

# Mogućnost primjene moringe u proizvodima od kozjeg mlijeka

---

**Rajačić, Maja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:501782>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Maja Rajačić  
1291/USH

**MOGUĆNOST PRIMJENE  
MORINGE U PROIZVODIMA OD  
KOZJEG MLIJEKA**

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

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović prije svega na ukazanom povjerenju, strpljenju, entuzijazmu, stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji koji su uvijek bili uz mene, podržavali me u odlukama te ohrabivali i motivirali u teškim trenucima.*

*Također, hvala mom dečku, prijateljima i kolegama s fakulteta koji su uvijek bili uz mene, upotpunili studentski život te ga učinili lakšim i zabavnijim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### MOGUĆNOST PRIMJENE MORINGE U PROIZVODIMA OD KOZJEG MLIJEKA

*Maja Rajačić, 1291/USH*

**Sažetak:** Popularnost kozjeg mlijeka sve više raste, a razlog tome su njegove dijetetske i terapijske prednosti. Sastojci kozjeg mlijeka svojim osobinama (bolja probavljivost, hipoalergenost, veći puferski kapacitet, viša pH vrijednost) povoljno djeluju na zdravlje ljudi. Boljoj probavljivosti pridonose kratko i srednje lančane masne kiseline kojih kozje mlijeko sadrži više od kravljeg mlijeka. Kozje mlijeko može se obogatiti raznim biljnim ekstraktima među kojima je i *Moringa oleifera* bogatog nutritivnog sastava koji pozitivno djeluje na zdravlje ljudi. Moringa je bogata vitaminima, mineralnim tvarima, polifenolima, flavonoidima, alkaloidima, izotiocijanatima i taninima koji mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva mliječnih proizvoda. Cilj ovog diplomskog rada je opisati i analizirati metode ekstrakcije ljekovitog bilja, njihovu upotrebu u mliječnoj industriji i dati pregled mogućnosti dodatka *Moringe oleifere* u proizvode od kozjeg mlijeka te njezinu nutritivnu vrijednost i utjecaj na zdravlje.

**Ključne riječi:** mliječni proizvodi, kozje mlijeko, *Moringa oleifera*, biljni ekstrakti

**Rad sadrži:** 51 stranica, 8 slika, 12 tablica, 69 literaturnih navoda, 6 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Irena Barukčić
2. Doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović
3. Doc.dr.sc. Maja Repajić
4. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjena)

**Datum obrane:** 14. srpanj 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**University of Zagreb**

**Graduate Thesis**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Food Technology and Engineering**

**Laboratory of Technology of Milk and Milk Products**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### THE POSSIBILITY OF USING MORINGA IN GOAT MILK PRODUCTS

*Maja Rajačić, 1291/USH*

**Abstract:** The popularity of goat's milk keeps increasing and the reason for that are its dietetic and therapeutic advantages. The properties of the goat's milk ingredients (better digestibility, hypoallergenicity, higher buffer capacity, higher pH value) have a favourable effect on human health. Short and medium chain fatty acids, which are found in greater quantity in goat milk than in cow milk, contribute to better digestibility. *Moringa oleifera* has a rich nutritional composition which has a positive effect on human health. Moringa is rich in vitamins, minerals, polyphenols, flavonoids, alkaloids, isocyanates and tannins which can affect physiochemical properties of dairy products. The goal of this thesis is to describe and analyse the methods of medicinal plants extraction, their use in dairy industry and to give an overview of the possibility of adding *Moringa oleifera* in products made from goat's milk as well as to show its nutritional value and the effect it has on health.

**Keywords:** dairy products, goat's milk, *Moringa oleifera*, plant extracts

**Thesis contains:** 51 pages, 8 figures, 12 tables, 69 references, 6 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Reviewers:**

1. PhD. Irena Barukčić, Assistant professor
2. PhD. Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor
3. PhD. Maja Repajić, Assistant professor
4. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 14<sup>th</sup> 2020.

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. KOZJE MLJEKO.....	2
2.1.1. Kemijski sastav .....	2
2.1.2. Zdravstvena vrijednost.....	12
2.2. BILJNI EKSTRAKTI.....	14
2.2.1. Podjela biljnih ekstrakata.....	14
2.2.2. Metode ekstrakcije ljekovitog bilja.....	15
2.2.3. Dodatak i utjecaj biljnih ekstrakata u proizvode od kozjeg mlijeka .....	20
2.3. <i>MORINGA OLEIFERA</i> .....	22
2.3.1. <i>Moringa oleifera</i> kao izvor nutrijenata .....	25
2.3.2. <i>Moringa oleifera</i> u mliječnim proizvodima .....	31
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>34</b>
3.1. METODE I REZULTATI .....	34
3.1.1. Određivanje bioaktivnih spojeva HPLC–ESI–QTOF–MS .....	34
3.1.2. Određivanje flavonoida pomoću LC/MS .....	37
3.1.3. Određivanje masnih kiselina i tokoferola u ulju sjemena moringe .....	39
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>41</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>43</b>
<b>6. PRILOZI.....</b>	<b>51</b>



# 1. UVOD

Koza je prva udomaćena životinja, o čemu postoje dokazi koji datiraju oko 8000 godina prije Krista, a o tome svjedoče zapisi s područja nekadašnje Mezopotamije (Ganj Darech, danas poznat kao Iran), što je doprinijelo izravnoj povezanosti koza sa životom ljudi koji su razvijali drevnu civilizaciju Srednjeg Istoka. Stalno spominjanje koza u grčkoj mitologiji potvrđuje njihovu važnost u antičko doba. Tako je Zeusa hranila i odgojila koza po imenu Amalthea, čiji se rog smatrao simbolom plodnosti i obilja. Dionizije, bog vina, sisao je kozu, a njegov sin Pan imao je kozje rogove i stopala. Čak se za kožu od koza smatralo da ima čudotvorne osobine.

Kozje mlijeko ima veću prehrambenu vrijednost od kravljeg mlijeka jer sadrži veći udio kratko i srednje lančanih masnih kiselina, topljivog kalcija, fosfora, magnezija i vitamina A. Kozje mlijeko je lakše probavljivo, a ima i jače izražene baktericidne i imunološke osobine te se koristi u dijetetske i terapijske svrhe. Kako je kozje mlijeko postalo vrlo popularno, počelo se sve više koristiti za proizvodnju sira i fermentiranog mlijeka koji općenito posjeduju znatno veću nutritivnu vrijednost od nefermentiranog mlijeka.

Kao odgovor na zahtjeve potrošača i radi poboljšanja bioaktivnih svojstava mliječnih proizvoda, takvi proizvodi se obogaćuju voćem, povrćem ili biljem tijekom fermentacije. Biljni ekstrakti u mliječnim proizvodima poboljšavaju fizikalno-kemijske karakteristike, a time je i prihvatljivost takvih proizvoda veća.

Jedna od autohtonih biljaka iz Indije je *Moringa oleifera*, biljka bogata nutrijentima koji pozitivno utječu na zdravlje ljudi. U zemljama u razvoju *Moringa oleifera* se koristi kao alternativa uvoznim dodacima prehrani za liječenje i borbe protiv neuhranjenosti, naročito kod dojenčadi i dojilja, zahvaljujući svojim kemijskom sastavu..

Cilj ovog diplomskog rada je bio kroz pregled relevantne i recentne znanstvene literature opisati i analizirati metode ekstrakcije ljekovitog bilja te njihovu upotrebu u mliječnoj industriji. Isto tako cilj ovog rada je bio pomoću dostupne literature dati pregled mogućnosti dodatka *Moringe oleifere* u proizvode od kozjeg mlijeka te njezinu nutritivnu vrijednost i utjecaj na zdravlje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOZJE MLJEKO

S nutritivnog gledišta mlijeko je najkompletnija i najizbalansirana prehrambena namirnica jer sadrži sve tvari za neophodno funkcioniranje organizma i očuvanje zdravlja.

Proizvodnja i konzumacija kozjeg mlijeka u svijetu je u stalnom porastu kao i broj koza, koji se povećava u odnosu na ostale vrste mliječnih životinja. To se posebno odnosi na zemlje u kojima je kozje mlijeko odraz tradicionalne proizvodnje. Sastojci kozjeg mlijeka svojim osobinama (bolja probavljivost, hipoalergenost, veći puferski kapacitet, viša pH vrijednost) povoljno djeluju na zdravlje ljudi. Kozje mlijeko u usporedbi s kravljim sadrži više masnih kiselina koje povoljno utječu na zdravlje ljudi, posebice na krvožilni sustav. Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg, a efikasnija je i apsorpcija aminokiselina. Osjetljivost ljudi na  $\alpha$ -laktalbumin i  $\beta$ -laktoglobulin kravljeg mlijeka zanemariva je nakon zamjene kravljeg mlijeka s kozjim (Filipović Dermić i sur., 2014).

Ovo poglavlje dat će uvid u kemijski sastav kozjeg mlijeka, po čemu se razlikuje od kravljeg mlijeka, njegova fizikalna svojstva i kako određeni sastojci utječu na zdravlje ljudi.

#### 2.1.1. Kemijski sastav

Sastav mlijeka određuje njegovu hranjivu vrijednost, prikladnost za preradu u mliječne proizvode, te mnoge fizikalno-kemijske i organoleptičke osobine proizvoda. Osnovni sastav kozjega i kravljeg mlijeka se puno ne razlikuje (tablica 1). Sastav kozjeg mlijeka ovisi o pasmini i genotipu koza, redoslijedu i stadiju laktacije te godišnjem dobu. Stadij laktacije i godišnje doba su povezani jer je većina mliječnih koza u istom stadiju laktacije u određeno doba godine, što može utjecati na sastav mlijeka. Duljina laktacije koza također je varijabilna, od 150 do 300 dana, a mliječnih pasmina od 210 do 300 dana (Božanić i sur., 2018).

Tablica 1. Sastav, svojstva i energijska vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2018)

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

Pojedini sastojci mlijeka utječu na njegovu prirodnu kiselost, a stečena je kiselost rezultat vrenja laktoze prisutnih mikroorganizama.

**Prirodna kiselost** potječe od kiselih svojstava kazeina, a najviše od kiselih soli (citrata i fosfata) te nešto od plinova u mlijeku ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$ ), askorbinske kiseline i slobodnih masnih kiselina ili aminokiselina. Kiselost mlijeka može se odrediti kao titracijska kiselost ili kao aktivna kiselost, tj. pH-vrijednost.

**Titracijska kiselost** određuje se titracijom mlijeka s otopinom NaOH, određene molarnosti, uz indikator fenolftalein. Ovisno o postupku određivanja, titracijska se kiselost mlijeka izražava u različitim kiselinskim stupnjevima koji odgovaraju broju mililitara utrošene otopine NaOH za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenolftalein. Pri određivanju titracijske kiselosti mlijeka:

- prema Thorneru (°Th) – koristi se 0,1 molarna otopina NaOH (mol/10)
- prema Dornicu (°D) – koristi se 0,11 molarna otopina NaOH (mol/9)
- prema Soxhlet-Henkelu (°SH) – koristi se 0,25 molarna otopina NaOH (mol/4)

**Aktivna kiselost mlijeka** izražava se koncentracijom vodikovih iona ili pH-vrijednošću:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Prosječna titracijska kiselost kozjeg mlijeka iznosi od 6,5-7,5 °SH, a pH vrijednost od 6,4-6,7 odnosno 6,5-6,8 (Božanić i sur., 2018)

Parkash i Jenness (1968) zaključuju da je pH kozjeg niži od pH kravljeg mlijeka. Najniža kiselost je sredinom, a najviša krajem laktacije. Kiselost kozjeg mlijeka je neznatno viša od kravljeg mlijeka, a ovisi u znatnoj mjeri o ambijentalnim temperaturama (klimi) i higijenskim uvjetima proizvodnje (Antunac i Samaržija, 2000).

**Gustoća** je fizikalno svojstvo mlijeka i općenito predstavlja omjer mase i volumena, a ovisi o količini svih sastojaka mlijeka. Najviše ovisi o količini mliječne masti zato što ona najviše varira, a pritom ima najmanju specifičnu težinu. Gustoća je jedan od parametara za dokazivanje patvorenja mlijeka jer se dodatkom vode u mlijeko gustoća smanjuje dok se obiranjem masti povećava. Izražava u  $\text{g/cm}^3$ , a zbog ovisnosti o temperaturi, navodi se i referentna temperatura (20 °C) (Božanić i sur., 2018). Vrijednost gustoće kozjeg mlijeka varira od 1,025 do 1,042  $\text{g/cm}^3$  i slična je gustoći kravljeg mlijeka, ali je niža od gustoće ovčjeg mlijeka (Antunac i Samaržija, 2000).

**Vrelište mlijeka** je temperatura ključanja, a zbog otopljenih je tvari nešto veća (oko 100,16 °C) od temperature ključanja vode (100 °C) (Tratnik i Božanić, 2012).

**Ledište mlijeka** je temperatura smrzavanja, a ovisi o udjelu otopljenih tvari kao i vrelište mlijeka te je nešto niže od temperature smrzavanja vode. Točka ledišta kozjeg mlijeka niža je u odnosu na kravlje mlijeko za 0,04 °C, a ne bi smjela biti viša od -0,540 °C. Ledište ovisi o udjelu svih otopljenih tvari, ali najviše ovisi o koncentraciji laktoze. Laktoza ima vrlo konstantnu koncentraciju u mlijeku pa se kriokopskim određivanjem ledišta mlijeka najtočnije može kontrolirati patvorenje mlijeka razvodnjavanjem. Na točku ledišta mlijeka utječu brojni čimbenici: pasmina, sezona, klima, stadij laktacije, zdravlje vimena, hranidba, higijenska kvaliteta mlijeka, itd. (Antunac i Samaržija, 2000).

**Viskoznost** je rezultat unutrašnjeg trenja molekula, tj. otpora tekućine pri protjecanju. Dinamička viskoznost  $\eta$  obično se izražava u paskal sekundama (Pa s). U većini se uvjeta mlijeko ponaša kao Newtonska tekućina, što znači da je smično naprezanje proporcionalno brzini smicanja ( $dv/dx$ ). U tekućem mlijeku, na viskoznost utječu koncentracija masti i proteina, temperatura, pH i starost mlijeka. Viskoznost ovčjeg mlijeka je mnogo veća od kozjeg ili kravljeg mlijeka, pri čemu kravlje mlijeko ima najnižu vrijednost. Viskoznost egipatskog devinog mlijeka procijenjena je na  $2,2 \times 10^{-3}$  Pa s što je viša vrijednost od kravljeg ( $1,7 \times 10^{-3}$  Pa s) i kozjeg ( $2,12 \times 10^{-3}$  Pa s), ali niža od ovčjeg mlijeka ( $2,48 \times 10^{-3}$  Pa s) i slično kao vrijednost bivoljeg mlijeka ( $2,2 \times 10^{-3}$  Pa s) (Park, 2007). Vrijednost dinamičke viskoznosti  $\eta$

smanjuje se pri porastu temperature. Čini se da doprinos kazeinskih micela usko ovisi o temperaturi. Viskoznost mlijeka povećava se zagrijavanjem do točke koagulacije proteina, što je osnova za stvaranje visoke viskoznosti u pregrijanom kondenziranom mlijeku (Park, 2007).

**Boja mlijeka** je bijela s mogućom svjetložučkastom nijansom. Bijela boja dolazi uglavnom od kazeina, ali i mliječna mast ima svoju ulogu pri odbijanju svjetla od njene površine (Tratnik i Božanić, 2012). Vitamin A i njegov provitamin  $\beta$ -karoten u kravljem su mlijeku otopljeni u mliječnoj masti, i to u ovojnici masne globule. Kozje mlijeko sadržava više vitamina A (retinola) od kravljeg mlijeka. U njemu je sav  $\beta$ -karoten iz hrane i krvi konvertiran u vitamin A, što je razlog njegove karakteristične izrazito bijele boje (Božanić i sur., 2002).

**Proteini** sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu, od građe do reprodukcije. Oni kataliziraju važne reakcije u ljudskom organizmu, vežu mineralne tvari i vitamine, te stabiliziraju okus mlijeka i mliječnih proizvoda (Božanić i sur., 2002). Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017), udio proteina u kozjem mlijeku iznosi najmanje 2,5 %, a najviše 4,5 %.

Od ukupnih dušičnih tvari mlijeko sadržava oko 95 % proteina (PN) i oko 5 % neproteinskih dušičnih tvari (NPN). U neproteinske dušične tvari ubrajaju se peptidi, slobodne aminokiseline, amonijak, aminošećeri, kreatin, kreatinin, urea, ureinska kiselina i mnoge druge. U proteinima mlijeka nalaze se dva glavna tipa proteina: kazein i proteini sirutke (Tratnik i Božanić, 2012). Od ukupne količine u kozjem mlijeku na kazein otpada 75 % (Antunac i Samaržija, 2000).

Kazein je glavni i najsloženiji protein mlijeka koji na suhu tvar sadržava 93 % proteina (kazeinskih frakcija) i oko 7 % neproteinskih tvari (Tratnik i Božanić, 2012). Kazein, koji je u mlijeku u obliku većih koloidnih čestica, sadrži značajne količine kalcija i fosfata, a manje magnezija i citrata. Čestice kazeina nazivaju se kalcijev kazeinat fosfat kompleks, a u mlijeku se nalaze u obliku micela. Micele kazeina sastoje se od kazeinskih frakcija, a to su  $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein. Kazeinske micele kozjeg mlijeka su manje u odnosu na kazeinske micele kravljeg mlijeka, a udio proteina sirutke (albumina i globulina) u kozjem mlijeku je veći. U kozjem mlijeku glavna frakcija kazeina je  $\beta$ -kazein, dok je u kravljem mlijeku  $\alpha_{s1}$ -kazein (tablica 2) (Božanić i sur., 2002).

Tablica 2. Postotni udjeli (%) glavnih frakcija kazeina u kozjem i kravljem mlijeku (Božanić i sur., 2018).

