



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET



# **Profil proteina i sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

**Dr Mirela Iličić**

**Dr Olivera Đuragić**

Kandidat:

**Jasmina Gubić, dipl. inž. spec.**

Novi Sad, 2016. godina

## UNIVERZITET U NOVOM SADU

## TEHNOLOŠKI FAKULTET

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska publikacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Jasmina Gubić, dipl. inž. spec.
Mentor: MN	Dr Mirela Iličić, docent Dr Olivera Đuragić, naučni saradnik
Naslov rada: NR	Profil proteina i sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija

ZP	
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Tekst autora
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 6, stranica 105, slika 28, tabela 24, literaturnih navoda 227
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda
Predmetna odrednica: PO	Mleko magarice balkanske rase, profil proteina, sastav masnih kiselina, laktacija
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod IZ	U okviru doktorske disertacije ispitan je nutritivni kvalitet mleka magarice balkanske rase tokom laktacije. Prosečna suva materija mleka magarice balkanske rase iznosi 9,26%. Sadržaj proteina tokom laktacije kreće se od 1,40% do 1,92%. Prosečan sadržaj mlečne masti je 0,61%, a sadržaj laktoze iznosi 6,50%.

	<p>Sadržaj analiziranih minerala: Ca, Na, K, Mg, P i Zn se povećava tokom laktacije i maksimalna vrednost utvrđena je 170. dana. Primenom kapilarne elektroforeze definisan je profil proteina mleka magarice balkanske rase. Identifikovane su sledeće proteinske frakcije: <math>\alpha_1</math>-kazein, <math>\alpha_2</math>-kazein, <math>\beta</math>-kazein (A, F), <math>\alpha</math>-laktalbumin (A, C), <math>\beta</math>-laktoglobulin, lizozim, laktoferin, serum albumin i imunoglobulin čiji sadržaj opada tokom perioda laktacije. Sadržaj <math>\alpha</math>-laktalbumina se kreće od 3090 mg/l do 1990 mg/l, a lizozima varira od 1040 mg/l do 2970 mg/l. Navedene frakcije proteina su najzastupljenije u mleku magarice balkanske rase. Laktoferin i imunoglobulin su frakcije sa najmanjim udelom u mleku magarice balkanske rase. Korišćenjem gasne hromatografije/masene spektrometrije utvrđen je sastav masnih kiselina mleka. Udeo esencijalne linolne kiseline (C18:2 n6) kreće se u opsegu od 7,08%, do 9,69%, a udeo <math>\alpha</math>-linoleinske kiseline (C18:3 n3) varira od 5,85% do 7,83%.</p> <p>Sastav mleka magarice balkanske rase kompariran je sa nutritivnim karakteristikama humanog mleka tokom 40. i 90. dana laktacije. Utvrđene su značajne razlike u sadržaju proteina mleka, mlečne masti i minerala. Odnos kazeina i proteina surutke kreće se od 0,68 do 0,75 u mleku magarice, dok u humanom mleku varira od 0,59 do 0,70. Udeo <math>\alpha</math>-linoleinske kiseline (C18:3 n3) je oko 2,5 puta veći u mleku magarice u odnosu na humano mleko.</p> <p>Generalno se može zaključiti da mleko magarice balkanske rase ima specifične nutritivne karakteristike koje variraju u zavisnosti od sastava hrane za životinje i analiziranog perioda laktacije.</p>
Datum prihvatanja teme:  DP	19.06.2015.
Članovi komisije:	Dr Spasenija Milanović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu,

KO	<p>predsednik</p> <p>Dr Mirela Iličić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor</p> <p>Dr Olivera Đuragić, naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor</p> <p>Dr Aleksandra Torbica, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, član</p>
----	--

University of Novi Sad

Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Content code: CC	PhD Thesis
Author: AU	MSc Jasmina Gubić
Mentor: MN	Dr Mirela Iličić, Assistant Professor Dr Olivera Đuragić, Research Associate
Title: TI	Protein profile and fatty acid composition on donkey milk of the balkans breed
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia

---

Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	Chapters 6, pages 105, figures 28, tables 24, references 227
Scientific field: SF	Technological engineering
Scientific discipline: SD	Dairy technology
Subject / Key words: SKW	Donkey milk balkan breeds, protein profile, fatty acid composition, lactation
UDC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	Nutritional quality of Balkan donkey milk during lactation was investigated within this thesis. The mean content of dry matter, fat and lactose in the Balkan donkey milk was 9.26%, 0.61% and 6.50%, respectively. Protein content during lactation period ranged from 1.40% to 1.92%. Content of the analyzed minerals: Ca, Na, K, Mg, Zn and P increased during the lactation period and reached their maximum value at 170 <sup>th</sup> day. The protein profile of Balkans donkey milk was

	<p>defined by application of capillary electrophoresis when the following protein fractions: <math>\alpha_1</math>-kazein, <math>\alpha_2</math>-kazein, <math>\beta</math>-kazein (A, F), <math>\alpha</math>-laktalbumin (A, C), <math>\beta</math>-laktoglobulin, lysozyme, lactoferrin, serum albumins and immunoglobulins, whose content decreases during lactation period, were identified. <math>\alpha</math>-laktalbumin contents ranged from 3090 mg/l to 1990 mg/ and lysozyme varies between 1040 mg/l to 2970 mg/l. These two protein fractions were the most abundant in the Balkan donkey milk, while lactoferrin and immunoglobulin were at least represented. The fatty acid composition of Balkan donkey milk was determined using gas chromatography/mass spectrometry. The share of the essential linoleic (C18: 2 n6) and <math>\alpha</math> - linolenic (C18: 3 n3) acid ranged from 7.08 % to 9.69% and from 5.85 % to 7.83 %.</p> <p>Nutritional quality of Balkan donkey milk has been compared with the nutritional quality of human milk during the 40<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> day of lactation. Significant differences in the protein content of milk, fat and minerals were found. The ratio of casein and whey protein ranged from 0.68 to 0.75 in the Balkan donkey milk, while in human milk this value varies from 0.59 to 0.70. The share of <math>\alpha</math>-linolenic acid (C18:3 n3) is around 2.5 times higher in donkey than in human milk.</p> <p>The main conclusion is that Balkan donkey milk has specific and unique nutritional quality which depend on the feed composition and on the analyzed period of lactation.</p>
Accepted by science board: ASB	19.06.2015.
Defended on: DE	
Thesis defend board: DB	<p>Spasenija Milanović, Ph. D., Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, president</p> <p>Mirela Iličić, Ph. D., Assistant Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, mentor</p> <p>Olivera Đuragić, Ph. D., Research Associate, Institute</p>



	<p>of Food Technology, Novi Sad, University of Novi Sad, mentor</p> <p>Aleksandra Torbica, Ph. D., Principal Research Fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, University of Novi Sad, member</p>
--	--

*Iskoristila bih stranicu disertacije da se zahvalim svima onima koji su zaslužni za sve ostale stranice ove disertacije, kao i mnoge druge stranice ispisane tokom mog studiranja i istraživačkog rada.*

*Autor*

---

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
PREGLED LITERATURE .....	3
KARAKTERISTIKE MAGARICE BALKANSKE RASE .....	3
NUTRITIVNA VREDNOST MLEKA MAGARICE.....	5
PROTEINI .....	6
Kazein.....	8
Proteini surutke .....	10
Lizozim.....	14
Laktoferin .....	14
MLEČNA MAST .....	15
Masne kiseline.....	17
LAKTOZA .....	19
MINERALI .....	20
VITAMINI .....	21
BIOAKTIVNE KOMPONENTE .....	21
UTICAJ ISHRANE NA SASTAV MLEKA MAGARICE TOKOM LAKTACIJE .....	25
KARAKTERISTIKE HRANE ZA ŽIVOTINJE.....	25
SASTAV MLEKA .....	30
MATERIJAL I METODI RADA.....	33
MATERIJAL .....	33
Mleko magarice balkanske rase .....	33
Humano mleko.....	33
Hrana za životinje.....	33
METODI.....	34
Fizičko-hemijske metode analize mleka magarice balkanske rase .....	34
Kapilarna elektroforeza proteina mleka.....	35
Gasna hromatografija/masena spektrometrija .....	35
Sastav masnih kiselina mleka i hrane za životinje .....	35
Spektrofotometrijska analiza .....	36
Sadržaj ukupnog fosfora u mleku .....	36
Sadržaj ukupnog fosfora hrane za životinje .....	37
Antioksidativna aktivnost mleka .....	37
Atomska apsorpciona spektrofotometrija.....	37
Sadržaj minerala u mleku.....	37
Sadržaj minerala hrane za životinje .....	38
Enzimski analiza vitamina C u mleku .....	38
HPLC analiza vitamina E i A u mleku .....	38
Analiza hrane za životinje.....	39
Statistička analiza rezultata .....	39
Deskriptivna statistika .....	39
Klaster analiza (CA).....	40
Analiza glavnih komponenata (PCA).....	40

<b>REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>42</b>
<b>KARAKTERISTIKE MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE TOKOM PERIODA LAKTACIJE .....</b>	<b>42</b>
HEMIJSKI SASTAV .....	42
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) hemijskog i mineralnog sastava mleka magarice balkanske rase .....	46
PROFIL PROTEINA .....	48
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) profila proteina mleka magarice balkanske rase .....	53
SASTAV MASNIH KISELINA .....	55
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase .....	59
<b>KOMPARATIVNA ANALIZA MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE I HUMANOG MLEKA .....</b>	<b>61</b>
HEMIJSKI SASTAV .....	61
SADRŽAJ MINERALA .....	63
SADRŽAJ VITAMINA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST .....	64
PROFIL PROTEINA .....	65
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) nutritivnih karakteristika mleka magarice i humanog mleka .....	69
SASTAV MASNIH KISELINA .....	71
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) sastava masnih kiselina mleka magarice i humanog mleka .....	74
<b>UTICAJ ISHRANE NA SASTAV MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE .....</b>	<b>77</b>
HEMIJSKI SASTAV HRANE ZA ŽIVOTINJE .....	77
Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) sastava hrane za životinje .....	82
<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>84</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>87</b>

---



## UVOD

Očuvanje autohtonih rasa životinja započeto je u cilju plasiranja animalnih proizvoda na domaće tržište, u skladu sa preporukama Organizacije za hranu i poljoprivredu-FAO (Stojanović, 2012) i Pravilnikom o listi genetskih rezervi domaćih životinja, autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa (Sl. list RS, br. 38/2010) u Srbiji. Prema podacima iz 2009. godine magarica balkanske rase (*Equus assinus asinus*) predstavlja prirodni resurs Balkanskog poluostrva i broji oko 1000 jedinki (Kugler i sar., 2008; FAO DAD-IS, 2009). Navedena rasa uzgaja se na farmi Specijalnog rezervata prirode "Zasavica", nadomak Sremske Mitrovice, a postoji još nekoliko farmi u Srbiji od kojih je najveća na Staroj Planini. Način čuvanja, ishrana na pašnjaku, klimatski uslovi kao i karakteristike rase značajno doprinose specifičnim svojstvima mleka magarice balkanske rase.

Pozitivan uticaj mleka magarice na zdravlje ljudi poznat je još od antičkih vremena (Coppola i sar., 2002). Mleko magarice nije dovoljno zastupljeno u proizvodnji i ishrani dece i odraslih, posebno u našoj zemlji, a retko je predmet naučnog istraživanja. Brojne studije fokusirane su u većoj meri na kravlje mleko, iako mleko magarice i drugih životinjskih vrsta ima podjednako veliki značaj za ishranu dece i odraslih u raznim delovima sveta (Gentili i sar., 2013). U zemljama kao što su Italija, Turska, Grčka i Kina, proizvodnja, korišćenje i istraživanje visoko kvalitetnog, hipoalergijskog mleka magarice je u stalnom porastu (Kugler, 2008; Tadesse, 2010; Zhang i sar., 2008). U Srbiji su oskudni podaci o karakterizaciji i definisanju nutritivnog profila mleka magarice.

Istraživanja mleka magarice u svetu započeta su zbog sadržaja kazeina i proteina surutke (0,60-1,33), dobre digestibilnosti i lake resorpcije u krv (Guo i sar., 2007; Uniacke-Lowe, 2011, Tidona i sar., 2011). Prema hemijskom sastavu mleko magarice je

slično humanom mleku i značajno se razlikuje od mleka drugih životinja, kao što su kravlje, kozje i ovčije. Mleko magarice prosečno sadrži 7,40-8,80 g/100ml suve materije, 1,40-2,00 g/100ml proteina, 0,30-1,80 g/100ml mlečne masti, 5,80-7,40 g/100ml laktoze i 0,30-0,50g/100ml pepela. Takođe, mleko magarice sadrži visok udeo nezasićenih masnih kiselina od kojih su najznačajnije omega-6 i omega-3 masne kiseline (Martemucci i sar., 2012). Više od 70% globula mlečne masti u mleku magarice je manja od 2 µm, čime je površina za enzimatsku razgradnju veća i zbog čega je razgradnja masnih globula mleka magarice brža u odnosu na mleko preživara (Martini i sar., 2013 a, b; Martini i sar., 2014). U mleku magarice udeo lizozima i laktoferina, enzima koji deluje baktericidno mnogo je veći od udela u kobiljem i humanom mleku (Pinnola, 2009). Mleko magarice bogato je vitaminima C, A i E, a poseduje i odgovarajuću antioksidativnu aktivnost (Luthfor i sar., 2004, Tadesse, 2010; Claeys i sar., 2014; Popović i sar., 2014). Terapeutsko delovanje mleka magarice postiže se pri kozumiranju u svežem (nativnom) obliku bez prethodne toplotne obrade. Mleko magarice ima važna prehrambena i terapeutska svojstva, koja povoljno deluju na zdravlje novorođenčadi i odraslih ljudi (Uniacke-Lowe i sar., 2010). Stoga, analiza mleka magarice je višestruko opravdana sa nutritivnog, ekonomskog i terapeutskog aspekta. Poslednjih nekoliko godina raste interesovanje za ispitivanje mogućnosti korišćenja prirodnih proizvoda od kojih mleko magarice zauzima značajno mesto zbog specifičnog hemijskog sastava i nutritivnih karakteristika.

Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita nutritivna vrednost mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije (od 45. do 280. dana), pri čemu su posebno definisani:

- Profil proteina mleka metodom kapilarne elektroforeze;
- Sastav masnih kiselina mleka metodom gasne hromatografije/masene spektrometrije;
- Hemijski sastav mleka magarice balkanske rase i humanog mleka tokom 40. i 90. dana laktacije ;
- Uticaj načina ishrane životinje na hemijski sastav mleka, tokom perioda laktacije.



## PREGLED LITERATURE

### KARAKTERISTIKE MAGARICE BALKANSKE RASE

Magarica balkanske rase (*Equus asinus asinus*) je domaća životinja, čiji je izvorni oblik afrička rasa (*Equus asinus*) ([www.zasavica.org.rs](http://www.zasavica.org.rs)). Proces domestikacije otpočeo je u Holocenu pre 8000-11000 godina u Severoistočnoj Africi i nastavio je da se širi ka Jugoistočnoj Aziji i na Jug Evrope (Littauer i Crouwel, 1979). Balkanska rasa magarice pojavila se dve do tri hiljade godina kasnije u Aziji: Indiji i Pakistanu. Smatra se da su kolonizovale u Evropu iz Male Azije, preko Ukrajine, Rusije i Balkanskog poluostrva.

Iz literature je poznato da su savremene rase magarice poreklom od dva izvorna oblika:

- Nubijske rase (*Equus asinus africanus*) čije je prirodno stanište područje Nila i
- Somalijske rase (*Equus asinus somaliensis*)-predak magarice sa područja jugoistočne Azije, ali i Evropskih rasa, uključujući i magarice balkanske rase (Epstein, 1984; Clutton-Brock, 1987, Jordana & Folch, 1996).

Magarica balkanske rase pripada autohtonj rasi, izvorno nastaloj i gajenoj na Balkanskom poluostrvu (FAO DAD-IS, 2009) (slika 1). Tokom 20. veka broj životinja ove rase stalno opada delimično zbog gubitka interesa za uzgoj ove vrste životinja, a još više zbog veoma odmakle depopulacije i napuštanja ruralnog područja od strane ljudi (Trailović, 2009). Izvorni oblici ove rase magarice mogu se naći u Specijalnom Rezervatu Prirode "Zasavica" u kome se gaje u prirodnom okruženju ([www.zasavica.org.rs](http://www.zasavica.org.rs)). Period gestacije traje od 12 do 14 meseci, a period laktacije od 6

do 9 meseci (Kugler i sar., 2008). Magarica balkanske rase daje u proseku od 200-300 ml mleka, a u toku jednog dana do 900 ml mleka (Trailović, 2009).



Slika 1. Magarice balkanske rase ([www.zasavica.org.rs](http://www.zasavica.org.rs))



Slika 2. Specijalni Rezervat Prirode "Zasavica" ([www.zasavica.org.rs](http://www.zasavica.org.rs))



## NUTRITIVNA VREDNOST MLEKA MAGARICE

Za količinu proizvodnje mleka magarice i kobiljeg mleka nema statističkih podataka, a smatra se da čini manje od 0,1% ukupne svetske proizvodnje mleka. Najveće komercijalne farme magarica i mlekare za preradu ove vrste mleka nalaze se u Kini, Italiji, Turskoj i Grčkoj, a tradicionalno se magarice uzgajaju u Africi, Aziji i istočnoj Evropi (Kugler, 2008; Tadesse, 2010; Zhang i sar., 2008).

Mlečna mast, mlečni šećer (laktoza) i proteini mleka- kazein,  $\alpha$ -laktalbumin i  $\beta$ -laktoglobulin sintetišu se u mlečnoj žlezdi. Ostali sastojci, kao što su mineralne materije, neki enzimi, vitamini, albumini krvnog seruma, imunoglobulini i brojni drugi glikoproteini direktno prelaze iz krvi u mlečnu žlezdu i postaju sastojci mleka (Tratnik i sar., 2012).

Sastav mleka može biti promenljiv u zavisnosti od mnogobrojnih činioca: vrste, rase, zdravstvenog stanja životinje, stadijuma laktacije, načina i vrste hrane, godišnjeg doba, kao i od karakteristike životinje (starost, telesna masa, itd). U mleku tokom godišnjeg doba najviše varira sadržaj masti, a najmanje sadržaj laktoze (Clayes i sar., 2014 ). U tabeli 1. prikazan je osnovni hemijski sastav mleka magarice i humanog mleka, kao i mleka od šest vrsta životinja, koja se najviše koriste za preradu u industriji mleka.

Tabela 1. Hemijski sastav i energetska vrednost mleka različitih vrsta životinja i humanog mleka

Vrste mleka	Suva materija (%)	Proteini (%)	Mlečna mast (%)	Ugljeni hidrati (%)	Pepeo (%)	Energetska vrednost (kJ/100ml)
Kravlje <sup>a</sup>	12,80	3,5	3,8	4,8	0,7	285
Kozje <sup>b</sup>	13,30	3,6	4,2	4,7	0,8	289
Ovčije <sup>b</sup>	17,70	4,9	7,2	4,8	0,8	398
Bivolje <sup>b</sup>	17,00	4,0	7,5	4,8	0,7	389
Kobilje <sup>c</sup>	10,70	2,1	1,7	6,4	0,5	209
Magareće <sup>c</sup>	9,30	1,7	0,6	6,6	0,4	201
Humano <sup>d</sup>	12,50	1,0	4,5	7,0	0,2	239

<sup>a</sup>Barłowska, 2007; Barłowska i sar., 2011; Flowers i sar., 2008

<sup>b</sup>Haenlein & Wendorff , 2006; Park i sar., 2007; Raynal-Ljutovac i sar., 2008; Luna i sar., 2008;

<sup>c</sup>Salimei i sar., 2004; Guo i sar., 2007; <sup>d</sup>Krešić i sar., 2013b

Energetska vrednost mleka je blisko povezana sa koncentracijom određenih jedinjenja u suvoj materiji, a posebno sa sadržajem masti. Najviša energetska vrednost zabeležena

je kod ovčijeg i bivoljeg mleka, a nešto niža kod kravljeg i kozjeg mleka (Bylund, 2003; Barłowska, 2007; Tratnik i sar., 2012). Niska energetska vrednost karakteristična je za humano, kobilje i mleko magarice (Ofteidal & Jenness, 1988; Guo i sar., 2007; Shamsia, 2009).

Tabela 2. Hemijski sastav mleka magarice različitih rasa

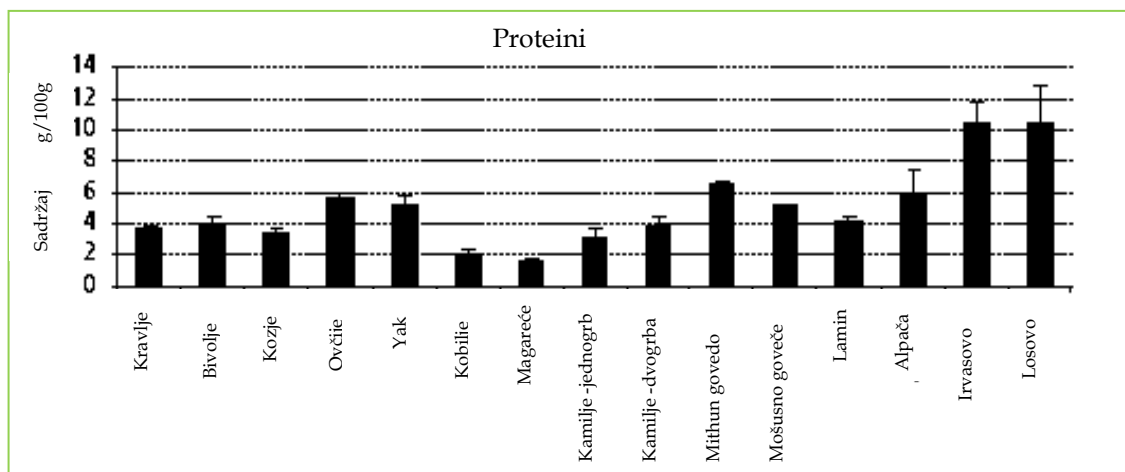
Rasa, zemlja porekla	Period laktacije	pH	Suva materija (%)	Proteini (%)	Mlečna mast (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)	Autor i godina
Martina Franca, Italija	15-240	6,87-7,18	8,45-9,13	1,25-2,18	0,10-1,40	6,03-7,28	0,36-0,44	Salimei i sar., 2004
								D'Alessandro i sar., 2011a,b
Ragusana, Italija	28-150	7,10	8,45-9,00	1,80-2,00	0,30-0,60	6,20-6,60	0,36-0,40	Salimei & Fantuz., 2012
								Matremucci i sar., 2012
Amiata, Italija	90-150	6,90	9,47	1,63	0,55	7,12	0,36	Salimei i sar., 2004
Primorsko Dinarski, Hrvatska	20-170	7,00	8,61-9,13	1,41-1,77	0,25-0,45	6,19-6,37	-	Giosue i sar., 2008
Jiangque, Kina	15-180	7,14-7,22	8,94-9,93	1,37-1,85	0,50-1,85	6,01-6,60	0,35-0,51	Martini i sar., 2014
								Ivanković i sar., 2009
								Guo i sar., 2007

Karakteristike mleka magarice razlikuje se u velikoj meri od ostalih vrsta životinja (Doreau, 1991; Drogoul i sar., 1992). Hemijski sastav mleka magarice različitih rasa prikazan je u tabeli 2. Brojni autori ispitivali su uticaj perioda laktacije na kvalitet i promene nutritivnog profila mleka magarice Italijanske rase (Martina Franca, Ragusana i Amiata) (Salimei i sar., 2004, Guo i sar., 2007, Giosue i sar., 2008, Martini i sar., 2014), Brazilske rase (Cavalcante i sar., 2012), kao i Hrvatske rase (Primorsko Dinarski magarac) (Bilandžić i sar., 2014).

## PROTEINI

Proteini su neophodna komponenta za odvijanje svih životnih procesa i funkcija u organizmu, pre svega u snabdevanju organizma esencijalnim amino kiselinama i biološki aktivnim proteinima kao što je imunoglobulin (Tadesse, 2010). U sastav proteina mleka ulazi 20 različitih amino kiselina, iste opšte strukture, ali funkcionalno različitih karakteristika (Park, 2013). Sadržaj proteina mleka kod različitih životinja

prikazan je na slici 3 gde se može videti da najveći sadržaj proteina ima mleko irvasa i losa (>10%), a najmanje mleko magarice i kobilje mleko (<2%).



Slika 3. Sadržaj proteina mleka kod različitih vrsta životinja (FAO STAT, 2012)

U mleku je identifikovano više od 200 različitih vrsta proteina, od kojih je većina u neznatnim koncentracijama ili tragovima. Mleko sadrži oko 95% azotnih proteinskih frakcija i 5% neproteinskih azotnih materija. U neproteinske azotne materije mleka ubrajaju se: peptidi, slobodne amino kiseline, amonijak, amino šećeri, keratin, urea, ureinska kiselina i mnoga druga jedinjenja (Tratnik i sar., 2012). U proteinima mleka nalaze se dva glavna tipa potpuno različitih proteina: kazein i proteini surutke (Tratnik i sar., 2012). Kazein nakon razgradnje u humanom intestinalnom traktu predstavlja donor značajne količine kalcijuma i fosfora, bioaktivnih peptida, dok se proteinima surutke pripisuju mnoge biološke funkcije. Ukupna biološka vrednost proteina mleka (kazeina i proteina surutke) je visoka i iznosi 90 (Carić i sar., 1997).

Tabela 3. Sadržaj i udeo proteina u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Sadržaj proteina (g/100ml)	Vrste mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>d</sup>	Humano <sup>c</sup>
<b>Ukupni proteini</b>	3,2-4,5	1,6-2,3	1,5-1,8	0,7-1,7
<b>Kazein</b>	2,5-2,8 (75%)	0,9-1,2 (50%)	0,6-1,0 (48,3%)	0,3-0,4 (40%)
<b>Proteini surutke</b>	0,5-0,7 (20%)	0,7-0,9 (40%)	0,5-0,8 (46,9%)	0,7-0,8 (60%)

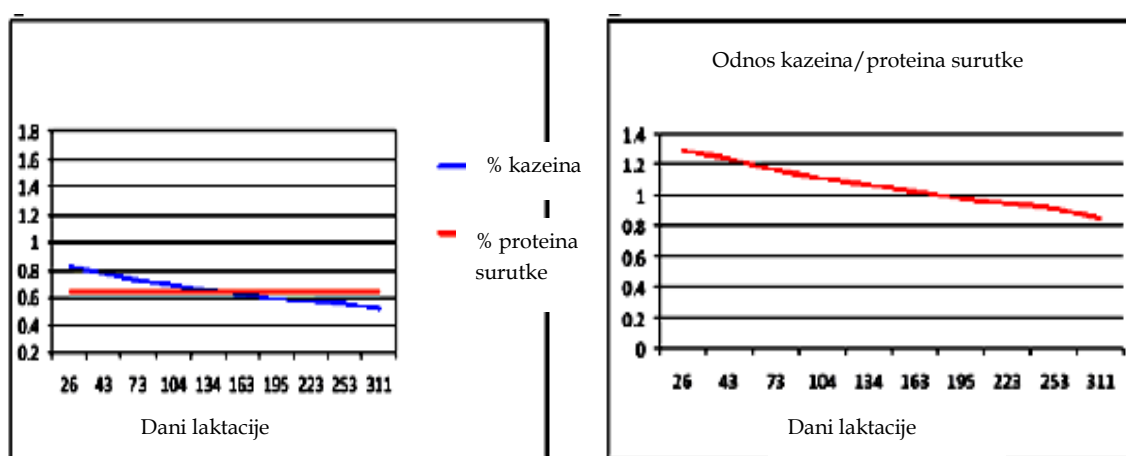
<sup>a</sup> Bylund, 2003

<sup>b</sup> Miranda i sar., 2004

<sup>c</sup> Park i sar 2007, Walstra i sar., 2006

<sup>d</sup> Salimei i sar., 2004; Guo i sar., 2007; Polidori i sar., 2007; 2012

Vrlo je bitan sadržaj imunoenaktivnih jedinjenja, kao što su imunoglobulini, laktoferin, transferin, enzimi laktoperoksidaza i lizozim. Navedeni sastojci mleka utiču na otpornost ljudskog organizma i štite organizam od štetnih bakterija, virusa, toksina, uzročnika zaraznih bolesti, alergijskih reakcija i tumora (Tratnik i sar., 2012). Po hemijskom sastavu mleko magarice veoma je slično kobiljem i humanom mleku. Proteini mleka magarice sadrže ~48,3% kazeina i ~46,9% proteina surutke i oko 30%  $\beta$ -laktoglobulina (Salimei, 2004). Za mleko magarice je karakterističan odnos kazeina i proteina surutke ~1,04 (Guo i sar, 2007).



Slika 4. Uticaj perioda laktacije na promenu: a) sadržaja kazeina i proteina surutke u mleku magarice; b) odnosa kazeina i proteina surutke (Burumini, 2012)

Odnos kazeina i proteina surutke kreće se od 1,33 do 0,86 i smanjuje se u toku perioda laktacije (slika 4 ab). Nizak odnos kazeina i proteina surutke ima važnu ulogu u senzibilizaciji na frakcije proteina kravljeg mleka, odnosno nizak odnos smanjuje mogućnost alergijskih pojava na mleko magarice (Tidona i sar, 2011; Burumini, 2012).

## Kazein

Kazein je protein kravljeg mleka, koji čini oko 75-80% ukupnih proteina mleka. Po svojoj strukturi je složeni kalcijum-fosfoglikoprotein i ubraja se u grupu termostabilnih proteina (Maćej i sar., 2007). U sirovom mleku kazein se nalazi u obliku malih koloidnih čestica koje sadrže oko 2 puta više vode od svoje mase, a nazivaju se micle kazeina. Micle kazeina prvenstveno se sastoje od kazeinskih frakcija:  $\alpha_{s1}$ -kazeina,  $\alpha_{s2}$ -

kazeina,  $\beta$ -kazeina i  $\kappa$ -kazeina, koje se sintetišu u mlečnoj žlezdi. Prisutne frakcije  $\gamma$ -kazeina su rezultat proteolize  $\beta$ -kazeina pod dejstvom enzima plazmina (Tratnik i sar., 2012). Veličina čestica kazeina zavisi od koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Joni  $\text{Ca}^{2+}$  omogućavaju vezivanje proteina za ćelijski zid i njihovu stabilizaciju (Trewweek, 2012). Od svih frakcija kazeina samo  $\alpha_2$ - i  $\kappa$ -kazein sadrže cistein, koji učestvuje u formiranju intra i intermolekularnih disulfidnih veza. Frakcija  $\beta$ -kazeina ima izražene hidrofobne, a  $\alpha_2$ -kazein izražene hidrofilne osobine. Takođe, C-terminalni deo  $\kappa$ -kazeina je izrazito hidrofilne prirode (Fox & McSweeney, 1998). Kazein je izvor aminokiselina i nosilac jona kalcijuma i fosfata, a obezbeđuje i različite bioaktivne peptide koji se oslobađaju u gastrointestinalnom traktu tokom razgradnje kazeinata (Möller, 2008). Sadržaj frakcija kazeina u mleku i udeo pojedinih frakcija kazeina u ukupnom kazeinu različitih vrsta životinja i humanom mleku prikazani su u tabeli 4 i 5.

*$\alpha_1$  i  $\alpha_2$ - frakcije* kazeina sastoje se od tri izrazito hidrofobna dela molekula, a ostatak je bogat grupom fosfoserina (8-9 Ser-P). Najzastupljenije varijante  $\alpha_2$ - kazeina su  $\alpha_1\text{B}$  i  $\alpha_2\text{A}$  bogate fosfoserinom (10-13 Ser-P) odgovornim za hidrofilni deo proteinskog molekula jako negativnog naboja, pa su i vrlo "senzibilne" na jone kalcijuma.  $\alpha_2$ -kazein sadrži najviše lizina (Tratnik i sar., 2012). Iako je jedan od alergena u kravljem mleku, potpuno odsustvo ovog proteina ograničava izlučivanje drugih mlečnih proteina i kalcijum-fosfata, što ukazuje na važnost  $\alpha$ -kazeina u formiranju kazeinske micelle (Huszár, 2008).

*$\beta$ -kazein* najhidrofobniji je sa izrazito naelektrisanim delom molekula i sadrži nizak udeo fosfoserina (5 Ser-P). To daje osobinu da formira agregate sa N-terminalnim delovima molekula izloženim prema rastvoru, a hidrofobnim delom prema unutrašnjosti micelle (Tratnik i sar., 2012). Za vreme digestije mleka formiraju se fosfopeptidi pri čemu se zadržavaju rastvorljivi  $\text{Ca}^{2+}$  joni, koji se apsorbuju. Znači da fosfopeptid formiran od strane  $\beta$ -kazeina doprinosi visokoj bioraspoloživosti kalcijuma iz humanog mleka. Fosfopeptidni deo kazeina može uticati na apsorpciju drugih dvovalentnih jona, kao što je cink (Lönnerdal, 2003).

*$\kappa$ -kazein* sadrži najčešće samo jedan fosfoserin (1 Ser-P). Jedan deo  $\kappa$ -kazeina je hidrofilan i sadrži ugljene hidrate (N-acetilneuraminsku kiselinu, galaktozu i N-acetilgalaktozamin) što daje da oko 2/3 molekula bude izuzetno polarno, dok je preostali

deo molekula izuzetno hidrofoban. Hidrofobni deo molekula sadrži relativno stabilnu disulfidnu vezu (S-S) u kojoj je zastupljena i  $\alpha$ -helikoidna i  $\beta$ -nabrana struktura (Tratnik i sar., 2012).

Tabela 4. Sadržaj frakcija kazeina u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Kazeinske frakcije (g/100ml)	Vrsta mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>d</sup>	Humano <sup>c</sup>
<b>Ukupni kazein</b>	2,10	1,38	0,72	0,55
<b><math>\alpha</math><sub>1</sub>-kazein</b>	1,10	0,24	0,20	0,07
<b><math>\alpha</math><sub>2</sub>-kazein</b>	0,36	0,02	0,02	-
<b><math>\beta</math>-kazein</b>	0,21	1,10	0,50	0,38
<b><math>\kappa</math>-kazein</b>	0,43	0,02	-	0,10

<sup>a</sup>Bylund, 2003; Claeys i sar., 2014

<sup>b</sup>Miranda i sar., 2004

<sup>c</sup>Park i sar., 2007; Walstra i sar., 2006

<sup>d</sup>Polidori, 2010; Vincenzetti i sar., 2008, 2012

Tabela 5. Udeo pojedinih frakcija kazeina u ukupnom kazeinu mleka različitih vrsta životinja i humanom mleku

Kazeinske frakcije (%)	Vrsta mleka			
	Kravlje	Kobilje	Magareće	Humano
<b><math>\alpha</math><sub>1</sub>-kazein</b>	52	18	28	13
<b><math>\alpha</math><sub>2</sub>-kazein</b>	17	1	3	-
<b><math>\beta</math>-kazein</b>	10	79	69	69
<b><math>\kappa</math>-kazein</b>	20	1	-	19

Malacarne i sar., 2002; Park i sar., 2006

## Proteini surutke

Proteini surutke su kompaktni globularni proteini sa većom količinom esencijalnih amino kiselina u odnosu na kazein. Glavne frakcije proteina surutke čine:  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, imunoglobulini i albumin krvnog seruma. Pored toga u mleku se nalaze enzimi lizozim i laktoferin (Park, 2009; Uniacke-Lowe, T., 2011). Sadržaj frakcija proteina surutke u mleku i udeo frakcija proteina surutke u ukupnim proteinima surutke različitih vrsta životinja i humanom mleku prikazane su u tabelama 6 i 7.

