Spektrofluorimetrijska analiza kiselo topljivih proteina kravljeg i kozjeg mlijeka

Dobrijević, Zorana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:663914

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Zorana Dobrijević

SPEKTROFLUORIMETRIJSKA ANALIZA KISELO TOPLJIVIH PROTEINA KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Biokemija
Tema rada je prihvaćena na XXI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 30.06.2010.
Mentor: dr. sc. *Ivica Strelec*, izv. prof.
Pomoć pri izradi: -

SPEKTROFLUORIMETRIJSKA ANALIZA KISELO TOPLJIVIH PROTEINA KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Zorana Dobrijević, 29/DI

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost razlikovanja kravljeg od kozjeg mlijeka na osnovi intenziteta fluorescencije, koncentracije proteina i količine ukupnog amino dušika u sirutki. Dodatno je ispitano može li se procijeniti količina ukupnog amino dušika i količina proteina na osnovi fluorescencije. Analiza je obuhvaćala 60 uzoraka kravljeg (svježe, pasterizirano, UHT, rekonstituirano) i kozjeg (svježe, UHT) mlijeka. Fluorescencija se nije pokazala pogodnom metodom za razlikovanje kravljeg i kozjeg mlijeka, ali se na osnovi FAST indeksa moglo razlikovati sirova od termički obrađenih mlijeka. Na osnovi količine ukupnog amino dušika moguće je razlikovati sirutke kozjih i kravljih mlijeka. Određivanje intenziteta fluorescencije sirutke pri 290/340 nm može poslužiti za procjenu koncentracije proteina u sirutki.

Ključne riječi: spektrofluorimetrija, mlijeko, sirutka, proteini

Rad sadrži: 46 stranica
16 slika
9 tablica
46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. dr. sc. *Jovica Hardi,* red. prof. — predsjednik
2. dr. sc. *Ivica Strelec,* izv. prof. — član-mentor
3. dr. sc. *Lidija Jakobek,* izv. prof. — član
4. dr. sc. *Vedran Slačanac,* izv. prof. — zamjena člana

Datum obrane: 7. listopad, 2015.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food technology
Course title:	Biochemistry
Thesis subject	was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. XXI held on June 30, 2010.
Mentor:	*Ivica Strelec*, PhD, associate prof.
Technical assistance:	-

SPECTROFLUORIMETRIC ANALYSIS OF ACID SOLUBLE PROTEINS IN COW'S AND GOAT'S MILKS

Zorana Dobrijević, 29/DI

Summary:

The aim of this study was to examine possibility of cow's and goat's milk differentiation by fluorescence intensity, protein concentration and amino nitrogen quantity of whey samples. Additionally, possibility of total amino nitrogen and protein concentration estimation by fluorescence peak measurement were examined. Analysis included sixty samples of cow's (raw, pasteurized, UHT and reconstituted) and goat's (raw, UHT) milk. Fluorescence was not found applicable for differentiation of cow's and goat's milk, but FAST index was found as promising indicator for differentiation of raw and thermally processed milk. Cow's and goat's milk could be differentiated on the basis of total free amino nitrogen quantity in whey samples. Fluorescence intensity measurement at 290/340 nm was found applicable for estimation of protein concentration in whey.

Key words: fluorescence, milk, whey, protein

Thesis contains: 46 pages
16 figures
9 tables
46 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Jovica Hardi*, PhD, prof.	chair person
2.	*Ivica Strelec*, PhD, associate prof.	supervisor
3.	*Lidija Jakobek*, PhD, associate prof.	member
4.	*Vedran Slačanac*, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: October 7, 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Ivici Strelecu

i višoj tehničarki Dragici Roknić, na srdačnoj suradnji,

strpljenju i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **3**

2.1. MLIJEKO 4
2.2. PROTEINI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA 5
2.2.1. Kazein *5*
2.2.2. Proteini sirutke *6*
2.2.3. NPN *7*
2.3. METODE DETEKTIRANJA PATVORENJA MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA 8
2.3.1. Elektroforetske metode *9*
2.3.2. Kromatografske metode *11*
2.3.3. Imunokemijske metode *12*
2.3.4. Tehnike bazirane na DNA analizi *13*
2.4. FLUORESCENCIJA 14
2.4.1. Mehanizam fluorescencije *14*
2.4.2. Fluoropori *16*

3. EKSPERIMENTALNI DIO **19**

3.1. ZADATAK 20
3.2. MATERIJALI I METODE 20
3.2.1. Priprema uzoraka sirutke *20*
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina Lowryjevom metodom *21*
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom *21*
3.2.4. Određivanje količine ukupnog amino dušika OPA metodom *22*
3.2.5. Snimanje trodimenzionalnog spektra fluorescencije sirutke *22*
3.2.6. Snimanje emisijskih spektara fluorescencije sirutke *22*
3.2.7. Određivanje intenziteta fluorescencije sirutke pri točno određenim valnim duljinama ekscitacije i emisije *23*
3.2.8. Obrada podataka *23*

4. REZULTATI I RASPRAVA **24**

4.1. TRODIMENZIONALNI SPEKTRI FLUORESCENCIJE SIRUTKE KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA 25
4.2. RAZLIKOVANJE VRSTI MLIJEKA NA OSNOVI NORMALIZIRANIH EMISIJSKIH KRIVULJA FLUORESCENCIJE SIRUTKE 28
4.3. INTENZITETI VRHOVA FLUORESCENCIJE SIRUTKE KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA PRI TOČNO ODREĐENIM VALNIM DULJINAMA EKSCITACIJE I EMISIJE 30
4.4. FAST INDEKS SIRUTKI KRAVLJIH I KOZJIH MLIJEKA 32
4.5. KONCENTRACIJA PROTEINA U SIRUTKI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA 34
4.6. KOLIČINA UKUPNOG AMINO DUŠIKA U SIRUTKI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA 37

5. ZAKLJUČAK **41**

6. LITERATURA **43**

1. UVOD

Patvorenje prehrambenih proizvoda podrazumijeva zamjenu i/ili dodavanje nekog sastojka proizvodu mimo zakonskih odredaba, čime nepošteni proizvođači ostvaruju financijsku dobit. Patvorenjem se mijenjaju svojstva i zdravstvena sigurnost izvornog proizvoda, čime se može nanijeti šteta potrošačima (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zelenakova i sur., 2010.; Zachar i sur., 2011.).

U proizvodnji različitih mliječnih proizvoda, patvorenje često podrazumijeva zamjenu mlijeka veće vrijednosti onim manje vrijednosti. Kravlje mlijeko je jeftinije od drugih vrsta i njegova proizvodnja prevladava u svijetu, stoga ga neki proizvođači koriste za patvorenje kozjeg ili ovčjeg mlijeka. Miješanje različitih vrsta mlijeka ponekad je poželjno radi svojstava proizvoda. No, problem nastaje kada konačni proizvod nije deklariran kao proizvod sastavljen od više vrsta mlijeka. Takav se proizvod smatra patvorenim i Zakonom je zabranjen (NN., 117/03.), jer mu se mijenja kvaliteta i zdravstvena sigurnost (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.).

Potrošači trebaju biti zaštićeni od ovakve prakse zbog vjerskih i kulturoloških razloga, mogućih alergija na kravlje komponente u ovim proizvodima te propisanih zahtjeva kakvoće. Kako bi se izbjegla mogućnost nezakonite zamjene jedne vrste mlijeka drugom, neophodno je osigurati adekvatne kontrolne mjere sposobne otkriti takve prevare i zaštititi potrošača (Hurley i sur., 2004.; Damjanović i sur., 2006.; Nicolaou i sur., 2010.; Song i sur., 2011.; Zachar i sur., 2011.).

Većina metoda za identifikaciju autentičnosti mliječnih proizvoda temelji se na analizi glavnih proteina mlijeka. Za otkrivanje patvorenja jedne vrste mlijeka drugim uglavnom se koriste elektroforetske, kromatografske, spektroskopske i imunokemijske metode (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.).

Cilj ovog rada bio je utvrditi može li se razlikama u intenzitetu fluorescencije, koncentraciji proteina te količini ukupnog amino dušika u sirutki razlikovati kravlje od kozjeg mlijeka. Dodatno je ispitana mogućnost procjene količine ukupnog amino dušika i količine proteina na osnovi fluorescencije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MLIJEKO

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složena sastava, koju izlučuje mliječna žlijezda ženki sisavaca. Pod pojmom mlijeko podrazumijeva se kravlje mlijeko, dok se ostale vrste moraju istaknuti oznakom porijekla. Različite vrste mlijeka se razlikuju prema prehrambenim, fizikalno-kemijskim i tehnološkim osobinama. Mlijeko sadrži preko stotinu različitih sastojaka čija količina varira u različitih vrsta sisavaca, ali razlikuje se i unutar iste vrste (**Tablica 1**). Sastav ovisi o raznim čimbenicima: pasmini i zdravstvenom stanju životinje, stadiju laktacije, načinu i vrsti hranidbe, godišnjem dobu, okolišnim uvjetima, vrsti i broju mužnje, dobi i tjelesnoj masi životinje i sl. (Fox i McSweeny, 1998.; Tratnik, 1998.; Mioč i Pavić, 2002.; Park i sur., 2007.; Slačanac i sur., 2010.).

U novije vrijeme proizvodnja kozjeg mlijeka u svijetu bilježi sve veći porast. Iako ono čini svega 2% ukupne svjetske proizvodnje, u prehrani se sve više ističu njegove prednosti (Božanić i sur., 2002.). Njegovi proteini imaju veću biološku vrijednost od kravljih, bolje je probavljivo, ima bolje imunološke i antibakterijske karakteristike te je hipoalergijsko (Haenlein, 2004.; Park i sur., 2007.; Olalla i sur., 2009.; Slačanac i sur., 2010.).

Tablica 1 Prosječan sastav kozjeg i kravljeg mlijeka (Slačanac i sur., 2010.)

Sastav (g/kg)	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
Suha tvar	119,4	128,9
Mast	33,5	38,5
Bezmasna ST	89,0	90,0
Laktoza	45,5	47,0
Proteini	33,0	33,3
Kazein	25,5	27,0
Albumin, globulin	7,5	6,5
NPN	4,0	2,0
Pepeo	8,0	7,3
Kalorije	70	69

U Hrvatskoj postoji samo dvije vrste kozjih proizvoda na tržištu, UHT mlijeko i mali broj sireva (Slačanac i sur., 2010.).

2.2. PROTEINI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Osnova za razlikovanje mlijeka različitih vrsta je njihov sadržaj proteina (Fox i McSweeny, 1998.). Proteini sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu, od građe do reprodukcije. Kataliziraju važne reakcije, vežu mineralne tvari i vitamine te imaju glavnu ulogu u proizvodnji mliječnih proizvoda i stabiliziraju okus mlijeka (Božanić i sur., 2002.; Slačanac i sur., 2010.). Prosječne količine proteina u kravljem mlijeku su između 3,1-3,9 g/100 g, a u kozjem između 3,27-4,60 g/100 g, pri čemu neki autori navode više razine u sirovom, a niže u obrađenom mlijeku, dok drugi ne navode tu razliku (Park i sur., 2007.; Olalla i sur., 2009.).

Dvije su osnovne vrste proteina u mlijeku definirane u ovisnosti o njihovoj topljivosti pri pH 4,6 i temperaturi od 25˚C. Pri ovim uvjetima, oko 80% ukupnih proteina se istaloži iz otopine i ta frakcija se naziva kazein. Proteini koji ostanu otopljeni nazivaju se proteini sirutke ili serum proteini (Fox i McSweeny, 1998.; Tratnik, 1998.; Park i sur., 2007.; Pasztor-Huszar, 2008.; Olalla i sur., 2009.; Slačanac i sur., 2010.; Rahimi Yazdi i Corredig, 2012.).

2.2.1. Kazein

Kazein čini 80% proteina kravljeg mlijeka, odnosno 77% proteina kozjeg mlijeka. Osnovni kazeini u kozjem i kravljem mlijeku su isti: α_{s1}-CN, α_{s2}-CN, β-CN i κ-kazeini (**Tablica 2**), sa molarnim omjerom u kravljem mlijeku oko 4:1:4:1,3 (Tratnik, 1998.; Borkova i Snašelova, 2005.; Park i sur., 2007.; Pasztor-Huszar, 2008.; Rahimi Yazdi i Corredig, 2012.). Dok je u kravljem mlijeku α_{s1}-kazein glavna frakcija kazeina, u kozjem mlijeku to je β-kazein (Božanić i sur., 2002.; Borkova i Snašelova, 2005.). Čestice kazeina u mlijeku se nalaze u obliku micela, pri čemu su micele kozjeg mlijeka manje nego kravlje (Božanić i sur., 2002.; Park, 2009.).

Kazein je vrlo stabilan na visokim temperaturama, može se zagrijati na 100˚C tijekom 24 sata, bez koagulacije, ali podložan je proteolitičkim reakcijama tijekom zrenja sira (Fox i McSweeny, 1998.; Damjanović i sur., 2006.; Pasztor-Huszar, 2008.; Rahimi Yazdi i Corredig, 2012.). Kazein se lako taloži iz mlijeka na različite načine (uglavnom djelovanjem enzima ili

kiselina) pa se može izdvojiti iz mlijeka (Tratnik, 1998.). Sintetiziran je samo u mliječnim žlijezdama i ne može se naći drugdje u prirodi (Fox i McSweeny, 1998.).

Tablica 2 Udio (%) glavnih kazeinskih frakcija u kozjem i kravljem mlijeku (Slačanac i sur., 2010.)

Kazeinska frakcija	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
α_s-CN	26	56
β-CN	64	33
κ-CN	10	11
α_s-CN/ β-CN	0,41	1,70

Vrlo mala količina α_{S1}-kazeina u kozjem mlijeku omogućava sigurnu identifikaciju patvorenja kozjeg mlijeka kravljim, već s količinama od 1% (Jenness, 1980.; Božanić i sur., 2002.). U mlijeku su također prisutni i produkti proteolize sva 4 primarna kazeina (Borkova i Snašelova, 2005.).