Frakcije kazeina	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
$\alpha_s$	26	56
$\beta$	64	33
$\kappa$	10	11
$\alpha_s / \beta$	0,41	1,70

Nekazeinske frakcije proteina mlijeka ili sirutke se dijele u laktalbumine, laktoglobuline i proteoze peptone. Proteini sirutke znatno su hidrofilniji od kazeina pa su stabilni na djelovanje kiseline ili enzima sirila te zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirutke (Tratnik i Božanić, 2012).

Kozje mlijeko karakterizira velika genetička varijabilnost prirode i količine frakcija proteina, zahvaljujući uglavnom  $\alpha_{s1}$ -kazeinu u kojem je do sada identificirano 10 varijanti (tablica 3).

Tablica 3. Proteinske varijante u kozjem mlijeku (Moioli i sur., 1997)

Proteinska frakcija	Proteinske varijante
$\alpha_{s1}$ - kazein	A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , C, D, E, F, G, O
$\alpha_{s2}$ - kazein	A, B, C
$\beta$ - kazein	A, B, O
$\kappa$ - kazein	A, B
$\alpha$ - laktalbumin	A, B
$\beta$ - laktoglobulin	A, B

Polimorfizam  $\alpha_{s1}$ -kazeina nađen je u većini europskih pasmina koza (Moioli i sur., 1997). Na čvrstoću i viskoznost jogurta, sinerezu kod grušanja enzimima, toplinsku stabilnost mlijeka, udio kazeina, suhe tvari, fosfora te na pH-vrijednost mlijeka utječe genetski polimorfizam  $\beta$ -laktoglobulina,  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeina. Postotak proteina u kravljem i kozjem mlijeku je sličan, ali se proteini kozjeg mlijeka razlikuju po genetskom polimorfizmu i njihovoj učestalosti. Te se genetičke razlike ili razlike uzrokovane pasminom u građi  $\alpha_{s1}$ - kazeina mogu podijeliti na “nul tip” (O), “niski tip” (F, D) te “vrlo visoki tip” (A, B, C), sa srednjim klasama (E). Visok tip

mlijeka ima dulje koagulacijsko vrijeme za što je odgovoran  $\alpha_{s1}$ -kazein koji usporava nastajanje gruš. Kozje mlijeko takvog tipa pogodnije je u sirarstvu zbog boljeg prinosa sira i veće čvrstoće gruš što je povezano s nižom pH-vrijednošću, većim udjelom kalcija, manje intenzivnom kozjim okusom te glađom teksturom gruš. S druge strane, mlijeko niskog tipa ima bolju probavljivost (Tratnik i Božanić, 2012).

Nutritivna vrijednost proteina ovisi o udjelu različitih aminokiselina što se apsorbiraju nakon probave u alimentarnom sustavu. Kazeinske micelle kozjeg mlijeka su manje u odnosu na kazeinske micelle kravljeg mlijeka, a udio proteina sirutke (albumina i globulina) u kozjem mlijeku je veći. Kozje mlijeko sadržava manje  $\alpha_{s1}$ -kazeina nego kravlje, gruš kozjeg mlijeka je nježniji, a prinos je manji. Razlog tome je upravo u njegovoj manjoj čvrstoći.

Dodatkom jake kiseline izravno u kozje mlijeko nastaju nježnije pahulje i to puno brže u odnosu na kravlje mlijeko koje sporije stvara veće nakupine. Ovakav pokus opisuje događanja u želucu tijekom probave, što dokazuje da se kozje mlijeko probavlja brže i lakše u odnosu na kravlje (Božanić i sur., 2002).

Mliječna mast utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Sadržaj mliječne masti u mlijeku može biti vrlo promjenjiv (Božanić i sur., 2002). Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017) udio masti u kozjem mlijeku iznosi najmanje 2,5 %, a najviše 5 %. Najniže vrijednosti sadržaja masti u mlijeku ustanovljene su u ljetnim mjesecima (lipanj-srpanj), stoje dijelom uvjetovano načinom hranidbe, sezonom i stadijem laktacije. Variranje sadržaja masti u mlijeku različitih pasmina veće je od variranja sadržaja proteina. Proizvodnja mlijeka je u obrnuto proporcionalnom odnosu s postotkom masti i proteina u mlijeku (Antunac i Samaržija, 2000).

**Mliječna mast** kozjeg mlijeka prisutna je u mlijeku u obliku triglicerida (98-99 %) okruženih membranama globule mliječne masti. Sastav masnih kiselina ovisi u velikoj mjeri o sastavu prehrane. Najznačajnije niže masne kiseline koje su i najzastupljenije u mlijeku koje daju mlijeku karakterističan „kozji miris“ su kapronska, kaprilna i kaprinska (Kalyankar i sur., 2016). Te se masne kiseline puno brže konvertiraju u energiju i ne nakupljaju se u obliku tjelesnih zaliha, može se reći da metaboliziraju više poput šećera nego poput masti. Većina masnih kiselina javlja se samo u tragovima, a samo 15 masnih kiselina zastupljeno je u udjelu većem od 1 %. (Tratnik i Božanić, 2012). Mast se u mlijeku nalazi u obliku masnih globula promjera  $< 3 \mu\text{m}$ , koje su učestalije u kozjem nego u kravljem mlijeku (65:43 %), te nemaju sposobnost izdvajanja na površinu pa ne dolazi do agregacije. Manje masne globule osiguravaju bolju dispergiranost, bolju homogenost masti u mlijeku. (Antunac i Samaržija, 2000).

Razlika je u mliječnoj masti kozjega i kravljeg mlijeka u zasićenosti i dužini lanaca masnih kiselina, što ima veliku nutritivnu i zdravstvenu važnost (tablica 4) (Tratnik i Božanić, 2012).

Tablica 4. Postotni udjeli (%) glavnih masnih kiselina u uzorcima (n=39) kozjeg mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012)

Masne kiseline		Kozje mlijeko		Kravlje mlijeko
		minimum - maksimum	prosjeak	
<b>C4:0</b>	Maslačna	1,49 – 4,23	2,99	3,3
<b>C6:0</b>	<b>kapronska</b>	4,28 – 8,82	6,25	1,6 1,3 3,0 3,1 18,4
<b>C8:0</b>	<b>kaprilna</b>	1,70 – 4,12	2,52	
<b>C10:0</b>	<b>kaprinska</b>	8,59 – 12,64	10,41	
<b>C12:0</b>	laurinska	3,80 – 7,32	5,64	
<b>C14:0</b>	miristinska	10,70 – 15,26	12,81	9,5
<b>C16:0</b>	palmitinska	27,35 – 40,66	34,80	28,8
<b>C18:0</b>	stearinska	4,73 – 9,93	6,84	14,6
<b>C18:1</b>	oleinska	10,34 – 17,08	13,26	29,8
<b>C18:2</b>	linolna	2,54 – 4,81	3,60	2,5
<b>C18:3</b>	linolenska	0,20 – 1,72	0,88	-

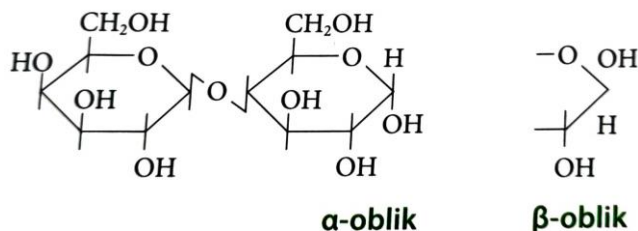
**Laktoza ili mliječni šećer** je značajan izvor energije, disaharid koji se sastoji od glukoze i galaktoze te koji pospješuje djelovanje probavnog sustava i povećava sposobnost organizma za vezanje fosfora i kalcija. Slatkoća joj iznosi 1/5 slatkoće saharoze (komercijalnog šećera) i daje blago slatkast okus mlijeku (Božanić i sur., 2018).

U mlijeku laktoza se pojavljuje uglavnom kao mješavina dvaju osnovnih oblika, strukturno izomernih. To su  $\alpha$ -oblik i  $\beta$ -oblik koji se razlikuju po položaju H i OH skupine na prvom C atomu glukozidnog dijela laktoze (slika 1). Kobilje mlijeko (oko 6 %) i majčino mlijeko (6-8 %) sadrže veći udio laktoze od kravljeg, bivoljeg i kozjeg mlijeka (4,5–4,8 %) (Tratnik i Božanić, 2012).

Tijekom laktacije, sadržaj laktoze ima suprotan trend od sadržaja masti i proteina (Antunac i Samaržija, 2000). Na kraju laktacije ili u mlijeku bolesne životinje smanjuje se količina laktoze pa tako mastitično mlijeko može sadržavati oko 2 % laktoze (Tratnik i Božanić, 2012).



Fermentacijom dio laktoze (23-30 %) uglavnom prelazi u mliječnu kiselinu (75-95 %). Proizvodnja svih fermentiranih mliječnih proizvoda zasniva se na fermentaciji laktoze (Božanić i sur., 2018).



Slika 1. Struktura  $\alpha$ -oblika i  $\beta$ -oblika laktoze (Tratnik i Božanić, 2012)

Laktoza ima više bitnih uloga u prehrani. Ona potiče peristaltiku crijeva i olakšava probavu masti i proteina te ostalih hranjivih tvari. Osim toga ima preventivnu ulogu za nastanak osteoporoze jer potpomaže apsorpciji kalcija i fosfora u organizmu i osigurava optimalnu razinu magnezija. Osobe koje pate od laktoza netolerancije (nedostatak  $\beta$ -galaktozidaze) češće obolijevaju od osteoporoze što je jedan od dokaza da laktoza potpomaže apsorpciju kalcija u organizmu (Tratnik i Božanić, 2012).

U mlijeku je identificirano oko 40 različitih **mineralnih tvari**, a prema njihovom udjelu ubrajaju se u makroelemente i mikroelemente.

Mikroelemenata je u mlijeku brojčano više (20-25) nego makroelemenata, ali je većina nađenih (Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Cu, F, Sr i dr.) prisutna samo u tragovima ili pak samo kvalitativno dokazana (Ba, Ti i drugi) (Tratnik i Božanić, 2012). Od svih najviše su istraženi Fe i Cu zbog njihove uloge u oksidaciji lipida. U velikoj mjeri se nalaze u kompleksu s proteinima, a ima ih nešto u ovojnici masne kuglice mlijeka te u sastavu nekih enzima kao u ksantin-oksidazi i katalazi (Božanić i sur., 2002).

Makroelementi u mlijeku nalaze se uglavnom u obliku topljivih i netopljivih anorganskih i organskih soli. Manji dio mineralnih tvari nalazi se u sastavu proteina (osobito u kazeinu) i u adsorpcijskom sloju membrane masne globule te u enzimima i vitaminima mlijeka. Najviše je mineralnih tvari u obliku topljivih disociranih ili nedisociranih anorganskih i organskih soli kao što su kloridi, fosfati i citrati i to K, Ca, Na i Mg). Dio mineralnih tvari nalazi se u ioniziranom obliku ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) (Tratnik i Božanić, 2012).

Kozje mlijeko sadrži veću količinu mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan (tablica 5). Krajem laktacije mlijeko sadrži više

mineralnih tvari pa je ta slanost izraženija (Božanić i sur., 2018). Kozje mlijeko je izvrstan izvor biorazgradivog kalcija, fosfora i magnezija jer sadrži veće količine tih tvari u topljivom obliku u odnosu na kravlje (Božanić i sur., 2002).

Tablica 5. Udjeli mineralnih tvari (mg L<sup>-1</sup>) u kozjem i kravljem mlijeku (Božanić i sur., 2002).

Mineralna tvar	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
<b>Kalcij (Ca)</b>	1304	1200
<b>Fosfor (P)</b>	1080	950
<b>Magnezij (Mg)</b>	136	130
<b>Natrij (Na)</b>	488	500
<b>Kalij (K)</b>	1996	1500
<b>Kloridi (Cl)</b>	1566	1000
<b>Željezo (Fe)</b>	0,5	0,5
<b>Cink (Zn)</b>	2,9	3,5
<b>Bakar (Cu)</b>	0,23	0,20

Mlijeko sadrži gotovo sve poznate vitamine (tablica 6). Pomanjkanje vitamina u ljudskom organizmu izaziva velike poremećaje te razne bolesti. Baš zato se ne može zamisliti pravilna prehrana (osobito djece i bolesnika) bez mlijeka i mliječnih proizvoda. Vitamini se dijele na vitamine topljive u masti (A, D, E, K) i vitamine topljive u vodi (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> i C). Mlijeko različitog podrijetla sadrži različite količine vitamina iako to ovisi i o brojnim drugim čimbenicima (Božanić i sur., 2002).

Kozje mlijeko sadrži više **vitamina A** (retinola) od kravljeg mlijeka. Kako je već navedeno, u njemu je sav karoten konvertiran u vitamin A, što je razlog njegove karakteristične vrlo bijele boje (Božanić i sur., 2018).

**Vitamin D (kalciferol)** se u mlijeku može naći u četiri oblika, najčešće u D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i D<sub>3</sub> (kolekalciferol) obliku, a rjeđe u D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> obliku. Vitamin D je poznat po svom esencijalnom djelovanju na probavnu apsorpciju i iskorištavanje Ca i P u kostima (Božanić i sur., 2002).

**Vitamin E (tokoferol)** je poznat po ulozi prirodnog antioksidansa, te je uvršten u agense protiv starenja (Božanić i sur., 2002).

**Vitamin B<sub>1</sub> (tiamin)** u mlijeku se nalazi slobodan ili vezan za fosforu kiselinu. Specifično je potreban u završnom dijelu metabolizma ugljikohidrata i nekih aminokiselina. Boja sirutke ima žuto-zelenu boju koja potječe od vitamina B<sub>2</sub> (riboflavin). Osjetljiv je na svjetlost pa se

preporuča mlijeko držati u neprozirnoj ambalaži. Manjak ovog vitamina dovodi do poremećaja probave.

**PP** (eng. *Pelagra preventive factor*) **vitamin, antipelagrični vitamin ili nikotinska kiselina**, ali poznat i kao **vitamin B<sub>3</sub> (niacin)** sastavni je dio koenzima važnih u brojnim biokemijskim reakcijama organizma. Kozje mlijeko je tri puta bogatije vitaminom B<sub>3</sub> od kravljeg. Vitamin B<sub>5</sub> (pantotenska kiselina) je sastavni dio koenzima A važnog za metabolizam ugljikohidrata, masnih kiselina i dušičnih spojeva (Božanić i sur., 2018).

**Vitamin B<sub>6</sub> (piridoksin)** ima važnu ulogu u metabolizmu šećera, lipida te u sintezi B<sub>3</sub> vitamina. U mlijeku je veći dio slobodan, a manji vezan na proteine.

**Vitamin B<sub>8</sub> (biotin)** sudjeluje u sintezi masnih kiselina. Važan je u prehrani čovjeka, a može ga sintetizirati crijevna mikroflora. U mlijeku se nalazi u slobodnom stanju.

**Vitamin B<sub>9</sub> (folna kiselina)** faktor je rasta raznih mikroorganizama i životinja. Sudjeluje u sintezi nukleotida i u brojnim biokemijskim reakcijama. U kozjem mlijeku ga ima oko 5 puta manje nego u kravljem i humanom.

**Vitamin B<sub>12</sub> (kobalamin)** vrlo je kompleksne strukture i jedini koji sadrži kobalt. Sudjeluje u radu živčanog sistema i koštanoj moždini. Prilično je termostabilan, ali degradira pri temperaturama višim od 100 °C. Vitamini B kompleksa stabilni su i ne uništavaju se termičkom obradom (Božanić i sur., 2018).

Aktivni oblici **vitamina C** su L-askorbinska kiselina i dihidro L-askorbinska kiselina. Neophodan je za mnoge oksidacijske reakcije u tijelu. Vitamin C je važan u stvaranju hidroksiprolina, sastojka kolagena. On održava normalno stanje međustaničnih tvari u cijelom tijelu. Termolabilan je, a razgrađuje se izlaganjem svjetlosti i zraku (dodiru s kisikom) (Božanić i sur., 2002).

Tablica 6. Vitaminski sastav kozjeg i kravljeg mlijeka (na 100 g) (Božanić i sur., 2018)

	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
<b>Vitamini topljivi u mastima</b>		
<b>Retinol (A) (mg)</b>	0,040	0,035
<b>Karoten (mg)</b>	0	0,021
<b>Kalciferol (D) (µg)</b>	0,06	0,08
<b>Tokoferol (E) (mg)</b>	0,04	0,11
<b>Vitamini topljivi u vodi</b>		
<b>Tiamin (B<sub>1</sub>) (mg)</b>	0,05	0,04

<b>Riboflavin (B<sub>2</sub>) (mg)</b>	0,14	0,17
<b>Niacin (B<sub>3</sub>) (mg)</b>	0,27	0,09
<b>Pantotenska kiselina (B<sub>5</sub>) (mg)</b>	0,31	0,34
<b>Piridoksin (B<sub>6</sub>) (mg)</b>	0,05	0,04
<b>Biotin (B<sub>8</sub>) (μg)</b>	2,0	2,0
<b>Folna kiselina (B<sub>9</sub>) (μg)</b>	1,0	5,3
<b>Kobalamin (B<sub>12</sub>) (μg)</b>	0,06	0,35
<b>Askorbinska kiselina (C) (mg)</b>	1,3	1,0

### 2.1.2. Zdravstvena vrijednost

Prehrambena, biološka i terapijska vrijednost kozjeg mlijeka kao namirnice izuzetno je značajna s obzirom na sastav, mogućnost resorpcije i iskorištenja u ljudskom organizmu. Bolja probavljivost, viši puferski kapacitet i terapijske vrijednosti, samo su neke karakteristike prema kojima se kozje mlijeko značajno razlikuje od ostalih vrsta mlijeka (Antunac i sur., 2000). Energetska vrijednost, sadržaj esencijalnih masnih i aminokiselina, količina vitamina i mineralnih tvari, probavljivost i apsorpcija pojedinih sastojaka određuju hranidbenu vrijednost kozjeg mlijeka. Energetska vrijednost kozjeg mlijeka je oko 69 kcal/100 g ili 288 kJ/100 g što je približno jednako energetske vrijednosti kravljeg mlijeka (Antunac i sur., 2000).