Tabela 6. Sadržaj frakcija proteina surutke u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Proteini surutke (g/100ml)	Vrsta mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>a</sup>	Magareće <sup>b</sup>	Humano <sup>a</sup>
<b>Ukupni proteini surutke</b>	0,60	0,85	1,00	0,70
<b>α-laktalbumin</b>	0,14	0,26	0,30	0,25
<b>β-laktoglobulin</b>	0,32	0,25	0,20	-
<b>serum albumin</b>	0,04	0,04	0,04	0,05
<b>imunoglobulini</b>	0,08	0,20	0,30	0,20
<b>lizozim</b>	0,01	0,09	0,09	0,04
<b>laktoferin</b>	0,001	0,006	0,08	0,16

<sup>a</sup> Park, 2009; Uniacke -Lowe i sar., 2010; Tratnik i sar., 2012

<sup>b</sup> Polidori, 2010; Vincenzetti i sar., 2008; 2012; Clayes i sar., 2014

*α-laktalbumin* je metaloprotein koji vezuje jedan jon  $\text{Ca}^{2+}$  po molu na mestu lanca koji sadrži četiri ostatka asparaginske kiseline. Sastoji se od jednog lanca sa 123 aminokiselinska ostatka, sa molekulskom masom 14 kDa. *α-laktalbumin* se pojavljuje u dve, najviše tri genetske varijante i veoma je sličan lizozimu u pogledu aminokiselinskih sekvenci i genetske strukture (Businco i sar., 2000). Bogat je triptofanom i cisteinom, ali ne sadrži slobodne SH-grupe, nego ima 4 stabilne disulfidne veze (S-S). Sadrži manje prolina, pa je vrlo kompaktan protein sa više  $\alpha$ -uvojnih struktura. *α-laktalbumin* je najotporniji protein surutke na delovanje toplote. Međutim, pri  $\text{pH} < 5$  *α-laktalbumin* gubi kalcijumove jone i postaje osetljiviji na toplotnu denaturaciju (Tratnik & Božanić, 2012). Između *α-laktalbumina* i udela laktoze postoji jaka pozitivna korelacija. *α-laktalbumin* je proteinska podjedinica enzima koja katališe biosintezu laktoze. U humanom mleku udeo *α-laktalbumina* je najveći, posebno u kolostrumu i oko 76% je identičan sa *α-laktalbuminom* kravljeg mleka (Park, 2013).

*α-laktalbumin* je dobar izvor esencijalnih aminokiselina triptofana i cisteina, a po sastavu aminokiselina sličan je lizozimu (López-Expósito & Recio, 2008). Klinička ispitivanja su pokazala da hrana obogaćena *α-laktalbuminom* utiče na smanjenje stresa i depresivnog stanja ljudi (Tidona i sar., 2011). Antimikrobni peptidi *α-laktalbumina* kravljeg mleka formiraju se u gastrointestinalnom traktu pod dejstvom proteaza (Lönnerdal, 2003).

Tabela 7. Udeo pojedinih frakcija u ukupnim proteinima surutke u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Frakcije proteina surutke (%)	Vrsta mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>a</sup>	Magareće <sup>b</sup>	Humano <sup>a</sup>
$\alpha$ -laktalbumin	23	31	30	36
$\beta$ -laktoglobulin	53	42	20	-
serum albumin	7	5	4	7
imunoglobulini	13	23	30	29
lizozim	2	11	9	6
laktoferin	0,2	0,7	8	23

<sup>a</sup> Malacarne i sar., 2002; Martuzzi i sar., 2002

<sup>b</sup> Guo i sar., 2007; Park i sar., 2006

$\alpha$ -laktalbumin kravljeg mleka otporan je u želudcu i dvanaestopalačnom crevu na enzime i 95% ostaje nesvaren *in vitro*. Međutim, unosom mleka magarice u organizam samo 5% dobijenih peptida ostaje nesvareno (Tidona i sar., 2011). Tokom digestije  $\alpha$ -laktalbumina sa tripsinom nastaju dva peptida koja imaju antibakterijska svojstva. Ovi fragmenti su aktivni protiv gram-pozitivnih bakterija, a baktericidna aktivnost je otkrivena za samo neke gram-negativne sojeve: *E.coli*, *Klebsiela pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Spahylococcus epidermis*, *Streptococci* (López-Expósito & Recio, 2008).

$\beta$ -laktoglobulin je protein surutke prisutan u različitim vrstama mleka, osim humanog, kamiljeg i mleka glodara (Uniacke-Lowe i sar, 2010).  $\beta$ -laktoglobulin je najzastupljeniji protein surutke koji se u kravljem mleku nalazi u obliku dimera i sadrži slobodnu SH-grupu dok je u mleku magarice u monomernoj formi bez slobodne SH-grupe (Lønnerdal, 2003). To je globularan rastvorljiv protein, molekulske mase 18,4 kDa (Burumini, 2012). Sastavljen je od dva peptidna lanca koji su čvrsto vezani pomoću nekovalentnih veza. Svaki lanac ima ukupno 162 aminokiseline, jednu -SH grupu i dve (-S-S-) disulfidne veze. U  $\beta$ -laktoglobulinu dominira  $\beta$ -nabrana struktura, ali postoji deo  $\alpha$ -uvojne strukture i deo neodređene strukture. Pri temperaturi 60°C  $\beta$ -laktoglobulin je dimer i pogodan je za denaturaciju.  $\beta$ -laktoglobulin ima nekoliko uloga, uključujući i razvoj pasivnog imuniteta zajedno sa imunoglobulinom G (Sutton & Alston-Mills, 2006), a osim toga, nakon proteolitičke digestije sa komercijalnim enzimima, daje peptide baktericidnog dejstva na gram negativne bakterije (Pellegrini i sar., 2003).  $\beta$ -laktoglobulin je generalno otporan na proces digestije, pretpostavlja se



zbog vezivanja masnih kiselina. Međutim, u mleku magarice 70%  $\beta$ -laktoglobulina je lako razgradivo, što je dva puta više nego u kravljem mleku. Veći procenat razgrađenog  $\beta$ -laktoglobulina može da poboljša prinos bioaktivnog peptida u intestinalnom traktu (Inglistad i sar., 2010, Tidona i sar., 2011);

Smatra se da je  $\beta$ -laktoglobulin zajedno sa kazeinskim frakcijama jedan od glavnih uzroka alergija na proteine kravljeg mleka (Restani i sar., 2002).  $\beta$ -laktoglobulin poseduje nekoliko važnih bioloških funkcija:

- vezuje retinol (vitamin A9) , štiti od oksidacije, transportuje do tankog creva, gde se retinol vezuje za protein, koji ima sličnu strukturu kao  $\beta$ -laktoglobulin;
- vezuje masne kiseline i podstiče aktivnost lipaze;
- olakšava transport folne kiseline i povećava fotostabilnost i rastvorljivost vitamina u vodi (Barlowska i sar., 2011).

*Serum albumin* po sastavu i imunološkim karakteristikama pokazuje sličnosti sa krvnim serum albuminom. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca sa 582 aminokiseline, 35 ostataka cisteina koji učestvuju u nastanku 17 disulfidnih veza (-S-S-) i 1 slobodne SH-grupe. Struktura ovog proteina je ovalnog oblika i sadrži oko 60%  $\alpha$ -uvojne strukture. Ustanovljeno je da vezuje neke metale i slobodne masne kiseline dugog lanca, pa se smatra aktivatorom probavnih lipaza, a utiče i na pasivni imunitet (Tratnik & Božanić, 2012).

*Imunoglobulini (Ig)* su specifična antitela velike molekulske mase čija je osnovna fiziološka funkcija vezivanje antigena (bakterije, virusi, toksini, strani proteini). Odgovorni su za prenos imuniteta na potomstvo i mogu biti efikasna zaštita od mnogih bolesti i alergijskih reakcija (Tratnik & Božanić, 2012). Imunoglobulini sadrže ugljene hidrate (heksoze i heksozamin) čime se ubraja u glikoproteine koji omogućavaju prenos pasivnog imuniteta od majke na potomstvo. U mleku imunoglobulin je prisutan u maloj količini (0,6-1 g/l), ali je njegov sadržaj u kolostrumu znatno veći (i do 100 puta) (Tratnik & Božanić, 2012). Sastoji se od više genetskih varijanti, a glavne su IgG (IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>); IgA i IgM čije molarna mase rastu prema redosledu navođenja. Postoji još nekoliko genetskih varijanti (IgE i IgD) koje se u mleku nalaze u obliku monomera. U kravljem mleku najzastupljeniji je IgG (oko 80%

ukupnih Ig), dok je u humanom mleku dominantan IgA (Tratnik & Božanić, 2012). Koncentracija imunoglobulina u humanom mleku je izuzetno visoka ~1-2 g/l u ranoj laktaciji, a kreće se od 0,5 g/l do 1 g/l do druge godine laktacije (Lønnerdal, 2003). U mleku magarice ukupan sadržaj imunoglobulina povećava se tokom perioda laktacije i dostiže vrednost 88,3 mg/l (Guo i sar., 2007).

### **Lizozim**

*Lizozim* je minorni endogeni enzim mleka (<0,3 mg/100ml). Zastupljen je u značajnoj količini u kobiljem mleku (79 mg/100ml), a nalazi se i u kolostrumu humanog mleka (10-12 mg/100ml). Lizozim je specifičan protein humanog mleka, koji ima antibakterijska i antivirusna svojstva i sposoban je da razori spoljni ćelijski zid gram-pozitivnih bakterija hidrolizom  $\beta$ -1,4 veze N-acetil muraminska kiseline i 2-acetilamino-2-dezoksi-D-glukoze (Milonis & Polidori, 2011). Lizozim štiti organizam od metaboličkih poremećaja i pomaže aktivnosti IgA u humanom mleku (Tratnik & Božanić, 2012). Pokazuje sinergističko delovanje zajedno sa laktoferinom u uništavanju gram-negativnih bakterija *in vitro* (Lopez-Eksposito, 2008). Lizozim i laktoferin aktiviraju imunizaciju i predstavljaju zaštitu od infekcija respiratornog i digestivnog trakta, a koristan je i u sprečavanju nastanka kožnih oboljenja. Lizozim deluje kao prirodni konzervans, daje dugi rok trajanja mleku i u prehrambenoj industriji, može da se koristi kao stabilizator (Paolicelli, 2005). Rezultati studija pokazuju da lizozim, nezavisno od uloge kao katalizatora i bez enzimske aktivnosti, ima baktericidna svojstva (Lopez-Eksposito & Recio, 2008).

U mleku magarice lizozim sadrži 129 aminokiselina u dve forme (A i B) (Herrouin i sar., 2000). Smatra se da je lizozim važna komponenta za održavanje senzornih karakteristika, pH i mikrobiološke flore mleka magarice na temperaturi hlađenja duže od 10 dana. U mleku magarice lizozim se nalazi u količini 4 g/l, a sadržaj se smanjuje tokom laktacije (Guo i sar., 2007).

### **Laktoferin**

*Laktoferin* je glikoprotein, pripada porodici transferina, sa dva mesta za feri jon, molekulske mase (Mr 80 kDa) (Wakabayashi i sar., 2006). To je protein koji ima različite funkcije uključujući regulisanje hemostaze, rast ćelija, odbranu od infektivnih agenasa,

antiinflamatornu aktivnost i zaštitu od raka. Laktoferin je prisutan u mleku, a u manjim količinama i u spoljašnjim tečnostima: pljuvački, suzama, žuči, sokovima pankreasa. Laktoferin je takođe specifični protein mleka magarice i humanog mleka koji vezuje gvožđe i narušava metabolizam nekih mikroorganizama u organima za digestiju. Koncentracija laktoferina prilično je visoka u humanom mleku oko 1,0 mg/ml. Međutim koncentracija laktoferina veća je u kolostrumu (u humanom mleku oko 7,0 mg/ml) (Barlowska i sar., 2011). Pozitivan efekat laktoferina naglašen je samo u humanom mleku i nije izražen u infant-formulama za decu (Park, 2009).

U mleku magarice koncentracija laktoferina iznosi 0,09 g/l i slična je kao kod kobiljeg mleka (Barlowska i sar., 2011). U poređenju sa mlekom ostalih vrsta životinja njegov sadržaj je veći (0,37 g/l laktoferina), a znatno manji nego u humanom mleku 1,65 g/l (Salimei i sar., 2004; Chiavari i sar., 2005; Guo i sar., 2007). Antimikrobna aktivnost nativnog i razgrađenog mleka magarice rezultat je sastava laktoferina i peptida nastalih digestijom mleka (Tidona, 2011). Laktoferin u mleku magarice je velikim delom otporan na sokove želuca i dvanaestopalačnog creva, a to ukazuje da ima bolju biološku funkciju kao izvor aminokiselina.

Laktoferin poseduje antimikrobnu aktivnost protiv širokog spektra gram- pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Burimini, 2012). Ispitivanja Šarića i sar. (2012) ukazuju na antibakterijsko dejstvo mleka magarice protiv *E. coli* i *S. enteritidis* na temperaturama od 3-15°C. Pored antimikrobnog dejstva, utvrđeno je da laktoferin pozitivno deluje na rast korisnih bakterija kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*. Takođe, laktoferin i lizozim deluju sinergistički na efikasno eliminisanje gram-negativnih bakterija (Sherman i sar., 2004). Laktoferin vezuje oligosaharide u spoljašnjoj bakterijskoj membrani, čime se "otvaraju" pore za lizozim koji narušava glikozidnu vezu u unutrašnjosti peptodiglikanske matrice (Burimini, 2012).

## MLEČNA MAST

Mlečna mast utiče na prijatan ukus, aromu, konzistenciju i teksturu mleka, i daje energetska vrednost 38 kJ/g. Mlečna mast se sintetiše u mlečnim epitelnim ćelijama kao masne globule koje se izlučuju u mleko obavijene ćelijskom membranom. Mast

mleka se uglavnom sastoji od triglicerida (98%). Ostali sastojci su mono- i digliceridi, fosfolipidi, steroli i slobodne masne kiseline (Fox & McSweeney, 1998). Hidrofobne grupe fosfolipida okrenute su prema masnoj fazi i povezane s teško rastvorljivim triacilglicerolima, koji se nalaze u središtu globule. Hidrofilne grupe fosfolipida okrenute su prema vodenoj fazi mleka i povezane proteinima. Međumolekularna veza između fosfolipida i proteina naziva se "lipoproteinski" kompleks. Hlađenjem mleka masne globule očvršćavaju, dolazi do kristalizacije glicerida, a emulzija postaje suspenzija. Tako mlečna mast u mleku istovremeno može biti u stanju emulzije i suspenzije (Tratnik & Božanić, 2012).

Sadržaj (minimalne i maksimalne vrednosti) i prečnik globula mlečne masti prikazan je u tabeli 8. Visoka varijabilnost sadržaja mlečne masti u mleku magarice od 1,82 do 0,28 g/100g mleka, može biti posledica pre svega rase, faze laktacije, ishrane kao i tehnike muže (Guo i sar., 2007; Pinnola, 2009; Salimei i Fantuz, 2012).

Tabela 8. Sadržaj i prečnik globula mlečne masti u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleka

Mleko	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>b</sup>	Humano <sup>c</sup>
Mlečna mast (%)	3,8-4,6	0,27-2,43	0,28 -1,82	3,5-4,5
Veličina globula mlečne masti (µm)	3,5-5,5	2,0-3,0	1,9-2,0	3,0-5,0

<sup>a</sup> Martini i sar., 2013a, Salimei & Fantuz 2012

<sup>b</sup> Welsch i sar., 1988

<sup>c</sup> Yamawaki i sar., 2005; Krešić i sar., 2013a

Sadržaj mlečne masti mleka magarice varira najčešće u proseku od 0,45% do 0,7% što je znatno niže u poređenju sa sadržajem u kravljem, kobiljem i humanom mleku (Malacarne i sar., 2002; Doreau & Martin-Rosset, 2002, Lönnerdal, 2003). Najnovija istraživanja strukture mlečne masti pokazuju da postoji zavisnost između dimenzija globula mlečne masti i nutritivnog kvaliteta mleka (Martini i sar. 2013a). Navedeni autori su zaključili da manje globule masti imaju veću količinu membrane po zapreminskoj masi u odnosu na veće globule. Stoga, manje globule imaju na raspolaganju za enzime pri digestiji i ova površina je bogata korisnim komponentama kao što su polinezasićene masne kiseline (Martini i sar., 2013b).

## Masne kiseline

Udeo pojedinih masnih kiselina veoma je promenljiv u mleku i zavisi najviše od stadijuma laktacije i načina ishrane. Mlečna mast prosečno sadrži oko 70% zasićenih masnih kiselina (najviše palmitinske), 30% nezasićenih, 27% mononezasićenih (oleinske) i samo 3% polinezasićenih masnih kiselina (Tratnik & Božanić, 2012). Glavne masne kiseline u ukupnim mastima mleka različitih vrsta životinja i u humanom mleku prikazane su u tabeli 9.

Svi sisari uključujući i čoveka, imaju ograničenu mogućnost stvaranja dvostrukih veza u masnim kiselinama te je stoga neophodan unos esencijalnih višestruko nezasićenih masnih kiselina putem hrane. Esencijalna masna kiselina iz grupe n6 je linolna kiselina (C18:2 n6), dok je iz grupe n3 esencijalna  $\alpha$ -linoleinska kiselina (C18:3 n3). Linolna i  $\alpha$ -linoleinska kiselina su prekursori dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina sa 20-22 C-atoma iz grupe n3, odnosno grupe n6 (Watkins, 2009). Konverzijom  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline nastaje prvo eikozapentaenska kiselina (C20:5 n3), a potom dokozaheksaenska kiselina (C22:6 n3). Iz linolne masne kiseline nastaje arahidonska kiselina (C20:4 n6) koja je komponenta ćelijske membrane (Murray i sar., 2011).

Masne kiseline u mleku mogu poticati od: sinteze mlečnih žlezda, apsorpcije iz plazme u kojoj se nalaze kao posledica ishrane jedinke, ali mogu biti i rezultat mobilizacije zaliha masti iz adipoznog tkiva majke (Jensen, 1996). Udeo masnih kiselina poreklom iz hrane je oko 30%. Iz potkožnog tkiva potiče oko 60% masnih kiselina, dok ostatak nastaje sintezom u mlečnim žlezdama (10-12%) (Innis, 2007).

U poređenju sa mlekom preživara, kobilje i mleko magarice sadrži veći procenat polinezasićenih masnih kiselina, a u manjoj količini su zastupljene zasićene i mononezasićene masne kiseline (tabela 9). Specifičnost mleka magarice je u sastavu masnih kiselina, pre svega višeg n3 sadržaja, nižeg n6/n3 odnosa i nižeg odnosa arahidonske/eikozapentaenske masne kiseline u poređenju sa humanim, a posebno kravljim mlekom (Duchén 2001; Gastaldi i sar 2010).

Tabela 9. Sastav masnih kiselina u mleku različitih životinja i humanom mleku

Masne kiseline (%)	Vrste mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>c</sup>	Humano <sup>d</sup>
<b>SFA zasićene</b>	<b>65,85-76,10</b>	<b>37,97-59,61</b>	<b>42,76-69,66</b>	<b>40,36-64,75</b>
C4:0 maslačna	3,50-4,40	-	0,40-0,60	2,80-3,82
C6:0 kapronska	2,23-2,40	-	0,50-1,22	0,80-1,27
C8:0 kaprilna	1,37-1,40	2,50-3,88	6,70-12,80	3,80-3,92
C10:0 kaprinska	2,70-3,03	4,07-8,34	10,20-15,65	2,90-5,10
C12:0 laurinska	3,30-4,11	4,98-9,16	6,42-10,67	3,10-6,12
C14:0 miristinjska	10,90-11,62	5,25-8,70	5,60-7,60	3,90-6,90
C16:0 palmitinska	32,61-35,90	19,64-27,42	11,47-18,56	14,60-20,20
C17:0 margarinska	0,20-0,42	0,35-0,59	0,22-0,26	0,25-0,30
C18:0 stearinska	8,73-12,20	0,98-1,14	1,12-1,99	7,90-15,90
C20:0 arahidska	0,21-0,35	0,10-0,18	0,08-0,12	0,25-1,07
C22:0 behenska	0,10-0,30	0,10-0,20	0,05-0,19	0,06-0,15
<b>MUFA mononezasićene</b>	<b>22,72-31,24</b>	<b>21,58-34,10</b>	<b>14,21-31,51</b>	<b>26,83-36,49</b>
C10:1 kaprinska	0,30-0,40	1,23-1,70	1,25-2,20	0,30-1,38
C12:1 laurinska	0,45-0,52	0,14-0,34	0,10-0,20	0,11-0,17
C14:1 miristoleinska	0,80-1,30	0,57-0,73	0,22-0,38	1,20-1,80
C16:1 palmitoleinska	1,15-2,10	4,86-7,26	2,37-4,23	6,60-8,32
C17:1 heptadekanska	0,10-0,45	0,01-0,13	0,27-0,35	0,30-0,40
C18:1 n-9 oleinska	18,02-23,97	14,47-23,56	9,65-23,70	18,02-23,97
C20:1 n-9 eručna	1,90-2,50	0,30-0,38	0,35-0,45	0,30-0,45
<b>PUFA polinezasićene</b>	<b>3,75-6,81</b>	<b>10,78-33,36</b>	<b>12,23-24,51</b>	<b>19,46-31,76</b>
<b>PUFA n3</b>	<b>0,75-1,26</b>	<b>5,97-14,08</b>	<b>5,17-11,93</b>	<b>1,70-2,41</b>
C18:3 n3 $\alpha$ -linoleinska	0,32-0,63	5,56-13,29	4,81-11,17	1,41-1,90
C18:4 n3 stearidonska	0,10-0,11	0,02-0,03	0,01-0,03	0,01-0,03
C20:5n3 eikozapentaenoična	0,19-0,35	0,35-0,60	0,30-0,56	0,04-0,07
C22:5n3 dokozaheksaenska	0,08-0,09	0,03-0,08	0,03-0,07	0,07-0,18
C22:6n3 dokozaheksaenska	0,06-0,08	0,01-0,08	0,02-0,10	0,17-0,23
<b>PUFA n6</b>	<b>3,00-5,55</b>	<b>4,81-19,28</b>	<b>7,06-12,58</b>	<b>17,76-29,35</b>
C18:2 n6 linolna	1,32-2,30	4,39-18,73	5,60-11,10	10,20-18,80
C20:2 n6 eikozadienska	1,02-2,30	0,33-0,45	0,22-0,36	0,20-0,56
C20:4 n6 arahidonska	0,66-0,95	0,09-0,10	0,08-0,13	0,08-0,10
<b>Odnos n6/n3</b>	<b>4,00-4,40</b>	<b>0,81-1,37</b>	<b>1,16-0,99</b>	<b>7,28-9,89</b>
<b>UFA nezasićene</b>	<b>26,47-38,05</b>	<b>32,36-67,46</b>	<b>26,44-56,02</b>	<b>45,99-68,25</b>

<sup>a</sup> Arsić i sar., 2009; Mapekula i sar., 2011; Samkova i sar., 2012

<sup>b</sup> Malacarne i sar., 2002; Orlandi i sar., 2003; Fiečko i sar., 2009

<sup>c</sup> Chiofalo & Salimei 2001; Matremucci & D'Alessandro, 2012

<sup>d</sup> Arsić i sar., 2009; Szabo i sar., 2010; Martini i sar., 2013a; Krešić i sar., 2013a

## LAKTOZA

Osnovni šećer mleka čini laktoza. Laktoza je disaharid ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) sastavljen od molekula  $\beta$ -D- galaktoze i  $\beta$ -D-glukoze koji su vezani preko  $\beta$ -1-4 glikozidne veze. U mleku se pojavljuje uglavnom mešavina dva osnovna oblika, strukturno izomernih, i to  $\alpha$ -oblik i  $\beta$ -oblik laktoze. Pri sobnoj temperaturi u mleku utvrđeno je približno 62,7%  $\beta$ -laktoze i oko 37,3%  $\alpha$ -laktoze, od ukupno prisutne količine (Tratnik & Božanić, 2012). To je šećer koji se sintetise isključivo u mlečnoj žlezdi iz glukoze i glikogena (Aghsaghali i sar., 2012). Autori ukazuju da se laktoza ne apsorbuje kao i drugi ugljeni hidrati i izaziva malo povećanje šećera u krvi (Atkinson i sar., 1957).

Tabela 10. Koncentracija laktoze u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Vrste mleka	Kravlje	Kobilje	Magareće	Humano
Laktoza (% <b>, g/L</b> )	4,6 (44-56)	6,4 (56-72)	6,1 (58-74)	7,0 (63-70)

Claeys i sar., 2014; Jirillo i sar., 2014

Laktoza je prisutna u različitim količinama u mleku većine sisara (tabela 10). Veći udeo laktoze sadrži kobilje, mleko magarice (oko 6-7%) i humano mleko (6-8%), dok je niži sadržaj laktoze u ostalim vrstama mleka: kravlje, bivolje, ovčije i kozje mleko (4,5-4,8%) (Tratnik & Božanić, 2012). Tokom laktacije sisari proizvode veću količinu enzima laktaze, dok se produkcija enzima smanjuje nakon laktacije i doprinosi da se razgradi značajno manja količina laktoze. Kod mladunaca životinja, laktoza se sporije razgrađuje nego drugi ugljeni hidrati, što dovodi do prisustva nerazgrađene laktoze u distalnom delu tankog creva i favorizuje uspostavljanje *Lactobacillus* flore koja održava nisku pH vrednost u crevnom sadržaju. Niska pH vrednost može da doprinese boljoj apsorpciji kalcijuma (Porter, 1978). Promena količine laktoze u mleku obrnuto je proporcionalna sa promenom udela sastojaka rastvorljivih u vodi (posebno Na i Cl) (Tratnik & Božanić, 2012). Stoga, udeo laktoze koja se sintetise u epitelnim ćelijama mlečne žlezde služi kao glavni faktor koji utiče na volumen mleka. Važnu ulogu u sintezi laktoze ima protein surutke  $\alpha$ -laktalbumin, koji se sintetise u endoplazmatskom retikulumu, odakle se transportuje u Goldžijev aparat (Čagalj & Brezovečki, 2013). Zajedno sa  $\beta$ -1,4-galaktozil transferazom (katalitička komponenta enzima laktoza-sintetaze),  $\alpha$ -laktalbumin povećava enzimski afinitet za glukoza 1000 puta u fazi sinteze laktoze, kada je glukoza vezana s galaktozom (Neville, 2009).

## MINERALI

Minerali su kvantitativno minorna jedinjenja u mleku, nisu izvor energije, ali su od suštinske važnosti za život, jer doprinose raznim vitalnim funkcijama u organizmu. Mleko je bogato mineralima, posebno kalcijumom (Ca) koji je važan za izgradnju i održavanje zdravih kostiju i tkiva. Sadržaj kalcijuma se u organizmu životinje i čoveka najbolje može iskoristiti iz mleka. Mleko sadrži više od 40 minerala među kojima su P, Mg, K, Na, Cl, Fe, Mn, Cu, Zn, F i I. Njihova količina zavisi od vrste i načina ishrane životinje (Gaucheron, 2005; 2011). Učešće odgovarajućih minerala u mleku različitih životinja i humanom mleku prikazano je u tabeli 11.

Tabela 11. Sadržaj minerala u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Minerali (mg/kg)	Vrste mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>c</sup>	Humanod <sup>d</sup>
Ca	1043-1283	519-1240	552-1176	280-324
P	930-992	310-704	525-845	140-430
Ca/P	1,2-1,3	1,67-1,76	1,05-1,39	2,00-0,75
Na	391-644	166-297	113-172	160-180
K	1212-1681	387-773	552-962	518-620
Mg	97-146	44-104	56-113	34-40
Zn	3,20-3,80	0,90-6,40	0,52-5,02	1,45-5,32
Fe	0,70-0,80	0,20-1,50	0,29-5,40	0,11-1,57
Ash, %	0,70-0,80	0,28-0,58	0,30-0,50	0,20-0,30

<sup>a</sup> Doreau & Martin-Rosset, 2002; Malacarne i sar, 2002; Gaucheron, 2005; Claeys i sar., 2014

<sup>b</sup> Summer i sar, 2004; Claeys i sar., 2014

<sup>c</sup> Salimei & Fantuz, 2012; Claeys i sar., 2014

<sup>d</sup> Yamawaki i sar., 2005; Claeys i sar., 2014

Makroelementi (Ca, Mg, Na, K, P i Cl) različito su raspoređeni u vodenoj i micelarnoj fazi mleka, u zavisnosti od njihove monovalentnosti katjona. Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> su prisutni uglavnom u slobodnom obliku, a samo u ograničenom obimu u formi jonskih parova. Divalentni joni Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> imaju uticaj na fizičko-hemijske osobine kazeinske micide. U sprovedenoj *in vitro* studiji utvrđeno je da se tokom digestije kazeinske micide poboljšava apsorpcija kalcijuma (Gaucheron, 2011). Sadržaj Na i K održava konstantnu vrednost osmotskog pritiska u ekstracelularnoj tečnosti.

Sadržaj Ca, P, K, Na i Mg u mleku magarice najbliži je kobiljem mleku. Učešće Ca u mleku magarice je najveće, a zatim sledi udeo K, P, Na i Mg. Uticaj laktacije na



promenu koncentracije sadržaja minerala posebno je izražen u mleku na sadržaj Ca, P i Mg (Fantuz i sar., 2006, 2009, 2011).

## VITAMINI

Vitamini su fiziološki, biohemijski i metabolički bioaktivne komponente mleka. Nutritivne prednosti konzumiranja sirovog mleka se ogledaju u dovoljnoj količini vitamina (Salimei & Fantuz, 2012). Surutka je dobar izvor vitamina rastvorljivih u vodi, dok je lipidna frakcija važan izvor liposolubilnih vitamina (Guy & Fenaille, 2006).

Vitamini E, A i C poseduju visoka antioksidativna svojstva i niz biohemijskih uloga vezanih za funkciju imunog sistema (Luthfor i sar., 2004; Lima i sar., 2014). Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) je liposolubilni vitamin, odgovoran za zaštitu ćelijske membrane, inhibira peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina (Lima i sar., 2014). Vitamin A je aktivno jedinjenje koje sadrži humano mleko i mleko različitih vrsta životinja, uglavnom kao retinol i u manjoj meri karotenoide (provitamin A), dok se vitamin C nalazi u obliku  $\alpha$ -askorbinske kiseline (Luthfor i sar., 2004). Sadržaj vitamina A, E i C prikazan je u tabeli 12.

Tabela 12. Sadržaj vitamina u mleku različitih vrsta životinja i humanom mleku

Vitamini ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vrste mleka			
	Kravlje <sup>a</sup>	Kobilje <sup>b</sup>	Magareće <sup>c</sup>	Humano <sup>d</sup>
A	0,27-2,34	0,34-0,88	0,59-0,65	0,05-0,57
E	0,90-3,80	1,13-1,34	0,81-1,07	0,74-5,02
C	10,00-10,85	12,87-23,80	31,50	30,03-35,20

<sup>a, c</sup> Gentili i sar., 2013, Luthfor i sar., 2004

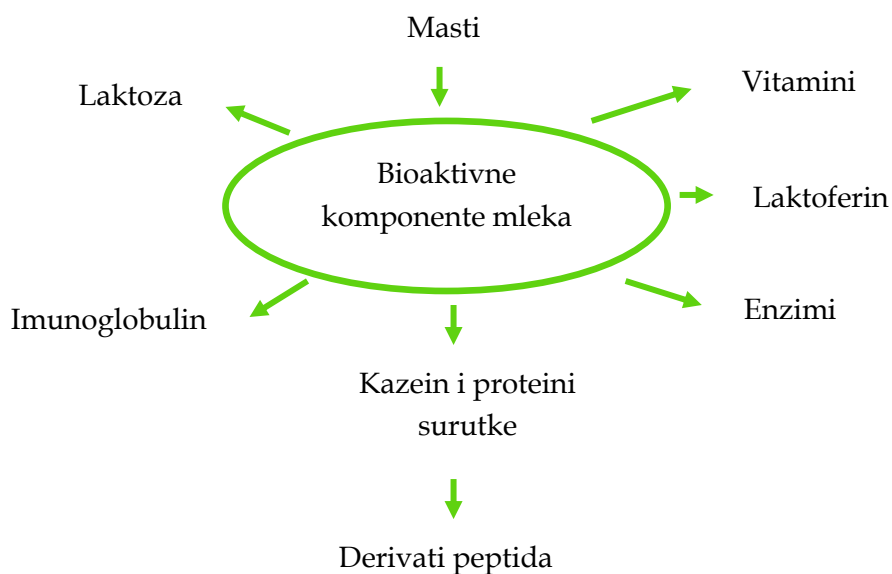
<sup>b</sup> Park i sar., 2006

<sup>d</sup> Luthfor i sar., 2004

## BIOAKTIVNE KOMPONENTE

U istraživanjima mleko magarice se navodi kao hrana bogata bioaktivnim jedinjenjima (slika 5) (Park, 2009). Prema mišljenju nutricionista, mleko treba unositi u organizam najviše zbog biološke vrednosti proteina, a onda i zbog svih drugih važnih sastojaka

mleka (Tratnik & Božanić, 2012). Pored nutritivnih vrednosti mleka, biološki aktivna jedinjenja kao što su kazein i proteini surutke važni su za fiziološke i biohemijske funkcije i imaju presudan značaj na ljudski metabolizam i zdravlje (Park, 2009). Bioaktivno dejstvo proteina mleka ispoljava se u digestivnom traktu tokom proteolitičke razgradnje, pri čemu se oslobađaju i aktiviraju bioaktivni peptidi. Kravlje mleko ima najveći sadržaj kazeina u odnosu na kobilje, magareće i humano mleko. Visok sadržaj kazeina u kravljem mleku uzrokuje formiranje čvrstog koaguluma u stomaku, koji zahteva 3-5 sati digestije (Malcarne i sar., 2002; Shamsia, 2009), odnosno, količina kazeina u kravljem mleku približno četiri puta je veća nego u mleku magarice i humanom mleku. Mleko magarice postaje sve značajnije zbog biološke aktivnosti koja se manifestuje kroz oksidativna svojstva, sposobnost imuno stimulacije, anti-inflamatorni efekat i antimikrobna svojstva (Park, 2009). Kobilje, magareće i humano mleko formiraju mekši koagulum u odnosu na kravlje mleko i potrebno vreme digestije je oko dva sata nakon unoenja mleka u organizam.



Slika 5. Bioaktivne komponente mleka (Park, 2009)

*$\beta$ -laktoglobulin* ima nekoliko bioloških funkcija, poboljšava digestiju lipida, transport retinola i masnih kiselina, uključujući i razvoj pasivnog imuniteta zajedno sa IgG (Sutton & Alston-Mills, 2006; Barlowska i sar., 2011).  *$\beta$ -laktoglobulin* mleka magarice

je monomer, a u mleku preživara dimer. Drugačija struktura i niži nivo ovog alergena u mleku magarice je razlog za hipoalergijski karakter ovog mleka (Restani i sar., 2002). Visok stepen svarljivosti  $\beta$ -laktoglobulina u mleku magarice može da poboljša prinos bioaktivnog peptida u digestivnom traktu (Inglstad i sar., 2010, Tidona i sar., 2011). Humano mleko ne sadrži  $\beta$ -laktoglobulin (najčešći uzročnik alergija), dok je udeo najvrednijeg  $\alpha$ -laktalbumina najveći u kolostrumu.

Sadržaj  *$\alpha$ -laktalbumina* mleka magarice je oko 76% identičan sa  $\alpha$ -laktalbuminom kravljeg mleka, ali sadrži  $2\text{Ca}^{2+}$  jona, pa nije glikoliziran. Skoro 100%  $\alpha$ -laktalbumina pretvara se u telesni protein, zbog optimalnog udela esencijalnih aminokiselina (Park, 2013). U humanom mleku, veći je odnos cisteina/metionina (1,32) nego u kravljem mleku (0,30) što osigurava bolje iskorišćenje proteina humanog mleka.  $\alpha$ -laktalbumin je dobar izvor esencijalnih aminokiselina triptofana i cisteina, koji su preteče serotonina, a po aminokiselinskom sastavu je sličan sa lizozimom. Pojedina klinička istraživanja pokazuju da hrana obogaćena  $\alpha$ -laktalbuminom utiče na smanjenje stresa kod ljudi i ublažavanja depresivnog stanja (Lopez-Exposito & Recio, 2008).

*Laktoferin* je multifunkcionalni protein koji ima antibakterijsku, antivirusnu i antiinflamatornu aktivnost i uključen je u izgradnju imuniteta i apsorpciju gvožđa (Lönnerdal, 2003). Laktoferin u humanom mleku je većim delom svarljiv, a nesvareni deo se vezuje za receptore na površini crevnih epitelnih ćelija (Suzuki i sar., 2005). Glavni deo gvožđa u ljudskom telu vezan je za laktoferin (Lönnerdal i sar., 2003). Laktoferin olakšava apsorpciju gvožđa u crevima zbog prisustva određenih laktoferin receptora (Suzuki i sar., 2005). Deo laktoferina koji bebe unesu preko mleka, prolazi kroz gastrointestinalni trakt u delimično degradiranom obliku i kao takav utiče na formiranje crevne flore, apsorpciju gvožđa i rast ćelija (Kuwata i sar, 1998).

Laktoferinu se pripisuje nekoliko antimikrobnih aktivnosti, kako zbog zasićenja gvožđem, tako i zbog formiranja peptida laktofericina tokom digestije laktoferina. Polipeptid laktofericin nastaje delimičnom hidrolizom laktoferina pod dejstvom pepsina i ima izraženije bakteriostatsko dejstvo, koje je nezavisno od prisustva gvožđa (Park, 2009). Nedavne studije takođe su pokazale da laktofericin blokira vezivanje enteropatogene *E.coli* za crevne ćelije, deluje protiv virusa i gljiva (Andersson i sar., 2000).