2.2.2. Proteini sirutke

Proteini sirutke su biološki najvrjedniji proteini i čine približno 18-20% ukupnih proteina mlijeka (Božanić i sur., 2002.; Herceg i Režek, 2006.). Ovu skupinu proteina najvećim dijelom čine β-laktoglobulini (β-Lg) i α-laktalbumini (α-La) (**Tablica 3**). Zatim slijede proteoze-peptoni (koji djelomično potječu i od hidrolize β-kazeina) te imunoglobulini (IgG, IgA, IgM) i albumin krvnog seruma, kao i manji peptidi poput enzima, laktoperoksidaze, lizozima, glikoproteina, krvnog transferina, glikomakropeptida i laktoferina (Tratnik, 1998.; Borkova i Snašelova, 2005.; Herceg i Režek, 2006.; Pasztor-Huszar, 2008.; Park, 2009.).

Tablica 3 Sastav i sadržaj proteina sirutke u obranom mlijeku (Borkova i Snašelova, 2005.)

	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko
Proteini sirutke (g/l)	6,46	6,14
β-laktoglobulini (%)	59,3	54,2
α-laktalbumini (%)	16,2	21,4
Imunoglobulini (%)	15,0	11,5
Serum albumin/laktoferin (%)	9,5	12,8

Proteini sirutke su izrazito hidrofilni i stabilni na utjecaj kiseline ili enzima te zaostaju u otopini (sirutki) nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnog gruša. No, vrlo su termolabilni (osim proteoze-peptona) u odnosu na termostabilni kazein te koaguliraju pod utjecajem topline (Fox i McSweeny, 1998.; Herceg i Režek, 2006.). Denaturacija započinje već na temperaturi iznad 60°C, no koagulacija većine sirutkinih proteina odvija se pri temperaturi od 90-95°C, kroz 10-20 minuta (Fox i McSweeny, 1998.; Tratnik, 1998.; Herceg i Režek, 2006.; Damjanović i sur., 2006.; Rahimi Yazdi i Corredig, 2012.). Talože se u prisutnosti 12%-tne trikloroctene kiseline (Olalla i sur., 2009.).

Proteinima sirutke se pripisuju razni korisni učinci, poput antimikrobnih, antiviralnih, antikarcinogenih i hipokolesterolemičnih svojstava; mogu se koristiti za poboljšanje fizičkih sposobnosti i hipoalergijsku prehranu dojenčadi (Herceg i Režek, 2006.; Park, 2009.).

2.2.3. NPN

Većinu ukupnih dušičnih tvari u mlijeku čine proteini, ali manji dio otpada na neproteinske dušične tvari (NPN). To su uglavnom mali peptidi, aminošećeri, slobodne aminokiseline, kreatin, ureja, mokraćna kiselina, nukleotidi, nukleozidi, poliamini i amonijak (**Tablice 4, 5**) (Tratnik, 1998.). Od ukupne količine dušika, NPN frakcija zauzima oko 5% u kravljem mlijeku te oko 9% u kozjem (Jenness, 1980.; DePeters i Ferguson, 1992.; Olalla i sur., 2009.).

Tablica 4 Sastav NPN frakcije kravljeg mlijeka (DePeters i Ferguson, 1992.)

Sastojak	Količina (mg/100g)
NPN	29,64
Ureja N	14,21
Amonijak N	0,88
Kreatin N	2,55
Kreatinin N	1,21
Mokraćna kiselina N	0,78
α-amino N	4,43
Orotinska kiselina N	1,46
Peptidi N	3,20
Hipurna kiselina N	0,44
Nepoznato	0,48

Tablica 5 Sastav NPN frakcije kozjeg mlijeka (Park i sur., 2007.)

Sastojak	Količina (mg N/100 ml)
Amonijak N	0,17
Ureja N	6,54
Kreatinin N	0,19
Kreatin N	3,55
Mokraćna kiselina N	1,55
α-amino N	2,20
Nepoznato	5,63

Glavna komponenta NPN frakcije je ureja, s udjelom u kravljem mlijeku od oko 30% (EFSA, 2012.), odnosno 10 do 15 mg/dl (Prpić i sur., 2005.). Količina ukupnih i esencijalnih aminokiselina podjednaka je u obje vrste mlijeka (**Tablica 6**). Ali količina slobodnih, pogotovo esencijalnih, aminokiselina u kozjem mlijeku je puno veća (Božanić i sur., 2002.).

Tablica 6 Analiza aminokiselina u kozjem i kravljem mlijeku (Božanić i sur., 2002.)

Aminokiseline (mg%)	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
a) ukupne AK	2989	3199
b) ukupne slobodne AK	2,51	2,38
c) ukupne esencijalne AK	1210	1280
d) ukupne slobodne i esencijalne AK	0,82	0,70
b/a (%)	0,084	0,074
c/a (%)	40,48	40,01

U konačnici, kozje mlijeko, u odnosu na kravlje, ima veći sadržaj ukupnih nukleotidnih monofosfata, slobodnih aminokiselina, ureje i sijalinske kiseline (EFSA, 2012.).

2.3. METODE DETEKTIRANJA PATVORENJA MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Većina metoda za identifikaciju autentičnosti mliječnih proizvoda temelji se na analizi glavnih proteina mlijeka (**Tablica 7**). Najčešće korištene metode za otkrivanje patvorenja jedne vrste mlijeka drugim su elektroforeza, izoelektrično fokusiranje (IEF), kapilarna elektroforeza (CE), reverzno fazna visokotlačna tekućinska kromatografija (RP HPLC),

ionozmjenjivačka visokotlačna tekućinska kromatografija (IE HPLC), hidrofobna kromatografija (HIC), imunokemijske metode (ELISA) i PCR tehnike (Hurley i sur., 2004.; Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Nicolaou i sur., 2010.; Song i sur., 2011.; Zachar i sur., 2011.).

Tablica 7 Proteinski markeri koji se koriste za detekciju različitih vrsta mlijeka (Borkova i Snašelova, 2005.)

Metoda	Proteinski marker
Elektroforeza	Kravlji para-κ-kazein Kravlji α_{s1}-kazein
Izoelektrično fokusiranje	Kravlji γ_2 i γ_3 kazeini Kozji para-κ-kazein
Kapilarna elektroforeza	Kozji α-laktalbumin Kozji β-laktoglobulin Kravlji α_{S1}-kazein Kompletni kozji i kravlji proteini sirutke i kazeini
Indirektna ELISA	Kravlji κ-kazein Imunoglobulin G Kozji α_{S2}-kazein Kravlji β-kazein Kravlji α_{S1}-kazein
Sendvič ELISA	Kravlji β-kazein Kravlji β-laktoglobulin Kozji proteini sirutke
RP HPLC	Kravlji i kozji β-laktoglobulini Kravlji α-laktalbumin Kravlji α-kazein
HIC	Kravlji i kozji kazeini

2.3.1. Elektroforetske metode

Elektroforeza

Elektroforeza je separacijska tehnika utemeljena na mobilnosti iona u električnom polju (Pasztor-Huszar, 2008.). Poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE) ima značajnu ulogu u istraživanju mliječnih proteina. Obzirom na jednostavnost i relativno kratko vrijeme analize, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti uree (urea-PAGE) ili prisutnosti natrijeva

dodecil sulfata (SDS-PAGE) se često koristi za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.).

Pesić i sur. (2011.) su pomoću urea-PAGE elektroforeze uspjeli dokazati prisutnost 3% kravljeg mlijeka u kozjem i 5% u ovčjem, dok su Borkova i Snašelova (2005.) postigle limit detekcije od 5% za obje mješavine. Singhal i sur. (1997.) navode mogućnost otkrivanja više od *5*% kozjeg mlijeka u ovčjem. Također, na temelju detekcije proteina sirutke i kazeina moguće je utvrditi i dodatak kravljeg mlijeka u mliječne proizvode, npr. u ovčji jogurt, u količini od 1% (Borkova i Snašelova, 2005.) te u ovčje, kozje i bivolje sireve, u količini od 10% (Veloso i sur., 2004.; Damjanović i sur., 2006.).

Prednost elektroforetske analize je mogućnost istodobne analize većeg broja uzoraka na istom gelu, pod jednakim uvjetima, što povećava ponovljivost i usporedivost dobivenih rezultata. Glavni nedostatak je relativno slaba osjetljivost (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.).

Kapilarna elektroforeza

Za utvrđivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka koristi se i tehnika kapilarne zonske elektroforeze (CE) uz detekciju UV detektorom. Minimum detekcije kapilarne zonske elektroforeze je približno 2% za mješavine mlijeka i 4% za sireve. Prednost metode je kraće vrijeme analiza u odnosu na kromatografske metode, visoka razlučivost i dobra kvantifikacija (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.).

Izoelektrično fokusiranje

Iz istraživanja kojeg su proveli Špoljarić i sur. (2013.) može se vidjeti da je metoda izoelektričnog fokusiranja (IEF) prikladna za detekciju sirovog i toplinski obrađenog kravljeg mlijeka u svježim i zrelim sirevima proizvedenih od ovčjeg ili kozjeg mlijeka, ili mješavine ovčjeg i kozjeg mlijeka. Europska komisija je 1992. godine usvojila ovu metodu kao referentnu metodu za dokazivanje kravljih κ-kazeina u ovčjim, kozjim i bivoljim sirevima (Singhal i sur., 1997.; Damjanović i sur., 2006.; Nicolaou i sur., 2010.; Zachar i sur., 2011.).

Metoda izoelektričnog fokusiranja je metoda visoke razine razlučivanja u kojoj se proteini razdvajaju ovisno o njihovim izoelektričnim točkama. Temelji se na odvajanju kazeinske frakcije iz mlijeka i sira nakon plazminolize pod određenim uvjetima. Analizom

proteinskog hidrolizata izoelektričnim fokusiranjem mogu se odvojiti kravlji γ_2- i γ_3-kazeini od ovčjih kazeina. Test je pozitivan na patvorenje ukoliko je dokazano barem 1% ukupnih kravljih γ_2- i γ_3-kazeina. Da bi se izbjegli lažni rezultati, potrebno je detektirati obje (γ_2 i γ_3) frakcije kazeina. Prisutnost kravljeg mlijeka u uzorcima može se dokazati korištenjem 2 referentna standarda mlijeka, s 0 i 1% kravljeg mlijeka. Metoda omogućava detekciju od 0,5%. Nedostatak ove metode je nemogućnost dokazivanja patvorenja ovčjih sireva kozjim mlijekom. Naime, položaji ovčjih i kozjih γ-kazeinskih frakcija se preklapaju. Također, ova metoda se može koristiti za razlikovanje ovčjeg i kozjeg mlijeka u siru, kada se analiza temelji na dokazivanju para-κ-kazeina, ali je tada granica detekcije viša (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.).

2.3.2. Kromatografske metode

U kromatografskim tehnikama osnovno odvajanje se odvija uslijed razlika u migraciji komponenti između nepokretne i pokretne faze u sustavu. Postoje različiti tipovi kromatografije, poput isključivanja po veličini, ionskoj izmjeni, hidrofobnim interakcijama i reverzno fazna kromatografija. Razlikuju se po mehanizmu separacije i odabiru pokretne i nepokretne faze (Zachar i sur., 2011.). Ove metode imaju veliku primjenu u izolaciji proteina mlijeka. Prednost su brzina, jednostavnost i mogućnost automatizacije (Borkova i Snašelova, 2005.).

Tekućinska kromatografija reverznih faza

RP-HPLC (eng. Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography) je vrlo osjetljiva i točna metoda, sa sposobnošću kvantitativne analize mlijeka. Pomoću proteina sirutke može se odrediti prisutnost kravljeg mlijeka u drugim vrstama (s limitom detekcije nižim od 1%) i udio određenog mlijeka u mješavinama mlijeka. Također, moguća je detekcija patvorenja kravljim mlijekom i kvantifikacija pojedinih vrsta mlijeka u kozjim i ovčjim sirevima. Nedostatak metode je nemogućnost razlikovanja kozjeg i ovčjeg mlijeka, zbog vrlo sličnih vremena retencije proteina (Borkova i Snašelova, 2005.; Zachar i sur., 2011.).

Ionoizmjenivačka visokotlačna tekućinska kromatografija

IE HPLC (eng. Ion Exchange High-Performance Liquid Chromatography) je metoda s mogućnošću identifikacije kravljeg mlijeka u kozjem pomoću α_{S1}-kazeina (Borkova i Snašelova, 2005.).

Hidrofobna kromatografija

HIC (eng. Hydrophobic Interactive Chromatography) se može koristiti za odjeljivanje kazeinskih frakcija sirovih kozjih, kravljih i ovčjih mlijeka i sireva. Limit detekcije za dodatak kravljeg mlijeka u kozje i ovčje je 10% (Borkova i Snašelova, 2005.; Zachar i sur., 2011.).

Visokotlačna tekućinska kromatografija

Za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka često se primjenjuje i tekućinska kromatografija visokog razlučivanja (eng. High-Performance Liquid Chromatography - HPLC), koja se najčešće temelji na dokazivanju proteina sirutke, a granice detekcije su 2% i niže (Damjanović i sur., 2006.; Reid i sur., 2006.).

U novije vrijeme, sve se više koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Na primjer, tekućinskom kromatografijom visokog razlučivanja, uz elektrosprej ionizaciju te detekcijom masenim detektorom (eng. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry - ESI-MS), a na temelju analize β-laktoglobulina, može se detektirati 5% kravljeg mlijeka u kozjem mlijeku (Damjanović i sur., 2006.). Korištenje metode matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom uz analizator masa s vremenom proleta (eng. Matrix Assisted Laser Desorption - Ionization Time of Flight - MALDI-TOF), moguće je dokazati 2% ovčjeg mlijeka u bivoljem, dok je limit detekcije za dokazivanje kravljeg mlijeka u bivoljem 5% (Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.).

2.3.3. Imunokemijske metode

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka najčešće korištena imunološka metoda je ELISA (Reid i sur., 2006.; Damjanović i sur., 2006.). Prednosti su joj visoka osjetljivost, niska cijena, brza primjena i obrada velikog broja uzoraka. Jednostavna je

za korištenje, brza, pouzdana i prikladna za upotrebu u rutinskoj inspekciji mlijeka (Hurley i sur., 2004.; Zelenakova i sur., 2010.; Song i sur., 2011.; Zachar i sur., 2011.).