Mliječna mast kao najvažniji sastojak kozjeg mlijeka, sadrži mnogo masnih kiselina kratkog i srednje dugog lanca, koje imaju veliki značaj u prevenciji i liječenju mnogih poremećaja i bolesti ljudi. Mast kozjeg mlijeka probavljivija je od masti kravljeg mlijeka, jer su masne globule manje i ima ih više (tablica 7) pa je ukupna masna površina veća te ih lipaze u crijevima lakše razgrađuju. Promjer pojedinih globula masti u kozjem mlijeku je od 0,73 do 8,58 μm, dok je promjer masnih globula u kravljem mlijeku veći i iznosi od 0,92 do 15,75 μm. Što su masne globule manje i ima ih više, one imaju veću specifičnu površinu koja u kozjem mlijeku iznosi 21,778 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup>, a u kravljem mlijeku 17,117 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> (Božanić i sur., 2018).

Udio od 90 % ukupnih čestica u kozjem mlijeku ima promjer manji od 5,21 μm, a u kravljem mlijeku taj iznos je manji od 6,42 μm. Takve manje globule masti bolje su raspršene u mlijeku pa osiguravaju puno bolju homogenost kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje. Prirodna homogenizacija kozjeg mlijeka što se tiče probave, povoljnija je u odnosu na mehaničku homogenizaciju kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2002).

Tablica 7. Parametri veličine i broja masnih globula u mliječnoj masti kozjega i kravljega mlijeka (Božanić i sur., 2018)

Parametar	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
<b>Određena količina masti (%)</b>	2,90	3,40
<b>Broj globula mL<sup>-1</sup> mlijeka</b>	1,9x10 <sup>9</sup>	1,5x10 <sup>9</sup>
<b>Prosječni promjer (μm)</b>	3,10	3,60

Zbog povećane relativne površine masnih globula probavljivost traje vremenski kraće za 20 %. Boljoj probavljivost mliječne masti kozjeg mlijeka pridonosi i udio od 35 % masnih kiselina kratkog i srednje dugog lanca (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) koje lipaza brže hidrolizira i koje se jednostavnijim mehanizmom apsorbiraju u odnosu na dugolančane masne kiseline (Antunac i sur., 2000). Masne kiseline srednje dugog lanca (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) koriste se u tretmanu sindroma malapsorpcije, intestinalnih poremećaja, koronarnih bolesti, prehrane prerano rođene dojenčadi, cističnih fibroza i žučnih kamenaca zbog jedinstvene sposobnosti davanja energije, dok u isto vrijeme snizuju zalihe kolesterola (Kalyankar i sur., 2016).

Kozje mlijeko ima i brojna terapijska svojstva značajna za ljudsko zdravlje. Visoki udio proteina, neproteinskog dušika i fosfata daje kozjem mlijeku veći puferski kapacitet (Park, 1994), zbog čega je idealno u liječenju čira na želucu (Haenlein, 2004). Puferski kapacitet pokazuje koliko je potrebno dodati jake kiseline ili lužine u 1 dm<sup>3</sup> da se pH-vrijednost promijeni za jednu jednicu. Viši puferski kapacitet balansira promjenu pH-vrijednosti u organizmu tijekom probave hrane i tako održava optimalnu pH-vrijednost za aktivnost probavnih enzima (Tratnik i Božanić, 2012).

Najznačajnija terapijska uloga kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje je upravo njegova hipoalergenost. Između 40 i 100 % pacijenata alergičnih na proteine kravljeg mlijeka dobro podnose kozje mlijeko (Park, 1994). Razlog hipoalergenosti kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje je razlika u njihovoj strukturi proteina. Djeca alergična na α<sub>s1</sub>-kazein u kravljem mlijeku dobro podnose kozje mlijeko zbog niskog sadržaja ili čak potpunog izostanka α<sub>s1</sub>- kazeina u njemu. Jednako tako i pacijenti koji su bili osjetljivi na α-laktalbumin i β-laktoglobulin kravljeg mlijeka uspješno su izliječeni nakon zamjene kravljeg s kozjim mlijekom (Antunac i sur., 2000). U prehrani djece jednako tako dobrim se pokazalo evaporirano kozje i kozje mlijeko u prahu. Toplinskom obradom kozjeg mlijeka smanjuju se alergeni u mlijeku, a istovremeno se mijenja i struktura proteina (Antunac i sur., 2000).

## 2.2. BILJNI EKSTRAKTI

Biljni ekstrakti se mogu definirati kao spoj i/ili smjesa spojeva dobiveni različitim postupcima ekstrakcije iz svježih ili osušenih biljaka ili dijelova biljaka kao što su list, cvijet, sjemenke, korijen ili kora. Aktivni sastojci dobiveni su zajedno sa ostalim materijalom prisutnim u biljnoj masi (Vinatoru, 2001). Takvi proizvodi dobiveni iz biljaka su relativno složene smjese metabolita, u polukrutom ili praškastom stanju (nakon uklanjanja otapala) namijenjeni samo za oralnu ili vanjsku upotrebu.

Biljni ekstrakti se dovode u kontakt sa otapalom za ekstrakciju u odgovarajućem uređaju (ekstraktor). U sljedećoj fazi procesa nastaje međuproizvod („miscella“, „eluat“) koji se odvaja od ostatka smjese. Ako se u procesu ekstrakcije koriste tekuća otapala (etanol ili smjesa etanola i vode, masna ulja i sl.) nakon filtracije se dobiva tekući ekstrakt. Kao rezultat procesa ekstrakcije može se dobiti i suhi ekstrakt, ako se od faze „miscelle“ nastavi proces uparivanja u vakuum uparivaču. U ovoj fazi nastaje gusti ekstrakt od koga se daljnjim procesom sušenja na odgovarajući način dobiva suhi ekstrakt (Savić, 2014).

### 2.2.1. Podjela biljnih ekstrakata

Biljne ekstrakte možemo podijeliti prema konzistenciji i postupku ekstrakcije.

Ovisno o konzistenciji, ekstrakti se mogu klasificirati kao:

1. tekući ekstrakti
2. polukruti ekstrakti
3. suhi ekstrakti

**Tekući ekstrakti** (*extracta fluida*) su preparati tekuće konzistencije kod kojih jedan dio mase ekstrakta odgovara jednom dijelu mase suhe biljne tvari upotrijebljene za ekstrakciju. Tinkture (*tincturae*) su tekući preparati koji se dobivaju ekstrakcijom osušenih biljnih droga i pripremaju se postupkom maceracije ili perkolacije (Savić, 2014).

**Polukruti ekstrakti** (*extracta spissa*) se inicijalno proizvode kao tekući ekstrakti, ali se koncentriranje provodi tako dugo dok se ne postigne sadržaj vlage 30 % ili manje. Ovakav ekstrakt ima teksturu guste paste ili viskoznog sirupa i obično je tamnosmeđe boje (Ashurst, 2005).

**Suhi ekstrakti** (*extracta sicca*) su kruti preparati dobiveni uparavanjem otapala koje je korišteno za njihovo dobivanje (Savić, 2014).

Prema postupku ekstrakcije ekstrakte dijelimo na vodene macerate, tinkture, infuzije, dekokte, perkolate i glicerinske ekstrakte.

**Vodeni macerati** pripremaju se od biljaka koje sadrže aktivne tvari osjetljive na toplinu, te se ekstrahiraju u mlakoj vodi. To su najčešće ljekovite biljke sa sluzima, odnosno biljke poput korijena bijelog sljeza (*Althaea officinalis*), sjemenki piskavice (*Trigonella foenum – graecum L.*), sjemenki lana (*Linum usitatissimum*) i psiliuma (*Plantago ovate*). Idealni su za biljke sa sluzima jer su same sluzi vrlo česte nestabilne na povišenoj temperaturi (Anonymous 1).

**Tinkture** su ekstrakti sobne temperature koji su proizvedeni s visokim postotkom alkohola u ekstrakcijskoj tekućini, tipično sa 60-70 % ili više. Posebno su pogodni za ekstrakciju biljaka koji sadrže smolaste i hlapljive sastojke, jer alkohol taloži neželjene gumaste i proteinske tvari. To omogućava filtriranje tinkture dajući bistre pripravke koji su dobro očuvani od kvarenja. (Ashurst, 2005).

**Infuzije** su opći naziv za ekstrakte koji nastaju prelaskom biljnih sirovina u tekućinu. Najčešće se dobivaju od biljnih dijelova kao što je list, cvijet ili cijeli nadzemni dio zeljaste biljke (Dragović-Uzelac, 2016).

**Dekokti** su ekstrakti koji se dobivaju kuhanjem biljaka u ključaloj vodi tj. postupkom dekokcije.

**Perkolati** su tekući ekstrakti biljaka gdje se biljka tretira s otapalima niskog vrelišta poput etanola pri povišenoj temperaturi kako bi se povećala ekstrakcija slabo topivih spojeva. To je pogodan način ekstrakcije za tvrde biljne dijelove.

**Glicerinski ekstrakti** su ekstrakti koji se dobivaju tako da se cijela biljka, svježa ili suha, macerira u razrijeđenom glicerolu. Tako se sačuvaju veće količine ljekovitih tvari u biljci. Biljke se također mogu usitniti i cijele čuvati u otopini glicerola (Dragović-Uzelac, 2016).

### 2.2.2. Metode ekstrakcije ljekovitog bilja

Početna faza kod proizvodnje biljnih ekstrakata iz ljekovitog bilja je priprema uzorka za ekstrakciju kako bi se sačuvale bioaktivne komponente važne za ekstrakciju. Za očuvanje fitokemikalija u završnim ekstraktima bitno utječu mljevenje i sušenje. U proučavanju ljekovitog bilja koriste se svježi i sušeni uzorci. U većini slučajeva prilikom ekstrakcije preferira se osušeni uzorak (Azwanida, 2015). Vongsak i sur. (2013) usporedili su svježe i sušene listove moringe u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida te se pokazalo da nisu primijećene nikakve značajne promjene ukupnih fenola, ali je u sušenom uzorku bio prisutan veći udio flavonoida (Vongsak i sur., 2013).

Važni parametri ekstrakcije koji utječu na kvalitetu dobivenog ekstrakta su temperatura i vrijeme ekstrakcije, veličina čestica sirovog materijala te količina korištenog otapala.

Temperatura utječe na topljivost i difuziju otapala te također na viskoznost i površinsku napetost tekućina. Vrijeme ekstrakcije je parametar koji je izravno povezan s temperaturom. Duže vrijeme povećava iskorištenje ekstrakcije, ali produženo izlaganje bioaktivnih spojeva krutog materijala visokoj temperaturi može dovesti do njihove degradacije (Palma i sur., 2013). Ekstrakcija iz krutog materijala se najčešće može ubrzati povećanjem dodirne površine materijala i otapala te smanjenjem radijalne udaljenosti između čestica materijala (miješanjem i mljevenjem). Usitnjavanjem biljnog materijala prije ekstrakcije se povećava dodirna površina, a samim time i učinkovitost ekstrakcije (Schilcher i sur, 2005).

### **Ekstrakcija organskim otapalima**

Maceracija, infuzija, dekokcija i perkolacija

**Maceracija** je postupak namakanja biljnog materijala (usitnjenog ili samljevenog) u zatvorenoj posudi s otapalom, pri sobnoj temperaturi, u trajanju od minimalno 3 dana uz povremeno miješanje. Nakon izvršene ekstrakcije, smjesa ide na prešanje ili filtraciju kako bi se odvojio ekstrakt od netopivog biljnog materijala (troja). U uobičajenim metodama toplina se prenosi konvekcijom i kondukcijom, a otapalo se odabire na osnovi spoja koji se želi ekstrahirati (Dekebo, 2019). Maceracija je najlakša i najjednostavnija tehnika ekstrakcije. Nedostatak metode je u dugom vremenu trajanja procesa i nastanku velike količine organskog otpada kojeg je potrebno adekvatno zbrinuti.

Uobičajeni naziv **infuzija** u hrvatskom jeziku je čaj. Aktivne tvari biljaka se ekstrahiraju vrućom vodom kojom se osušena bilja prelije. Infuzije se rade tako da se voda zagrije do vrenja, te se u nju stavi osušena i/ili usitnjena biljka i ostavi stajati pokrivena između 5 i 15 minuta. Talog se zatim odvoji od tekućine (Dragović-Uzelac, 2016).

**Dekokcija** je postupak u kojem se sirovi biljni materijal kuha u određenom volumenu vode određeno vrijeme, nakon čega se hladi, cijedi i zatim filtrira. Ova procedura koristi se za ekstrakciju materijala koji su topljivi u vodi i termostabilni. Prikladni su za tvrde biljne dijelove kao što su podanak, korijen i kora gdje je potrebno duže vrijeme da vruća voda prodre u unutrašnjost biljnih dijelova i ekstrahira aktivne tvari. Početni omjer biljnog materijala i vode je točno određen i iznosi 1:4 ili 1:16, nakon čega se volumen kuhanjem smanjuje na  $\frac{1}{4}$  početnog volumena tijekom ekstrakcije. Nakon toga se koncentrirani ekstrakt filtrira i koristi kao takav ili ide na daljnju preradu (Handa i sur., 2008). Infuzije i dekokti ekstrahiraju polarnije tvari iz biljke.

**Perkolacija** je postupak ekstrakcije otapala koji se koristi kao alternativa infuzijskom postupku. Ova metoda često se koristi prilikom ekstrakcije aktivnih sastojaka u pripremi

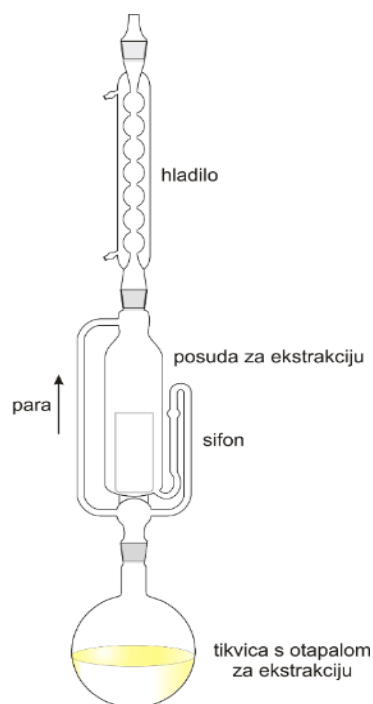


tinktura i tekućih ekstrakata u uređaju koji se naziva perkolator (Handa i sur., 2008). Kod ove metode biljka se stavi iznad posude s otapalom, a iznad biljnog materijala postavi se hladilo. Otapalo se tada grije na temperaturu vrenja otapala, pa otapalo isparava, hladi se u hladilu i kapa po biljnom materijalu vršeći na taj način ekstrakciju (Dragović-Uzelac, 2016). Zatim se može ponovno preraditi, kako bi se postigli veći prinosi i brže stope ekstrakcije od klasičnog postupka namakanja. Perkolacija uključuje mehaničke procese osmoze i difuzije u stanici i izvan nje (Ashurst, 2005). Razlikujemo klasičnu perkolaciju kod koje se ekstrakcija provodi pri sobnoj temperaturi uz jednakomjerno protjecanje otapala kroz stupac biljnog materijala u perkolatoru i reperkolaciju gdje se ekstrakcija vrši pri sobnoj temperaturi uz jednakomjerno protjecanje otapala kroz stupac biljnog materijala kroz više perkolatora spojenih serijski (Dragović-Uzelac, 2016).

#### Kontinuirana vruća ekstrakcija (ekstrakcija po Soxhlet-u)

Aparatura po Soxhletu (slika 2) sastoji se od tikvice s otapalom za ekstrakciju, posude za ekstrakciju i hladila. Načelo je rada ovog uređaja u tome da se pare otapala koje se zagrijava u tikvici, nakon prolaza kroz cijev, kondenziraju u hladilu, te još topli kondenzat natapa materijal koji se ekstrahira u ekstraktoru. Otapalo puni prostor ekstraktora i cjevčicu do najviše točke i tada se prema zakonu spojenih posuda prelije u tikvicu. Postupak se ponavlja do bezbojnog ekstrakta (Rapić, 2008).

Prednost ove metode u usporedbi s ranije opisanim metodama je ta što se velike količine uzorka mogu ekstrahirati s mnogo manjom količinom otapala. To utječe na uštedu vremena, energije i financija. U malim razmjerima koristi se samo kao serijski postupak, ali postaje ekonomičniji kada se provodi postupak kontinuirane ekstrakcije u srednjem i velikom razmjeru (Handa i sur., 2008).



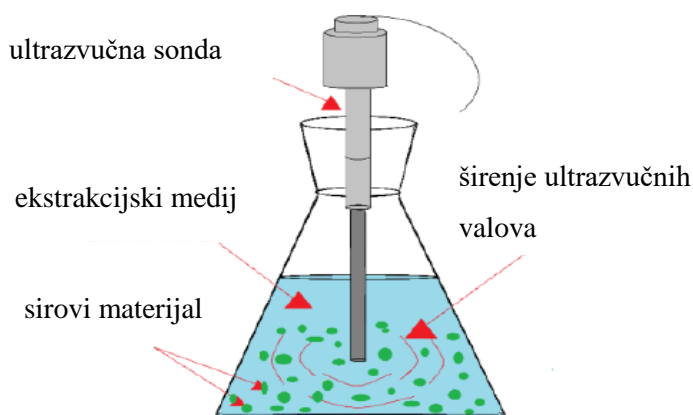
Slika 2. Aparatura po Soxhlet-u (Anonymous 2)

### Ultrazvučna ekstrakcija

Postupak uključuje upotrebu ultrazvuka s frekvencijama u rasponu od 20 kHz do 2000 kHz. Mehanički učinak akustične kavitacije ultrazvuka povećava dodirnu površinu između uzorka i otapala te permeabilnost staničnih stijenki (Dhanani i sur., 2013). Mehanički učinak ultrazvuka, tj. djelovanje kavitacija na staničnu stijenku biljke, dovodi do oštećenja stijenke, čime se poboljšava prijenos mase i olakšava pristup otapala staničnom sadržaju rezultirajući većim prinosima ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Jedan nedostatak postupka je povremeni, ali poznati štetni učinak energije ultrazvuka (više od 20 kHz) na aktivne sastojke ljekovitih biljaka stvaranjem slobodnih radikala i posljedično nastanak nepoželjnih promjena u molekulama uzorka (Handa i sur., 2008).

