođenčadi (Božanić i sur., 2002).

### 2.1.3. Antioksidacijski kapacitet kozjeg mlijeka

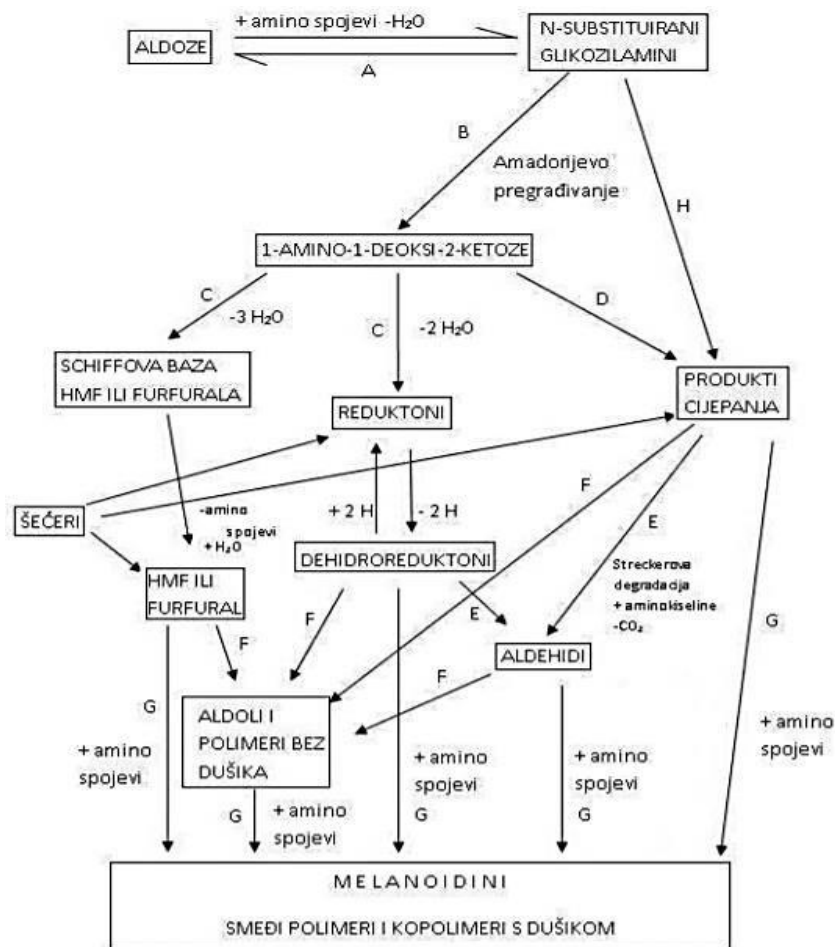
Antioksidansi su kemijske tvari koje mogu neutralizirati, a time inhibirati slobodne radikale i ostale reaktivne oblike, koji neprekidno nastaju oksidacijskim stresom u organizmu. Smatra se da kozje mlijeko posjeduje visoko antioksidativno djelovanje zato što je bogato raznim fiziološki funkcionalnim komponentama, kao što su proteini, vitamini (E i C), flavonoidi i karotenoidi (Alyaqoubi i sur., 2014). Glavni protein mlijeka, kazein, u svome sastavu sadržava različite frakcije kao što su  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazein, koji sadrže znatne količine fosfata, a samim time i antioksidanse. Također, dokazana je antioksidacijska aktivnost proteina sirutke koji imaju sposobnost da učinkovito inaktiviraju oksidaciju lipida. Najčešćim mjestom autooksidacije smatra se membrana globule mliječne masti. Na autooksidaciju lipida mlijeka i oksidaciju izazvanu svjetlošću utječe složenainterakcija prooksidansa i antioksidansa.  $\beta$ -karoten, koji se smatra preventivnih antioksidansom, može jednom molekulom inhibirati dvjesto pedeset do tisuću molekula neradikalnog, ali i reaktivnog oblika kisika (Ilijanić, 2019).

Glavni predstavnik antioksidansa iz mlijeka koji su topljivi u vodi jest vitamin C. Vitamin C je jedan od najjačih i najmanje toksičnih prirodnih antioksidansa i kao takav može neutralizirati superoksidne ( $O_2^-$ ) i alkoksilne ( $RO\cdot$ ) radikale, singletni kisik te željezove i dušikove okside, ali i značajno inhibirati razgradnju vitamina B2 u mlijeku izloženom svjetlu. Dok je vitamin C bitan predstavnik antioksidansa topljivih u vodi, vitamini A i E (tokoferoli, tokotrienoli) smatraju se primarnim antioksidansima topljivim u lipidima. Njihov glavni zadatak je zaštita polinezasićenih masnih kiselina. Također, antioksidacijsko djelovanje cinka, selena i glutaciona izaziva supresiju superoksidnog radikala. Vrlo važnu ulogu antioksidansa može imati i laktoferin, tako da veže prooksidacijske ione željeza. Antioksidacijski potencijal mlijeka može se pripisati i aminokiselinama koje sadrže sumpor (metionin, cistein), superoksid dismutazi, glutation peroksidazi, katalazi, oligosaharidima itd. (Ilijanić, 2019).



## 2.2. UKUPNI I SLOBODNI HMF

Zbog toplinske obrade i temperature skladištenja, u mlijeku i mliječnim proizvodima dolazi do neenzimatskog posmeđivanja, odnosno do Maillardovih reakcije. Maillardove reakcije mogu se podijeliti u 3 faze: inicijalnu ili početnu fazu, fazu stvaranja međuprodukata i finalnu fazu. U prvoj fazi, reducirajući šećer, poput glukoze, kondenzira sa spojem koji posjeduje slobodnu amino skupinu, dajući produkt kondenzacije N-supstituirani glikosilamin, koji se preuređuje u Amadorijev proizvod preslagivanja (ARP). ARP pri pH 7 ili nižem, podvrgava se 1,2-enolizaciji sa stvaranjem furfurala (kada su uključene pentoze) ili hidroksimetilfurfurala (HMF) (kada su uključene heksoze). U završnoj fazi dolazi do kondenzacije aldola i konačno nastaju heterociklični dušični spojevi, melanoidini, koji su vrlo obojeni i daju proizvodima specifičnu aromu (Martins i sur., 2001). Cijeli mehanizam Maillardove reakcije može se vidjeti na slici 1. HMF se kao takav koristi kao parametar intenziteta i kvalitete postupka toplinske obrade. Količina HMF-a ovisi o nutritivnom sastavu mlijeka, intenzitetu toplinske obrade i uvjetima skladišta. Razina HMF-a povećava se s povećanjem intenziteta obrade (Özdal i sur., 2018).



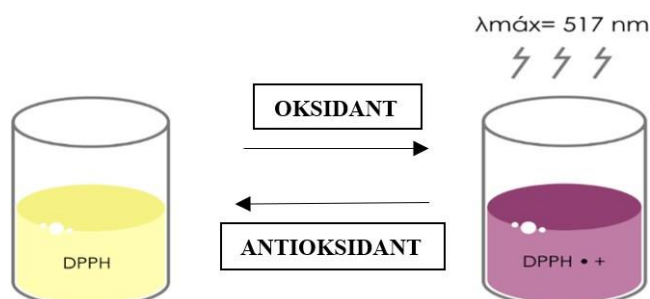
Slika 1. Shematski prikaz Maillardove reakcije (Vincek, 2014)

Kada se govori o HMF-u potrebno je razlikovati slobodni HMF od ukupnog HMF-a. Ukupni HMF je zbroj prekursora HMF-a (laktulozil-lizin, 1-2 enolizirani proizvodi, itd.) i slobodnog HMF-a (Ritota i sur., 2017).

### 2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST - DPPH METODA

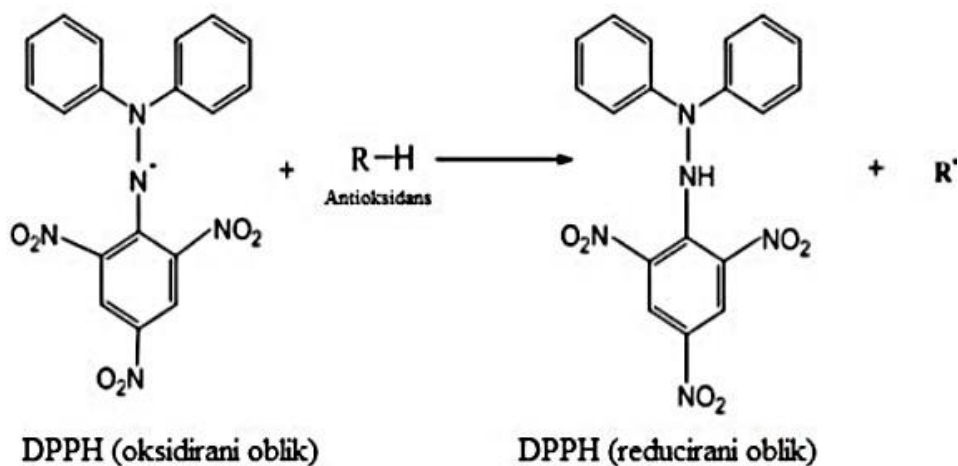
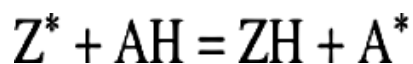
DPPH metoda služi za određivanje potencijala hvatanja slobodnih radikala od strane antioksidativnih spojeva i smatra se kao jedna od standardnih i jednostavnih kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidativnih svojstava čistih spojeva. Ovu metodu je razvio Blois (1958) sa stajalištem da na sličan način odredi antioksidativno djelovanje upotrebom stabilnih slobodnih radikala  $\alpha,\alpha$ -difetil- $\beta$ -pikrilhidrazila. Često se koristi za mjerenja sadržaja antioksidansa u pšeničnim zrnima i mekinjama, povrću, začinskom bilju, brašnu i ostalima u različitim sustavima otapala, kao što su etanol, aceton, benzen i metanol (Mishra i sur., 2011). DPPH se može otopiti samo u organskim podlogama, a ne u vodenim podlogama, što predstavlja ograničenje pri tumačenju uloge hidrofilnih antioksidansa (Arnao, 2000). DPPH metoda se koristi za mjerenje antioksidacijske aktivnosti zato što dobro simulira reaktivne kisikove i dušikove oblike koji se nalaze u biološkim sustavima (Štoler, 2017).

DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) je karakteriziran kao stabilan radikal u otopini i u metanolu daje ljubičasto obojenje koje apsorbira svjetlost na 517 nm. Test se temelji na principu da neparni elektron dušikovog atoma u DPPH se reducira primanjem atoma vodika iz antioksidansa u odgovarajući hidrazin te dolazi do redukcije iz DPPH• u DPPH<sub>2</sub>, a ljubičasta boja se mijenja u žutu što je popraćeno smanjenjem apsorpcije na 517 nm (Kedare i Singh, 2011). Izmjena boje prati se spektrofotometrijski i koristi se za određivanje parametara antioksidativnih svojstava (Mishra i sur., 2011). Promjena boje je prikazana shematski na slici 2.



Slika 2. Promjena boje DPPH uslijed redukcije (Anonymous 1)

Na slici 3 prikazan je mehanizam redukcije DPPH. Prva formula predstavlja pojednostavljeni prikaz redukcije gdje  $Z^{\bullet}$  predstavlja DPPH, a AH molekulu donora, dok druga prikazuje detaljniju reakciju redukcije DPPH.