U praksi se koriste različite tehnike ELISA-e (indirektna, kompetitivna, sendvič, uz korištenje monoklonskih i poliklonskih antitijela) s granicom detekcije patvorenja nižim od 0,5% (Hurley i sur., 2004.; Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.). Glavna prednost ovog pristupa je da se protutijela mogu izraditi da odgovaraju specifično za željeni protein te omogućuju prepoznavanje i kvantifikaciju tog proteina (Borkova i Snašelova, 2005.; Reid i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.). Ciljani proteini su kazeini, β-laktoglobulini, imunoglobulini (IgG) ili drugi proteini sirutke. Kazeini su relativno stabilni na toplinu, stoga se koriste kao antigeni za detektiranje patvorenja u mlijeku tretiranom toplinom (Hurley i sur., 2004.; Nicolaou i sur., 2010.; Song i sur., 2011.).

ELISA metode su uspješno korištene za razlikovanje mlijeka različitih vrsta te detekciju prisutnosti kravljeg mlijeka u ovčjem, kozjem i bivoljem mlijeku, ovčjem i kozjem siru i kozjeg u ovčjem mlijeku (Singhal i sur., 1997.; Hurley i sur., 2004.; Reid i sur., 2006.; Zelenakova i sur., 2010.; Zachar i sur., 2011.; Song i sur., 2011.). Može se koristiti i za određivanje prisutnosti biljnih proteina u mlijeku u prahu (Reid i sur., 2006.).

Iako je granica detekcije ELISA metode niska, kao nedostatak te metode navodi se određen postotak lažno negativnih rezultata patvorenja u slučajevima prethodne toplinske obrade mlijeka (Damjanović i sur., 2006.). Potreba za izradom specifičnih antitijela može stvarati poteškoće (Reid i sur., 2006.; Nicolaou i sur., 2010.).

2.3.4. Tehnike bazirane na DNA analizi

Posebnu mogućnost dokazivanja patvorenja mlijeka i sira različitim vrstama mlijeka na razini nižoj od 0,5% pokazuje metoda lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction - PCR). Metoda se temelji na izolaciji DNA iz prirodno prisutnih epitelnih stanica u sastavu somatskih stanica mlijeka i sira, odnosno dokazivanju prisutnosti somatskih stanica u mlijeku pomoću detektiranja genomske DNA iz različitih vrsta (Damjanović i sur., 2006.). Prednost ove metode je velika osjetljivost, s mogućnošću detekcije malih količina

dodanog mlijeka, već od 0,1% kravljeg mlijeka u drugim vrstama mlijeka i sirevima (Borkova i Snašelova, 2005.; Zachar i sur., 2011.) te 0,6% kozjeg mlijeka u ovčjem (Lopez-Calleja i sur., 2007.).

U odnosu na ELISA metodu, prednost PCR metode je mogućnosti dokazivanja patvorenja mlijeka, sira i mliječnih proizvoda dobivenih od toplinski obrađenog mlijeka (Borkova i Snašelova, 2005.; Damjanović i sur., 2006.; Zachar i sur., 2011.). Metoda je brza i pouzdana za kvalitativnu analizu u laboratoriju, ali nije praktična za rutinsku analizu u industriji. Kvantifikacija somatskih stanica ovisi o pasmini i stadiju laktacije, može biti ometena okolišnim faktorima ili utjecajem obrade, poput zagrijavanja te zahtijeva skupe instrumente i reagense (Damjanović i sur., 2006.; Nicolaou i sur., 2010.; Song i sur., 2011.).

2.4. FLUORESCENCIJA

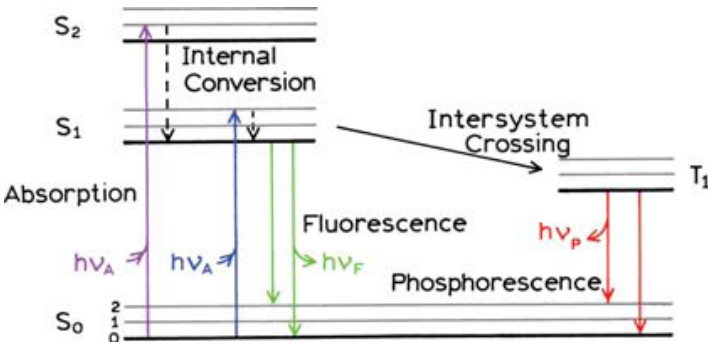
2.4.1. Mehanizam fluorescencije

Pojava da se nakon pobuđivanja molekule ili atoma u ekscitirano elektronsko stanje od strane nekog izvora energije, molekula ili atom vraća u osnovno stanje, pri čemu emitira energiju u obliku svjetlosti naziva se luminiscencija (White i Argauer, 1970.; Đačanin, 2009.). Ukoliko emisija energije traje oko 10^{-8} sekundi nakon što je izvor pobude uklonjen, fenomen se naziva fluorescencijom. Ako traje dulje vrijeme, naziva se fosforescencijom (White i Argauer, 1970.).

Ovisno o načinu pobuđivanja molekule, postoji više vrsta luminiscencije. Fotoluminiscenciju (fluorescenciju) izaziva apsorpcija elektromagnetnog zračenja, dok se kod kemiluminiscencije pobuđena molekula formira u kemijskoj reakciji. Ako se ovaj proces odvija u živim organizmima, energijom metaboličkih reakcija, radi se o bioluminiscenciji. Elektroluminiscenciju izaziva električna struja, radioluminiscencija je posljedica ekscitacije česticama velike energije, a triboluminiscencija nastaje kao posljedica oslobađanja energije uslijed mrvljenja ili loma (White i Argauer, 1970.; Đačanin, 2009.).

Fluorescencija je emisijski proces u kojemu se atomi ili molekule pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetskog zračenja. Pobuđene se vrste tada relaksiraju u osnovno stanje otpuštanjem suviška svoje energije u obliku fotona. Pri povratku u osnovno stanje dolazi do emisije fluorescencije, čija brzina je obično 10^{-8} s, tako da je tipično trajanje fluorescencije oko 10 ns. Fluorescentno zračenje uvijek se događa na duljim valnim duljinama, nego što je bila valna duljina pobude. Razlika u energiji ili valnoj duljini između apsorbiranog i emitiranog fotona naziva se Stokesov pomak (emitirano zračenje ima manje energije po fotonu, stoga ima dulju valnu duljinu) (White i Argauer, 1970.; Maljković, 1992.; Skoog i sur., 1999.; Christensen i sur., 2006.; Lakowicz, 2006.; Pasztor-Huszar, 2008.; Đačanin, 2009.).

Procesi koji se odvijaju između apsorpcije i emisije svjetlosti, obično su prikazani na dijagramu Jablonskog (**Slika 1**). Singlet osnovno, prvo i drugo elektronsko stanje su prikazani kao S0, S1 i S2. Pri svakom od ovim elektronskih nivoa fluoropori mogu postojati u brojnim vibracijskim energetskim nivoima, opisani s 0, 1, 2, itd. Prijelazi između stanja su opisani kao vertikalne linije (Lakowicz, 2006.).



Slika 1 Dijagram po Jablonskom (Lakowicz, 2006.)

Apsorpcijom elektromagnetnog zračenja molekula se sa osnovnog singletnog stanja (S0) dovodi u neko od pobuđenih elektronskih stanja (S1, S2...) i neko pobuđeno vibracijsko stanje. Ako se molekula ekscitirala na pobuđeni nivo S2, ona će za vrlo kratko vrijeme (~10^{-12} s), putem unutarnje energijske relaksacije, predati energiju višim vibracijskim stanjima prvog pobuđenog elektronskog stanja (S1). Zatim, u sudarima sa molekulama okoline, slijedi brz (~10^{-12} s) prijelaz vibracijskom relaksacijom na nulti vibracijski nivo prvog pobuđenog elektronskog stanja. Ova dva procesa gubitka energije odvijaju se veoma brzo, uslijed čega najniži vibracijski nivo prvog pobuđenog singleta postaje najnaseljeniji. Iz tog stanja molekula

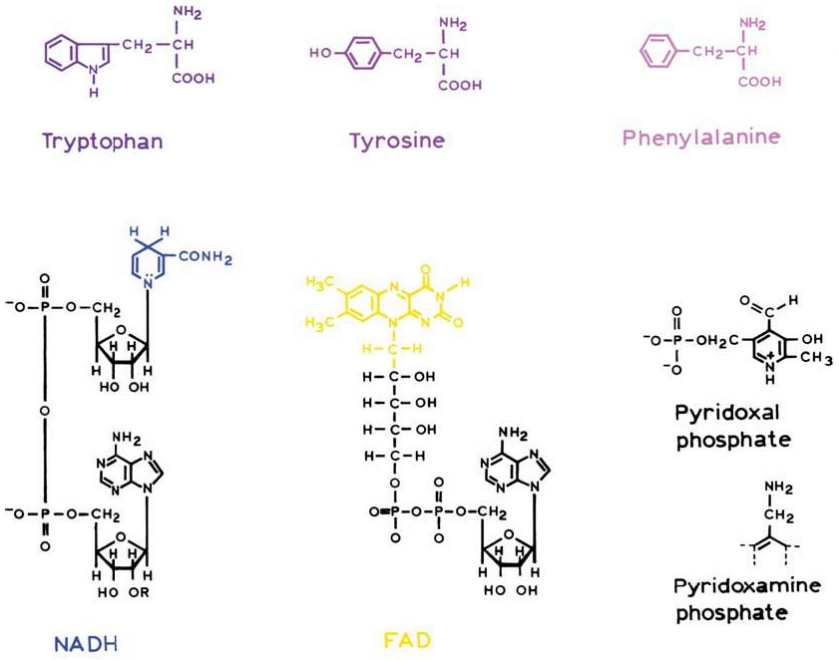
može prijeći na osnovno elektronsko stanje radijativnim procesom (fluorescencijom), koji se odvija nakon 10^{-12} s - 10^{-9} s (Ramanujam, 2000.; Lakowicz, 2006.; Pasztor-Huszar, 2008.; Đačanin, 2009.).

2.4.2. Fluoropori

Fluoropori mogu biti podijeljeni u dvije osnovne grupe: endogene i egzogene. Endogeni fluoropori su oni koji se prirodno javljaju, a uključuju aromatske aminokiseline, strukturne proteine, enzime i koenzime, vitamine, lipide i porfirine, NADH, flavine, derivate piridoksila i klorofil (**Tablica 8, Slika 2**).

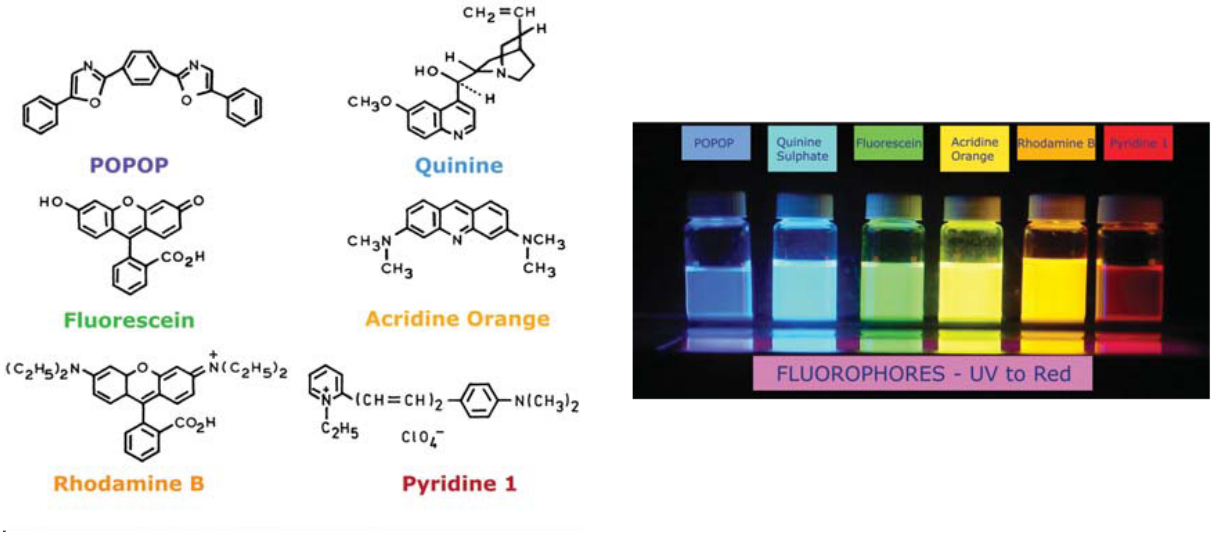
Tablica 8 Ekscitacijski i emisijski maksimumi bioloških molekula koje fluoresciraju (Ramanujam, 2000.)

Endogeni fluoropori	Max ekscitacije (nm)	Max emisije (nm)
Aminokiseline		
Triptofan	280	350
Tirozin	275	300
Fenilalanin	260	280
Strukturni proteini		
Kolagen	325	400, 405
Elastin	290, 325	340, 400
Enzimi i koenzimi		
FAD, flavini	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitamini		
Vitamin A	327	510
Vitamin K	335	480
Vitamin D	390	480
Spojevi vitamina B6		
Piridoksin	332, 340	400
Piridoksamin	335	400
Piridoksal	330	385
Piridoksilna kiselina	315	425
Piridoksal-5' fosfat	330	400
Vitamin B12	275	305
Lipidi		
Fosfolipidi	436	540, 560
Lipofuskin	340-395	540, 430-460
Ceroid	340-395	430-460, 540
Porfirini	400-450	630, 690



Slika 2 Endogeni fluoropori. R je vodik u NADH i fosfatna grupa u NADPH. (Lakowicz, 2006.)

Ekstrizični (egzogeni) fluoropori se dodaju uzorku, kako bi se osigurala fluorescencija kada ona ne postoji prirodno ili kako bi se promijenila spektralna svojstva uzorka. Oni uključuju dansil, fluorescein, rodamin i brojne druge tvari (**Slika 3**).



Slika 3 Ekstrizični fluoropori (Lakowicz, 2006.)

Intrizična fluorescencija proteina potječe od aromatskih aminokiselina, triptofana, tirozina i fenilalanina. Indolna skupina ostataka triptofana je dominantni izvor UV apsorbancije i emisije proteina. Emisija triptofana je vrlo osjetljiva na okolinu, stoga se često koristi kao 'glasnik' konformacijskih promjena proteina. Maksimumi apsorpcije ove tri

aminokiseline su: Phe-260 nm, Tyr-275 nm, Trp-280 nm. Emitiraju fluorescenciju pri oko 320-350 nm. (White i Argauer, 1970.; Ramanujam, 2000.; Ruoff i sur., 2005.; Lakowicz, 2006.; Pasztor-Huszar, 2008.).