Postoje učinkovitiji sustavi za ekstrakciju, poput ultrazvučnog sustava sa sondom (slika 3), gdje joj neposredni kontakt s uzorkom omogućava razvoj snage do 100 puta više nego što je predviđeno u ultrazvučnoj kupki (Medina-Torres i sur., 2017).

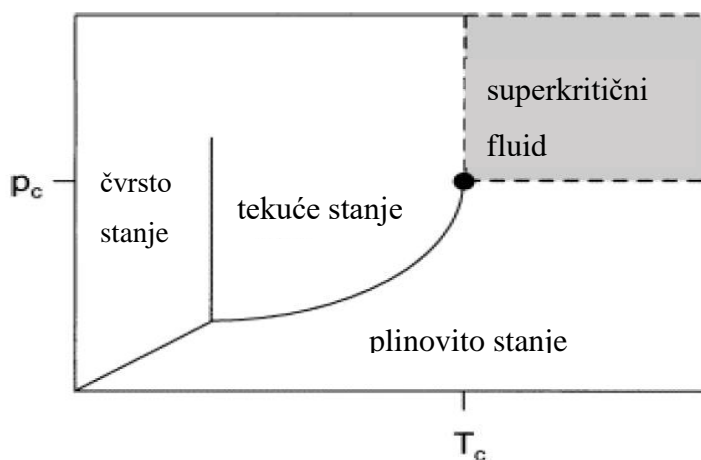


Slika 3. Ultrazvučni sustav i njegovi dijelovi (Medina-Torres i sur., 2017)

### Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE) alternativna je metoda pripreme uzoraka s općim ciljevima smanjene uporabe organskih otapala i povećanog protoka uzorka. Čimbenici koje treba uzeti u obzir uključuju temperaturu, tlak, volumen uzorka, prikupljanje analita, dodavanje otapala, kontrola protoka i tlaka (Handa i sur., 2008).

Superkritični fluid (SF) je supstanca koja ima svojstva plina i tekućine u svojoj kritičnoj točki (slika 4). Primjer superkritičnog fluida je  $\text{CO}_2$  koji postaje superkritičan iznad temperature od  $31,1\text{ }^\circ\text{C}$  i pri tlaku od  $7380\text{ kPa}$ . Superkritični  $\text{CO}_2$  dobro otapa nepolarne sastojke, ima nisku cijenu i nisku toksičnost zbog čega je povećana njegova potražnja. Zbog njegove slabe topljivosti polarnih sastojaka napravljene su modifikacije kao što je dodatak male količine etanola i metanola kako bi se ekstrahirali polarni sastojci (Patil i sur., 2013).



Slika 4. Fazni dijagram (tlak – temperatura) za jednu supstancu ( $P_c$  – kritični tlak,  $T_c$  – kritična temperatura) (Abbas i sur., 2008)

## **Ekstrakcija mikrovalovima**

Ekstrakcija mikrovalovima koristi energiju mikrovalova (0,3 do 300 GHz) kako bi olakšala migraciju analita iz matriksa uzorka u otapalo (Trusheva i sur., 2007). Tijekom ekstrakcije dolazi do interakcije mikrovalne radijacije sa dipolima polarnih materijala što dovodi do zagrijavanja blizu površine materijala. Rotacija molekula inducirana mikrovalovima onemogućava stvaranje vodikovih veza pri čemu dolazi do migracije iona i prodiranja otapala u matriks uzorka (Kaufmann i Christen, 2002).

Većinom se koristi otapalo koje absorbira mikrovalove. Mikrovalovi selektivno reagiraju sa slobodnim molekulama vode što dovodi do naglog zagrijavanja i povećanja temperature zbog čega dolazi do pucanja stanične stijenke i otpuštanja eteričnih ulja u otapalo (Camel, 2001). U usporedbi s maceracijom, metode ekstrakcije mikrovalovima i ultrazvučna ekstrakcija dale su veći prinos ekstrakcije, kraće vrijeme i manje radne snage (Trusheva i sur., 2007).

Uz navedene konvencionalne i napredne tehnike ekstrakcije, još se koriste i druge napredne tehnike poput ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE, PLE), ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem (HVED) ili ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HHPE).

### **2.2.3. Dodatak i utjecaj biljnih ekstrakata u proizvode od kozjeg mlijeka**

S obzirom da je kozje mlijeko sve popularnije i pozitivno djeluje na zdravlje, sve više se istražuje dodatak biljnih ekstrakata koji svojim sastavom mogu dodatno obogatiti, ali i utjecati na fizikalno-kemijska svojstva i prihvatljivost mliječnih proizvoda.

Jogurt je već dugo poznat kao proizvod s mnogim poželjnim učincima na zdravlje. Izvršna senzorska svojstva i zdravstvene koristi jogurta mogu se pripisati djelovanju bakterija jogurta i njihovih metabolita. Bakterije mliječne kiseline (BMK), posebno laktobacili, streptokoki i bifidobakterije važni su mikroorganizmi povezani sa zdravstvenim stanjem ljudskog gastrointestinalnog trakta koji opravdava nazivajući ih prijateljskim bakterijama (Bakr i Salihin, 2013).

Međutim, kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina koje su prisutne u ovom mlijeku i mliječnim proizvodima kozjem mlijeku daju karakterističan neugodan okus, što ograničava prihvaćanje od strane potrošača i razvoj kozjih mliječnih proizvoda (Feng i sur., 2018). Posljednjih godina tržište funkcionalne hrane raste sa sve većim interesom potrošača za usvajanjem zdrave prehrane i potragom za raznolikim prehrambenim proizvodima.

Prehrambena industrija zainteresirana je za istraživanje novih prehrambenih proizvoda s dobrim prihvaćanjem, poboljšanim prehrambenim vrijednostima i zdravstvenim pogodnostima. Jogurt se smatra sigurnim i hranjivim mliječnim proizvodom, te se njegova konzumacija stalno povećava (Aryana i Olson, 2017). U jogurt od kozjeg mlijeka, dodavanje okusa i aroma pomoću voća i/ili njegovih derivata može povećati njegovu hranjivu vrijednost i maskirati njegov kozji okus u razvoju novih proizvoda od kozjeg mlijeka (Feng i sur., 2018).

Ekstrakt komine grožđa može biti jedan od alternativnih sastojaka za uporabu u valorizaciji probiotičkih mliječnih proizvoda, poput fermentiranog kozjeg mlijeka, poboljšanjem njihovih svojstava za promicanje zdravlja. Kako ističu Sun-Waterhouse i sur. (2017), dodavanje polifenola u fermentirane mliječne proizvode dovodi do povećanja dnevnog unosa ovih bioaktivnih spojeva. Prema Dos Santos i sur. (2017) primjena ekstrakta komine grožđa povećala je ukupni fenolni udio fermentiranog kozjeg mlijeka prerađenog sa sokom od grožđa i probiotičkim kulturama (Dos Santos i sur., 2017). Probiotičke kulture su dio mikrobne populacije probavnog sustava ljudi i životinja te sudjeluju u njihovom metabolizmu. One mogu rasti u mlijeku i proizvoditi kiselinu, ali je potrebna dulja adaptacija pojedinih sojeva u mlijeku pa i dodatak promotora rasta (Tratnik i Božanić, 2012). Unatoč dokazima o zaštitnom učinku ekstrakta komine grožđa na održivost *L. acidophilus*, ustanovilo se da je *L. rhamnosus* najpovoljniji za proizvodnju fermentiranog mlijeka sa sokom i kominom od grožđa (Dos Santos i sur., 2017).

Osim ekstrakta komine grožđa antioksidacijsku aktivnost pokazuju korijen đumbira i cikle. Dodatak određene koncentracije ekstrakta đumbira (*Zingiber officinale*) i cikle (*Beta vulgaris* L.) u kravlji, kozji i bivolji jogurt istraživali su Srivastava i sur. (2015), a najvišu antioksidacijsku vrijednost imali su jogurti od kozjeg mlijeka s dodatkom 2 % ekstrakta đumbira i 2 % ekstrakta cikle nakon čega slijede jogurti od kravljeg te od bivoljeg mlijeka. Minimalna antioksidacijska aktivnost određena je u jogurtima s dodatkom ekstrakta đumbira i cikle u koncentracijama od 0,05 % i 1 %. Između ekstrakta đumbira i cikle višu antioksidacijsku aktivnost je pokazao ekstrakt đumbira (Srivastava i sur., 2015).

Kako bi se smanjila pojava sinereze u jogurtu te poboljšala konzistencija, prehrambena industrija koristi razne aditive prilikom proizvodnje. Ekstrakt soje topljiv u vodi jedan je od stabilizatora koji imaju važnu ulogu u pripremi prehrambenih proizvoda jer poboljšavaju nutritivnu vrijednost proizvoda i utječu na stvaranje strukture gela (Silva, 2015). Viskoznost proizvoda, jedno od reoloških svojstava, značajno utječe na prihvaćanje proizvoda od strane kupaca te je važan faktor koji treba kontrolirati tijekom prerade jogurta. S povećanjem suhe

tvori dolazi do smanjenja sinereze pa se zbog toga ekstrakt soje može uspješno koristiti u proizvodnji jogurta jer stabilizira odvajanje sirutke. Jogurt od kozjeg mlijeka s dodatkom ekstrakta soje pokazao je bolju viskoznost i kapacitet zadržavanja vode te smanjio sinerezu u jogurtu (Silva i sur., 2012).

Viskoznost može povećati i visok udio vlakana (uglavnom topljivih vlakana), znatna količina škroba i polisaharida pektina kao što ima kupuasu (*Theobroma grandiflorum*), tropsko voće porijeklom iz brazilske Amazonije. Kupuasu je voće koje ima karakterističnu aromu, okus i teksturu, njegova vlaknasta pulpa može pružiti drugačiju konzistenciju od ostalih voćnih pulpa (Costa i sur., 2015). Dodatkom ekstrakata raznog voća i povrća, poboljšalo je različita svojstva jogurta od kozjeg mlijeka i njihovu prihvaćenost od strane kupaca zbog boljih senzorskih svojstava i gubitka jakog „kozjeg okusa“ kojeg jogurt ima bez dodatka ekstrakta.

### 2.3. MORINGA OLEIFERA

*Moringa oleifera* Lam. (slika 5), porijeklom iz Indije, raste u tropskim i suptropskim regijama svijeta. Obično je poznato kao "stablo bubnjeva" ili "stablo hrena". Moringa može podnijeti i jaku sušu i blage uvjete mraza, pa je stoga i kultivirana širom svijeta. Svaki je dio stabla pogodan za prehrambene ili komercijalne svrhe zbog dobre hranjive vrijednosti. Listovi su bogati mineralnim tvarima, vitaminima i drugim bitnim fitokemikalijama. Koriste kod pothranjenosti, posebno među dojenčadi i dojiljama, jer oni sadrže više kalcija nego mlijeko, više željeza od špinata, više vitamina C od naranče i više kalija nego banana. Osim toga, moringa posjeduje antioksidacijsko, antikancerogeno, protuupalno, antidijabetičko te antimikrobno svojstvo (Gopalakrishnan i sur., 2016).



Slika 5. Potpuno zrelo drvo *Moringa oleifera* (Parrotta, 2014)

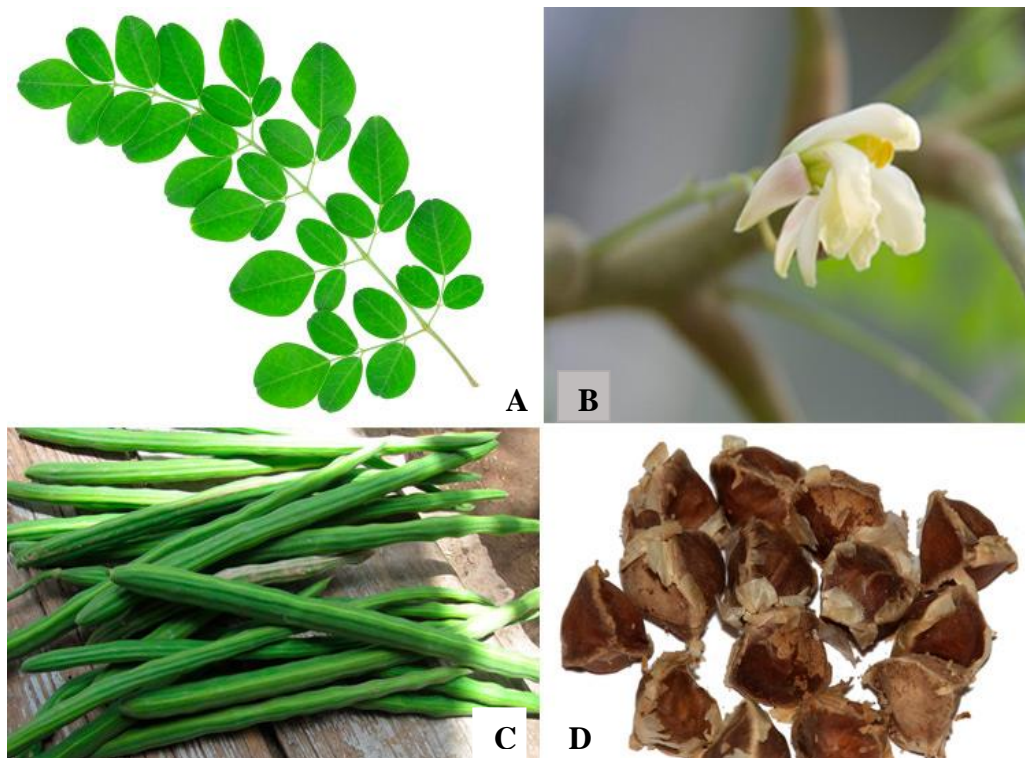
*Moringa oleifera* je najčešće kultivirana vrsta drveća u obitelji *Moringaceae*. Taksonomski, *M. oleifera* je dodijeljena porodici *Moringaceae* iz roda *Moringa*. Procjenjuje se da rod *Moringa* obuhvaća 13 vrsta od kojih je 11 podrijetlom iz Afrike (*M. drouhardii*, *M. stenopetala*, *M. hildebrandtii*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. rivaie*, *M. ruspoliana*, *M. arborea*, *M. borziana*, *M. pygmaea* i *M. longituba*) i Arabije i 2 iz Indije (*M. concanensis* i *M. oleifera*) (Tablica 8) (Falowo i sur., 2018).

Tablica 8. Taksonomija *Moringa oleifera* Lam.

<b>Taksonomija <i>Moringa oleifera</i> Lam.</b>	
<b>Carstvo</b>	<i>Plantae</i>
<b>Koljeno</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Razred</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Red</b>	<i>Brassicales</i>
<b>Porodica</b>	<i>Moringaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Moringa</i>

<b>Vrsta</b>	<i>M. oleifera</i>	<i>M. ovalifolia</i>
	<i>M. concanensis</i>	<i>M. peregrine</i>
	<i>M. arborea</i>	<i>M. rivae</i>
	<i>M. borziana</i>	<i>M. Ruspoliana</i>
	<i>M. drouhardii</i>	<i>M. pygmaea</i>
	<i>M. hildebrandtii</i>	<i>M. stenopetala</i>
	<i>M. longituba</i>	

Procjenjuje se da zrela biljka raste u prosječnoj visini od 5 do maksimalno 10 m u povoljnim uvjetima. List (slika 6 A) je zelenkaste boje i raste uglavnom na vrhovima grana. Cvijet (slika 6 B) ima žućkasto-bijele latice dužine od 1,0 do 1,5 cm, a širine 2,0 do 2,5 cm. Stabljika/kora je bjelkastosiva i okružena je debelim plutama. Sjemenke (slika 6 D) su okruglog ili trokutastog oblika sa smečkastom polupropusnom ljuskom i nalaze se u dugačkoj vitkoj mahuni (slika 6 C) (Falowo i sur., 2018).



Slika 6. Dijelovi biljke *Moringa oleifera* - A (list), B (cvijet), C (mahune), D (sjemenke)  
(Anonymous 3)



Ova vrsta najbolje raste u prosječnom rasponu maksimalne temperature od 25 do 35 °C, iako može preživjeti ljetnu temperaturu do 48 °C na ograničeno vrijeme i može podnijeti mraz zimi. U Indiji se ova vrsta uglavnom razmnožava reznicama (dužine 1-2 metra), tijekom ljetnih mjeseci (lipanj – srpanj). U komercijalnom uzgoju obrezuje se do 3 m kako bi se olakšala berba mahuna i lišća. Indija je najveći proizvođač moringe s godišnjom proizvodnjom od 1,1–1,3 milijuna tona plodova s površine 38 000 ha. Na sjevernom i istočnom dijelu zemlje lišće pada u prosincu-siječnju, a novi listovi se pojavljuju u ožujku-svibnju, zajedno s cvjetovima, nakon čega plodovi padaju od travnja do lipnja. Međutim, u južnim dijelovima države cvjetovi i plodovi nastaju tijekom cijele godine, od srpnja do rujna i ožujka do travnja, koja su i dva najveća razdoblja za žetvu (Pandey i sur., 2011).

### 2.3.1. *Moringa oleifera* kao izvor nutrijenata

Svaki dio biljke *Moringa oleifera* skladište je važnih hranjivih nutrijenata (tablica 9). Listovi moringe bogati su mineralnim tvarima poput kalcija, kalija, cinka, magnezija, željeza i bakra. U listovima su prisutni vitamini poput  $\beta$ -karotena, vitamina A, vitamina B skupine (folne kiseline, piridoksina i nikotinske kiseline), vitamina C, D i E (tablica 10) (Gopalakrishnan i sur., 2016). Osim vitamina i mineralnih tvari, listovi moringe bogati su karotenoidima, polifenolima, fenolnim kiselinama, flavonoidima, alkaloidima, glukozinolatima, izotiocijanatima, taninima i saponinima (Vergara-Jimenez i sur., 2017)

Tablica 9. Sastav nutrijenata listova, praha, sjemenke i mahune biljke *Moringa oleifera* na 100 g biljnog materijala (Gopalakrishnan i sur., 2016).