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

Ograničenja metode su brojna. Neka od njih su da je DPPH osjetljiv na neke Lewisove baze i vrste otapala te na kisik. Može biti topljiv samo u organskom otapalu, a interferencija apsorpcije spojeva uzoraka može predstavljati problem za kvantitativnu analizu. Također, apsorpcija DPPH u metanolu i acetonu opada pod svjetlom. DPPH metoda ima ograničenja u odražavanju raspodjele antioksidansa u emulzijskim sustavima i nije korisna za mjerenje antioksidativnog djelovanja plazme, jer se proteini talože u alkoholnom reakcijskom mediju (Kedare i Singh, 2011). Glavna prednost ove metode je što će, ukoliko se izdvoji dovoljno vremena, DPPH reagirati s cijelim uzorkom tj. DPPH reagira sporo čak i sa slabim antioksidansima (Štoler, 2017). Rezultati ove metode izražavaju se kao ekvivalenti Troloxa ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilokroman-2-karboksilne kiseline), a s obzirom da postoje različite vrste antioksidansa koji različitim brzinama i kinetikama reagiraju s DPPH, također je moguće da se veličina uzoraka prilagodi tome da dođe do reakcije samo 50 % ukupne količine DPPH (Prakash, 2001).

## 2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST - FRAP METODA

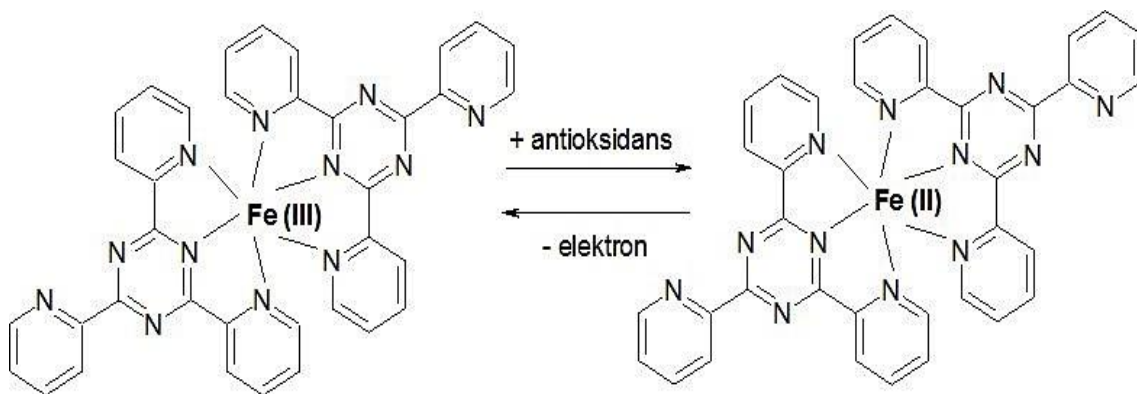
FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je jednostavna kolorimetrijska metoda koja služi za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Reakcija koja se odvija jest između supstrata (donor elektrona) i iona  $\text{Fe}^{3+}$  (akceptor elektrona) pri čemu dolazi do stvaranja iona  $\text{Fe}^{2+}$ . Redukcija se spektrofometrijski prati promjenom boje otopine  $\text{Fe}^{3+}$  s TPTZ (2,4,6-tris(2piridil)-s-triazinom), koji postaje plav i apsorbira elektromagnetsko zračenje na valnoj duljini 593 nm (Martins i sur., 2012). Glavna kemijska reakcija odvija se između  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2$  i molekule donora elektrona ArOH i glasi:



U FRAP testu nije potrebna prethodna obrada uzorka, stehiometrijski čimbenici su konstantni, linearnost se održava u širokom rasponu, obnovljivost je izvrsna i osjetljivost je visoka. Također, u FRAP testu nije potrebna visoko specijalizirana oprema ili vještina, niti kritična kontrola vremena i uvjeta reakcije (Benzie i Strain, 1999).

Kako bi se čim točnije i preciznije izmjerila reducirajuća snaga, moraju biti ispunjeni sljedeći uvjeti: 1) samo antioksidansi mogu reducirati  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2$  (III) u reakcijskim uvjetima, 2) brzina reakcije mora biti dovoljno brza da se reakcija može izvršiti u kratkom vremenu ispitivanja i 3) oksidirani antioksidans  $\text{ArOH}^{\bullet}$  i njegovi sekundarni produkti reakcije ne bi trebali apsorbirati na 593 nm, što je najveća apsorpcija  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2$  (II) (Ou i sur., 2002).

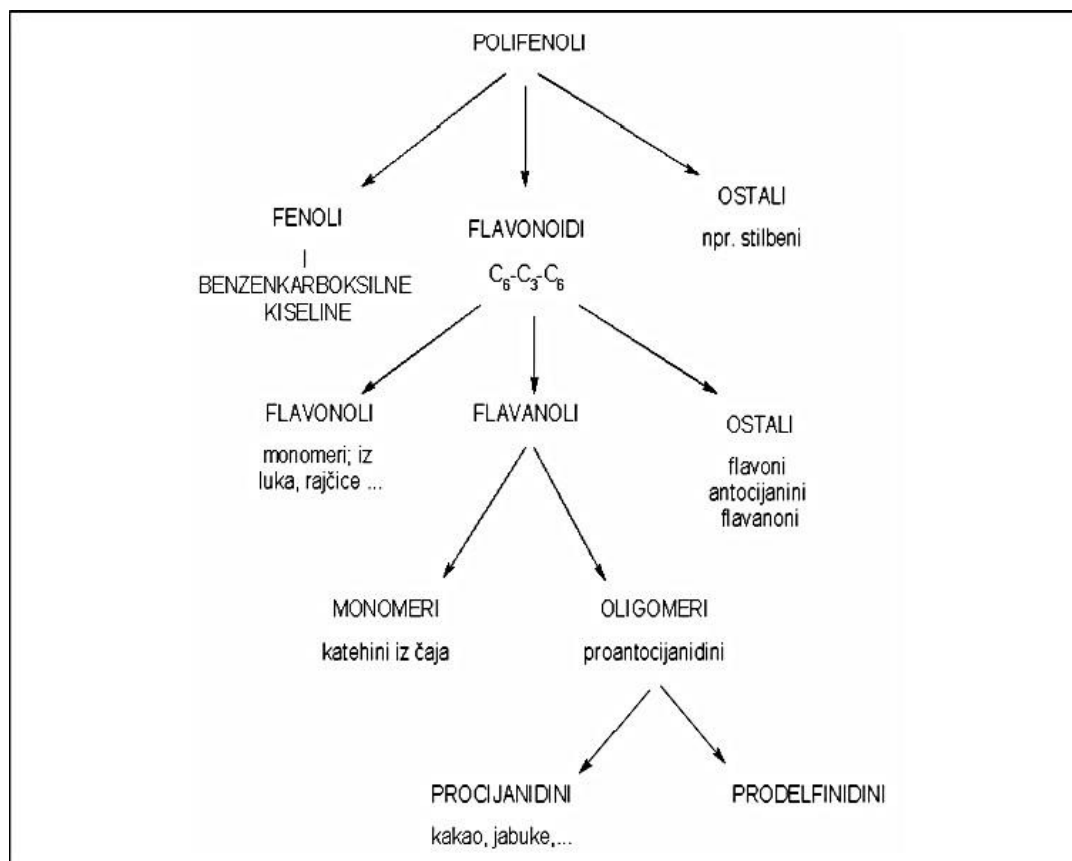
FRAP analiza mora se provoditi u kiselom području pri  $\text{pH} = 3,6$  kako bi se održala dobra topljivost željeza. Uslijed nižeg  $\text{pH}$  smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava redoks potencijal, koji dodatno omogućuje pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije  $\text{Fe}(\text{III})/\text{Fe}(\text{II})$  iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Štoler, 2017). Na slici 4. prikazan je oksidirajući i reducirajući oblik TPTZ-a.



Slika 4. Oksidirajući i reducirajući oblik TPTZ-a (Flaig i Zand, 2016)

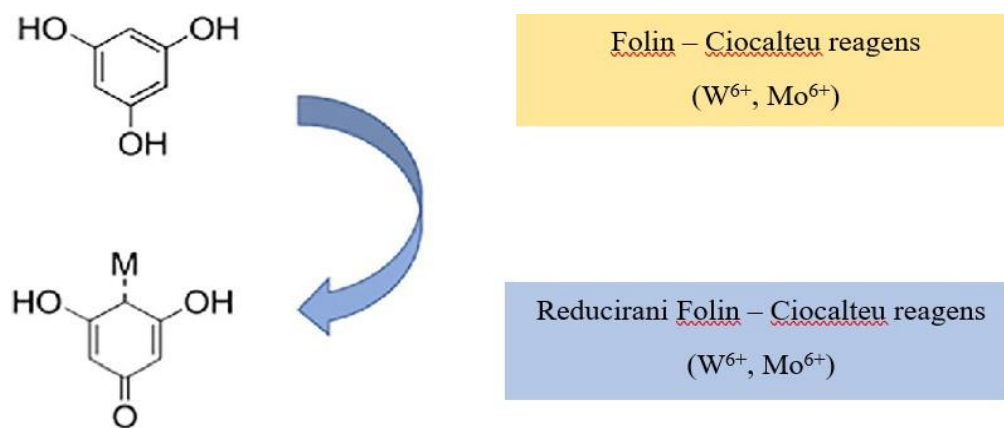
## 2.5. UKUPNI FENOLI

Fenolni spojevi u prirodi prisutni su u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla (Berend i Grabarić, 2008). U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju jednostavne fenole, fenolne kiseline (derivati benzojeve i cimetine kiseline), kumarine, flavonoide, stilbene, hidrolizirane i kondenzirane tanine, lignane i lignine (Blainski i sur., 2013). Osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Berend i Grabarić, 2008). Interes za fenolne spojeve povećao se zbog njihovih značajnih bioloških učinaka. Na slici 5. prikazana je podjela polifenola. Fenolni spojevi provode širok spektar metaboličkih aktivnosti, a one su: antioksidativno, protuupalno, protualegrijsko i protukancerogeno djelovanje, inhibicija agregacije trombocita i imunološke funkcije, sudjeluju u izravnoj zaštiti DNA i u promicanju apoptoze (Vazquez i sur., 2014).



Slika 5. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabrić, 2008)

Folin-Ciocalteu metoda je priznata, široko korištena metoda za kvantificiranje ukupnih fenolnih spojeva u različitim ekstraktima. To je kolorimetrijska metoda koja omogućuje analizu organskih spojeva koji imaju hidroksilirane aromatske spojeve (Vasquez i sur., 2014). Dolazi do reakcije polifenola i Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) u blago alkalnim uvjetima te dolazi do stvaranja relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa koji potom možemo spektrofotometrijski odrediti pri 750 nm (Berend i Grabrić, 2008). Reakcije redukcije Folin-Ciocalteu reagensa je vidljiva na slici 6. Međutim, ovaj se reagens brzo razgrađuje u alkalnim otopinama, zbog čega je potrebno koristiti višak reagensa da bi se dobila potpuna reakcija. Ovaj višak može rezultirati taloženjem i visokom mutnoćom, što onemogućava spektrofotometrijsku analizu. Da bi riješili ovaj problem, Folin i Ciocalteu uključili su litijeve soli u reagens, što je spriječilo zamućenje (Blainski i sur., 2013).



Slika 6. Reakcija redukcije Folin-Ciocalteu reagensa (Ford i sur., 2019)

## 2.6. SDS-PAGE ELEKTROFOREZA

Toplinska obrada mlijeka rezultira brojnim fizikalno-kemijskim promjenama na sastojcima mlijeka. Značajne promjene koje se događaju zagrijavanjem mlijeka iznad 60 °C uključuju denaturaciju proteina sirutke, interakcije između denaturiranih proteina sirutke i kazeinskih micela, pretvorbu topljivog kalcija, magnezija i fosfata u koloidno stanje. Razina tih promjena ovisi i o temperaturi i o duljini toplinske obrade (Jovanović i sur., 2007).