Svaka fluorescentna molekula ima karakterističan spektar ekscitacije i emisije, što se može koristiti za odvajanje i identifikaciju molekula (Andersen i Mortensen, 2008.; Strelec, 2009.). Pod idealnim uvjetima intenzitet fluorescencije je linearno proporcionalan koncentraciji fluoropora (Christensen i sur., 2006.; Andersen i Mortensen, 2008.).

Hrana sadrži različite fluoropore, čiji signali se mogu preklapati, što može onemogućiti mjerenje koncentracije pojedinog spoja (Ruoff i sur., 2005.; Andersen i Mortensen, 2008.).

Mlijeko sadrži nekoliko unutarnjih fluoropora, a dominiraju aromatske aminokiseline triptofan i tirozin (**Tablica 9**), vitamin A i riboflavin (Andersen i Mortensen, 2008.; Christensen i sur., 2006.; Hougaard i sur., 2013.).

Tablica 9 Prosječni sastav fluorescirajućih aminokiselina u proteinima kravljeg i kozjeg mlijeka **(Haenlein, 2004.)**

Aminokiselina	Kravlje mlijeko (g/100g)	Kozje mlijeko (g/100g)
Triptofan	0,046	0,044
Fenilalanin	0,159	0,155
Tirozin	0,159	0,179

Fluorescentni spojevi mogu nastati i tijekom procesiranja mlijeka, npr. Maillardovi produkti te mogu biti korišteni u procjeni jakosti toplinskog tretmana (Andersen i Mortensen, 2008.; Matijević i Blažić, 2008.; Hougaard i sur., 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je odrediti može li se mjerenjem intenziteta fluorescencije sirutke kravljeg i kozjeg mlijeka te određivanjem količine ukupnog amino dušika i proteina razlikovati kozje od kravljeg mlijeka. Dodatno je ispitana mogućnost procjene količine ukupnog amino dušika i količine proteina na osnovi fluorescencije.

3.2. MATERIJALI I METODE

Analiza je obuhvaćala ukupno 60 uzoraka mlijeka. Deset uzoraka svježih kozjih i deset uzoraka svježih kravljih mlijeka prikupljeno s obiteljskih gospodarstava Slavonije i Baranje, 10 uzoraka pasteriziranog i 10 uzoraka UHT kravljeg mlijeka bilo je od proizvođača Meggle, Dukat, Vindija i Kim, 10 uzoraka kozjeg mlijeka od proizvođača Vindija, a 10 uzoraka rekonstituiranog mlijeka u prahu proizvođača Dukat i Novi Domil te jedno porijeklom iz Republike Poljske pripremljeno je prema uputama proizvođača.

Natrijev tetraborat dodekahidrat, Folin-Ciocalteau reagens i metanol dobavljeni su od proizvođača Kemika (Zagreb). Ditiotreitol (DTT) i natrijev dodecil-sulfat (SDS) dobavljeni su od proizvođača Merck (Njemačka), a *o*-ftaldialdehid (OPA) od proizvođača Sigma (USA). Ostale korištene kemikalije bile su analitičke čistoće od proizvođača Kemika ili Merck.

3.2.1. Priprema uzoraka sirutke

Uzorci sirutke su pripremljeni tako da je 1,5 ml određene vrste mlijeka (mlijeko u prahu je prije toga rekonstituirano prema uputama proizvođača) pomiješano s 7,5 ml 0,1 M Na-Ac pufera pH 4,6. Nakon homogeniziranja na vorteks mješalici, suspenzija je ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom deset minuta, a zatim centrifugirana pri 4000 okretaja/min (2575 g) tijekom deset minuta. Bistri supernatant je profiltriran kroz filter papir Whatman, a dobiveni filtrat je korišten za mjerenje fluorescencije, određivanje koncentracije proteina i ukupnog amino dušika.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina Lowryjevom metodom

Lowry metoda se temelji na dvije reakcije: reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i reakciji fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozina u proteinu sa Folin-Ciocalteau reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavoljubičastog obojenja sa apsorpcijskim maksimumom pri 660 nm (Lowry i sur., 1951.; Strelec, 2009.).

Volumen od 100 µl uzorka pomiješan je s 1 ml alkalne otopine, nakon čega je smjesa homogenizirana na vorteks mješalici te ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom deset minuta. Smjesi je dodano 100 µl Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:1) te je smjesa promiješana na vorteks mješalici i termostatirana u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37ºC tijekom 15 minuta. Po isteku vremena mjerena je apsorbancija razvijenog obojenja pri valnoj duljini od 660 nm, uz baždarenje instrumenta slijepom probom koja je umjesto uzorka sadržavala 100 µl pufera za pripremu sirutke. Rezultati apsorbancije preračunati su u količinu proteina na osnovi baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama goveđeg serumskog albumina.

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Ova metoda se temelji na vezanju anionskog oblika boje Coomassie Briliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke u proteinu, pri čemu se razvija kompleks s apsorpcijskim maksimumom pri valnoj duljini od 595 nm (Bradford, 1976.; Strelec, 2009.).

Volumenu od 100 µl pripremljenog uzorka dodano je 2 ml Bradford reagensa te je nakon pet minuta očitana apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm, uz baždarenje instrumenta slijepom probom koja je umjesto uzorka sadržavala 100 µl pufera za pripremu sirutke. Rezultati apsorbancije preračunati su u količnu proteina na osnovi baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama goveđeg serumskog albumina.

3.2.4. Određivanje količine ukupnog amino dušika OPA metodom

Količina ukupnog amino dušika u uzorcima sirutke određena je OPA (*o*-ftaldialdehid) metodom prema Nielsenu i sur. (2001.). Metoda se temelji na reakciji između α-amino skupina i *o*-ftaldialdehida u prisutnosti ditiotreitola, pri čemu se stvara obojeni produkt s maksimumom apsorpcije na valnoj duljini od 340 nm (Church i sur., 1983.; Nielsen i sur., 2001.).

OPA reagens pripremljen je neposredno prije analize na slijedeći način: 80 mg *o*-ftaldialdehida otopljeno je u 2 ml metanola i otopina je dodana u 50 ml 0,1 M natrijevog tetraborata, kojoj je potom dodano 100 mg ditiotreitola, 5 ml 20%-nog natrijevog dodecil sulfata i destilirane vode do volumena od 100 ml.

100 µl uzorka pomiješano je sa 1 ml OPA reagensa i smjesa je promućkana inverzijom kivete, a nakon dvije minute mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 340 nm, uz slijepu probu koja je umjesto uzorka sadržavala 100 µl destilirane vode za pripremu sirutke. Intenzitet apsorbancije preračunat je u količinu ukupnog dušika pomoću proračunske formule dobivene iz baždarnog dijagrama pripremljenog pomoću otopina poznatih koncentracija aminokiselina lizina, valina i glutaminske kiseline.

3.2.5. Snimanje trodimenzionalnog spektra fluorescencije sirutke

Trodimenzionalni spektar fluorescencije sirutke sniman je pomoću Cary Eclipse spektrofluorimetra (Varian, USA) u području valnih duljina ekscitacije od 260 do 400 nm i valnih duljina emisije od 280 do 500 nm.

3.2.6. Snimanje emisijskih spektara fluorescencije sirutke

Emisijski spektri fluorescencije sirutke snimani su pomoću Cary Eclipse spektrofluorimetra (Varian, USA) pri valnim duljinama ekscitacije od 280 i 330 nm i potom normalizirani prema Ruoff i sur. (2005).

3.2.7. Određivanje intenziteta fluorescencije sirutke pri točno određenim valnim duljinama ekscitacije i emisije

Određivanje intenziteta fluorescencije sirutke provedeno je pri točno određenim valnim duljinama ekscitacije i emisije kako slijedi: 290/340 te 330/425. Sva mjerenja su provedena u triplikatu.

Intenziteti fluorescencije upotrebljeni su za proračun FAST indeksa pomoću formule:

$$FAST = \frac{F\ AMP}{F\ Trp} \times 100$$

Naime, FAST indeks (Fluorescence of Advanced Maillard products and Soluble Tryptophan) iskorišten je za ustanovljavanje razlika u toplinskom tretmanu mlijeka budući u sebi objedinjuje dvije pojave uzrokovane djelovanjem toplinskog tretmana:

- denaturaciju proteina sirutke koja se odvija pri nižim temperaturama te se prati pomoću vrijednosti fluorescencije triptofana (*F* Trp) pri valnoj duljini ekscitacije i emisije od 290/340 nm, i
- Maillardove reakcije, koje se odvijaju pri višim temperaturama i prate se fluorescencijom naprednih Maillardovih produkata (*F* AMP) pri valnoj duljini ekscitacije i emisije od 330/425 nm.

3.2.8. Obrada podataka

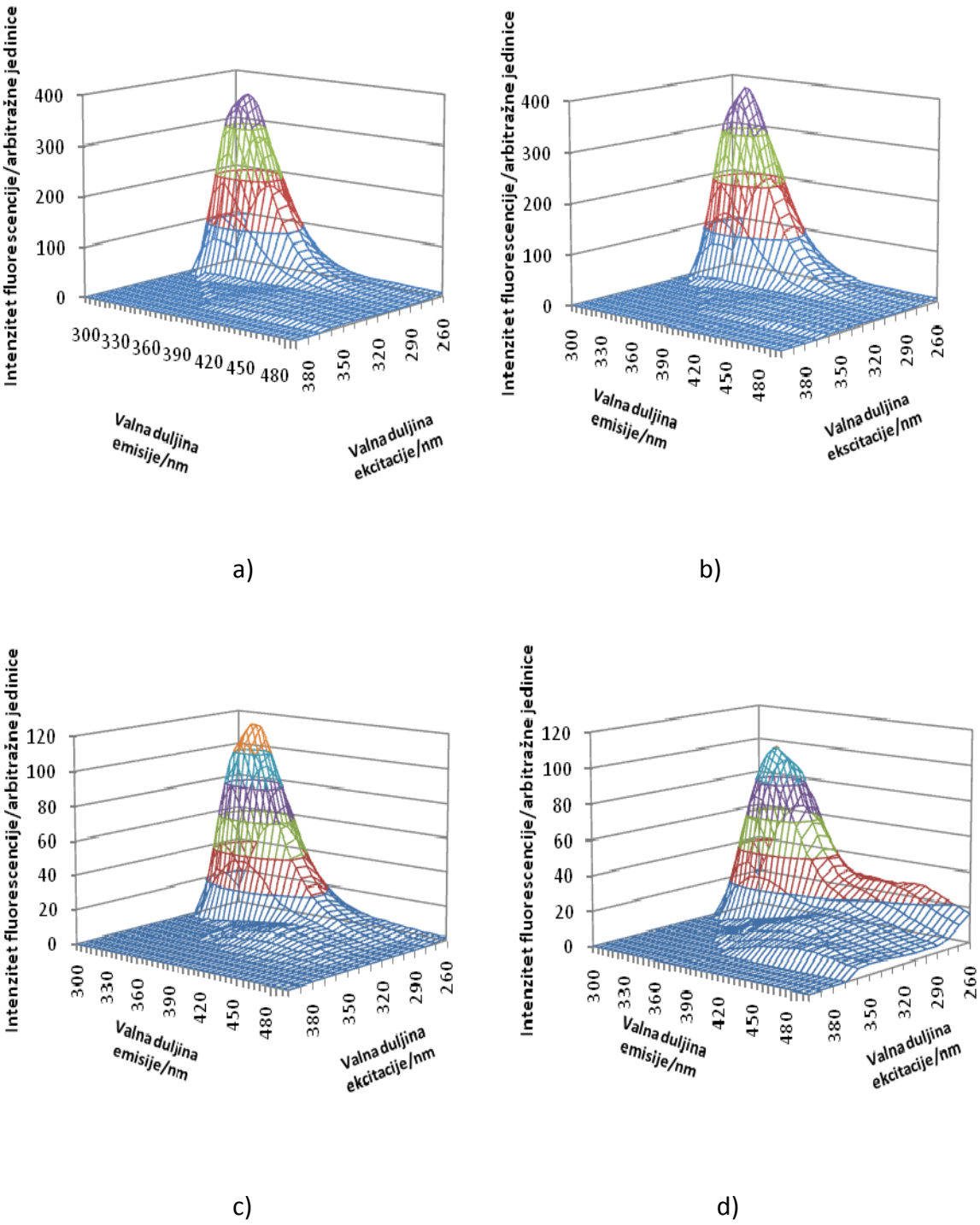
Program Excel korišten je za izračun srednjih vrijednosti mjerenja i dobivanje trodimenzionalnih spektara fluorescencije, dok je program Statistica (Stat Soft, USA) korišten za deskriptivnu statističku analizu te određivanje statistički značajne razlike između različitih vrsta mlijeka (studentov t-test).

4. REZULTATI I RASPRAVA

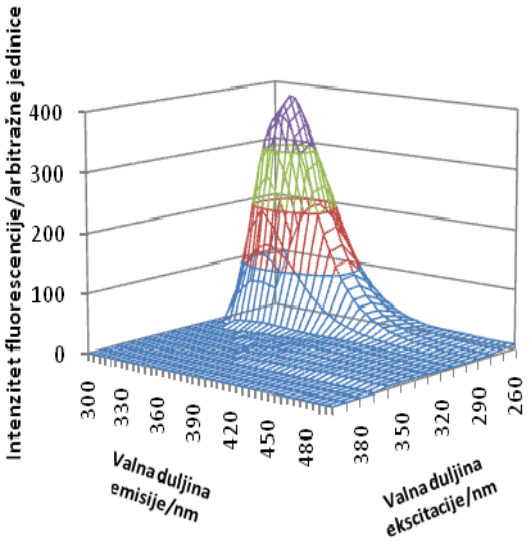
4.1. TRODIMENZIONALNI SPEKTRI FLUORESCENCIJE SIRUTKE KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Nakon pripreme uzoraka sirutke sirovog, pasteriziranog i UHT kravljeg mlijeka, sirovog i UHT kozjeg mlijeka te rekonstituiranog kravljeg mlijeka u prahu, snimljeni su spektri fluorescencije u području valne duljine ekscitacije 260-400 nm i emisije 300-500 nm.