Rezultati studija pokazuju da *lizozim* nezavisno od svoje uloge katalizatora, odnosno bez enzimske aktivnosti poseduje baktericidna svojstva (Lopez-Eksposito, 2008). Lizozim i laktoferin aktiviraju imunizaciju, favorizuju zaštitu od infekcije respiratornog i digestivnog trakta i sprečavaju nastanak dermatitisa (Paolicelli, 2005).

*Laktoza* obezbeđuje oko 45-50% sadržaja ukupne energije humanog mleka. Laktoza ima fundamentalnu ulogu, jer stimuliše creva da apsorbuju kalcijum i ima pozitivan uticaj na koštanu mineralizaciju i stimulaciju pravilnog razvoja nervnog sistema kod beba u prvih nekoliko meseci (Tadesse, 2010). Laktoza pomaže apsorpciju i zadržavanje i drugih važnih minerala, kao što su Mg, Zn i Mn kao i vitamina C ([www.dairyglobalnutrition.org](http://www.dairyglobalnutrition.org)). Ishrana sa humanim mlekom stimuliše endogenu aktivnost laktaze i olakšava probavu laktoze. Visoke koncentracije laktoze u humanom mleku smatraju se od velikog značaja za bebe i decu, jer njen metabolički proizvod, galaktoza, odlazi u sastav galaktolipida centralnog nervnog sistema (Calil i sar., 2003).

*Bioaktivne komponente masti* u mleku obuhvataju trigliceride, zasićene, polinezasićene masne kiseline, fosfolipide i vitamine A i D koji poseduju antikancerogeno, antimikrobno i antiinflamatorno delovanje. Vitamini A i D su najviše istraživana prirodna antikancerogena jedinjenja koji najbolje deluju u kombinaciji sa vitaminom E i selenom (German & Dillard, 2002).

*Antioksidansi* je agens koji onemogućava, sprečava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljanog molekula (Halliwell & Gutteridge, 2007). Neki antioksidansi se sintetišu u organizmu (endogeni), a drugi (egzogeni) unose hranom ili upotrebom dijetetskih suplemenata. Grupu endogenih antioksidanasa čine enzimi, neenzimski molekuli, kao i neki hemijski elementi (cink i selen). Ovi sistemi su međusobno komplementarni, jer deluju sinergistički protiv različitih radikala u različitim ćelijskim prostorima. Antioksidanti reaguju sa slobodnim radikalima, stabilizuju ih, i na taj način štite ćelije od oštećenja (Halliwell, 2009). Najpoznatiji i najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamini C, E i A, karotenoidi, polifenoli i drugi (Pietta, 2000; Fang i sar., 2002).

Mleko sadrži nekoliko fizioloških funkcionalnih komponenata uključujući proteine, nezasićene masne kiseline, naročito konjugovanu linoleinsku kiselinu i omega-3 masne kiseline, vitamine E i C, kao i karotenoide i flavonoide sa antioksidativnim svojstvima, čime održava veću oksidacionu stabilnost i obezbeđuje potencijalno veću zaštitu

životinja i ljudi od izloženosti oksidativnom stresu (Valko i sar., 2007). Proteini mleka smatraju se važnim izvorom bioaktivnih peptida, koji su neaktivni unutar sekvence proteina, a oslobađaju se enzimskom proteolizom, čime se dobijaju biološki aktivni fragmenti peptida. Istraživanja sprovedena u posledenje vreme pokazuju da je kazein važan izvor različitih biološki aktivnih peptida (Kumar i sar., 2013). Antiradikalska aktivnost kazeina i peptida izvedenih iz kazeina je sposobnost da inhibiraju enzimsku i neenzimsku lipidnu peroksidaciju (Rival i sar., 2001 a, b). Antioksidativna aktivnost kazeinskih frakcija kreće se od najveće ka najmanjoj vrednosti sledećim redom:  $\beta$ -kazein >  $\alpha$ <sub>1</sub>-kazein >  $\alpha$ <sub>2</sub>-kazein >  $\alpha$ -laktoalbumin >  $\beta$ -laktoglobulin (Rival i sar., 2001 a,b).

Antioksidans kao što je vitamin E vezuju radikale u masnoj fazi, a vitamin C u vodenoj fazi. Ove antioksidativne komponente su aktivne u prevenciji lipidne peroksidacije i održavanju kvaliteta mleka, ili se takođe koriste kao sastojci u hrani i farmaceutskim proizvodima u cilju poboljšanja zdravlja dece i odraslih (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000).

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazala je mast mleka krava i magarica u odnosu na mleko drugih vrsta životinja, kada se mlečna mast koristi kao supstrat. Pored toga, oksidativna stabilnost mlečne masti mleka krava i magarica bila je veća u odnosu na mleko koza i ovaca, što se može objasniti visokim odnosom oleinske/ $\alpha$ -linoleinske kiseline (Popović i sar., 2014).

## **UTICAJ ISHRANE NA SASTAV MLEKA MAGARICE TOKOM LAKTACIJE**

### **KARAKTERISTIKE HRANE ZA ŽIVOTINJE**

Travnjaci (livade i pašnjaci) su poljoprivredne površine obrasle različitim biljnim vrstama koje se koriste za ishranu životinja i proizvodnju hrane za životinje. Biljne travnjake čine tri osnovne grupe biljaka. Prvu grupu čine trave (*Poaceae*), drugu grupu čine leptirnjače (*Fabaceae*) i treća grupa su ostale biljne vrste koje pripadaju različitim botaničkim grupama i podgrupama. U Autonomnoj Pokrajini Vojvodini pod livadama

se nalazi 37,960 hektara, a pod pašnjacima 89,285 hektara površine ([www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs](http://www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs)).

Pašnjak je jedan od izvora sveže, zelene trave. U predelima gde su najznačajnije zastupljeni, mogu biti jedini izvor kabaste hrane u vreme aktivne vegetacije tj. od aprila do novembra. Pašnjaci sadrže visok procenat vode 60-80% i imaju veliku hranljivu vrednost zbog visokog učešća proteina u suvoj materiji paše 20-22%, a učešće proteina zavisi od botaničkog sastava paše. Hranljiva vrednost paše je veća, posebno u sadržaju proteina, ako je učešće leptirnjača (detelina, lucerka, grahorina itd.) veće, jer su one bogatije u hranljivim materijama od slatkih trava (livadarke, ljulj itd.). U ukupnoj količini sirovih proteina 45-85% čine pravi proteini, dok su ostalo amidi (Grubić, 2003).

Količina celuloze je veoma varijabilna i u najvećoj meri zavisi od faze razvoja biljaka. Mlade biljke sadrže 15-18% sirove celuloze koja je, zahvaljujući manjem stepenu lignifikacije, svarljivija. Po sadržaju i svarljivosti sirove celuloze mlade zelene biljke se nalaze između kabaste hrane i koncentrata. Starije i zrelije biljke imaju značajno veći procenat sirove celuloze 20-30% i više. U suvoj materiji paše sadržaj masti se kreće 4-5% dok količina i sastav pepela, zavise od prisustva pojedinih makro i mikroelemenata u zemljištu. Procenat pepela se kreće od 7-11%. Najzastupljeniji element je kalcijum koji se koncentriše u lišću oko 0,5%. Procenat fosfora zavisi od stadijuma razvoja, ali i njegove zastupljenosti u zemljištu. Mlade biljke sadrže veći procenat fosfora. Sadržaj fosfora je u granicama 0,2-0,6%. Kvalitetna paša je bogata vitaminima A, K, C i B kompleksa. Hranljive materije trava su dobro svarljive i s obzirom na sadržaj, paša je jedno od najpotpunijih hraniva za životinje, a ujedno i najjeftinija jer je životinje uzimaju same ([www.amiscg.org](http://www.amiscg.org)).

Pašnjak Valjevac u okviru prirodnog rezervata "Zasavica" zauzima površinu od 300 ha i predstavlja značajnu bazu za ispašu životinja. Jedna od najobimnijih i najznačajnijih familija biljaka je svakako familija trava (*Poaceae*) ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)) koja je najzastupljenija na pašnjaku Valjevac. Floristički sastav pašnjaka Valjevac u okviru prirodnog rezervata Zasavica prikazan je na slici 6. Na pašnjaku je značajan povoljan uticaj sunca, čistog vazduha i što je najvažnije slobodnog kretanja. Pašnjak "Valjevac" sastavljen je od niskih zemljišnih livada (klasa *Molinio-Arrhenateretea* R. Tx. 1937) i vlažnih eutrofnih i mezotrofnih travnjaka (klase *Phragmitetea communis* Tx. et Preising

1942). Vegetacija pripada klasi *Molinio-Arrhenateretea* R. Tx. 1937 ( sa ukupno 895 vrsta koje obuhvataju 31,36% ukupnih biljnih vrsta Srbije) i klasi *Phragmitetea communis* Tx. et Preising 1942 (sa ukupno 290 biljnih vrsta koje obuhvataju 10,16% biljnih vrsta Srbije). Ujedno, ovo je i najekonomičniji oblik ishrane životinja ([www.amiscg.org](http://www.amiscg.org)).

Najčešći način konzervisanja trava na pašnjaku „Valjevac“ je proizvodnja livadskog sena. Livadsko seno nastaje sušenjem zelene voluminozne krme do standardne vlažnosti 12-15% pri kojoj se može sačuvati hranljiva vrednost i kvalitet kroz duže vreme, do upotrebe. S obzirom na vrstu biljnog materijala u ishrani životinja, najčešće se priprema seno livadskih trava, seno višegodišnjih leguminoza i seno detelinsko-travne smeše (Domaćinović i sar., 2008).

U toku zime livadsko seno predstavlja glavni deo obroka i izvora proteina za Balkanskog magarca. Livadsko seno se dobija sušenjem pokošene mase, a hranljiva vrednost zavisi od botaničkog sastava. Pašnjak „Valjevac“ daje prinose 1,3-2,0 t/ha sena godišnje (Statistički Zavod Srbije, 2013).

Konzervisanjem sveže trave menja se njen sastav. Sušenjem trave smanjuje se sadržaj ukupnih masnih kiselina, posebno linolne i linolenske kiseline (Shingfield i sar., 2005). Ishrana sušenom travom, može dati mleko sa nešto većim sadržajem oleinske kiseline (Chilliard i sar., 2001). Livadsko seno je prosečan izvor proteina, dobar izvor kalcijuma i karotina, ali sa umerenom količinom fosfora. Sadržaj celuloze je dosta visok ([www.amiscg.org](http://www.amiscg.org)).

Hemijski sastav i hranljiva vrednost sena promenjiva je i posebno izražena kod sena livadskih trava. Energetska vrednost sena leguminoza i sena livadskih trava uglavnom je slična i iznosi 0,5 hranljivih jedinica/kg (odgovara potrebi stvaranja 1 kg mleka). Proteinska vrednost nešto je izraženija u korist sena leguminoza (12-16%) od sena livadskih trava (7-9%). Seno je dobar izvor vitamina, naročito vitamina A,  $\beta$ -karotena i vitamina D, što zavisi od načina sušenja

---

**Familija**
**Poaceae**

*Lolium perenne*  
Engleski ljulj



*Lolium multiflorum*  
Italijanski ljulj



*Agropyrum repens*  
Puzava pirika



*Alopecurus pratensis*  
Lisičij rep



*Festuca pratensis*  
Visoki vijuk

**Fabaceae**

*Trifolium pratense*  
Crvena detelina



*Trifolium repens*  
Bela detelina



*Medicago sativa* L.  
Lucerka-pitoma det.

**Asteraceae**

*Achillea millefolium*  
Hajdučka trava



*Matricaria inodora*  
Bezmirisna kamilica

**Plantagenaceae**

*Plantago media*  
Bokvica



Slika 6. Floristički sastav pašnjaka Valjevac u okviru Specijalnog rezervata prirode "Zasavica" (Grdović i sar., 2013)



Seno je bogato  $\beta$ -karotenom (70-100 mg/kg), dok sušenjem na tlu, sunčevi UV-zraci aktiviraju sintezu vitamina D. Seno predstavlja osnovnu hranu za preživare, konje i magarce u zimskim mesecima. Kvalitetno livadsko seno vrlo je dobra dijetetska hrana, s pozitivnim uticajem na proces digestije (Domaćinović i sar., 2008).

*Detelina (Trifolium)* crvena i bela, korisiti se kao hrana za životinje u svežem i prerađenom obliku (seno, silaža, brašno). Crvena detelina je druga po značaju višegodišnja leguminoza posle lucerke. Crvena detelina posebno je bogata proteinima čiji sadržaj može da dostigne 25% u fazi bujanja, pa čini važan sastojak kvalitetne kabaste hrane za životinje (Vasiljević i sar., 2009). Visok sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata, čini je boljom od lucerke i Italijanskog ljulja. Crvena detelina sadrži velike količine provitamina A i vitamina C, D, E, K, B1, B2 i B3. Takođe je bogata i mineralima (Marković i sar., 2007). U rano proleće, mlade biljke imaju visok udeo lišća sa visokim sadržajem vlage, proteina, minerala i nizak sadržaj vlakana. Prosečno, crvena detelina sadrži oko 17-20% proteina, 29-39% ugljenih hidrata, blizu 2% masti i 8% pepela. Sadržaj minerala je visok na početku vegetacione sezone. Prosečan sadržaj Ca iznosi 1,86%, P 0,30%, Na 0,08% i K 2,42% (Vasiljević i sar., 2009).

*Lucerka (Medicago sativa L.)* ima izuzetnu ulogu u ishrani domaćih životinja, a koristi se u većini slučajeva kao seno. Lucerka se smatra vodećom i najstarijom gajenom krmnom biljkom, koja se odlikuje visokom sposobnošću proizvodnje zelene mase (sena) najboljeg kvaliteta. Lucerka se odlikuje, pre svega, visokim sadržajem sirovih proteina, koji se kreće od 18-22% zavisno od faze starosti vegetativnih organa, odnosno, sadrži 12-14% svarljivih proteina. Ona predstavlja najvažniju kabastu hranu u zimskom periodu. Po sadržaju mineralnih materija, naročito fosfora i kalcijuma, lucerka zauzima prvo mesto među krmnim biljkama. Lucerka sadrži i mikroelemente kao što su Zn i Mo. Takođe, zelena masa i dobro proizvedeno seno sadrži značajne količine karotina kao izvora A vitamina, značajnu seriju vitamina: B, C, D, E i minerala fosfora i kalijuma (Bilić, 2012).

*Kukuruz (Zea mays L.)* je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u svetu. Svi delovi biljke kukuruza (osim korena) koriste se za ishranu domaćih životinja. Zrno kao hrana za životinje ima izuzetno veliku važnost jer sadrži oko 70-75% ugljenih hidrata,

10% proteina, oko 5% ulja, 15% mineralnih materija i 2,5% celuloze. U zrnu kukuruza 80% proteina nalazi se u endospermu, a 20% u klici (Grubić, 2003).

Glavni razlog dodatka kukuruza kao i prekrupe kukuruza je izvor energije, i to 1,54 MJ probavljive energije (DE) po kg. Kukuruz je bogat linolnom kiselinom i sadrži je oko 60%, zatim karotenom koji se pretvara u vitamin A u tankom crevu. Skrob se takođe u tankom crevu pod dejstvom enzima amilaze pretvara u glukozu, prost šećer značajan za podsticanje telesnih funkcija životinje ([www.equinenutritionnerd.com](http://www.equinenutritionnerd.com)).

Kukuruzno zrno je značajan izvor vitamina B i E (Buckner i sar., 1990), ima i visok sadržaj fenolnih jedinjenja (između ostalih antocijaninini), koja imaju ulogu antioksidanasa, kao i mineralnih materija K i Mg (Grbeša, 2008).

U tabeli 13 prikazan je prosečni sastav različitih vrsta hrane za životinje. Vrsta hrane/biljaka i faza rasta najvažniji su faktori koji utiču na sastav i hranljivu vrednost biljaka. Kako biljke rastu veća je potreba za vlaknastim tkivima da održe svoju strukturu, pa samim tim se sadržaj celuloze povećava, a koncentracija proteina opada (McDonalds i sar., 2014).

Tabela 13. Sastav različitih vrsta hrane za životinje (McDonalds i sar., 2014).

Vrsta hrane	Sadržaj			
	Suva materija (%)	Proteini (% na sm)	Celuloza (% na sm)	Pepeo (% na sm)
Livadska trava	12-25	20-30	20-35	5-12
Livadsko seno	15-35	25-30	25-45	8-12
Seno lucerke	80-90	18-25	25-45	8-15
Detelina	13-24	17-25	20-30	5-14

## SASTAV MLEKA

Svaka promena u ishrani životinja (godišnje doba, sadržaj i sastav masti i ulja u toku perioda laktacije) utiče na sastav mleka, posebno na sadržaj i sastav masnih kiselina (Kalač & Samkova, 2010).

Način funkcionisanja digestivnog sistema magarice je drugačiji od preživara. Magarice tokom digestije hrane imaju sposobnost da koriste vlakna (celulozu i hemicelulozu)

vrlo efikasno. Poželjno je da ishrana navedenih životinja bude bogata vlaknima jer način na koji fermentišu vlakna je jedinstven. Magarice su pseudo preživari, imaju veliki cekum (slepo crevo) odgovoran za većinu fermentacija koje se odvijaju dok se kod preživara taj proces odvija u buragu (Aganga i sar., 2000). S obzirom da se hidrogenizacija masti u buragu, ne odvija kod magarica, nezasićene masne kiseline koje životinje unesu preko ishrane, nemaju mogućnost da prerastu u zasićene masne kiseline (Aganga i sar., 2000).

Sporiji prolazak hrane kroz gastrointestinalni trakt, ima za posledicu veću svarljivost organskih materija i vlakana (Pearson i sar. 2005). Životinjama na pašnjaku leti se smanjuje sadržaj masne kiseline C16:0 i povećava sadržaj C18:1 u mleku preživara i ne preživara (Devle i sar., 2012).

Masne kiseline iz hrane predstavljaju jedan od izvora masnih kiselina raspoloživih za sintezu mlečne masti, posebno više masne kiseline (polinezasićene), koje učestvuju sa oko 18-25% u sastavu mlečne masti (Hawke & Taylor, 1983).

Tokom laktacije prosečan sadržaj mlečne masti mleka varira i zavisi od rase, ishrane, perioda laktacije, starosti i zdravstvenog stanja životinje, kao i stepena uhranjenosti i intervala između uzimanja mleka itd. Sezonski faktor se može sagledati upoređivanjem masnokiselinskog sastava masti mleka u npr. prolećnom periodu, u maju mesecu, i zimskom periodu, u novembru. Uobičajeno je da je u letnjem periodu povećan sadržaj nižih zasićenih kiselina, C4:0 i C6:0, kao i sa većim brojem C atoma nezasićenih masnih kiselina, C18:1 i C18:2. U zimskom periodu je uglavnom povećani sadržaj viših zasićenih masnih kiselina kao što su: C12:0, C14:0 i C16:0, kao i nekih kiselina srednjeg lanca C10:0 (Hawke & Taylor, 1983). Sezonski uticaj je izražen i na sadržaj nutritivno visoko vredne bioaktivne komponente-konjugovane linolne kiseline (C18:2-CLA) (Chilliard i sar., 2001, Kalač & Samkova, 2010). Posebno je izraženo povećanje sadržaja CLA kod mleka dobijenog od muznih životinja sa ispaše, što se smatra rezultatom konzumiranja trava bogatih linolnom (C18:2) i  $\alpha$ -linoleinskom (C18:3) kiselinom, koje su prekusori u nastanku konjugovane linolne kiseline. Sadržaj konjugovane linolne kiseline u mleku zavisi od vremena koje životinja provede na ispaši, godišnjeg doba i sastava trava. Prelaskom na ispašu utvrđeno je kontinualno

povećanje sadržaja konjugovane linolne kiseline u mleku, koje dostiže maksimalnu vrednost od 2,54% dvadeset trećeg dana ispaše (Khanal i sar., 2004).

Razlike uočene u sastavu masnih kiselina mleka raznih životinja u velikoj meri povezane su sa načinom ishrane, kao i mehanizmom sinteze masnih kiselina. Sastav mlečne masti nepreživara odražava se u potpunosti na sastav lipida u ishrani, dok masne kiseline kod preživara podležu hidrogenizaciji zasićenih masnih kiselina u buragu pre apsorpcije (Korhonen, 2009; Stender i sar., 2008). Ustanovljen je uticaj botaničkog sastava trave, kao i vrste sena, na sastav masnih kiselina u mlečnoj masti. Poznato je da u područjima sa kontinentalnom klimom sveža trava sadrži od 1-3% masnih kiselina sa 18 ugljenikovih atoma (najviše u proleće i jesen), od čega 55-65% čini  $\alpha$ -linoleinska kiselina. Najzastupljenije masne kiseline u mleku u toku ispaše su: miristinska, palmitinska i stearinska kao i mononezasićene masne kiseline u količini od 23 do 32% među kojima je najzastupljenija oleinska (Collomb i sar., 2002b).

Mleko životinja koje se hrane svežom travom sa livada i pašnjaka ima znatno veći sadržaj nezasićenih masnih kiselina u odnosu na mleko životinja koje se hrane senom i/ili silažom. Visok sadržaj linolne kiseline 8,7% i  $\alpha$ -linoleinske kiseline 10% je zbog unosa trave i žitarica (Devle i sar., 2012). Martini i sar. (2015) su utvrdili da način ispaše i hranjenje životinja travom značajno utiče na senzorske i nutritivne karakteristike mleka, posebno u proleće. Pored ishrane svežom travom, izlaganje suncu životinja doprinosi povećanju sadržaja masnih kiselina kratkog lanca, laurinske, miristinske i stearinske kiseline i do smanjenja sadržaja oleinske, linolne i  $\alpha$ -linoleinske kiseline (Agustino i sar., 2002). Ishrana kukuruzom utiče na veći udeo linolne kiseline u mleku u odnosu na ispašu (Kalač & Samkova, 2010). Ukupan sadržaj vitamina u mleku je vrlo promenljiv i zavisi od vitaminskog sastava hrane za životinje, pri čemu je nivo vitamina rastvorljivih u vodi viši od sadržaja vitamina rastvorljivih u mastima (Claeys i sar., 2014).



## **MATERIJAL I METODI RADA**

### **MATERIJAL**

#### **MLEKO MAGARICE BALKANSKE RASE**

U istraživanjima je korišćeno mleko magarice balkanske rase iz Specijalnog Rezervata Prirode "Zasavica", opština Sremska Mitrovica i Bogatić.

Obuhvaćeno je ukupno 10 životinja istog perioda laktacije u trajanju od 2 godine. Jedinke uključene u eksperiment su starosti od 3-7 godina. Uzorci su uzimani pojedinačno od svake životinje dva puta dnevno nakon muže (7h i 15h) u količini od 150-200ml. Uzorci mleka su skladišteni u rashladnom uređaju na +4°C tokom transporta i zamrzavani do izvođenja analiza. Tokom perioda laktacije mleko magarice je uzorkovano 40., 45., 60., 80., 90., 100., 125., 150., 170., 200., 230. i 280. dana.

#### **HUMANO MLEKO**

Analizirano je humano mleko od 10 žena istog perioda laktacije, starosti od 30-40 godina. Uzorci mleka sakupljeni su 40. i 90. dana laktacije. Prosečni uzorci formirani su od jutarnjeg i podnevnog mleka.

#### **HRANA ZA ŽIVOTINJE**

Za ishranu životinja u periodu laktacije korišćeno je livadsko bilje, livadsko seno, detelina i kukuruz (Tabela 14).

Tabela 14. Način ishrane magarica u periodu laktacije

Vrsta hrane	Sezona			
	Proleće	Leto	Jesen	Zima
Livadsko bilje (paša)	✓	✓	✓	
Livadsko seno				✓
Detelina	✓			
Kukuruz	✓	✓	✓	✓

## METODI

### FIZIČKO-HEMIJSKE METODE ANALIZE MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE

*Određivanje pH vrednosti* je izvršeno prema referentnoj ISO 11869 (1997) metodi na temperaturi 20° C upotrebom laboratorijskog pH metra (ISKRA, pH METER MA5724). *Sadržaj suve materije* u uzorcima mleka određen je IDF/ISO 21A metodom (1982).

*Sadržaj proteina* u mleku je utvrđen na osnovu sadržaja ukupnog azota određenog referentnom metodom (IDF 20-5, 2001) i množenjem sa faktorom 6,38.

*Sadržaj mlečne masti* u uzorcima mleka određen je metodom po Gerber-u (IDF 105: 2008).

*Sadržaj laktoze* u uzorcima mleka određen je gravimetrijski GEA Niro A19a metodom.

*Sadržaj ukupnog pepela* u uzorcima mleka određen je gravimetrijskom metodom (IDF 90, 1979).

*Energetska vrednost (EV)* određena je računskim putem prema Pravilniku o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Sl. glasnik RS, br. 85/2013).

$$EV \text{ (kJ/100ml)} = ( \% \text{ protein} \times 17) + ( \% \text{ masti} \times 37) + ( \% \text{ UH} \times 17))$$

## KAPILARNA ELEKTROFOREZA PROTEINA MLEKA

Razdvajanje proteina mleka (*Lab-on-a-Chip*) izvršeno je primenom automatske kapilarne elektroforeze korišćenjem uređaja Agilent 2100 bioanalyzer („Agilent Technologies“, SAD) uz primenu „Protein 80 Plus Lab Chip“ kita. Čipovi su pripremljeni prema uputstvu koji pruža Protein 80 Lab Chip komplet (slika 7). Kvalitativna analiza proteina urađena je određivanjem molekulskih masa razdvojenih frakcija proteina. Kvantitativnom analizom utvrđena je koncentracija svake od determinisanih proteinskih frakcija tokom perioda laktacije.



Slika 7. Agilent 2100 Bioanalyzer; Protein 80 Plus Lab Chip

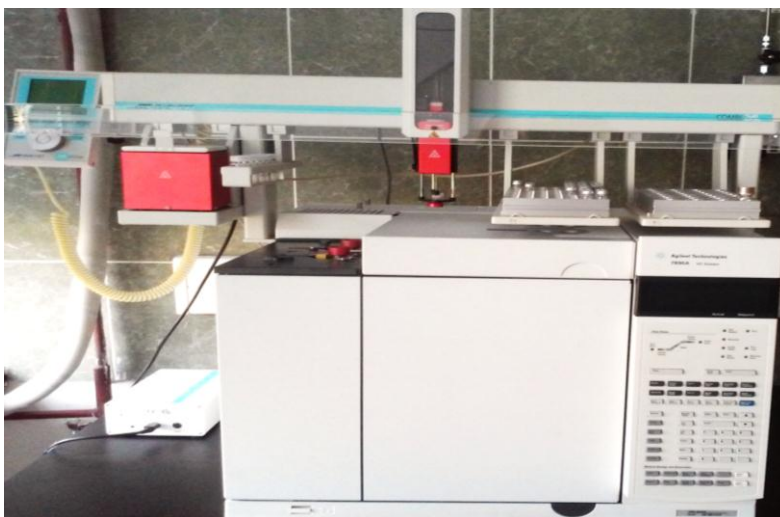
Pre razdvajanja proteina, izvršena je ekstrakcija rastvorljivih proteina iz uzoraka (Tidona i sar., 2011). Ispitivani uzorci mleka su razblaženi u odnosu 1:1,5 (v/v) uzorak: pufer, ekstrakcionog pufera (0,125 M Tris-HCl pri pH 6,8, 4% Na-dodecil sulfata, 2% glicerola i 2%  $\beta$ -merkaptetoetanol). Uzorci su toplotno denaturisani na 100 °C u trajanju od 5 min. Goveđi serum albumin je korišćen kao standard za kvantifikaciju proteina mleka. Svi uzorci su analizirani u tri nezavisna ponavljanja.

## GASNA HROMATOGRAFIJA/MASENA SPEKTROMetriJA

### Sastav masnih kiselina mleka i hrane za životinje

Određivanje masnih kiselina iz uzorka mleka ~2ml i uzorka hrane za životinje ~1g vršena je pomoću ekstrakcije sa hloroformom i metanolom u odnosu 2:1 uz mešanje/centrifugiranje pri čemu su ekstrahovane masti i pripremljeni su metil-estri

masnih kiselina prema metodi po Folch i sar. (1957). Azot je korišćen za sušenje i uklanjanje rastvarača iz metil-estara masnih kiselina. Dobijeni uzorci su analizirani na gasnom hromatografu-GC Agilent 7890A sistemu sa maseno spektrometrijskim detektorom-FID (slika 8), režimom ubrizgavanja, opremljen kapilarnom kolonom (DB WAX 30 m, 0.25 mm, 0.50  $\mu$ m). Helijum je korišćen kao noseći gas (čistoće > 99,9997 vol. %, brzina protoka = 1,26 ml/min). Pikovi masnih kiselina su identifikovani poređenjem vremena retencije sa retencionim vremenima standarda Supelco 37 mix. komponenta metil estara masnih kiselina (Sigma-Aldrich, EU), a podacima interne biblioteke podataka. Rezultati su izraženi u % kao udeo pojedinačnih masnih kiselina od ukupnih masnih kiselina.



Slika 8. Agilent 7890A- GC system

## SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA

### Sadržaj ukupnog fosfora u mleku

Sadržaj ukupnog fosfora (P) u uzorcima mleka određen je spektrofotometrijskom metodom (IDF 42, 2006). Uzorci mleka su upareni, a zatim metodom "suvog spaljivanja" žareni na  $550 \pm 10^\circ\text{C}$ . Nakon hlađenja, pepeo se hidrolizuje pomoću hlorovodonične kiseline. Dobijeni rastvor se filtrira i razblaži molibdenskim rastvorom čija se apsorbancija meri na spektrofotometru ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ). Sadržaj P izražen je u mg/100ml.



## Sadržaj ukupnog fosfora hrane za životinje

Sadržaj P određen je spektrofotometrijski u skladu sa Pravilnikom o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane (Sl. list SFRJ, br. 15/87). Analize su urađene u dve probe u svakom uzorku, a srednja vrednost je izračunata i izražena u mg/kg suve materije.

## Antioksidativna aktivnost mleka

Antioksidativna aktivnost na DPPH slobodne radikale određena je spektrofotometrijskom metodom koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH (Živković i sar., 2009). Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donor vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH prelazi u redukovani neutralni DPPH oblik. Iz uzoraka mleka pripremljeni su etanolni rastvori pomoću etanola (1:1) čime je izvršena ekstrakcija. Koncentracija DPPH u reakcionoj smeši određena je preko kalibracione krive. DPPH aktivnost izražena je kao sposobnost hvatanja slobodnih radikala (AA) i izračunata prema formuli:

$$\% \text{ AA} = \frac{(\text{DPPH}_{\text{sp}}) - (\text{DPPH}_{\text{u}})}{(\text{DPPH}_{\text{sp}})} \times 100$$

gdje je (DPPH<sub>sp</sub>) koncentracija DPPH u slepoj probi, (DPPH<sub>u</sub>) koncentracija DPPH u uzorku (u etanolnom ekstraktu).

Sve analize su urađene u dve probe u svakom uzorku, i izračunata je srednja vrednost.

## ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROFOTOMETRIJA

### Sadržaj minerala u mleku

Sadržaj minerala (K, Na, Mg, Ca, Zn, Fe) u uzorcima mleka određen je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom na instrumentu Varian SpectrAA 10 (Varian, 1989) primenom odgovarajuće metode (IDF 119, 2007). Uzorci mleka su upareni, a zatim je suvi ostatak pripreman metodom "suvog spaljivanja" žarenjem na 550±10°C. Dobijeni

pepeo rastvoren je u hlorovodoničnoj kiselini i zatim prenesen u normalni sud od 50 ml koji je dopunjen destilovanom vodom. Sadržaj minerala izražen je u mg/100ml.

### **Sadržaj minerala hrane za životinje**

Sadržaj Ca, Cu, Fe, Cu, Zn, Mn i K određen je metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (SRPS EN ISO 6869, 2004). Analize su urađene u dve probe u svakom uzorku, a srednja vrednost je izračunata i izražena u mg/kg suve materije.

### **ENZIMSKA ANALIZA VITAMINA C U MLEKU**

Sadržaj vitamina C u uzorcima mleka određen je komercijalnim enzimskim testom Megazyme International, Irska (Bergmeyer, 1988). Apsorbancija je merena pomoću spektrofotometra (UV/VIS SPECORD M 40, Carl Zeiss).

### **HPLC ANALIZA VITAMINA E I A U MLEKU**

Sadržaj vitamina E i vitamina A u uzorcima mleka određen je pomoću HPLC sistema Agilent 1200 serije (Agilent Technologies Inc., USA). Izokratski režim eluiranja je primenjen koristeći mobilnu fazu metanol, pri protoku od 0,2 ml min<sup>-1</sup> i pritisku 30 bara. Eluat je detektovan korišćenjem UV spektra i DAD detektora, a talasna dužina na kojoj su praćeni signali bila je 285 nm (vitamin E) i 326 nm (vitamin A). Ekstrakti mleka su pripremljeni prema modifikovanoj metodi II (Mendoza i sar., 2003). Zapremina uzorka korišćena za injektovanje je 5 µl. Analiza je trajala 12 minuta. Vreme zadržavanja vitamina E iznosi 2,68 min, a vreme zadržavanja vitamina A je 4,5min. .

Jedinjenja su identifikovana hromatografskim poređenjem sa standardima  $\alpha$ -tokoferola (Sigma Co, St Louis, MO, USA). Za pravljenje standardne kalibracione krive za određivanje vitamina E pripremljeni su rastvori  $\alpha$ -tokoferola sledećih koncentracija: 8,64; 25,92; 43,20; 60,48 µg/ml. Standardna kalibraciona kriva za određivanje vitamina A dobijena je pravljenjem rastvora retinola (Sigma Co, St Louis, MO, USA) u koncentraciji 4,00; 10,00; 16,00; 22,00 µg/ml.

Priprema ekstrakta uzoraka mleka izvršena je prema metodi II za infant formule (Mendoza i sar., 2003). Uzorak mleka (1g) je rastvoren sa 4ml apsolutnog etanola u epruvetu koja je smeštena u centrifugu na 2500 obrtaja u trajanju od 2 min. Smeši je dodato 400  $\mu$ l n-heksana i mešano na vortexu 1min, a zatim centrifugirano 5min na 2500 obrtaja. Organski sloj uklonjen je propuštanjem kroz mikrofilter sa prečnikom pora 0,45  $\mu$ m. Sadržaj vitamina E i A određen je u dve probe u svakom uzorku, a srednja vrednost je izračunata i izražena u  $\mu$ g/ml.

## **ANALIZA HRANE ZA ŽIVOTINJE**

*Sadržaj vlage* u uzorcima hrane za životinje određen je gravimetrijskom metodom (SRPS ISO 6496, 2001).

*Sadržaj proteina* je utvrđen na osnovu sadržaja ukupnog azota određenog metodom po Kjeldalu (SRPS EN ISO 5983-2, 2010) i množenjem sa faktorom 6,25.

*Sadržaj ukupnog pepela* određen je gravimetrijskom metodom (SRPS ISO 5984, 2002).

*Ukupan sadržaj masti* određen je na uređaju za ekstrakciju masti, prema proceduri proizvođača (Soxtec System HT, model 1043 Extraction unit, „Foss Tecator AB“, Švedska) i u skladu sa metodom po Soxhlet-u (SRPS ISO 6492, 2000).

*Ukupan sadržaj celuloze* određen je na uređaju za ekstrakciju vlakana prema proceduri proizvođača (CSF6, uređaj za vakum filtraciju, VELP) i u skladu sa odgovarajućom metodom (AOAC 978.10, 2000).

Sve analize su urađene u dve probe u svakom uzorku, a srednja vrednost je izračunata i izražena u % (w/w)/suve materije.

## **STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

### **Deskriptivna statistika**

Deskriptivna statistika je upotrebljena za kvantitativnu analizu ispitivanih osobina kako bi se opisali podaci i sagledali njihovi međusobni odnosi. Univarijantna analiza je urađena da bi se utvrdila raspodela promenljivih, uključujući centralnu tendenciju (srednje vrednosti) i disperziju (opsezi, standardne devijacije i varijanse).

Rezultati su interpretirani na osnovu Tukey-evog HSD testa, na nivou značajnosti  $p < 0,05$ , pri nivou poverenja od 95%. Tukey-ev HSD (*honestly significant distance*) test pokazuje koliko treba da su udaljene bilo koje dve srednje vrednosti da bi bile statistički različite. Za razliku dve srednje vrednosti veću od standardne devijacije (SD), ovim testom se dokazuje da je statistički značajna. Tukey-evim HSD testom podataka dobijenih različitim laboratorijskim merenjima, ustanovljeno je da je većina uzoraka statistički značajno različita na nivou  $p < 0,05$ . Dokazano je da su ispitivani uzorci dovoljno različiti da bi se pristupilo statističkoj analizi i matematičkom modelovanju.