Kazein je glavna proteinska komponenta mlijeka te spada u skupinu toplinski stabilnih proteina jer ne koagulira kada je podvrgnut visokoj toplinskoj obradi te se sastoji od četiri frakcije:  $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein. Frakcija proteina sirutke sadrži četiri glavna proteina:  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, proteini krvnog seruma (BSA) i imunoglobulin (Ig). Osim glavnih proteina, proteini sirutke sadrže brojne manje frakcije kao što su proteoza-peptoni (PP), osteopontin, laktoferin te oko šezdeset različitih vrsta enzima. Proteini sirutke su toplinski labilni proteini. Toplina smanjuje njihovu stabilnost sljedećim redoslijedom: PP >  $\alpha$ -La >  $\beta$ -Lg > BSA > Ig. Kada su proteini sirutke izloženi visokim temperaturama, oni se nepovratno denaturiraju i zgrušavaju. Denaturacija proteina sirutke započinje na 65 °C, ali uglavnom se događa tijekom zagrijavanja mlijeka na temperaturama iznad 80 °C. Tijekom toplinske obrade proteini mlijeka mogu stvarati komplekse, odnosno agregirati. Razvija se proteinski kompleks između  $\alpha$ -La i  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La i  $\kappa$ -kazeina, kao i kompleks između  $\beta$ -Lg i  $\kappa$ -kazeina (Jovanović i sur., 2007). U tablici 2 prikazane su vrijednosti molekularnih masa proteina mlijeka. Iz tablice je vidljivo da se molekularna masa kazeina kreće u rasponu od 19 do 25 kDa. Najmanju

molekularnu masu ima  $\alpha$ -laktalbumin, dok najveću imaju albumini krvnog seruma (Lisak Jakopović, 2013).

Tablica 2. Molekularne mase proteina mlijeka (Lisak Jakopović, 2013)

<b>Protein</b>	<b>Molekularna masa (kDa)</b>
$\alpha_{s1}$ -kazein	23,00
$\alpha_{s2}$ -kazein	25,00
$\beta$ -kazein	24,00
$\kappa$ -kazein	19,00
$\alpha$ -laktalbumin	14,18
$\beta$ -laktoglobulin	18,36
Albumini krvnog seruma	66,40



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom radu kao glavni materijal korišteno je sirovo kozje mlijeko koje je tretirano na 7 različitih temperaturnih režima.

Kemikalije koje su korištene za određivanje titracijske kiselosti su 2 %-tni fenolftalein, 0,1 M NaOH i kobaltov sulfat  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Za određivanje mliječne masti metodom po Gerberu korišteni su  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i izoamilni alkohol. Za SDS PAGE analizu korištene su slijedeće kemikalije: akrilamid, amonij-persulfat (APS), bromfenol plavo, Coomassie Brilliant Blue, glicerol, glicin, izopropanol, kloridna kiselina, kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, EDTA), natrijev dodecilsulfat (SDS), octena kiselina, standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen), Tris (hidroksimetil)-aminometan i  $\beta$ -merkptoetanol. Pri određivanju ukupnog i slobodnog HMF-a korištene su 0,15 M oksalna kiselina, 40 %-tna trikloroctena kiselina (TCA) i 0,05 M TBA (2-tiobarbituratna kiselina).

Za pripremu uzorka mlijeka korišteni je 1 M HCl pripremljeni u 95 % etanolu (v/v, 15/85). Kod korištenja DPPH metode korišteni je  $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  DPPH otopljenog u 95 % etanolu, a u metodi s reagensom po Folin-Ciocalteu korišteni je FC reagens razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10 i 7,5 % (w/v) otopina natrijeva karbonata. U FRAP metodi određivanja antioksidacijskog potencijala bilo je potrebno pripremiti FRAP reagens 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). Svi pokusi su ponovljeni dva puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ponavljanja.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema uzorka

Sirovo kozje mlijeko je razdijeljeno u volumene od 100 mL i zagrijavano na 7 različitih temperaturnih režima koji su prikazi u tablici 3.

Tablica 3. Temperaturni režimi

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

Uzorci mlijeka tretirani na 63 – 65 °C /15 s, 63 – 65 °C/30 min, 72 °C/20 s, 85 °C/30 s i 90 – 95 °C/7 min zagrijavani su na magnetnom grijaču, dok su uzorci tretirani na 116 °C/16 min i 120 °C/5 min zagrijavani u autoklavu. Po završetku zagrijavanja, mlijeko je brzo ohlađeno pod mlazom tekuće hladne vode ili u hladnoj kupelji s ledom.

### 3.2.2. Određivanje fizikalno – kemijskih parametara kozjeg mlijeka

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

### 3.2.2.1. *Određivanje kiselosti mlijeka*

Kiselost mlijeka može se mjeriti određivanjem pH vrijednosti ili titracijom s lužinom. Osnovna razlika između ove dvije metode određivanja kiselosti je u tome, što prilikom mjerenja pH mjerimo aktivnu kiselost, odnosno mjerimo koncentraciju vodikovih iona prisutnih u mlijeku koji su nastali uslijed disocijacije sastojaka mlijeka. Kod određivanja titracijske kiselosti mjeri se i latentna kiselost koja potječe od momentalno nedisociranih kiselih sastojaka, koji imaju veliki puferski kapacitet (Božanić i sur., 2010).

Kod određivanja pH vrijednosti, kalibriran je pH metar, elektroda je isprana s vodom i uronjena u uzorak mlijeka. Nakon što se pH vrijednost ustalila na ekranu pH metra, očitao se pH.

Određivanje titracijske kiselosti provodi se metodom po Soxlet – Henkel-u. Metoda se zasniva na tome da se 20 mL mlijeka pomiješalo s 1 mL 2 % fenolftaleina i titriralo s 0,1 M NaOH do pojave crvenkaste boje koja je stabilna 1 min. Prije same analize, pripremljena je standardna boja koja predstavlja nijansu do koje se mlijeko titrira natrijevom lužinom. Standardna boja se pripremila tako da se u jednu Erlenmayerovu tikvicu otpipetiralo 20 mL istog uzorka mlijeka i dodalo 0,4  $\mu$ L 5 % otopine kobaltovog sulfata ( $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Božanić i sur., 2010).

Izračun titracijske kiselosti mlijeka provodio se prema izrazu:

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

gdje je  $a$  = mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 20 mL mlijeka,  $f$  = faktor otopine natrijeve lužine ( $\text{NaOH}$ ) =  $0,1 \text{ mol L}^{-1} = 1$ .

### 3.2.2.2. *Određivanje udjela mliječne masti butiriometrijskom metodom po Gerberu*

Metoda po Gerberu je butiriometrijska metoda i zasniva se na kemijskom otapanju kazeina i zaštitne opne globula masti sumpornom kiselinom i odvajanjem masti centrifugiranjem pri čemu se količina mliječne masti očita na skali butiriometra. U Gerberov butiriometar stavljeno je točno navedenim redoslijedom: 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 11 mL mlijeka + 1 mL izoamilnog alkohola. Butiriometar se začepio i dobro promućkao i zatim se stavio u centrifugu na brzinu od 1200 okretaja po minuti na 5 min. Nakon centrifugiranja, na skali butiriometra očitana je postotak mliječne masti (Božanić i sur., 2010).

### 3.2.2.3. Određivanje udjela laktoze metodom po Loof-Schoorlu

Laktoza se određivala metodom prema Loof-Schoorlu koja se bazira na redukciji metala iz alkalne otopine njihove soli, reducirajućim ugljikohidratima (u našem slučaju laktozom). U tikvicu s brušenim grlom stavljen je 1 mL uzorka mlijeka kojem se zatim dodalo 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključila na povratno hladilo i kuhala uz lagano vrenje točno 10 min. Vrijeme se mjeri nakon što prva kap kapne u tikvicu. Zatim se tikvica skinula, ohladila pod mlazom tekuće vode te je dodano 15 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida, a potom se oprezno i polako dodalo 25 mL 25 %-tne otopine sulfatne kiseline uz miješanje. Izlučeni jod titriran je s 0,1 mol L<sup>-1</sup> natrijevim tiosulfatom tako dugo dok boja uzorka nije prešla u žutu boju. Zatim se dodao 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i lagano je nastavljena titracija natrijevim tiosulfatom sve do prijelaza tamnoplave boje u putenastu koja je trebala biti stabilna nekoliko minuta. Usporedno je rađena i slijepa proba gdje se umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetiralo 25 mL destilirane vode, a dalje je sve rađeno na isti način kao i s uzorkom. U račun je uzet ukupan broj utrošenih mL natrijeva tiosulfata iz obje titracije (Božanić i sur., 2010). Izračun udjela laktoze se radio prema izrazu:

Slijepa proba troši x ml 0,1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Uzorak troši y ml 0,1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

$$(x-y) \cdot f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = z \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [2]$$

### 3.2.2.4. Određivanje gustoće mlijeka

Gustoća mlijeka određuje se pomoću laktodenzimetra. Mlijeko se nalilo do vrha menzure te se nakon toga laktodenzimetar uronio u mlijeko tako da je plivao u njemu. Kad se laktodenzimetar umirio, očitala se temperatura mlijeka i laktodenzimetarski broj. Ovisno o vrijednosti temperature potrebno je bilo korigirati laktodenzimetarski broj pomoću kojeg se odredila gustoća mlijeka. Ako se gustoća definira kao omjer gustoće neke tvari prema gustoći standardne tvari (obično voda maksimalne gustoće: pri 4 °C i tlaku od 1,01325 bara), onda je to "relativna gustoća" – bezdimenzionalni broj. Vrijednost °L<sub>korigirani</sub> uvrštena je kao zadnje dvije decimale relativne volumenske težine (Božanić i sur., 2010).

Izračun za korekciju:

$$T > 15 \text{ °C} \rightarrow \text{°L}_{\text{korigirani}} = \text{°L}_{\text{očitani}} + \{(\text{°C} - 15 \text{ °C}) \times 2\}$$

$$T < 15 \text{ °C} \rightarrow \text{°L}_{\text{korigirani}} = \text{°L}_{\text{očitani}} - \{(\text{°C} - 15 \text{ °C}) \times 2\}$$

$$\text{°L}_{\text{korigirani}} \rightarrow \text{RVT} = 1,0\_ \_ \quad [3]$$

### 3.2.2.5. Određivanje indeksa boje

Određivanje boje uzoraka provodilo se difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru CM-3500d. Izvor svjetla je pulsirajuća ksenon lampa koja je dizajnirana da daje standardni izvor svjetla D65. Neovisno o valnoj duljini, svjetlo reflektirano od uzorka se sakuplja u integrirajućoj sferi te se normalizira prema svjetlu izvora reflektancije. Zbog toga je potrebno prije svakog seta mjerenja kalibrirati uređaj s čisto bijelim standardom (100 %-tna refleksija) te crnim valjkom (0 % refleksije). U programu Spectramagic NX se podešavaju sve potrebne postavke. Mjerenje se provodilo tako da se svaki uzorak ulio u posudicu koja se poklopila s crnim valjkom maksimalne apsorpcije svjetlosti. Kao rezultat dobivene su  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti za svaki uzorak.

$\Delta E^*$  vrijednost pokazuje koliko neki proizvod odstupa od boje referentnog uzorka odnosno sirovog kozjeg mlijeka (tablica 4) te se računa po formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2} \quad [4]$$

$L^*$  - svjetlina boje ispitivanog uzorka u  $L^*a^*b^*$  sustavu

$a^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka

$b^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka

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

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

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

Tablica 4. Značenje razlika između izmjerene  $\Delta E^*$  vrijednosti i referentne (Gelo, 2019)

$\Delta E^*$	Značenje
0,00 - 0,05	Razlike u tragovima
0,50 - 1,50	Mala razlika
1,50 - 3,00	Primjetna razlika
3,00 - 6,00	Značajna razlika
6,00 - 12,00	Velika razlika
>12,00	Vrlo velika razlika

### 3.2.3. Određivanje udjela ukupnog i slobodnog HMF-a

#### 3.2.3.1. Priprema kemikalija

Za određivanje udjela slobodnog i ukupnog HMF-a korištene su 0,15 M oksalna kiselina, 40 % (w/v) trikloroctena kiselina i 0,05 M TBA. Za pripremu 0,15 M oksalne kiseline otopljeno je 3,5045 g oksalne kiseline u 500 mL destilirane vode. Za pripremu TCA otopljeno je 100 mL TCA u 250 mL destilirane vode, a za TBA otopljeno je 1,802 g u 250 mL destilirane vode.