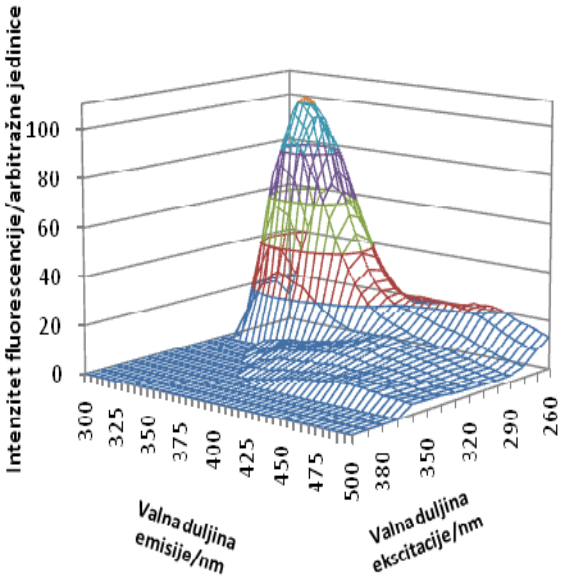
Analizom spektara fluorescencije sirutke uočava se da sve ispitane vrste i tipovi mlijeka pokazuju jedan dominantni vrh fluorescencije s maksimalnim intenzitetom pri 280/340 nm, dok se u slučaju termički obrađenih vrsta mlijeka (pasterizirano, UHT, rekonstituirano mlijeko u prahu) uočava postojanje dodatnog vrha fluorescencije centriranog pri 330/430 nm, ali znatno nižeg intenziteta (**Slike 4, 5**). Vrh fluorescencije pri 280/340 nm može se pripisati fluorescenciji triptofana, dok je vrh fluorescencije pri 330/430 nm karakterističan za Maillardove produkte, nastale tijekom termičke obrade mlijeka (Birlouez-Aragon i sur., 1998.; Christensen i sur., 2006.).



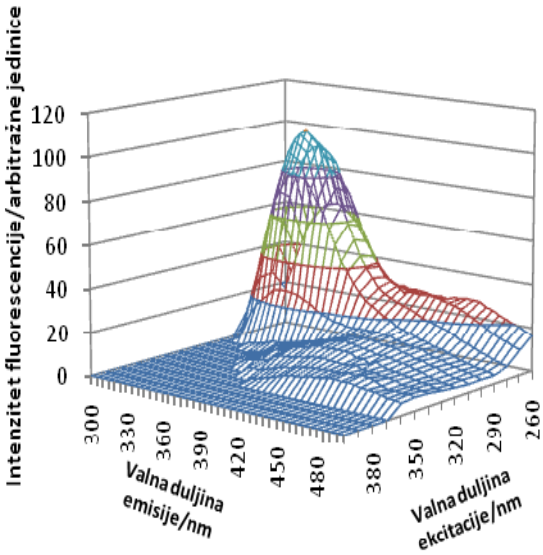
Slika 4 Trodimenzionalni spektri fluorescencije sirutke sirovog kozjeg (a) i sirovog kravljeg mlijeka (b), te UHT kozjeg (c) i UHT kravljeg mlijeka



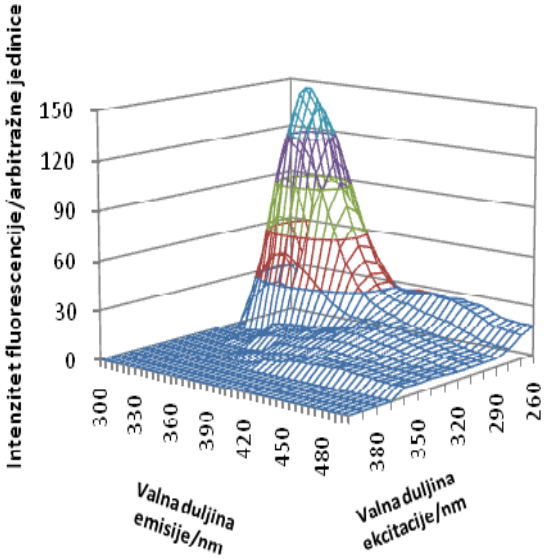
a)



b)



c)



d)

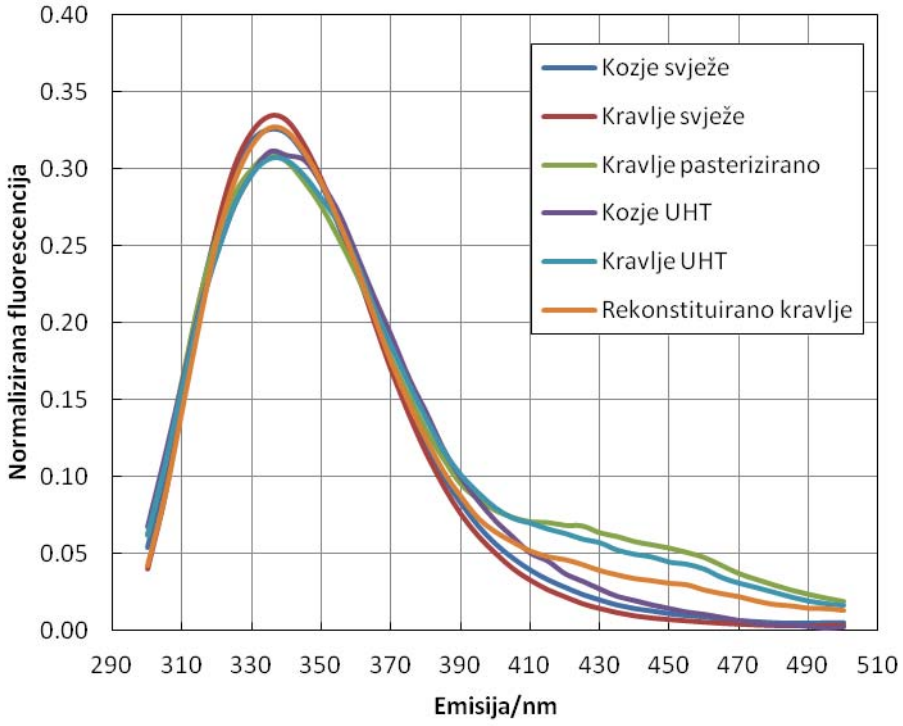
Slika 5 Trodimenzionalni spektri fluorescencije sirutke sirovog (a), pasteriziranog (b), UHT (c) i rekonstituiranog kravljeg mlijeka (d)

Obzirom na nepostojanje razlika u položaju vrhova fluorescencije u trodimenzionalnim spektrima fluorescencije sirutki pripremljenih od različitih tipova kravljeg i kozjeg mlijeka može se zaključiti da trodimenzionalni spektri fluorescencije ne mogu poslužiti u razlikovanju vrsta mlijeka.

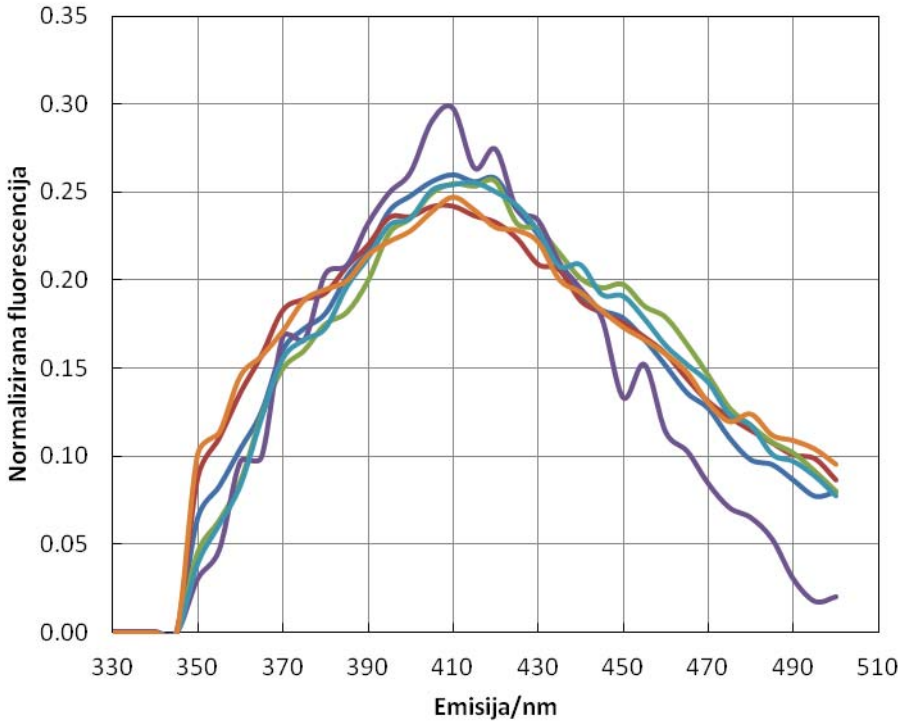
4.2. RAZLIKOVANJE VRSTI MLIJEKA NA OSNOVI NORMALIZIRANIH EMISIJSKIH KRIVULJA FLUORESCENCIJE SIRUTKE

Obzirom da su sve ispitane vrste mlijeka pokazivale dominantni vrh fluorescencije pri 280/340 nm te sporedni vrh fluorescencije niskog intenziteta centriran pri 330/430 nm, provedena je analiza emisijskih spektara fluorescencije pri valnim duljinama ekscitacije 280 i 330 nm. Kako bi se vrste mlijeka mogle međusobno usporediti provedena je normalizacija emisijskih krivulja prema Ruoff i sur. (2005.). Na takav su se način svi uzorci iste vrste i tipa mlijeka mogli svrstati pod jednu krivulju emisije pri određenoj valnoj duljini ekscitacije.

Na **Slici 6** može se vidjeti da se različite vrste i tipovi mlijeka ne mogu razlikovati na osnovi normaliziranih krivulja emisije. Stoga se ova metoda ne može koristiti za razlikovanje različitih vrsta i tipova mlijeka.



a)



b)

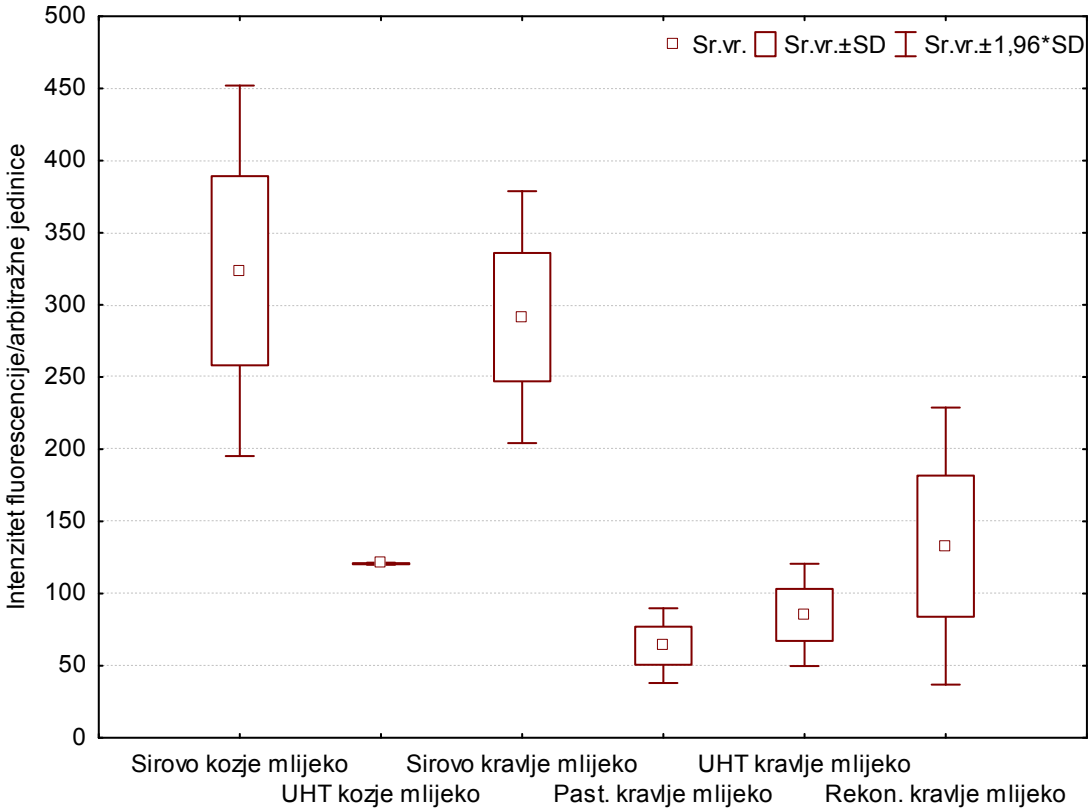
Slika 6 Normalizirane emisijske krivulje fluorescencije sirutke ispitanih vrsta mlijeka pri valnoj duljini ekscitacije pri 280 nm (a) i 330 nm (b)

4.3. INTENZITETI VRHOVA FLUORESCENCIJE SIRUTKE KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA PRI TOČNO ODREĐENIM VALNIM DULJINAMA EKSCITACIJE I EMISIJE

Iako je analiza trodimenzionalnih spektara fluorescencije pokazala da se različite vrste i tipovi mlijeka ne razlikuju po položaju vrhova fluorescencije, uočeno je postojanje razlika u intenzitetu fluorescencije vrhova. Stoga su određeni intenziteti vrhova fluorescencije sirutke kravljeg i kozjeg mlijeka, pri točno određenim valnim duljinama ekscitacije i emisije od 290/340 nm i 330/425 nm.

