

Utjecaj dodatka ekstrakata lista masline na sigurnost, sastav i svojstva jogurta od kozjeg mlijeka

Devčić, Iva

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:159:638274>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Iva Devčić
1290/USH

**UTJECAJ DODATKA
EKSTRAKATA LISTA MASLINE
NA SIGURNOST, SASTAV I
SVOJSTVA JOGURTA 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 doc.dr.sc. Irene Barukčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Maje Repajić.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Ireni Barukčić na odabranoj temi, stručnim savjetima te vođenju kroz cijeli diplomski.

Hvala doc. dr. sc. Maji Repajić na pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala bratu Mislavu na strpljenju i podršci tijekom svih ovih godina.

Najveće hvala mami i tati. Bez vaše ljubavi, podrške, ohrabrivanja i razumijevanja ovo ne bi bilo moguće. Hvala što ste mi najveći oslonac i što uvijek vjerujete u mene!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ DODATKA EKSTRAKATA LISTA MASLINE NA SIGURNOST, SASTAV I SVOJSTVA JOGURTA OD KOZJEG MLIJEKA

Iva Devčić, 1290/USH

Sažetak: Trendovi razvoja funkcionalne hrane sve su više orijentirani na obogaćivanje proizvoda biljnim ekstraktima. Kozje mlijeko pri tom odavno uživa povjerenje potrošača kao funkcionalni proizvod. Iako se smatra otpadom, list masline se pokazao izvrsnim izvorom biološki aktivnih molekula. Obogaćivanje jogurta ekstraktom lista masline doprinijelo bi stvaranju novog tipa funkcionalnih mliječnih proizvoda, ali i proširilo mogućnosti redukcije otpada nastalog u prehrambenoj industriji. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na sigurnost kozjeg jogurta primjenom HACCP načela te utjecaj na njegova fizikalno-kemijska i senzorska svojstva, udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost. Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak ekstrakta u proizvodnji jogurta predstavlja kemijski rizik pa su određene zaštitne i korektivne radnje, kritične granice, sustav nadzora te postupak verifikacije. Ekstrakt lista utječe na gotovo sva ispitivana svojstva ovog proizvoda, povećava udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet, a senzorska analiza ukazuje da bi ovako obogaćen jogurt mogao biti prihvaćen na tržištu kao funkcionalna hrana.

Gljučne riječi: jogurt, kozje mlijeko, ekstrakt lista masline, HACCP

Rad sadrži: 49 stranica, 6 slika, 18 tablica, 58 literaturnih navoda

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. Irena Barukčić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Maja Repajić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović
2. Doc.dr.sc. Irena Barukčić
3. Doc.dr.sc. Maja Repajić
4. Izv.prof.dr.sc. Marina Krpan (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ADDITION OF OLIVE LEAF EXTRACTS ON SAFETY, COMPOSITION AND PROPERTIES OF GOAT'S MILK YOGHURT

Iva Devčić, 1290/USH

Abstract: Trends in the development of functional foods are increasingly focused on enriching products with plant extracts. Goat's milk has long been trusted by consumers as a functional product. Although considered a waste, the olive leaf has proven to be an excellent source of biologically active molecules. Enriching yogurt with olive leaf extract would contribute to the creation of a new type of functional dairy products, but also expand the possibilities of reducing waste generated in the food industry. Therefore, the aim of this thesis was to examine the impact of the addition of olive leaf extract on the safety of goat yogurt using the HACCP principle, and the impact on its physicochemical and sensory properties, total phenols and antioxidant activity. The obtained results show that the addition of extract in the production of yogurt poses a chemical risk, so certain protective and corrective actions, critical limits, monitoring system and verification procedure are determined. The leaf extract affects almost all the examined properties of this product, increases content of total phenols and antioxidant capacity, and sensory analysis indicates that yogurt enriched in this way could be accepted on the market as a functional food.

Keywords: yogurt, goat's milk, olive leaf extract, HACCP

Thesis contains: 49 pages, 6 figures, 18 tables, 58 references

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. *Irena Barukčić*, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 23rd, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MLIJEKO	2
2.1.1. Fermentirano mlijeko.....	2
2.2. KOZJE MLIJEKO	3
2.2.1. Sastav i prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka	3
2.2.2. Okus i miris kozjeg mlijeka.....	9
2.2.3. Fermentirano kozje mlijeko.....	9
2.3. BILJNI EKSTRAKTI I NJIHOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI	10
2.4. MASLINA	11
2.4.1. List masline.....	11
2.4.2. Ekstrakt lista masline.....	13
2.5. SIGURNOST HRANE	14
2.6. HACCP SUSTAV	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA	20
3.2. EKSTRAKCIJA LISTA MASLINE	24
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih fenola u ekstraktu lista masline	25
3.3. PROIZVODNJA JOGURTA OD KOZJEG MLIJEKA S DODATKOM EKSTRAKTA LISTA MASLINE.....	27
3.3.1. Određivanje titracijske kiselosti.....	28
3.3.2. Određivanje boje.....	28
3.3.3. Određivanje električne provodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS).....	28
3.3.4. Određivanje viskoznosti	28
3.3.5. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	29
3.3.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	29
3.3.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	31
3.3.8. Senzorsko ocjenjivanje	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA	35
4.2. FIZIKALNO – KEMIJSKE KARAKTERISTIKE JOGURTA OD KOZJEG MLIJEKA SA EKSTRAKTOM LISTA MASLINE	38
4.3. UKUPNI FENOLI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	40
4.4. SENZORSKO OCJENJIVANJE UZORAKA JOGURTA	42
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Smatra se da su koze (*Capra hircus*) bile prve pripitomljene životinje koje su se koristile kao stoka prije otprilike 10 000 godina na području Mezopotamije, današnjeg Srednjeg Istoka te je i u današnje vrijeme uzgoj koza i proizvodnja kozjeg mlijeka u stalnom porastu.

Glavni razlozi povećane proizvodnje kozjeg mlijeka su porast domaće potrošnje i potražnje za proizvodima od kozjeg mlijeka poput sireva i jogurta, povećanje populacije s alergijama na kravlje mlijeko te brojni znanstveno dokazani terapijski učinci kozjeg mlijeka. Kozje mlijeko je dostupno diljem svijeta, a proizvodi od kozjeg mlijeka se smatraju specijalnom hranom te postaju sve popularniji u razvijenim zemljama.

Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su pokazala kako neki sastojci prirodno prisutni u voću i povrću, žitaricama i orašastim plodovima, imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Između ostalog tu se ubrajaju i polifenoli koji nisu sadržani u namirnicama životinjskog porijekla. Porastom trendova konzumiranja funkcionalne hrane javila se potreba za pronalaskom načina obogaćivanja namirnica prethodno spomenutim bioaktivnim sastojcima, a jedno od rješenja su dodaci u obliku biljnih ekstrakata.

Maslina (*Olea europaea* L.) potječe s istočnog Mediterana odakle se proširila prema zapadnim regijama. Najbolje joj odgovara mediteranska klima koju karakteriziraju topla i suha ljeta te kišne i hladne zime. Godišnje se u svijetu obradi preko 10 milijuna hektara maslina pri čemu zaostaje ogromna količina otpada u koji spada i lišće. List masline predstavlja obećavajući izvor bioaktivnih komponenti zbog čega bi zemlje koje proizvode maslinovo ulje trebale uzeti u obzir komercijalizaciju proizvodnje proizvoda od lista masline zbog njegovog sadržaja bioaktivnih komponenti koje imaju visoki antioksidacijski potencijal u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Dodatak ekstrakta lista masline u jogurt od kozjeg mlijeka potencijalno predstavlja inovativan proizvod koji bi se mogao definirati kao funkcionalna hrana zbog bogatstva bioaktivnim sastojcima. Međutim, u proizvodnji ovakvog tipa proizvoda može se javiti nekoliko problema vezanih uz nedovoljno poznate učinke dodatka ekstrakta na senzorska i fizikalno-kemijska svojstva fermentiranog mliječnog proizvoda, na proces fermentacije te na sigurnost ove vrste proizvoda.

Zbog svega navedenog, ciljevi ovog rada bili su ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na proces fermentacije, senzorska i fizikalno-kemijska svojstva kozjeg jogurta te primjenom načela HACCP sustava predložiti generički model nadzora proizvodnje kojim se omogućuje sigurnost ovakvog proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MLIJEKO

Mlijeko je najkompletnija prirodna tekućina. Sadrži sve tvari koje su neophodne za očuvanje zdravlja i normalnu funkciju organizma.

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složena i promjenjiva sastava. Bijele do žućkasto-bijele boje, karakteristična okusa i mirisa, a izlučuje ju mliječna žlijezda ženki sisavaca određeno vrijeme nakon poroda. Pod pojmom „mlijeko“ se uvijek podrazumijeva kravlje mlijeko, a ostale vrste mlijeka se moraju istaknuti oznakom, npr. „kozje mlijeko“.

Pojedine vrste mlijeka sadržavaju uglavnom iste sastojke, ali udjeli, odnosi te struktura i kvaliteta sastojaka mogu biti vrlo različiti.

Mlijeko se stvara iz specifičnih sastojaka koji prelaze iz krvi u mliječnu žlijezdu gdje se zbivaju vrlo složeni biokemijski procesi sekrecije. Neki se sastojci sintetiziraju u mliječnoj žlijezdi od sastojaka koji potječu iz krvi. Tako nastaju mliječna mast, mliječni šećer (laktoza) i tipični proteini mlijeka (kazein, α -laktalbumin i β -laktoglobulin). Ostali sastojci (mineralne tvari, neki enzimi, vitamini, albumin krvnog seruma, imunoglobulini i brojni drugi sastojci) izravno prelaze iz krvi u mliječnu žlijezdu i postaju sastojci mlijeka.

Sastav mlijeka može biti promjenjiv jer ovisi o brojnim čimbenicima (pasmimi i zdravstvenom stanju muznih životinja, redosljedu i stadiju laktacije, načinu i vrsti hranjenja, sezoni, vrsti mužnje te dobi i broju mužnji). U mlijeku je najviše promjenjiv udio mliječne masti, a najmanje udio laktoze (Tratnik i Božanić, 2012; Jensen, 1995).

2.1.1. Fermentirano mlijeko

Razvoj mikrobiologije, biokemije i tehnologije omogućio je da se vrenje mlijeka provodi pomoću odabranih mikroorganizama poznatih karakteristika i da se u kontroliranim uvjetima mogu proizvoditi fermentirana mlijeka željenih senzorskih svojstava.

Proces mliječno-kiselog vrenja laktoze mlijeka u mliječnu kiselinu djelovanjem enzima bakterije mliječne kiseline vrlo je složen i odvija se postupnom razgradnjom laktoze pri čemu nastaju brojni međuprodukti i energija.

Bakterije mliječne kiseline ne koriste laktozu izravno nego ju prevode u svoju stanicu gdje ju pomoću β -galaktozidaze (laktaze) cijepaju na glukozu i galaktozu.

Fermentirano mlijeko odavno poznaju uzgajivači stoke koji su slučajno otkrili prirodno vrenje i ustanovili da je nastalo kiselo mlijeko vrlo ukusno za jelo. Industrijska proizvodnja je započela

krajem 19. st., a temelji se na proučavanju autohtonih fermentiranih vrsta mlijeka. Prvo proizvedeno fermentirano mlijeko bio je jogurt (Tratnik i Božanić, 2012; Samaržija, 2015).

2.2. KOZJE MLIJEKO

Mlijeko je dio osnovne prehrane stotinama godina pa bi njegova eliminacija imala brojne nutritivne posljedice s obzirom na ključnu ulogu u prehrani i zdravlju. U posljednje vrijeme kravlje mlijeko i proizvodi od kravljeg mlijeka imaju loš položaj u očima potrošača koji vjeruju da je ono bogato tzv. *lošim* mastima te ima negativne posljedice na zdravlje. Uz to, povećana je svijest o intoleranciji i alergijskim simptomima povezanim s konzumacijom kravljeg mlijeka što dovodi do potrage za alternativama. Jedna od mogućih alternativa bi zahvaljujući jedinstvenom sastavu i svojstvima moglo biti kozje mlijeko (Kalyankar i sur., 2016).

Smatra se da su koze (*Capra hircus*) (Amigo i Fontecha, 2011) bile prve pripitomljene životinje koje su služile kao stoka prije otprilike 10 000 godina na području Mezopotamije, odnosno današnjeg Srednjeg Istoka. Imale su značajan utjecaj na ljudske živote, između ostalog i na Sumerane koji su živjeli na tom području (Turkmen, 2017). Uzgoj koza i danas ima veliku ulogu u prehrani i gospodarstvu u brojnim zemljama u razvoju (Kalyankar i sur., 2016). Mali preživaci kao što su koze imaju brojne prednosti od krupnije stoke. Zahtijevaju manje troškove kao što su potrebe za manje hrane i vode te nemaju potrebe za velikim štalama (Turkmen, 2017) te je njihov uzgoj moguć i u zemljama gdje klimatski uvjeti ne pogoduju držanju stoke (Amigo i Fontecha, 2011). Koriste se kao jedan od glavnih izvora proteina životinjskog podrijetla, kalcija i fosfora te je često preporučeno od strane zdravstvenih djelatnika kada kravlje mlijeko uzrokuje alergije. Popularan je mliječni proizvod potrošača različitih dobnih skupina te načina života. Mala djeca te starije osobe mogu biti posebno osjetljivi na kravlje mlijeko (Kalyankar i sur., 2016).

Na području Europe i Europske Unije proizvodnja kozjeg mlijeka je u blagom porastu posljednjih 20 godina, uz nekoliko oscilacija, dok svjetska proizvodnja bilježi značajan porast (FAO, 2018). Proizvodnja kozjeg mlijeka u Hrvatskoj posljednjih 10 godina je promjenjiva, ali se može reći da u posljednjih 5 godina ima blagi porast (Državni zavod za statistiku, 2020).