#### 3.2.3.2. Postupak određivanja ukupnog HMF-a

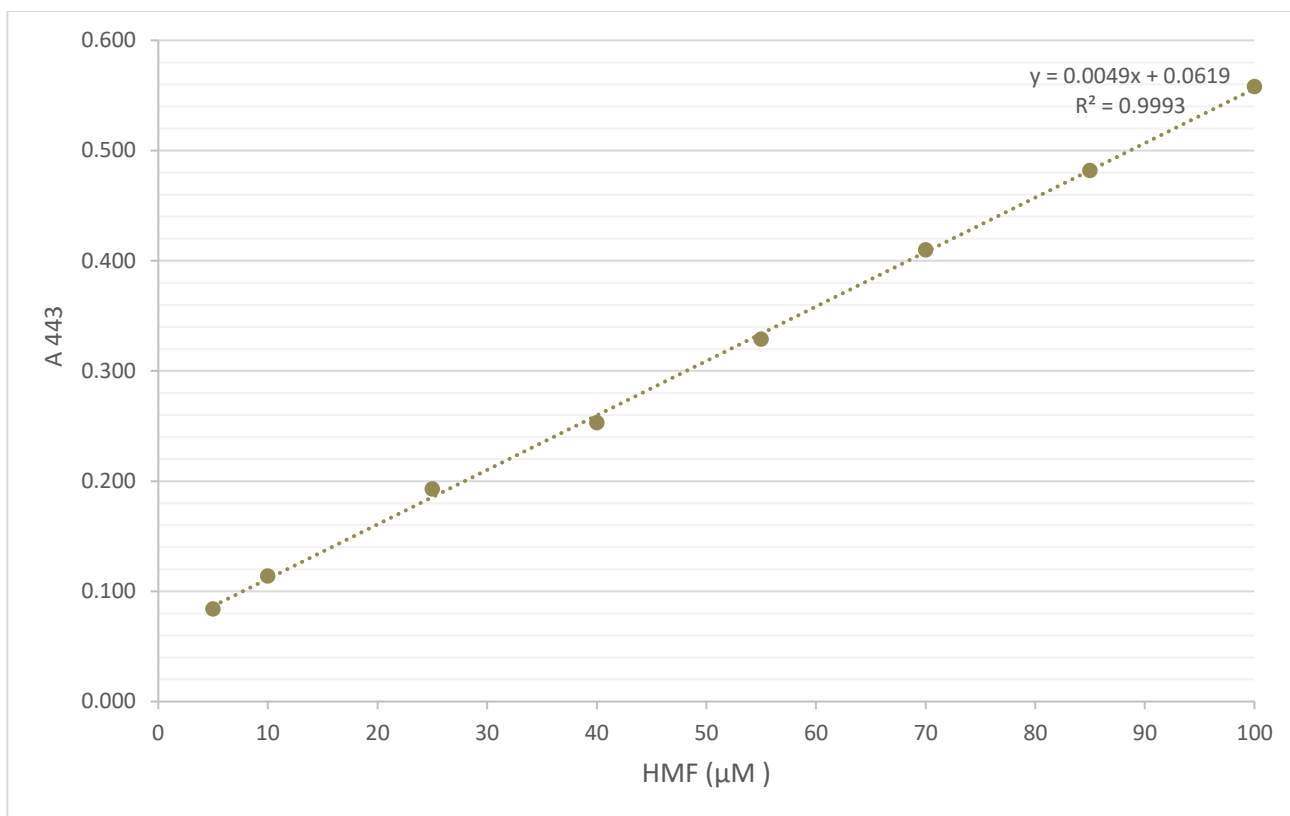
10 mL svakog uzorka mlijeka pomiješano je s 5 mL 0,15 M oksalne kiseline i zatim zagrijavano na 100 °C 1 h na magnetskoj miješalici. Uzorci su se zatim naglo ohladili u hladnoj kupelji i deproteinizirali dodatkom 5 mL 40 % (w/v) trikloroctene kiseline. Nakon deproteinizacije, uzorci su filtrirani kroz Whatmann filter papir broj 42. Zatim je pomiješano je 4 mL dobivenog filtrata s 1 mL 0,05 M TBA i inkubirano na 40 °C u trajanju od 30 min. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 443 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava destiliranu vodu i prolazi sve faze pripreme uzorka (Morales i sur., 1996).

#### 3.2.3.3. Postupak određivanja slobodnog HMF-a

10 mL svakog uzorka mlijeka pomiješano je s 5 mL 0,15 M oksalne kiseline te se smjesi odmah dodalo 5 mL 40 %-tne TCA. Dobivena otopina filtrirana je kroz Whatmann filter papir broj 42. Zatim je pomiješano 4 mL dobivenog filtrata s 1 mL 0,05 M TBA i inkubirano na 40 °C u trajanju od 30 min. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pi 443 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava destiliranu vodi i prolazi sve faze pripreme uzorka (Francisquini i sur., 2018).

#### 3.2.3.4. Postupak izrade baždarnog dijagrama za metodu određivanja udjela HMF-a

Baždarni dijagram je rađen tako da su uzete različite koncentracije standarda HMF-a od 5 do 100 µM i te su različite koncentracije očitane na valnoj duljini od 443 nm. Na temelju dobivenih vrijednosti nacrtan je baždarni dijagram (Morales i sur., 1996). Baždarni dijagram za kvantifikaciju ukupnog i slobodnog HMF-a prikazan je na slici 7. Nakon crtanja dijagrama, iz jednadžbe pravca izračunata je koncentracije HMF-a pri određenim apsorbancijama svakog uzorka mlijeka.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 443 nm (A443) o koncentraciji HMF-a ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )

3.2.4. Priprema supernatanta za određivanje antioksidacijske aktivnosti i udjela ukupnih fenola Pomiješan je 1 g mlijeka s 10 mL 1 M HCl koji je pripremljen u 95 %-tnom etanolu (v/v, 15/85) te se tako dobivena smjesa inkubirala na 30 °C 1 h u vodenoj kupelji uz uključenu tresilicu. Nakon toga, smjesa se centrifugirala pri 7800 g na 5 °C 15 min. Dobiveni supernatant može se čuvati u zamrzivaču na -20 °C do daljnje uporabe (Alyaqoubi i sur., 2014).

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom

#### 3.2.5.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za određivanje antioksidacijskog potencijala pomoću DPPH metode potrebno je svaki puta napraviti svježu  $6,0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  otopinu DPPH reagensa. Otopina je pripremljena tako da se na 100 mL 95 %-tnog etanola odvagunulo 0,00237 g DPPH.

#### 3.2.5.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

U epruveti se pomiješalo 0,1 mL prethodno dobivenog uzorka s 3,9 mL DPPH. Smjesa se ostavila na sobnoj temperaturi na mračnom mjestu 30 min i nakon toga očitala se apsorbancija u spektrofotometru na 517 nm. Slijepa proba sadrži umjesto uzorka otapalo, odnosno 95 %-tni etanol.

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

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

$A_o$  – A517 za slijepu probu (95 % etanol)

$A_s$  – A517 za uzorak (Sangsopha i sur., 2019).

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

#### 3.2.6.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Kemikalije i reagensi se pripremaju prema Benzie i Strain (1996). Potrebno je svaki puta pripremiti svježi FRAP reagens koji se sastoji od 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mmol TPTZ-a pripremljenog u 40 mmol HCl i 2,5 mL 20 mmol  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  u omjeru 10:1:1. Acetatni pufer i željezo (III) klorid heksahidrat nije potrebno svaki puta svježe pripremati. Odvagnuto je 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopunjeno do oznake s destiliranom vodom, a za acetatni pufer se odvagalo 3,1 g natrijevog acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijelo pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetiralo 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopunilo se destiliranom vodom do oznake.

Prije svakog mjerenja potrebno je svježe pripremati otopinu TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) za koji se odvagnulo 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopunilo do oznake s 40 mM HCl. Klorovodična kiselina se pripremila tako da se otpipetiralo 330  $\mu\text{L}$  37 %-tne klorovodične kiseline i nadopunilo destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

Nakon što su se pomiješale kemikalije u određenom omjeru, FRAP reagens se inkubirao na 37 °C na 30 min.

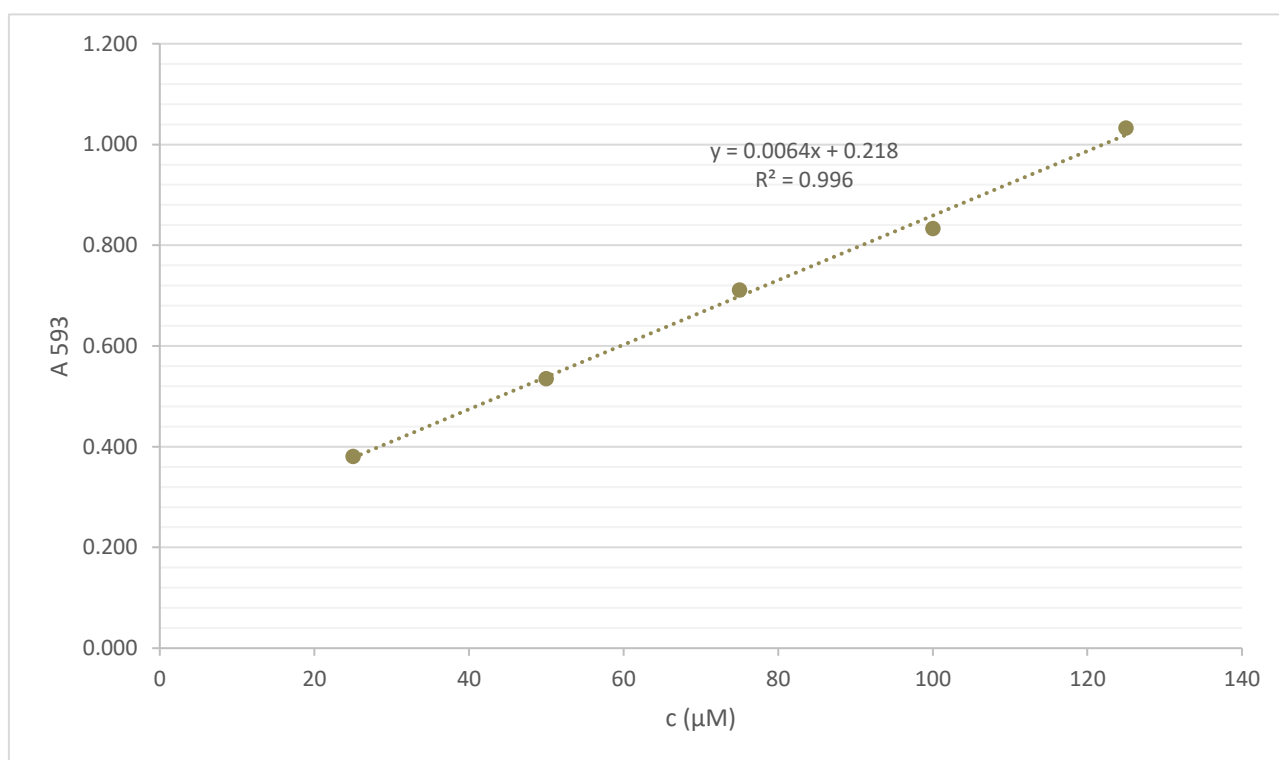
#### 3.2.6.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Pomiješalo se 3,4 mL dobivenog FRAP reagensa s 0,6 mL prethodno dobivenog ekstrakta i tako dobivena smjesa se inkubirala na 37 °C 60 min. Nakon toga, smjesi se očitala apsorbancija na 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka umjesto kojeg se stavlja otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran, odnosno stavio se 1 M HCl pripremljeni u 95 %-tnom etanolu.



### 3.2.6.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu

Za pripremu baždarnog pravca pripremila se 2 mmol L<sup>-1</sup> otopina Trolox-a od koje su se pripremila razrjeđenja u koncentracijama: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetiralo: 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvot (stock) otopine Trolox-a te do oznake nadopunilo destiliranom vodom. Daljnji postupak određivanja je identičan protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 0,6 mL uzorka dodalo 0,6 mL prethodno pripremljene koncentracije Troloxa. Rezultati se izražavaju u konačnici kao mg Trolox ekvivalenta mL<sup>-1</sup> (Sangsopha i sur., 2019). Baždarni dijagram za kvantifikaciju antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom prikazan je na slici 8.