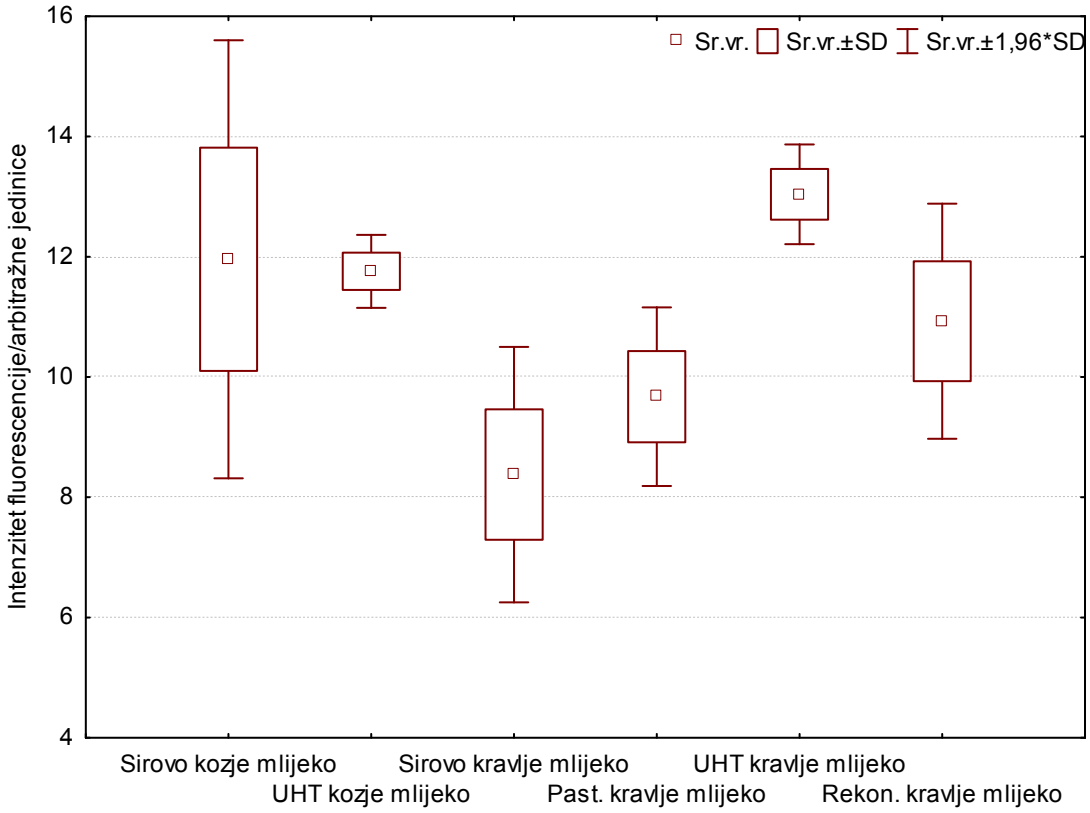
Slikom 7 prikazani su rezultati intenziteta vrhova fluorescencije uzoraka sirutke kozjeg i kravljeg mlijeka pri valnoj duljini od 290/340 nm. Vidljivo je da sirutke pripravljene od sirovih mlijeka sadrže puno veću količinu proteina nego sirutke pripravljene od kupovnih mlijeka. Međutim, te su razlike prije svega odraz razlika u koncentraciji proteina zbog standardizacije kupovnih mlijeka (deklarirani udio proteina u uzorcima pasteriziranog kravljeg mlijeka je 3,3%, u uzorcima trajnog kravljeg mlijeka 3,2 i 3,4% te u uzorcima trajnog kozjeg mlijeka 2,8%). Stoga se rezultati intenziteta vrhova fluorescencije pri 290/340 nm ne mogu koristiti kao pouzdan indikator za razlikovanje vrsta mlijeka.

Usporedba intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm između kupovnih mlijeka (pasterizirano, UHT i rekonstituirano) pokazuje blage, ali statističke značajne razlike među vrstama kupovnih mlijeka.



Slika 7 Prosječni intenziteti fluorescencije pri 290/340 nm u sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka

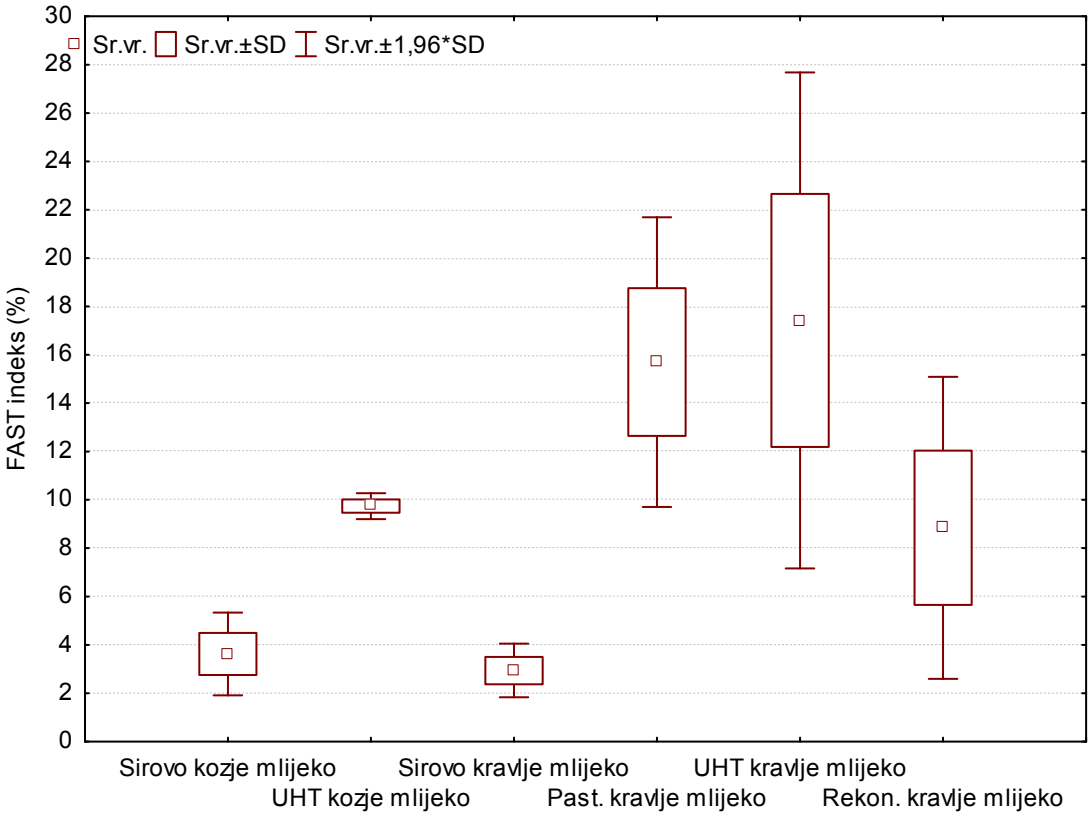
Intenziteti fluorescencije uzoraka sirutke pri valnoj duljini od 330/425 nm nalaze se u puno užem rasponu. U slučaju sirutke sirovog i UHT kozjeg mlijeka intenziteti fluorescencije variraju od 11,76 do 11,96, a slučaju sirutke sirovog, pasteriziranog, UHT i rekonstituiranog kravljeg mlijeka u rasponu od 8,38 do 13,04 arbitražnih jedinica (**Slika 8**). Usporedba istih tipova mlijeka (sirovo, UHT) različitih vrsti (kravlje, kozje) pokazuje statistički značajne razlike između sirutki kravljeg i kozjeg mlijeka ($p<0,05$), pri čemu sirutke sirovih kozjih mlijeka pokazuju nešto više intenzitete fluorescencije od sirutki sirovih kravljih mlijeka, dok sirutke UHT kravljih mlijeka pokazuju više vrijednosti fluorescencije od sirutki UHT kozjih mlijeka. Isto tako se mogu uočiti statistički značajne razlike između različitih tipova termički obrađenih kravljih mlijeka pri čemu sirutke UHT kravljeg mlijeka posjeduju najviše vrijednosti fluorescencije za razliku od ostalih tipova kravljih mlijeka. Ove razlike ne mogu se uočiti između sirutki sirovih i UHT kozjih mlijeka.



Slika 8 Prosječne vrijednosti intenziteta fluorescencije pri 330/425 nm u sirutkama ispitivanih uzoraka mlijeka

4.4. FAST INDEKS SIRUTKI KRAVLJIH I KOZJIH MLIJEKA

Obzirom da su uočene značajne razlike u intenzitetima fluorescencije pri 330/425 nm između sirutki različitih vrsta (kravlje i kozje) i tipova mlijeka (sirovo, pasterizirano, UHT, rekonstituirano) koje jednim dijelom mogu i potjecati od razlika u količini prisutnih proteina (izraženih kao fluorescencija pri 290/340 nm), provedena je analiza razlika na osnovi FAST indeksa. FAST indeks izračunat je kao omjer intenziteta fluorescencije pri 330/425 i 290/340 nm.

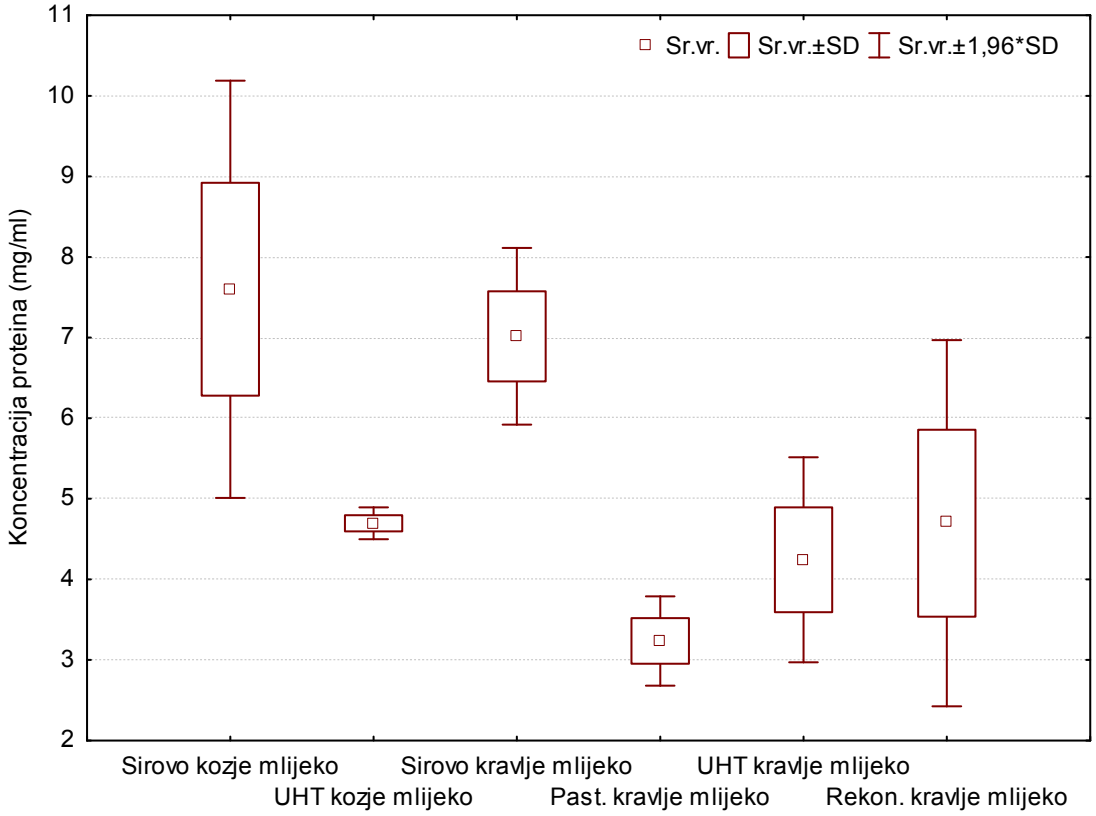


Slika 9 Prosječne vrijednosti FAST indeksa sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka

Rezultati su pokazali (**Slika 9**) na postojanje značajnih razlika FAST indeksa između sirutki sirovih i kupovnih mlijeka iste vrste. Sirutke sirovih kozjih i kravljih mlijeka pokazale su znatno niže vrijednosti FAST indeksa od sirutki kupovnih mlijeka obrađenih pasterizacijom ili sterilizacijom UHT postupkom. Tako je FAST indeks sirutki UHT kozjih mlijeka oko 2,7 puta veći nego u slučaju sirutki sirovih kozjih mlijeka. U slučaju sirutki kravljih mlijeka, FAST indeks sirutki pasteriziranih mlijeka je 5,3 puta veći u odnosu na sirutke sirovih mlijeka, a FAST indeks sirutki UHT mlijeka je 5,9 puta veći u odnosu na sirutke sirovih mlijeka, što upućuje na nastajanje fluorescentnih Maillardovih produkata tijekom termičke obrade. Navedeno upućuje da tijekom termičkog tretmana kravljih mlijeka nastaje dvostruko više Maillardovih produkata nego u slučaju termičkog tretmana kozjih mlijeka. Ova pojava se može objasniti dvostruko manjim sadržajem lizina u kozjem mlijeku (Mioč i Pavić, 2002.), jer Maillardovi produkti nastaju reakcijom između α-amino skupina lizinskih ostataka proteina i reducirajućih šećera u mlijeku (Rufian-Henares i sur., 2006.).

4.5. KONCENTRACIJA PROTEINA U SIRUTKI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Obzirom da su rezultati intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka pokazivali značajne razlike koje se mogu pripisati razlikama u koncentraciji proteina, u pripremljenim sirutkama određena je koncentracija proteina pomoću dvije metode, Lowryjeve i Bradfordičine. Srednje vrijednosti rezultata prikazane su **Slikama 10**, **11**.