2.2.1. Sastav i prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka

Sastav mlijeka određuje njegovu hranjivu vrijednost, prikladnost za preradu te fizikalno-kemijske i organoleptičke osobine proizvoda (Antunac i Samaržija, 2000). Sastav kozjeg mlijeka razlikuje se ovisno o pasmini, prehrani, okolišnim čimbenicima, kao i stadiju laktacije

(Amigo i Fontecha, 2011). U usporedbi s kravljim mlijekom, kozje mlijeko sadrži 13 % više kalcija, 25 % više vitamina B₆, 47 % više vitamina A, 134 % više kalija i 350 % više niacina, također ima viši udio klorida, bakra i mangana te 27 % više selena koji je esencijalni nutrijent te ne sadrži kontroverzne hormone rasta koji se nalaze u kravljem mlijeku (Kalyankar i sur., 2016). Kozje mlijeko se od kravljeg razlikuje višim udjelom neproteinskog dušika, manjim udjelom koagulirajućih bjelančevina, većom varijabilnošću fizikalnih i kemijskih osobina te nižom termostabilnošću i različitim lipolitičkim sistemom. Po kemijskom sastavu kozje mlijeko je slično kravljem što je i prikazano u tablici 1 (Antunac i Samaržija, 2000).

Tablica 1. Usporedba udjela sastojaka u kozjem i kravljem mlijeku (Božanić i sur., 2018)

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

Glavne proteinske frakcije kozjeg mlijeka su uglavnom slične onima u majčinom, kravljem i ovčjem mlijeku. Sirovo kozje mlijeko smije sadržavati najmanje 2,5 %, a najviše 4,5 % proteina (Pravilnik, 2017). Mliječni proteini se sastoje od kazeina te proteina sirutke. Kazein, kao glavni protein mlijeka, sastoji se od α_{s1} -kazeina, α_{s2} -kazeina, β -kazeina i κ -kazeina. Glavni proteini sirutke su β -laktoglobulin i α -laktalbumin. Ostali proteini sirutke, kao što su imunoglobulini, albumini seruma, proteoze-peptoni i laktoferin, prisutni su u nižim koncentracijama (Turkmen, 2017). Proteini sirutke su biološki najvrjedniji proteini, dok nutritivna vrijednost proteina ovisi o udjelu različitih aminokiselina koje se apsorbiraju nakon probave.

Kazein koji se u mlijeku nalazi u obliku većih koloidnih čestica sadrži značajne količine kalcija i fosfata te se čestice kazeina nazivaju kalcijev kazeinat fosfat kompleks, a u mlijeku se nalaze

u obliku micela (Božanić i sur., 2002). Kazeinske micelle kozjeg mlijeka su manje od kazeinskih micela kravljeg mlijeka, a udio proteina sirutke viši je u kozjem mlijeku. U kravljem mlijeku α_{s1} -kazein je glavna frakcija kazeina, dok je u kozjem mlijeku to β -kazein te se može reći da je β -kazein glavni protein kozjeg mlijeka, dok α_{s1} -kazeina sadržava vrlo malo. To je jedan od uzroka mekšeg gruš kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje (Božanić i sur., 2018).

Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka te je efikasnija apsorpcija aminokiselina. Količina ukupnih aminokiselina je podjednaka, ali se razlikuju u udjelima kao što su udio histidina, arginina, cisteina, valina, leucina i asparagina čiji su udjeli viši u kozjem mlijeku, dok su udjeli serina, tirozina i glutamina viši u kravljem. Također, biološka vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka je približno jednaka, ali je analiza pokazala višu količinu slobodnih aminokiselina, posebno slobodnih esencijalnih aminokiselina u kozjem mlijeku (Božanić i sur., 2002). Od slobodnih aminokiselina u kozjem mlijeku se najviše nalazi taurina. Njegova količina u kozjem mlijeku slična je onoj u majčinom mlijeku te je znatno viša u odnosu na kravlje. Taurin je esencijalna aminokiselina koja se prirodno nalazi u tekućinama i tkivima organizma te je posebno važan u prehrani male djece i novorođenčadi jer sudjeluje u rastu i razvoju stanica mozga. Također djeluje kao katalizator kod lučenja žučnih soli, uključen je u neke fiziološke procese kao što su modulacija protoka kalcija, pobuđivanje neurona te stabilizacija membrana smanjivanjem toksičnih supstancija i osmoregulacija. Bolest srčanog mišića povezana je s niskom koncentracijom taurina u tkivima i njegovim visokim udjelom u urinu. Tijekom provođenja eksperimenata na životinjama, smatra se da je nedostatak taurina tijekom razvoja glavni uzrok zaostajanja u rastu, oštećenja cerebralnog razvoja te degeneracije očne mrežnice (Božanić i sur., 2018).

Genski polimorfizam β -laktoglobulina, α_{s1} -, β - i κ -kazeina utječe na čvrstoću i viskoznost jogurta, sinerezu kod grušanja enzimima, toplinsku stabilnost mlijeka, udio kazeina, suhe tvari, mineralnih tvari te pH-vrijednost mlijeka. Svojstva koagulacije kozjeg mlijeka vezana su uz njegov sastav. S obzirom na sastav mlijeka, α_{s1} -kazein glavni je čimbenik brzine nastajanja gruš i njegove čvrstoće. Budući da kozje mlijeko sadržava znatno manje α_{s1} -kazeina nego kravlje, gruš kozjeg mlijeka je nježniji, a i prinos je manji. Kako kozje mlijeko sadržava manje kazeina, osobito α_{s1} -kazeina, ali i više kalcija vezanog na micelle, gruš od kozjeg mlijeka obično je suši u odnosu na kravlje mlijeko (Božanić i sur., 2018).

Kinetika zakiseljavanja kozjega i kravljeg mlijeka također se razlikuje. Zbog većeg udjela proteina sirutke, kozje mlijeko bolje puferira pa je pad pH-vrijednosti u njemu sporiji što može produljiti fermentaciju. Kozje mlijeko daje mekaniji, krhkiji gruš ako se proizvodi

zakiseljavanjem, što je vezano uz manje proteinske micelle i manji udio α_{s1} -kazeina. Fermentirano kozje mlijeko zbog svoga proteinskog sastava daje manje čvrst gruša i mekanije je konzistencije u usporedbi s kravljim mlijekom (Božanić i sur., 2018).

Gruša kozjeg mlijeka probavljiviji je u odnosu na gruša kravljeg mlijeka. Razlog tome je upravo u njegovoj manjoj čvrstoći. Dodatkom jake kiseline izravno u kozje mlijeko nastaju manje i nježnije pahulje gruša, i to puno brže u odnosu na kravlje mlijeko koje sporije stvara veće nakupine. Ovakav pokus opisuje zbivanja u želucu tijekom probave, gdje želučane proteinaze djeluju puno lakše i brže na kozje mlijeko (Park, 2017). Zbog toga se kozje mlijeko probavlja brže i lakše u odnosu na kravlje.

Vrlo mali udio α_{s1} -kazeina u kozjem mlijeku omogućava sigurnu identifikaciju patvorenja kozjeg mlijeka kravljim, već i količinama od 1 %. Jedna od metoda dokazivanja patvorenja mlijeka, a ujedno i referentna metoda je izoelektrično fokusiranje. Riječ je o elektroforetskoj tehnici separacije amfoternih molekula (molekula s nabojem, pozitivnim ili negativnim). Budući da su izoelektrične točke frakcija kazeina kravljega i kozjeg mlijeka različite, ovom se tehnikom može dokazati patvorenje kozjeg mlijeka kravljim (Božanić i sur., 2018).

Mliječna mast ima najveću energetska vrijednost u mlijeku te utječe na okus mlijeka kao i na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda (Božanić i sur., 2018), a njen sadržaj može biti vrlo promjenjiv – od 2,5 do 6 % (Božanić i sur., 2002), ali je u sirovom kozjem mlijeku dozvoljeno najmanje 2,5 %, a najviše 5 % (Pravilnik, 2017). Mliječna mast je smjesa velikog broja različitih lipidnih tvari i sadrži više od 200 različitih masnih kiselina, ali samo je 15 masnih kiselina zastupljeno u udjelu većem od 1 %. Kratki lanci masnih kiselina daju mliječnoj masti izvanrednu probavljivost, brzo oksidiraju, a mliječna mast opskrbljuje organizam esencijalnim masnim kiselinama i vitaminima topljivim u mastima (A, D, E i K). Mliječna mast sadrži konjugiranu linolnu kiselinu, koja ima antikancerogeno djelovanje, te fosfolipide koji sadrže kolin za kojeg je poznato da pospješuje oksidaciju masti u jetri te održava ravnotežu koncentracije kolesterola. Također, kozje mlijeko sadrži manje kolesterola u odnosu na kravlje. Osim toga, razlika u mliječnoj masti kozjeg i kravljeg mlijeka je u zasićenosti i duljini lanaca masnih kiselina što je veoma bitno s nutritivnog i zdravstvenog gledišta.

Mast kozjeg mlijeka je probavljivija od masti kravljeg mlijeka jer su masne globule kozjeg mlijeka manje te ih ima više zbog čega je ukupna masna površina veća što doprinosi lakšoj razgradnji lipazama u crijevima. Takve manje globule masti bolje su raspršene u mlijeku pa osiguravaju puno bolju homogenost te je brzina obiranja masti puno manja.

Gotovo 28 % masnih kiselina kozjeg mlijeka je kraćih lanaca ($C_4 - C_{12}$) te prosječno 38 % srednjelančanih masnih kiselina ($C_6 - C_{14}$).

Tri masne kiseline nazvane po kozama (capra, lat.=koza): kapronska (C₆), kaprilna (C₈) i kaprinska (C₁₀) čine oko 20 % masnih kiselina kozjeg mlijeka, dok ih u kravljem ima samo 6 %. Navedene masne kiseline se metaboliziraju više poput šećera, odnosno puno brže se prevode u energiju i ne nakupljaju se u obliku tjelesnih zaliha zbog čega se ne nakupljaju u arterijama pa ne dolazi do njihovog začepljenja. One također utječu i na jedinstven, specifičan okus kozjeg mlijeka (Božanić i sur., 2002).

Mliječni šećer – laktoza je glavni ugljikohidrat gotovo svih mlijeka sisavaca (Turkmen, 2017) te je značajan izvor energije, pospješuje djelovanje probavnog sustava i povećava sposobnost vezanja fosfora i kalcija. Laktoza je disaharid koji se sastoji od glukoze i galaktoze, sladak je te daje blago slatkast okus mlijeku (Božanić i sur., 2002). Iako kozje mlijeko sadrži nešto manju količinu laktoze od kravljeg, ne može biti zamjena za osobe koje boluju od intolerancije na laktozu. Mlijeko sadrži derivate laktoze kao što su laktuloza, laktitol i razne druge oligosaharide. Oligosaharidi mlijeka poboljšavaju funkcije mozga i živčanog sustava te imaju antigena svojstva (Turkmen, 2017), a osim toga igraju važnu ulogu u intestinalnoj flori novorođenčadi (Amigo i Fontecha, 2011). Kozje mlijeko je vrlo slično humanom s obzirom na sadržaj oligosaharida, kojih ima više od kravljeg mlijeka, čak 4 do 5 puta (Turkmen, 2017).

Proizvodnja fermentiranih mliječnih proizvoda zasniva se na fermentaciji laktoze (Božanić i sur., 2018).

Na sastav mineralnih tvari kozjeg mlijeka utječe pasmina, prehrana, stadij laktacije kao i ukupno zdravstveno stanje ove životinje. Međutim, udjeli mineralnih tvari u kozjem mlijeku su uglavnom veći od onih u kravljem, ali i u humanom mlijeku kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Udjeli mineralnih tvari u kozjem mlijeku u usporedbi s kravljim i majčinim mlijekom (u 100 g uzorka) (Turkmen, 2017)

<i>Minerali (mg)</i>	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko	Majčino mlijeko
<i>Kalcij</i>	134	119	32
<i>Kloridi</i>	150	100	60
<i>Bakar</i>	0,05	0,06	0,06
<i>Jod</i>	0,022	0,021	0,007
<i>Željezo</i>	0,05	0,05	0,03
<i>Magnezij</i>	14	13	3
<i>Mangan</i>	0,032	0,02	0,07
<i>Fosfor</i>	111	93	14
<i>Kalij</i>	204	151	51
<i>Selen</i>	1,33	0,96	1,52
<i>Sumpor</i>	28	32	14
<i>Natrij</i>	50	49	17
<i>Cink</i>	0,30	0,38	0,17

Kozje mlijeko predstavlja idealan izvor kalcija i fosfata prilikom nedovoljne konzumacije mesa. Ono sadrži više kalcija, fosfora, kalija, magnezija i klorida, a manje natrija i sumpora od kravljeg mlijeka. Jedna od najvećih razlika kozjeg i kravljeg mlijeka je udio kalcija te fosfora. Osim što kozje mlijeko sadrži više udjele nekih minerala, neka istraživanja pokazuju da je i bioraspoloživost minerala puno veća u kozjem mlijeku, kao što su primjerice željezo, selen, cink i bakar (Turkmen, 2017).

Vitamini su fiziološke, biokemijske i metaboličke komponente sadržane u mlijeku. Ukupan sastav vitamina kozjeg mlijeka promjenjiv je ovisno o prehrani, stadiju laktacije te okolišnim čimbenicima (Turkmen, 2017). Kozje mlijeko sadrži više vitamina A od kravljeg zbog čega je više bijelo. Naime, koze prevode sav β -karoten u vitamin A u mlijeku. Kozje mlijeko sadrži vitamin A, niacin, tiamin, riboflavin i pantotenat u količinama dovoljnim da zadovolji potrebe novorođenčadi. Međutim, kozje mlijeko ima značajno manje folne kiseline i vitamina B₁₂ od kravljeg mlijeka kojeg kravlje mlijeko ima pet puta više. Kozje i kravlje mlijeko sadrže podjednake količine piridoksina, vitamina C i vitamina D.

Pokazalo se da su visoka temperatura i kratkotrajno trajanje pasterizacije najbolji za očuvanje vitamina kao i produljenje trajnosti kozjeg mlijeka (Park, 2017).