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

### 3.2.7. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

#### 3.2.7.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Kemikalije i reagensi se pripremaju prema Singleton i sur. (1999). Folin-Ciocalteu reagens se pripremio tako da se razrijedio s destiliranom vodom u omjeru 1:10 i potrebno ga je svaki puta svježe pripremati. Također, za ovu metodu otopljeno je 7,5 g natrijeva karbonata u 100 mL destilirane vode za pripremu otopine natrijeva karbonata.

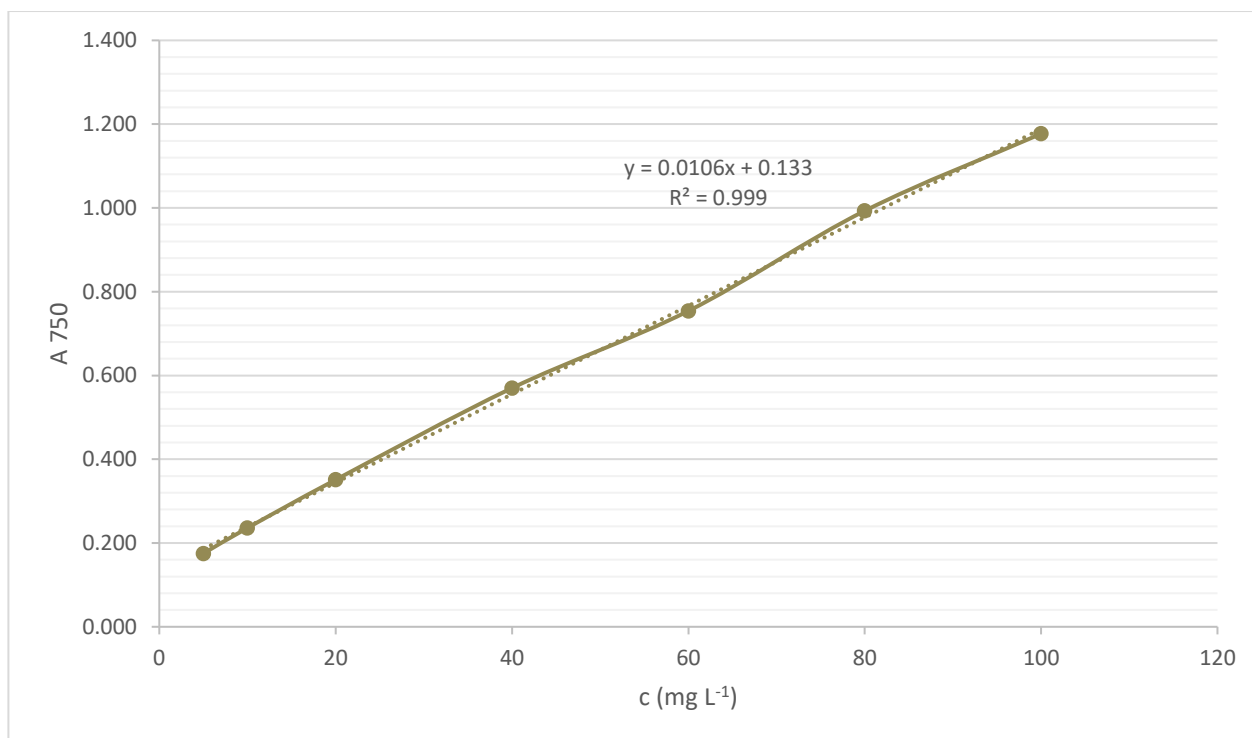
#### 3.2.7.2. Postupak određivanja ukupnih fenola s reagensom po Folin Ciocalteu

U epruvetu je redom dodano: 0,4 mL dobivenog ekstrakta, 1,6 mL Folin-Ciocalteu reagensa te je nakon otprilike 5 min dodano 2 mL otopine natrijeva karbonata. Dobivena smjesa se zatim dobro homogenizirala na vortexu i inkubirala na sobnoj temperaturi 2 h. Nakon 2 h izmjerena je apsorbancija na 750 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, a umjesto uzorka sadržava destiliranu vodu.

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

Za pripremu baždarnog pravca odvagano je 0,125 g galne kiseline koja se otopila u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernej tikvici od 100 mL i nadopunila se s destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline pripremljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se redom otpipetiralo 0,4, 0,8, 2, 4, 6 i 8 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunilo do oznake destiliranom vodom. U konačnici koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznosile su 50, 50, 75, 100 i 125 mg L<sup>-1</sup>.

Daljnji postupak određivanja je identičan protokolu za određivanje ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 0,4 mL uzorka dodalo 0,4 mL galne kiseline. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtan je baždarni dijagram i zatim su preko jednadžbe pravca preračunate vrijednosti za uzorke (Sangsopha i sur., 2019). Baždarni dijagram za kvantifikaciju udjela fenola sa reagensom po Folin - Ciocalteu prikazan je na slici 9.



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm ( $A_{750}$ ) o koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

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

U 15  $\mu\text{L}$  uzorka mlijeka je dodano 15  $\mu\text{L}$  2 x koncentriranog Laemmli pufera koji se sastoji od: 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 i 0,2 mL  $\beta$ -merkaptetanol. Tako priređeni uzorci su prokuhani 2,5 min. U međuvremenu je izvađen češljic iz prethodno pripremljenog 10 %-tnog poliakrilamidnog gela te je pripremljena aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu je dodano 400 mL pufera za elektroforezu (1x). Nakon kuhanja, 20  $\mu\text{L}$  uzorka je pomoću Hamilton igle nanešeno na 10 %-tni poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 190 V tijekom 45 min. Pritom je korišten standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) tijekom 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 %, v/v) do obezbojenja pozadine.

10 %-tni poliakrilamidni gel se sastoji od gela za razdvajanje (donji gel) i gela za sabijanje (donji gel). Gornji gel sastoji se od: 2,5 mL Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufera, 3 mL 30 %-tnog akrilamida, 2,5 mL destilirane vode, 5  $\mu\text{L}$  TEMED-a (N, N, N', N'-

terametiletildiamin) i 38  $\mu\text{L}$  10 %-tnog APS-a (monijev persulfat). Gornji gel se sastoji od: 2,13 mL Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufera, 0,3 mL 30 %-tnog akrilamida, 5  $\mu\text{L}$  TEMED-a i 22,5  $\mu\text{L}$  10 %-tnog APS-a.

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

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

Pufer za elektroforezu (10 x koncentrirana otopina) sastoji se od: 3,0 g Tris-a, 14,4 g glicina i 1,0 g SDS-a (natrijev dodecyl sulfat) te je nadopunjeno do 100 mL destiliranom vodom.

### 3.2.9. Određivanje električne provodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) mlijeka i salamure

Električna provodljivost i ukupne otopljene tvari određivane su pomoću konduktometra (TDS/Conductivity/ $^{\circ}\text{C}$  meter with RS-232 CON 200 series, Oacton, Singapur) na način da je elektroda uronjena u uzorak te je očitana vrijednost električne provodnosti i ukupne otopljene tvari. Nakon upotrebe, elektroda je isprana destiliranom vodom te posušena staničevinom. Mjerna jedinica u kojoj je izražena električna provodljivost je  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , dok se TDS izražava kao mg otopljenih tvari po litri uzorka.

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Excel (Windows 10) te su sve vrijednosti izražene kao prosjek dvaju mjerenja i pripadajuća standardna devijacija.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. FIZIKALNO – KEMIJSKI PARAMETRI KOZJEG MLIJEKA

U Tablici 5 prikazane su eksperimentalne vrijednosti fizikalno – kemijskih analiza kozjega mlijeka.

Tablica 5. Fizikalno – kemijski parametri kozjega mlijeka

Parametar	Sirovo kozje mlijeko
pH	6,79±0,06
°SH	6,60±0,00
Mliječna mast (%)	2,65±0,35
Laktoza (%)	4,70±0,00
Gustoća (g L <sup>-1</sup> )	1040,80±4,53
Proteini (g 100 g <sup>-1</sup> )*	2,97±0,01
Bezmasna suha tvar (g 100 g <sup>-1</sup> )*	8,62±0,01
Točka leđišta (°C)*	-0,5501±0,0010

Izmjerena pH vrijednost kozjega mlijeka je iznosila 6,79 pH jedinica što je u skladu s literaturom gdje je navedeno da pH vrijednost kozjega mlijeka u prosjeku iznosi oko 6,72 (Božanić i sur., 2018). Aktivna kiselost mlijeka se zbog puferskog kapaciteta kreće u užim granicama te može biti između 6,5 – 6,8 pH jedinica. Mlijeko ima relativno veliki puferski kapacitet (broj molova kiseline ili lužine da se pH vrijednost promijeni za jedinicu) na što većinski utječu kazein i topljivi fosfati te citrati (Babić, 2009).

Titracijska kiselost je iznosila 6,6 °SH, što je malo niže od prosjeka (6,8 °SH). Razlog nižoj titracijskoj kiselosti je najvjerojatnije što kozje mlijeko ima najmanji puferski kapacitet budući da ima i najmanji udjel kazeina.

\* Parametri određivani na uređaju MilkoScan.

Kao što je prethodno ustanovljeno udio mliječne masti u kozjem mlijeku varira od vrijednosti 2,5 do 6 %. U ovom istraživanju udio mliječne masti iznosi 2,65 % što je blizu donje granice. Razlog tomu je zato što je udjel masti i proteina sredinom laktacije puno niži nego na početku ili kraju laktacije.

Sadržaj laktoze iznosi 4,7 % što je i karakteristično za kozje mlijeko koje tijekom čitavog tijeka muznosti ima podjednak udio laktoze. Smanjenje laktoze ispod 4,5 % u mlijeku ukazuje na moguć razvoj subkliničkog mastitisa.

Prosječna vrijednost gustoće iznosi 1030,1 g L<sup>-1</sup>, dok je ovim istraživanjem iznosila 1040,8 g L<sup>-1</sup> što nije veliko odstupanje od prosjeka.

Udjel proteina iznosio je 2,97 %, što je niža vrijednost od prosjeka (3,10 %). Kao što je i prethodno napomenuto, količine proteina i masti uvelike se mijenjaju kroz laktaciju te je u početku uvijek veća količina proteina sirutke, a prema kraju laktacije se njihova količina smanjuje. Pošto je istraživanje provedeno upravo na kraju laktacije, tome se mogu pripisati manje količine proteina i mliječne masti. Udjel bezmasne suhe tvari također opada kroz laktaciju pa tako on iznosi 8,62 %, što je dosta niža vrijednost s obzirom da Božanić i sur. (2018) navode da je njezin udjel u prosjeku 11,94 %

Određivanje točke ledišta primjenjuje se za utvrđivanje patvorenja mlijeka vodom ili drugim vrstama mlijeka te kao pokazatelj kvalitete mlijeka. Točka ledišta kozjeg mlijeka niža je u odnosu na kravlje mlijeko za 0,04 °C, a ne bi smjela biti viša od -0,540 °C. Prema literaturnim podacima u različitim zemljama, točka ledišta kozjeg mlijeka iznosi od -0,54 do -0,596 °C (Antunac i Samaržija, 2000). U ovom istraživanju točka ledišta iznosi -0,5501 °C što je u skladu s literaturnim podacima.