<b>Nutrijenti / mjerna jedinica</b>	<b>Svježi listovi</b>	<b>Osušeni listovi</b>	<b>Prah</b>	<b>Sjemenka</b>	<b>Mahuna</b>
<b>Kalorije (kcal)</b>	92	329	205	/	26
<b>Proteini (g)</b>	6,7	29,4	27,1	35.97±0.19	2,5
<b>Masti (g)</b>	1,7	5,2	2,3	38.67±0.03	0,1
<b>Ugljikohidrati (g)</b>	12,5	41,2	38,2	8.67±0.12	3,7
<b>Vlakna (g)</b>	0,9	12,5	19,2	2.87±0.03	4,8

Svježi listovi *Moringe oleifere* dobar su izvor vitamina A. Vitamin A ima važnu funkciju i utječe pozitivno na ljudsko zdravlje. Važan je za vid, reprodukciju, embrionalni rast i razvoj, za imunološki sustav i staničnu diferencijaciju. Listovi moringe su dobar izvor karotenoida provitamina A. Listovi također sadrže 200 mg/100 g vitamina C, što je viša koncentracija od one koja se nalazi u naranči. Također štite tijelo od različitih štetnih učinaka slobodnih radikala, zagađivača i toksina i djeluju kao antioksidansi. Svježi listovi su i dobar izvor vitamina E, koncentracije slične onima kao u orašastim plodovima (Vergara-Jimenez i sur., 2017). Vitamin E pomaže zaustaviti lančane reakcije peroksidacije lipida koje stvaraju slobodni radikali. Metabolizira perokside prije nego što izazovu oštećenje stanične membrane (Ferreira i sur., 2008).

Tablica 10. Sastav i količine vitamina u listovima, prahu, sjemenkama i mahunama moringe na 100 g biljnog materijala (Gopalakrishnan i sur., 2016).

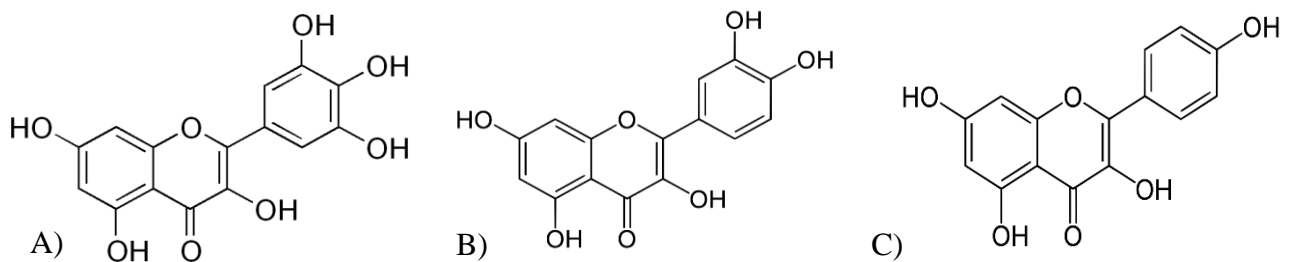
<b>Nutrijenti / mjerna jedinica</b>	<b>Svježi listovi</b>	<b>Osušeni listovi</b>	<b>Prah</b>	<b>Sjemenka</b>	<b>Mahuna</b>
<b>Vitamin B<sub>1</sub> (mg)</b>	0,06	2,02	2,64	0,05	0,05
<b>Vitamin B<sub>2</sub> (mg)</b>	0,05	21,3	20,5	0,06	0,07
<b>Vitamin B<sub>3</sub> (mg)</b>	0,8	7,6	8,2	0,2	0,2
<b>Vitamin C (mg)</b>	220	15,8	17,3	4.5± 0.17	120
<b>Vitamin E (mg)</b>	448	10,8	113	751.67±4.41	/

Studija Rodríguez-Pérez i sur. (2015) je pokazala da listovi moringe mogu biti dobar izvor bioaktivnih spojeva poput polifenolnih spojeva. Moringa se može koristiti kao dodatak prehrani u zemljama gdje je autohtona vrsta, a nudi i nove mogućnosti kompanijama za razvoj prehrambenih, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda (Rodríguez-Pérez i sur., 2015).

Flavonoidi, koji se sintetiziraju u biljci kao odgovor na mikrobnе infekcije, imaju benzopiranski prsten kao zajedničku strukturu. Pokazano je da unos flavonoida štiti od

kroničnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, uključujući kardiovaskularne bolesti i rak (Vergara-Jimenez i sur., 2017). Flavonoidi štite stanice od oštećenja uzrokovanih X-zrakama, blokiraju napredovanje staničnog ciklusa i sintezu prostaglandina, inhibiraju mutacije i sprječavaju kancerogenezu kod pokusnih životinja (Ferreira i sur., 2008).

Listovi moringe dobar su izvor flavonoida. Glavni flavonoidi koji se nalaze u lišću moringe su miricetin, kvercetin i kempferol (slika 7). Kvercetin je jak antioksidans, s višestrukim terapijskim svojstvima (Vergara-Jimenez i sur., 2017).



Slika 7. Struktura miricetina (A), kvercetina (B) i kemferola (C)

Prema Berkovich i sur. (2013) studija in vitro pokazala je da ekstrakt lišća *Moringa oleifera* pokazuje snažnu antikancerogenu aktivnost za koju su zaslužni glukozinolati, izotiocijanati, glikozidnih spojevi i glicerol-1-9-oktadekanoat (Berkovich i sur., 2013).

*Moringa* je izuzetno korisna za liječenje kardiovaskularnih poremećaja, jer sadrži spojeve koji mogu sniziti krvni tlak, razinu lipida i povećati proizvodnju urina. Sok od lišća moringe koristi se za stabilizaciju krvnog tlaka. Listovi moringe sadrže karbamate, tiokarbamate, nitrile ili acetilirane glikozidne skupine koje se rijetko nalaze u prirodi, ali za koje je utvrđeno da su odgovorne za snižavanje krvnog tlaka. Izotiocijanatni i tiokarbamatni glikozidi izolirani su iz etanolnih ekstrakata mahune moringe i pokazuju hipotenzivne učinke (Hasan i sur., 2019).

Listovi moringe imaju malu kalorijsku vrijednost što ih čini vrlo dobar dodatak prehrani pretilih ljudi i onih koji ne žele dobivati previše kilograma i može biti vrlo dobar izvor energije (Oduro i sur., 2008).

U usporedbi s drugom hranom, razni dijelovi biljke moringe imaju 10 puta više vitamina A od mrkve, 17 puta više kalcija od mlijeka, 9 puta više proteina od jogurta, 15 puta više kalija nego banana i 25 puta više željeza od špinata (Gopalakrishnan i sur., 2016). *Moringa* ima puno mineralnih tvari koje su neophodne za rast i razvoj, a kalcij se smatra jednim od važnijih mineralnih tvari za rast čovjeka (tablica 11). Dok jedna šalica mlijeka može osigurati 300-400

mg kalcija, listovi moringe mogu pružiti 1000 mg, a moringa u prahu čak više od 4000 mg. Moringa prah može se koristiti kao zamjena za tablete željeza, stoga kao i lijek za anemiju (Fuglie, 2005). Djeca, žene reproduktivne dobi i trudnice najosjetljiviji su na nedostatak mikronutrijenata i anemiju stoga im treba hrana s visokim udjelom željeza.

Ako trudnica ima anemiju može doći do štetnih učinaka na nju i na plod. Smanjuje se opskrba kisikom u majčinom metabolizmu, razina hemoglobina je niska da bi mogao vezati kisik i time može doći do neizravnog i štetnog učinka na trudnicu i novorođenče, uključujući smrt pri rođenju, prijevremeno rođenje i mala težina djeteta pri rođenju (Iskandar i sur, 2015).

Kalcij pomaže u stvaranju jakih kostiju i zuba. Pokazalo se da konzumacija slatkog krumpira i lišća moringe može pridonijeti svakodnevnim potrebama kalcija (Oduro i sur., 2008).

Tablica 11. Sastav i količina (mg) mineralnih tvari listova, praha, sjemenke i mahune biljke *Moringa oleifera* na 100 g biljnog materijala (Gopalakrishnan i sur., 2016).

<b>Nutrijenti / mjerna jedinica</b>	<b>Svježi listovi</b>	<b>Osušeni listovi</b>	<b>Prah</b>	<b>Sjemenka</b>	<b>Mahuna</b>
<b>Kalcij (mg)</b>	440	2185	2003	45	30
<b>Magnezij (mg)</b>	42	448	368	635±8.66	24
<b>Fosfor (mg)</b>	70	252	204	75	110
<b>Kalij (mg)</b>	259	1236	1324	/	259
<b>Bakar (mg)</b>	0,07	0,49	0,57	5.20±0.15	3,1
<b>Željezo (mg)</b>	0,85	25,6	28,2	/	5,3
<b>Sumpor (mg)</b>	/	/	870	0,05	137

Sjemenke moringe sadrže najviše ulja 30-42 %, dok listovi i mahune sadrže 1-2 % (Tsaknis i sur., 1999).

Koncentracija ulja u sjemenkama ovisi o klimatskim faktorima. Pokazalo se da je koncentracija ulja viša u sjemenkama ubranih uz pojas rijeke Ind i u kultivirano zdravim biljkama čija je opskrba vodom redovita nego u biljkama u suhom planinskom kraju kojima je nedostajalo navodnjavanja. Udio ulja u sjemenkama s različitih nalazišta mogao je varirati zbog razlike prirodnog sastava tla i ostalih učinaka od strane čovjeka (Anwar i Bhangar, 2003).

Ulje sjemenki moringe sadrži oko 20 % zasićenih masnih kiselina i 80 % nezasićenih masnih kiselina. Od zasićenih masnih kiselina u koje se ubrajaju palmitinska (C16:0), stearinska kiselina (C18:0), arahidska kiselina (C20:0) i behenijska kiselina (C22:0), najzastupljenija je behenijska iza koje slijedi palmitinska kiselina (Tsaknis i sur., 1999). Ulje sadrži visok udio polinezasićenih masnih kiselina, oko 76 %, što ga čini idealnim za zamjenu maslinovog ulja. Najzastupljenija polinezasićena masna kiselina u ulju je oleinska kiselina (> 70 %) koja uz ostale dvije kiseline, linoleinsku i linolensku, ima mogućnost kontrole kolesterola (Lalas i Tsaknis, 2002).

Ulje moringe komercijalno je poznato kao „ben ulje“ ili „behenijsko ulje“ zbog zastupljene behenijske (C22:0) masne kiseline (Rashid i sur., 2008). Koristi se za prehranu ljudi, u kozmetici i sapunima. Jako je cijenjeno u parfemskoj industriji zbog moći upijanja i zadržavanja mirisa. Pogača se nakon prešanja koristi kao gnojivo (Parrotta, 2014). Zbog svojih fizikalnih svojstava, dodatak behenijske kiseline može posvijetliti teksturu čokolade i poboljšati osjet masnoće te spriječiti bijeljenje zaprške (Lalas i Tsaknis, 2002).

Prema Lalas i Tsaknis (2002) ulja sjemena moringe sadrži  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferole dok većina biljnih ulja sadrži  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferole.  $\delta$ -tokoferol, osim ulja sjemena moringe, sadrže i druga ulja poput ulja sjemena pamuka, kikirikija, pšeničnih klica, sojinog i ricinusovog ulja. Antioksidacijska aktivnost  $\delta$ -tokoferola viša je od aktivnosti  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferola. Iz tog razloga tokoferoli prisutni u ulju moringe mogu zaštititi ulje od kvarenja tijekom skladištenja (Lalas i Tsaknis, 2002).

Aminokiseline su organski spojevi koji tvore proteine i kao takvi utječu na količinu i kvalitetu proteina. Aminokiseline se mogu podijeliti na esencijalne i neesencijalne aminokiseline. One su potrebne za proizvodnju enzima, imunoglobina, hormona i za formiranje strukture crvenih krvnih stanica (Moyo i sur., 2011).

*Moringa oleifera* je dobar izvor proteina. Prema Sanchez-Machado i sur. (2010), osušeni listovi moringe sadrže 16 aminokiselina (tablica 12). Ukupna koncentracija aminokiselina u cvjetovima i lišću moringe je u rasponu od 74,5 do 172,7 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari. Od ukupnih aminokiselina, lišće sadrži 44 % esencijalnih aminokiselina, nezrele mahune 30 %, a cvjetovi 31 %. Najzastupljenije aminokiseline u različitim dijelovima biljke moringe su glutaminska kiselina, arginin i asparaginska kiselina dok su u najnižim koncentracijama prisutni metionin i tirozin (Sanchez-Machado i sur., 2010). Metionin i cistein snažni su antioksidansi koji pomažu u detoksikaciji štetnih spojeva i štite tijelo od zračenja. Hidroksiprolin je glavna komponenta proteinskog kolagena koji ima ključnu ulogu u stabilnosti kolagena (Moyo i sur., 2011).

Svi dijelovi biljke sadrže visoki postotak esencijalnih aminokiselina, osim aminokiseline metionina koje nedostaje u zelenim listovima. Na varijacije u sastavu aminokiselina u lišću može utjecati kvaliteta proteina i podrijetlo biljke (kultivirane ili divlje sorte) (Sanchez-Machado i sur., 2010).

Tablica 12. Udio aminokiselina (mg g<sup>-1</sup> na suhe tvari) jestivih dijelova *Moringe oleifere* (Sanchez-Machado i sur., 2010)

<b>Aminokiseline</b>	<b>Listovi</b>	<b>Nezrele mahune</b>	<b>Cvijet</b>
<b>Aspartat</b>	15,8 ± 1,5	7,4 ± 0,3	12,3 ± 0,9
<b>Glutamat</b>	17,1 ± 1,4	14,6 ± 2,3	17,0 ± 2,2
<b>Serin</b>	9,4 ± 0,5	7,5 ± 1,8	7,5 ± 0,4
<b>Histidin*</b>	7,0 ± 0,4	2,0 ± 0,3	3,1 ± 0,4
<b>Glicin</b>	10,3 ± 0,7	4,3 ± 0,5	6,5 ± 0,3
<b>Treonin*</b>	7,9 ± 0,4	3,3 ± 0,5	5,4 ± 0,2
<b>Alanin</b>	12,5 ± 0,6	4,2 ± 0,7	8,1 ± 0,5
<b>Prolin</b>	12,4 ± 0,9	4,0 ± 0,6	6,6 ± 0,5
<b>Tirozin*</b>	4,8 ± 0,9	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
<b>Arginin</b>	12,2 ± 0,8	8,1 ± 2,5	20,1 ± 1,2
<b>Valin*</b>	11,3 ± 1,1	4,3 ± 1,0	6,4 ± 0,6
<b>Metionin*</b>	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2
<b>Izoleucin*</b>	8,9 ± 0,7	3,1 ± 0,4	5,2 ± 0,5
<b>Leucin*</b>	17,5 ± 0,2	5,6 ± 0,5	8,7 ± 0,9
<b>Fenilalanin*</b>	8,9 ± 0,3	2,3 ± 0,4	3,8 ± 0,5
<b>Lizin*</b>	15,3 ± 0,6	2,5 ± 0,6	4,6 ± 0,5
<b>Ukupno</b>	<b>172,7 ± 3,2</b>	<b>74,5 ± 4,3</b>	<b>116,7 ± 3,2</b>
<b>Esencijalne aminokiseline</b>	<b>83 ± 1,8</b>	<b>24,4 ± 1,5</b>	<b>38,6 ± 1,5</b>

\*esencijalne aminokiseline

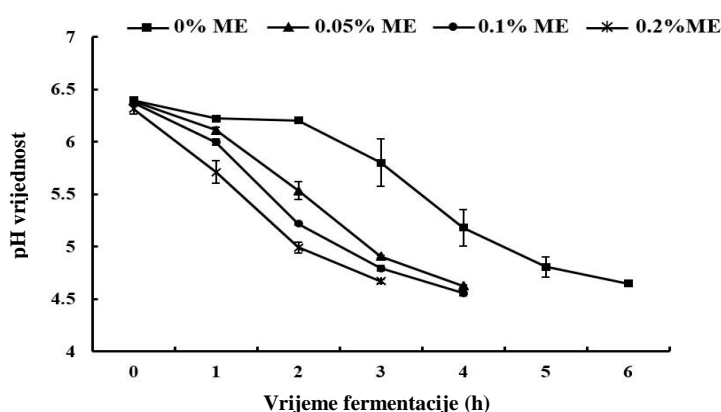
Valja napomenuti da sastav hranjivih sastojaka varira ovisno o mjestu rasta biljke. Pokazalo se da godišnja doba utječu na udio hranjivih sastojaka. Viši udio proteina, vitamina A i glukozinolata te vrijednost antioksidacijske aktivnosti je u toplo-vlažnoj sezoni dok su u hladnoj i suhoj sezoni pronađeni viši udjeli željeza, vitamina C i fenolnih kiselina (Gopalakrishnan i sur., 2016). Razlika u rezultatima može se pripisati činjenici da lokacija, klima i okolišni čimbenici značajno utječu na udio hranjivih tvari u stablu (Moyo i sur., 2011).

### 2.3.2. *Moringa oleifera* u mliječnim proizvodima

*Moringa oleifera*, domorodačko indijsko stablo, koristi se za medicinsku upotrebu i hranu. Budući da gotovo svaki dio moringe sadrži bioaktivne komponente, koristio se kao biljni lijek i kao vrijedan prehrambeni resurs. Listovi moringe su bogat izvor fenola, proteina, mineralnih tvari i vitamina, kao i dobri izvori fitonutrijenata (Zhang i sur, 2019). Ekstrakt moringe može se dodavati u mliječne proizvode radi poboljšanja fizikalno-kemijskih i nutritivnih svojstava tih proizvoda.

U proizvodnji jogurta i jogurtu sličnih fermentiranih mlijeka koriste se homofermentativne vrste *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* kao monokulture ili najčešće kao mješovita jogurtna kultura (Tratnik i Božanić, 2012).