2.2.2. Okus i miris kozjeg mlijeka

Kozje mlijeko ima karakterističan okus i miris koji potječu od slobodnih masnih kiselina kratkog lanca te je vrlo rašireno mišljenje o neprihvatljivosti okusa i mirisa kozjeg mlijeka. Međutim, svježe pomuzeno kozje mlijeko s kojim se pravilno i higijenski postupka okusom i mirisom ne razlikuje se uvelike od primjerice, kravljeg mlijeka. Karakterističan nepoželjan okus može biti posljedica lošeg postupanja s mlijekom od trenutka mužnje do predaje ili proizvodnje određenih proizvoda. Naime, mliječna mast kozjeg mlijeka sadržava veći udio masnih kiselina jakog mirisa (kapronska, kaprilna i kaprinska), koje tijekom pravilne obrade mlijeka ostaju vezane u gliceridima. Membrana masne globule kozjeg mlijeka krhkija je nego membrana masne globule kravljeg mlijeka i lakše se ošteti tijekom nepravilnog rukovanja mlijekom pa se enzimi oslobode i dovode do lipolize te karakterističnog nepoželjnog okusa i mirisa. Na stvaranje suokusa u mlijeku mogu utjecati mnogi čimbenici kao što su neadekvatna stočna hrana, prisutnost korova, mirisi okoline, fiziologija muzne životinje, nepravilni postupci obrade, nepravilna oprema i rukovanje, sporo hlađenje, promjenjiva temperatura tijekom čuvanja, dodavanje toplog mlijeka u čuvano hladno mlijeko, nerashlađeni transport i slično. Nastajanje specifičnog okusa kozjeg mlijeka usko je povezano s prirodom različitih sastojaka mlijeka, kao i s biokemijskim i enzimatskim čimbenicima. Velik je utjecaj i primijenjenih tehnoloških postupaka obrade koji mogu dovesti do degradacija pojedinih sastojaka mlijeka. Osim toga, zapaženo je da je okus obranoga kozjeg mlijeka vrlo blag u usporedbi s punomasnim (Božanić i sur., 2018).

2.2.3. Fermentirano kozje mlijeko

Najpopularnije fermentirano mlijeko je jogurt. Jogurt od kozjeg mlijeka je bio tradicionalni proizvod u zemljama gdje su nastala fermentirana mlijeka. U današnje vrijeme ciljano tržište su kupci koji traže bolji nutritivni sastav od onog koji nudi kravlje mlijeko ili su alergični na proteine kravljeg mlijeka ili pak jednostavno više uživaju u okusu proizvoda od kozjeg mlijeka (Moatsou i Park, 2017). Također, nakon fermentacije, kozje mlijeko djelomično gubi svojstven okus neprihvatljiv mnogim potrošačima (Božanić i sur., 2018).

Jedan od glavnih problema u proizvodnji jogurta od kozjeg mlijeka je slaba tekstura odnosno nedostatak konzistencije i manja viskoznost u odnosu na jogurt proizveden od kravljeg mlijeka. To je posljedica razlike u sastavu proteina, pogotovo kazeina. Osim toga, važnu ulogu i igra pasmina koza od kojih potječe mlijeko.

Najčešće korištena starter kultura za proizvodnju jogurta sastoji se od sojeva *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u omjeru 1:1, s optimalnim rastom pri temperaturi između 37 i 40 °C pri kojoj se odvija termofilna fermentacija. Ove dvije kulture proizvode mliječnu kiselinu puno brže kada se koriste zajedno nego svaka posebno jer svaka od njih otpušta produkte koje ona druga može iskoristiti. Smatra se da je kozje mlijeko bolje od kravljeg za rast bakterija mliječno kiselog vrenja zbog većeg udjela vitamina i neproteinskog dušika.

Jogurt se tradicionalno povezuje s dobrim zdravljem i dugim životom zbog kemijskog i probiotičkog sastava te se općenito fermentiranom mlijeku pripisuju terapijska svojstva zbog činjenice da sadrži žive mikroorganizme (Moatsou i Park, 2017).

2.3. BILJNI EKSTRAKTI I NJIHOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Biljni ekstrakti su važan izvor biološki aktivnih komponenti koje imaju bitnu ulogu u ljudskom zdravlju. Kako bi se njihova povoljna svojstva mogla primijeniti, oni moraju biti pažljivo pripremljeni. Prije ekstrakcije biljke se uglavnom suše, ali ponekad se koristi i svježi biljni materijal. Ovisno o dijelu biljke koji se ekstrahira, on mora biti usitnjen, bilo da se usitnjava u veće čestice, sitne pa nastaje prah ili se nježno drobi. Nakon ekstrakcije može se još i primijeniti filtracija, koncentracija ili sušenje (Rodino i Butu, 2019).

Proces ekstrakcije koji se primjenjuje je ključan element uključen u ekstrakciju i identifikaciju bioaktivnih komponenti koje se nalaze u biljkama. Bioaktivni sastojci mogu biti ekstrahirani iz svih dijelova biljaka kao što su stabljika, kora, listovi, cvjetovi, korijenje, plodovi, sjemenke. Pokazalo se da je biološka aktivnost biljnih ekstrakata različita ovisno o vrsti ekstrakcijskog procesa koji je bio primijenjen što naglašava važnost odabira pravilnog procesa. Iako su poznate tradicionalne i jednostavne metode ekstrakcije kao i nove suvremenije, njihova efikasnost ovisi o brojnim parametrima kao što su dužina trajanja ekstrakcije, korišteno otapalo, pH otapala, temperatura, veličina čestica biljaka, omjer biljnog materijala i otapala, i slično. Konvencionalne metode ekstrakcije su: infuzija, dekokcija, maceracija, perkloracija i Soxhlet ekstrakcija, dok su neke od modernijih metoda ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Rodino i Butu, 2019).

Prehrambena industrija sve više istražuje prirodne izvore bioaktivnih komponenti kako bi zadovoljila potrebe potrošača koji zahtijevaju funkcionalnu hranu koja sadrži prirodne aditive te imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Za tu svrhu mogu poslužiti fitokemikalije dobivene iz biljnih ekstrakata koji imaju antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Zbog toga se

najviše i istražuje primjena tih svojstava kao i primjena prirodnih konzervansa kao alternativa onim sintetičkim te su kao takvi posebno zanimljivi u proizvodnji minimalno procesirane hrane, organske hrane, funkcionalne hrane i sl. U hranu se mogu dodavati u svježem ili osušenom stanju, kao biljni ekstrakti ili kao eterična ulja (Filipčev, 2020). U funkcionalnu hranu može se svrstati i fermentirana hrana, kao što su fermentirana mlijeka uključujući i jogurt. Posljednjih godina brojni mliječni proizvodi se obogaćuju probiotičkim bakterijama i/ili bioaktivnim komponentama te zbog svojih zdravstvenih učinaka na organizam postoji povećan interes za razvoj i konzumaciju takvih novih funkcionalnih mliječnih proizvoda (Zoidou i sur., 2017).

2.4. MASLINA

Maslina (*Olea europaea* L.) je bila jedna od prvih pripitomljenih stabala prije otprilike 8 000 godina. Smatra se da je do toga došlo na područjima obala Sirije, Libanona i Palestine odakle se uzgoj proširio na Cipar, Tursku i Kretu te prema Egiptu. Sve prijašnje civilizacije (Egipćani, Feničani, Grci, Rimljani) su imale značajnu ulogu u njihovoj distribuciji diljem Mediterana (Kailis, 2017). Masline su crnogorična stabla te se danas uzgajaju u svim zemljama s mediteranskom klimom, a vodeći proizvođači maslina su Španjolska, Italija i Grčka (Raina, 2003). Maslinama, koje se smatraju autohtonom vrstom na području Mediterana odgovara klima s blagim i vlažnim zimama te dugim, toplim i suhim ljetima te u takvim područjima daju nabolje urode (Kailis, 2017). Uzgoj maslina u svijetu, ali i u Europi te Europskoj Uniji, uključujući Hrvatsku, posljednjih 20 godina je u blagom porastu, uz nekoliko oscilacija (FAO, 2018) što znači da je u porastu i otpad koji nastaje branjem i preradom maslina.

2.4.1. List masline

Maslinovo ulje i masline su bogate bioaktivnim sastojcima te je povećana proizvodnja maslinovog ulja i maslina odgovorna za nastanak velike količine nusprodukata. Uzgoj maslina i proces industrijske proizvodnje za posljedicu imaju nastanak velikih količina krutog otpada kao i tamne otpadne tekućine. Taj otpad sadrži i vrijedne sastojke kao što su ugljikohidrati, organske kiseline, minerali, ulja, vlakna i polifenoli. Lišće masline sadrži ugljikohidrate, ulja, proteine, vlakna, anorganske komponente te brojne sekundarne metabolite. Kao nusproizvod, listovi se uglavnom spaljuju ili spaljuju s ostalim otpadom što ima brojne ekonomske, ali i ekološke posljedice. Također se ponekad koristi u proizvodnji za hranu za stoku ili za proizvodnju etanola i drugih kemikalija (Skaltsounis i sur., 2015). Međutim, list masline zbog svog vrijednog sastava umjesto otpada može naći svoju primjenu u industriji.

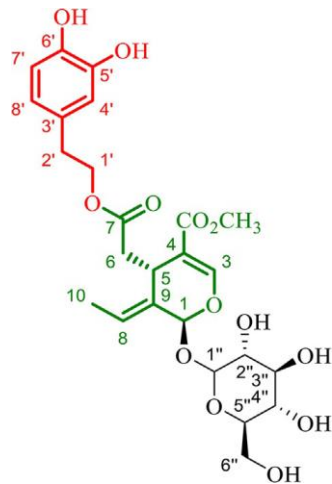
Maslina ima debele sklerofilne listove na čijoj se površini s gornje strane nalazi kutikula koja pruža zaštitu od ekstremnih toplinskih uvjeta i suše. Mladi listovi sadrže fotosintetske pigmente, minerale, suhu tvar i malu količinu masti i proteina s antioksidansima, uključujući oleuropein. Šećeri u listu masline su glukoza, manitol i saharoza s oligosaharidima i njihovim prekursorima – galaktoza, rafinoza i stahioza (Kailis, 2017).

List masline predstavlja bogat izvor bioaktivnih komponenti zbog čega se dugi niz godina koristio kao lijek u narodnoj medicini (Dais i Hatzakis, 2015) na području Mediterana, a posebno značajan je postao kada se 1854. godine otkrilo da je učinkovit u liječenju groznice i malarije (Talhoui i sur., 2016). Osim toga, postoje i jasni dokazi o antimikrobiološkoj aktivnosti komponenti koje sadrži ekstrakt lista masline koje inhibiraju nekoliko Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kvasce i parazite, uključujući i malariju (Cruz i sur., 2017). Bioaktivni sastav lista masline ovisi o brojnim čimbenicima kao što su područje kultivacije, agronomski postupci, okolišni uvjeti, starost kultivara, stabla i lista, stadij razvoja listova, ostali biotički i abiotički parametri, tretiranje biljnog materijala nakon branja (proces sušenja te uvjeti skladištenja) te tehnike i načini ekstrakcije lista masline. Listovi različite starosti mogu se pronaći duž cijele krošnje tijekom cijele godine. Na odraslom stablu masline životni vijek lista je i do tri godine, ali većina lišća otpada tijekom druge godine, pogotovo kada se nalaze u sjeni. Maslinovo lišće se može podijeliti na trenutno i staro sezonsko, a trenutno se još dodatno dijeli na novo i zrelo lišće. Novi listovi rastu prema vrhu ovogodišnjih izdanaka, dok se zreli mogu pronaći u sredini i na unutrašnjim dijelovima tih izdanaka. Oblik i veličina listova su promjenjivi. Gornja strana lista je svijetlo- do tamnozeleno, dok je donja pepeljasto siva do zelena (Tsimidou i Papoti, 2010). Nedavno je list ekstrakta masline postao obećavajući sastojak u industrijskoj proizvodnji zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje te farmakoloških svojstava, a zbog antioksidativnih svojstava se svrstava u kategoriju funkcionalne hrane. Frakcioniranje ekstrakata i pročišćavanje aktivnih komponenti, kao što su oleuropein, hidroksitirozol i tokoferoli, koriste se u proizvodnji funkcionalne hrane te dodataka prehrani. Također se istražuje nutritivno obogaćivanje maslinovog ulja s polifenolima izoliranim iz lista masline (Dais i Hatzakis, 2015). S obzirom na ubrzan rast tržišta s prirodnim sastojcima i aditivima brojni proizvodi su našli svoju primjenu.. Ova vrsta hrane omogućava dodatne prednosti u odnosu na tradicionalnu hranu te se na tržištu nalazi u širokom spektru proizvoda, pa je tako moguće naći i preparate lista masline u formi praha ili ekstrakta (Skaltsounis i sur., 2015).

2.4.2. Ekstrakt lista masline

Znanstvena istraživanja su pokazala da list masline sadrži fenolne spojeve odgovorne za brojne biološke aktivnosti, uključujući antioksidativne, protuupalne, antimikrobiološke, antivirološke, antikancerogene te djelotvorne kardiološke učinke. Većina radova biološke učinke ekstrakta lista masline pridaje ukupnim fenolima ili pojedinim fenolnim spojevima kao što su sekoiridoidi, posebno oleuropein i hidroksitirozol te flavonoidima kao što su diosmetin, kvercetin, luteolin, apigenin i njihovi derivati. Glavne skupine fenola u listu masline su fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi i sekoiridoidi te uključuju uglavnom vanilinsku kiselinu, kafeinsku kiselinu, hidroksitirozol, rutin, verbaskozid, luteolin, kvercetin, oleuropein, dimetiloleuropein i ligstrozid (Talhaoui i sur., 2016).

Polifenoli se definiraju kao sekundarni metaboliti koji su derivati pentoza fosfatnog puta u biljkama. Ove komponente, jedne od najraširenijih grupa fitokemikalija, imaju važnu fiziološku i morfološku ulogu kod biljaka. Strukturno, iako vrlo različiti, polifenoli imaju zajedničku osnovnu građu – aromatski prsten koji na sebe ima vezanu jednu ili više hidroksilnih skupina. List masline sadrži mnoštvo različitih fenolnih derivata, a sastoji se od jednostavnih fenola, flavonoida i sekoiridoida. Flavonoidi su jedna od najrasprostranjenijih grupa polifenola u listu masline (Talhaoui i sur., 2015). Građeni su od 15 ugljikovih atoma koji sadrže difenilpropanski kostur povezan s piranskim prstenom u sredini (Pietta, 2000) te se razlikuju s obzirom na povezanost B i C prstena, ali i prema stupnju nezasićenosti, stupnju oksidacije te prema broju i položaju hidroksilne skupine u C prstenu (Ignat i sur., 2011). Sekoiridoidi, koji su podskupina iridoida – derivati monoterpena s iridanskom strukturom, su ograničeni samo na *Oleaceae* porodicu te su glavna porodica spojeva koji se nalaze u listu masline, a među njima se nalazi oleuropein, glavna fenolna komponenta u listu masline (Talhaoui i sur., 2015). Oleuropein je definiran kao glikozid estera β -glukozilirane elenolske kiseline i 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozol) te je odgovoran za gorčinu maslinovog ulja. Molekularna struktura oleuropeina može biti podijeljena u tri podjedinice: hidroksitirozol, monoterpen i dijelovi glukoze, kao što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Molekularna struktura oleuropeina (crveno-hidroksitirosol, zeleno-monoterpen, crno-dijelovi glukoze) (Cavaca i sur., 2020)

Oleuropein je odgovoran za većinu djelotvornih učinaka ekstrakta lista masline te ima potencijalna biološka i farmakološka svojstva zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava. Također derivati oleuropeina imaju biološka svojstva (Cavaca i sur., 2020).