Sljedeći parametar koji je određivan je indeks boje. Indeks boje određivan je na dva uzorka kozjeg mlijeka te su se kao uzorci koristili sirovo mlijeko i tretirani uzorci, a rezultati su vidljivi u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati određivanja indeksa boje

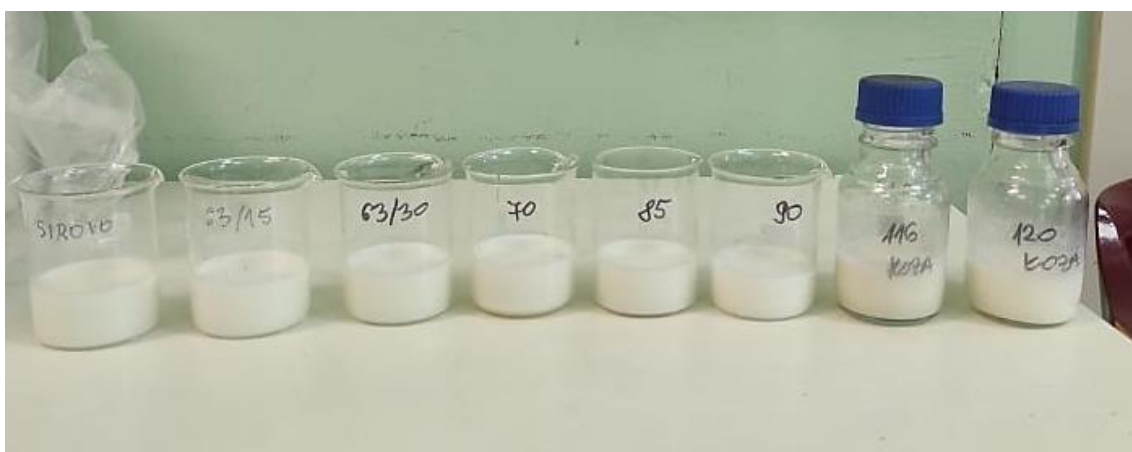
Uzorak	Prosječna vrijednost parametara $L^*a^*b^*$		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>Sirovo mlijeko</b>	87,54±0,89	-2,44±0,37	8,01±0,18
<b>63 °C/15 s</b>	88,11±1,29	-2,75±0,15	7,96±0,02
<b>63 °C/30 min</b>	88,16±2,31	-2,705±0,007	7,18±2,01
<b>72 °C/20 s</b>	88,99±0,42	-2,73±0,09	8,48±0,59
<b>85 °C/30 s</b>	89,08±0,91	-2,88±0,11	7,78±0,26
<b>90–95 °C/7 min</b>	89,53±1,48	-2,69±0,12	8,31±0,46
<b>116 °C/16 min</b>	85,70±0,60	-0,53±0,78	11,51±0,17
<b>120 °C/ 5min</b>	86,66±0,50	-1,13±1,16	9,47±1,17

$L^*$  predstavlja svjetlinu, odnosno skalu sive boje, pri čemu vrijednost 0 predstavlja potpuno crnu boju, a vrijednost 100 potpuno bijelu. Promatrajući dobivene vrijednosti može se vidjeti da svi pasteurizirani uzorci imaju višu  $L^*$  vrijednost u odnosu na sirovo mlijeko. Iz toga se može zaključiti da toplinski tretman utječe na promjenu boje. Najveća  $L^*$  vrijednost izmjerena je u uzorku tretiranom na 90 – 95 °C/7 min. Međutim, u steriliziranim uzorcima došlo je do smanjenja  $L^*$  vrijednosti u odnosu na sirovi uzorak. Najniža vrijednost  $L^*$  parametra izmjerena je u uzorku tretiranom na 116 °C/16 min. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da temperature toplinske obrade više od 100 °C utječu negativno na bijelu boju kozjeg mlijeka.

Parametar  $a^*$  ima raspon vrijednosti od -100 do +100, gdje negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji, dok pozitivne vrijednosti označavaju približavanje crvenoj boji. Sve izmjerene vrijednosti parametra  $a^*$  su negativne što znači da se približavaju zelenoj boji.

Uzorak tretiran na 85 °C/30 s daje više zelenu boju, dok se sterilizirani uzorci više približavaju 0 i samim time imaju najmanje vrijednosti parametra  $a^*$ .

Parametar  $b^*$  ima isti raspon vrijednosti, gdje -100 označava čisto plavu, a +100 čisto žutu boju. Svim uzorcima je izmjerena vrijednost veća od 0. Najviše vrijednosti parametra  $b^*$  izmjerene su u steriliziranim uzorcima, dok je najmanja vrijednosti izmjerena kod uzorka tretiranom na 63-65 °C/30 min. Na slici 10 prikazane su boje tretiranih uzoraka mlijeka u odnosu na sirovo kozje mlijeko. Vidljivo je da su sterilizirani uzorci malo potamnili u odnosu na ostale koji su očuvali svoju bijelu boju.



Slika 10. Promjena boje tretiranih uzoraka mlijeka (vlastita fotografija)

Tablicom 7 prikazane su izračunate  $\Delta E^*$  vrijednosti odnosno odstupanje boje toplinski tretiranih uzoraka od boje sirovog kozjeg mlijeka. Najveća odstupanja zabilježena su u steriliziranim uzorcima na 116 °C/16 min i 120 °C/5 min, dok je najmanje zabilježeno u uzorku tretiranom na 63-65 °C/30 min.

Tablica 7. Izračunate  $\Delta E^*$  vrijednosti

UZORAK	$\Delta E^*$
63-65 °C/15 s	15,98
63-65 °C/30 min	15,20
72 °C/20 s	16,56
85 °C/30 s	15,87
90 °C/7 min	16,44
116 °C/16 min	19,70
120 °C/5 min	17,55



#### 4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNOG I SLOBODNOG HMF-a

Tablicama 8 i 9 prikazani su rezultati koji su dobiveni mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra i izračunate koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a za sve uzorke mlijeka.

Tablica 8. Rezultati određivanja slobodnog HMF-a

<b>UZORAK</b>	<b>c <math>\mu\text{M}^{-1}</math></b>
Sirovo	7,16 $\pm$ 0,86
63 °C/15 s	6,86 $\pm$ 0,43
63 °C/30 min	16,65 $\pm$ 1,58
72 °C/20 s	5,61 $\pm$ 0,15
85 °C/30 s	10,74 $\pm$ 2,74
90 °C/7 min	7,06 $\pm$ 0,72
116 °C/16 min	<b>28,69<math>\pm</math>1,31</b>
120 °C/5 min	28,19 $\pm$ 5,78

Tablica 9. Rezultati određivanja ukupnog HMF-a

<b>UZORAK</b>	<b>c <math>\mu\text{M}^{-1}</math></b>
Sirovo	6,86 $\pm$ 2,45
63 °C/15 s	7,88 $\pm$ 1,30
63 °C/30 min	8,08 $\pm$ 3,61
72 °C/20 s	6,65 $\pm$ 0,72
85 °C/30 s	6,66 $\pm$ 0,15
90 °C/7 min	7,78 $\pm$ 0,29
116 °C/16 min	<b>35,23<math>\pm</math>18,03</b>
120 °C/5 min	26,76 $\pm$ 5,78

Maillardova reakcija od velike je važnosti u određivanju kvalitete mliječnih proizvoda podvrgnutih toplinskoj obradi i obrađenom mlijeku. Pretpostavlja se da su glavni reaktanti u mliječnim proizvodima laktoza i proteini te također sve amino skupine fosfolipida imaju mogućnosti ulaska u reakciju. Postoje dva načina na koja HMF nastaje: iz Amadori spojeva ili iz izomerizacije laktoze, i reakcije razgradnje koje slijede. Za mjerenje koncentracije HMF-a u mlijeku korišten je test s TBA. Metodom se mjeri HMF oslobođen dehidracijom iz heksoza (slobodnih ili povezanih s bjelančevinama, npr. Amadori proizvodi) putem 1,2 enolizacije uz gubitak tri molekule vode u kipućoj oksalnoj kiselini (Morales i sur., 1996). Provedeni test s TBA nešto je manje pouzdan od suvremenih instrumentalnih metoda poput HPLC ili LCMS, ali omogućuje procjenu intenziteta toplinske obrade i kvalitete mlijeka te procjenu varijabli skladištenja proizvoda.

Sukladno očekivanjima, količina HMF-a rasla je s intenzitetom obrade. Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablicama 8 i 9 može se vidjeti da je ova tvrdnja dokazana. Najveće količine HMF-a, i slobodnog i ukupnog, prisutne su u uzorcima mlijeka koji su tretirani na temperaturama višim od 100 °C, odnosno u steriliziranim uzorcima. Koncentracija i ukupnog i slobodnog HMF-a najviša je u uzorku tretiranom na 116 °C 16 min. U pasteriziranim uzorcima su prisutne relativno niske koncentracije HMF-a, međutim najveća koncentracija i ukupnog i slobodnog HMF-a izmjerena je kod uzorka koji je tretiran na 63 – 65 °C 30 min. HMF otkriven u nezagrijanim uzorcima (sirovo mlijeko) nastao je tijekom analitičkog postupka zbog kiselih uvjeta i korištene temperature. Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjem Morales i sur. (1996), gdje su najmanje koncentracije HMF-a izmjerene u pasteriziranim uzorcima kravljeg mlijeka ( $2,1 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ), dok su najveće zabilježene u steriliziranom mlijeku ( $17,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ).

Na nastanak HMF-a utječu različite varijable kao što su kemijska struktura reaktanta, pH, aktivnost vode te temperatura i vrijeme (Morales i sur., 1996). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su najveće koncentracije HMF-a izmjerene u uzorcima gdje je prisutno dulje vrijeme toplinske obrade. Zato sterilizirani uzorak tretiran na većoj temperaturi (116 °C) u duljem vremenu (16 min) ima najveće koncentracije i slobodnog i ukupnog HMF-a. Od pasteriziranih uzoraka onaj koji ima najveću koncentraciju slobodnog i ukupnog HMF-a je onaj koji je tretiran 30 min. Najmanje koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerene su u uzorcima koji su tretirani na 72 °C 20 s.

Ono što odstupa od tvrdnje da koncentracija HMF-a raste s porastom intenziteta obrade jest da je u nekim slučajevima došlo do smanjenja koncentracije HMF-a u odnosu na sirovo mlijeko. Kod mjerenja slobodnog HMF-a u uzorcima tretiranim na 63 °C/15 min, 72 °C/20 s i 90 °C/7

min došlo je do navedenog smanjenja koncentracije, dok je u uzorcima tretiranim na 72 °C/20 s i 85 °C/30 s došlo do smanjenja koncentracije ukupnog HMF-a. Iz ovih rezultata može se zaključiti da navedeni toplinski tretmani utječu na smanjenje koncentracije HMF-a.

#### 4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Tablica 10. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

UZORAK	% DPPH REDUKCIJE
Sirovo	<b>34,54±0,25</b>
63 °C/15 s	31,50±0,30
63 °C/30 min	31,58±0,23
72 °C/20 s	27,99±2,25
85 °C/30 s	30,68±0,24
90 °C/7 min	30,75±0,34
116 °C/16 min	29,28±8,93
120 °C/5 min	32,09±5,61

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva. U biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala kad je njihova koncentracija viša nego što je to potrebno za odvijanje normalnih fizioloških reakcija. Djeluju tako da inaktiviraju slobodne radikale i onemogućuju lančanu reakciju nastanka novih radikala te tako sprječavaju njihovo štetno djelovanje na organizam (Halliwell, 1990).

Uspoređujući rezultate dobivene u sirovom mlijeku s tretiranim uzorcima, vidljivo je da toplinski tretmani smanjuju postotak DPPH redukcije radikala. Pad nije linearan, međutim nisu niti velike razlike u vrijednostima postotka redukcije. Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena je u sirovom uzorku kozjeg mlijeka. Uspoređujući netretirani uzorak mlijeka sa tretiranima, najmanja antioksidacijska aktivnost izmjerena je u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s, dok je u uzorku tretiranom na 120 °C/5 min izmjerena najveća antioksidacijska aktivnost.

Prema istraživanju Alyaqoubi i sur. (2014) nisu pronađene značajne razlike između srednjih vrijednosti antioksidativne aktivnosti steriliziranih i pasteriziranih uzoraka mlijeka. Nasuprot tome, srednje vrijednosti antioksidativne aktivnosti tretiranih uzoraka bile su značajno niže od onih u

sirovom mlijeku.