Deskriptivna statistička analiza, uz pomoć *Microsoft Excel 2007 softvera*, primenjena je za izračunavanje srednjih vrednosti, standardne devijacije i varijanse promenljivih.

### **Klaster analiza (CA-Cluster Analysis)**

CA analiza se odnosi na ispitivane uzorke, koji se grupišu tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi. Računate su ukupne povezanosti tačaka, a rastojanja između tačaka u 13-dimenzionalnom koordinatnom prostoru su merena korišćenjem City-block (Manhattan) algoritma. City-block udaljenosti, koje se prikazuju na ordinatnoj osi grafika su merene kao srednje razlike između dimenzija različitih uzoraka. Merenje udaljenosti City-block algoritmom daje rezultate slične Euklidskom merenju, ali je to merenje pogodnije zato što je smanjen uticaj pojedinačnih velikih udaljenosti, jer se ne računaju kvadrati vrednosti pojedinačnih koordinata. Odgovarajuća grafička prezentacija rezultata ima izgled dendrograma. Na dobijenom grafiku je moguće odrediti optimalan broj klastera i videti hijerarhijski odnos između različitih grupa, odnosno varijabli.

### **Analiza glavnih komponentata (PCA- Principal Components Analysis)**

Termin analiza glavnih komponentata se odnosi na matematičku metodu za analizu podataka koja gradi linearne višeparametarske modele na osnovu kompleksnog seta podataka. PCA je višeparametarska matematička metoda u kojoj se ispituju korelacije između promenljivih, a na osnovu toga se broj promenljivih smanjuje i određuju se nove, faktorske koordinate. Ove transformacije (preslikavanja) koordinata izvode se

tako da prva faktorska koordinata pokriva najveću moguću varijansu sistema, a analiza se koristi da se obezbedi najveće moguće razdvajanje između grupa (klastera) koje definišu promenljive. Metoda prepoznavanja sličnosti među grupama uzoraka se ovde koristi za karakterizaciju i razdvajanje uzoraka na osnovu uočenih osobina uzoraka (tj. na osnovu eksperimentalnih merenja svih promenljivih veličina koje se pripisuju određenom uzorku). PCA omogućava značajno smanjivanje broja promenljivih, kao i detektovanje nekih strukturnih zavisnosti koje postoje između eksperimentalno merenih veličina i različitih uzoraka. "Auto - skaliranje" se vrlo često koristi za višeparametarsko poređenje različitih kompleksnih uzoraka hrane, pri čemu se uzorci ocenjuju (rangiraju) na osnovu srednje vrednosti i standardne devijacije grupe uzoraka. Pošto jedinice, kao ni skale različitih promenljivih koje opisuju poređene uzorke hrane nisu iste, potrebno je transformisati podatke svih merenja u tzv. standardne ocene, bezdimenzionalne vrednosti koje se dobijaju iz srednje vrednosti eksperimentalnih (merenih) vrednosti određene veličine za dati uzorak, podeljene sa standardnom devijacijom grupe uzoraka, prema jednačini:

$$\text{Standardna ocena} = (x - \mu) / \sigma$$

pri čemu je  $x$  mereni podatak,  $\mu$  srednja vrednost grupe podataka, i  $\sigma$  standardna devijacija.

Celokupan skup podataka se uvodi u PCA analizu u obliku "auto-skalirane" matrice (Prior i sar., 2005; Sun & Tanumihardjo, 2007). PCA ortogonalno transformiše eventualno korelisane podatke u skup linearno nekorelisanih promenljivih (glavne komponente). Rezultati PCA analize se obično tumače na osnovu doprinosa (engl. score) promenljivih u komponentama. PCA je najzastupljenija multivarijaciona analiza koja otkriva međusobni odnos podataka na način koji najbolje objašnjava njihovu varijansu. CA i PCA su urađene primenom *StatSoft Statistica 10* programa.



## REZULTATI I DISKUSIJA

### KARAKTERISTIKE MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE TOKOM PERIODA LAKTACIJE

#### HEMIJSKI SASTAV

Mleko magarice balkanske rase analizirano je tokom perioda laktacije, a rezultati su prikazani u tabeli 15.

pH mleka tokom perioda laktacije, kreće se u intervalu od 6,99 (45. dana laktacije) do 7,64 (200. dana laktacije). Prosečna pH vrednost mleka magarice balkanske rase je 7,24 i veća je od pH vrednosti kravljeg mleka (6,6-6,7). Navedeni podaci mogu se objasniti činjenicom da mleko magarice ima niži sadržaj kazeina u odnosu na kravlje mleko (Salimei i sar., 2004; Constanzo, 2013).

Sadržaj proteina mleka najveći je na početku laktacije i kreće se od 1,83% do 1,92% (45-60. dan). Tokom laktacije sadržaj proteina opada i dostiže vrednost 1,40% (280. dan).

Prosečan sadržaj proteina mleka magarice balkanske rase je 1,63% i u skladu je sa literaturnim podacima koji iznose redom: 1,61% (Guo i sar.2007); 1,59% (Ivanković i sar. 2009); 1,63% (D'Alessandro i sar. 2011 a, b) za Marina Franca i Primorsko-Dinarsku rasu. Međutim, vrednosti su nešto niže u poređenju sa sadržajem proteina kod rase Ragusana 1,71% (Salimei i sar., 2004) i 1,90% (Giosue i sar., 2008).

Srednja vrednost sadržaja mlečne masti raste sa periodom laktacije i dostiže najveću vrednost 1,06% 100. dana laktacije, nakon čega opada do 170. dana kada dostiže najmanju vrednost 0,47%. Široka varijabilnost u sadržaju mlečne masti mleka magarice balkanske rase u skladu je sa literaturnim podacima (Salimei i sar., 2004; Guo i sar.,

2007; D'Alessandro i sar., 2011 a, b). Trend naglog povećanja sadržaja mlečne masti oko 100. dana laktacije uočen je za rasu Jiangqu Guo i sar. (2007).

Tabela 15. Hemijski sastav mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

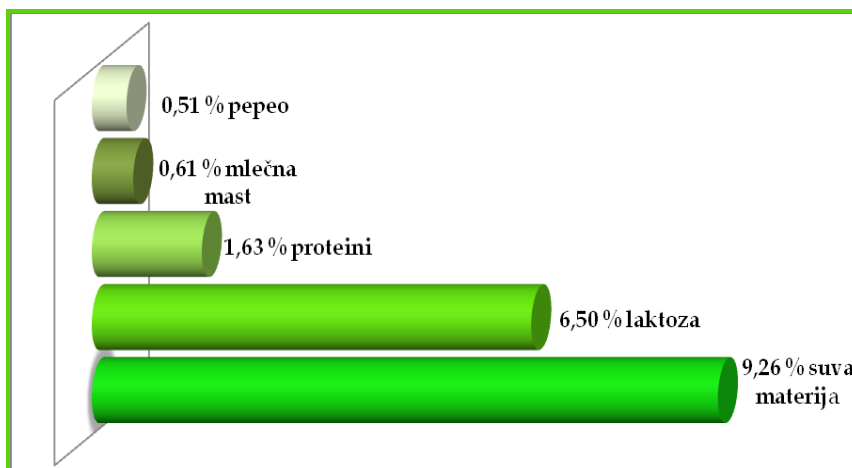
Dani laktacije	Hemijski sastav							
	pH	SM (%)	PR (%)	MM (%)	L (%)	PE (%)	vit. C (µg/ml)	EV (kJ/100ml)
45	6,99 <sup>a</sup> ±0,11	9,00 <sup>a</sup> ±0,11	1,83 <sup>g</sup> ±0,11	0,45 <sup>b</sup> ±0,11	6,30 <sup>e</sup> ±0,11	0,42 <sup>ad</sup> ±0,11	23,51 <sup>b</sup> ±0,11	154,86 <sup>a</sup> ±0,37
60	7,40 <sup>bcd</sup> ±0,05	9,36 <sup>b</sup> ±0,11	1,92 <sup>h</sup> ±0,11	0,50 <sup>a</sup> ±0,11	6,48 <sup>a</sup> ±0,11	0,46 <sup>a</sup> ±0,11	25,90 <sup>i</sup> ±0,11	161,30 <sup>b</sup> ±0,37
80	7,11 <sup>ab</sup> ±0,04	8,98 <sup>a</sup> ±0,11	1,73 <sup>f</sup> ±0,11	0,52 <sup>a</sup> ±0,11	6,34 <sup>f</sup> ±0,11	0,38 <sup>c</sup> ±0,11	33,67 <sup>i</sup> ±0,11	156,43 <sup>e</sup> ±0,71
100	7,00 <sup>a</sup> ±0,01	9,74 <sup>e</sup> ±0,11	1,70 <sup>f</sup> ±0,11	1,06 <sup>f</sup> ±0,11	6,39 <sup>g</sup> ±0,11	0,47 <sup>a</sup> ±0,11	24,46 <sup>g</sup> ±0,11	176,75 <sup>g</sup> ±0,37
125	7,10 <sup>ab</sup> ±0,05	9,00 <sup>a</sup> ±0,11	1,64 <sup>b</sup> ±0,11	0,59 <sup>c</sup> ±0,11	6,14 <sup>e</sup> ±0,11	0,60 <sup>b</sup> ±0,11	23,55 <sup>f</sup> ±0,11	154,09 <sup>a</sup> ±0,71
150	7,22 <sup>abc</sup> ±0,03	8,81 <sup>d</sup> ±0,11	1,62 <sup>b</sup> ±0,11	0,50 <sup>a</sup> ±0,11	6,11 <sup>d</sup> ±0,11	0,60 <sup>b</sup> ±0,11	23,42 <sup>d</sup> ±0,11	150,93 <sup>d</sup> ±0,03
170	7,52 <sup>cd</sup> ±0,30	8,50 <sup>c</sup> ±0,11	1,49 <sup>a</sup> ±0,11	0,47 <sup>b</sup> ±0,11	5,79 <sup>b</sup> ±0,11	0,76 <sup>f</sup> ±0,11	25,16 <sup>h</sup> ±0,11	141,15 <sup>c</sup> ±0,71
200	7,64 <sup>d</sup> ±0,04	9,36 <sup>b</sup> ±0,02	1,50 <sup>a</sup> ±0,11	0,50 <sup>a</sup> ±0,11	6,85 <sup>i</sup> ±0,11	0,52 <sup>e</sup> ±0,11	19,01 <sup>c</sup> ±0,11	160,45 <sup>b</sup> ±0,71
230	7,13 <sup>ab</sup> ±0,11	9,86 <sup>f</sup> ±0,11	1,45 <sup>d</sup> ±0,11	0,68 <sup>d</sup> ±0,11	7,26 <sup>a</sup> ±0,11	0,47 <sup>a</sup> ±0,11	11,62 <sup>b</sup> ±0,11	173,23 <sup>f</sup> ±0,71
280	7,28 <sup>abc</sup> ±0,04	9,99 <sup>g</sup> ±0,11	1,40 <sup>c</sup> ±0,11	0,86 <sup>e</sup> ±0,11	7,28 <sup>a</sup> ±0,11	0,45 <sup>a</sup> ±0,11	8,59 <sup>a</sup> ±0,11	179,38 <sup>h</sup> ±0,37

<sup>a-i</sup> - u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa)  
skraćenice: SM-suva materija; PR-proteini, MM-mlečna mast; L-laktoza; PE-pepeo; vit. C-vitamin C; EV-energetska vrednost

Iz tabele 15 je evidentno da sadržaj laktoze u mleku magarice tokom laktacije varira i kreće se od 5,79% (170. dana) do 7,28% (280. dana). Prosečan sadržaj laktoze iznosi 6,50% (slika 9) i u skladu je sa vrednostima laktoze u drugim istraživanjima (Salimei i sar., 2004; Guo i sar., 2007; Giosue i sar., 2008; Ivanković i sar., 2009; D'Alessandro i sar., 2011 a,b).

Iz tabele 15 se dalje može uočiti da je u mleku magarice sadržaj suve materije, proteina, mlečne masti, laktoze i energetske vrednosti izuzetno nizak 170. dana laktacije, dok prosečan sadržaj pepela dostiže maksimalnu vrednost i iznosi 0,76%. Sadržaj pepela počinje kontinualno da opada nakon 170. dana do kraja laktacije. Generalno, krajem laktacije (nakon 200. dana) sadržaj suve materije, mlečne masti i laktoze se povećava, što je praćeno opadanjem sadržaja proteina i pepela. Trend variranja energetske

vrednosti mleka magarice najviše je uzrokovana promenama sadržaja suve materije i sadržaja mlečne masti, što je u saglasnosti sa Guo i sar. (2007). Mleko magarice je digestibilna hrana niske energetske vrednosti pogodna za potrošače sa specifičnim zahtevima u ishrani, kao što su sportisti i stariji ljudi (Cavallarin i sar., 2015).



Slika 9. Prosečan hemijski sastav mleka magarice balkanske rase

Vrednost prosečnog sadržaja vitamina C povećava se od 45-80. dana, kada dostiže maksimalnu vrednost 33,67 µg/ml, nakon čega sadržaj vitamina C u mleku magarice opada do kraja laktacije. U literaturnim padacima sadržaj vitamina C u mleku magarice Abyssinian rase analizirao je samo Tadesse (2010) i takođe utvrdio visok sadržaj vitamina C 31,5 µg/mL.

Sadržaji minerala mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije prikazani su u tabeli 16.

Praćenjem sadržaja minerala Ca, P, Mg, Na, K i Zn u mleku magarice balkanske rase, uočava se isti trend promena. Sadržaj svih minerala povećava se tokom laktacije i dostiže maksimalnu vrednost tokom 170. dana, nakon čega sadržaj minerala opada do kraja laktacionog perioda. U mleku magarice sadržaj minerala opada sledećim redom  $Ca > K > P > Na > Mg > Zn$ .



Tabela 16. Mineralni sastav mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

Dani laktacije	Sadržaj minerala (mg/100ml)					
	Ca	P	Mg	Na	K	Zn
45	133,92 <sup>ab</sup> ±4,25	36,81 <sup>c</sup> ±1,53	5,62 <sup>b</sup> ±0,32	23,13 <sup>a</sup> ±1,28	123,10 <sup>bce</sup> ±2,79	0,34 <sup>a</sup> ±0,05
60	140,87 <sup>abc</sup> ±8,66	40,39 <sup>cd</sup> ±2,09	6,05 <sup>ab</sup> ±0,15	28,40 <sup>abde</sup> ±2,47	118,18 <sup>abc</sup> ±1,64	0,34 <sup>a</sup> ±0,03
80	156,85 <sup>bcd</sup> ±6,40	50,16 <sup>ab</sup> ±3,44	7,97 <sup>cd</sup> ±0,16	34,47 <sup>bc</sup> ±4,32	117,02 <sup>abc</sup> ±2,13	0,38 <sup>ab</sup> ±0,02
100	161,15 <sup>cd</sup> ±6,30	46,36 <sup>ab</sup> ±3,34	6,58 <sup>a</sup> ±0,18	31,49 <sup>bcdde</sup> ±1,79	109,47 <sup>abd</sup> ±5,94	0,42 <sup>abcd</sup> ±0,03
125	178,84 <sup>de</sup> ±2,47	55,29 <sup>b</sup> ±1,10	8,85 <sup>e</sup> ±0,41	32,88 <sup>bce</sup> ±1,71	124,82 <sup>ce</sup> ±4,68	0,49 <sup>cde</sup> ±0,01
150	187,84 <sup>e</sup> ±10,32	52,18 <sup>ab</sup> ±1,25	8,58 <sup>de</sup> ±0,38	33,33 <sup>bc</sup> ±5,45	113,47 <sup>abc</sup> ±11,50	0,48 <sup>bcdde</sup> ±0,07
170	224,06 <sup>f</sup> ±6,74	62,25 <sup>e</sup> ±2,61	9,76 <sup>f</sup> ±0,27	36,17 <sup>c</sup> ±1,10	135,45 <sup>e</sup> ±4,19	0,57 <sup>e</sup> ±0,02
200	156,71 <sup>bcd</sup> ±6,52	49,19 <sup>ab</sup> ±1,05	7,77 <sup>c</sup> ±0,19	25,44 <sup>ade</sup> ±1,30	109,71 <sup>abd</sup> ±3,43	0,50 <sup>de</sup> ±0,04
230	125,26 <sup>a</sup> ±3,16	47,25 <sup>a</sup> ±2,87	6,64 <sup>a</sup> ±0,07	24,81 <sup>ad</sup> ±1,50	104,65 <sup>ad</sup> ±2,06	0,39 <sup>abc</sup> ±0,02
280	118,37 <sup>a</sup> ±4,47	39,35 <sup>c</sup> ±0,78	6,01 <sup>ab</sup> ±0,18	23,33 <sup>a</sup> ±0,127	98,39 <sup>d</sup> ±1,23	0,38 <sup>ab</sup> ±0,02

<sup>a-d</sup> - u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa)

skraćenice: SM-suva materija; PR-proteini, MM-mlečna mast; L-laktoza; PE-pepeo; vit. C-vitamin C; EV-energetska vrednost

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju su znatni veći sa užim opsegom variranja sadržaja (osim sadržaja P) od rezultata dobijenih za Italijanske rase (Salimei i sar., 2004; Fantuz i sar., 2009; Salimei & Fantuz, 2012; Bilandžić i sar., 2014). Imajući u vidu značaj minerala u ishrani životinje, može se reći da je veći sadržaj minerala zabeležen u prvoj polovini perioda laktacije povezan je jedinim izvorom minerala potrebnim za rast životinje tokom ishrane, mlekom (Salimei i sar., 2004; Guo i sar., 2007). Trend smanjenja sadržaja Ca, P i Mg tokom laktacije može se objasniti činjenicom da se smanjuje sadržaj azota (proteina) i kazeina tokom laktacije u mleku magarice (Giosuè i sar., 2008; 200 i sar., 2009), kao i da se tokom letnje sezone u ishrani životinja smanjuje sadržaj navedenih minerala (Miraglia&Martin-Roset, 2006).

Iz tabele 17 vidi se da je sadržaj pepela u mleku magarice u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem Ca, P, Mg i Zn ( $p < 0,01$ ). Sadržaj Ca u mleku magarice je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem P, Mg, Na i Zn ( $p < 0,01$ ), kao i sa sadržajem K ( $p < 0,05$ ). Sadržaj P je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem Mg, Na i Zn ( $p < 0,01$ ), dok je sadržaj Mg u mleku

magarice u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem Na i Zn ( $p < 0,01$ ). Generalno, u mleku magarice balkanske rase uočena je pozitivna korelacija između minerala tokom laktacije, što je potvrđeno i u istraživanju Salimei & Fantuz (2012), osim za odnos između minerala Ca i Na za Italijansku rasu Martina Franca. Jaka korelacija između Ca, P i Mg objašnjava se asocijacijom ovih minerala u kazeinskoj miceli (Giosuè i sar., 2008; Fantuz i sar., 2009, 2011). Sadržaj suve materije u mleku magarice u pozitivnoj korelaciji sa laktozom ( $p < 0,01$ ) i sadržajem mlečne masti ( $p < 0,05$ ).

Tabela 17. Koeficijenti korelacije između sadržaja makro- i mikrokomponentata mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

	MM	L	PE	Ca	P	Mg	Na	K	Zn
SM	0,78*	0,88 <sup>+</sup>	-0,58**	-0,79 <sup>+</sup>	-0,60**	0,71*	0,66*	0,88**	0,50
PE				0,86 <sup>+</sup>	0,81 <sup>+</sup>	0,80 <sup>+</sup>	0,55**	0,58**	0,90 <sup>+</sup>
Ca					0,89 <sup>+</sup>	0,90 <sup>+</sup>	0,85 <sup>+</sup>	0,73*	0,85 <sup>+</sup>
P						0,97 <sup>+</sup>	0,80 <sup>+</sup>	0,54	0,89 <sup>+</sup>
Mg							0,80 <sup>+</sup>	0,57	0,88 <sup>+</sup>
Na								0,59**	0,57**

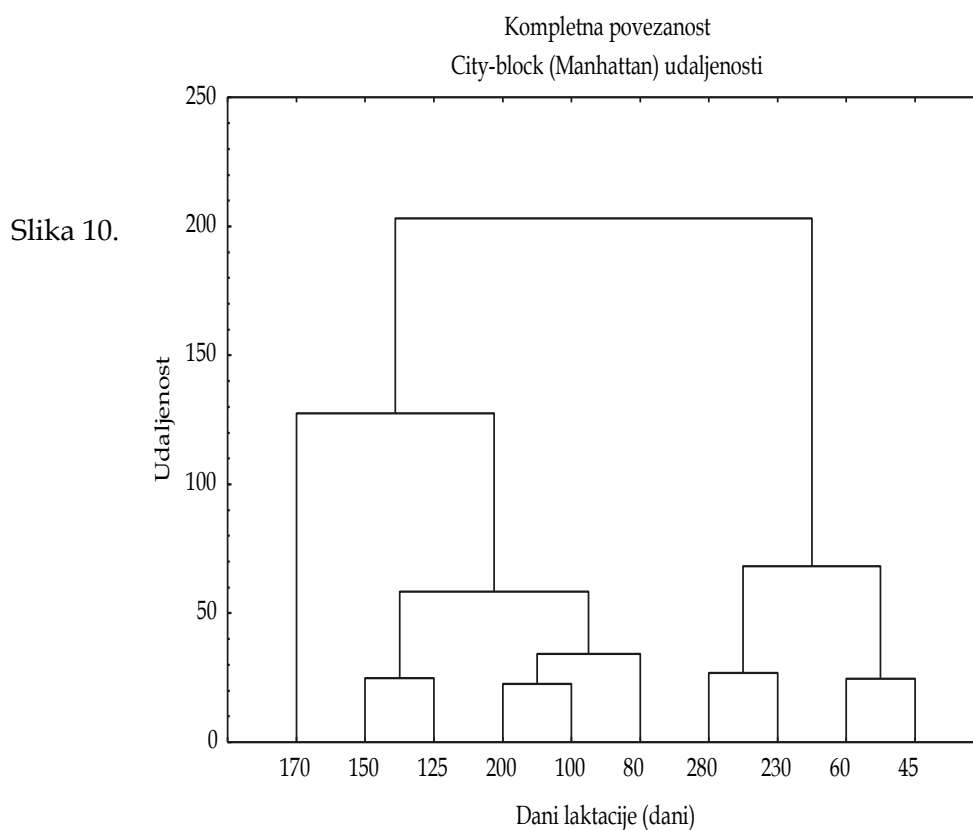
\*korelacija statistički značajna na nivou  $p < 0,01$ ; \*statistički značajna na nivou  $p < 0,05$ ; \*\*statistički značajna na nivou  $p < 0,10$ ; neoznačene korelacije nisu statistički značajne  
Skraćenice: SM-suva materija, MM-mlečna mast, PE-pepeo

### Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) hemijskog i mineralnog sastava mleka magarice balkanske rase

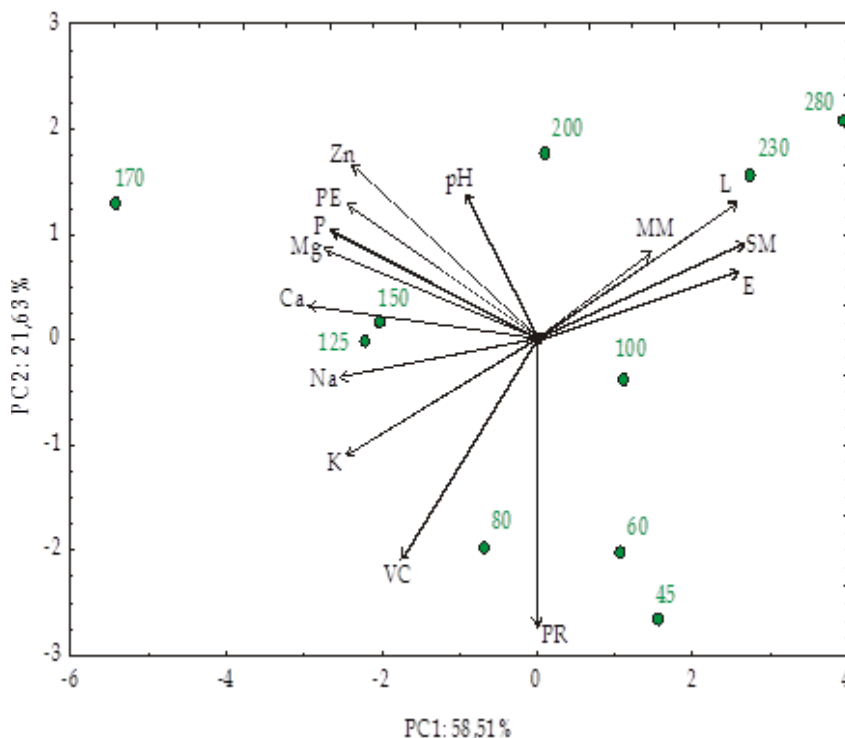
Slika 10 prikazuje dendogram za klaster analizu ispitanih uzoraka, koji su grupisani tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi. Dendogram prikazuje CA analizu za uzorke mleka tokom laktacije, za korišćene parametre kvaliteta (pH, suva materija, protein, mlečna mast, laktoza, pepeo, vitamin C, Ca, P, Mg, Na, K i Zn). Na dendogramu se primećuju dva odvojena klastera: desni koji obuhvata uzorke za 45., 60., 230. i 280. dan laktacije (koji imaju povećane vrednosti suve materije, mlečne masti i laktoze), i levi klaster koji obuhvata uzorke za 80., 100., 125., 150., 170. i 200. dan laktacije. Ova poslednja grupa uzoraka ima povećane vrednosti sadržaja minerala. Takođe, na biplot slici 10 uočava se da su uzorci koji imaju veći sadržaj suve materije, mlečne masti i laktoze na desnoj strani grafika (uzorci mleka magarice 45., 60., 230. i

280. dan laktacije), dok uzorci na levoj strani grafika imaju veći sadržaj minerala (80., 100., 125., 150., 170. i 200. dan laktacije).

Kvalitativni rezultati za PCA (slika 11) analizu pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 80,14% ukupne varijanse. Promenljive suva materija koja pokazuje 10,58% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije i laktoza (9,82%) su imale najizraženiji pozitivni uticaj na računanje prve glavne komponente. Dok ostali parametri: sadržaj PE pokazuje 8,92% (ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), Ca (12,77%), P(10,41%), Mg (11,3%), Na (9,56%), K (9,06%) i Zn (8,45%) imale su najizraženiji negativni uticaj na računanje prve glavne komponente. Najizraženiji pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu imale su promenljive pH (koja pokazuje 8,02% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije) i sadržaj Zn (10,92%), a najvažniji negativan uticaj na drugu glavnu komponentu imale su promenljive sadržaj proteina (30,49%) i vitamin C (17,56% od ukupne varijanse).



Dendrogram sličnosti hemijskog i mineralnog sastava uzoraka mleka magarice balkanske rase tokom laktacije za CA analizu



Slika 11. Biplot grafik za PCA analizu hemijskog sastava mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

Skraćenice: SM-suva materija; PR-proteini, MM-mlečna mast, L-laktoza, PE-pepeo, VC-vitamin C, E-energetska rednost

## PROFIL PROTEINA

Na slici 12 prikazana je slika gela sa molekulskim masama (kDa) i koncentracijama identifikovanih frakcija proteina mleka magarice balkanske rase 45. i 280. dana laktacije.

Proteinske frakcije kazeina mleka magarice identifikovane su na molekulskim masama ~30,3 kDa ( $\alpha_1$ -kazein) i ~26,7-27,0 kDa ( $\alpha_2$ -kazein). Rezultati istraživanja pokazali su da frakcija  $\beta$ -kazeina ima 2 genetske varijante. To su  $\beta$ -kazeina A čija molekulska masa iznosi 16-16,7 kDa i  $\beta$ -kazeina F molekulske mase 34,5-35,0 kDa. Od rastvorljivih proteina surutke mleka magarice identifikovana je genetska varijanta  $\alpha$ -laktalbumin C - molekulske mase 12 kDa i varijanta A čija molekulska masa iznosi 17,7 kDa. Frakcija  $\beta$ -laktoglobulina je na oko 19,6 kDa, a serum albumina 66,0 kDa. Glavni antimikrobni proteini identifikovani u mleku su imunoglobulin 37-38 kDa, laktoferin 74-78 kDa i lizozim 14,7-15,0 kDa. Rezultati Lab-on-a chip kapilarne elektroforeze mleka magarice balkanske rase pokazali su frakcije proteina slične rezultatima iz literature (Polidori i

sar., 2012; Salimei i sar., 2004; Vincenzetti i sar., 2008; Nazzaro i sar., 2010; Criscione i sar., 2009).

Proteini	Mw (kDa)	45. dan	45. dan	280. dan	280. dan
		c (mg/l)	LoaC gel slika	c (mg/l)	
Laktoferin	74,0-78,0	41,45		5,15	
Serum albumin	66,0	113,15		140,70	
Immunoglobulin	37,0-38,0	47,60		9,30	
$\beta$ -kazein F	34,5-35,0	84,20		13,00	
$\alpha_{S1}$ -kazein	30,3	1160,00		730,00	
$\alpha_{S2}$ -kazein	26,7-27,0	110,80		74,35	
$\beta$ -laktoglobulin	19,6	260,20		163,00	
$\alpha$ -laktalbumin A	17,7	3090,00		2240,00	
$\beta$ -kazein A	16,0-16,7	55,53		38,87	
Lizozim	14,7-15,0	2970,00		1040,00	
$\alpha$ -laktalbumin C	12,0	2730,00	1990,00		

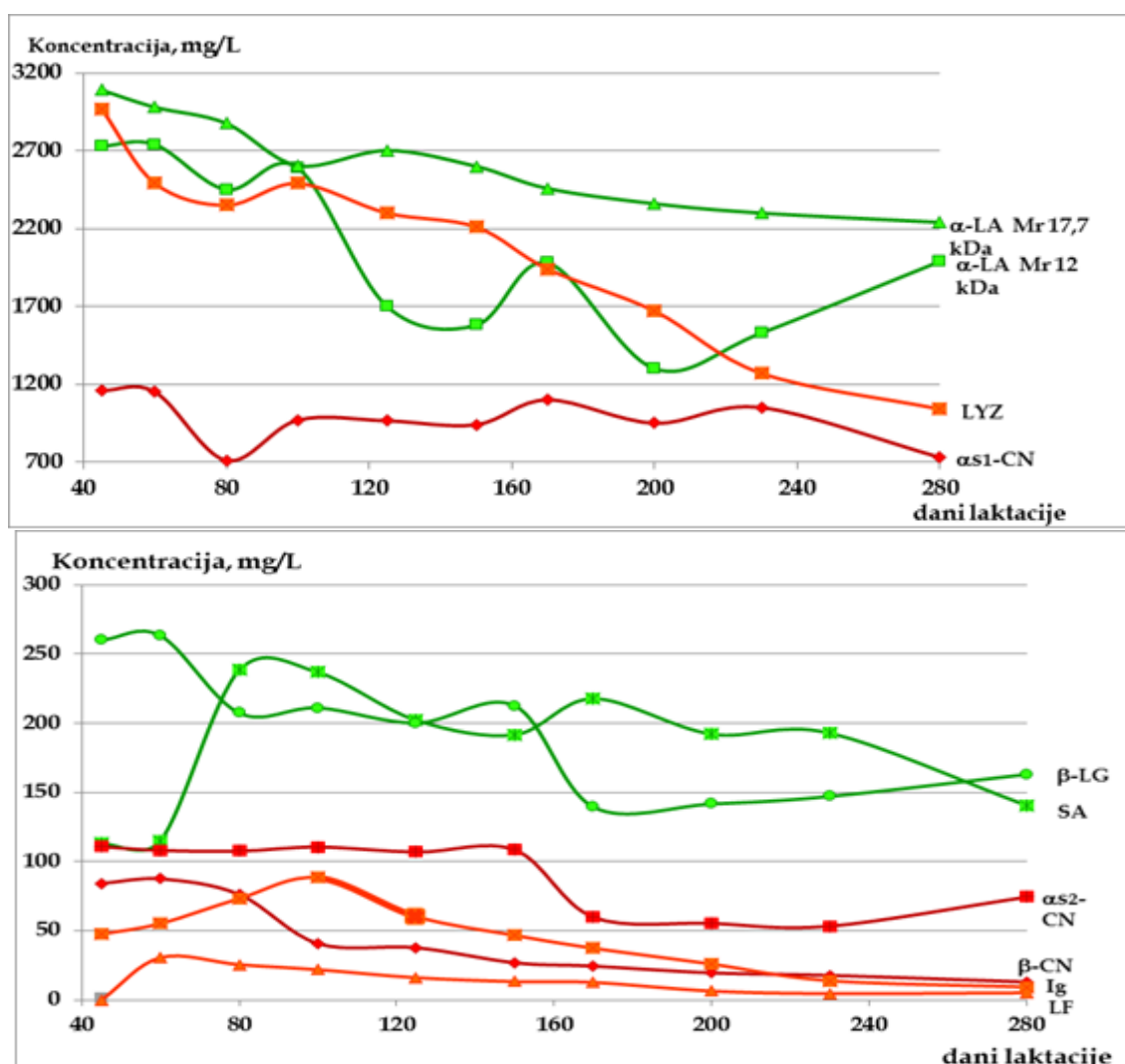
Slika 12. Simulirana slika gela frakcija proteina mleka magarice 45. i 280. dana laktacije dobijena primenom automatske kapilarne elektroforeze

Skraćenice: Mw-molekulska masa

Koncentracije identifikovanih frakcija proteina u mleku magarice balkanske rase tokom perioda laktacije prikazani su na slici 13. Trend sadržaja  $\alpha_{S1}$ -kazeina pokazao je visoku varijabilnost i sadržaj se kretao od 1160 do 730 mg/l, dok se sadržaj  $\alpha_{S2}$ -kazeina kretao od 110 do 74 mg/l. Sadržaj  $\alpha_{S1}$ -kazeina imao je trend znatnog opadanja od 60. dana do 150. dana, u poređenju sa  $\alpha_{S2}$ -kazeinom čiji sadržaj je počeo da opada nakon 150. dana i trajao je do kraja laktacije. Sadržaj  $\beta$ -kazeina značajno opada od početka do kraja laktacije (od 84 do 13 mg/l). Korišćenjem masene spektrometrije i tačne hromatografije visoke performanse u nekim uzorcima mleka magarice nisu detektovali prisustvo  $\alpha_{S1}$ -kazeina, dok je sadržaj  $\alpha_{S2}$ -kazeina bio prisutan u svim analiziranim uzorcima mleka Criscione i sar. (2009). Razlika u frakcijama primarne strukture  $\alpha_{S1}$ -kazeina mleka

magarice i kravljeg mleka je 43% i jedan je od razloga niskog alergijskog svojstva mleka magarice (Cunsolo i sar. ,2009).

Sadržaj  $\alpha$ -laktalbumina kreće se od 3090 mg/l na početku do 1990 mg/l krajem laktacione faze, sa izrazitim trendom variranja tokom perioda laktacije. U našem istraživanju  $\alpha$ -laktalbumin je dominantna proteinska frakcija u mleku magarice balkanske rase u odnosu na druge kvanifikovane frakcije. Prema literaturnim istraživanjima sadržaj  $\alpha$ -laktalbumina u mleku magarice kreće se od 800 mg/l do 2700 mg/l (Vincenzetti i sar., 2008; Tidona i sar., 2011 ).



Slika 13. Trend koncentracija frakcija proteina mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije

Skraćenice:  $\alpha$ 1-CN- $\alpha$ 1-kazein,  $\alpha$ 2-CN- $\alpha$ 2-kazein,  $\beta$ -CN-  $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -LA- $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -LG-  $\beta$ -laktoglobulin,LYZ-lizozim, LF-laktoferin, SA-serum albumin, Ig-imunoglobulini

U mleku  $\alpha$ -laktalbumin je otporan na gastrointestinalne enzime u organizmu, i u sprovedenom *in vitro* istraživanju sa humanim enzimima približno 95%  $\alpha$ -laktalbumina je ostalo nepromenjeno, što je slično sa kobiljim, kravljim i humanim mlekom (Inglistad i sar., 2010; Tidona i sar., 2011).

Sadržaj  $\beta$ -laktoglobulina varira od 139 mg/l do 263 mg/l, a koncentracija se smanjuje nakon 60. dana i 150. dana laktacije. Iako je  $\beta$ -laktoglobulin generalno otporan na gastrointestinalne enzime, u ispitivanjima simulirane *in vitro* digestije mleka magarice, autori su došli do saznanja da se 70%  $\beta$ -laktoglobulina mleka magarice razgrađuje, dva puta više u odnosu na kravlje mleko (Inglistad i sar. 2010; Tidona i sar. 2011). Takođe, dokazano je i da se  $\beta$ -laktoglobulin kobiljeg mleka brže razgrađuje u odnosu na  $\beta$ -laktoglobulin kravljeg i kozjeg mleka (Tidona i sar., 2011).