Zhang i sur. (2019) proveli su istraživanje koje je pokazalo da ekstrakt moringe ubrzava rast bakterija mliječne kiseline tijekom fermentacije jogurta. Povećani rast bakterija mliječne kiseline može se pripisati komponentama ekstrakta moringe kao što su organske kiseline, fenolne kiseline i flavonoidi (Shokery i sur., 2017). Smatra se da ove komponente potiču rast bakterija mliječne kiseline i uzrokuju brži pad pH vrijednosti. Bržim padom pH vrijednosti kraće je vrijeme fermentacije (Zhang i sur., 2019). Iz dijagrama ovisnosti pH o trajanju fermentacije (slika 8), vidi se da je dodatkom veće koncentracije ekstrakta moringe brži pad pH vrijednosti, a time i kraće vrijeme fermentacije jogurta. Povećana koncentracija organskih kiselina jedan je od važnih čimbenika koji mogu dramatično utjecati na rast bakterija (Shori, 2013). Jogurt s biljem poput metvice, kopra i bosiljka također je povećao broj bakterija mliječne kiseline i doprinio brzom padu pH vrijednosti (Zhang i sur, 2019).



Slika 8. Ovisnost pH vrijednost jogurta bez (0 %) i s dodatkom ekstrakta *Moringe oleifere* (ME) (0,05, 0,1 i 0,2 %) o trajanju fermentacije (Zhang i sur., 2019)

Slično rezultatima prethodnih istraživanja, jogurt s dodatkom soje, koja sadrži polifenolne spojeve, pokazao je veći broj bakterija mliječne kiseline u usporedbi s kontrolnim jogurtom, povećavajući održivost probiotika (Shori, 2013). Uz to, polifenoli su spriječili potencijalno kvarenje inhibirajući rast mikroorganizama kvarenja poput kvasaca i plijesni tijekom fermentacije. Povećanim rastom broja bakterija smanjilo se vrijeme fermentacije jogurta s dodatkom biljnih ekstrakata za razliku od kontrolnog jogurta (Zhang i sur., 2019).

Dodatak moringe u jogurt ima utjecaj na sinerezu i viskoznost. Zhang i sur. (2019) otkrili su da je povećana viskoznost jogurta posljedica interakcija proteina i polifenola. Budući da polifenoli posjeduju značajan afinitet prema proteinima, oni mogu tvoriti komplekse s proteinima mlijeka poput kazeina. Ovaj kompleks može doprinijeti opaženoj sinerezi i povećanju kapaciteta zadržavanja vode jogurta s dodatkom ekstrakta moringe. Stoga podaci o viskoznosti sugeriraju da dodatak ekstrakta moringe može doprinijeti dobroj teksturi i viskoznosti tijekom senzorske procjene (Zhang i sur., 2019).

Dok je dodatak moringe povećao sinerezu, prema Shokery i sur. (2017) dodatak zelenog čaja je smanjio sinerezu jogurta. Dönmez i sur. (2017) naveli su da učinak ekstrakta zelenog čaja na brzinu sinereze ovisi o dodanoj koncentraciji ekstrakta. Ekstrakt je smanjio stopu sinereze kada je dodano 0,02 %, ali je uzrokovao povećanje kada je dodano 2 %. Te razlike među rezultatima mogu biti zbog biljnog izvora, vrste ili postupka ekstrakcije (Dönmez i sur., 2017). Prema istraživanju Shokery i sur. (2017), ekstrakt moringe je kiseliji s višim udjelom kalcija i vlakana u odnosu na ekstrakt zelenog čaja, a ti su čimbenici mogli utjecati na grušanje jogurta uzrokujući veću sinerezu (Shokery i sur., 2017).

Dodatak ekstrakta moringe rezultirao je povećanom gorčinom, viskoznošću i teksturom, ali smanjenom općom prihvatljivošću, slatkoćom, kiselosti, aromom i kiselom aromom te se time smanjila ocjena okusa u usporedbi s kontrolnim jogurtom. Razlog takvih rezultata je gorak okus i biljna aroma moringe. Međutim, dodavanje 0,05 % ekstrakta moringe jogurtu nije značajno utjecalo na opću prihvatljivost u odnosu na kontrolni jogurt. Na temelju podataka senzorske procjene dobivenih u ovom istraživanju, dodatak 0,05 % ekstrakta moringe mogao bi biti koristan za proizvodnju jogurta s dodatkom ekstrakta moringe jer su ove koncentracije pokazale poboljšane karakteristike kvalitete bez stvaranja značajnih negativnih senzornih svojstava (Zhang i sur., 2019).

Da bi se poboljšala senzorska svojstva i bolja prihvaćenost jogurta s dodatkom moringe mogu se dodati banana, avokado ili slatki krumpir. Prema Kuikman i O'Connor (2015) moringa probiotički jogurt s dodatkom banane može se usporediti s moringa probiotičkim jogurtom.



Jogurt s dodatkom banane imao je bolje ocjene izgleda, okusa, teksture i ukupne kvalitete nego sam moringa probiotički jogurt. Isto tako, nisu pronašli razliku između moringa probiotičkog jogurta i moringa uzorka s dodatkom slatkog krumpira za okus i teksturu te uzorka s dodatkom avokada za teksturu, što sugerira da su oni također usporedivi. Ovakvi proizvodi mogu ponuditi dodatne zdravstvene koristi u odnosu na probiotički jogurt s moringom (Kuikman i O'Connor, 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. METODE I REZULTATI

U ovom poglavlju je dan pregled metoda kojima su određeni bioaktivni spojevi u biljci *Moringa oleifera*, a za koje se u istraživanjima pokazalo da utječu na ljudsko zdravlje.

##### 3.1.1. Određivanje bioaktivnih spojeva HPLC–ESI–QTOF–MS

Rodriguez-Perez i sur. (2015) proveli su istraživanje i odredili bioaktivne spojeve pomoću visoko djelotvorne tekućinske kromatografije – elektrosprej ionizacije – kvadropolnog Time of flight masenog spektrometra (HPLC-ESI-QTOF-MS) u uzorcima *Moringe oleifere* prikupljene na Madagaskaru. Grane sa stabla otkinute su ručno i položene na police dužine 3 m, širine 30 cm s razmakom od 50 cm na suhom mjestu uz dobru ventilaciju i u tami. Dva tjedna kasnije, lišće je usitnjeno u tarioniku, a dobiveni prah *Moringe oleifere* pohranjen je u mraku na suhom mjestu sve do obrade.

##### Priprema uzorka

Ekstrakt listova moringe dobiven je ekstrakcijom kruto-tekuće i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE). Za provedene ekstrakcije koristila su se različita otapala i mješavina otapala s vodom. Od otapala su koristili metanol, etanol i aceton u omjerima 100 %, 70:30 (otapalo:voda) i 50:50 (otapalo voda). UAE koristeći etanol:voda (50:50) bio je najefikasniji postupak ekstrakcije, koji je omogućio dobivanje  $47 \pm 4$  mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)  $g^{-1}$  suhog lišća (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

##### Metode istraživanja

##### Određivanje udjela ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola dobivenih ekstrakata određen je korištenjem Folin-Ciocalteu testa (Herrero i sur., 2011) s nekim izmjenama. Ukupni volumen reakcijske smjese smanjen je na 1 mL. Pomiješano je 600  $\mu$ L vode i 10  $\mu$ L uzorka, kojem je dodano 50  $\mu$ L nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 10 minuta, dodano je 150  $\mu$ L 2 %  $Na_2CO_3$  i volumen je dopunjen do 1 mL s vodom. Nakon 2 sata inkubacije pri sobnoj temperaturi u tami, 200  $\mu$ L smjese prenese se u jažicu mikroploče. Apsorbancija je izmjerena na 760 nm koristeći Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Micro plate reader (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Koncentracija ukupnih polifenola izračunata je na osnovu određenih apsorbanacija korištenjem kalibracijske krivulje za galnu kiselinu ( $5$  do  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) te su rezultati izraženi kao mg galne kiseline po g suhog lišća (mg GAE/g) (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

#### HPLC analiza

HPLC metoda provedena je koristeći Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system. Kolona koja je korištena za separaciju je Zorbax Eclipse Plus C18 ( $1.8 \mu\text{m}$ ,  $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ). Odvajanje je provedeno mobilnom fazom otapala A ( $0.5 \%$  mravlje kiseline u vodi) i otapalo B (acetonitril). Gradijent je programiran:  $0 \text{ min}$ ,  $5 \%$  B;  $10 \text{ min}$ ,  $35 \%$  B;  $65 \text{ min}$ ,  $95 \%$  B;  $67 \text{ min}$ ,  $5 \%$  B u 3 ciklusa. Volumen ubrizgavanja je  $10 \mu\text{L}$ , a brzina protoka  $0,50 \text{ mL min}^{-1}$  kroz gradijent (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

#### ESI-QTOF-MS analiza

HPLC sustav spojen je s micrOTOF-Q II masenim spektrometrom opremljenim elektrosprej ionizacijom (ESI) u režimu negativnog iona. Detekcija je provedena uzimajući u obzir raspon masa od  $50$ – $1100 \text{ m/z}$ , koristeći kapilarni napon od  $+4000 \text{ V}$ , temperaturu suhog plina (dušik) od  $210 \text{ }^\circ\text{C}$ , protok suhog plina od  $8,0 \text{ L min}^{-1}$ , tlak u raspršivaču od  $2,0 \text{ bara}$  i brzina spektra od  $1 \text{ Hz}$ . Da bi se postigla točnost mjerenja potrebna za identificiranje spojeva, korištena je vanjska kalibracija instrumenta. U tu svrhu upotrijebljeni su klasteri natrijevog formijata koji se sastoje od  $5 \text{ mM}$  natrijevog hidroksida i vode:2-propanol  $1:1$  s  $0,2 \%$  mravlje kiseline (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

### Rezultati istraživanja

Prilog 1 prikazuje udio ukupnih fenola određenih korištenjem Folin-Ciocalteu testa i izraženih kao mg ekvivalenta galne kiseline po g suhog lišća (mg GAE  $\text{g}^{-1}$ ) koristeći ekstrakciju kruto-tekuće (maceracija) i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE). Koristeći  $100 \%$  organsko otapalo količina ekstrahiranih fenolnih spojeva za oba tipa ekstrakcija je manja nego kada se koristi smjesa otapala i vode. Koristeći UAE ekstrahirana je veća količina ukupnih fenola nego kada se provodi maceracija. Razlog tome može biti korištenje ultrazvuka koji može uništiti stanične stijenke te otapalo prodire više u uzorak i time se postiže veći prinos ekstrakcije (Vinatoru, 2001). Iz tog razloga, čini se da je UAE najbolji izbor za ekstrahiranje fenolnih spojeva iz lišća moringe (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

S druge strane, pokazalo se da je najučinkovitije ako se koristi otapalo u omjeru  $50:50$ . Nije bilo značajnih razlika između UAE koristeći smjesu otapala metanol:voda ( $50:50$ ) ili etanol:voda ( $50:50$ ). Mnogi autori su istraživali utjecaj otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva

te zaključili da je najviše ekstrahiranih tvari postignuto s omjerom etanola i vode 30-60 %. Iz tih razloga, odabrali su UAE koristeći omjer etanola i vode 50:50 (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Prilog 2 prikazuje HPLC kromatogram ekstrakta lišća moringe dobiven HPLC–ESI–QTOF–MS analizom u režimu negativnog iona. Spojevi su identificirani usporedbom njihovih MS i MS/MS spektara te pomoću podataka iz literature i baze podataka masenog spektra kao što su Metlin i MassBank. Identificirano je 59 spojeva koji pripadaju skupinama aminokiselina, nukleozida, organskih kiselina, fenolnih kiselina i njihovih derivata, tioglikozida, lignana i flavonoida. Ova metoda omogućila je identifikaciju tri aminokiseline, leucina ili izoleucina (pik 5), fenilalanina (pik 10) i triptofana (pik 15). Pored toga, nukleozid adenozin (pik 9) je identificiran, ima retencijsko vrijeme (RT) 11.6 (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Pokazalo se da ekstrakt sadrži 11 organskih kiselina. Jedna od njih je glukonska kiselina (pik 1). Ona je blaga organska kiselina koja je dostupna u biljkama, a dobiva se iz glukoze oksidacijskom reakcijom. Koristi se za upotrebu u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima. Pik 2 je karakterističan za kvininsku kiselinu, jedna od glavnih kiselina koja je već prethodno identificirana u lišću moringe. Dvije kiseline koje nisu toliko opisane i povezane s lišćem moringe su jabučna (pik 3) i limunska kiselina (pik 4). Osim navedenih organskih kiselina, pronađene su i azelainska kiselina (pik 42), dekanska dikiselina (pik 52) i 5 izomera 9,12,13-trihidroksi oktadekanske kiseline (pikovi 55-59) (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni biljni metaboliti, široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Jedanaest fenolnih kiselina i njihovih derivata je identificirano u uzorku moringe, od kojih sedam po prvi put. Od jedanaest spojeva, 4 su izomeri kafeoilkvinske kiseline (pikovi 11, 12, 13 i 14) koji su do sad pronađeni u lišću moringe, a oni koji su po prvi put identificirani su 2 izomera feruloilkininske kiseline (pikovi 18 i 24), izomeri kumaroilkininske kiseline (pikovi 16, 17 i 20) i 4-*p*-kumaroilkininska kiselina (pik 22) (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti koji se mogu pronaći u 16 porodica reda Brassicales među koje spadaju biljke iz porodica *Brassicaceae* i *Moringaceae*. Posljednjih godina proučavaju se zbog svojih kemoterapijskih svojstava. U uzorku moringe identificirana su 3 izomera glukomoringina (pikovi 6, 7 i 8). Glukozinolati se nalaze u sjemenkama određenih biljaka dok je njihova identifikacija u lišću puno rjeđa zbog starosti biljaka i faktora okoliša koji imaju utjecaj na njihovu koncentraciju (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Lignani su jedan od glavnih fitoestrogena koji se nalaze u biljkama, a koji djeluju i kao antioksidansi. Iako ih sadrži puno vrsta biljaka, lignani nisu ranije pronađeni u lišću *Moringa*

*oleifera*, niti u obitelji *Moringaceae*. Na kromatogramu, u uzorku moringe 4 lignana su pokazali nizak intenzitet. Identificirani su pinoresinol ili epipinoresinol glikozid (pik 27), lariciresinol glikozid (pik 25) i isolariciresinol glikozidni izomer (pik 28) i sekoizolariciresinol glikozid (pik 31) (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

Od fenolnih spojeva najzastupljenija skupina u uzorku moringe su flavonoidi tj. derivati kemferola i kvercetina. U uzorku moringe identificirano je 26 različitih flavonoida, a neki od njih su identificirani po prvi put. Kemferol (pik 53) kao jedan od glavnih flavonoida ima retencijsko vrijeme 40,85, a njegovi derivati koji su pronađeni su kemferol 3-*O*-glukozid (pik 40), kemferol diglikozid (pik 21), izomeri kemferol acetil glikozida (pikovi 43, 44 i 49), kemferol malonil glikozida (pik 45), kemferol glikozid-hidroksi-metilglutarata (pik 46) i kemferoldiacetil ramnozida (pik 51). Prema mnogim znanstvenicima, derivati kemferola zajedno s derivatima kvercetina su glavni flavonoidi u lišću moringe. Od 11 derivata kvercetina, četiri su identificirana u prethodnim istraživanjima, a ostali su identificirani po prvi put. U 5 derivata kvercetina (pikovi 37-39, 48 i 54) koji su identificirani po prvi put ubrajaju se kvercetin triacetilgalaktozid, izomeri kvercetin acetil glikozida i dva neodređena kvercetinska derivata (Rodriguez-Perez i sur., 2015).

### 3.1.2. Određivanje flavonoida pomoću LC/MS

Coppin i sur. (2013) odredili su flavonoide u moringi pomoću LC/MS metode. Uzorci su skupljeni s više lokacija iz sub-saharske Afrike, točnije s dvije lokacije iz Gane, jedne iz Senegala i četiri iz Zambije. Dva seta uzoraka su skupljeni krajem jeseni i krajem zime.

Listovi su ručno ubrani iz rasadnika i s biljaka uzgajanih na poljima, osušeni su u hladu, a zatim zapakirani za kasnije eksperimentalne analize. Listovi su se sušili u hladu ispod drveta i izvan direktne sunčeve svjetlosti kako bi se izbjegla degradacija određenih analita na višim temperaturama. Svi materijali su samljeveni u fini prah laboratorijskim mlinom (Perten 3100) i čuvali su se pri sobnoj temperaturi u mraku. Materijali koji su koristili u analizama su: standardne komponente (kvercetin i kemferol), HPLC otapala acetonitril, metanol, octena kiselina, mravlja kiselina i voda. Za HPLC metodu su koristili HPLC kolonu Prodigy ODS3 5 µm, 150 x 3.2mm 5 µ, a za LC-MS koristili su Hewlett Packard Agilent 1100 Series LC/MS.

### Priprema uzorka

Za kvalitativnu identifikaciju, 100 mg praha uzoraka lista moringe ekstrahirano je u 25 mL 0,1 % octene kiseline u 70 % metanolu u vodi tijekom 25 minuta i kondicionirano 2 sata pri

sobnoj temperaturi. Uzorci su čuvani u hladnjaku preko noći pri 5 °C. Ekstrahirana otopina ostavljena je da se zagrije do sobne temperature, a otprilike 1 mL filtrira se kroz filter 0,45 µm i prebaci u HPLC staklene bočice za HPLC analizu (Coppin i sur., 2013).

Za kvantitativno određivanje flavonoida kvercetina i kempferola, približno 100 mg svakog uzorka lišća moringe stavljeno je u tikvicu s okruglim dnom od 125 mL. Dodano je 15 mL otopine metanola i tretirano ultrazvukom 15 minuta. Svakoj smjesi doda se koncentrirana HCl (1,5 mL) i refluksira 2 sata. Uzorci su ostavljeni da se ohlade do sobne temperature i stavljeni u odmjernu tikvicu od 25 mL kako bi se volumen održao konstantnim. Otprilike 1 mL ekstrakta filtrira se kroz 0,45 µm filter i prebaci u HPLC staklene bočice (Coppin i sur., 2013).