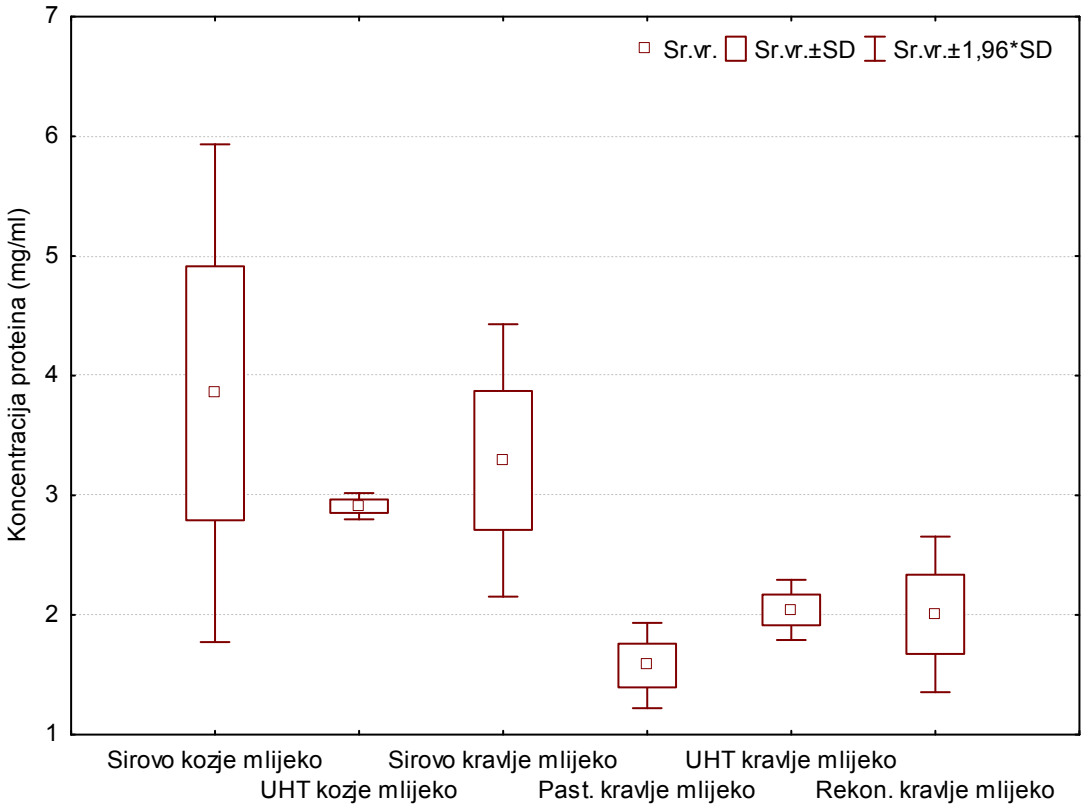


Slika 10 Srednje vrijednosti koncentracije proteina sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka određenih Lowryjevom metodom

Analiza koncentracije proteina u pripremljenim sirutkama ukazala je na postojanje značajnih razlika između različitih tipova i vrsta mlijeka. Sirutke sirovih kozjih i kravljih mlijeka pokazivale su značajno veću koncentraciju proteina od kupovnih mlijeka, što ne začuđuje budući su sirova mlijeka nestandardizirana obzirom na sadržaj proteina i mliječnu mast. Međutim, kad su isti tipovi kravljeg i kozjeg mlijeka (sirovo, UHT) uspoređeni, nije uočena značajna razlika u količini proteina između sirovog kozjeg i kravljeg, kao i UHT kozjeg

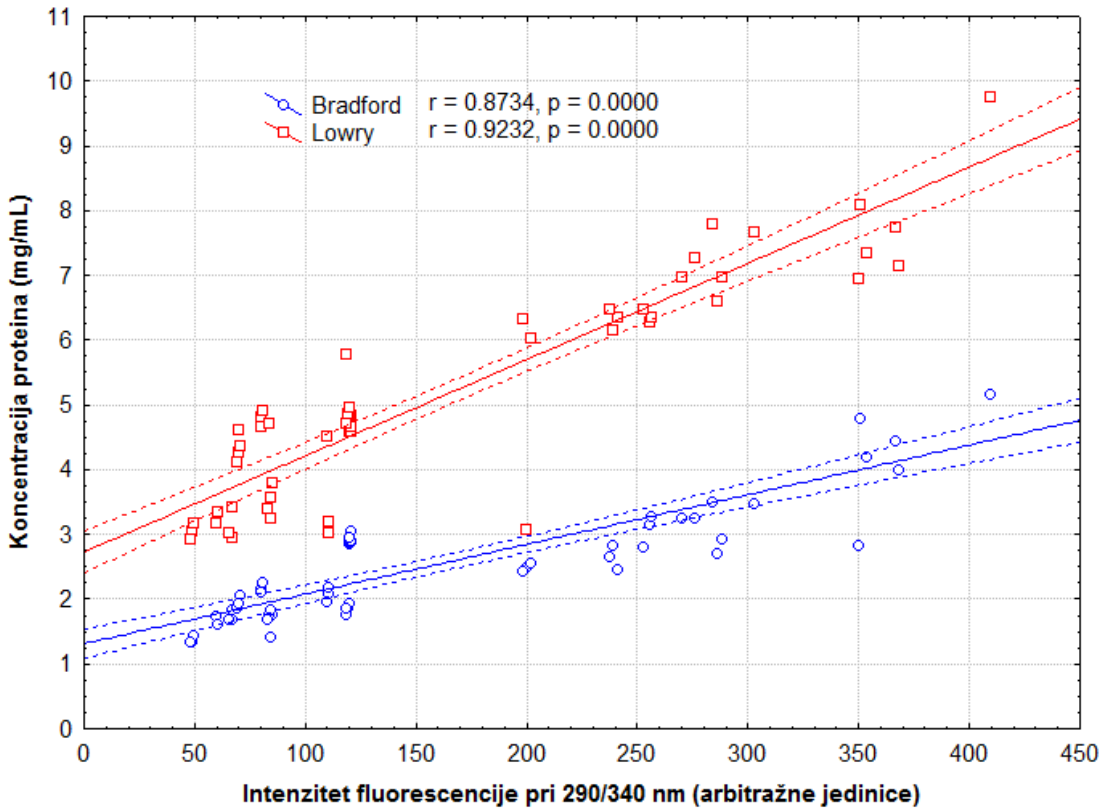
i kravljeg mlijeka. Štoviše, navedeni rezultati su pokazivali vrlo veliku sličnost sa rezultatima intenziteta fluorescencije sirutki pri 290/340 nm.

Gotovo identične razlike dobivene su analizom koncentracije proteina u sirutkama ispitivanih uzoraka mlijeka određenih Bradfordičinom metodom (**Slika 11**). Međutim, koncentracija proteina u sirutki ispitivanih vrsta mlijeka određena Bradfordičinom metodom pokazala se dvostruko nižom nego koncentracija proteina određena Lowryjevom metodom. Najvjerojatniji razlog tomu je što se u Bradfordičinoj metodi boja veže samo na bazične i aromatske bočne ogranke u proteinu, dok se u Lowryjevoj metodi ioni bakra vežu na peptidne veze.



Slika 11 Srednje vrijednosti koncentracije proteina u sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka određenih Bradfordičinom metodom

Obzirom da su se uočene razlike u koncentraciji proteina u sirutkama ispitivanih uzoraka mlijeka pokazale gotovo identičnima razlikama uočenim u intenzitetu fluorescencije pri 290/340 nm, provedena je usporedba koncentracije proteina i intenziteta fluorescencije (**Slika 12**).

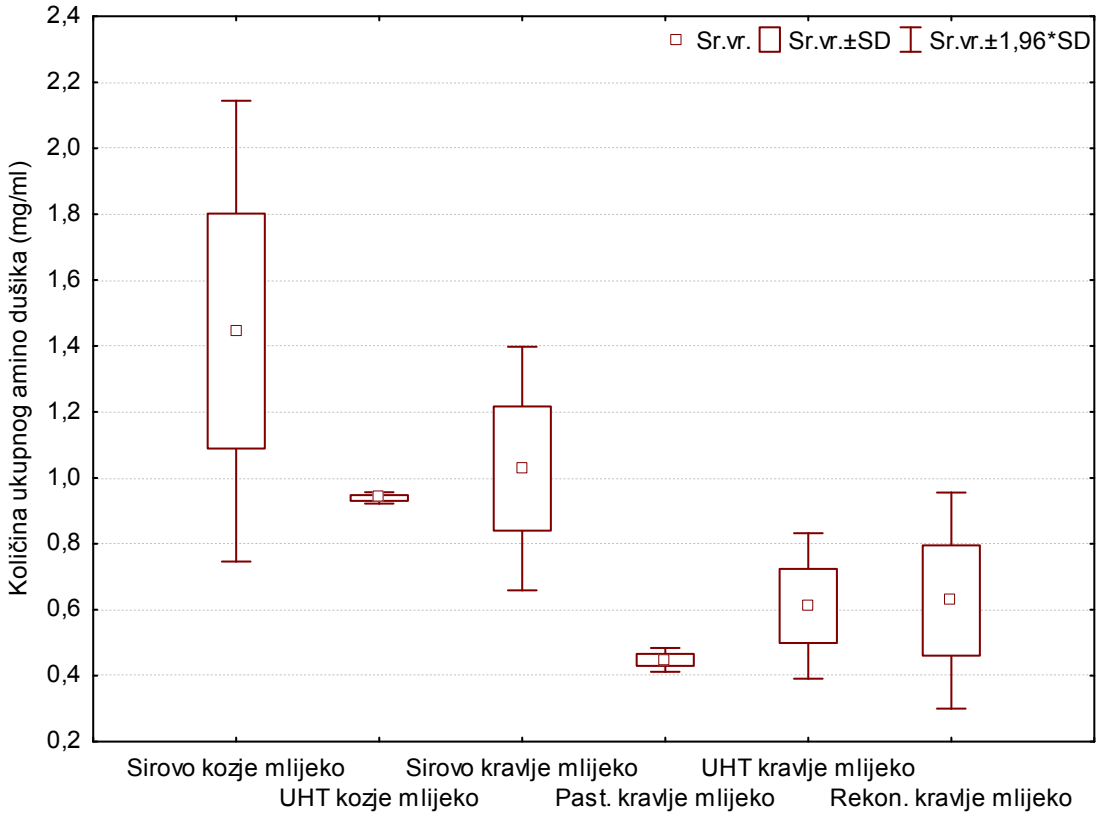


Slika 12 Usporedba koncentracije proteina i intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka

Usporedba koncentracije proteina u sirutkama ispitivanih uzoraka mlijeka i intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm ukazala je na postojanje visokog stupnja korelacije između ovih metoda. Tako je između Lowryjeve metode i intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm ustanovljen značajan koeficijent korelacije od 0,9232, a u slučaju Bradfordičine metode nešto niži koeficijent korelacije od 0,8734. Ovo upućuje da se mjerenjem intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm može procijeniti koncentracija proteina u sirutki. Pri tome je ključno napomenuti da je Lowryjeva metoda pogodnija metoda za određivanje koncentracije proteina u sirutki, budući pokazuje znatno viši stupanj korelacije.

4.6. KOLIČINA UKUPNOG AMINO DUŠIKA U SIRUTKI KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

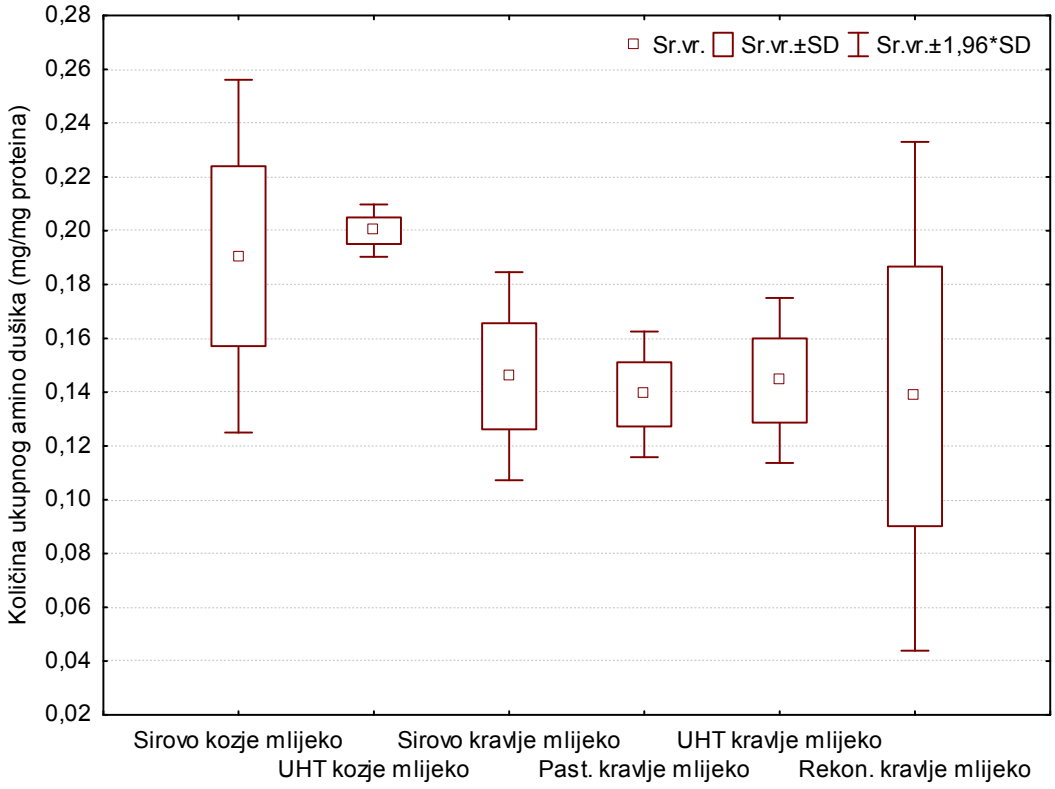
OPA metodom određena je količina ukupnog amino dušika u sirutkama ispitivanih uzoraka mlijeka (**Slika 13**). Kao i u slučaju intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm te koncentracije proteina određenih Lowryjevom i Bradfordičinom metodom uočene su značajno više količine ukupnog amino dušika u sirutkama pripravljenim od sirovog kozjeg i kravljeg mlijeka u odnosu na kupovna mlijeka. Sirovo kozje mlijeko sadržavalo je oko 2 puta veću količinu ukupnog amino dušika, a sirovo kravlje mlijeko oko 1,5 do 2 puta veću količinu od kupovnih mlijeka. Štoviše, kada se količina ukupnog amino dušika usporedi sa količinama u neproteinskoj frakciji (NPN) (Eškit, 2010.), tada se može uočiti da sirutke sirovih vrsta mlijeka sadrže oko 4 do 6 puta, a sirutke termički obrađenih mlijeka oko 2 do 3 puta veću količinu ukupnog amino dušika od NPN frakcija. To se može pripisati značajnom doprinosu proteina sirutke određivanju ukupnog amino dušika. Naime, uz α-amino skupine proteina i peptida sirutke sa o-ftaldialdehidom reagiraju i amino skupine bočnih ogranaka proteina i peptida sirutke, što rezultira značajno povećanim sadržajem ukupnog amino dušika. No, bez obzira na razlike između sirovih i kupovnih mlijeka iste vrste, mogu se uočiti značajne razlike između istog tipa kravljeg i kozjeg mlijeka. Tako sirutka sirovih kozjih mlijeka sadrži oko 30%, a sirutka UHT kozjeg mlijeka oko 35% ukupnog amino dušika više nego isti tip kravljeg mlijeka. Ovo se može pripisati većem sadržaju malih peptida u kozjem u odnosu na kravlje mlijeko (Eškit, 2010.).