Iako se biljni ekstrakti zbog svog prirodnog podrijetla smatraju sigurnim za konzumaciju, treba biti oprezan. Nepravilna primjena, priprema ili doziranje mogu imati negativne zdravstvene posljedice. Zbog toga je potrebno istražiti potencijalne interakcije s drugim namirnicama odnosno toksikokinetiku, što uključuje apsorpciju, raspodjelu u organizmu, biotransformacije u druge metabolite, odnosno interakcije sa staničnim makromolekulama te izlučivanje iz organizma. Biljke od kojih se dobivaju ekstrakti, pa tako i masline, su izložene djelovanju pesticida, dimnih plinova fosilnih goriva i ispušnih plinova motornih vozila kao i krutih čestica i sastojaka dima iz industrijskih postrojenja te djelovanju kiselih kiša (Giannenas i sur., 2020). Svi ti čimbenici imaju utjecaj na sastav biljnih ekstrakata, a samim time i na zdravlje čovjeka koji ih konzumira zbog čega je bitno ispitati i utvrditi njihovu sigurnost za upotrebu.

2.5. SIGURNOST HRANE

Sigurnost hrane je pojam kojim se nastoji povećati povjerenje u hranu koju potrošači konzumiraju (Bažok i sur., 2014). Svjetska zdravstvena organizacija definirala je sigurnost hrane kao osiguranje da hrana neće naškoditi potrošaču ako je pripremljena i konzumirana na pravilan način. Zbog velikog broja slučajeva trovanja hranom bitno je kontrolirati opasnosti koje narušavaju sigurnost hrane. Prilikom analize rizika potrebno je primijeniti procjenu rizika, upravljanje rizikom te komunikaciju o riziku. Rast svjetske populacije, industrijalizacije, globalne razmjene, znanstvenih dostignuća, dostupnosti hrane i mikrobiološke adaptacije

predstavljaju nove izazove na području sigurnosti hrane (Bertolatti i Theobald, 2019). Alati koji čine temeljnu koncepciju sigurnosti hrane su: dobra proizvođačka praksa, dobra poljoprivredna praksa, dobra distribucijska praksa, dobra higijenska praksa, HACCP i analiza rizika (Bažok i sur., 2014).

2.6. HACCP SUSTAV

HACCP (eng. *Hazard Analysis Critical Control Point*) je sustav kontrole koji omogućava identifikaciju, procjenu i uspostavu kontrole nad kemijskim, fizičkim i biološkim opasnostima koje su važne za sigurnost hrane u bilo kojoj fazi pripreme, proizvodnje, prerade, pakiranja, skladištenja, prijevoza i distribucije hrane (Pravilnik, 2015). Svaki subjekt u poslovanju s hranom, osim na razini primarne proizvodnje, dužan je uspostaviti i provoditi redovite kontrole higijenskih uvjeta proizvodnje u svakom objektu pod svojom kontrolom, provedbom preventivnog postupka samokontrole, razvijenog u skladu s načelima sustava HACCP (analiza rizika i kontrola kritičnih točaka) (Zakon, 2013). Glavni cilj HACCP-a je prevencija razvoja opasnosti tj. HACCP se temelji na sustavu koji predviđa što bi u pojedinoj fazi proizvodnje moglo poći krivo te se tako sprječava da potencijalno opasan proizvod stigne do potrošača (Bažok i sur., 2014).

HACCP sustav se temelji na kontroli procesa proizvodnje određenog proizvoda, ali za uspostavljanje HACCP plana u praksi potrebno je uspostaviti i preduvjetne programe (Bažok i sur., 2014). Preduvjetni programi su strukturalni, higijenski i drugi zahtjevi koje subjekt u poslovanju s hranom mora ispuniti te aktivnosti koje mora provoditi, a koji su potrebni za održavanje higijene u cijelom lancu hrane (Pravilnik, 2015), a čine ih dobra proizvođačka praksa, dobra higijenska praksa, sljedivost, standardni sanitacijski operativni postupci i standardni operativni postupci. Standardni sanitacijski operativni postupci utvrđuju način i korake sanitacije s obzirom na mogućnost izravne kontaminacije proizvoda tijekom proizvodnje, a odnose se na čistoću opreme, pribora i površina prije početka i tijekom proizvodnje, higijenu radnika te manipulaciju sirovinom, poluproizvodom ili gotovim proizvodom. Standardni operativni postupci dani su u obliku uputa koje opisuju način izvođenja neke radnje u okviru implementacije pojedinih preduvjetnih programa: ŠTO točno treba napraviti; KAKO se to radi; KADA se to radi (učestalost navedenih radnji, granične vrijednosti, popravne radnje); TKO mora nešto napraviti; ZAŠTO se to radi; GDJE se to radi.

Svaki preduvjetni program čini zaseban sustav, ne povezuje se s određenim procesom i primjenjiv je na sve proizvodne procese u određenoj tvrtki.

Dokument u kojem se nalaze sve potrebne informacije za implementaciju HACCP sustava naziva se HACCP priručnik koji se sastoji od dijagrama tijeka i kontrolne tablice (HACCP plan) (Bažok i sur., 2014). Dijagram tijeka je sustavni prikaz slijeda koraka ili postupaka primijenjenih u procesu pripreme, proizvodnje, prerade, pakiranja, skladištenja, prijevoza i distribucije hrane, a HACCP plan je izrađen u skladu s načelima HACCP sustava u cilju osiguranja kontrole opasnosti koje su važne za sigurnost hrane u dijelu lanca hrane koji se razmatra (Pravilnik, 2015) te sadrži ključne podatke za svaku fazu proizvodnje što uključuje kritične kontrolne točke, kontrolne kriterije (kritične granice), kontrolne mjere i tko ih provodi i HACCP zapise (dokumente). HACCP se temelji na sedam načela, a njihova implementacija se provodi u 12 koraka, međutim prije aplikacije HACCP načela potrebno je provesti pet uvodnih radnji:

- 1) Uspostaviti HACCP tim – potrebno je okupiti multidisciplinarni tim od najviše 6 stručnjaka različitih područja djelovanja, a članovi tima mogu biti zaposlenici tvrtke, ali i vanjski suradnici. Voditelj tima mora biti educiran iz područja HACCP-a.
- 2) Opisati proizvod – bitno je izdvojiti one karakteristike proizvoda koje mogu utjecati na njegovu sigurnost, to su: kemijski sastav, fizikalna svojstva, mikrobiološka kvaliteta, senzorska svojstva, metode prerade, trajnost, uvjeti skladištenja, metoda distribucije, ambalaža, prisutnost alergena, tekst deklaracije. Bitno je i navesti sirovinu kao i sve dodatke koji se koriste u proizvodnji. Za sirovinu je bitno navesti kemijski sastav i fizikalna svojstva, mikrobiološke i kemijske kriterije, uvjete skladištenja, način pakiranja i distribucije.
- 3) Utvrditi namjenu proizvoda i potrošačku skupinu – važno je navesti skupine ljudi koji će konzumirati proizvod i uzeti u obzir osjetljive grupe poput djece, starijih osoba, trudnica, osoba s imunološkim bolestima te ako osjetljive grupe ne smiju konzumirati određeni proizvod to se mora naznačiti na deklaraciji. Također, ako se radi o polugotovom proizvodu, potrebno je opisati postupke pripreme kojima će se namirnica pripremiti do faze u kojoj će biti spremna i sigurna za konzumaciju.
- 4) Napraviti dijagram tijeka – dijagram tijeka je osnova za provedbu analize rizika. U dijagramu tijeka kojeg izrađuje HACCP tim prikazane su sve faze proizvodnje – od preuzimanja sirovine do gotovog proizvoda, osim toga potrebno je i navesti sve dodatne informacije nužne da bi prikaz procesa bio što jasniji i realniji. Od dodatnih podataka koji se navode najvažniji su: podaci o sirovini (oblik u kojem se zaprima, karakteristike, uvjeti skladištenja, postupci prije procesiranja te podaci o procesiranju (vrijeme/temperatura i slijed postupaka)), detalji o procesu proizvodnje (redoslijed faza

proizvodnje, temperaturni uvjeti i vremensko trajanje, prazni hodovi u proizvodnji) i podaci o uvjetima skladištenja i distribucije gotovog proizvoda.

- 5) Potvrditi dijagram tijeka (na mjestu proizvodnje) – prije početka provedbe analize opasnosti, HACCP tim u pogonu proizvodnje provjerava je li dijagram tijeka kompletan, odnosno je li u skladu sa stvarnim tijekom procesa proizvodnje te unosi eventualne izmjene (Bažok i sur., 2014).

Nakon provedenih pet uvodnih radnji slijedi provedba 7 HACCP načela.

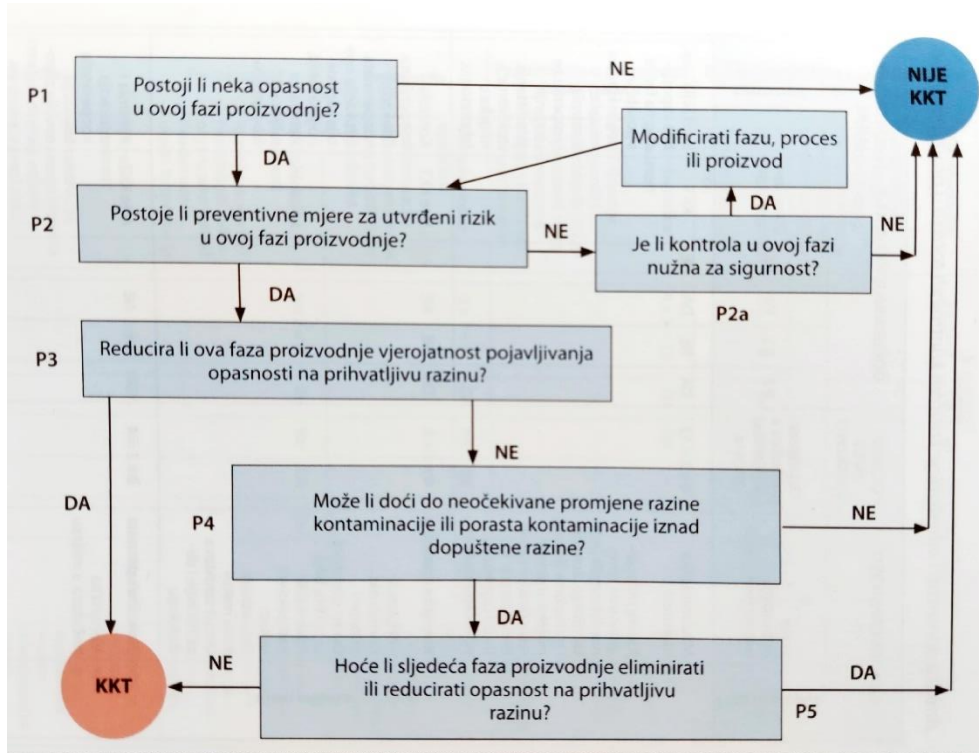
1. Utvrđivanje svih opasnosti koje se moraju spriječiti, ukloniti ili smanjiti na prihvatljivu razinu – nakon identifikacije opasnosti potrebno je provesti analizu opasnosti, odnosno procijeniti važnost svake identificirane opasnosti u proizvodnji. U ocjenjivanje važnosti pojedinih opasnosti treba uključiti vjerojatnost njihovog pojavljivanja i dođe li do njihove pojave ozbiljnost posljedica za zdravlje (tablica 3).

Tablica 3. Ocjenjivanje opasnosti (Bažok, 2014)

VJEROJATNOST POJAVE	Nije za očekivati = 1	1	2	2	4
	Moglo bi se dogoditi = 2	2	4	6	8
	Zna se dogoditi = 3	3	6	9	12
	Često se događa = 4	4	8	12	16
		Nije od važnosti = 1	Može prouzročiti prigovor kupaca ili opoziv hrane = 2	Može uzrokovati ozbiljna oboljenja = 3	Može prouzročiti kobne posljedice = 4
OZBILJNOST POSLJEDICA					

2. Utvrđivanje kritičnih kontrolnih točaka i kontrolnih točaka u koraku ili koracima na kojima je kontrola nužna za sprečavanje ili uklanjanje opasnosti ili za njezino smanjivanje na prihvatljivu razinu – kritična kontrolna točka (eng. *critical control point* – CCP) se definira kao postupak ili faza proizvodnje pri kojoj se može prevenirati, ukloniti ili svesti na prihvatljivu razinu identificirana opasnost. Za utvrđivanje CCP koristi se stablo odlučivanja

(dijagram odluke). Sastoji se od niza logičnih pitanja koja se primjenjuju na svaku identificiranu opasnost i na svaku fazu proizvodnje u kojoj se određena opasnost može pojaviti (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz dijagrama odluke (Bažok, 2014)

3. Utvrđivanje kritičnih granica na kritičnim kontrolnim točkama i kontrolnim točkama koje razdvajaju prihvatljivo od neprihvatljivog u svrhu sprečavanja, uklanjanja ili smanjivanja uočenih opasnosti na prihvatljivu razinu – kritična granica mora biti mjerljiva, mora se moći redovito pratiti i osigurati trenutni rezultat kako bi se moglo predvidjeti ili preduhitriti mogući gubitak kontrole procesa proizvodnje.
4. Uspostava i provedba učinkovitih postupaka praćenja kritičnih kontrolnih točaka i kontrolnih točaka – u HACCP planu mora biti utvrđeno koje osoblje obavlja nadzor, što se nadzire, u kojem trenutku i na koji se način provodi nadzor.
5. Određivanje korektivnih mjera koje se poduzimaju ako sustav nadgledanja upozori da kritična kontrolna točka nije pod kontrolom – za svaku CCP moraju biti određene korektivne mjere. Korektivna radnja mora osigurati da se CCP dovedu pod kontrolu i mora osigurati pravilno odlaganje neispravnog proizvoda. Korektivni postupak ovisi o tehnološkom procesu proizvodnje i fazi procesa proizvodnje u kojoj je korekcija potrebna.