Sadržaj serum albumina kreće se od 113 mg/l do 238 mg/l i pokazuje trend ka konstantnoj vrednosti tokom srednjeg perioda laktacije.

Sadržaj lizozima identifikovan u mleku magarice balkanske rase kreće se od 1040 mg/l do 2970 mg/l. Sadržaj lizozima je stabilan tokom različitih faza laktacije a značajno se smanjuje nakon 150. dana. Mleko magarice je poznato kao bogat izvor lizozima 1000 mg/l (Vincenzetti i sar., 2008) i prisutan je u većoj koncentraciji nego u humanom 400mg/l i kravljem mleku 130mg/l, dok je sadržaj veoma sličan kobiljem mleku 400-1000 mg/l (Floris i sar., 2003; Alabiso i sar., 2009 a, b). Šarić i sar. (2014) su ispitivali antibakterijska svojstva sirovog mleka magarice, odnosno proteinskih frakcija lizozima i laktoferina. Utvrđeno je da lizozim deluje kao prirodni konzervans i inhibira rast velikog broja bakterija. Visoko antimikrobno dejstvo lizozima daje mleku magarice dug prirodni rok trajanja čime se postiže baktericidno dejstvo na potencijalne patogene bakterije i mikroorganizme (Zhang i sar., 2008; Nazzaro i sar., 2010) .

Laktoferin i imunoglobulin su frakcije sa najmanjim udelom u mleku magarice. Sadržaj laktoferina se kreće od 87-13 mg/l i značajno opada tokom laktacije (pokazuje sličan trend kao  $\beta$ -kazein). Imunoglobulin ima trend rasta i maksimalnu vrednost dostiže 100. dana (88,3 mg/l) nakon čega se sadržaj smanjuje. Prema istraživanjima Guo i sar. (2007) sadržaj imunoglobulina ima trend porasta tokom celog perioda laktacije (15-180. dana). Funkcija imunoglobulina je da inhibira rast različitih mikroorganizama i da doprinose imunitetu životinje i čoveka. Često se koristi argument za pripisivanje

pozitivnim efektima imunoglobulina različitih vrsta mleka ili konzumiranju sirovog mleka (Claeys i sar., 2014). Visok sadržaj zaštitnih antimikrobnih jedinjenja lizozima, laktoferina i imunoglobulina u mleku magarice balkanske rase, kao i visoka digestibilnost proteina surutke, posebno tokom ranog i srednjeg perioda laktacije, objašnjava se blagotvorni uticaj na zdravlje i imuni sistem dece i odraslih. U mleku magarice balkanske rase najzastupljenije proteinske frakcije su  $\alpha$ -laktalbumin i lizozim. (Salimei i sar. 2004; Guo i sar. 2007). Primenom SDS-PAGE elektroforeze, takođe su zaključili da su proteini surutke kao što su  $\beta$ -laktoglobulin, lizozim i  $\alpha$ -laktalbumin najzastupljeniji u mleku magarice Italijanske rase (Polidori & Vincenzetti, 2012).

Na osnovu dobijenih rezultata prosečna vrednost sadržaja kazeina u mleku magarice balkanske rase tokom laktacije je oko 39,95% u odnosu na ukupne proteine. Sadržaj proteina surutke iznosi oko 58,94%, dok je prosečna vrednost odnosa kazeina i proteina surutke 0,68. Prema literaturnim podacima (Polidori & Vincenzetti, 2012). pored velike razlike u prosečnom sadržaju ukupnih proteina u kravljem mleku 3,20% u odnosu na 2,20% u mleku magarice, odnos kazein:proteini surutke je izuzetno različit i iznosi 80:20 u kravljem mleku a u mleku magarice iznosi 58:42.

Tabela 18. Koeficijenti korelacije između proteinskih frakcija mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

	$\beta$ -CN	$\alpha$ -LA C	$\alpha$ -LA A	$\beta$ -LG	LYZ	LF	Ig
$\alpha$ s <sub>2</sub> -CN	0,69*	0,63*	0,80+	0,89+	0,81+	0,75*	0,79+
$\beta$ -CN		0,83+	0,96+	0,86+	0,79+	0,94+	0,58**
$\alpha$ -LA C			0,74*	0,75*	0,65*	0,85+	0,59**
$\alpha$ -LA A				0,90+	0,91+	0,96+	0,65*
$\beta$ -LG					0,82+	0,89+	0,59**
LYZ						0,90+	0,80**
LF							0,61+

\*korelacija statistički značajna na nivou  $p < 0,01$ ; \*statistički značajna na nivou  $p < 0,05$ ; \*\*statistički značajna na nivou  $p < 0,10$ ; Skraćenice:  $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN- $\alpha$ s<sub>1</sub>-kazein,  $\alpha$ s<sub>2</sub>-CN- $\alpha$ s<sub>2</sub>-kazein,  $\beta$ -CN- $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -LA- $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -LG-  $\beta$ -laktoglobulin, LYZ-lizozim, LF-laktoferin, Ig-immunoglobulin i SA-serum albumin, Mw-molekulska masa

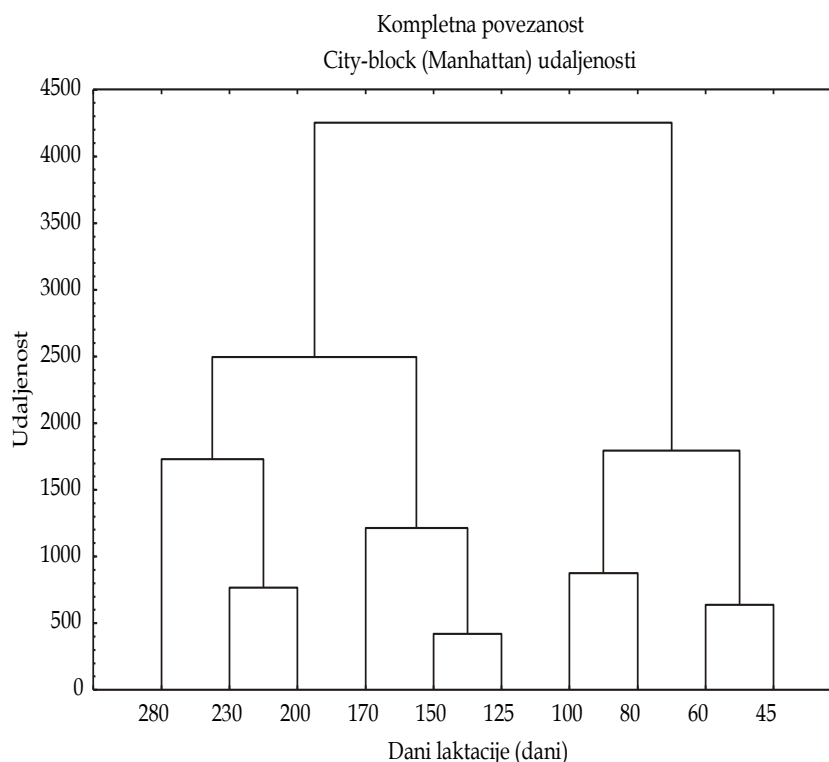


Udeo kazeina u mleku magarice Italijanske rase kreće se od 37,56 do 39,98%, dok je udeo proteina surutke od 53,03 do 57,06% od ukupnih proteina (Salimei i sar., 2004; Guo i sar., 2007). Prema literaturnim podacima odnos kazeina i proteina surutke može da varira u mleku magarice od 0,49 do 1,70 (Tidona i sar., 2011).

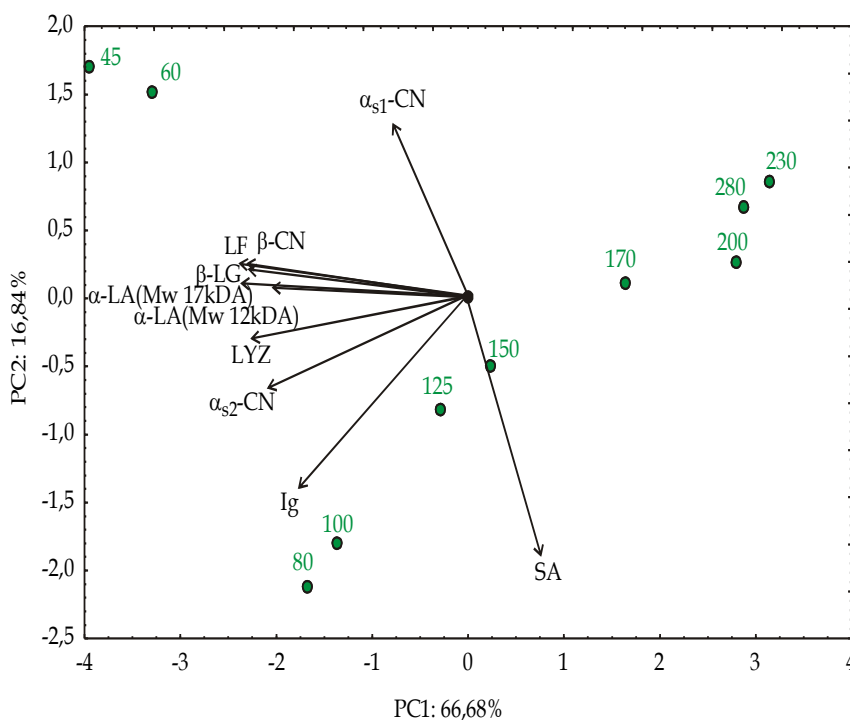
Iz tabele 18 može se uočiti da su frakcije proteina mleka magarice u međusobnoj pozitivnoj, visoko značajnoj korelaciji.

### Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) profila proteina mleka magarice balkanske rase

Slika 14 prikazuje dendogram za klaster analizu uzoraka mleka, koji su grupisani tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi. Dendogram pokazuje analizu za uzorke mleka pri laktaciji, za korišćene kriterijume ( $\alpha_1$ -kazein,  $\alpha_2$ -kazein,  $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, lizozim, laktoferin, imunoglobulin i serum albumin).



Slika 14. Dendogram sličnosti proteinskih frakcija mleka magarice balkanske rase tokom laktacije za CA analizu



Slika 15. Biplot za PCA analizu proteinskih frakcija mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

Na dendogramu se primećuju tri odvojena klastera: desni koji obuhvata uzorke za 45., 60., 80. i 100. dan laktacije, srednja grupa koja obuhvata uzorke za 125., 150. i 170. dan laktacije i levi klaster koji obuhvata uzorke za 200., 230. i 280. dan laktacije. Poslednja grupa uzoraka ima smanjene vrednosti sadržaja proteina. Uočena je znatna udaljenost između prvog i drugog dva klastera (oko 2000), dok udaljenost između drugog i trećeg klastera iznosi oko 500.

Kvalitativni rezultati za analizu glavnih komponentata (slika 15) pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 83,52% ukupne varijanse. Promenljive  $\alpha_{s2}$ -kazein (koja pokazuje 11,03% ukupne varijanse, računato na osnovu relativne korelacije),  $\beta$ -kazein (13,07%),  $\alpha$ -laktalbumin (10,54%/14,13%),  $\beta$ -laktoglobulin (13,39%), lizozim (12,85%), laktoferin (14,17%) i imunoglobulin (7,86%) su imale najizraženiji negativni uticaj na računanje prve glavne komponente.

Promenljiva  $\alpha_{s1}$ -kazein (21,14%), je imala najizraženiji pozitivan uticaj na računanje druge glavne komponente, a najizraženiji negativan uticaj na drugu glavnu komponentu su imale promenljive imunoglobulin (24,28%) i sadržaj serum albumina

(45,54%). Takođe, sa iste slike uočava se da uzorci koji imaju veći sadržaj  $\alpha$ <sub>2</sub>-kazein,  $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -laktalbumin, lizozim, laktoferin i imunoglobulin su na levoj strani slike (uzorci mleka magarice 45., 60., 80. i 100. dan laktacije).

## SASTAV MASNIH KISELINA

Tokom perioda laktacije analiziran je sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase.

Promene sadržaja masnih kiselina tokom perioda laktacije su prikazane u tabeli 19. Dominantne masne kiseline u svim uzorcima mleka tokom laktacije su oleinska (C18:1 n9) sa prosečnim udelom 22,50% i palmitinska (C16:0) sa udelom 18,72%. Mleko magarice balkanske rase sadrži najviše zasićenih (50,64%), mononezasićenih (27,21%) i polinezasićenih (15,47%) masnih kiselina. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa sastavom masnih kiselina za druge rase magarica (Chiofalo & Salimei, 2006; Gastaldi i sar., 2010), a slično je sastavu kobiljeg (Pikul i sar., 2008) i humanog mleka (Chiofalo i sar., 2004). Sadržaj zasićenih masnih kiselina u mleku magarice je značajno niži od sadržaja u mleku preživara (Chiofalo i sar, 2003).

Od zasićenih masnih kiselina sa većim udelom pored C16:0, zastupljene su redom kaprinska (C10:0), laurinska (C12:0), miristinska (C14:0) i kaprilna (C8:0). Prosečan sadržaj pojedinačnih zasićenih masnih kiselina sličan je rezultatima dobijenim kod mleka Italijanske rase Martina France (Matremucci i sar., 2012) i Amiata (Martini i sar., 2014, 2015), a niži od Ragusana rase (Chiofalo i sar., 2004). Dobijeni podaci istraživanja verovatno su rezultat razlike u rasi životinje i sastavu hrane za životinje (Matremucci i sar., 2012). U mleku magarice balkanske rase utvrđen je nizak sadržaj stearinske kiseline (C18:0), što je kod kobiljeg mleka pripisano niskom sadržaju stearinske kiseline u hrani za životinje i visokoj aktivnosti  $\Delta$ -desaturaze na konverziju C18:1n9 masne kiseline koja je dodatno ubrzana visokim sadržajem palmitoleinske (C16:0) masne kiseline (Doreau i sar., 2002). U grupi mononezasićenih masnih kiselina pored C18:1 n9, značajan udeo je palmitoleinske (C16:1 n7) kiseline, a u grupi polinezasićenih linolne (C18:2 n6) i  $\alpha$ -linoleinske (C18:3 n3) masne kiseline.

Mleko magarice balkanske rase pokazuje sličan sastav masnih kiselina u poređenju sa rezultatima ranijih istraživanja mleka magarice drugih rasa (Chiofalo i sar., 2003;2004; Matremucci i sar., 2012).

Iz rezultata u tabeli 19 može se videti da tokom laktacije u mleku magarice dolazi do opadanja sadržaja zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina od 45. dana do 100. dana, dok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina raste. Nakon 100. dana laktacije udeo zasićenih masnih kiselina raste, a sadržaj mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina blago opada do kraja perioda laktacije. Ispitivanjem sastava masnih kiselina mleka magarice rase Martina Franca tokom laktacije utvrđen je veći sadržaj zasićenih masnih kiselina i niži sadržaj polinezasićenih masnih kiselina na početku perioda laktacije (Matremucci i sar., 2012). Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina mleka magarice Martina Franca i Amiata rase, ima tendenciju porasta sredinom laktacije (Matremucci i sar., 2012; Martini i sar., 2015), što nije karakteristično za mleko magarice balkanske rase. Sadržaj esencijalne polinezasićene masne kiseline linolne (C18:2 n6), koja je od vitalnog značaja za fiziološki ciklus organizma, nalazi se u opsegu od 7,08%, na početku laktacije, do 9,69%, u drugoj polovini laktacionog perioda. Hrana za životinje (trava i detelina) sadrži visok udeo polinezasićenih masnih kiselina, posebno C18:2 n6 i C18:3 n3 (Dewhurst i sar., 2006). Iz grupe polinezasićenih masnih kiselina, udeo  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline (C18:3 n3) u mleku magarice balkanske rase tokom laktacije varira u intervalu od 5,85% do 7,83%. Visok sadržaj linolne i  $\alpha$ -linoleinske kiseline u mleku magarice, može se objasniti činjenicom da navedena rasa magarica ne pripada grupi preživara, odnosno pripada grupi monogastričnih životinja (*monogastric herbivore*) gde polinezasićene masne kiseline (linolna i  $\alpha$ -linoleinska kiselina) iz hrane prolaze nepromenjene kroz digestivni trakt životinje, odnosno iz tankog creva prelaze u krvotok i ugrađuju se u tkivo. Kod preživara, polinezasićene masne kiseline hrane (linolna i  $\alpha$ -linoleinska kiselina) mikrobnom biohidrogenacijom, prevode se u zasićenu masnu kiselinu (stearinsku), i oko 10% C18:2 n6 iz hrane je raspoloživa za ugradnju u tkivo (Wood i sar., 2008). (Williams, 2000, Constanzo, 2013).

Udeo esencijalnih masnih kiselina,  $\alpha$ -linoleinske (C18:3 n3) i linolne (C18:2 n6) u mleku magarice pokazuju visoke vrednosti u odnosu na mleko preživara (C18:3 n3 0,7-1%; C18:6 n6 1,8-2,1%) (Chiofalo i sar., 2006), ali su uporedive sa sadržajem u kobiljem mleku (C18:3 n3 5-19%; C18:6 n6 5-10%) (Tesse i sar., 2008; Tafaro i sar., 2007).

Mleko magarice balkanske rase je bogat izvor nezasićenih masnih kiselina, zbog odsustva izomerizacije i hidrogenacije masnih kiselina u crevima, pre apsorpcije i esterifikacije u krv (Chiofalo i sar., 2006). Značajno prisustvo nezasićenih masnih kiselina zajedno sa niskim aterogenim i trombogenim indeksom, čini mleko magarice veoma korisnom hranom u prevenciji kardiovaskularnih, autoimunih i inflamatornih bolesti (Polidori & Vincenzetti, 2012). Nekoliko studija je ukazalo da dodavanje  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline u ishrani ljudi utiče pozitivno na atopijski dermatitis (Chiofalo i sar., 2004, 2006).

Istraživanjima je utvrđeno da se u lipidima hrane odnos n6/n3 masnih kiselina kreće u opsegu od 15:1 do 16,7:1, a optimalno preporučeni odnos iznosi 1:1 do 5:1 (Simopoulos, 2002). Prosečan udeo nezasićenih masnih kiselina u mleku magarice balkanske rase 42,63%, veći je od sadržaja u mleku magarice rase Martina Franca 32,42% (Chiofalo i sar., 2003; 2004), i od sadržaja u mleku preživara 19-26% (Chiofalo i sar., 1996; 2001).

Prema istraživanjima koje su objavili Martini i sar. (2014) odnos nezasićenih/zasićenih masnih kiselina je 1 u mleku magarice Amiata rase i Martina Franca (Salimei & Fantuz, 2012) i sličan je vrednostima za humano mleko 1,4 (Francois i sar., 2003), a znatno viši nega kod mleka preživara 0,4 (Dewhurst i sar., 2006).

Tabela 19. Sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom 280 dana laktacije

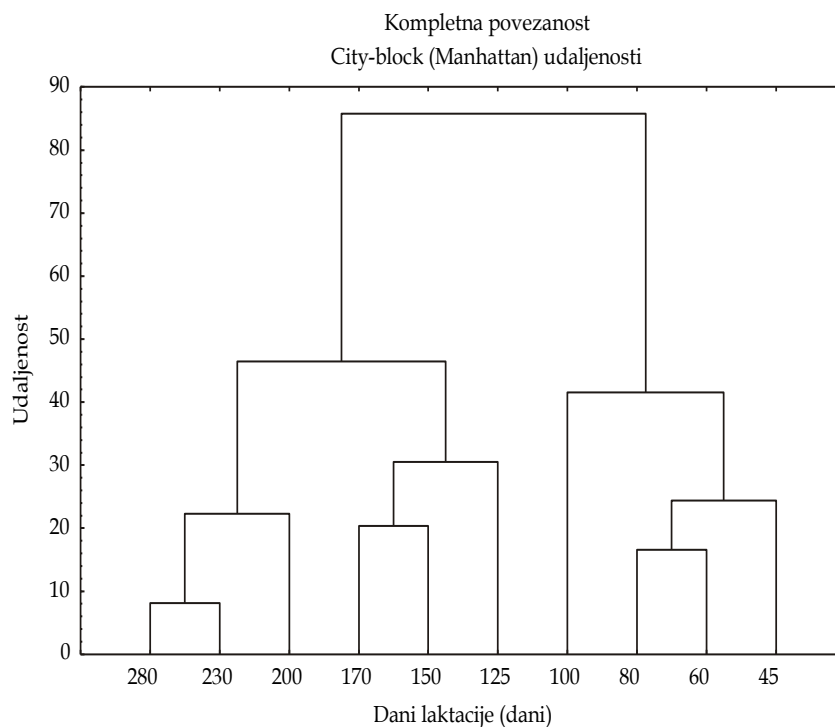
Masne kisljine	% od ukupnih masnih kiselina									
	45	60	80	100	125	150	170	200	230	280
<b>SFA</b>	41,51±0,06 <sup>f</sup>	34,18±0,12 <sup>d</sup>	37,53±0,66 <sup>e</sup>	46,27±0,52 <sup>a</sup>	47,14±0,62 <sup>a</sup>	52,22±0,57 <sup>b</sup>	56,21±0,34 <sup>b</sup>	61,14±0,18 <sup>g</sup>	63,92±0,39 <sup>c</sup>	63,32±0,51 <sup>c</sup>
C4:0	0,09±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,02 <sup>a</sup>	0,07±0,05 <sup>a</sup>	0,016±0,12 <sup>a</sup>	0,33±0,03 <sup>b</sup>	0,43±0,04 <sup>b</sup>	0,08±0,10 <sup>a</sup>	0,09±0,04 <sup>a</sup>
C6:0	0,17±0,01 <sup>b</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,19±0,03 <sup>b</sup>	1,15±0,00 <sup>a</sup>	0,34±0,03 <sup>d</sup>	1,22±0,03 <sup>ac</sup>	1,15±0,01 <sup>a</sup>	2,57±0,04 <sup>e</sup>	1,25±0,05 <sup>ac</sup>	1,32±0,11 <sup>c</sup>
C8:0	3,15±0,05 <sup>b</sup>	2,96±0,06 <sup>a</sup>	3,19±0,02 <sup>b</sup>	4,04±0,07 <sup>d</sup>	3,47±0,05 <sup>c</sup>	4,25±0,05 <sup>e</sup>	4,08±0,03 <sup>de</sup>	3,64±0,09 <sup>c</sup>	2,92±0,12 <sup>a</sup>	2,02±0,02 <sup>f</sup>
C10:0	6,16±0,06 <sup>e</sup>	4,63±0,04 <sup>c</sup>	5,66±0,49 <sup>d</sup>	6,80±0,11 <sup>f</sup>	7,52±0,09 <sup>b</sup>	8,54±0,11 <sup>a</sup>	8,88±0,06 <sup>a</sup>	9,49±0,15 <sup>g</sup>	8,84±0,05 <sup>a</sup>	7,95±0,06 <sup>b</sup>
C11:0	1,46±0,05 <sup>a</sup>	1,31±0,02 <sup>a</sup>	1,74±0,03 <sup>e</sup>	2,51±0,14 <sup>c</sup>	1,95±0,09 <sup>b</sup>	2,03±0,06 <sup>b</sup>	2,45±0,09 <sup>c</sup>	8,76±0,11 <sup>d</sup>	8,25±0,05 <sup>f</sup>	8,96±0,02 <sup>d</sup>
C12:0	4,40±0,05 <sup>a</sup>	3,93±0,02 <sup>c</sup>	4,33±0,02 <sup>a</sup>	8,27±0,03 <sup>e</sup>	7,72±0,07 <sup>d</sup>	10,13±0,04 <sup>f</sup>	12,21±0,10 <sup>g</sup>	14,59±0,25 <sup>h</sup>	14,91±0,14 <sup>b</sup>	15,00±0,02 <sup>b</sup>
C14:0	3,80±0,11 <sup>e</sup>	3,01±0,01 <sup>a</sup>	3,04±0,03 <sup>a</sup>	4,25±0,11 <sup>b</sup>	6,33±0,10 <sup>g</sup>	5,61±0,13 <sup>f</sup>	7,32±0,04 <sup>cd</sup>	4,37±0,08 <sup>b</sup>	7,07±0,06 <sup>c</sup>	7,41±0,25 <sup>d</sup>
C16:0	21,32±0,09 <sup>g</sup>	17,18±0,09 <sup>d</sup>	18,19±0,11 <sup>a</sup>	17,77±0,19 <sup>e</sup>	18,63±0,30 <sup>f</sup>	22,21±0,02 <sup>h</sup>	18,18±0,02 <sup>a</sup>	15,65±0,04 <sup>c</sup>	19,05±0,05 <sup>b</sup>	19,07±0,08 <sup>b</sup>
C18:0	0,95±0,03 <sup>b</sup>	0,98±0,04 <sup>bc</sup>	1,15±0,03 <sup>a</sup>	1,36±0,04 <sup>g</sup>	1,11±0,02 <sup>a</sup>	1,08±0,06 <sup>ac</sup>	1,16±0,01 <sup>ef</sup>	1,65±0,06 <sup>f</sup>	1,55±0,03 <sup>de</sup>	1,50±0,01 <sup>d</sup>
<b>MUFA</b>	34,10±0,05 <sup>i</sup>	32,82±0,04 <sup>h</sup>	29,63±0,02 <sup>g</sup>	34,45±0,01 <sup>j</sup>	25,33±0,03 <sup>f</sup>	23,79±0,03 <sup>c</sup>	24,81±0,05 <sup>e</sup>	24,21±0,08 <sup>d</sup>	21,04±0,07 <sup>a</sup>	21,93±0,01 <sup>b</sup>
C14:1 n5	0,36±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>e</sup>	0,40±0,02 <sup>b</sup>	0,34±0,02 <sup>a</sup>	0,49±0,01 <sup>f</sup>	0,52±0,01 <sup>g</sup>	0,41±0,01 <sup>b</sup>	0,21±0,01 <sup>c</sup>	0,26±0,01 <sup>d</sup>	0,36±0,01 <sup>a</sup>
C16:1 n7	6,63±0,01 <sup>j</sup>	5,63±0,02 <sup>i</sup>	4,79±0,01 <sup>h</sup>	3,44±0,02 <sup>f</sup>	3,62±0,01 <sup>g</sup>	2,80±0,01 <sup>d</sup>	2,65±0,01 <sup>c</sup>	2,19±0,01 <sup>a</sup>	2,32±0,02 <sup>b</sup>	3,35±0,03 <sup>e</sup>
C18:1 n9	26,34±0,02 <sup>i</sup>	25,95±0,03 <sup>h</sup>	23,53±0,01 <sup>g</sup>	29,98±0,01 <sup>j</sup>	20,69±0,01 <sup>d</sup>	19,95±0,01 <sup>c</sup>	21,26±0,04 <sup>e</sup>	21,46±0,04 <sup>f</sup>	18,06±0,05 <sup>b</sup>	17,76±0,05 <sup>a</sup>
C22:1 n9	0,07±0,03 <sup>g</sup>	0,94±0,02 <sup>d</sup>	0,91±0,02 <sup>d</sup>	0,69±0,01 <sup>f</sup>	0,53±0,01 <sup>c</sup>	0,45±0,02 <sup>ab</sup>	0,49±0,01 <sup>bc</sup>	0,35±0,02 <sup>e</sup>	0,41±0,01 <sup>a</sup>	0,46±0,01 <sup>ab</sup>
<b>PUFA</b>	14,19±0,04 <sup>d</sup>	15,04±0,04 <sup>b</sup>	16,12±0,01 <sup>f</sup>	17,98±0,03 <sup>h</sup>	14,57±0,03 <sup>a</sup>	15,16±0,03 <sup>c</sup>	17,51±0,01 <sup>g</sup>	14,65±0,06 <sup>a</sup>	15,09±0,05 <sup>bc</sup>	14,41±0,03 <sup>e</sup>
C18:2 n6	7,08±0,02 <sup>a</sup>	7,25±0,08 <sup>d</sup>	7,43±0,02 <sup>e</sup>	9,54±0,02 <sup>f</sup>	7,14±0,05 <sup>a</sup>	8,20±0,01 <sup>c</sup>	9,69±0,01 <sup>g</sup>	7,87±0,03 <sup>b</sup>	8,25±0,02 <sup>c</sup>	7,84±0,03 <sup>b</sup>
C18:3 n3	6,65±0,01 <sup>e</sup>	7,04±0,02 <sup>g</sup>	7,83±0,02 <sup>j</sup>	7,56±0,02 <sup>i</sup>	6,76±0,04 <sup>f</sup>	6,44±0,02 <sup>d</sup>	7,25±0,02 <sup>h</sup>	6,02±0,03 <sup>b</sup>	6,12±0,03 <sup>c</sup>	5,85±0,01 <sup>a</sup>
C20:2 n6	0,21±0,01 <sup>f</sup>	0,39±0,01 <sup>be</sup>	0,41±0,01 <sup>ab</sup>	0,31±0,01 <sup>d</sup>	0,42±0,01 <sup>ac</sup>	0,32±0,01 <sup>d</sup>	0,36±0,01 <sup>e</sup>	0,43±0,01 <sup>ac</sup>	0,41±0,01 <sup>ab</sup>	0,45±0,01 <sup>c</sup>
C20:4 n6	0,25±0,01 <sup>b</sup>	0,36±0,01 <sup>e</sup>	0,45±0,01 <sup>f</sup>	0,57±0,01 <sup>g</sup>	0,24±0,01 <sup>b</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>a</sup>	0,33±0,02 <sup>c</sup>	0,31±0,01 <sup>c</sup>	0,28±0,02 <sup>d</sup>
<b>n6/n3</b>	1,06±0,00 <sup>b</sup>	1,03±0,01 <sup>e</sup>	0,95±0,00 <sup>d</sup>	1,26±0,00 <sup>c</sup>	1,06±0,01 <sup>b</sup>	1,27±0,00 <sup>c</sup>	1,34±0,00 <sup>a</sup>	1,31±0,00 <sup>f</sup>	1,35±0,00 <sup>a</sup>	1,34±0,01 <sup>a</sup>
<b>UFA</b>	48,29±0,04 <sup>d</sup>	47,86±0,04 <sup>b</sup>	45,75±0,01 <sup>f</sup>	52,43±0,03 <sup>h</sup>	39,90±0,03 <sup>a</sup>	38,95±0,03 <sup>c</sup>	42,32±0,01 <sup>g</sup>	38,36±0,06 <sup>c</sup>	36,13±0,05 <sup>e</sup>	36,34±0,03 <sup>e</sup>
<b>UFA/SFA</b>	1,16±0,00 <sup>e</sup>	1,40±0,00 <sup>h</sup>	1,22±0,01 <sup>g</sup>	1,13±0,00 <sup>f</sup>	0,85±0,00 <sup>b</sup>	0,70±0,00 <sup>d</sup>	0,75±0,00 <sup>b</sup>	0,63±0,00 <sup>a</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	0,57±0,00 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog

HSD testa). Skraćenice: FA-masne kisljine, SFA-zasićene, MUFA-mononezasićene, PUFA-polinezasićene, UFA-nezasićene

## Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponenta (PCA) sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase

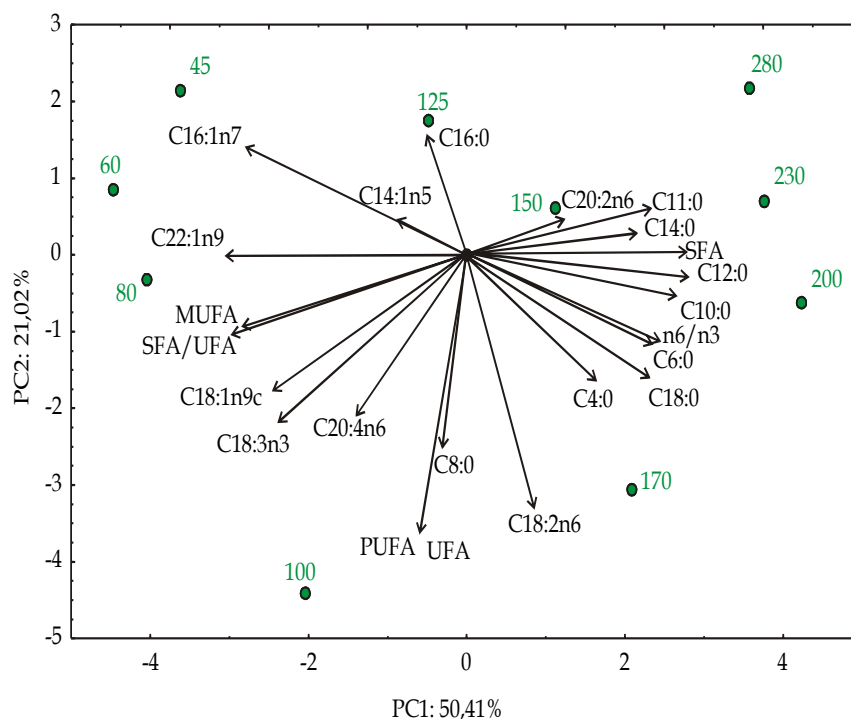
Slika 16 prikazuje dendrogram za klaster analizu sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase, koje su grupisane tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi.



Slika 16. Dendrogram sličnosti masnih kiselina uzoraka mleka magarice balkanske rase tokom laktacije za CA analizu

Na dendrogramu se primećuju tri odvojena klastera: levi koji obuhvata uzorke za 45., 60., 80. i 100. dan laktacije (povećane vrednosti C16:1 n7, C18:3 n3, C18:1 n9c, C22:1 n9, mononezasićene i odnos zasićenih/nezasićenih masnih kiselina), srednja grupa koja obuhvata uzorke za 125., 150. i 170. dan laktacije i desni klaster koji obuhvata uzorke za 200., 230. i 280. dan laktacije (povećane koncentracije C4:0, C6:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C18:0, C20:2 n6, zasićene masne kiseline i n6/n3). Uočena je znatna udaljenost između prvog i druga dva klastera (oko 45), dok udaljenost između drugog i trećeg klastera iznosi oko 25. Kvalitativni rezultati za analizu glavnih komponenta (slika 17) pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 71,43% ukupne varijanse. Promenljive C10:0 (koja pokazuje 7,56% ukupne varijanse, računato na osnovu

korelacije) C12:0 8,37%, zasićene masne kiseline 8,36% i odnos n6/n3 masnih kiselina 6,52% imaju najizraženiji pozitivni uticaj na računanje prve glavne komponente, dok su C16:1 n7 (6,41% ukupne varijanse), C22:1 n9 (7,86%), mononezasićene (6,68%) i odnos zasićenih/nezasićenih (7,48%) imaju najveći negativan uticaj na prvu glavnu komponentu.



Slika 17. Biplot za PCA analizu masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom laktacije

Promenljive C8:0 (koja pokazuje 8,64% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), C18:2 n6 (15,30%), C18:3 n3 (6,78%), C20:4 n6 (6,16%), polinezasićene (18,38%) i nezasićene masne kiseline (18,38%), imaju najizraženiji negativan uticaj na računanje druge glavne komponente.

Uticaj različitih parametara na uzorke može da se oceni sa slike 17 na kojoj su uzorci koji imaju veći udeo C16:1 n7, C18:1 n9c, C22:1 n9 mononezasićenih masnih kiselina, C18:3 n3 i odnosa zasićenih/nezasićenih na levoj strani grafika (uzorci mleka magarice 45., 60., 80. i 100. dan laktacije), a uzorci koji imaju veći udeo C4:0, C6:0, C10:0, C11:0, C12:0,



C14:0, C18:0, C20:2 n6, zasićenih masnih kiselina i odnosa n6/n3 se nalaze na desnoj strani grafika.

Povećane vrednosti mononezasićenih masnih kiselina i polinezasićene masne kiseline C18:3 n3 tokom 45. do 100. dana laktacije mleka magarice balkanske rase uslovljene su ishranom životinja na pašnjaku uz dodatak sveže deteline (u periodu proleća i početka leta). Pašnjak je najbogatiji u sadržaju polinezasićenih i nezasićenih masnih kiselina, dok je detelina bogata sadržajem mononezasićenih masnih kiselina (Martini i sar., 2015). U toku kasne jeseni i zimskog perioda (200. do 280. dan laktacije) mleko magarice je bogato sadržajem zasićenih i n6/n3 masnih kiselina, što se postiže ishranom livadskim senom i kukuruzom.