Niža antioksidativna aktivnost toplinski obrađenih uzoraka od sirovog mlijeka ilustrira smanjenje udjela fenola i flavonoidnih spojeva u obrađenim uzorcima mlijeka. Također, sposobnost toplinski obrađenih uzoraka da uklone i unište lanac slobodnih radikala je slabija od uzorka sirovog kozjeg mlijeka. Prethodna istraživanja govore da pasterizacija i sterilizacija negativno utječu na ukupnu koncentraciju polifenola zbog moguće denaturacije sadržaja fenola i katabolizma aminokiselina. Te razlike u antioksidacijskoj aktivnosti mogu se prepisati većem udjelu proteina seruma i manjem udjelu albumina u toplinski obrađenim uzorcima tijekom denaturacije izazvane toplinskim stresom. Udjel albumina se smanjuje zbog njegove velike osjetljivosti na toplinsku obradu (Alyaqoubi i sur., 2014).

#### 4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Tablica 11. Prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

UZORAK	c $\mu\text{M}^{-1}$
Sirovo	41,64±6,08
63 °C/15 s	41,88±9,50
63 °C/30 min	43,83±4,33
72 °C/20 s	40,16±0,66
85 °C/30 s	44,61±1,65
90 °C/7 min	46,72±2,21
116 °C/16 min	58,44±2,43
120 °C/5 min	<b>78,60±32,48</b>

Uspoređujući rezultate dobivene provođenjem DPPH metode i FRAP metode, vidljivo je da nema značajnih odstupanja bez obzira što se rezultati kod DPPH metode izražavaju preko postotka, dok se kod FRAP metode izražavaju kao ekvivalenti koncentracije standarda Trolox ( $\mu\text{M}$ ).

Iz tablice 11, vidljivo je da je u FRAP metodi također najmanja koncentracija Troloxa izmjerena u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s, a najveća kod steriliziranog uzorka na 120 °C/5 min. S obzirom na ove rezultate, metode se međusobno poklapaju. Međutim, kod DPPH metode dolazi

do opadanja postotka DPPH redukcije radikala s obzirom na sirovi uzorak mlijeka, dok kod FRAP metode dolazi do porasta koncentracije Troloxa u većini uzoraka u odnosu na sirovo mlijeko. Odnosno, u DPPH metodi dolazi do pada antioksidacijske aktivnosti uslijed toplinske obrade, a kod FRAP metode dolazi do porasta. Može se zaključiti da su za povećanje antioksidacijske aktivnosti najvjerojatnije odgovorni određeni produkti Maillardovih reakcija neenzimskog tamnjenja, a koji iskazuju određenu antioksidacijsku aktivnost.

Razlike između rezultata metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti se mogu objasniti drugačijim principima na kojima se temelje metode. Metoda DPPH uključuje sposobnost vezanja slobodnih radikala od strane antioksidansa, dok FRAP metoda uključuje sposobnost antioksidansa da reducira ion željeza (mjeri redukcijski kapacitet), iako su obje reakcije temeljene na mehanizmu izmjene elektrona (redoks reakcije). Međutim, kao što je navedeno toplinskom obradom nastaju spojevi koji ulaze u reakciju s FRAP reagensom, odnosno koji djeluju kao antioksidansi. Dok je s druge strane aktivnost mjerena DPPH metodom padala što je vezano uz antioksidacijsku aktivnost sastojaka koji su prisutni u mlijeku od početka i dešava se ono što se očekivalo – povećanjem intenziteta toplinske obrade smanjuje se antioksidacijska aktivnost svojstvena mlijeku.

Prema Thaipong i sur. (2006) koji su uspoređivali rezultate različitih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka metanolnog ekstrakta guava voća, utvrđeno je da rezultati između DPPH metode i FRAP metode ne pokazuju značajna odstupanja.

#### 4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA FENOLA FOLIN–CIOCALTEU METODOM

Tablica 12. Rezultati određivanja udjela fenola Folin–Ciocalteu metodom

UZORAK	c $\mu\text{M}^{-1}$
Sirovo	35,96±0,47
63 °C/15 s	33,27±6,14
63 °C/30 min	32,53±0,60
72 °C/20 s	31,20±8,54
85 °C/30 s	<b>38,51±11,81</b>
90 °C/7 min	34,74±14,74
116 °C/16 min	32,52±0,80
120 °C/5 min	36,20±7,74

Fenoli i polifenoli jači su antioksidansi od vitamina te predstavljaju važne antioksidanse u prehrani koja se često konzumira. Na sadržaj polifenola u kozjem mlijeku utječe način prehrane koze. Dokazana je pozitivna korelacija u kozjem mlijeku između unošenja krme i antioksidativnih komponenata, uglavnom flavonoida, poput rutina i kvercetina (Perna i sur., 2018).

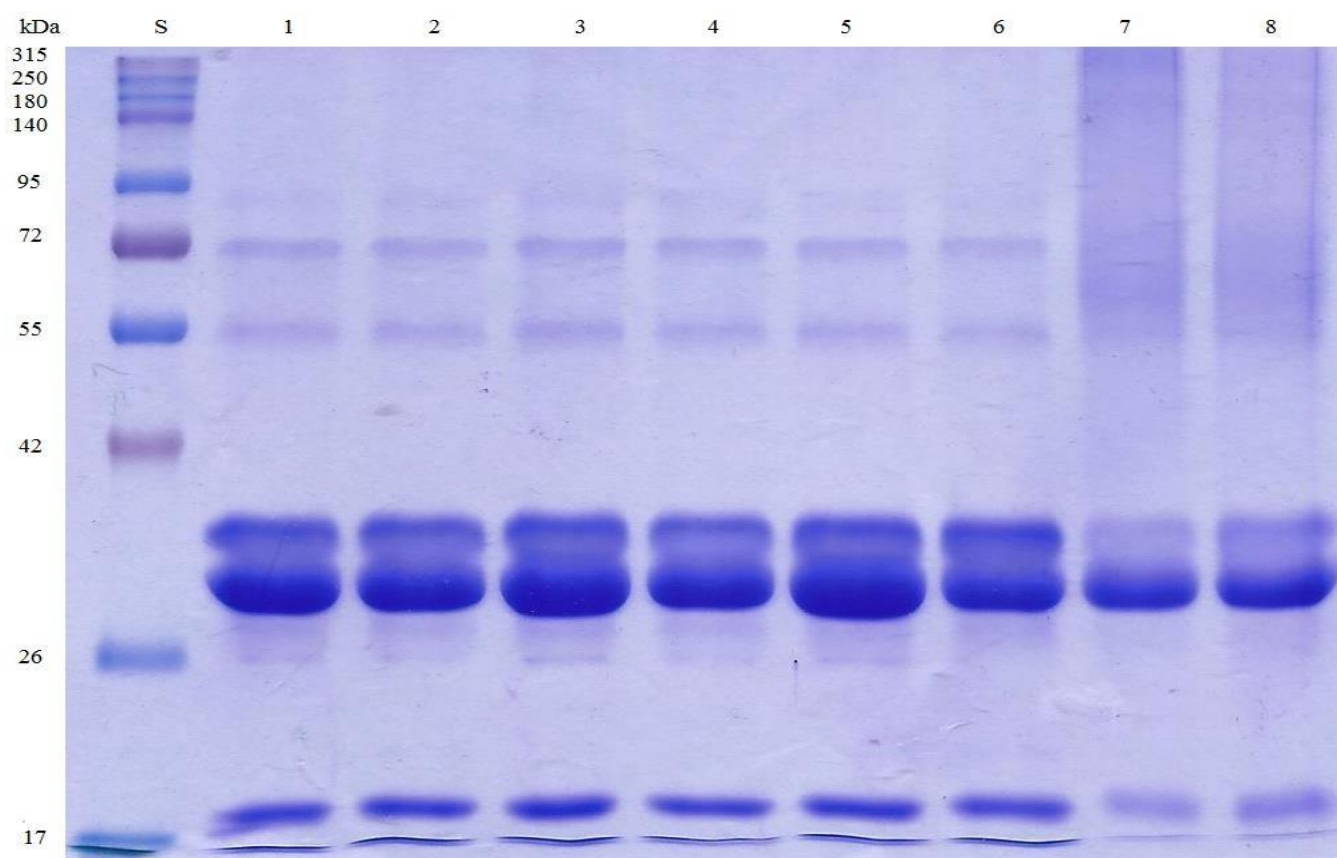
Iz rezultata prikazanih u tablici 12, može se vidjeti da sirovo kozje mlijeko sadrži visoku koncentraciju fenolnih spojeva. Uslijed toplinske obrade mlijeka u većini slučajeva došlo je do smanjenja koncentracije fenola. Međutim, u uzorcima tretiranim na 85 °C/30 s i 120 °C/5 min došlo je do povećanja koncentracije. Rezultati određivanja ukupnih fenola u toplinski tretiranim uzorcima ukazuju na to da se najveći antimikrobni učinak, koji se pripisuje fenolima, očekuje kod steriliziranog uzorka na 120 °C/5 min, a najmanji u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s.

Također, uočena je značajna korelacija između određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH i FRAP metoda i udjela fenola. Ako usporedimo sve dobivene rezultate, najveća antioksidacijska aktivnosti i najveći udio fenola izmjereni su u sva tri slučaja u steriliziranom uzorku tretiranom na 120 °C/5 min. Dok su najmanje vrijednosti izmjerene u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s. Iz tih rezultata, pozitivna korelacija između udjela fenola i antioksidacijske aktivnosti među svim ispitivanim uzorcima ukazuje na važnost udjela fenola na sadržaj antioksidansa.

Folin-Ciocalteu reagens ne reagira samo s fenolima, već općenito s tvarima koje djeluju reducirajuće što uključuje i neke spojeve koji sadržavaju dušik, poput hidroksilamina i gvanidina. U istraživanju Everette i sur. (2010) testirana je reaktivnosti Folin-Ciocalteu reagensa prema različitim spojevima. Od testiranih aminokiselina, samo su tirozin, triptofan i cistein pokazali značajnu reaktivnost prema reagensu. Budući da kozje mlijeko sadržava veće količine cisteina, moguće je da je on odgovaran za reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom.

#### 4.6. REZULTATI SDS – PAGE ELEKTROFOREZE

Na slici 11 prikazani su rezultati provođenja SDS-PAGE elektroforeze.



Slika 11. Prikaz rezultata SDS-PAGE elektroforeze (Linija 1 – sirovo mlijeko; linija 2 – uzorak tretiran na 63-65 °C/15 s; linija 3 – uzorak tretiran na 63-65 °C/30 min; linija 4 – uzorak tretiran na 72 °C/20 s; linija 5 – uzorak tretiran na 85 °C/230 s; linija 6 – uzorak tretiran na 90-90 °C/7 min; linija 7 – uzorak tretiran na 116 °C/16 min i linija 8 – uzorak tretiran na 120 °C/5 min)

SDS-PAGE elektroforezom detektirana su 4 glavna banda:  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, kazein i albumini krvnog seruma. Band od kazeina dijeli se na četiri frakcije:  $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein. Bandovi u sirovom uzorku su jasno vidljivi, dok kod tretiranih uzoraka su deblji i razlijaniji što znači da je došlo do denaturacije proteina.

Na slici 12 može se vidjeti da položaj najjače pruge na gelu odgovara molekularnoj masi od 26 do 40 kDa i predstavlja kazein. Ovaj položaj pruge ne odgovara teoretskoj molekularnoj masi kazeina koja se kreće od 19 do 25 kDa. Molekularna masa od 26 kDa odgovara  $\kappa$ -kazeinu te se vidi iz slike 12 da s porastom temperature sve više denaturira. Frakcija kazeina kozjeg mlijeka koje ima najviše je  $\beta$ -kazein i njegova molekularna masa iznosi oko 30 kDa, dok je najveća frakcija  $\alpha$ -kazein. Obje frakcije najjače denaturiraju u steriliziranim uzorcima, što je bilo i očekivano s obzirom da je kazein termostabilan protein.