6. Uspostava postupaka koji se redovito poduzimaju kako bi se verificirala učinkovitost mjera – prije implementacije HACCP plana potrebno je utvrditi verifikacijske postupke koji uključuju verifikaciju i validaciju kritičnih kontrolnih točaka. Verifikacija je korak u kojem se primjenom različitih metoda, postupaka, testova i ostalih procjena utvrđuje valjanost HACCP plana i usklađenost provedbe HACCP sustava s pisanim dokumentima. Validacija se sastoji u pribavljanju podataka o učinkovitosti HACCP plana tj. cilj validacije je utvrditi jesu li sve opasnosti identificirane te hoće li HACCP plan učinkovito kontrolirati identificirane opasnosti.
7. Uspostava dokumentacije i vođenje evidencija primjerenih vrsti i veličini subjekta u poslovanju s hranom, a koje će dokazivati učinkovitu primjenu mjera – zbog učinkovitog provođenja HACCP sustava potrebno je uspostaviti sustav pisanja zapisa te to omogućuje pisani dokaz da se HACCP sustav provodi u skladu s HACCP planom. Ako za proizvodnju nekog proizvoda nema pisanih zapisa, proizvod se smatra kontaminiranim i nepoželjnim za konzumaciju. Bez zapisa tvrtka ne može dokazati da se proces proizvodnje odvija u skladu s HACCP planom. Dokumentacija mora sadržavati: HACCP plan i popratnu dokumentaciju korištenu pri njegovom razvoju: podaci o timu, dijagram tijeka, analiza opasnosti, korektivne akcije; zapise o praćenju CCP; zapise o devijacijama CCP i poduzetim korektivnim mjerama; zapise o povlačenju i zadržavanju proizvoda; zapise o modifikaciji HACCP plana; zapise o auditu, verifikaciji i validaciji; zapise o sastancima HACCP tima (Pravilnik, 2015; Bažok, 2014).

Kod svake promjene proizvoda, procesa ili bilo koje njegove faze, subjekti u poslovanju s hranom moraju revidirati i ažurirati HACCP sustav (Pravilnik, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada sastojao se od 2 dijela. Prvi dio obuhvaća primjenu HACCP načela kako bi se utvrdio utjecaj dodatka ekstrakata lista masline na sigurnost jogurta od kozjeg mlijeka, dok drugi dio obuhvaća proizvodnju jogurta od kozjeg mlijeka s različitim količinom dodanog ekstrakta lista masline kako bi se utvrdio njegov utjecaj na fizikalno-kemijske karakteristike jogurta i proces fermentacije kozjeg mlijeka.

3.1. PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA

U prvoj fazi izrade ovog diplomskog rada izrađen je dijagram tijeka za jedan od mogućih načina proizvodnje kozjeg jogurta obogaćenog ekstraktom lista masline te je nastavno na to provedena primjena prvih 6 od 7 načela HACCP sustava koristeći standard CAC RCP 1-1969, rev. 4-2003 (Codex Alimentarius Commission, 2003):

NAČELO 1: Provesti analizu opasnosti.

NAČELO 2: Utvrditi kritične kontrolne točke (CCP)

NAČELO 3: Uspostaviti kritične granice.

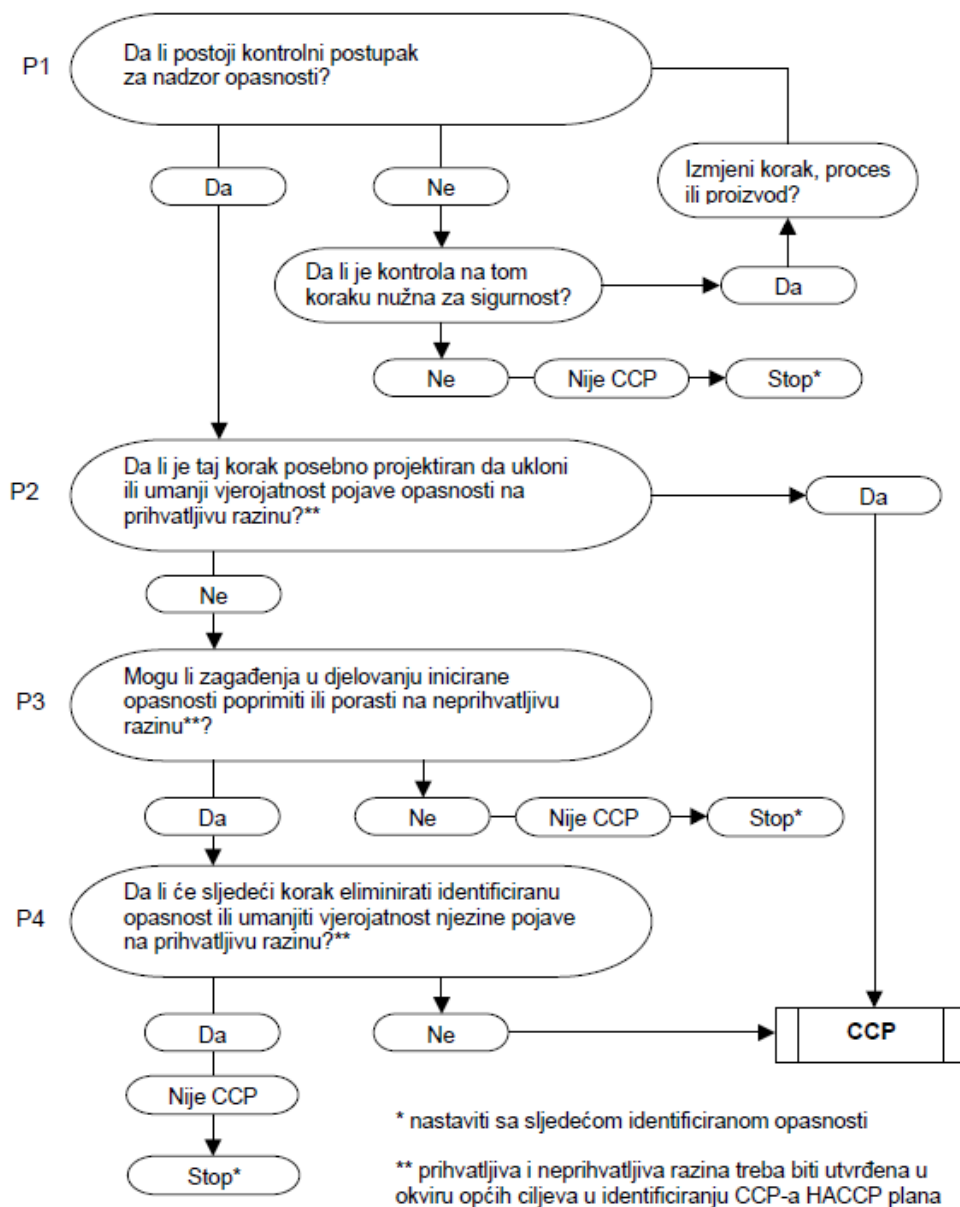
NAČELO 4: Uspostaviti sustav za nadziranje kontrole CCP-a.

NAČELO 5: Uspostaviti korektivne akcije.

NAČELO 6: Uspostaviti postupke verifikacije za potvrđivanje da HACCP sustav učinkovito djeluje.

NAČELO 7: Uspostaviti dokumentaciju koja se odnosi na sve postupke i zapise sukladno ovim načelima i njihovoj primjeni.

Prilikom primjene načela 2 (utvrđivanje kritičnih kontrolnih točaka) može se utvrditi više CCP-a kod kojih je kontrola primijenjena za istu opasnost. Utvrđivanje CCP-a u HACCP sustavu može biti olakšano primjenom stabla odlučivanja (slika 3) koji se zasniva na pristupu logičnog zaključivanja. Primjena stabla odlučivanja treba biti fleksibilna te treba biti upotrijebljeno kao smjernice za utvrđivanje CCP-a (FAO, 2011).



Slika 3. Stablo odlučivanja (Codex Alimentarius Commission, 2003)

Osim stabla odlučivanja kao pomoć se koristio i jedan od dostupnih numeričkih modela analize rizika čija je svrha potvrditi jesu li stablom odluke utvrđene CCP zaista CCP. Primijenjeni matriks procjene rizika zasnivao se na principu kombinacije vjerojatnosti pojave i ozbiljnosti posljedica određene opasnosti te njihov umnožak ukazuje je li neki korak u proizvodnji CCP ili ne. Vjerojatnost, odnosno učestalost pojave opisuje koja je vjerojatnost da će se opasnost pojaviti ukoliko proces bude nesukladan te je podijeljena u 5 razina od gotovo nemoguće (1) do izvjesno (5) što je detaljno prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Učestalost pojave opasnosti (Manning i Soon, 2013)

VJEROJATNOST DA ĆE SE OPASNOST POJAVITI UKOLIKO PROCES BUDE NESUKLADAN	UČESTALOST POJAVE OPASNOSTI	MNOŽITELJ
GOTOVO NEMOGUĆE	Manje od jednom godišnje, nema podataka o pojavi u prošlosti	1
MALO VJEROJATNO	Vrlo rijetko, poznato je da se može pojaviti	2
NIZAK RIZIK POJAVE	Izolirani slučajevi pojave uglavnom nakon nepropisnog rukovanja/postupanja	3
VJEROJATNO	Čimbenici vezani uz proizvod ili tehnološku operaciju čija je prisutnost/pojava očekivana	4
IZVJESNO/SIGURNO	Čimbenici vezani uz proizvod ili tehnološku operaciju koji se moraju obavezno kontrolirati	5

Također, ozbiljnost, odnosno težina posljedica ukoliko dođe do opasnosti su podijeljeni u razine 1-6 te detaljno definirani u tablici 5.

Tablica 5. Ozbiljnost posljedica ukoliko nastupi opasnost (Manning i Soon, 2013)

OZBILJNOST POSLJEDICA KOD IZOSTANKA KONTROLE	TEŽINA POSLJEDICA UKOLIKO NASTUPI OPASNOST	MNOŽITELJ
MALA ŠTETA	Blaže razočaranje kod potrošača, može uzrokovati njihove žalbe	1
ŠTETNO	Vrlo blage medicinske intervencije, potrošači razočarani i vjerojatno će se žaliti proizvođaču	2
OZBILJNA ŠTETA	Oboljeli kod kuće, nije nužan medicinski tretman, potrošači razočarani i vjerojatno će se žaliti nadležnom inspekcijskom tijelu	3
VRLO OZBILJNA ŠTETA	Oboljeli kod kuće, nužan medicinski tretman, potrošači vrlo razočarani, značajan rizik tužbe	4
POGUBNO, OZBILJNA BOLEST	Oboljeli hospitaliziran, značajan rizik tužbe, popraćeno medijski, intervencija službe za upravljanje kriznim situacijama, oštećen ugled proizvođača	5
KATASTROFA	Smrt, najviša razina intervencije službe za upravljanje kriznim situacijama, izvjestan rizik tužbe, uništenje proizvođača	6

Kombiniranjem tablice 4 i tablice 5 dolazi se do rezultata u matriksu procjene rizika te se utvrđuje je li neki korak CCP. Množenjem učestalosti pojave i ozbiljnosti posljedica dolazi se do rezultata od 1 do 30. Umnožak 1-5 predstavlja da se koraci nadziru putem načela dobre proizvođačke prakse (DPP) te je preporuka da se priroda problema provjeri u okviru preduvjetnih programa. 6-9 označava potrošačko pitanje odnosno manji rizik za sigurnost potrošača te je nužna kontrola putem načela DPP, a može biti kontrolna točka. Umnožak 10-16 znači da se korak sigurno nadzire putem načela DPP ili je kontrolna točka. Potrebno je primijeniti stablo odluke za biološke opasnosti te sastaviti proceduru za korektivne radnje.

Rezultati veći od 16 označavaju da je korak sigurno CCP i nedostatan nadzor može rezultirati trovanjem potrošača te je potrebno primijeniti stablo odluke za biološke opasnosti (tablica 6).

Tablica 6. Matriks procjene rizika (Manning i Soon, 2013)

UČESTALOST →	Gotovo nemoguće	Malo vjerojatno	Nizak rizik	Vjerojatno	Izvjesno
OZBILJNOST ↓	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Mala šteta (1)	1	2	3	4	5
Štetno (2)	2	4	6	8	10
Ozbiljna šteta (3)	3	6	9	12	15
Vrlo ozbiljna šteta (4)	4	8	12	16	20
Pogubno (5)	5	10	15	20	25
Katastrofalno (6)	6	12	18	24	30

Nakon procjene rizika definirane su kontrolne mjere, odnosno radnje koje eliminiraju opasnost, sprječavaju pojavu ili svode opasnost na prihvatljivu razinu, kritične granice, mjere korekcije i predloženi načini verifikacije (Jeličić i sur., 2009; Manning i Soon, 2013) te je sve prikazano u obliku HACCP plana.

3.2. EKSTRAKCIJA LISTA MASLINE

Ekstrakcija lista masline provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction* – ASE) na uređaju Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, Waltham, SAD) (slika 4). Na analitičkoj vagi (ABT 220-4M, Kern & Sohn, Balingen, Njemačka) se odvagne 2,5 g osušenog i samljevenog lista masline te se pomiješa s dijatomejskom zemljom (Alfa Aesar, Kandel, Njemačka) koja je inertna, a povećava površinu uzorka što omogućava učinkovitiju ekstrakciju, te se smjesa prenese u ćeliju od nehrđajućeg čelika (34 mL, Thermo Scientific, Waltham, SAD) na čije je dno prethodno stavljen celulozni

filter (Restek, Bellefonte, SAD). Čvrsto zatvorene ćelije se smještaju na okretajući nosač ASE uređaja, a ekstrakt se skuplja u staklene boce. Robotska ruka prenosi jednu po jednu ćeliju u pećnicu koja radi na odabranoj temperaturi tijekom ekstrakcije.