## **KOMPARATIVNA ANALIZA MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE I HUMANOG MLEKA**

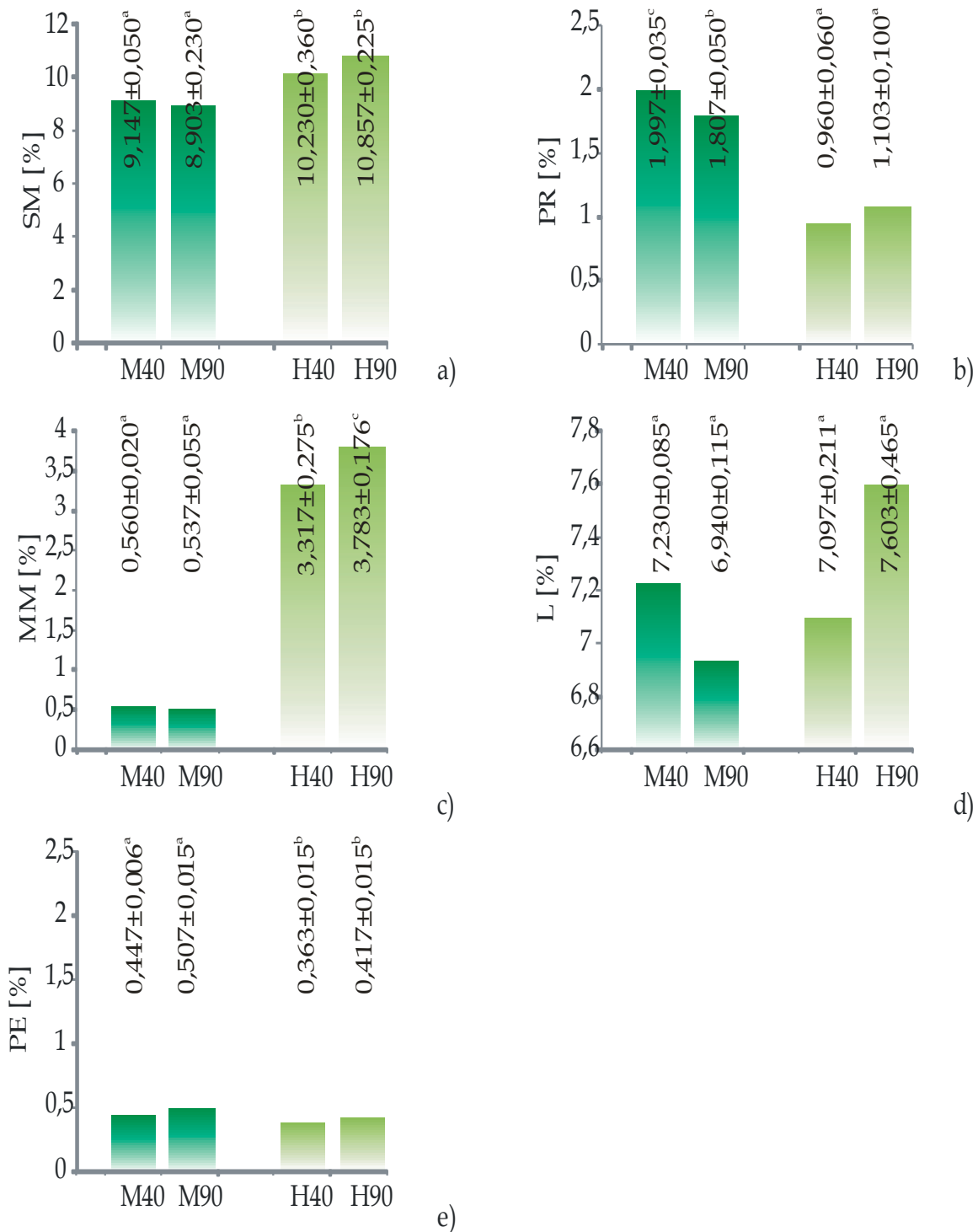
### **HEMIJSKI SASTAV**

U četvrtom delu doktorske disertacije cilj istraživanja bio je da se uporede koncentracije proteinskih frakcija i masnih kiselina mleka magarice i humanog mleka u ranoj fazi laktacije (40. i 90. dan).

Komparativna analiza hemijskog sastava analiziranih pokazatelja kvaliteta mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije prikazane su sa histogramima na slikama 18 do 20 i tabeli 20.

Na slici 18 komparativno je prikazan hemijski sastav mleka magarice (suva materija, proteini, mlečna mast, laktoza i pepeo) i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije. Iz prikazanih rezultata se vidi da je prosečan sadržaj suve materije i pepela mleka magarice niži u odnosu na humano mleko i tokom laktacije ne menja se značajno ( $p < 0,05$ ).

Sadržaj proteina veći je u mleku magarice u odnosu na humano mleko, dok je sadržaj mlečne masti oko 5 puta veći u humanom u odnosu na mleko magarice balkanske rase, tokom istog perioda laktacije.



Slika18. Komparativna analiza hemijskog sastava mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

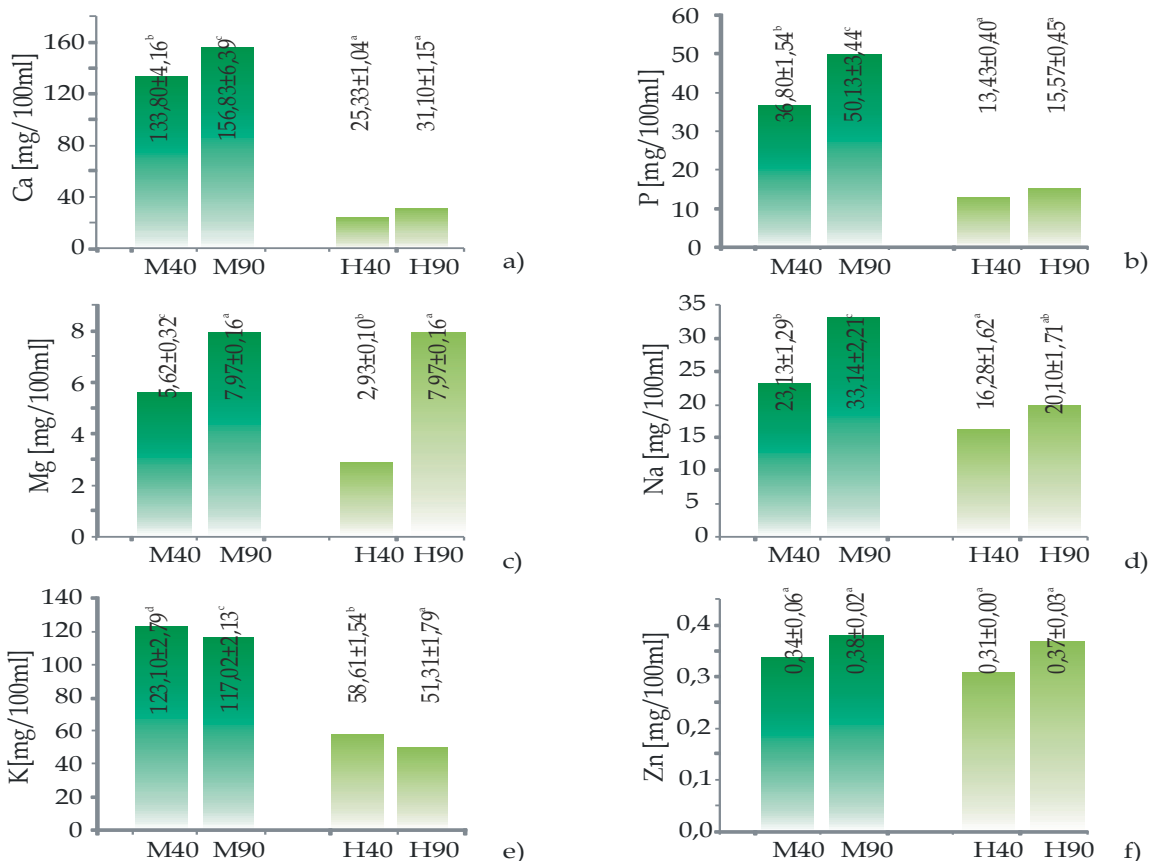
Skraćenice: a) SM-suva materija, b) PR-proteini, c) MM-mlečna mast, d) L-laktoza, e) PE-pepeo; M 40-mleko magarice 40.-og dana laktacije, M 90-mleko magarice 90.-og dana laktacije, H 40-humanom mleko 40.-og dana laktacije, H 90-humanom mleko 90.-og dana laktacije

Tokom 40. i 90. dana laktacije nema značajne promene ( $p < 0,05$ ) u sadržaju proteina kod humanog mleka, dok se kod mleka magarice ne menja sadržaj mlečne masti.

Sadržaj laktoze isti je u obe vrste mleka i ne menja se značajno tokom analiziranog perioda laktacije. Analizom rezultata prikazanih na slici 18 može se zaključiti i potvrditi da je mleko magarice veoma slično humanom mleku, posebno u sadržaju suve materije i laktoze.

## SADRŽAJ MINERALA

Na slici 19 komparativno je prikazan mineralni sastav mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije.

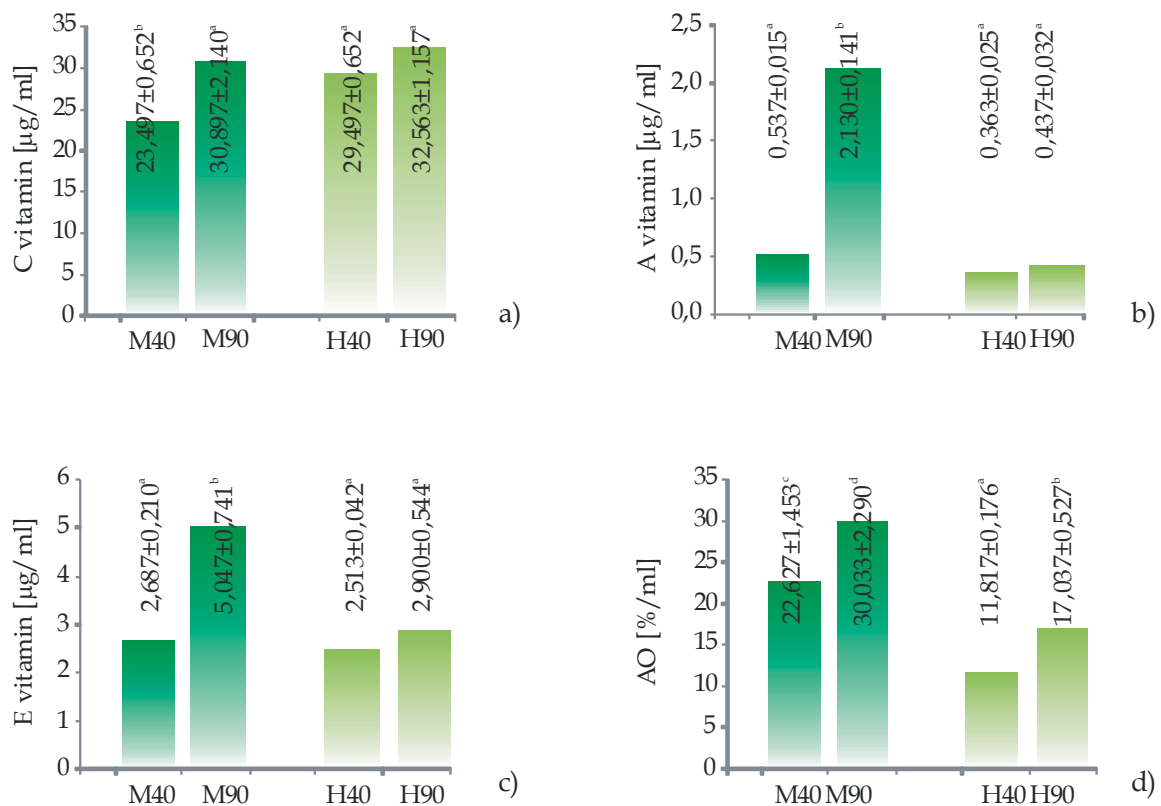


Slika 19. Komparativna analiza mineralnog sastava mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije a) Ca; b) P; c) Mg; d) Na; e) K; f) Zn

Iz prikazanih rezultata uočava se da je prosečan sadržaj svih minerala (Ca, P, Mg, Na i K) znatno veći u mleku magarice u odnosu na humano mleko, pri čemu su utvrđene statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) između svih ispitanih dana laktacije, osim za Zn, čiji se sadržaj ne razlikuje od vrste mleka i perioda laktacije.

## SADRŽAJ VITAMINA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Da bi se utvrdila korelacija između sadržaja pojedinih vitamina mleka magarice i humanog mleka, praćen je sadržaj vitamina C, A i E tokom 40 i 90. dana laktacije (slika 20). Visok sadržaj vitamina C imale su obe vrste mleka sa trendom blagog povećanja tokom 90. dana laktacije.



Slika 20. Komparativna analiza sadržaja vitamina: a) C, b) A, c) E i d) antioksidativna aktivnost mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

Skraćenica: AO-antioksidativna aktivnost

Prema istraživanjima Živković i sar. (2015) postoji velika varijabilnost u sadržaju vitamina C u humanom mleku od 30 do 100 mg/l sa progresivnim smanjenjem tokom laktacije. Sadržaj vitamina C u kravljem mleku kreće se od 8 do 20 mg/l što je značajno niže od sadržaja u mleku magarice od 20 do 40 mg/l (Bates & Prentice, 1994).

Mleko magarice ima veći sadržaj vitamina A i E u odnosu na humano mleko. Između humanog mleka tokom 40 i 90. dana laktacije nema statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ). Macias i sar. (2001) su zaključili da je prosečan sadržaj vitamina E u humanom mleku 2,7  $\mu\text{g/ml}$  i da je rano dojenje veoma bitno zbog unosa ovog vitamina koji ne prolazi kroz placentu u velikim količinama. Sadržaj vitamina A u humanom mleku ima oko 0,33  $\mu\text{g/ml}$  i dobro se absorbuje, delimično zbog prisustva lipaze u humanom mleku koje pomaže detetu da razloži vitamin (Živković i sar., 2015).

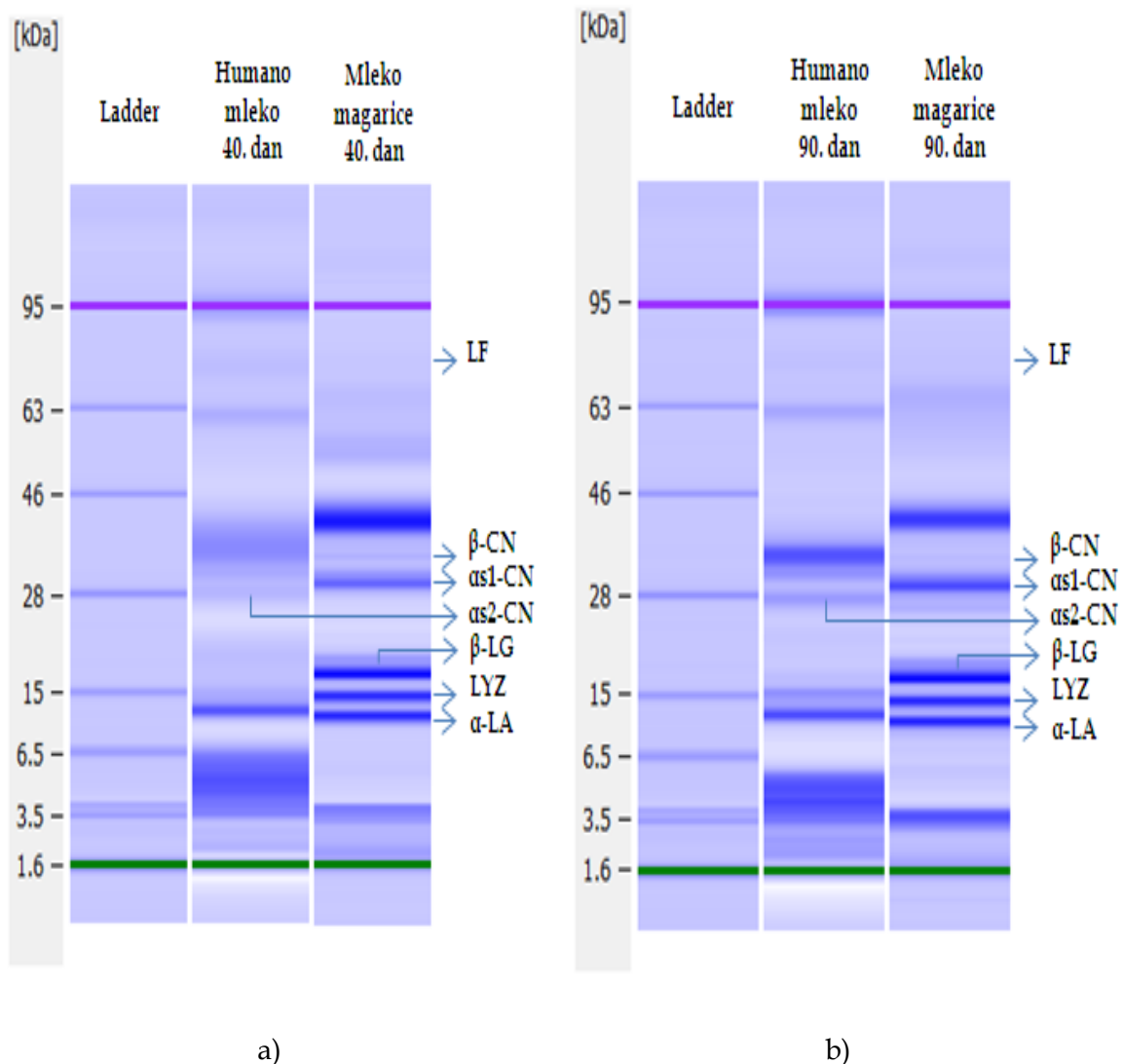
Prema rezultatima iz histograma (slika 20) može se zapaziti da su vrednosti antioksidativne aktivnosti značajano veće ( $P > 0,05$ ) u mleku magarice u odnosu na humano mleko. U obe vrste mleka antioksidativna aktivnost se povećava tokom 90. dana laktacije. Zarban i sar. (2009) su ustanovili da je ukupni antioksidativni kapacitet u humanom mleku DPPH testom 41,9 (%) ( $\mu\text{mol/l}$ ).

## PROFIL PROTEINA

Na slici 21 (a, b) prikazana je simulirana slika gela sa molekulskim masama-Mw (kDa) i identifikovane koncentracije proteinskih frakcija između mleka magarice balkanske rase i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije, a u tabeli 20 koncentracije identifikovanih proteinskih frakcija.

Iz tabele 20 vidi se da se koncentracija  $\alpha_{S1}$ -kazeina u ispitivanim uzorcima mleka magarice kreće od 1,38 do 1,89 g/l, dok sadržaj  $\beta$ -kazeina varira od 0,10 do 0,55 g/l. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature (Milonis & Polidori, 2011; Polidori & Vincenzetti, 2012). Goldfarb i sar., (1989) analizirali su 125 pojedinačnih uzoraka humanog mleka koristeći dvodimenzionalnu elektroforezu i u neznatnom broju su detektovali  $\alpha_{S1}$ -kazein. U mleku magarice balkanske rase identifikovan je  $\alpha_{S1}$ -kazein,

jedan od potencijalnih alergena kod dece. Mleko magarice pokazalo je odsustvo frakcije  $\alpha_2$ -kazeina 40. dana laktacije (slika 20) i vrlo niske koncentracije 0,11 g/l na najnižoj molekulskoj masi 28 kDa 90. dana laktacije. Razdvajanjem frakcija na osnovu rastvorljivosti proteina u humanom mleku identifikovani su  $\alpha_2$ -kazein i  $\beta$ -kazein tokom 40. i 90. dana laktacije.



Slika 21. Simulirana slika gela frakcija proteina mleka magarice balkanske rase i humanog mleka a) 40. i b) 90. dana laktacije razdvojenih primenom automatske kapilarne elektroforeze.

Strelice ukazuju na položaj identifikovanih proteinskih frakcija ( $\beta$ -CN- $\beta$ -kazein,  $\alpha_1$ -CN- $\alpha_1$ -kazein,  $\alpha_2$ -CN- $\alpha_2$ -kazein,  $\beta$ -LG- $\beta$ -laktoglobulin, LYZ-lizozim,  $\alpha$ -LA- $\alpha$ -laktalbumin)

Tabela 20. Koncentracije frakcija proteina mleka magarice i humanog mleka

Proteinske frakcije (g/l)	Mleko/ dani laktacije			
	M 40	M 90	H 40	H 90
$\alpha$ S1-CN	1,377±0,049 <sup>b</sup>	1,887±0,100 <sup>c</sup>	ND	ND
$\alpha$ S2-CN	ND	0,113±0,021 <sup>c</sup>	0,021±0,003 <sup>a</sup>	0,055±0,006 <sup>b</sup>
$\beta$ -CN	0,100±0,046 <sup>a</sup>	0,553±0,050 <sup>d</sup>	0,230±0,050 <sup>b</sup>	0,353±0,050 <sup>c</sup>
$\alpha$ -LA	1,567±0,115 <sup>b</sup>	2,733±0,170 <sup>c</sup>	0,537±0,031 <sup>a</sup>	0,620±0,044 <sup>a</sup>
$\beta$ -LG	0,260±0,017 <sup>b</sup>	0,197±0,055 <sup>b</sup>	ND	ND
SA	0,113±0,021 <sup>a</sup>	0,107±0,025 <sup>a</sup>	0,100±0,046 <sup>a</sup>	0,100±0,010 <sup>a</sup>
LYZ	2,973±0,080 <sup>c</sup>	2,493±0,276 <sup>b</sup>	0,043±0,008 <sup>a</sup>	0,076±0,013 <sup>a</sup>
LF	0,012±0,003 <sup>a</sup>	0,253±0,064 <sup>b</sup>	0,013±0,004 <sup>a</sup>	0,006±0,004 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Skraćenice:  $\alpha$ S1-CN- $\alpha$ S1-kazein,  $\alpha$ S2-CN- $\alpha$ S2-kazein,  $\beta$ -CN- $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -LA- $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -LG- $\beta$ -lakoglobulin, SA-serum albumin, LYZ-lizozim, LF-laktoferin

U odnosu na druge vrste životinja, mleko magarice kao i kobilje mleko ima sličan profil proteina sa humanim mlekom (Barlowska i sar., 2011). U prethodnim istraživanjima dokazano je da se kazein mleka magarice Italijanske rase kao i kobilje mleko veoma dobro razlaže u ljudskom želucu i samo 30% ostaje nerazgrađeno nakon 30 min (Inglstad i sar., 2010). U humanom mleku oko 39% kazeina ostaje nerazgrađeno u ljudskom želucu, koje se od strane dvanaestopalačnog creva skoro u potpunosti svari nakon 30 min (Inglstad i sar., 2010). Mleko magarice ima prihvatljiv ukus i ne izaziva opterećenje rastvorenih supstanci u bubregu dece i odraslih (Milonis & Polidori, 2011). Na osnovu dobre digestibilnosti mleko magarice predstavlja dobru zamenu za humano mleko u ranom detinjstvu (Mansueto i sar., 2013).

Na slici 21 detektovane su proteinske frakcije molekulske mase od oko 12,3 kDa u mleku magarice balkanske rase i humanom mleku, čime je identifikovano prisustvo  $\alpha$ -laktalbumina. Mleko magarice sadrži veću količinu  $\alpha$ -laktalbumina (1,57-2,73 g/l) nego humano mleko (0,54-0,62 g/l) tokom analiziranog perioda laktacije. Koncentracija  $\alpha$ -laktalbumina povećana je tokom faze laktacije (40. do 90. dana) u obe vrste mleka.  $\alpha$ -laktalbumin je važan u sintezi laktoze (Calil & Falcao, 2003) i potreban je za pravilan transport gvožđa (Chatterton i sar., 2006).

Frakcija  $\beta$ -laktoglobulina je takođe identifikovana u mleku magarice balkanske rase sa niskom koncentracijom 0,26 g/l ( 40. dana) koja se smanjuje do 90. dana laktacije (0,20 g/l).  $\beta$ - laktoglobulin je odsutan u humanom mleku i generalno se smatra zajedno sa kazeinskom frakcijom kao jedan od glavnih uzročnika alergija na kravlje mleko (Restani i sar., 2002), jer je u stanju da izazove alergijsku reakciju pri unosu mleka (Uniacke-Lowe i sar., 2010). Iako je  $\beta$ -laktoglobulin generalno otporan na dejstvo gastro-intestinalnih enzima u humanom organizmu, otpornost na razgradnju se razlikuje od vrste životinja, tako da je  $\beta$ -laktoglobulin iz ovčijeg mleka daleko više digestibilan od kravljeg mleka (El-Zahar i sar., 2005). Veća razgradnja  $\beta$ - laktoglobulina u mleku magarice sigurno poboljšava tolerantnost i prinos izvedenih bioaktivnih peptida u digestivnom traktu sa potencijalnim antimikrobnim delovanjem (Tidona i sar., 2011). Pozitivan efekat na zdravlje se ispoljava zahvaljujući prisustvu  $\beta$ -laktoglobulina, uključujući tu i antivirusni i antikancerogeni efekat (Chatterton i sar., 2006). Drugi autori su pokazali da  $\beta$ -laktoglobulin formira komplekse sa folnom kiselinom, sugerišući da bi ovi kompleksi mogli da se koriste za potpuno iskorišćenje folne kiseline u neonatalnom sticanju pasivnog imuniteta kod dece (Liang i sar., 2008 ).

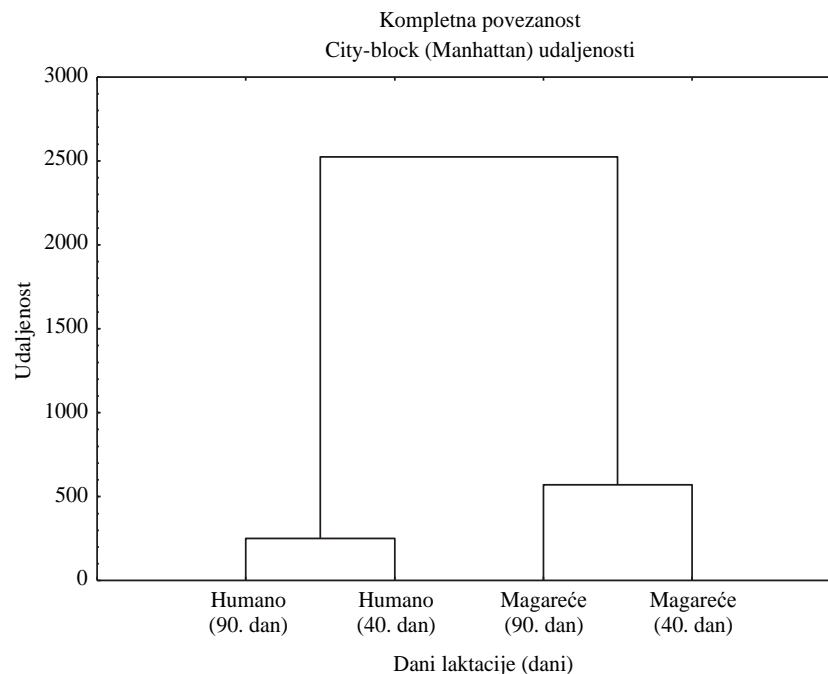
Mleko magarice je posebno bogato sa dva proteina surutke, lizozimom i laktoferinom, koji su detektovani na molekulskoj masi od oko 76 kDa i 14.9-15.4 kDa, respektivno. Dobijeni rezultati su pokazali da tokom prva tri meseca laktacije mleko magarice sadrži visoku koncentraciju laktoferina (0,01-0,25 g/l), što je slično humanom mleku (0,01 g /l). Ova studija je pokazala da je sadržaj lizozima u mleku magarice balkanske rase (2,97-2,49 g/l) što je 30-50 puta veći nego u humanom mleku (0,043-0,081 g/l). Veći sadržaj lizozima u mleku magarice u odnosu na humano mleko takođe je dokazan u nekim ranije sprovedenim istraživanjima. Šarić i sar. (2012) su utvrdili da sadržaj lizozima i laktoferina u uzorcima mleka magarice iznose 1,31 g/l i 0,80 mg/l, respektivno. Takođe, mleko magarice balkanske rase ima antibakterijski efekat protiv *E. coli* i *S. enteritidis* na različitim testiranim temperaturama (Šarić i sar, 2012.). Sadržaj lizozima i laktoferina povećava se od 40. do 90. dana laktacije, što može da ukaže na važnu imuno-zaštitnu ulogu ovog enzima kod dece koja se hrane humanim mlekom tokom navedenog perioda laktacije (Polidori & Vincenzetti, 2012). Što se tiče sadržaja glavnih proteinskih frakcija identifikovanih u mleku magarice, može se zaključiti da su slične onima iz humanog



mleka, a razlikuju se u odnosu na mleko preživara (Polidori & Vincenzetti, 2012; Lönnderal, 2013). Za razliku od drugih humanih mlečnih zamena, mleko magarice, kao prirodna hrana, može da doprinese bebama i deci da izgrade jak imuni sistem. Rezultati kliničkih istraživanja tolerantnosti dece sa alergijama (na kravlje mleko i drugu hranu) na mleko magarice, sprovedene u period od 1992. do 2009. godine, ukazuju na tolerantnost dece uzrasta od 10 dana do 11 godina na mleko magarice od 82,6% do 100% (Iacono i sar., 1992; Carroccio i sar., 2000; Monti i sar., 2007; Vita i sar., 2007).

### **Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponenta (PCA) nutritivnih karakteristika mleka magarice i humanog mleka**

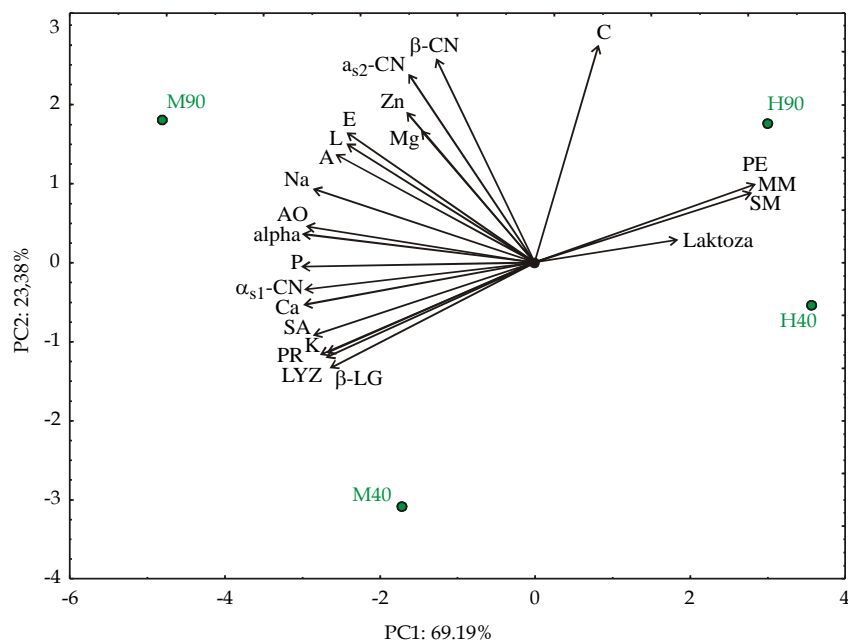
Slika 22 prikazuje dendogram za klaster analizu za hemijski sastav, sadržaj minerala, profil proteina, sadržaj vitamina i antioksidativne aktivnosti mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije, koji su grupisani tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi.



Slika 22. Dendogram sličnosti hemijskog i mineralnog sastava, profila proteina, vitamina i antioksidativne aktivnosti uzoraka mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

Na dendogramu se primećuju dva odvojena klastera: desni koji obuhvata uzorke mleka magarice i levi klaster koji obuhvata uzorke humanog mleka 40. i 90. dan laktacije. Uočena je znatna udaljenost između ovih klastera (oko 2000).

Kvalitativni rezultati za ovu analizu pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 92,57% ukupne varijanse i da se to može smatrati dovoljnim za prikazivanje celokupnog seta eksperimentalnih podataka. Promenljive Ca (koja pokazuje 6,07% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), P (6,28%),  $\alpha_1$ -kazein (6,19%) i  $\alpha$ -laktalbumin (6,12%) su imale najizraženiji negativni uticaj na računanje prve glavne komponente. Promenljive Mg (koja pokazuje 6,43% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), Zn (7,92%), vitamin C (17,17%), vitamin E (6,17%),  $\alpha_2$ -kazein (12,92%) i  $\beta$ -kazein (14,96%) su imale najizraženiji pozitivan uticaj na računanje druge glavne komponente.



Slika 23. Biplot analize glavnih komponenata hemijskog i mineralnog sastava, profila proteina, vitamina i antioksidativne aktivnosti mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

Skraćenice:  $\alpha_1$ -CN- $\alpha_1$ -kazein,  $\alpha_2$ -CN- $\alpha_2$ -kazein,  $\beta$ -CN- $\beta$ -kazein,  $\alpha$ -LA- $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -LG- $\beta$ -lakoglobulin, SA-serum albumin, LYZ-lizozim, LF-laktoferin, SM-suva materija, PR-proteini, MM-mlečna mast, L-laktoza, PE-pepeo, C-vitamin C, A-vitamin A, E-vitamin E, AO-antioksidativna aktivnost

Sa slike 23 se vidi da mleko magarice ima veće koncentracije proteina, Ca, P, Mg, Na, K, Zn, vitamina A, vitamina E,  $\alpha$ <sub>S1</sub>-kazeina,  $\alpha$ -laktalbumina,  $\beta$ -laktoglobulina, serum albumina, lizozima i antioksidativnu aktivnost u odnosu na humano mleko, dok humano mleko ima veće koncentracije suve materije, mlečne masti i laktoze u odnosu na mleko magarice u analiziranom periodu laktacije.

## SASTAV MASNIH KISELINA

Rezultati sastava masnih kiselina mleka magarice i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije prikazani su u tabeli 21. Zasićene masne kiseline čine 41,65% ukupnih masnih kiselina u mlečnoj masti mleka magarice balkanske rase i 41,30% od ukupnih masnih kiselina u mastima humanog mleka nakon 40 dana laktacije. Slično humanom mleku mleko magarice karakterišu male količine kratkog lanca i velike količine dugog lanca masnih kiselina (Susmita i sar., 2012). Zasićene masne kiseline su dominantna grupa u ukupnim masnim kiselinama u mleku magarice balkanske rase i humanom mleku, zatim mononezasićene i polinezasićene masne kiseline, prisutne u nižim koncentracijama (Malacarne i sar., 2002). Dobijeni rezultati humanog mleka su u skladu sa podacima iz literature gde su autori Susmita i sar. (2012) utvrdili da u humanom mleku Bengalskih majki ima 35% mononezasićenih masne kiselina.

Iz tabele 21 može se videti da od zasićenih masnih kiselina, najveći udeo čini palmitinska kiselina (C16:0) u obe vrste mleka, sa nešto većim sadržajem u mleku magarice balkanske rase u odnosu na humano mleko 40. dana. Evidentno je opadanje sadržaja C16:0 tokom 90. dana laktacije. Udeo C16:0 od ukupnih zasićenih masnih kiselina u mleku magarice i humanom mleku čini oko 44%. Susmita i sar. (2012) su takođe utvrdili da u humanom mleku Bengalskih majki ima 60% C16:0, dok rezultati Mayer & Fiechter (2013) pokazuju da C16:0 čini 40% i 39% od ukupnih zasićenih masnih kiselina kod ovčijeg i kozjeg mleka. Sadržaj kaprinske kiseline (C10:0) u mleku magarice je veći nego u humanom mleku. Masne kiseline od C4:0 do C11:0 i C13:0 do C16:0 pokazuju trend opadanja tokom 90. dana laktacije, dok sadržaj C12:0, C14:0 i C18:0 ima trend povećanja. Procenti laurinske (C12:0), stearinske (C18:0) i miristinske masne kiseline (C14:0) veći su u humanom mleku u odnosu na mleko magarice. Ukupna

koncentracija zasićenih masnih kiselina ima rastući trend tokom laktacije u obe vrste mleka, ali je povećanje koncentracije izraženije u mleku magarice (sa 41,65% na 49,67%).

Sadržaj mlečne masti u mleku magarice je nizak što ima za posledicu nisku energetske vrednost u odnosu na humano mleko i mleko drugih životinja ( Salimei i sar., 2004 ). Međutim, u procentima sastav masnih kiselina i posebno sadržaj polinezasićenih masnih kiselina u mleku magarice je veći od kravljeg mleka, što je glavna tačka interesa upotrebe mleka magarice ( Gastaldi i sar., 2010).

Dobro izbalansiran odnos n6/n3 masnih kiselina od 1,17: 1 u mleku magarice u odnosu na humano mleko čini mleko magarice veoma korisnim u ljudskoj ishrani. Sadržaj laurinske (C12: 0) i miristinske masne kiseline (C14:0) u ishrani dece humanim mlekom je višestruko značajan zbog visokog antibakterijskog i antivirusnog agensa (Carpo i sar., 2007).