Najslabija pruga na gelu odgovara molekularnoj masi od 17 kDa, koja se odnosi na  $\alpha$ -laktalbumin. Međutim, ne odgovara teoretskoj molekularnoj masi  $\alpha$ -laktalbumina koja iznosi 14 kDa. U pasteriziranim uzorcima,  $\alpha$ -laktalbumin najviše je denaturirao u uzorku 4, odnosno na 72 °C/20 s. Sljedeća pruga na gelu odgovara molekularnoj masi od 19 kDa i odgovara teoretskoj molekularnoj masi  $\beta$ -laktoglobulina. U pasteriziranim uzorcima,  $\beta$ -laktoglobulin je najviše denaturirao u uzorcima 4 i 6, odnosno na 72 °C/20 s i 95 °C/7 min. Rezultati denaturacije  $\alpha$ -laktalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina ispali su prema očekivanjima s obzirom da proteini sirutke denaturiraju već na 60 °C. Proteini kojima je detektirana najveća molekularna masa od 55 do 72 kDa su albumini krvnog seruma koji u pasteriziranim uzorcima nisu denaturirali.

Kod steriliziranih uzoraka došlo je do denaturacije svih proteina, ali i međusobne agregacije denaturiranih proteina te su nastali kompleksi koji imaju veličinu od 55 kDa pa čak do 315 kDa što znači da su pomoću SDS-a detektirane velike molekule.



#### 4.7. REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTRIČNE PROVODLJIVOST I TDS-aMLIJEKA I SALAMURE

U odnosu na kravlje, kozje mlijeko ima višu električnu vodljivost. Budući da električna vodljivost raste s koncentracijom otopljenih iona u otopini tako i kozje mlijeko ima veću vodljivost budući da sadrži klor u višim koncentracijama u odnosu na kravlje mlijeko. Električna vodljivost smanjuje se s povećanjem udjela mliječne masti (Časek, 2010). Rezultati određivanja električne provodljivost i TDS-a prikazani su u tablici 13.

Tablica 13. Rezultati određivanja električne provodljivost i TDS-a mlijeka i salamure

UZORAK	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	Provodljivost (μS cm <sup>-1</sup> )
Sirovo	346±14,14	699,5±27,58
63-65 °C/15 s	340,5±3,54	698,5±21,92
65-65 °C/30 min	316±15,56	642±15,56
72 °C/20 s	346±5,66	699±16,67
85 °C/30 s	295,5±26,16	655±8,49
90 °C/7 min	363,5±9,19	740,5±20,51
116 °C/16 min	304,5±13,44	624±14,14
120 °C/5 min	350,5±4,95	711±5,66

Što se tiče ukupnih otopljenih tvari, iz rezultata se vidi da ih je najviše prisutno u uzorcima tretiranim na 90 °C/7 min i 120 °C/5 min. U odnosu na udjel ukupnih otopljenih tvari u sirovom uzorku, vidljivo je da je došlo do povećanja TDS-a, odnosno došlo je do povećanja koncentracije otopljenih iona. Najmanja koncentracija zabilježena je u uzorku tretiranom na 85 °C/30 s.

Najveća električna vodljivost je zabilježena na istim uzorcima kao i najveća koncentracija ukupnih otopljenih tvari, a to su uzorci tretirani na 90 °C/7 min i 120 °C/5 min. Dok je najmanja vodljivost zabilježena u steriliziranom uzorku na 116 °C/16 min.

Iz ovih rezultata možemo zaključiti da toplinski tretmani uzrokuju povećanje koncentracije ukupnih otopljenih tvari, a povećanjem TDS-a povećava se i električna vodljivost kozjeg mlijeka.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara kao što su pH vrijednost (6,79), °SH vrijednost (6,60), gustoća (1040,80 g L<sup>-1</sup>), točka ledišta (-0,5501 °C) i udio laktoze (4,70 %) odgovaraju prosječnim vrijednostima, dok su vrijednosti mliječne masti (2,65 %), proteina (2,97 g 100 g<sup>-1</sup>) i bezmasne suhe tvari bile niže od prosječnih što se prepisuje stadiju laktacije tijekom kojeg se uzeo uzorak mlijeka.
2.  $\Delta E^*$  vrijednosti svih tretiranih uzoraka su veće od 12 što znači da je razlika boje tretiranih uzoraka u odnosu na referentni uzorak (sirovo kozje mlijeko) vrlo velika. Najveća odstupanja zabilježena su u steriliziranim uzorcima na 116 °C/16 min i 120 °C/5 min, dok je najmanje zabilježeno u uzorku tretiranom na 63-65 °C/30 min.
3. Porastom intenziteta obrade raste udjel slobodnog i ukupnog HMF-a u uzorcima mlijeka. Najveće koncentracije slobodnog i ukupnog HMF-a izmjerene su u steriliziranim uzorcima na temperaturama iznad 100 °C, dok su najmanje koncentracije izmjerene u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s te se smatra najpovoljnijim tretmanom u slučaju određivanja ukupnog i slobodnog HMF-a.
4. DPPH metodom utvrđeno je da pasterizacija i sterilizacija negativno utječu na antioksidacijsku aktivnost kozjeg mlijeka, odnosno ona se smanjuje. Najveći postotak DPPH redukcije radikala zabilježen je u uzorku tretiranom na 120 °C/5 min, dok je najmanji postotak prisutan u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s.
5. FRAP metodom utvrđeno je da toplinski tretmani povećavaju vrijednosti ovako izmjerene antioksidacijske aktivnosti sastojaka kozjeg mlijeka. Najveća koncentracija izmjerena je u uzorku tretiranom na 120 °C/5 min, dok je najmanja u uzorku tretiranom na 72 °C/20 s, isto kao i kod DPPH metode. Za povećanje antioksidacijske aktivnosti najvjerojatnije su odgovorni određeni produkti Maillardovih reakcija, a koji iskazuju određenu antioksidacijsku aktivnost.
6. Razlike između rezultata metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti mogu se objasniti drugačijim principima na kojima se temelje metode. Metoda DPPH uključuje sposobnost vezanja slobodnih radikala od strane antioksidansa, dok FRAP metoda uključuje sposobnost antioksidansa da reducira ion željeza (mjeri redukcijski kapacitet), iako su obje reakcije temeljene na mehanizmu izmjene elektrona (redoks reakcije).
7. Toplinska obrada smanjuje koncentraciju fenola u kozjem mlijeku. Međutim, u uzorcima tretiranim na 85 °C/30 s i 120 °C/5 min došlo je do povećanja izmjerenih

vrijednosti što se može pripisati vjerojatnom nastanku spojeva koji ulaze u interakcije s Folin Ciocalteu reagensom.

8. Toplinski tretmani uzrokuju denaturaciju proteina sirutke i kazeina. Najviši stupanj denaturacije je zabilježen u steriliziranim uzorcima gdje je došlo i do agregacije denaturiranih proteina.
9. Toplinski tretmani uzrokuju povećanje koncentracije ukupnih otopljenih tvari, a povećanjem TDS-a povećava se i električna vodljivost kozjeg mlijeka. Najveće koncentracije su zabilježene u uzorcima tretiranim na 90 °C/7 min i 116 °C/16 min.
10. Kada se uzmu u obzir sve provedene analize, temperaturni tretman koji bi bio najbolji za obradu kozjeg mlijeka je na 72 °C/20 s. U ovim uzorcima izmjerena je najmanja koncentracija ukupnog i slobodnog HMF-a, ne dolazi do značajne denaturacije proteina te su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti i koncentracije fenola najmanje različite u usporedbi sa sirovim kozjim mlijekom.

## 6. LITERATURA

- Alyaqoubi, S., Abdullah, A., Samudi, M., Abdullah, N., Radhi Addai, Z., Al-ghazali, M. (2014) Effect of Different Factors on Goat Milk Antioxidant Activity. *Int. J. Chemtech Res.* **6**, 3091-3196.
- Anonymous 1, <<https://bioquochem.com/antioxidant-capacity/dpph-assay-kit/>> Pristupljeno: 16.srpnja 2021.
- Antunac, N., Samaržija, D. (2000) Proizvodnja, sastav i osobine kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo*. **1**, 55-66.
- 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.
- Babić, M (2009) Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka bakterijom *Lactobacillus casei* – 01, Osijek.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999) Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.* **299**. 15-27.
- Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Zagreb.
- Blainski, A., Lopes, G.C., Palazzo de Mello, J.C. (2013) Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. **18**, 6852-6865.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Zagreb.
- Božanić R., Lisak Jakobović K., Barukčić I. (2018) *Vrste mlijeka*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Božanić, R., Tratnik, Lj., Drgalic I. (2002) Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo*. **3**, 207-237.
- Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) *Azospirillum* spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for Azospirillum, (Cassan i sur., ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.
- Časek, D. (2010) Sastav, svojstva i primjena kozjeg mlijeka, Zagreb.

FAO (1998): Yearbook of Production 1997, Vol. 51. FAO Statistics Series No. 142, FAO, UN, Rome, Italy, p. 239.

Flaig, D., Zand, A. (2016) Surface Engineering of Chitosan and Polyethylene Bags using Atmospheric Pressure Plasma as Novel Materials for Food Packaging.

Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G.N., Walsh, P.J. (2019) A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Photochem Anal.* 1-13.

Francisquini, J. d'A, Neves, L. N., Torres, J. K., Carvalho, A. F., Perrone, I. T., da Silva, P. H. F. (2018) Physico-chemical and compositional analyses and 5-hydroxymethylfurfural concentration as indicators of thermal treatment intensity in experimental dulce de leche. *Journal of Dairy Research*, 1–6.

Gelo, K. (2019) Utjecaj kalijeveg klorida u salamuri na fizikalno-kemijske i senzorske parametre te na zrenje sira tipa feta, Zagreb.

Getaneh, G., Mebrat, A., Wubie A., Kendie H. (2016) Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value. *J. Nutr. Health.* **3**, 2-10.

Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biochemical Antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **9(1)**, 1 – 32.

Ilijanić, V. (2019) Antioksidacijska aktivnost mliječnog proizvoda dobivenog pomoću kefirnih zrnaca, Rijeka.

Jovanovic, S., Barac, M., Macej, O., Vucic, T., Lacnjevac, C. (2007) SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments.

Kalyankar, S.D., Khedar, C.D., Patil, A.M. (2016) Goat: Milk, Elsevier Ltd., India.

Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* **4**, 412-422.

Lisak Jakopović, K. (2013) Optimiranje uvjeta selektivne enzimске hidrolize proteina sirutke u svrhu njihove izolacije, doktorska disertacija, Zagreb.

Martins, A.C., Bukman, L., Vargas, A.M.M., Barizão, É., Moraes, J.C.G., Visentainer, J.V., Almeida, É.C. (2012) The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology, *Food Chem.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>

Martins, S.I.F.S, Jongen, W.M.F, van Boekel, M.A.J.S. (2001) A review of Maillard reaction

in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci Technol.* **11**, 364-373.

Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. (2011) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. *Food Chem.* 1036–1043.

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

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

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

Perna, A., Simonetti, A., Grassi, G., Gambacorta, E. (2018) Effect of  $\alpha$ S1-casein genotype on phenolic compounds and antioxidant activity in goat milk yogurt fortified with *Rhus coriaria* leaf powder. *J. Dairy Sci.* **101**, 7691-7701.

Prakash, A. (2001) Antioxidant activity. *Med. Lab. Anal. Prog.* **19-2**, 1–6.

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

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

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

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

Štoler, I. (2017) Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška, Zagreb.

Tamanna, N., Mahmood, N. (2015) Food Processing and Maillard Reaction Products: Effect on Human Health and Nutrition. *Int. J. Food Sci.* 1-6.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669-675.

Tomić-Karović, K. Metode određivanja kiselosti mlijeka, Zagreb, 131-136.

Vázquez, C.V., Villa Rojas, M.G., Ramírez, C.A., Chávez-Servín, J.L., García-Gasca, T., Ferriz

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

Vincek, M. (2014) Enzimsko i neenzimsko posmeđivanje, Zagreb.

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





## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Elena Popadić