Parametri metode:

- $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Broj ciklusa = 3
- Statičko vrijeme = 5 min
- Volumen ispiranja uzorka = 50 mL
- Volumen ispiranja sustava = 5 mL (2x)
- Otapalo = voda
- Plin = dušik
- $V_{\text{ćelije}} = 34\text{ mL}$
- $m_{\text{uzorka}} = 2,5\text{ g}$
- Tlak = 10,34 MPa

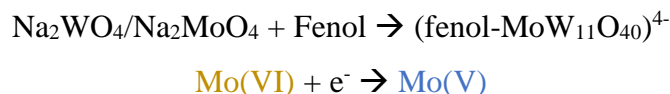


Slika 4. ASE uređaj (vlastita fotografija)

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih fenola u ekstraktu lista masline

Za određivanje ukupnih fenola korištena je metoda s Folin-Ciocalteu reagensom prema Shortle i sur. (2014). Ova metoda se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa i fenolnih spojeva. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosformolibdenske

kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.



Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL razrijeđenog (5x) ekstrakta, 200 μL F.C. reagensa (Merck, Darmstadt, Njemačka) i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodaje se 1 mL unaprijed pripremljene zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću vortexa (IKA MS2 Minishaker, Staufen, Njemačka), a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri $T=50$ °C. Nakon toga se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm (VWR UV-1600PC, Radnor, SAD). Na isti način se pripremi i slijepa proba ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (voda) (Shortle i sur., 2014).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri $T=50$ °C. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2=0,9998) \quad [1]$$

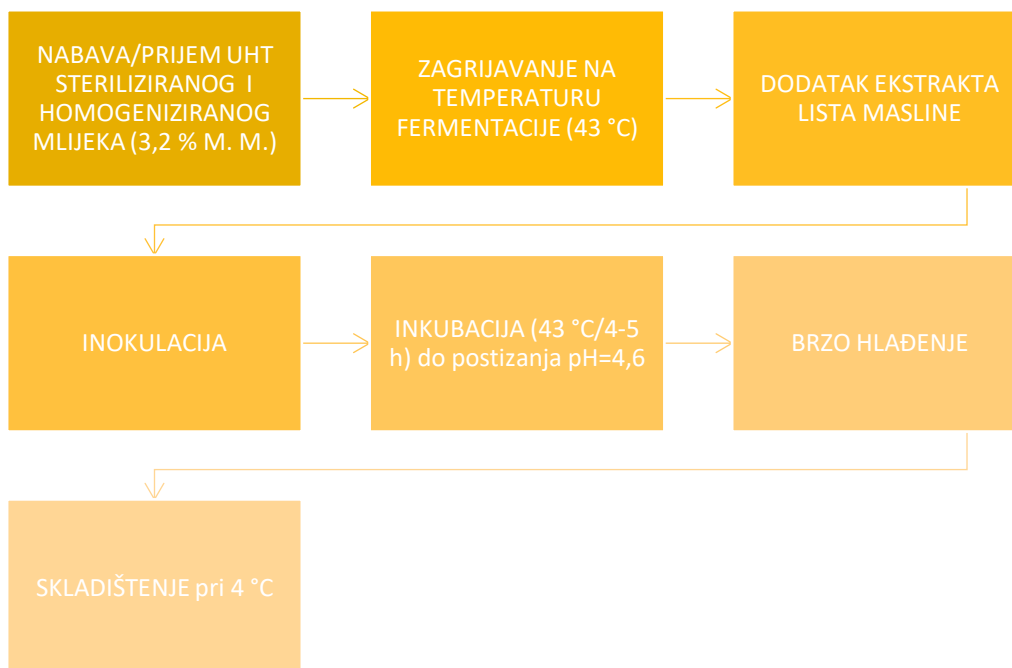
gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm
X – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})
 R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE L^{-1} ekstrakta kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3. PROIZVODNJA JOGURTA OD KOZJEG MLIJEKA S DODATKOM EKSTRAKTA LISTA MASLINE

Jogurt je proizveden od UHT steriliziranog, homogeniziranog kozjeg mlijeka standardiziranog na 3,2 % mliječne masti (Vindija d.d., Varaždin, Hrvatska) koje se prvo zagrijalo na temperaturu fermentacije ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$) te se zatim dodao vodeni ekstrakt lista masline u volumnim udjelima 1,5 i 3 % (v/v) i starter kultura YO MIX (Danisco, Francuska), nakon čega se po 150 mL inokuliranog mlijeka razlijeva u bočice za fermentaciju. Na isti način je pripremljen i kontrolni uzorak (K) koji nije sadržavao dodatak ekstrakta lista masline. Prije stavljanja bočica u termostat izmjeri se početni pH pomoću pH metra (pH 3110, WTW Technische Werkstätten GmbH, Njemačka). Bočice se inkubiraju pri $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ u termostatu (3u1 Uniblok, Inko, Zagreb, Hrvatska) dok se ne postigne vrijednost od oko 4,6 pH jedinica (može biti i 4,65). Pritom se pH mjeri svakih sat vremena, a pred kraj fermentacije i češće. Fermentacija se zaustavlja naglim hlađenjem stavljanjem u posudu ili sudoper s hladnom vodom. Nakon hlađenja slijedi čuvanje u hladnjaku 28-35 dana. Shema postupka proizvodnje prikazana je na slici 5.



Slika 5. Dijagram tijeka proizvodnje kozjeg jogurta

3.3.1. Određivanje titracijske kiselosti

Titracijska kiselost, odnosno kiselost po Soxhlet-Henkel-u određuje se tako da se u kontrolnoj tikvici napravi standardna boja tako da se u tikvicu prenese 20 mL uzorka i 0,4 mL kobaltovog sulfata $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. U drugu tikvicu se prenese 20 mL uzorka i 1 mL 2 % fenolftaleina te se titrira sa 0,1 M NaOH do crvenkaste boje, odnosno do boje koja je u prvoj tikvici, koja je stabilna 1 minutu (Božanić i sur., 2010). Izračun vrijednosti titracijske kiselosti se provodi prema slijedećem izrazu

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

gdje je a -broj mL NaOH utrošenih za titraciju; f -faktor otopine NaOH.

Rezultati su izraženi u $^{\circ}\text{SH}$ kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.2. Određivanje boje

Boja uzoraka jogurta se određivala pomoću spektrofotometra (Konica Minolta, CM-3500d, Tokio, Japan). Uzorak se stavlja u kivetu koja se umeće u uređaj, a podaci se iščitavaju na računalu. Prije mjerenja uređaj je potrebno kalibrirati prema uputama proizvođača. Određivala su se tri parametra boje: L^* (svjetlina), a^* (odnos zelene i crvene komponente) i b^* (odnos žute i plave komponente). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.3. Određivanje električne provodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS)

Električna provodljivost i TDS su se određivali pomoću konduktometra (TDS/Conductivity/ $^{\circ}\text{C}$ meter with RS-232 CON 200 series, Oacton, Singapur) tako da se elektroda uređaja uronila u uzorak jogurta te se očitala ustaljena vrijednost. Nakon korištenja elektroda se ispere destiliranom vodom.

3.3.4. Određivanje viskoznosti

Mjerenje viskoznosti provedeno je na viskozimetru (Rheomat, RM180, Rheometric Scientific, München, Njemačka) koji se sastoji od cilindričnog vretena i vanjskog plašta u koji se stavi uzorak. Mjerenje viskoznosti provedeno je u području brzine smicanja od 100 do 1290 s^{-1} . Rezultati su izraženi u Pa s kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.5. Određivanje udjela ukupnih fenola

Priprema uzorka:

Za određivanje ukupnih fenola uzorak jogurta se mora pripremiti na način da se 20 g jogurta centrifugira (Hettich Zentrifugen, Rotina 380 R, Tuttlingen, Njemačka) na 5000 rpm, 4 °C, 10 min. Dobiveni supernatant se profiltrira i dobiveni filtrat se koristi za određivanje ukupnih fenola (Perna i sur., 2014).

Postupak određivanja:

Postupak određivanja udjela ukupnih fenola u uzorcima jogurta jednak je postupku određivanja udjela ukupnih fenola u ekstraktu lista masline (poglavlje 3.2.1.), gdje se umjesto ekstrakta lista masline dodaje prethodno pripremljen filtrat jogurta. Za određivanje udjela ukupnih fenola filtrat uzoraka jogurta nije bilo potrebno razrijediti.

Izrada baždarnog pravca:

Postupak izrade baždarnog pravca za određivanje ukupnih fenola u uzorcima jogurta jednak je postupku izrade baždarnog pravca za određivanje ukupnih fenola u ekstraktu lista masline (poglavlje 3.2.1.).

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE L⁻¹ filtrata kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet u jogurtu s ekstraktom lista masline određen je FRAP metodom. Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsopijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996). Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Hagerman i sur., 1998; Simic i Jovanovic, 1994). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Reakcija prijenosa elektrona odvija se relativno brzo, najčešće u trajanju 4-6 min, pa se njome može opisati antioksidacijski kapacitet onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo, dok za one spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna. Ova metoda je brza, jeftina i ne zahtijeva posebnu opremu, stoga

se uvelike primjenjuje u određivanju antioksidacijskog kapaciteta različitih namirnica. FRAP vrijednosti se najčešće izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Priprema uzorka:

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedeno je u prethodno pripremljenim filtratima uzoraka jogurta (poglavlje 3.3.5.).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete se redom otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL dobivenog supernatanta i 2080 prethodno pripremljenog FRAP reagensa, dobro se promiješa te termostatira 5 min pri $T=37\text{ }^\circ\text{C}$. Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm (VWR UV-1600PC, Radnor, SAD). Slijepa proba sadrži sve osim uzorka, umjesto kojega se dodaje destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake vodom. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom se nadopunjuju do oznake vodom. Koncentracije Troloxa u tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pri $T=37\text{ }^\circ\text{C}$. Apsoorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 593 nm. Antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$Y = 0,0014 \times X \quad (R^2=0,9995) \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbanacija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ filtrata kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Uz FRAP metodu, antioksidacijski kapacitet uzoraka jogurta određen je i DPPH metodom kako su opisali Tavakoli i sur. (2018). Ova metoda daje informaciju o reaktivnosti ispitivanog spoja sa stabilnim slobodnim radikalom. Zbog svog nesporenog elektrona DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm (Kazazić, 2014).

Priprema uzorka:

Uzorak jogurta potrebno je pripremiti za analizu tako da se 2,5 mL destilirane vode doda u 10 g jogurta kojemu je pH prethodno podešen na 4 dodatkom 1 M HCl. Jogurt je potom 10 min inkubiran pri $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zatim centrifugiran (Hettich Zentrifugen, Rotina 380 R, Tuttlingen, Njemačka) na 10 000 rpm kroz 10 min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni supernatant se izdvojio i pH mu je podešen na 7 dodatkom NaOH. Potom je ponovljen postupak centrifugiranja. Tako dobiveni supernatant je korišten za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.

Postupak određivanja:

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom se provodi tako da se u staklene epruvete doda 250 μL supernatanta u 3 mL etanolne otopine DPPH (60 mM) i dobro promiješa, čuva 5 min pri sobnoj temperaturi te odredi apsorbancija na 517 nm (VWR UV-1600PC, Radnor, SAD). Slijepa proba sadrži destiliranu vodu umjesto uzorka.

Antioksidacijski kapacitet izračunao se prema formuli:

$$\text{Antioksidacijski kapacitet} = ((A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{uzorak}}) / A_{\text{slijepa proba}}) \times 100 \quad [4]$$

Antioksidacijski kapacitet izražen je u % kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.3.8. Senzorsko ocjenjivanje

Senzorsko ocjenjivanje fermentiranog mlijeka provodilo se prema protokolu opisanom u Priručniku i prikazanom u tablicama 7 i 8 (Božanić i sur., 2010).

Tablica 7. Opisni parametri senzorskih svojstava (Božanić i sur., 2010)

Senzorsko svojstvo	F _v	Opisni parametar	Ocjena	Najviši broj bodova
Izgled	0,2	Homogeno, glatko, boja jednaka po cijeloj površini	5	1
		Zamjetne male neravnine i udubljenja, malo izdvajanje sirutke na površini, mala razlike u boji površine	3-4	
		Neravno, znatno izdojena sirutka, bitne razlike u boji na površini	1-2	
Boja	0,2	Jednolična po cijelom proizvodu, bijela do blago žućkasta	4-5	1
		Manja odstupanja u boji	3	
		Strana boja, ne karakteristična za jogurt, nejednolična	1-2	
Konzistencija	0,8	Homogene, viskozno, kompaktno, ujednačene strukture, bez grudica	5	4
		Male nehomogenosti, zamjetno odvajanje krute i tekuće faze ili male grudice	3-4	
		Odvajanje faza, grudičavost, nehomogenost	1-2	
Miris	0,4	Ugodno osvježavajući kiselkasti miris	4-5	2
		Slabo izražen okus po prekiselom	3	
		Proizvod neugodna mirisa, po prekiselom, strani miris	1-2	
Sinereza	0,4	Nema je ili je nezamjetna	4-5	2
		Slabo do umjereno izražena	2-3	
		Jako zamjetna	1	
Okus	2,0	Ugodno kiseo, osvježavajući, bez grudica i fine konzistencije u ustima	4-5	10
		Malo prekiselilo ili malo preslatkasto,	3	
		Jako kiseo ili ni malo kiseo, stranog okusa, nehomogen u ustima, ostavlja neugodan naknadni okus	1-2	

Tablica 8. Obrazac za senzorsko ocjenjivanje fermentiranog mlijeka (Božanić i sur., 2010)

Ime i prezime, datum ocjenjivanja:			
Datum postavljanja pokusa/r.br. uzorkovanja			
Svojstvo (ocjenjuje se ocjenama od 1 do 5)	K	L 1,5 %	L 3%
Izgled			
Boja			
Konzistencija			
Miris			
Sinereza			
Okus			
Komentari:			

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na sigurnost jogurta od kozjeg mlijeka primjenom HACCP načela.

Ekstrakt lista masline proizveden je primjenom ASE tehnike te je dodan u jogurt od kozjeg mlijeka u koncentracijama od 1,5 i 3 % (v/v). Nakon proizvodnje jogurta provedene su analize utjecaja dodatka ekstrakta na fizikalno-kemijska svojstva jogurta.