### Metode istraživanja

#### LC/MS metoda za kvalitativno određivanje flavonoida

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) razdvajanje je provedeno mobilnom fazom koja sadrži otapalo A (0,1 % mravlja kiselina u vodi) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu) za gradijent: 10–30 % B u 20 min i 30 % B u 20–30 min pri brzini protoka od 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Volumen injektiranja je 10 µL, a UV detektor je postavljen na 254, 280 i 370 nm. Eluat je praćen pomoću elektrosprej ionizacije (ESI-MS) u režimu pozitivnog iona i skeniran m/z od 100 do 800. ESI je proveden uporabom napona od 3,5 kV pod optimalnom razinom kolizijske energije od 60 %. Dušik visoke čistoće (99,999 %) korišten je kao suhi plin pri protoku od 12 L min<sup>-1</sup> i kapilarnoj temperaturi 350 °C. Dušik je korišten kao raspršivač pri 40 psi (Coppin i sur., 2013).

#### HPLC metoda za kvantitativno određivanje

HPLC odvajanje provedeno je mobilnom fazom otapala A (0,1 % mravlje kiseline u vodi) i otapala B (0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu) i izokratskim protokom od 30 % B u 10 min s brzinom protoka od 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Volumen ubrizgavanja bio je 10 µL, a UV detektor postavljen je na 370 nm. Eluat je praćen ESI-MS pod istim uvjetima kao i za kvalitativnu identifikaciju (Coppin i sur., 2013).

### Rezultati istraživanja

Dobivenim UV i MS kromatogramima identificirano je 12 flavonoida (prilog 3) pomoću njihovog retencijskog vremena, UV apsorpcije, protoniranim molekulskim ionima i karakterističnim fragmentima iona za pojedine pikove. Flavonoidi koji su identificirani su

kvercetin i kempferol glikozidi, malonil glikozidi, acetil glikozidi i sukcionil glikozidi. Najzastupljeniji su kvercetin i kemferol glikozidi te malonil glikozidi.

Za potvrdu flavonoidnih aglikona, koristili su se standardni spojevi te su flavonoidi nađeni u hidroliziranom ekstraktu moringe uspoređeni sa standardima. Pod optimiziranim HPLC uvjetima, dva flavonoida, kvercetin i kempferol uspješno su kvantificirani u hidroliziranim ekstraktima moringe što se vidi u prilogu 4 koji prikazuje UV kromatograme (370 nm) standarda kvercetina i kemferola i hidroliziranog ekstrakta moringe.

### 3.1.3. Određivanje masnih kiselina i tokoferola u ulju sjemena moringe

Lalas i Tsaknis (2002) proveli su usporedbu ulja sjemenke moringe varijeteta *Periyakulam I* (PKM 1) s komercijalnim djevičanskim maslinovim uljem i uljem moringe varijeteta *Mbololo*. *Periyakulam I* dobiven je selekcijom lokalnih vrsta i kao takav razmnožava se samo sjemenom. Sadnice narastu do 4 m u visinu u 12 mjeseci na polju, procvjetaju i imaju plodove nakon 6 mjeseci od sjetve dok ostalim varijetima treba 3-4 godine.

Usporedili su fizikalne i kemijske karakteristike te proveli ekstrakciju (hladno prešanje, ekstrakcija n-heksanom i smjesa kloroform:metanol (1:1)) i degumiranje. Nakon provedene ekstrakcije odredili su fizikalna i kemijska svojstva, gustoću i indeks loma (pri 40 °C), boju, točku dimljenja, kiselost, saponifikacijski broj i jodni broj.

### Priprema uzorka

Sjemenke *Moringe oleifere* sakupljene su u Keniji, 30 kg sjemenki je sušeno na zraku u trajanju od 1 tjedna, pomiješano i podijeljeno u tri pojedinačna dijela po 10 kg za hladno prešanje i ekstrakciju otapala koristeći n-heksan i mješavinu kloroforma:metanol (1: 1) (Lalas i Tsaknis, 2002).

### Metode istraživanja

#### Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina određen je plinsko-tekućinskom kromatografijom (GLC) u skladu s metodom Tsaknis i sur. (1999). Analiza je provedena na plinskom kromatografu Varian 3600 opremljenom Supelcowax 10 silikagelnom kapilarnom kolonom 30m x 0,32 mm promjera, 0,25 µm debljina filma. Korišten je temperaturni program 60 °C 10 min, a zatim za 2 °C više po minuti do 220 °C. Temperature injektora i plameno-ionizacijskog detektora (FID) postavljene su na 160, odnosno 280 °C, volumen injektiranog uzorka je 0,2 µL, a plin-nosač je N<sub>2</sub> pri

protoku od 30 mL min<sup>-1</sup>. Interni standard koji je korišten bila je nonadekanska kiselina. Uzorci su pripremljeni i mjereni odvojeno u tri ponavljanja (Lalas i Tsaknis, 2002).

#### Određivanje tokoferola

Određivanje sastava tokoferola izvršeno je korištenjem modificirane metode koju je opisao Carpenter (1979). HPLC sustav je opremljen pumpom Waters 600E, kolonom Waters  $\alpha$ -Polarsil, 125Å, 10  $\mu$ m, 3,9 x 300 mm<sup>2</sup> i detektorom Waters 486. Priprema uzoraka provedena je na sljedeći način: 1 g ulja precizno je izvagan u 5 mL bočice omotane u foliju radi sprečavanja oksidacije uzorka. Ulje je otopljeno u 5 mL n-heksana prije injektiranja, a volumen uzorka je 20  $\mu$ L. Detektor je postavljen na 295 nm. Kao mobilna faza korišten je izopropanol:n-heksan:apsolutni etanol (2:97,5:0,5) pri 1 mL min<sup>-1</sup>. Uzorci su pripremljeni i mjereni odvojeno u tri ponavljanja (Lalas i Tsaknis, 2002).

#### Rezultati istraživanja

Ulja ekstrahirana pomoću tri različita postupka ekstrakcije nisu pokazala značajne razlike u sastavu masnih kiselina. Sastav masnih kiselina u uzorku i komercijalnim uljima prikazan je u prilogu 5. Ukupne nezasićene masne kiseline čine više od 76 %. Ulje moringe i maslinovo ulje imaju sličan udio oleinske kiseline (oko 74 %) dok se ulje moringe od maslinovog ulja razlikuje po nižem udjelu linolne kiseline i višem udjelu behenijske kiseline. Udjeli masnih kiselina u ulju *Moringe oleifere* varijeteta *Periyakulam* 1 su slični sastavu ulja *Moringe oleifere* varijeteta *Mbololo*. Ta dva ulja sadrže jednake količine palmitinske (C16:0) i behenijske kiseline (C22:0) od oko 6,40 %, dok ostale masne kiseline sadrže u manjem postotku. Pokazalo se da je ulje PKM 1 manje zasićeno i sadrži značajne razlike udjela palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0), oleinske (C18:1), arahidske (C20:0) i cerotske (C26:0) masne kiseline (Lalas i Tsaknis, 2002).

Ulje sjemena moringe sadrži  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferole (prilog 6). Ulje ekstrahirano n-heksanom ima najviši udio  $\alpha$ - i  $\delta$ -tokoferola, a najniži udio  $\gamma$ -tokoferola dok ulje dobiveno hladnim prešanjem ima najviši udio  $\gamma$ -tokoferola. Udjeli tokoferola u ulju PKM 1 i djevičanskom maslinovom ulju se značajno razlikuju. Udio  $\alpha$ -tokoferola u ulju PKM 1 dobivenog hladnim prešanjem je 17 puta niži, a  $\delta$ -tokoferola 2 puta viši od udjela u djevičanskom maslinovom ulju. Komercijalno ulje moringe varijeteta *Mbololo* sadrži puno viši udio tokoferola od djevičanskom maslinovog ulja i ulja PKM 1 (Lalas i Tsaknis, 2002).



## 4. ZAKLJUČAK

Na temelju proučene literature i napisanog diplomskog rada mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Kozje mlijeko probavljivije je od kravljeg mlijeka. U njemu su prisutne masne globule manjeg promjera te je time ukupna površina manja. U kozjem mlijeku sadržan je i udio od 35 % masnih kiselina kratkog i srednje dugog lanca koje lipaza brže hidrolizira i koje su jednostavnijim mehanizmom apsorbirane u odnosu na dugolančane masne kiseline.
2. Kozje mlijeko karakterizira svojstvo hipoalergenosti zbog niskog sadržaja ili potpunog izostanka  $\alpha_{s1}$ -kazeina pa je vrlo često konzumirano kod odraslih osoba i djece alergičnih na kravlje mlijeko.
3. Biljni ekstrakti podijeljeni su prema konzistenciji i postupku ekstrakcije. Prema konzistenciji podijeljeni su na tekuće, polukrute i suhe ekstrakte, a prema postupku ekstrakcije na vodene macerate, tinkture, infuzije, dekokte, perkolate i glicerinske ekstrakte.
4. Moringa je važan izvor hranjivih nutrijenata. U listovima moringe su zastupljene mineralne tvari, karotenoidi, polifenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, alkaloidi, glukozinolati, izotiocijanati, tanini i saponini. Ulje moringe poznato je i kao „ben ulje“ jer sadrži behenijsku kiselinu, a u njegovom sadržaju prisutan je i visok udio oleinske kiseline, slično kao u maslinovom ulju.
5. Fizikalno-kemijska svojstva jogurta od kozjeg mlijeka poboljšana su dodavanjem ekstrakta voća i povrća. Tako je jogurt od kozjeg mlijeka bolje prihvaćen od strane kupaca jer su mu poboljšana senzorska svojstva i izgubljen jaki „kozji“ okus kojeg jogurt ima bez dodataka ekstrakta. Dodavanjem ekstrakta komine grožđa povećan je fenolni udio, dok je dodavanjem soje povećana viskoznost i kapacitet vode i smanjena sinereza, a dodatkom kupuasu je zbog visokog udjela vlakana također povećana viskoznost jogurta od kozjeg mlijeka.

6. Moringa sadrži organske kiseline, fenolne kiseline i flavonoide kojima je potaknut rast bakterija mliječne kiseline čime je ubrzan pad pH vrijednosti i skraćeno vrijeme fermentacije. Interakcijom proteina i polifenola s proteinima mlijeka nastaju kompleksi koji doprinose povećanju viskoznosti i kapacitetu zadržavanja vode jogurta te dobroj teksturi. Dodavanjem moringe u mliječne proizvode smanjena je opća prihvatljivost, slatkoća, kiselost i aroma, ali uz moringu mogu biti dodani i ostali ekstrakti poput banane, avokada ili slatkog krumpira čime su poboljšana senzorska svojstva i povećana prihvatljivost mliječnih proizvoda. Do sada nije provedeno istraživanje kako moringa utječe na karakteristike kozjeg mlijeka, ali bi zbog opisanih osobina kozjeg mlijeka i nutritivnog sastava moringe to u budućnosti trebalo biti istraženo.

## 5. LITERATURA

Al-Ahwal, R. I. H., Saleh, A. E., Moussa, M. A. M. (2017) The Importance of Using Moringa Oleifera Extract on the Quality and Nutritive Value of Yoghurt. *J. Food and Dairy Sci.* **8**, 237-241.

Amabye, T. G., Gebrehiwot, K. (2015) Chemical compositions and nutritional value of Moringa oleifera available in the market of Mekelle. *J. Food. Nutr. Sci.* **3**, 187-190.

Anonymous 1 (2019) Tekući oblici <<https://www.plantagea.hr/fitoterapija/tekuci-oblici/>> Pristupljeno 28 svibnja 2020.

Anonymous 2 (2018) Soxhletov ekstraktor, <<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor>> Pristupljeno 28 svibnja 2020.

Anonymous 3 (2016) The Miracle of the Moringa Tree <<https://loveachild.com/2016/03/miracle-moringa-tree/>> Pristupljeno 28 svibnja 2020.

Antunac N., Samaržija D. (2000) Proizvodnja, sastav i osobine kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo.* **50**, 53-66.

Antunac N., Samaržija D., Havranek J. (2000) Hranidbena i terapeutska vrijednost kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo.* **50**, 297-304.

Anwar, F., Bhangar, M. I. (2003) Analytical characterization of Moringa oleifera seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J. Agr. Food. Chem.* **51**, 6558-6563.

Aryana, K. J., Olson, D. W. (2017) A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products. *J. Dairy. Sci.* **100**, 9987-10013.

Ashurst, P. R. (2016) *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*, 3.izd., Wiley Blackwell, Chichester, str. 313-330.

Azwanida, N.N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med. Aromat. Plants*. **4**, 196.

Bakr, S. A., Salihin, B. A. (2013) Effects of inclusion of *allium sativum* and *cinnamomum verum* in milk on the growth and activity of lactic acid bacteria during yogurt fermentation. *J. Environ. Agric. Sci.* **13**, 1448-1457.

Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., Lev-Ari, S. (2013) *Moringa Oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *Bmc.Complem.Altern. M.* **13**, 212-219.

Božanić, R., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I. (2018) *Vrste mlijeka*, 1. izd., Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

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

Camel, V. (2001) Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*. **126**, 1182-1193.

Coppin, J. P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M. H., Ho, C. T., Juliani, R., Simon J.E., Wu, Q. (2013) Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *J. Funct. Food*. **5**, 1892-1899.

Costa, M. P., Frasaio, B. S., Silva, A. C. O., Freitas, M. Q., Franco, R. M., Conte-Junior, C. A. (2015) Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. *J. Dairy Sci.* **98**, 5995-6003.

Dekebo, A. (2019) Introductory chapter: Plant extracts. U: *Plant extracts*, (Dekebo, A., ured.), IntechOpen, Adama, str. 1-10.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A., Kumar, S. (2013) Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab. J. Chem.* **10**, 1193-1199.

Donmez, O., Mogol, B. A., Gokmen, V. (2017) Syneresis and rheological behaviors of set yogurt containing green tea and green coffee powders. *J. Dairy. Sci.* **100**, 901-907.

Dos Santos, K. M., de Oliveira, I. C., Lopes, M. A., Cruz, A. P. G., Buriti, F. C., Cabral, L. M. (2017). Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. *J. Sci. Food Agr.* **97**, 1108-1115.

Dragović-Uzelac, V. (2016) Nastavni materijal iz modula Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvucna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.

Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J., Muchenje, V. (2018) Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food. Res. Int.* **106**, 317-334.

Feng, C., Wang, B., Zhao, A., Wei, L., Shao, Y., Wang, Y., Cao B., Zhang, F. (2019) Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. *Food chem.* **277**, 238-245.

Ferreira, P. M. P., Farias, D. F., Oliveira, J. T. D. A., Carvalho, A. D. F. U. (2008) *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. *Rev. Nutr.* **21**, 431-437.

Filipović Dermić Z., Mikulec N., Bendelja Ljoljić D., Antunac N. (2014) Terapijska i zdravstvena svojstva kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo.* **64**, 280-286.

Fuglie LJ (2005) The Moringa Tree: a local solution to malnutrition? <<https://www.yumpu.com/en/document/read/20078058/the-moringa-tree-a-local-solution-to-malnutrition-moringanews>> pristupljeno 28 svibnja 2020.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D. S. (2016) Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Sci. Hum. Wellness*. **5**, 49-56.

Guimarães da Silva, D. C., de Abreu L. R., Assumpcao G. M. P. (2012) Addition of water-soluble soy extract and probiotic culture, viscosity, water retention capacity and syneresis characteristics of goat milk yogurt. *Cienc. Rural*. **42**, 545-550.

Haenlein, G.F.W. (2004) Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res.* **51**, 155-163.

Park, Y. W. (2007) Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.* **68**, 73-87.

Handa, S.S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. (2008) Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants, 1. izd., Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, Trst, str. 21-26.

Hasan, M. M., Sharmeen, I. A., Anwar, Y., Alharby, H. F., Hasanuzzaman, M., Hajar, A. S., Hakeem, K. R. (2019) Evidence-Based Assessment of Moringa oleifera Used for the Treatment of Human Ailments. U: Plant and Human Health (Ozturk M., Hakeem K.R., ured.), Springer, Jeddah, str. 121-137.

Iskandar, I., Hadju, V., As' ad, S., Natsir, R. (2015) Effect of Moringa oleifera leaf extracts supplementation in preventing maternal anemia and low-birth-weight. *Int. J. Sci. Res.* **5**, 1-3.

Jaros, D., Rohm, H. (2003) Controlling the texture of fermented dairy products: the case of yoghurt. U: Dairy processing: improving quality, (Smit, G.. ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 155-184.

Kalyankar S.D., Khedkar C.D., Patil A.M. (2016) Goat: Milk. U: Encyclopedia of Food and Health (Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., ured.), Elsevier Science & Technology, Udgir, str. 356-260.

Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Anal.* **13**, 105-113.

Kuikman, M., O'Connor, C. P. (2015) Sensory evaluation of Moringa-probiotic yogurt containing banana, sweet potato or avocado. *J. Food Res.* **4**, 165-172.

Lalas, S., Tsaknis, J. (2002) Characterization of Moringa oleifera seed oil variety "Periyakulam 1". *J. Food Compos. Anal.* **15**, 65-78.

Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N. (2017) Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy.* **7**, 47-66.

Moioli B., Pilla F., Tripaldi C. (1998) Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Res.* **27**, 185-195.

Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., Muchenje, V. (2011) Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 12925-12933.

Owusu, D., Ellis, W. O., Oduro, I. (2008) Nutritional potential of two leafy vegetables: Moringa oleifera and Ipomoea batatas leaves. *Sci. Res. Essays.* **3**, 57-60.

Palma, M., Barbero, G. F., Pineiro, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., Meireles, M. A. A. (2013) Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. U: Natural Product Extraction Principles and Application (Rostagno, M. A., Prado, J. M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 58-88.

Park, Y.W. (1994) Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Res.* **14**, 151-159.

Parkash, S., Jenness, R. (1968.) The composition and characteristics of goats milk: a review. *Dairy Sci. Abstr.* **30**, 67-87.

Parrotta, J. A. (2004) Moringa oleifera. U: *Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie*, (Roloff A., Weisgerber H., Lang U. M., Stimm B., Schütt P., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 1-8.