Nezasićene masne kiseline čine 48,44% mleka magarice i 50,99% humanog mleka tokom 40 dana laktacije. Većina nezasićenih su mononezasićene masne kiseline, koje čine 34,04% i 37,23% od ukupnih masnih kiselina mleka magarice i humanog mleka nakon 40 dana laktacije. Chiofalo i sar. (2004) nisu našli značajnu varijabilnost tokom 40. i 90. dana laktacije u mleku magarice. Mleko magarice i humano mleko imali su značajno veći procenat oleinske kiseline (C18:1 n9) u poređenju na drugim identifikovanim mononezasićenim masnim kiselinama. Među mononezasićenim masnim kiselinama, količina C18:1 n9 bila je značajno veća i povećavala se tokom laktacije u mleku magarice, dok se smanjivala u humanom mleku. Druga velika frakcija masnih kiselina u obe vrste mleka bila je palmitoleinska kiselina (C16 : 1 n7).

Od polinezasićenih masnih kiselina, sadržaj C18:2 n6 linolne kiseline, značajno se povećava tokom 40. i 90. dana laktacije u obe vrste mleka, ali je znatno veći sadržaj nađen u humanom mleku.

Tabela 21. Sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

Masne kiseline	% od ukupnih masnih kiselina			
	M 40	M 90	H 40	H 90
<b>SFA</b>	41,65±0,04 <sup>b</sup>	49,67±0,07 <sup>d</sup>	41,30±0,05 <sup>a</sup>	42,08±0,06 <sup>c</sup>
C4:0	0,09±0,00 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>b</sup>	0,07±0,01 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>a</sup>
C6:0	0,17±0,01 <sup>a</sup>	1,15±0,02 <sup>c</sup>	0,11±0,02 <sup>b</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>
C8:0	3,14±0,02 <sup>b</sup>	4,07±0,01 <sup>c</sup>	3,06±0,02 <sup>a</sup>	3,10±0,02 <sup>ab</sup>
C10:0	6,18±0,01 <sup>c</sup>	7,83±0,01 <sup>d</sup>	1,98±0,02 <sup>a</sup>	2,20±0,01 <sup>b</sup>
C12:0	4,42±0,01 <sup>a</sup>	8,26±0,00 <sup>d</sup>	6,98±0,02 <sup>b</sup>	7,40±0,00 <sup>c</sup>
C13:0	0,17±0,01 <sup>c</sup>	0,35±0,01 <sup>d</sup>	0,09±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,02 <sup>b</sup>
C14:0	3,80±0,01 <sup>a</sup>	6,30±0,01 <sup>d</sup>	5,50±0,01 <sup>b</sup>	5,96±0,01 <sup>c</sup>
C16:0	21,26±0,01 <sup>d</sup>	17,77±0,02 <sup>a</sup>	19,50±0,04 <sup>c</sup>	18,62±0,03 <sup>b</sup>
C18:0	0,97±0,02 <sup>a</sup>	1,35±0,02 <sup>b</sup>	2,90±0,06 <sup>c</sup>	3,18±0,02 <sup>d</sup>
<b>MUFA</b>	34,09±0,07 <sup>ab</sup>	34,44±1,06 <sup>b</sup>	37,23±0,54 <sup>c</sup>	32,91±0,55 <sup>a</sup>
C14:1 n5	0,36±0,03 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>ab</sup>	0,30±0,01 <sup>b</sup>	0,36±0,02 <sup>a</sup>
C16:1 n7	6,63±0,01 <sup>d</sup>	3,44±0,13 <sup>a</sup>	3,90±0,07 <sup>c</sup>	3,62±0,06 <sup>b</sup>
C18:1 n9	26,34±0,11 <sup>a</sup>	29,98±1,14 <sup>c</sup>	32,40±0,59 <sup>d</sup>	28,36±0,54 <sup>b</sup>
C22:1 n9	0,76±0,04 <sup>c</sup>	0,68±0,02 <sup>bc</sup>	0,62±0,04 <sup>ab</sup>	0,58±0,06 <sup>a</sup>
<b>PUFA</b>	14,35±0,49 <sup>a</sup>	17,53±0,52 <sup>c</sup>	13,76±0,26 <sup>a</sup>	16,10±0,13 <sup>b</sup>
C18:2 n6	7,08±0,06 <sup>a</sup>	9,52±0,10 <sup>b</sup>	11,13±0,10 <sup>c</sup>	13,25±0,40 <sup>d</sup>
C18:3 n3	6,60±0,41 <sup>b</sup>	7,56±0,62 <sup>c</sup>	1,93±0,34 <sup>a</sup>	2,10±0,20 <sup>a</sup>
C20:2 n6	0,21±0,08 <sup>c</sup>	0,11±0,02 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
C20:2 n3	0,23±0,03 <sup>a</sup>	0,17±0,05 <sup>a</sup>	0,20±0,05 <sup>a</sup>	0,18±0,06 <sup>a</sup>
C20:4 n6	0,24±0,07 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup>	0,50±0,11 <sup>b</sup>	0,58±0,12 <sup>b</sup>
n6/n3	1,07±0,18 <sup>a</sup>	1,27±0,23 <sup>b</sup>	5,88±0,42 <sup>c</sup>	6,25±0,56 <sup>d</sup>
<b>UFA</b>	48,44±0,46 <sup>a</sup>	51,97±1,35 <sup>b</sup>	50,99±0,54 <sup>b</sup>	49,01±0,49 <sup>a</sup>

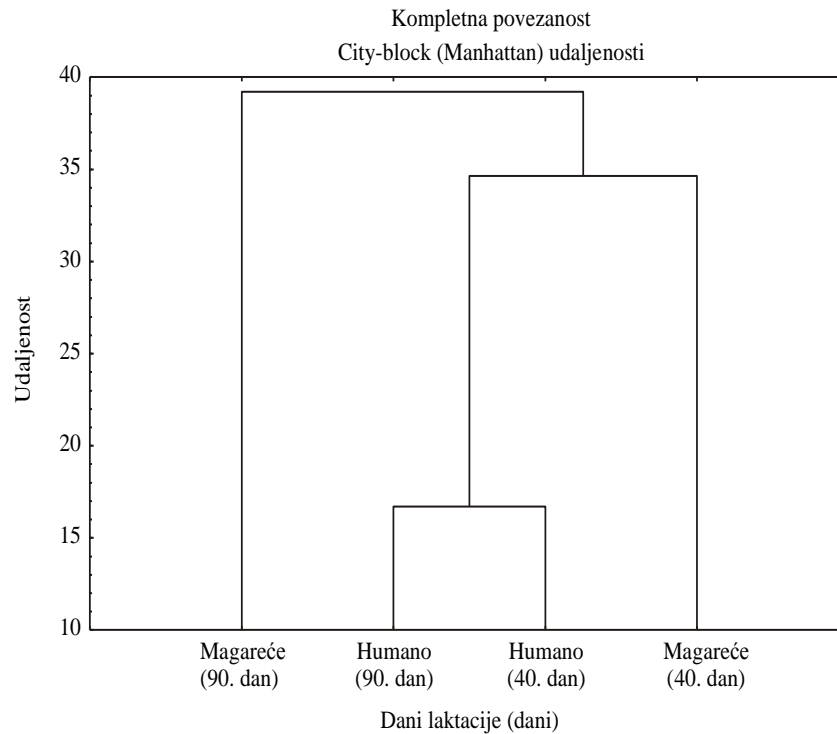
Sadržaj linolenske kiseline (C18:3 n3) značajno je veći ( $p < 0,05$ ) (oko 2,5 puta) u mleku magarice u odnosu na humano mleko, ali nakon 40. dana laktacije sadržaj se smanjuje u obe vrste mleka.

Vrednost ukupnih polinezasićenih masnih kiselina u humanom mleku je veći nego što je detektovano u evropskoj populaciji žena (10-16,6%), uz dominaciju polinezasićenih masnih kiselina iz n6 serije (Krešić i sar., 2013 a, b). U posmatranom periodu laktacije, sadržaj linolne i  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline povećane su u obe vrste analiziranih uzoraka mleka. U mleku magarice i humanom mleku ukupan odnos n6/n3 masnih kiselina pokazuje značajan rast tokom laktacije. U humanom mleku mnogo je veći (oko 60 puta) sadržaj n6 u odnosu na n3 masne kiseline tokom analiziranog perioda laktacije. Generalno, nizak sadržaj n3 masnih kiselina u humanom mleku ukazuje na to da je kod žena tokom laktacije preporučljiv dodatak n3 masnih kiselina (Arsić i sar., 2009), dok je mleko magarice veoma dobar izvor esencijalnih n3 masnih kiselina. Sadržaj linolne i  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline u humanom mleku u skladu je sa rezultatima Susmita i sar. (2012), koji su utvrdili da mleko Bengalskih majki sadrži 11,05% linolne i 1,68%  $\alpha$ -linoleinske masne kiseline. Odnos n6/ n3 je 1,07 i 1,27 u mleku magarice nakon 40. i 90. dana laktacije, odnosno, znatno niže u odnosu na humano mleko (5,88 i 6,25).

Niske koncentracije eikosadeinske masne kiseline (C20:2) i arahidonske kiseline (C20:4) su utvrđene u obe vrste mleka. Mleko magarice karakteriše prisustvo arahidonske masne kiseline, koja se nalazi u membranama nervnih ćelija i od suštinskog je značaja u toku neonatalnog razvoja bebe (Cocchi, 2000) iako je njen sadržaj niži u poređenju sa humanim mlekom.

### **Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponenata (PCA) sastava masnih kiselina mleka magarice i humanog mleka**

Slika 24 prikazuje dendogram klaster analize sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije, koji su grupisani tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi.



Slika 24. Dendrogram sličnosti sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije

Na dendrogramu se primećuju tri odvojena klastera: desni koji obuhvata uzorke mleka magarice za 40. dan, srednji klaster koji obuhvata uzorke humanog mleka 40. i 90. dan i levi klaster koji obuhvata uzorke mleka magarice, 90. dan.

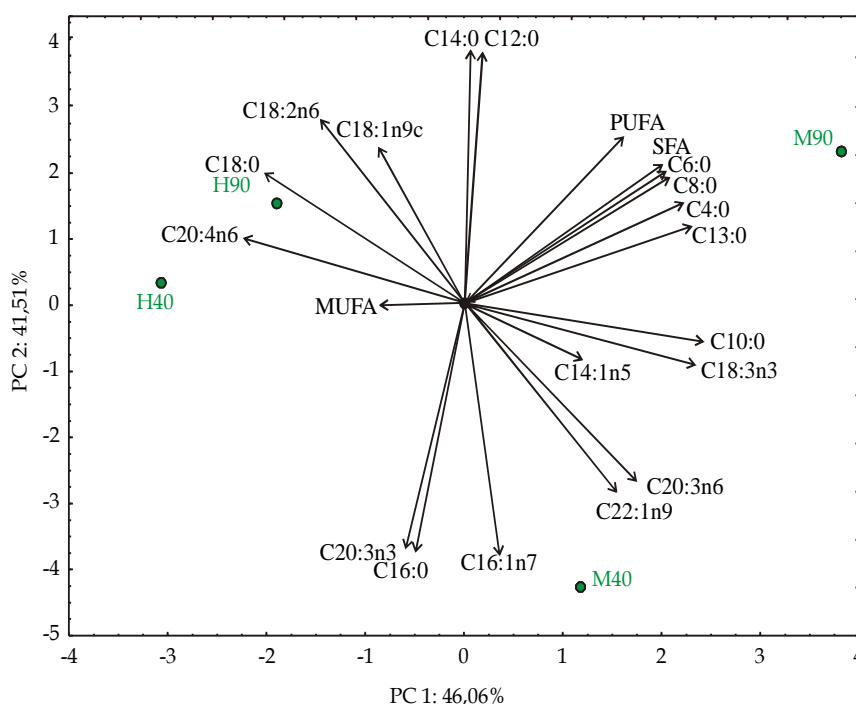
Kvalitativni rezultati za analizu glavnih komponenata sastava masnih kiselina prikazani su na biplot slici 25. Prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 87,57% ukupne varijanse, dovoljno za prikazivanje celokupnog seta eksperimentalnih podataka.

Promenljive C4:0 (koja pokazuje 8,59% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), C6:0 (7,27%), C8:0 (7,51%), C10:0 (10,01%), C13:0 (9,23%), zasićene masne kiseline (7,04%) i C18:3 n3 (9,65%), su imale najizraženiji pozitivni uticaj na računanje prve glavne komponente, dok su promenljive C18:0 (7,39%) i C20:4 n6 (8,88%) imale najizraženiji negativni uticaj na računanje prve glavne komponente.

Promenljive C12:0 (koja pokazuje 11,35 % ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), C14:0 (11,47%) i C18:2 n6 (6,04%), su imale najizraženiji pozitivan uticaj na računanje druge glavne komponente, dok su C16:0 (10,95%), C16:1 n7 (11,19%), C22:1 n9

(6,31%), C20:3 n3 (10,49%) imale najizraženiji negativan uticaj na računanje druge glavne komponente.

Sa slike 25 takođe se vidi da mleko magarice ima veće koncentracije zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina C6:0, C8:0, C4:0, C13:0 u 90. danu, dok je koncentracija C20:3 n3, C16:0, C16:1 n7, C22:1 n9 i C20:3 n6 masnih kiselina veća u mleku magarice u 40. danu. Humano mleko karakteriše povećana koncentracija C18:0, C20:4 n6 i C18:2 n6 masnih kiselina.



Slika 25. Biplot grafik za analizu glavnih komponenata sastava masnih kiselina mleka magarice balkanske rase i humanog mleka 40. i 90. dana laktacije  
Skrtaćenice: SFA-zasićene masne kiseline, PUFA-polinezasićene masne kiseline, MUFA-mononezasićene masne kiseline



# UTICAJ ISHRANE NA SASTAV MLEKA MAGARICE BALKANSKE RASE

## HEMIJSKI SASTAV HRANE ZA ŽIVOTINJE

Analiziran je sastav i uticaj vrste ishrane na kvalitet mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije. U tabeli 22 komparativno je prikazana hemijski kvalitet pašnjaka (proleće/jesen i leto), livadskog sena, deteline i kukuruza.

Iz dobijenih rezultata je evidentno da sadržaj suve materije, proteina i masti pašnjaka u proleće/jesen je veći u odnosu na leto, dok je sadržaj celuloze povećan u letnjem periodu.

Tabela 22. Hemijski sastav različitih vrsta hrane za životinje

Vrsta hrane	Hemijski sastav (% na SM)				
	Suva materija	Proteini	Mast	Pepeo	Celuloza
Pašnjak (proleće/jesen)	20,12±0,03 <sup>b</sup>	23,61±0,01 <sup>d</sup>	3,99±0,03 <sup>c</sup>	9,98±0,02 <sup>a</sup>	24,35±0,20 <sup>b</sup>
Pašnjak (leto)	19,02±0,05 <sup>a</sup>	21,85±0,17 <sup>c</sup>	3,12±0,08 <sup>ab</sup>	10,03±0,03 <sup>a</sup>	25,22±0,14 <sup>c</sup>
Livadsko seno (jesen/zima)	92,05±0,31 <sup>e</sup>	13,37±0,29 <sup>b</sup>	2,59±0,44 <sup>a</sup>	7,52±0,32 <sup>c</sup>	38,81±0,54 <sup>d</sup>
Detelina (proleće)	80,01±0,10 <sup>c</sup>	30,27±0,16 <sup>e</sup>	5,37±0,06 <sup>d</sup>	12,28±0,30 <sup>d</sup>	40,43±0,07 <sup>e</sup>
Kukuruz (cela sezona)	88,49±0,04 <sup>d</sup>	9,23±0,07 <sup>a</sup>	3,64±0,02 <sup>bc</sup>	1,46±0,04 <sup>b</sup>	3,32±0,08 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Opadanje sadržaja proteina i povećanje sadržaja celuloze tokom suve tople sezone, u skladu je sa zaključcima prethodnih istraživanja na ravničarskim pašnjacima (Martinelli i sar., 2007; Grdović i sar., 2013).

Sadržaj pepela pašnjaka nije pokazao statistički značajnu razliku ( $p=0,05$ ) u odnosu na sezonu. Pašnjak za ishranu životinja sa svojim brojnim biljnim vrstama pokazuje visok

kvalitet, što je u skladu sa istraživanjima koje su sproveli Grdović i sar. (2013) na pašnjaku Valjevac u oktobru, aprilu i junu.

Osnova obroka u ishrani životinja tokom zimskog perioda (novembar-april) je livadsko seno zadovoljavajućeg kvaliteta sa visokim sadržajem proteina i celuloze. U Evropi, posebno u Italiji, preporučuje se da 70-80% ishrane kopitara bude livadsko seno osušeno na suncu (Miraglia & Martin-Roset, 2006).

Pored livadskog sena, u obroke magarice balkanske rase ulazi i kukuruz tokom cele sezone. U prolećnom periodu od aprila ishrana magarice se obogaćuje svežom detelinom. Iz iste tabele može se videti da je detelina po hemijskom sastavu najbogatija proteinima, celulozom, pepelom i mastima u odnosu na drugu vrstu hrane.

U tabeli 23 prikazani su rezultati sadržaja minerala u različitoj vrsti hrane za magarice balkanske rase. Pašnjak sadrži minerale sledećim redom: Ca > P > Na > Mg > Fe > Mn > Zn > K > Cu. Tokom letnje sezone sadržaj Ca, P, Na i Fe smanjuje se, dok se sadržaj Mg, Cu, Zn, Mn i K povećava u odnosu na proleće/jesen. U poređenju sa pašnjakom, livadsko seno karakteriše visok sadržaj K, P, Mg, Fe, Cu, Zn i Mn, a nizak sadržaj Na. Dalje se iz rezultata prikazanih u istoj tabeli vidi da je detelina izuzetno bogata sadržajem P, K, Na i Ca, dok je mineralni sastav kukuruza siromašan u odnosu na drugu vrstu hrane za magarice.

Sastav masnih kiselina pašnjaka (proleće/jesen i leto), livadskog sena, deteline i kukuruza prikazan je u tabeli 24.

Kako se vidi iz dobijenih rezultata, sadržaj mononezasićenih, nezasićenih, C18:1 n<sub>9c</sub>, C18:2 n<sub>6</sub> i C18:3 n<sub>3</sub> masnih kiselina pašnjaka u proleće/jesen je veći u odnosu na leto, dok je sadržaj zasićenih, polinezasićenih i odnosa zasićenih/nezasićenih masnih kiselina povećan u letnjem periodu. U odnosu na drugu vrstu hrane pašnjak je najbogatiji sadržajem polinezasićenih i nezasićenih masnih kiselina, čije se promene tokom sezone u pašnjaku statistički značajno ne menjaju (p=0,05). Livadsko seno bogato je sadržajem zasićenih, mononezasićenih, odnosom zasićenih/nezasićenih, C18:1 n<sub>9</sub> i C18:2 n<sub>6</sub> masnih kiselina. Chiofalo i sar. (2006 a) su utvrdili sličan sastav livadskog sena tokom ishrane italijanske rase magarice Martina Franca. Sadržaj zasićenih i mononezasićenih

masnih kiselina izuzetno je visok u analiziranoj detelini dok je kukuruz bio bogat svim masnim kiselinama izuzev zasićene i C18:3 n3 masne kiseline.

Tabela 23. Sadržaj minerala različitih vrsta hrane tokom perioda laktacije magarice balkanske rase

Vrsta hrane	Sadržaj minerala (mg/kg na SM)								
	P	Ca	Na	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	K
Pašnjak (proleće/jesen)	1292,45±7,07 <sup>a</sup>	14167,54±153,31 <sup>c</sup>	516,15±10,00 <sup>d</sup>	442,80±502,03 <sup>ab</sup>	216,10±114,77 <sup>a</sup>	2,32±0,46 <sup>b</sup>	24,99±0,03 <sup>a</sup>	64,69±0,51 <sup>a</sup>	2,51±0,01 <sup>a</sup>
Pašnjak (leto)	1196,41±6,41 <sup>a</sup>	10054,01±53,02 <sup>d</sup>	306,73±11,58 <sup>c</sup>	964,77±14,49 <sup>bc</sup>	140,45±0,58 <sup>a</sup>	3,17±0,08 <sup>c</sup>	26,03±0,06 <sup>a</sup>	66,37±0,12 <sup>a</sup>	3,52±0,10 <sup>a</sup>
Livadsko seno (jesen/zima)	2300,04±300,01 <sup>a</sup>	2681,46±46,97 <sup>c</sup>	218,13±6,75 <sup>b</sup>	1450,26±51,82 <sup>c</sup>	423,15±2,21 <sup>c</sup>	5,70±0,25 <sup>e</sup>	29,56±0,18 <sup>d</sup>	138,33±5,60 <sup>d</sup>	4767,70±417,66 <sup>b</sup>
Detelina (proleće)	34698,00±1850,39 <sup>b</sup>	1621,99±38,54 <sup>b</sup>	876,40±60,30 <sup>e</sup>	274,35±8,77 <sup>a</sup>	131,85±5,20 <sup>ab</sup>	4,53±0,07 <sup>d</sup>	12,87±0,82 <sup>c</sup>	29,71±3,15 <sup>c</sup>	23090,07±657,76 <sup>c</sup>
Kukuruz (cela sezona)	0,38±0,07 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,08±0,01 <sup>a</sup>	12,26±0,12 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>b</sup>	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,01±0,01 <sup>b</sup>	0,42±0,10 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

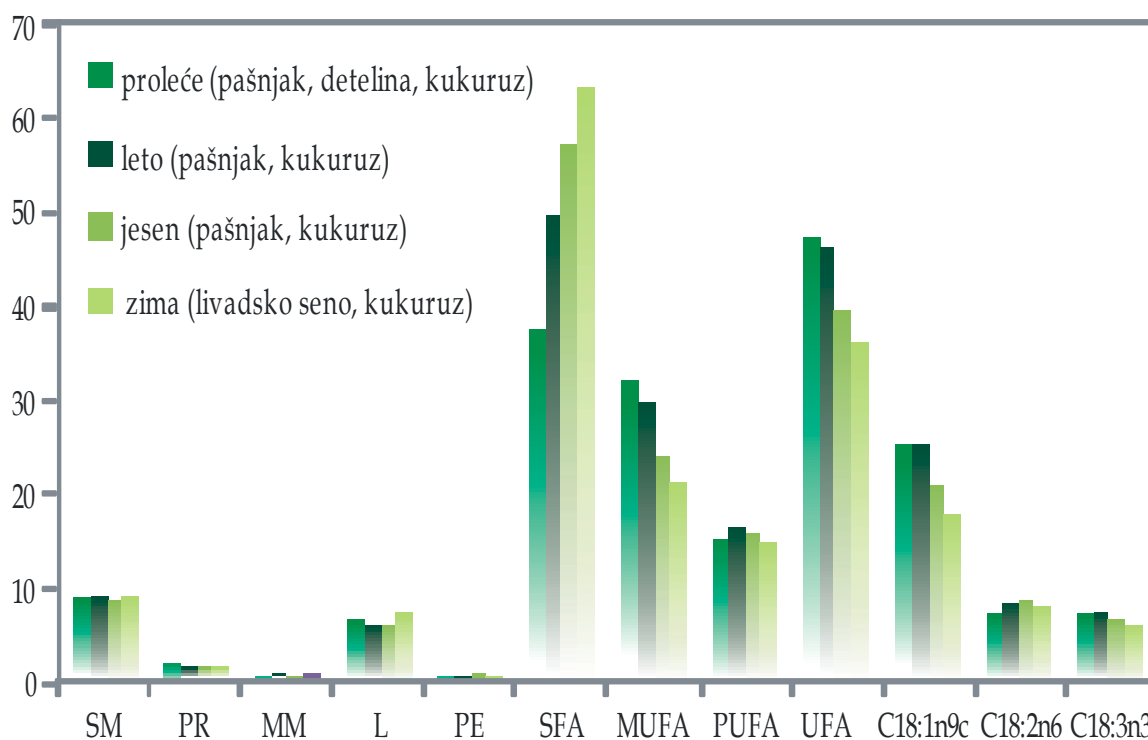
Tabela 24. Sastav masnih kiselina različitih vrsta hrane tokom perioda laktacije magarice balkanske rase

Vrsta hrane	% od ukupnih masnih kiselina							
	SFA	MUFA	PUFA	UFA	SFA/UFA	C18:1n9c	C18:2n6	C18:3n3
Pašnjak (proleće/jesen)	18,51±0,17 <sup>b</sup>	13,90±0,58 <sup>b</sup>	58,33±0,65 <sup>a</sup>	72,22±0,20 <sup>a</sup>	0,26±0,00 <sup>ab</sup>	4,37±0,04 <sup>c</sup>	17,37±0,24 <sup>c</sup>	39,36±0,32 <sup>c</sup>
Pašnjak (leto)	20,00±0,13 <sup>c</sup>	9,60±0,34 <sup>a</sup>	60,27±0,04 <sup>a</sup>	69,87±0,38 <sup>a</sup>	0,29±0,00 <sup>b</sup>	3,82±0,17 <sup>b</sup>	16,36±0,09 <sup>b</sup>	37,85±0,17 <sup>d</sup>
Livadsko seno (jesen/zima)	33,07±0,82 <sup>d</sup>	22,61±1,33 <sup>c</sup>	44,23±0,92 <sup>d</sup>	66,84±0,86 <sup>c</sup>	0,49±0,02 <sup>c</sup>	5,38±0,15 <sup>d</sup>	31,22±0,13 <sup>d</sup>	14,00±0,02 <sup>c</sup>
Detelina (proleće)	58,42±0,42 <sup>e</sup>	30,32±0,21 <sup>d</sup>	3,05±0,19 <sup>b</sup>	33,37±0,38 <sup>b</sup>	1,75±0,03 <sup>d</sup>	0,05±0,00 <sup>a</sup>	0,51±0,01 <sup>a</sup>	1,51±0,01 <sup>b</sup>
Kukuruz (cela sezona)	17,28±0,25 <sup>a</sup>	35,98±0,08 <sup>e</sup>	38,95±1,71 <sup>c</sup>	74,93±1,78 <sup>d</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>	32,79±0,15 <sup>e</sup>	56,56±0,13 <sup>e</sup>	0,80±0,02 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od  $p < 0,05$  (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Uticaj načina ishrane i sezone na sastav mleka magarice balkanske rase prikazan je na slici 26. Uticaj sezone i ishrane na pašnjacima nedovoljno je istražen i malo je podataka u literaturi. Nekoliko literaturnih navoda pokazuje da ishrana i sezona najviše utiču na sadržaj i sastav masnih kiselina (Chiofalo i sar., 2006 a,b). Porast sadržaja proteina, laktoze, mononezasićenih, polinezasićenih i C18:3 n3 masnih kiselina, u mleku magarice u toku proleća, uslovljen je ishranom magarice na pašnjaku i dodatkom sveže deteline sa visokim sadržajem proteina i masnih kiselina. Nakon toga sadržaj proteina ima opadajući trend. Rezultati istraživanja u odgovarajućoj sezoni su u skladu sa literaturnim podacima Guo i sar. (2007).

Sadržaj mlečne masti povećava se tokom leta i tokom zime na kraju laktacije, što je u skladu sa podacima u literaturi (Guo i sar., 2007; Cosentino i sar.,2010). Sadržaj suve materije i laktoze najveći je tokom kraja jeseni i početkom zime.



Slika 26. Uticaj načina ishrane i godišnjeg doba na sastav mleka magarice balkanske rase

Skraćenice: SM-suva materija, PR-proteini, MM-mlečna mast, L-laktoza, PE-pepeo, SFA-zasićene masne kiseline, PUFA-polinezasićene masne kiseline, MUFA-mononezasićene masne kiseline

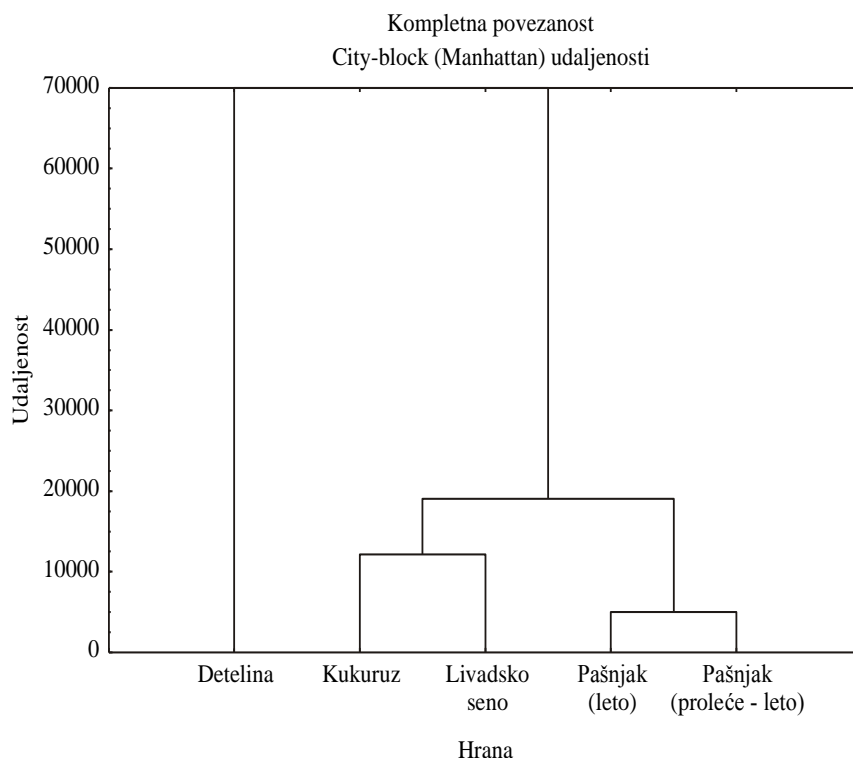
## **Klaster analiza (CA) i analiza glavnih komponentata (PCA) sastava hrane za životinje**

Slika 27 prikazuje dendogram klaster analize uzoraka različite hrane u ishrani magarice balkanske rase, koje su grupisane tako da se slične promenljive nađu u istoj klasi. Dendogram pokazuje komparativnu analizu za sastav pašnjaka (proleće/jesen), pašnjaka (leto), livadsko seno (jesen/zima), detelinu (proleće) i kukuruz (cela sezona).

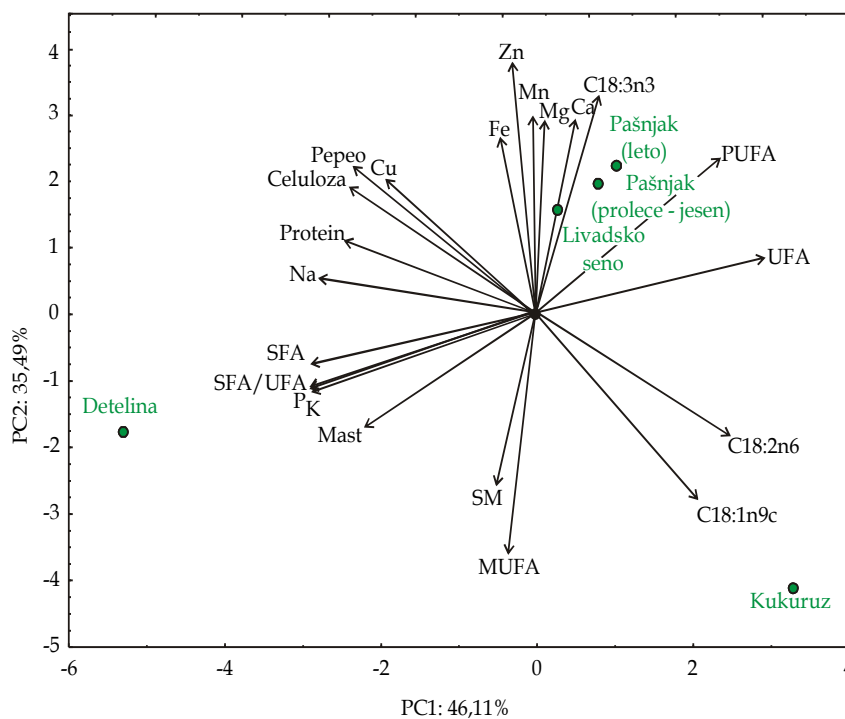
Na dendogramu (slika 27) se primećuju tri odvojena klastera: desni koji obuhvata uzorke za prehranu sa pašnjaka u proleće i leto, (povećane vrednosti polinezasićenih, nezasićenih masnih kiselina i minerala), srednja grupa koja obuhvata livadsko seno i kukuruz i desni klaster koji obuhvata uzorke za ishranu detelinom (povećane koncentracije zasićenih masnih kiselina, odnosa zasićenih/nezasićenih masnih kiselina, P, K, Na i masti). Uočena je znatna udaljenost između trećeg i druga dva klastera (oko 50000), dok je udaljenost između prvog i drugog klastera iznosila oko 8000.

Kvalitativni rezultati za analizu glavnih komponenta sastava masnih kiselina prikazani su na biplot slici 28. Rezultati pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 81,60% ukupne varijanse i da se to može smatrati dovoljnim za prikazivanje celokupnog seta eksperimentalnih podataka.

Sadržaj proteina čini 6,51% ukupne varijanse, dok sadržaj ostalih komponentata celuloza, P, Na, K, zasićene masne kiseline, odnos zasićenih/nezasićenih masnih kiselina iznosi redom 6,14%, 8,87%, 8,34%, 8,92% i ima najizraženiji negativni uticaj na računanje prve glavne komponente. Nezasićene masne kiseline (9,30%) i C18:2 n6 (6,68%) imaju najpozitivniji uticaj na računanje prve glavne komponente. Promenljive Ca (koja pokazuje 7,47% ukupne varijanse, računato na osnovu korelacije), Mg (7,22%), Fe (6,01%), Zn (12,16%), Mn (7,63%) i C18:3 n3 (9,22%) imale su najizraženiji pozitivan uticaj na računanje druge glavne komponente, a mononezasićene masne kiseline (11,12% od ukupne varijanse) i masne kiseline C18:1 n9 (6,80%) imale su najizraženiji negativan uticaj na računanje druge glavne komponente.



Slika 27. Dendrogram sličnosti sastava različitih vrsta hrane za magarice balkanske rase



Slika 28. Biplot grafik sastava različitih vrsta hrane za magarice balkanske rase

Skraćenice: SM-suva materija, SFA-zasićene masne kiseline, PUFA-polinezasićene masne kiseline, MUFA-mononezasićene masne kiseline



## ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja perioda laktacije i ishrane na kvalitet mleka magarice balkanske rase i poređenja sa sastavom humanog mleka može se zaključiti:

- ✓ Mleko magarice balkanske rase ima specifične hemijske karakteristike i prosečno sadrži: 9,26% suve materije, 6,50% laktoze, 1,63% proteina, 0,61% mlečne masti, 0,51% pepela, a energetska vrednost iznosi 160,86 kJ/100ml.
- ✓ Udeo kazeina u ukupnim proteinima mleka magarice balkanske rase tokom laktacije prosečno iznosi 39,95%, dok je udeo proteina surutke 58,94%. Odnos kazeina i proteina surutke je 0,68.
- ✓ Metodom kapilarne elektroforeze identifikovane su proteinske frakcije:  $\alpha_1$ -kazein,  $\alpha_2$ -kazein,  $\beta$ -kazein (A, F),  $\alpha$ -laktalbumin (A, C),  $\beta$ -laktoglobulin, lizozim, laktoferin, serum albumin i imunoglobulin čiji sadržaj opada tokom perioda laktacije.  $\alpha$ -laktalbumin i lizozim su najzastupljenije proteinske frakcije u mleku magarice balkanske rase. Sadržaj  $\alpha$ -laktalbumina se kreće od 3,09 g/l do 1,99 g/l, a lizozima varira od 1,04 g/l do 2,97 g/l. Laktoferin i imunoglobulin su frakcije sa najmanjim udelom u mleku magarice balkanske rase.
- ✓ Sadržaj mlečne masti raste tokom perioda laktacije i dostiže najveću vrednost 1,06 % 100. dana laktacije. Dominantne masne kiseline u mleku magarice balkanske rase tokom laktacije su oleinska (C18:1 n9) sa prosečnim udelom 22,50% i palmitinska kiselina (C16:0) sa udelom od 18,72%. Udeo linolne kiseline (C18:2 n6) kreće se u opsegu od 7,08%, do 9,69%, a udeo  $\alpha$ -linoleinske kiseline (C18:3 n3) u ukupnim masnim kiselinama varira od 5,85% do 7,83% Udeo



zasićenih masnih kiselina u mleku magarice iznosi 50,6%, dok udeo mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina je 27,21% i 15,47%, respektivno

- ✓ Prosečan sadržaj minerala u mleku magarice iznosi redom: kalcijum 158,39 mg/100ml, kalijum 47,92 mg/100ml, fosfor 47,92 mg/100ml, magnezijum 7,38 mg/100ml, natrijum 29,34 mg/100 ml, kalijum 115,42 mg/100ml i cink 0,43 mg/100ml.
- ✓ Prosečan sadržaj suve materije i pepela mleka magarice niži je za 1,2% u odnosu na humano mleko. Sadržaj proteina u mleku magarice je dva puta veći u odnosu na humano mleko, dok je sadržaj mlečne masti oko 5 puta veći u humanom mleku u poređenju sa mlekom magarice. Odnos kazeina i proteina surutke kreće se od 0,68 do 0,75 u mleku magarice, dok u humanom mleku varira od 0,59 do 0,70. Zasićene masne kiseline imaju rastući trend tokom laktacije u mleku magarice balkanske rase, kao i u humanom mleku. Sadržaj  $\alpha$ -linoleinske kiseline (C18:3 n3) je oko 2,5 puta veći u mleku magarice u odnosu na humano mleko. U humanom mleku je oko 60 puta veći udeo n6 masnih kiselina u odnosu na n3 masne kiseline tokom analiziranog perioda laktacije u mleku magarice.
- ✓ Sadržaj laktoze iznosi 7,08% u mleku magarice, odnosno 7,35% u humanom mleku i ne menja se značajno tokom analiziranog perioda laktacije. Prosečan sadržaj minerala (Ca, P, Mg, Na i K) znatno je veći u mleku magarice balkanske rase u odnosu na humano mleko.
- ✓ Visok sadržaj vitamina C utvrđen je u obe vrste mleka: 27,20  $\mu$ g/ml (mleko magarice) i 31,03  $\mu$ g/ml (humano mleko). Mleko magarice ima veći sadržaj vitamina A i E u odnosu na humano mleko, što je doprinelo i većoj antioksidativnoj aktivnosti mleku magarice u odnosu na humano mleko.
- ✓ Floristički sastav hrane za životinje doprineo je da hemijski sastav mleka magarice balkanske rase varira tokom sezone. Sadržaj suve materije, proteina, masti i minerala (Mg, Cu, Zn, Mn i K) u hrani za životinje tokom sezone proleće/jesen je veći u odnosu na letnji period ishrane životinje. Najveći sadržaj proteina celuloze, pepela i masti je u detelini koja je takođe izuzetno bogat izvor

minerala: P, K, Na i Ca. Najveći udeo mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina ima hrana za životinje u sezoni proleće/leto. Udeo zasićenih masnih kiselina je najveći u livadskom senu i kukuruzu tokom zime.