Također, ispitan je utjecaj dodatka ekstrakta na udio ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta dvjema metodama (FRAP i DPPH).

4.1. PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA

Tablica 9. Analiza rizika i utvrđivanje kritičnih kontrolnih točaka (CCP) pomoću stabla odlučivanja – Načelo 1 i 2

KORAK U PROIZVODNOM PROCESU	IDENTIFICIRANA OPASNOST	OPIS OPASNOSTI	STABLO ODLUKE				ZAKLJUČAK
			P1	P2	P3	P4	
PRIJEM MLJEKA	kemijska biološka	prisutnost antibiotika neodgovarajuća mikrobiološka kvaliteta – prevelik početni broj mikroorganizama, prisutnost eventualno patogenih mikroorganizama te njihovih spora	DA	DA			CCP
ZAGRIJAVANJE NA TEMPERATURU FERMENTACIJE	nije identificirana opasnost	/			/		nije CCP
DODATAK EKSTRAKTA LISTA MASLINE	kemijska	rezidue tvari korištenih za tretiranje biljke	DA	NE	DA	NE	CCP
INOKULACIJA	biološka	nedovoljno aktivna kultura uslijed isteka roka trajanja, kontaminacija nečistim priborom	NE	NE			nije CCP
INKUBACIJA	nije identificirana opasnost	/			/		
BRZO HLAĐENJE	biološka	rast spora zbog sporog hlađenja	NE	NE			nije CCP
SKLADIŠTENJE	biološka	porast broja mikroorganizama zbog neadekvatne (previsoke) temperature skladištenja	DA	NE	NE		nije CCP

Tablica 10. Numerička analiza rizika

CCP	KORAK U PROIZVODNOM PROCESU	IDENTIFICIRANA OPASNOST	VJEROJATNOST POJAVE	OZBILJNOST POSLJEDICA	UMNOŽAK	ZAKLJUČAK
					VJEROJATNOST POJAVE X OZBILJNOST POSLJEDICA	
1	PRIJEM MLJEKA	prisutnost antibiotika neodgovarajuća mikrobiološka kvaliteta – prevelik početni broj mikroorganizama, prisutnost eventualno patogenih mikroorganizama te njihovih spora	2	4/5	8/9	nije CCP
2	DODATAK EKSTRAKTA LISTA MASLINE	rezidue tvari korištenih za tretiranje biljke	5	4/5	20/25	CCP

Tablica 11. Utvrđene kritične granice – načelo 3

Korak u procesu proizvodnje	Vrsta opasnosti	Opis opasnosti	Zaštitne radnje	Kritične granice
Dodatak ekstrakta lista masline	kemijska	rezidue tvari korištenih za tretiranje biljke	inspekcijski pregledi te laboratorijske analize na kontrolu ostataka sredstava za zaštitu bilja	Maksimalni ostatak rezidua (MRO) sukladno važećoj zakonskoj regulativi (Uredba (EZ) 396/2005)

Tablica 12. Prijedlog sustava nadzora za utvrđenu CCP – načelo 4

Korak u procesu proizvodnje	Tko?	Što?	Kako?	Kada?	Gdje?
Dodatak ekstrakta lista masline	Voditelj proizvodne linije/proizvodnje	rezidue tvari za tretiranje biljaka	Pregled važećih izvješća laboratorijska analiza za šaržu ekstrakta koja se koristi u proizvodnji jogurta Poštivanje principa FI-FO (<i>First In - First Out</i>) i FE-FO (<i>First Expired-First Out</i>) Poštivanje ostalih parametara bitnih za održavanje kvalitete i sigurnosti ekstrakta (uvjeti čuvanja, poštvanje rokova potrošnje, itd)	Kod svakog zaprimanja pošiljke ekstrakta lista masline Kod otvaranja novih pakovina u proizvodnji	Prijem i skladištenje sirovina Proizvodnja jogurta

Tablica 13. Utvrđene korektivne akcije – načelo 5

KORAK U PROIZVODNOM PROCESU	KOREKTIVNE MJERE
DODATAK ESKTRAKTA LISTA MASLINE	<ul style="list-style-type: none"> • Ne zaprimanje šarže ekstrakta ukoliko nema važeći certifikat zdravstvene ispravnosti • Stavljanje u karantenu sumnjivih šarži proizvedenih jogurta i slanje na analize u ovlaštene laboratorije • Otpis i neškodljivo uklanjanje šarži jogurta s neodgovarajućim analitičkim izvješćem

Tablica 14. Uspostava postupka verifikacije – načelo 6

Utvrđena kritična kontrolna točka (CCP)	Predloženi postupak verifikacije	Učestalost	Nadležnost	Referentni dokumenti
DODATAK ESKTRAKTA LISTA MASLINE	Analize MRO ekstrakata i proizvedenih uzoraka jogurta od strane ovlaštenih laboratorija	2x godišnje	Voditelj proizvodnje	Analitička izvješća

Primjena HACCP načela započela je izradom dijagrama tijekom pokusne proizvodnje jogurta obogaćenog ekstraktom lista masline (slika 5), a nastavila se dalje primjenom načela 1 (tablica

9) odnosno analizom rizika pomoću stabla odlučivanja (slika 3) te su utvrđene dvije CCP: prijem mlijeka te dodatak ekstrakta lista masline. Kako bi se potvrdile te CCP primijenjena je i numerička analiza rizika (tablica 10) koja se temelji na vjerojatnosti pojave opasnosti te ozbiljnosti posljedica ako do opasnosti uistinu i dođe. Obzirom da je kozje mlijeko korišteno za proizvodnju jogurta nabavljeno iz maloprodaje te je prethodno UHT sterilizirano, vjerojatnost pojave opasnosti je veoma niska, malo je vjerojatno da će do opasnosti doći što znači da učestalost pojave opasnosti vrlo rijetko, poznato je da se može pojaviti. Vjerojatnost je karakterizirana kao niska obzirom da je početna sirovina koja se koristila već prošla čitav niz mjera nadzora kako bi se uopće mogla naći na tržištu. Množenjem vjerojatnosti pojave i ozbiljnosti posljedica ($2 \times 4/5$) došlo se do broja $8/9$ koji prema matriksu za procjenu rizika ne spada u CCP. Međutim, da je proizvodnja jogurta krenula od sirovog kozjeg mlijeka, taj korak (prijem mlijeka) bi svakako bio CCP. Druga CCP određena analizom rizika pokazala se i kao CCP nakon numeričke analize rizika te je za tu CCP potrebno provesti sve potrebne radnje (tablica 12 i tablica 13).

Korak dodatka ekstrakta lista masline podrazumijeva kemijsku opasnost zbog prisustva mogućih rezidua sredstava za zaštitu bilja (SZB). Iako se možda stablo masline nije tretiralo, SZB mogu i drugim putem kontaminirati biljku npr. zanošenjem do kojeg je došlo pri tretiranju susjednog usjeva i sl. Toleranca, odnosno maksimalna dopuštena količina (MRO) rezidua određena je prema propisima EU (tablica 11). Zbog skupih analiza rezidua SZB kontrolu namirnica provodi se redovitim inspekcijskim pregledima te putem nacionalnog sustava monitoringa. Planom monitoringa predviđen je broj uzoraka i vrsta namirnica koje se uzorkuju. Uzorkovanje provodi sanitarna inspekcija, a laboratorijsku analizu uzoraka obavlja ovlašteni akreditirani laboratorij (tablica 14).

Posljednjih desetak godina povećava se broj uzoraka, ali i svi sudionici prehrambenog lanca postaju svjesni sustava kontrole rezidua (Bažok i sur., 2014; Jurak i Sabljak, 2020).

4.2. FIZIKALNO – KEMIJSKE KARAKTERISTIKE JOGURTA OD KOZJEG MLJEKA SA EKSTRAKTOM LISTA MASLINE

Tablica 15. Titracijska kiselost, električna provodljivost i ukupne otopljene tvari (TDS)

Uzorak	K	L 1,5 %	L 3 %
<i>Titracijska kiselost (°SH)</i>	37,8	36,2	36,8
<i>El. provodljivost (mScm⁻¹)</i>	6,17	6,12	6,05
<i>TDS (g L⁻¹)</i>	3,06	3,08	3,01

Titracijska kiselost jogurta od kozjeg mlijeka kreće se od 36,2 °SH do 37,8 °SH (tablica 15) što odgovara vrijednostima dobivenim u istraživanju Božanić i sur. (2000). Pri tomu najvišu vrijednost ima kontrolni uzorak bez dodatka ekstrakta lista masline, dok najnižu vrijednost ima uzorak jogurta koji sadrži 1,5 % ekstrakta lista masline. Na titracijsku kiselost mogu utjecati netopljive tvari kao što su proteini, fosfati i citrati pa njihov puferski učinak može povećati titracijsku kiselost mliječnih proizvoda (Senel i sur., 2011). U skladu s time su vrijednosti izmjerene za ukupne otopljene tvari (tablica 15). Naime, najvišu izmjerenu vrijednost TDS (3,08 g L⁻¹) ima uzorak s 1,5 % dodanog ekstrakta, što posljedično rezultira najnižom titracijskom kiselosti ovog uzorka (36,2 °SH). S druge strane uzorci *K* i *L 3 %* imaju nešto niže TDS vrijednosti te više vrijednosti titracijske kiselosti. Dobiveni rezultati se podudaraju s onima navedenim u literaturi, odnosno titracijska kiselost postiže više vrijednosti u kontrolnim uzorcima nego u uzorcima kojima su dodani ekstrakti (Marand i sur., 2020; Karaaslan i sur., 2011).

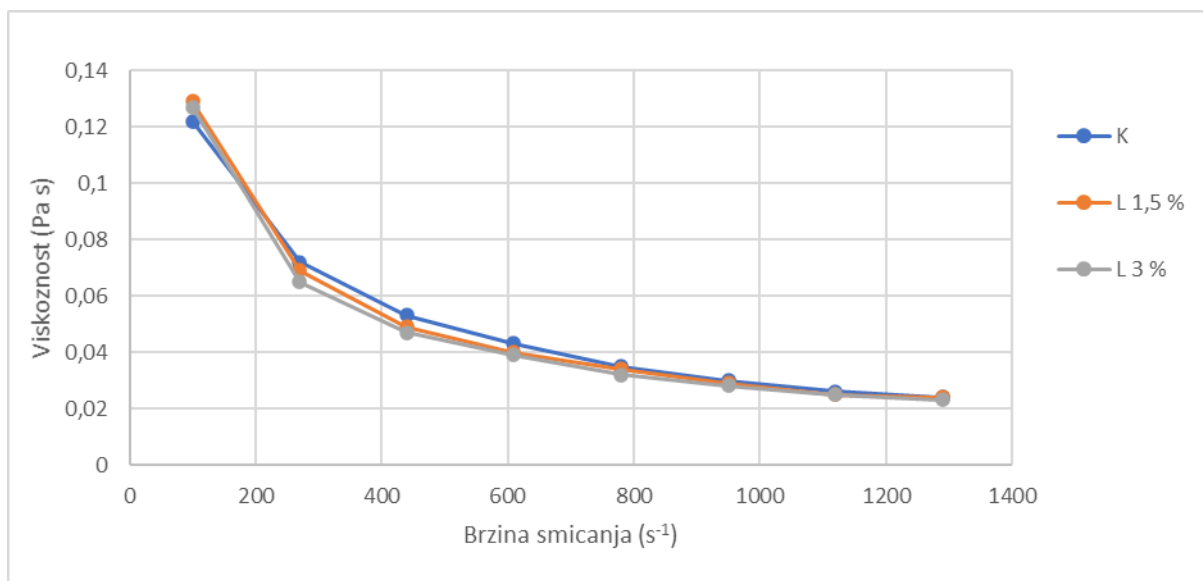
Međutim, nešto drugačiji trend pokazuje električna provodljivost koja se kreće od 6,05 mScm⁻¹ do 6,17 mScm⁻¹ (tablica 15) pri čemu najvišu vrijednost ima kontrolni uzorak, a najnižu uzorak *L 3 %*. Uzimajući u obzir prethodno navedene parametre, kao i činjenicu da električna provodljivost ovisi o količini iona te se mijenja ovisno o sastavu iona u uzorku (Norberg i sur., 2004), najviša vrijednost se očekivala kod uzorka *L 1,5%*.

Tablica 16. Boja

	<i>L*</i> vrijednost	<i>a*</i> vrijednost	<i>b*</i> vrijednost
<i>K</i>	17,62	1,65	27,61
<i>L 1,5 %</i>	15,73	3,6	25,24
<i>L 3 %</i>	14,81	5,58	24,09

*L** vrijednost predstavlja svjetlinu i kreće se od 0 do 100, pri čemu je *L*=0* potpuno crno, a *L*=100* potpuno bijelo. Vrijednost *a** predstavlja odnos zelene i crvene komponente, a *b** vrijednost odnos žute i plave komponente (Costa i sur., 2015).

Iz dobivenih rezultata određivanja parametara boje prikazanih u tablici 16 vidljivo je da je kontrolni uzorak najsvjetlije boje, odnosno svjetlina opada s višom koncentracijom dodanog ekstrakta. Zelene i crvene komponente su više prisutne u uzorcima s dodanim ekstraktima, nego u kontrolnom uzorku, a žute i plave imaju nešto više vrijednosti u kontrolnom uzorku nego u onima s dodanim ekstraktom lista masline. Rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja Marand i sur. (2020), gdje je isto vidljivo da dodaci u jogurtu smanjuju njegovu svjetlinu, odnosno dolazi do opadanja *L** vrijednosti s povećanjem koncentracije dodataka u jogurtu.



Slika 6. Viskoznost kozjeg jogurta bez (*K*) i s dodatkom ekstrakta lista masline (*L* 1,5 %, *L* 3 %)

Viskoznost je rezultat unutrašnjeg trenja molekula tj. otpora tekućine pri protjecanju. Ovisi o temperaturi te koncentraciji, fizičkom stanju i disperziji sastojaka suhe tvari, osobito proteina. Također, na viskoznost utječu i mineralne tvari. Bakterije mliječne kiseline tvore sluzave tvari – egzopolisaharide koji utječu na povećanje viskoznosti fermentiranih mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Iz dobivenih rezultata (slika 6) vidljivo je da su rezultati ispitivane viskoznosti u sva tri uzorka gotovo jednaki, kroz sva područja brzina smicanja, čime se može zaključiti da dodatak ekstrakta lista masline ne utječe na viskoznost jogurta od kozjeg mlijeka. Dobiveni rezultati odstupaju od literaturnih podataka gdje je navedeno da bi jogurti s dodanim ekstraktom trebali imati višu viskoznost koja ovisi o većem udjelu netopljivih tvari, proteinima te vrstama proteina kao i vezama između proteina i polifenolnih sastojaka (Zoidou i sur., 2017). Navedeni podaci odnose se na dulji period čuvanja jogurta, dok su uzorci ispitivani u ovom radu starosti 1 dan zbog čega vjerojatno postoje neusklađenosti u rezultatima.