Patil, A. A., Sachin, B. S., Wakte, P. S., Shinde, D. B. (2014) Optimization of supercritical fluid extraction and HPLC identification of wedelolactone from *Wedelia calendulacea* by orthogonal array design. *J. Adv. Res.* **5**, 629-635.

Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2017) *Narodne novine* **27**, Zagreb.

Rapić, V. (2008) Postupci pripreve i izolacije organskih spojeva, 2. izd., Školska knjiga, Zagreb.

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., Knothe, G. (2008) Moringa oleifera oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource. technol.* **99**, 8175-8179.

Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015) Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Ind. Crop. Prod.* **66**, 246-254.

Sanchez-Machado, D. I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes, J. (2010) Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. *Food. Anal. Methods.* **3**, 175-180.

Savić, Lj. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala: usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkričnog ugljen-dioksida. *Lek. Sirov.* **34**, 93-103.

Schilcher H., Imming P., Goeters S. (2005) Pharmacology and Toxicology. U: *Chamomile Industrial Profiles*, (Franke R., Schilcher H., ured.), Taylor and Francis, Boca Raton/London/New York/Singapore, str. 250-268.



Shokery, E. S., El-Ziney, M. G., Yossef, A. H., & Mashaly, R. I. (2017) Effect of green tea and Moringa leave extracts fortification on the physicochemical, rheological, sensory and antioxidant properties of set-type yoghurt. *J. Adv. Dairy. Res*, **5**, 2-12.

Shori, A. B. (2013) Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *J. Taibah. Univ. Sci.* **7**, 202-208.

Silva, D. C. G. (2015). Effect of the addition of water-soluble soybean extract and probiotic culture on chemical characteristics and folate concentration in yogurts produced with goat's milk. *Afr. J. of Microbiol. Res.* **9**, 1268-1274.

Srivastava, P., Prasad, S. G. M., Ali, M. N., Prasad, M. (2015). Analysis of antioxidant activity of herbal yoghurt prepared from different milk. *The Pharma Innovation*, **4**, 18-20.

Sun-Waterhouse D., Zhou J., Wadhwa S.S. (2013) Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*. **32**, 450-460.

Tratnik Lj., Božanić R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, 1. izd., Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Dourtoglou, V., Spiliotis, V. (1999) Characterization of Moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. *J. Agr. Food. Chem.* **47**, 4495-4499.

Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. (2007) Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem. Cent. J.* **1**, 13-16.

Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., Fernandez, M. L. (2017) Bioactive components in Moringa Oleifera leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, **6**, 91-104.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.

Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. (2013) Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crop. Prod.* **44**, 566-571.

Zhang, T., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Bae, H., Seo, H. G., Petriello, M. C., Han, S. G. (2019) Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. *LWT-Food. Sci. Technol.* **101**, 276-284.

## 6. PRILOZI

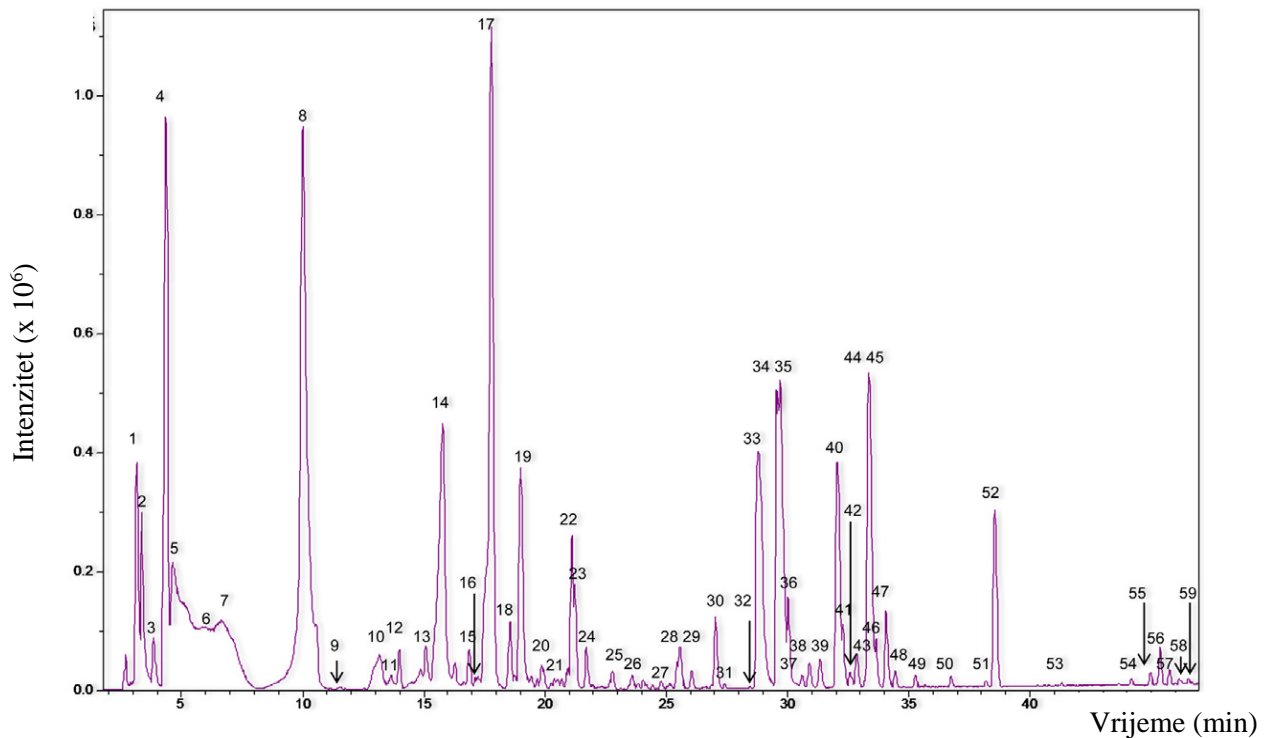
Prilog 1. Udio ukupnih fenola iz ekstrakata moringe dobivenih metodama ekstrakcije kruto-tekuće (maceracija) i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) koristeći različita otapala (ET-etanol, ME-metanol, AC-aceton). Brojevi uz ekstrakte predstavljaju postotak otapala (Rodriguez-Perez i sur., 2015)

Broj ekstrakcije	Otapalo	Maceracija	UAE
		Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g suhog lišća)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g suhog lišća)
1.	ET 70	24,3 ± 0,3	12,6 ± 0,2
2.	ET 70	-	4,4 ± 0,4
3.	ET 70	-	1,2 ± 0,5
4.	ET 70	-	0,8 ± 0,3
<b>Ukupno</b>		<b>24,3 ± 0,3</b>	<b>19 ± 1</b>
1.	ET 50	27 ± 2	24 ± 3
2.	ET 50	-	18,4 ± 0,4
3.	ET 50	-	4,6 ± 0,5
4.	ET 50	-	0,29 ± 0,07
<b>Ukupno</b>		<b>27 ± 2</b>	<b>47 ± 4</b>
1.	ET 100	3,82 ± 0,09	1,7 ± 0,2
2.	ET 100	-	2,84 ± 0,06
3.	ET 100	-	2,2 ± 0,4
4.	ET 100	-	1,9 ± 0,2
<b>Ukupno</b>		<b>3,82 ± 0,09</b>	<b>8,6 ± 0,7</b>
1.	ME 70	20 ± 1	27 ± 2
2.	ME 70	-	4,2 ± 0,2
3.	ME 70	-	1,22 ± 0,01
4.	ME 70	-	0,24 ± 0,06
<b>Ukupno</b>		<b>20 ± 1</b>	<b>33 ± 3</b>
1.	ME 50	27 ± 3	22 ± 1
2.	ME 50	-	11 ± 1
3.	ME 50	-	9,2 ± 0,2
4.	ME 50	-	3,25 ± 0,02

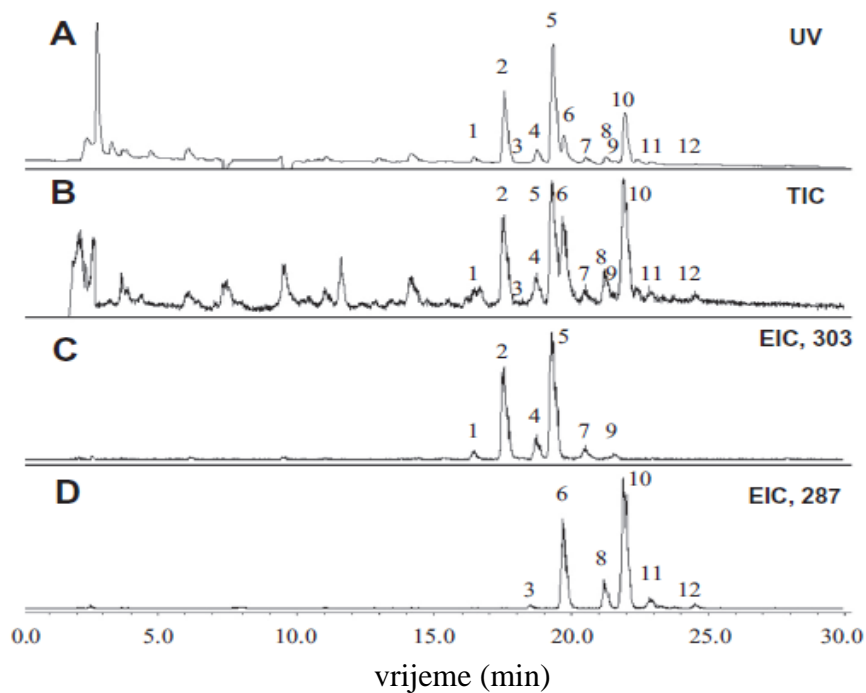
<b>Ukupno</b>		<b>27 ± 3</b>	<b>46 ± 3</b>
1.	ME 100	3,6 ± 0,3	12 ± 1
2.	ME 100	-	5,8 ± 0,6
3.	ME 100	-	4,5 ± 0,4
4.	ME 100	-	1,39 ± 0,08
<b>Ukupno</b>		<b>3,6 ± 0,3</b>	<b>23 ± 2</b>
1.	AC 70	26 ± 2	16,7 ± 0,4
2.	AC 70	-	5,12 ± 0,06
3.	AC 70	-	3,18 ± 0,07
4.	AC 70	-	0,84 ± 0,03
<b>Ukupno</b>		<b>26 ± 2</b>	<b>25,8 ± 0,5</b>
1.	AC 50	26 ± 2	28 ± 1
2.	AC 50	-	4,2 ± 0,7
3.	AC 50	-	0,84 ± 0,05
4.	AC 50	-	0,16 ± 0,02
<b>Ukupno</b>		<b>26 ± 2</b>	<b>33 ± 2</b>
1.	AC 100	2,0 ± 0,2	1,83 ± 0,04
2.	AC 100	-	1,4 ± 0,1
3.	AC 100	-	0,98 ± 0,01
4.	AC 100	-	1,10 ± 0,09
<b>Ukupno</b>		<b>2,0 ± 0,2</b>	<b>5,3 ± 0,2</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna derivacija

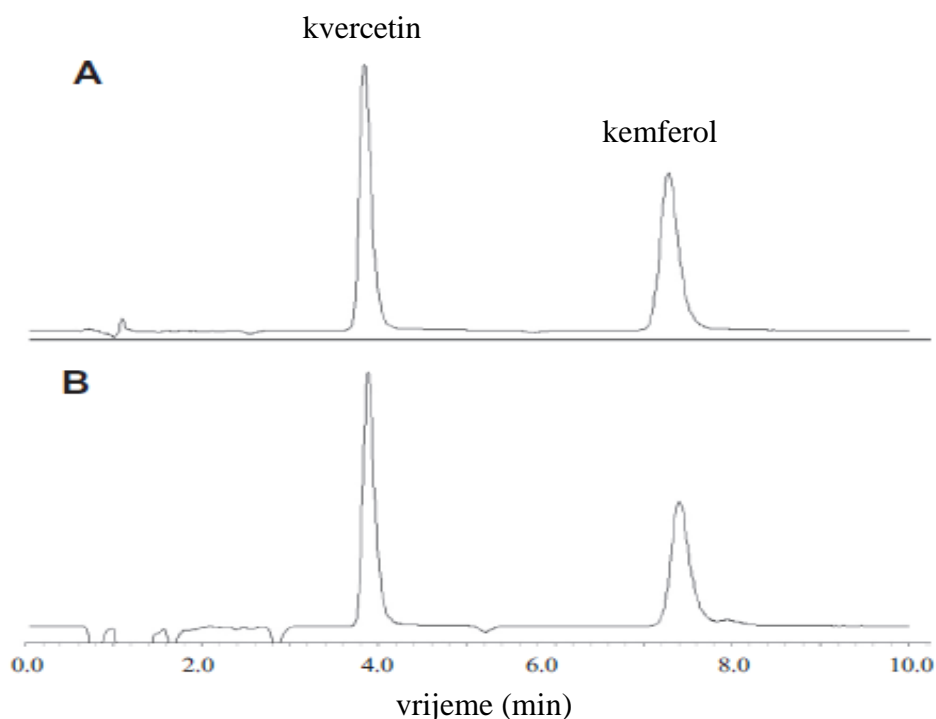
Prilog 2. HPLC kromatogram ekstrakta lišća moringe dobiven HPLC–ESI–QTOF–MS analizom u režimu negativnog iona (Rodriguez-Perez i sur., 2015)



Prilog 3. UV i MS kromatogrami ekstrakta *Moringe oleifere* (A) UV kromatogram (254 nm). (B) Ukupni ionski kromatogram. (C) Ionski kromatogram izoliranih iona (eng. *Extracted ion chromatogram*, EIC) derivata kvercetina (EIC 303). (D) Ionski kromatogram izoliranih iona derivata kvercetina (EIC 287) (Coppin i sur., 2013)



Prilog 4. UV kromatogrami (370 nm) standarda kvercetina i kemferola (A) i hidroliziranog ekstrakta moringe (B) (Coppin i sur., 2013)



Prilog 5. Sastav masnih kiselina (%) u degumiranim uljima moringe (Lalas i Tsaknis, 2002)

Masne kiseline	<i>M. oleifera</i> var. <i>Periyakulam</i>			Djevičansko maslinovo ulje	<i>M. oleifera</i> var. <i>Mbololo</i>			
	hladno prešanje	n-heksan	kloroform: metanol		hladno prešanje	n-heksan	kloroform: metanol	
<b>C8:0</b>	kaprilna	0,04 ±	0,03 ±	0,03 ±	nije	0,03	0,03	0,02
	kiselina	0,01	0,01	0,01	detektirano			
<b>C14:0</b>	miristinska	0,13 ±	0,13 ±	0,13 ±	<0,01	0,11	0,11	0,11
	kiselina	0,08	0,08	0,06				
<b>C16:0</b>	palmitinska	6,34 ±	6,46 ±	6,36 ±	11,2 ± 0,66	5,73	6,04	5,81
	kiselina	0,41	0,32	0,25				
<b>C16:1</b>	palmitoleinska	0,10 ±	0,09 ±	0,09 ±	1,22 ± 0,71	0,10	0,11	0,10
<b>cis n-9</b>	kiselina	0,06	0,09	0,04				
<b>C16:1</b>	palmitoleinska	1,28 ±	1,36 ±	1,40 ±	nije	1,32	1,46	1,44
<b>cis n-7</b>	kiselina	0,87	0,84	0,82	detektirano			

<b>C17:0</b>	heptadecenska kiselina	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	<0,01	0,09	0,09	0,09
<b>C18:0</b>	stearinska kiselina	5,70 ± 0,21	5,88 ± 0,23	5,74 ± 0,24	2,80 ± 0,12	3,83	4,14	4,00
<b>C18:1</b>	<b>oleinska kiselina</b>	<b>71,60 ± 0,73</b>	<b>71,21 ± 0,69</b>	<b>71,22 ± 0,70</b>	<b>74,53 ± 0,82</b>	<b>75,39</b>	<b>73,60</b>	<b>73,91</b>
<b>C18:2</b>	linolna kiselina	0,77 ± 0,38	0,65 ± 0,32	0,66 ± 0,33	8,82 ± 0,79	0,72	0,73	0,71
<b>C18:3</b>	linoleinska kiselina	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,05	1,12 ± 0,40	0,20	0,22	0,20
<b>C20:0</b>	arahidska kiselina	3,52 ± 0,29	3,62 ± 0,33	3,60 ± 0,44	<0,01	2,52	2,76	2,70
<b>C20:1</b>	eikozaenska kiselina	2,24 ± 0,26	2,22 ± 0,26	2,25 ± 0,20	<0,01	2,54	2,40	2,46
<b>C22:0</b>	<b>behenijska kiselina</b>	<b>6,21 ± 0,49</b>	<b>6,41 ± 0,46</b>	<b>6,28 ± 0,47</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>5,83</b>	<b>6,73</b>	<b>6,38</b>
<b>C22:1 cis</b>	eručna kiselina	0,12 ± 0,07	0,12 ± 0,07	0,12 ± 0,08	nije detektirano	0,15	0,14	0,14
<b>C26:0</b>	cerotska kiselina	1,21 ± 0,16	1,18 ± 0,20	1,23 ± 0,21	nije detektirano	0,96	1,08	1,06

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja ± standardna derivacija

Prilog 6. Udjeli tokoferola (%) u nedegumiranim uljima moringe (Lalas i Tsaknis, 2002)

Tokoferoli	Djevičansko						
	<i>M. oleifera</i> var. <i>Periyakulam</i>			maslinovo ulje	<i>M. oleifera</i> var. <i>Mbololo</i>		
mg/kg	hladno prešanje	n-heksan	kloroform: metanol	hladno prešanje	n-heksan	kloroform: metanol	
<b>α-tokoferol</b>	5,06±0,67	15,38±0,68	2,42±0,37	88,50±6,30	101,46	98,82	105,02
<b>γ-tokoferol</b>	25,40±1,16	4,47±0,87	5,52±0,69	9,90±0,65	39,54	27,90	33,45
<b>δ-tokoferol</b>	3,55±0,45	15,51±0,99	12,67±0,55	1,60±0,86	75,67	71,16	77,60

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja ± standardna derivacija

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Maja Rajčić*

Ime i prezime studenta