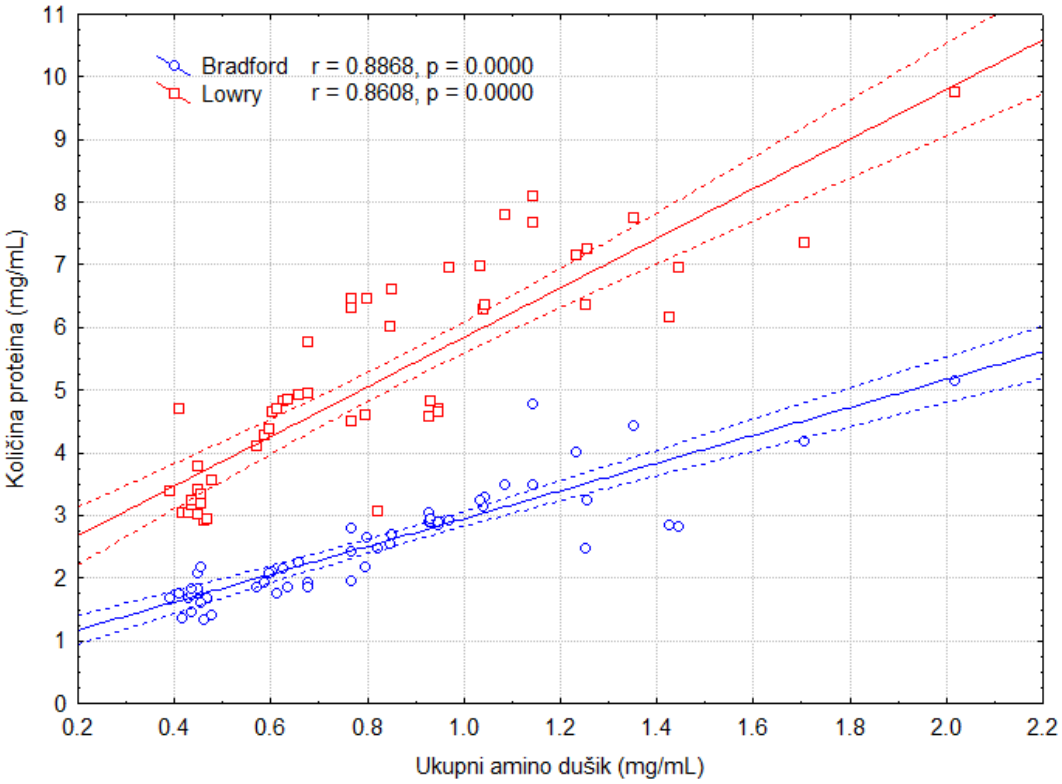
Slika 13 Srednje vrijednosti količine ukupnog amino dušika u sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka

Obzirom da su se sirutke navedenih uzoraka mlijeka međusobno razlikovale na osnovi količine ukupnog amino dušika za koju je pretpostavljeno da glavninom dolazi od proteina i peptida sirutke, to je provedena analiza razlika u sadržaju ukupnog amino dušika po mg proteina (**Slika 14**). Rezultati ove analize pokazali su da se sirutka kozjih mlijeka značajno razlikuje od kravljih budući sadrži 30 % veći sadržaj ukupnog amino dušika/mg proteina, dok između sirutki istog tipa mlijeka (sirovo, kupovno) ne postoje značajne razlike. Ovo je potvrdilo značajan doprinos proteina i peptida sirutke ukupnom amino dušiku.

Pretpostavljeni navedeni doprinos proteina i peptida sirutke ukupnom amino dušiku dodatno je potvrđen usporedbom količine proteina sirutke i količine ukupnog dušika (**Slika 15**).



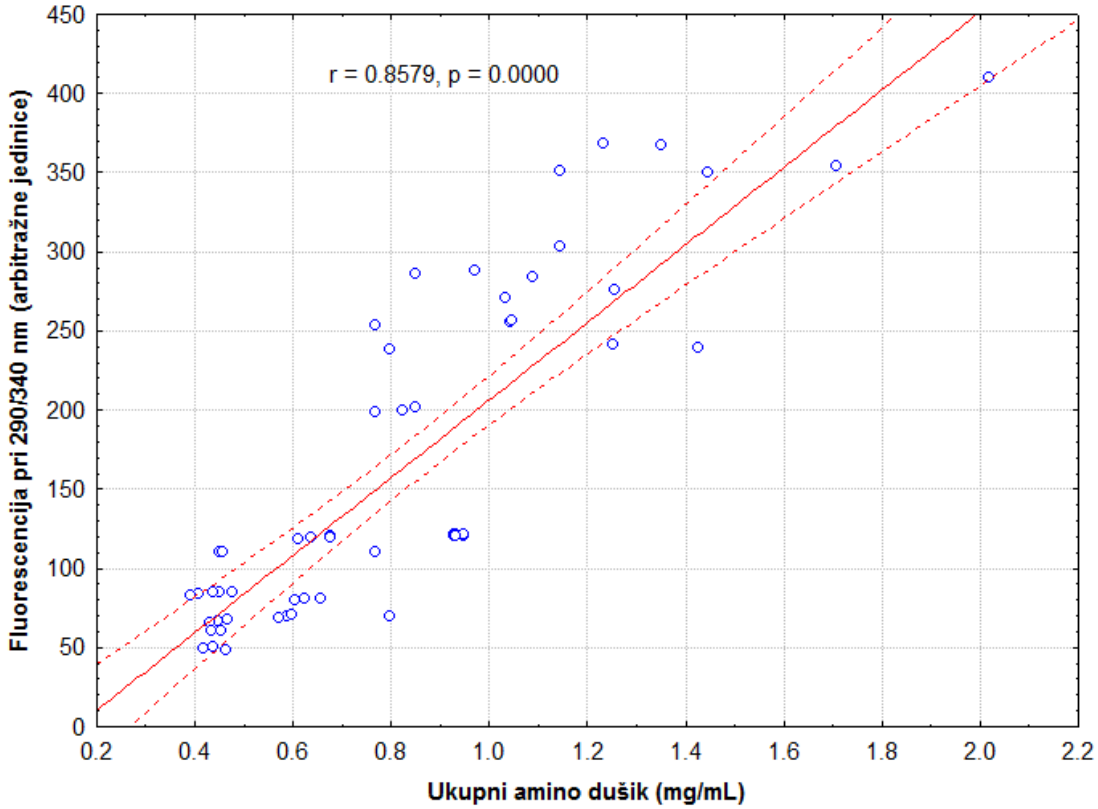
Slika 14 Ukupni amino dušik/mg proteina sirutki ispitivanih uzoraka mlijeka



Slika 15 Usporedba količine ukupnog amino dušika i količine proteina

Iz navedenog grafa uočljivo je da postoji statistički značajna korelacija između koncentracije proteina određenih Lowryjevom i Bradfordičinom metodom i količine ukupnog amino dušika. Stoga se može zaključiti da se mjerenjem količine proteina Lowryjevom ili Bradfordičinom metodom može procijeniti količina ukupnog amino dušika prisutnog u sirutki kozjeg i kravljeg mlijeka.

Obzirom da je uočena i značajna korelacija između koncentracije proteina određenih Lowryjevom metodom i mjerenjem intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm (**Slika 12**), to je količina ukupnog amino dušika uspoređena sa intenzitetom fluorescencije pri 290/340 nm (**Slika 16**).



Slika 16 Usporedba količine ukupnog amino dušika i intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm

Iz navedenog grafa uočljivo je da postoji statistički značajna korelacija između intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm i količine ukupnog amino dušika. Stoga se može zaključiti da se mjerenjem intenziteta fluorescencije pri 290/340 nm može procijeniti količina ukupnog amino dušika prisutnog u sirutki kozjeg i kravljeg mlijeka.

5. ZAKLJUČAK

- Na osnovi trodimenzionalnih spektara fluorescencije sirutke kozjeg i kravljeg mlijeka nije moguće razlikovati kozje i kravlje mlijeko.
- Kravlje i kozje mlijeko ne mogu se razlikovati na osnovi normaliziranih emisijskih krivulja fluorescencije sirutke.
- FAST indeks može poslužiti za razlikovanje sirovih od termički obrađenih mlijeka.
- Prema sadržaju ukupnog amino dušika po mg proteina mogu se razlikovati sirutke kozjih i kravljih mlijeka.
- Određivanje intenziteta fluorescencije sirutke pri 290/340 nm može poslužiti za procjenu koncentracije proteina u sirutki, pri čemu je Lowryjeva metoda za određivanje koncentracije proteina u sirutki pogodnija od Bradfordičine.

6. LITERATURA

Andersen C M, Mortensen G: Fluorescence spectroscopy: A rapid tool for analyzing dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:720-729, 2008.

Birlouez-Aragon I, Nicolas M, Metais A, Marchond N, Grenier J, Calvo D: A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *International Dairy Journal*, 8:771-777, 1998.

Borkova M, Snaželova J: Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products - a review. *Czech Journal of Food Science*, 23 (2):41-50, 2005.

Božanić R, Tratnik Lj, Drgalić I: Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo*, 52 (3):207-237, 2002.

Bradford M M: A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248-254, 1976.

Christensen J, Norgaard L, Bro R, Engelsen S B: Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical Rewievs*, 106 (6):1979-1994, 2006.

Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, Catignani G L: Spectrophotometric assay using ophtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66:1219-1227, 1983.

Damjanović S, Samardžija D, Havranek J: Metode za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka. *Mljekarstvo,* 56 (3):221-232, 2006.

DePeters E J, Ferguson J D: Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of Dairy Science,* 75:3192-3209, 1992.

Đačanin Lj: Optičke i strukturne osobine prahova cink-silikata dopiranih jonima retkih zemalja i prelaznih metala. *Magistarski rad*. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, Novi Sad, 2009.

Eškit M: Fluorescencija peptidne frakcije kravljeg i kozjeg mlijeka. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 2010.

European Food Safety Authority: *Scientific opinion on the suitability of goat milk protein as a source of protein in infant formulae and in follow-on formulae.* EFSA Journal 2012, 10(3):2603, Italija.

Fox P F, McSweeney P L H: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London, 1998.

Haenlein G F W: Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research,* 51:155-163, 2004.

Herceg Z, Režek A: Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo*, 56 (4):379-396, 2006.

Hougaard A B, Lawaetz A J, Ipsen R H: Front face fluorescence spectroscopy and multi-way data analysis for characterization of milk pasteurized using instant infusion. *LWT - Food Science and Technology,* 53:331-337, 2013.

Hurley I P, Ireland H E, Coleman R C, Williams J H H: Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food Science and Technology*, 39:873-878, 2004.

Jenness R: Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science,* 63:1605-1630, 1980.

Lakowicz R J: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, 2006.

Lopez-Calleja I, Gonzalez I, Fajardo V, Martin I, Hernandez P E, Garcia T, Martin R: Quantitative detection of goats milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18:1466-1473, 2007.

Matijević B, Blažić M: Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo*, 58 (2):151-169, 2008.

Mioč B, Pavić V: *Kozarstvo*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 2002.

Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R: Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science,* 93:5651-5660, 2010.

Nielsen P M, Petersen D, Damnbmann C: Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66:642-646, 2001.

Olalla M, Ruiz-Lopez M D, Navarro M, Artacho R, Cabrera C, Gimenez R, Rodriguez C, Mingorance R: Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. *Food Chemistry*, 113:835-838, 2009.

Park Y W, Juarez M, Ramos M, Haenlein G F W: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68:88-113, 2007.

Park Y W: *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell, Iowa, 2009.

Pasztor-Huszar K: Protein changed of various types of milk as affected by high hydrostatic pressure processing. *Doktorska disertacija*. Faculty of Food Science, Budimpešta, 2008.

Pesić M, Barac M, Vrvić M, Ristić N, Macej O, Stanojević S: Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125:1443-1449, 2011.

Prpić Z, Konjačić M, Vnučec I, Ramljak J, Ivanković A: Nehranidbeni čimbenici sadržaja ureje u mlijeku. *Stočarstvo*, 59:173-187, 2005.

Rahimi Yazdi S, Corredig M: Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry*, 132:1143-1149, 2012.

Ramanujam N: Fluorescence spectroscopy in vivo. U *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.

Reid L M, O'Donnell C P, Downey G: Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology*, 17:344-353, 2006.

Rufian-Henares J A, Guerra-Hernandez E, Garcia-Villanova B: Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomltose or lactose solutions. *Food chemistry*, 98:685-692, 2006.

Ruoff K, Karoui R, Dufour E, Luginbuhl W, Bosset J O, Bogdanov S, Amado R: Authentication of the botanical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy - A preliminary study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1343-1347, 2005.

Singhal R S, Kulkarni P R, Rege D V: *Handbook of indices of food quality and authenticity*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1997.

Skoog D A, West D M, Holler F J: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.

Slačanac V, Božanić R, Hardi J, Rezessyne Szabo J , Lučan M, Krstanović V: Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63:1-19, 2010.

Strelec I: *Praktikum iz biokemije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Song H, Xue H, Han Y: Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control*, 22:883-887, 2011.

Špoljarić J, Mikulec N, Plavljanić D, Radeljević B, Havranek J, Antunac N: Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of γ-casein. *Mljekarstvo*, 63 (3):115-121, 2013.

Tratnik Lj: *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 1998.

Veloso A C A, Teixeira N, Peres A M, Mendonca A, Ferreira I M P L V O: Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea–polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 87:289-295, 2004.

White C E, Argauer R J: Fluorescence analysis - A practical approach. New York, 1970.

Zachar P, Šoltes M, Kasarda R, Novotny J, Novikmecova M, Marcinčakova D: Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo*, 61 (3):199-207, 2011.

Zelenakova L, Židek R, Čanigova M: Reliability of cow casein quantitation in sheep milk and cheese by ELISA method. *Journal of Food Physics*, 22-26, 2010.