- ✓ Porast sadržaja proteina, laktoze, mononezasićenih, polinezasićenih i C18:3 n3 masnih kiselina je u mleku magarice u toku proleća. Sadržaj mlečne masti povećava se tokom leta i tokom zime na kraju laktacije. Sadržaj suve materije i laktoze u mleku magarice balkanske rase najveći je tokom kraja jeseni i početkom zime.



## LITERATURA

- Aganga, A. A.; Adogla-Bessa, T.; Omphile, U. J.; Tshireletso, K. (2000). Significance of browses in the nutrition of Tswana goats. *Arch. Zootec* 49 (188): 469-480
- Aghsaghali, A. M., Fathi, H. (2012). Lactose in ruminants feeding: A review. *Ann Biol Res* 3(1):645-650.
- Agustino, A., Rotunno, T., di Caterina, R., Mussio, A. (2002). Fatty acid composition of ewe milk as affected by solar radiation and high ambient temperature. *J Dairy Res* 69:81-194.
- Alabiso, M., Giosue, C., Alicata, M. L., Mazza, F. Iannolino, G. (2009a). The effects of different milking intervals and milking times per day in jennet milk production. *Anim* 3:543-547.
- Alabiso, M., Maniaci, G., Alicata, M. L., Iannolino, G., D'Amico, A., Bauman, D. E. Giosue, C. (2009b). Effects of foal at milking and dietary supplementation with extra virgin olive oil on jennet milk production. *Ital J Anim Sci* 8: 688- 690.
- Andersson, Y., Lindquist, S., Lagerqvist, C., Hernell, O. (2000). Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum Dev* 59 (2):95-105.
- AOAC Official Method 978.10:2000-Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food-Gravimetric Method
- Arsić, A., Prekajski, N., Vučić, V., Tepšić, J., Popović, T., Vrvic, M., Glibetić, M. (2009). Milk in human nutrition: comparison of fatty acid profiles. *Acta Vet* 59:569-578.
- Atkinson, R.L., Kratzer, F.H., Stewart, G.F. (1957). Lactose in animal and human feeding: a review. *J Dairy Sci* 40: 1114-1132.

- Barłowska, J. (2007). Nutritional value and technological usability of milk from cows of 7 breeds maintained in Poland. Post-DSc dissertation. Lublin, Poland: Agriculture Academy in Lublin. Available from Univ. of Life Sciences in Lublin.
- Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J. (2011). Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Compr Rev Food Sci F* 10:291-302.
- Bates, C. J., Prentice, A. (1994). Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharm Therapy* 62, 193-220.
- Bergmeyer, H.U. (1988). *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Vol. VI, VCH Publishers, New York.
- Bilandžić, N., Marija, S., Đokić, M., Kolanović, B. S., Varenina, I., Božić, Đ., Končurat, A. (2014). Differences of the essential mineral element levels in the milk of Croatian Coldblood horse and Littoral-Dinaric donkey. *Mljekarstvo* 64 (1):12-18.
- Bilić, V. (2012). Iskorišćavanje lucerke za spravljanje sena. *Aktuelni savetnik*, Novi Sad, 7-11.
- Burumini, D. (2012). Investigation on donkey milk protein fractions: in vitro antimicrobial, antiviral and anti-proliferative activities and casein separation by cation exchange chromatography. Doctoral thesis, Università degli studi di Catania, Italy.
- Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G. (2000). Allergenicity of mares milk in children with cows milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 105 (5):1031-1054.
- Bylund, G. (2003). *Dairy Processing Handbook*. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, pp. 361-374.
- Čagalj, M., Brezovečki, A. (2013). *Kemijski sastav, fizikalna svojstva i higijenska kvaliteta kobiljeg mlijeka Hravatskog Hladnokrvnjaka*. Rad za Rektorovu nagradu. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Zagreb.
- Calil, V. M. L. T., Falcão, M. C. (2003). Composition of human milk: the ideal food *Rev Med* 82: 1-10.
- Čalović, D., Ocokoljić, M., Petković, O. D. (2011). Allochthonous woody taxa in Zasavica ecosystem, *Biol Nyssana* 2 (1): 39-44.
- Carić, M., Milanović, S. (1997). *Topljeni sir*. Nauka, Beograd, p. 165.

- Carpo, B.G., Verallo-Rowell, V.M., Kabara, J. (2007). Novel antibacterial activity of monolaurin compared with conventional antibiotics against organisms from skin infections: an in vitro study. *J Drugs Dermatol* 6 :991-998.
- Carroccio, A., Cavataio, F., Montaldo, G., D'Amico, D., Alabrese, L., Iacono, G. (2000). Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatments. *Clin Exp Allergy* 30:1597-1603.
- Cavalcante, P. H., Silva, A. C. C., Sakamoto, S. M., Blanco, B. S. (2012). Serum protein fractions in Brazilian-breed donkeys using agarose gel electrophoresis. *Turk J Vet Anim Sci* 36(1): 9-12.
- Cavallarin, L., Giribaldi, M., de los Dolores Soto, M. (2015). A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in North Western Italy. *Food Control* 50:230-235.
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin-technological implications and processing: a review. *Int Dairy J* 16: 1229-1240.
- Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E. Grazia, L. (2005). Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactic acid bacteria. *Lait* 85: 481-490.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. (2001). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest Prod Sci* 70: 31-48.
- Chiofalo B., Salimei E., Chiofalo L. (2003). Acidi grassi nel latte di asina: proprietà nutrizionali ed extranutrizionali. *Large Anim Rev* 6: 21-26.
- Chiofalo, B. Salimei, E. (2006). In: Proc 2nd European Equine Health & Nutrition Congress, pp. 17-18.
- Chiofalo, B., Azzara, V., Liotta, L., Chiofalo, L. (2004). The chemical and physical parameters of Ragusana ass's milk during lactation, Proceedings of the 6<sup>th</sup> Congress "New findings in equine practice", Campobasso, Italy 77-84.
- Chiofalo, B., Drogoul, C. Salimei, E. (2006b). Other utilisation of mare's and ass's milk. In Proc. 3<sup>rd</sup> European Workshop on Equine Nutrition, Campobasso, Italy. pp. 133-147.

- Chiofalo, B., L. Biondi, M. Ziino, P. Pennisi, F. Salvo, A. Priolo. (1996). Variazione della composizione acidica del latte di pecore Comisane alimentate con un unifeed secco. *Riv. Ital. di Scienza dell'Alimentazione* 25 (3): 261-266.
- Chiofalo, B., Piccolo, D., Riolo, E. B., Maglieri, C., Salimei, E. (2006a). Different fibre sources in dairy ass's diet. I. Effects on milk fatty acid composition. Dans N. Miraglia, & Martin-Rosset, *Nutrition and Feeding of the Broodmare*, 120. Wageningen Academic Publishers ed., Campobasso, Italie 175-176.
- Chiofalo, B., Salimei, E. Chiofalo, L. (2001). Ass's milk: exploitation of an alimentary resource. *Riv. Folium* 1: 235-241.
- Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 12-14.
- Clutton-Brock, J. (1987). *A natural history of domestic mammals*, University Press, Cambridge.
- Cocchi, M. (2000). Acido docosaesaenoico (DHA) e funzione visiva. *Prog Nutr* 2: 43-51.
- Collomb, M., Butikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J. O. (2002). Correlation between fatty acids in cow's milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *Int. Dairy J* 12:661-666.
- Constanzo, A. (2013). Characterization of donkey milk proteins by a proteomic approach. Dottorato di ricerca In: *Scienze e tecnologie delle produzioni. Agro-Alimentari*.
- Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentinno, E., Nanni, M., Ranieri, P., Belli Blanes, R. Grazia, L. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Ann Microb* 52:55-60.
- Cosentino, C., Freschi, P., Paolino, R. (2010). Biodiversità zootecnica nei territori montani: l'allevamento asinino, una possibile alternativa. *Quaderno SoZooAlp* 6: 231-238.

- Criscione, A., Cunsolo, V., Bordonaro, S., Guastella, A., Saletti, R., Zuccaro, A., D'Urso, G. Marletta, D. (2009). Donkey's milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *Int Dairy J* 19:190-197.
- Cunsolo, V., Cairone, E., Fontanini, D., Criscione, A., Muccilli, V., Saletti, R., Fotia, S. (2009). Sequence determination of  $\alpha$ s1-casein isoforms from donkey by mass spectrometric methods. *J Mass Spectrom* 44: 1742-1753.
- D'Alessandro, A. G., Tesse, R., Montagna, C., De Leo, V., Addante, N., Armenio, L. Martemucci, G. (2011a). Production of donkey milk for human feeding: changes of gross composition and energetic value during lactation in Martina Franca breed. *Maced J Anim Sci* 1: 235-237.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Jirillo E., De Leo V. (2011b). Major whey proteins in donkey's milk: effect of season and lactation stage. Implications for potential dietary interventions in human diseases. *Immunopharm Immunotoxi* 33(2): 259-265.
- Devle, H., Vetti, I., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E. O., Vegarud, G., Ekeberg, D. (2012). A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and nonruminant milk. *Eur J Lipid Sci Tech* 114: 1036-1043.
- Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R. F., Scollan N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Tech* 131:168-206.
- Domaćinović, M., Antunović, Z., Mijić, P., Šperanda, M., Kralik, D., Đidara, M., Zmaić, K. (2008). Proizvodnja mlijeka, Poljoprivredni Fakultet u Osijeku, Osjek.
- Doreau, M. (1991). Le lait de jument. INRA Productions. *Animal* 4:297-302.
- Doreau, M., Martin-Rosset, W. (2002). Dairy Animals I. Horse. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Roginski H., Fuquay J.W. Fox P.F. Eds. Academic Press, London (GBR) 1: 630-637.
- Drogoul, C., Prevost, H., Maubois, J. L. (1992). Le lait de juments: UN produit, une filiere a developer? 18eme Journee d'Etude CREOPA, Paris, France, 37-51.
- Duchén, K. (2001). Are human milk polyunsaturated fatty acids (PUFA) related to atopy in the mother and her child? *Allergy* 56: 587-592.
- Đukić, M. (2008). Oksidativni stres-kliničko-dijagnostički značaj. Mono i Manjana, Beograd.

- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Metro, F., Haertlě, M. (2005). Peptic hydrolysis of ovine  $\beta$ -lactoglobulin. Exceptional susceptibility of native ovine  $\beta$ -lactoglobulin to pepsinolysis. *Int Dairy J* 15 (1):17-27.
- Epstein, H. (1984). Ass, mule and Onager. In Mason IL (ed) *Evolution of Domesticated Animals*. Longman, London and New York.
- Fang, Y., Yang, S. Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutr* 18: 872-879.
- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Piloni, R., Mariani, P., Salimei, E. (2011). Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *Int Dairy J* 20:12-16.
- Fantuz, F., Maglieri, C., Lebboroni, G. Salimei, E. (2009). Ca, Mg, Zn, Fe, Cu and Mn content of ass's milk. *Ital J Anim Sci* 8:703-705.
- Fantuz, F., Polidori, P., Maglieri, C., Varisco, G., Vincenzetti, S. Salimei, E. (2006). Ass's milk nitrogen distribution: effects of different dietary fibre source. In: *Nutrition and Feeding of Broodmare*, N. Miraglia & W. Martin & Rosset (eds.), Blackwell Publishing Professional, Oxford, 181-185.
- FAO DAD-IS. (2009). Domestic animal diversity information system: breeds. (<http://dad.fao.org>)
- FAO STAT Accessed June 20, 2012, <http://faostat3.fao.org/home/index.html>
- Fiećko, R. P., Tomczyński, R., Świstowska, A., Borejszo, Z., Kokoszko, E., Smoczyńska, K. (2009). Effect of mare's breed on the fatty acid composition of milk fat. *Czech J Anim Sci* 54 (9): 403-407.
- Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., and Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Curr Pharm Design* 9: 1257 - 1275.
- Flowers, G., A. A. Ghazaleh, A., Ibrahim, S. (2008). Optimizing the levels of linseed oil in grazing cows' diet to maximize conjugated linoleic acid in milk. *J Dairy Sci* 1: 90-92.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Fox, P. V., McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic & Professional, London.



- Francois, C.A., Connor, S.L., Bolewicz, L.C., Connor, W.E. (2003). Supplementing lactating women with flaxseed oil does not increase docosahexaenoic acid in their milk. *Am J Clin Nutr* 77:226–233.
- Gastaldi, G., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo, A., Medana, C., Baiocchi, C., Mussap, M., Galvano, F., Conti, A. (2010). Donkeys milk detailed lipid composition. *Front Biosci* E2:537-546.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev* 45 (4):473-483.
- Gaucheron, F. (2011). Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *J Am Coll Nutr* 50 (5):400-409.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S., Curini, R. (2013). Comprehensive Profiling of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Milk from Different Animal Species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation. *J Agric Food Chem.* 61(8):1628-1639.
- German, J. B., Dillard, C.J. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46 (1): 57-92.
- Giosuè, C., Alabiso, M., Russo, G., Alicata, M.L., Torrisi, C. (2008). Jennet milk production during the lactation in a Sicilian farming system. *Anim* 2 (10):1491-1495.
- Goldfarb, M.F., Salvatore, M.S. (1989). Two-dimensional electrophoretic analysis of human milks proteins. *Electrophoresis* 10: 67-70.
- Grbeša, D. (2008). Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Grdović, S., Petrujkić, B., Šefer, D., Mirilović, M., Dimitrijević, V., Stanimirović, Z. (2013). Hranljiva vrednost pašnjaka Valjevac-Rezervat prirode Zasavica. *Acta Vet,* 63(5-6):699-706.
- Grubić, G. (2003). Ishrana konja. Univerzitet u Beogradu. *Monografija*, Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Guo, H. Y., Pang, K., Zhang, X. Y., Zhao, L., Chen, S. W., Dong, M. L. Ren, F. Z. (2007). Composition, physiological properties, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. *J Dairy Sci* 90:1635-1643.
- Guy, P. A., Fenaille, F. (2006). Contribution of mass spectrometry to assess quality of milk-based products. *Mass Spectrom Rev* 25:290–326.

- Haenlein, G.F.W., Wendorff, W.L. (2006). Sheep milkproduction and utilization of sheep milk. In: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Y.W. Park & G.F.W.Haenlein (eds.), Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK and Ames, Iowa, USA, 137-194.
- Halliwell, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 46:531-542.
- Halliwell, B. Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed, Oxford University Press, Oxford.
- Hawke, J.C., Taylor, M.W. (1983). Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. In: *Development in dairy chemistry-2, Lipids*, Fox, P.F. (eds.), *Applied Sci* 80: 37-81.
- Herrouin, M., Mollé, D., Fauquant, J., Ballestra, F., Maubois, J. L., Léonil, J. (2000). New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *J Protein Chem* 19: 105-115
- Huszár, K. P. (2008). Protein changes of various types of milk as affected by high hydrostatic pressure processing, PhD Thesis, Faculty of Food Science, Corvinus University of Budapest.
- Iacono, G., Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Soresi, M. Balsamo, V. (1992). Use of ass' milk in multiple food allergies. *J Pediatr Gastroenter Nutr* 14:177-181.
- IDF 105: 2008 Milk determination of fat. Brussels, Belgium.
- IDF 119:2007 Milk and milk products. Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents - Atomic absorption spectrometric method.
- IDF 20-5:2001 Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. Brussels, Belgium.
- IDF 21A:1982 Milk, cream and evaporated milk. Determination of the total solids content (Reference Method). Brussels, Belgium.
- IDF 42:2006 Milk. Determination of total phosphorus content. Method using molecular absorption spectrometry.
- IDF 90:1979 Rennet caseins and caseinates. Determination of ash (Reference method). Brussels, Belgium.
- Inglstad, R.A., Devold, T.G., Eriksen, E.K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K. H. (2010). Comparison of the digestion of casein and whey proteins in equine, bovine,

caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci Technol* 90: 549-560.

- Innis, S. M. (2007). Dietary *n*-3 fatty acids and brain development. *J Nutr* 137:855-859.
- ISO 11869:1997 Methods for analysis of milk-based products Determination of titratable acidity of yogurt (potentiometric method).
- Ivanković, A., Ramljak, J., Tulina, I., Antunac, N., Basic, I., Kevala, N. Konjacic, M. (2009). Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littorl-Dinaric ass. *Lact Milk Hygi Quali* 59:107-113.
- Jensen, R.G. (1996). The lipids of human milk. *Prog Lip Res* 35:53-92.
- Jirillo, F., Magrone, T. (2014). Anti-inflammatory and Anti-Allergic Properties of Donkey's and Goat's Milk. *Endoc Metabol Immune Diso - Drug Targets* 14:27-37.
- Jordana, J., Folch, P. (1996). The endangered Catalonian donkey breed: the main ancestor of Ammerican Ass or mammoth. *J Equine Veter Sci* 16(10):436-441.
- Kalač, P., Samková, E. (2010). The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J Anim Sci* 55 (12): 521-537
- Khanal, R.C., Olson, K.C. (2004). Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Milk, Meat, and Egg: A Review. *Pak J Nutr* 3 (2): 82-98.
- Korhonen, H. J. (2009). Bioactive components in bovine milk. In: *Bioactive components in milk and dairy products, Chapter 2*, Y. W. Park (eds.), Iowa, USA, 25-36.
- Krešić, G., Dujmović, M., Mandić, M., Mrduljaš, N. (2013a). Majčino mlijeko: sastav masnih kiselina i prehrana dojilja. *Mljekarstvo* 63(3):158-171.
- Krešić, G., Dumović, M., Mandić, M.L., Delaš, I. (2013b). Dietary and breast milk Trans fatty acids seen in Croatian breastfeeding women from Adriatic region. *J Food Nutr Res* 3:156-163.
- Kugler, W., Grunenfelder, H. P., Broxham, E. (2008). *Donkey Breeds in Europe: Inventory, Description, Need for Action, Conservation; Report 2007/2008*. St. Gallen, Switzerland: Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe.
- Kumar, S., Chouhan, V. S., Sanghi, A., Teotia, U. V. S. (2013). Antioxidative effect of yak milk caseinates hydrolyzed with three different proteases. *Vet World* 6: 799-802.
- Kuwata, H., Yip, T. T., Yip, C. L., Tomita, M., Hutchens, T. W. (1998). Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in

serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (3): 764-773.

- Liang, L., Tajmir-Riahi, H.A., Subirade, M. (2008). Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules* 9:50-56.
- Lima, M. S. R., Dimenstein, R., Ribeiro, K. D.S. (2014). Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J Pediatr* 90(5):440-448.
- Lindmark-Månsson, H., Akesson B. (2000). Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 84 (1):103-110.
- Littauer, M. A., Crouwel, J. H. (1979). *Wheeled Vehicles and Ridden Animals in the Ancient Near East*. E. J Brill, Leiden.
- Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Amer J Clin Nutr* 77: 1537S-1543S.
- López-Expósito I, Recio I. (2008). Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Adv Exp Med Biol* 606:271-293.
- Luna, P., Bach, A., Juarez, M., Fuente, M. A. (2008). Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *Int. Dairy J* 18:99-107.
- Luthfor, A., Islam, S.K.N., Khan, N.I. and Nahid, S.N. (2004). Vitamin C Content in Human Milk (Colostrum, Transitional and Mature) and Serum of a Sample of Bangladeshi Mothers. *Mal J Nutr* 10(1): 1-4.
- Maćej, O., Jovanović, S., Barać, M. (2007). *Proteini mleka*. Monografija. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Macias C., Schweigert F. J. (2001). Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab* 45:82-5.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A. Mariani, P. (2002). Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *Int Dairy J* 12:869-877.
- Mansueto, P., Iacono, G., Taormina, G., Sedita, A., D'Alcamo, A., Adragna, F., Randazzo, G., Carta, M., Batista, G., Carroccio, A. (2013). Ass's milk in allergy to cow's milk protein: A review. *Acta Medica Mediterr* 29:153-160.

- Mapekula, M., Chimony, M., Mapiye, C., Dzama, K. (2011). Fatty acid, amino acid and mineral composition of milk from Nguni and local crossbred cows in South Africa. *J Food Compos Anal* 24:529-536.
- Marković, J., Ignjatović, S., Radović, J., Lugić, Z. (2007). Uticaj faze razvića na sadržaj makro i mikroelemenata u lucerki i crvenoj detelini. Zbornik radova, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 44 (1): 401-406.
- Matremucci, G. D' Alessandro, A. G. (2012). Fat content, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition. *Lipids Health Dis* 11 (113):1-14.
- Martinelli, A.G., Garrido, A.C., Forasiepi, A.M., Paz, E.R., Gurovich, Y. (2007). Notes on fossil remains from the Early Cretaceous Lohan Cura Formation, Neuquén Province, Argentina. *Gondwana Res* 11: 357-552.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F. (2014). Amiata donkeys: Fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. *Ital J Anim Sci* 13 (1): 123-126.
- Martini, M. Salari, F., Altomonte, I. (2013a). The macrostructure of milk lipids: the fat globules. *Crit. Rev. Food Sci.* DOI: 10.1080/10408398.2012.758626
- Martini, M., Altomonte, I., Manica, E., Salari, F. (2015). Changes in donkey milk lipids in relation to season and lactation. *J Food Compos Anal* 41:30-34.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F. (2013b). Evaluation of the fatty acid profile from the core and membrane of fat globules in ewe's milk during lactation. *Lebensm Wiss Technol* 50:253-258.
- Martuzzi, F. A., Summer, P. Formaggioni P., Mariani P. (2002). Mare milk at drying - off: chimico-physical characteristics, nitrogen composition and mineral elements in Italian Saddle and Haflinger nursing mares. Proc. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of EAAP, Cairo, pp.6.
- Mayer, H., Fiechter, G. (2013). Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. *Int Dairy J* 24:57-63.
- McDonalds, P. Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D. Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. (2014). *Animal Nutrition*. Seventh Edition. Pearson, Harlow, Essex, UK.

- Mendoza, B. R., Pons, S. M., Bargalló, A. I. C., López-Sabater, M. C. (2003). Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *J Chromatogra A* 1018:197-202.
- Milonis, E., Polidori, P. (2011). Assina milk production characteristics and management of the asinine, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 1-226.
- Miraglia, N., Martin-Rosset, W. (2006). Nutrition and Feeding of Broodmare, 120. Wageningen Academic Publishers ed., Campobasso, Italie, 179-180.
- Miranda, G., Maheć, M. F., Leroux, C., & Martin, P. (2004). Proteomic tools to characterize the protein fractions of *Equidae* milk. *Proteomics* 4: 2496-2509.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *Eur J Nutr* 47:171-182.
- Monti, G., Bertino, E., Muratore, M. C., Coscia, A., Cresi, F., Silvestro, L. (2007). Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr Allergy and Immunology* 18: 258-264.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M. (2011). Harperova ilustrirana biokemija, 28 izd. (ured. J. Lovrić, J. Sertić), Medicinska naklada, Zagreb.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. Coppola, R. (2010). Isolation of components with antimicrobial property from the donkey milk: A preliminary study. *Open Food Sci J* 4:43-47.
- Neville, M. C. (2009). Introduction: alpha-lactalbumin, a multifunctional protein that specifies lactose synthesis in the Golgi. *J Mammary Gland Biol* 14:211-212.
- Oftedal, O.T., Jenness, R., (1988). Interspecies variation in milk composition among horses, zebras and asses (*Perissodactyla: Equidae*). *J. Dairy Res* 55:57-66.
- Orlandi, M., Goracci, J., Curadi, M. C. (2003). Fat composition of mare's milk reference to human nutrition. *Titolare di contratto di Ricerca, Dipartimento di Produzioni Animali*, pp.97-105.
- Paolicelli, F. (2005). Impiego del latte di asina in campo medico, alimentare e cosmetico. 1° Convegno Nazionale sull'Asino, Grosseto, pp. 28-29.
- Park, Y. W. (2009). Bioactive components in goat milk. In: *Bioactive components in milk and dairy products, Chapter 3*, Y. W. Park (eds.), Iowa, USA, 15-42.

- Park, Y. W., Zhang, H., Zhang, B. Zhang, H. (2006). Mare milk. In: *Handbook of milk of non-bovine mammals*, 1st edition, Y. W. Park, G. F. Haenlein, & J. W. Son (eds.), Blackwell Publishing, UK, 275-296.
- Park, Y.W., Juarez, M. Ramosc, Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res* 68: 88-113.
- Park. Y.W. (2013). Effect of five years long-term frozen storage on sensory quality of Monterey Jack caprine milk cheese. *Small Rumin Res* 109:136-140.
- Pearson, R. A. (2005). Nutrition and Feeding of Donkeys. Dans N. S. Mathews, T. S. Taylor, *Vet Care Donkeys*, International Veterinary Information Service ed., Ithaca NY, USA. 21.
- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr Pharm Des* 9:1225-1238.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042.
- Pinnola, S. (2009). Aspetti quali-quantitativi del latte d'asina. Tesi di laurea vecchio ordinamento, Medicina Vet, Facolta, Pisa, Italia.
- Polidori P., Vincenzetti S. (2010). Differences of protein fractions among fresh, frozen and powdered donkey milk. *Food Nutr Agric* 2(1):56-60.
- Polidori, P., Vincenzetti, S. (2007). Differences of protein fractions among fresh, frozen and powdered donkey milk. *Recent patents on Food, Nutr Agri* 2 (1):56-60.
- Polidori, P., Vincenzetti, S. (2012). Protein profile characterization of donkey milk, In book: *Milk Protein, Chapter: 8*, Publisher: InTech, 215-232.
- Popović, B. V., Delaš, I., Međugorac, S., Vrančić, M. P., Bilušić, K. (2014). Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk, *Int J Dairy Techn* 67(3):94-401.
- Porter, J. W. G. (1978). Milk as a source of lactose, vitamins and minerals. *Proc Nutr Soc* 37:225-230.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Chem* 53: 4290-4302.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rum Res* 79:57-72.

- Restani P., Beretta B., Fiocchi A., Ballabio C., Galli C. L. (2002). Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann Allerg Asthma Imm* 89(1):11-15.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., Wichers, H. J. (2001a). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agr Food Chem* 49 (1): 295-302.
- Rival, S. G., Fornaroli, S. Boeriu, C. G. Wichers, H. J. (2001b). Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J Agr Food Chem* 49(1): 287-294.
- Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G. (2004). Composition and characteristics of ass's milk. *Anim Res* 53:67-78.
- Salimei, E., Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *Int Dairy J* 24 130-142.
- Samkova, E., Špička, J., Pešek, M., Pelikánová, T., Hanuš, O. (2012). Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *S Afr J Anim Sci* 42 (2): 83-100.
- Shamsia, S. M. (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *Int J Gene Mol Biol* 1: 52-58.
- Sherman, M. P., Bennett, S. H., Hwang, F. F., Yu, C. (2004). Neonatal small bowel epithelia: enhancing antibacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *BioMetals* 17: 285 – 289.
- Shingfield, K.J., Salo-Väänänen, P., Pahkala, E., Tojvonen, V., Jaakkola, S., Piironen, V., Huhtanen, P. (2005). Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cow's milk. *J Dairy Res* 72:349-361
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharm* 56:365-379.
- Sl. glasnik RS, br. 85/2013. Pravilniku o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane.
- Sl. list SFRJ, br. 15/1987. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane.
- Službeni list RS, br. 38/2010. Pravilnik o listi genetskih rezervi domaćih životinja, autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa.



- SRPS EN ISO 5983-2:2010 Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content - Part 2: Block digestion and steam distillation method, Institute for Standardization of Serbia, Belgrade.
- SRPS EN ISO 6869:2004 Animal feeding stuffs – Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc – Method using atomic absorption spectrometry, Institute for Standardization of Serbia, Belgrade.
- SRPS EN ISO 8968-1:2008 Mleko - Određivanje sadržaja azota - Deo 1: Metoda po Kjeldalu
- SRPS ISO 5984:2002 Animal feeding stuffs – Determination of crude ash, Institute for Standardization of Serbia, Belgrade.
- SRPS ISO 6492:2000 Animal feeding stuffs – Determination of fat content. Institute for Standardization of Serbia, Belgrade.
- SRPS ISO 6496:2001 Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content. Institute for Standardization of Serbia, Belgrade.
- STATISTICA (Data Analyses Software System), v.10.0 (2010). Stat-Soft, Inc.USA ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).
- Statistički Zavod Srbije, 2013, ([www.stat.gov.rs](http://www.stat.gov.rs)), Accessed on August 26, 2013;
- Stender, S., Astrup, A., Dyerberg, J. (2008). Ruminant and industrially produced structure and nutritional significance. *Int Dairy J* 20:609-629.
- Stojanović, S. (2012). Kvalitet mesa i mleka Podolskog govečeta, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Summer, A., Sabbioni, A., Formaggioni, P., Mariani, P. (2004). Trend in ash and mineral element content of milk from Haflinger nursing mares throughout six lactation months. *Livest Prod Sci* 88:55-62.
- Sun, T., Tanumihardjo, S.A., (2007). An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci* 72 (9):R159–R165.
- Susmita, R., Pubali, D., Sastinath, G. (2012). Comparative evaluation of essential fatty acid composition of mothers' milk of some urban and suburban regions of West Bengal, India. *Int J Food Sci Nutr* 63: 895-901.
- Sutton, L. F., Alston-Mills, B. (2006). Beta-lactoglobulin as a potential modulator of intestinal activity and morphology in neonatal piglets. *Anat Rec* 288A (6): 601-608.

- Suzuki, Y. A., Lopez, V., Lönnnerdal, B. (2005). Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 62 (22): 2560-2575.
- Szabo, E., Günther, B., Beermann, C., Weyermann, M., Brenner, H., Rothenbacher, D., Decsi, T. (2010). Fatty Acid Profile Comparisons in Human Milk Sampled From the Same Mothers at the Sixth Week and the Sixth Month of Lactation. *J Pediatr Gastr Nutr* 50 (3):316-320.
- Šarić, Lj., Šarić, B., Mandić, A., Tomić, J., Torbica, A., Nedeljković, N., Ikonić, B. (2014). Antibacterial activity of donkey milk against *Salmonella*. *Agro Food Industry Hi Tech* 25(5):30-34.
- Šarić, Lj., Šarić, B., Mandić, A., Torbica, A., Tomić, J., Cvetković, D., Okanović, Đ. (2012): Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *Int Dairy J* 25: 142-146.
- Tadesse, T. (2010). Investigation on nutritional and microbiological properties of Abyssinian donkey milk from Adea Woreda, Addis Ababa University. URL. <http://etd.aau.edu.et/dspace/bitstream/123456789/2678/1/Thesis%20cover%20page.pdf> Accessed 15.03.12.
- Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D'Alessandro, A.G, Amati, L., Jirillo, E. (2007). Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 13: 3711-3717.
- Tesse R, D'Alessandro, A. G., Paglialunga, C., Rizzi, D., Bozza, S., Martemucci, G., Armenio, L. (2008). Does donkey's milk may represent an alternative dietary support in patients with cow's milk-induced IgE-mediated and non- IgE- mediated disorders? Case reports [abstract]. Barcelona, Spain: In Proceedings of the XXVII Congress European Academy of Allergology and Clinical Immunology; p.467.
- Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D. (2011). Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int Dairy J* 21:158-165.
- Trailović, R. (2009). Filogenetska proučavanja domaćeg brdskog konja na osnovu genetskih markera. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu: Fakultet veterinarske medicine, Beograd 2009.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012). Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, p. 510.

- Treweek, T. M. (2012). Alpha-casein as a molecular chaperone. In: *Milk Protein*, W. L. Hurley (eds.), Rijeka, Croatia: InTech.Fox, 85-119.
- Uniacke-Lowe, T. (2011). Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. PhD thesis. Cork: University College Cork.
- Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, P. F. (2010). Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *Int Dairy J* 20: 609-629.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., Telser, I. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
- Varian Australia Pty Ltd., (1989). Flame absorption spectrometry. Analytical methods. Mulgrave, Vic., Australia.
- Vasiljević, S., Milić, D., Mikić, A. (2009). Chemical attributes and quality improvement of forage legumes. *Biotechn Anim Husb* 25: (5-6): 493-504
- Vincenzetti, S., Amici A., Pucciarelli, S., Vita, A., Micozzi, D., Carpi, F. M., Polzonetti, V., Natalini, P., Polidori, P. (2012). A Proteomic Study on Donkey Milk. *Biochem Anal Biochem* 1:1-8.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P. L., Cammertoni, N., Fantuz, F. Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chem* 106:640-649.
- Vita, D., Passalacqua, G., Di Pasquale, G., Caminiti, L., Crisafulli, G., Rulli, I., Pajno, G. V. (2007). Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: crossover comparison with goat's milk. *Pediatr Allergy Immu* 18: 594-598.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J* 6:1241-1251.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J (2006). Dairy Science and Technology, Second Edition. Boca Raton, FL: CRC Press.p.782.
- Watkins, P.A (2009). Fatty acids -Metabolism: Guideline to nutritional supplements, (ured. B. Caballero), Academic Press, Salt Lake City, SAD.
- Welsch, U., Buchheim, W., Schumacher, U., Schinko, I., Patton, S. (1988). Structural, histochemical and biochemical observations on horse milk-fat-globule membranes and casein micelles. *Histoche - mistry* 88:357-365.
- Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Ann Zootech* 49 : 165-180.

- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I., Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci* 78 (4): 343-358.
- [www.amiscg.org](http://www.amiscg.org)
- [www.dairyglobalnutrition.org](http://www.dairyglobalnutrition.org)
- [www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs](http://www.polj.savetodavstvo.vojvodina.gov.rs)
- [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
- [www.zasavica.org.rs](http://www.zasavica.org.rs)
- Yamawaki, N; Yamada, M; Kanno, T, Kojima, T; Kaneko, T; Yonekubo, A. (2005). Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol* 19: 171-181.
- Zarban, A., Taheri, F., Chahkandi, T., Sharifzadeh, G., Khorashadizadeh, M. (2009). Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk. *J Clin Biochem Nutr* 45: 150-154.
- Zhang, X. Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M. L., Ren, F. Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control* 19: 1191-1195.
- Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Denić, M., Kocić, G., Jovanović, T. (2015). Antioksidansi i antioksidativni kapacitet humanog mleka. *Acta Fac Med Naissen* 32 (2): 115-125.
- Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Pavlović, R., Kocić, G., Nikolić, G. (2009). DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk. *Prehrambena industrija- Mleko i mlečni proizvodi*, 23, 45-47.