4.3. UKUPNI FENOLI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Izvorni ekstrakt lista masline sadržavao je u prosjeku $727,14 \pm 6,06$ mg GAE L⁻¹ ukupnih fenola (rezultati nisu prikazani). Fenolni spojevi se ubrajaju u specifične pigmente i sekundarni su biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljaka u značajnim količinama, a do danas je poznato više od 8 000 različitih struktura. Sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima tijekom zrenja i dozrijevanja, a u samim biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno i kao foto receptori. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu parametri okoliša

kao što su svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Dais i Hatzakis, 2015).

Prema istraživanju Cruza i sur. (2017) udio ukupnih fenola u ekstraktu lista masline ovisi o primijenjenoj metodi ekstrakcije te korištenim otapalima. Xynos i sur. (2012) su istraživali utjecaj različitih otapala na ekstrakciju oleuropeina iz lista masline primjenom ASE tehnike. Obzirom da je oleuropein jedan od najzastupljenijih fenola u listu masline može se usporediti učinkovitost korištenja vode kao otapala. Njihovo istraživanje je pokazalo da se korištenjem etanola dobivaju najviše vrijednosti oleuropeina, ali je i upotreba vode kao ekstrakcijskog otapala dala obećavajuće rezultate.

Tablica 17. Ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet proizvedenih uzoraka kozjeg jogurta

	<i>K</i>	<i>L 1,5 %</i>	<i>L 3 %</i>
<i>UF</i> (<i>mg GAE L⁻¹</i>)	140,57 ± 0,40	150,29 ± 2,02	163,00 ± 10,71
<i>Antioksidacijski</i> <i>kapacitet FRAP</i> (<i>μmol TE L⁻¹</i>)	610,00 ± 2,02	670,00 ± 18,18	736,79 ± 2,53
<i>Antioksidacijski</i> <i>kapacitet DPPH</i> (%)	13,30 ± 0,31	18,76 ± 0,62	11,07 ± 0,39

Udio ukupnih fenola raste s porastom koncentracije ekstrakta u uzorcima jogurta, odnosno u kontrolnom uzorku udio ukupnih fenola je najniži dok je u uzorku s 3 % ekstrakta lista masline udio ukupnih fenola najviši (tablica 17).

Takav porast je u skladu s literaturom gdje se navodi da je udio ukupnih fenola viši u uzorcima gdje su dodani ekstrakti nego u kontrolnim uzorcima. Osim ukupnih fenola, trend porasta vidljiv je i u rezultatima određenog FRAP antioksidacijskog kapaciteta (tablica 17) što se također podudara s literaturom, odnosno provedenim istraživanjima (Granato i sur., 2018; Senadeera i sur., 2018).

Međutim, može se uočiti da trend vrijednosti DPPH antioksidacijskog kapaciteta analiziranih uzoraka nije dosljedan prethodno navedenom trendu udjela ukupnih fenola i FRAP antioksidacijskog kapaciteta (tablica 17) te odstupa od rezultata u literaturi gdje je navedeno da

antioksidacijski kapacitet ima više postotke u uzorcima kojima je dodan biljni ekstrakt (Granato i sur., 2018; Nguyen i Hwang, 2016).

4.4. SENZORSKO OCJENJIVANJE UZORAKA JOGURTA

Tablica 18. Prosječan broj ponderiranih bodova postignutih pri senzorskoj analizi uzoraka jogurta od kozjeg mlijeka

<i>Svojstvo</i>	<i>K</i>	<i>L 1,5 %</i>	<i>L 3%</i>
<i>Izgled (max 1)</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,96 ± 0,09
<i>Boja (max 1)</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>Konzistencija (max 4)</i>	3,50 ± 0,42	3,66 ± 0,42	3,50 ± 0,42
<i>Miris (max 2)</i>	1,92 ± 0,18	1,68 ± 0,44	1,84 ± 0,22
<i>Sinereza (max 2)</i>	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,92 ± 0,18
<i>Okus (max 10)</i>	9,20 ± 1,10	9,20 ± 1,78	9,20 ± 1,10
<i>Ukupni bodovi (max 20)</i>	18,62	18,54	18,42

Dodatni komentari su bili vezani za konzistenciju sva 3 uzorka koji su opisani kao „ljigavi“ i „sluzavi“ te za okus uzorka *L 3 %* koji je opisan kao najkiseliji od sva 3 uzorka.

Na temelju prosječnih bodova postignutih pri senzorskoj analizi (tablica 18) vidljivo je da je kontrolni uzorak postigao najviši broj ponderiranih bodova te je postigao najviši broj bodova u svim parametrima osim konzistencije. Uzorak *L 1,5 %* ga slijedi prema broju ukupnih bodova te je postigao najviši broj bodova u parametru konzistencije, ali najniži broj bodova u parametru mirisa. Uzorak *L 3 %* ima najniže postignute bodove od sva 3 uzorka, ali je po parametru mirisa postigao viši broj bodova od uzorka *L 1,5 %*.

Prema dobivenim rezultatima ispitivanja vidljivo je da dodatak ekstrakta ima gotovo neprimjetan utjecaj na senzorska svojstva i kao takav bi mogao biti prihvaćen od potrošača.

Literatura navodi da ekstrakt lista masline može dodati gorčinu i oštar naknadni okus jogurtu zbog interakcija fenola i proteina ili oksidacije te da se primjećuje svijetlo-zelena boja takvog jogurta što u provedenoj senzorskoj analizi nije slučaj obzirom da su uzorci s i bez ekstrakta dobili iste ocjene za parametar okusa i boje (Zoidou i sur., 2017; Zoidou i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem primjene HACCP načela te dobivenih rezultata fizikalno-kemijskih, reoloških i senzorskih analiza kao i analiza udjela ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom HACCP načela dodatak ekstrakta lista masline u jogurt od kozjeg mlijeka karakteriziran je kao kritična kontrolna točka u proizvodnji jogurta zbog kemijske opasnosti koju bi mogao predstavljati. Primjenom načela određene su zaštitne radnje, kritične granice, sustav nadzora, korektivne akcije te postupak verifikacije.
2. Dodatak ekstrakta lista masline u jogurt smanjuje titracijsku kiselost pri čemu najniže vrijednosti postiže uzorak L 1,5 % što je u skladu s najvišim vrijednostima izmjerenih ukupnih otopljenih tvari u istom uzorku. Također, u istom uzorku se očekivala i najviša vrijednost električne provodljivosti koja je ipak postignuta u kontrolnom uzorku.
3. Analiza boje na uzorcima pokazala je da najveću svjetlinu ima kontrolni uzorak, odnosno da se svjetlina smanjuje s povećanjem koncentracije dodanog ekstrakta lista masline.
4. Viskoznost kontrolnog uzorka te uzorka s dodanim ekstraktom je gotovo jednaka, odnosno dodatak ekstrakta lista masline u jogurt od kozjeg mlijeka nema utjecaj na njegovu viskoznost.
5. Udio ukupnih fenola se povećava s porastom koncentracije dodanog ekstrakta čime se može zaključiti da dodatak ekstrakta lista masline ima pozitivan utjecaj na ukupan porast polifenolnih sastojaka u jogurtu od kozjeg mlijeka.
6. Rezultati analize antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom također pokazuju porast vrijednosti s povećanjem koncentracije dodanog ekstrakta lista masline, dok su rezultati antioksidacijskog kapaciteta određeni DPPH metodom pokazali određena odstupanja. Takav rezultat može biti posljedica utjecaja drugih sastojaka mlijeka koji imaju antioksidativnu aktivnost.
7. Senzorskom analizom utvrđeno je da su svi uzorci jogurta približno jednako ocijenjeni, odnosno svi su postigli vrlo sličan ukupan broj bodova ($K = 18,62$; L 1,5% = 18,54; L 3 % = 18,42) što ukazuje da bi jogurti s dodatkom ekstrakta lista masline mogli biti dobro prihvaćeni na tržištu, posebno kao funkcionalna hrana.

6. LITERATURA

- Amigo, L., Fontecha, J. (2011) Milk | Goat Milk. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2. izd. (Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H.), Academic Press, San Diego, str. 484-493.
- Antunac, N., Samaržija, D. (2000) Proizvodnja, sastav i osobine kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **50**, 53-66.
- Bažok, R., Đugum, J., Grbeša, D., Hadžiosmanović, M., Havranek, J., Ivanković, A., Jakopović, I., Orešković, S., Rupiće, V., Samaržija, D., Tudor Kalit, M. (2014) Sigurnost hrane – od polja do stola, M.E.P. d.o.o., Zagreb.
- Benzie, I. F. F. (1996) An automated, specific, spectrofotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **29**, 111-116.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bertolatti, D., Theobald, C. (2019) Food Safety and Risk Analysis. U: *Encyclopedia of Environmental Health*, 2. izd. (Nriagu, J.), Elsevier, Amsterdam, str. 57-67.
- Božanić, R., Bilušić, T., Jelić, I. (2010) Analize mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.
- Božanić, R., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I. (2018) Vrste mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Božanić, R., Tratnik, Lj., Drgalić, I. (2002) Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* **52**, 207-237.
- Božanić, R., Tratnik, Lj., Marić, O. (2000) Senzorska svojstva i prihvatljivost jogurta i aromatiziranog jogurta proizvedenog od kozjeg i kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **50**, 199-208.
- Cavaca, L. A. S., Lopez-Coca, I. M., Silvero, G., Afonso, C. A. M. (2020) The olive-tree leaves as a source of high-added value molecules: Oleuropein. U: *Bioactive Natural Products* (Atta-Ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, str. 131-180.

- 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.
- Cruz, R. M. S., Brito, R., Smirniotis, P., Nikolaidou, Z., Vieira, M. C. (2017) Extraction of Bioactive Compounds From Olive Leaves Using Emerging Technologies. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* (Grumezescu, A. M., Holban, A. M.), Academic Press, London, str. 441-461.
- Dais, P., Hatzakis, E. (2015) Analysis of Bioactive Microconstituents in Olives, Olive Oil and Olive Leaves by NMR Spectroscopy: An Overview of the Last Decade. U: *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* (Boskou, D.), AOCS Press, Urbana, str. 299-332.
- Državni zavod za statistiku (2020) Publikacije prema statističkim područjima: Proizvodnja mlijeka i mliječnih proizvoda, Zagreb < <https://www.dzs.hr/> >. Pristupljeno 27. kolovoza 2020.
- FAO (2018) FAOSTAT, Food and agriculture data, FAO – Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rim < <http://www.fao.org/faostat/en> >. Pristupljeno 10. lipnja 2020.
- FAO (2011) *General Principles of Food Hygiene, CAC/RCP 1-1969*, FAO – Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rim.
- Filipčev, B. (2020) The effects of aromatic plants and their extracts in food products. U: *Feed Additives* (Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I.), Academic Press, London, str. 279-294.
- Giannenas, I., Sidiropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E., Florou-Paneri, P. (2020) The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. U: *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health* (Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I.), Academic Press, London, str. 1-18.
- Granato, D., Santos, J. S., Salem, R. D. S., Mortazavian, A. M., Rocha, R. S., Cruz, A. G. (2018) Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* **19**, 1-7.

- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Reichel, T. L. (1998) High molecular weight plant phenolics (Tannins) as biological antioxidants. *J. agric. Food Chem.* **46**, 1887-1892.
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
- Jeličić, I., Božanić, R., Krčmar, N. (2009) Primjena HACCP sustava u proizvodnji UHT steriliziranog mlijeka. *Mljekarstvo* **59**, 155-175.
- Jensen, R. G. (1995) Handbook of Milk Composition. Academic Press, San Diego.
- Jurak, G., Sabljak, I. (2020) Što o proizvodima biljnog podrijetla na hrvatskom tržištu govore analize ostataka pesticida? *Glasilo biljne zaštite* **20**, 333-339.
- Kailis, S. G. (2017) Olives. U: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2. izd. (Thomas, B., Murray, B. G., Murphy, D. J.), Academic Press, Oxford, str. 236-245.
- Kalyankar, S. D., Khedkar, C. D., Patil, A. M. (2016) Goat: Milk. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B, Finglas, P. M., Toldra, F.), Academic Press, Oxford, str. 256-260.
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., Turkoglu, H. (2011) Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 1065-1072.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada i Toksiko* **55**, 279-290.
- Manning, L., Soon, J. M. (2013) Mechanisms for assessing food safety risk. *Brit. Food J.* **115**, 460-484.
- Marand, M. A., Amjadi, S., Marand, M. A., Roufegarinejad, L., Jafari, S. M. (2020) Fortification of yogurt with flaxseed powder and evaluation of its fatty acid profile, physicochemical, antioxidant, and sensory properties. *Powder Technol.* **359**, 76-84.
- Moatsou, G., Park, Y. W. (2017) Goat Milk Products: Types of Products, Manufacturing Technology, Chemical Composition, and Marketing. U: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, 2. izd. (Park, Y. W., Haenlein, G. F. W., Wendorff, W. L.), Wiley Blackwell, Hoboken, str. 84-150.

- Nguyen, L., Hwang, E.-S. (2016) Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Yogurt Supplemented with Aronia (*Aronia melanocarpa*) Juice. *Prev. Nutr. Food Sci.* **21**, 330-337.
- Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I. R., Friggens, N. C., Sloth, K. H. M. N., Løvendahl, P. (2004) Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* **87**, 1099–1107.
- Park, Y. W. (2017) Goat Milk – Chemistry and Nutrition. U: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, 2. izd. (Park, Y. W., Haenlein, G. F. W., Wendorff, W. L.), Wiley Blackwell, Hoboken, str. 42-83.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. (2014) Antioxidant activity of yogurt made from milk characterized by different casein haplotypes and fortified with chestnut and sulla honeys. *J. Dairy Sci.* **97**, 6662-6670.
- Pietta P. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.
- Pravilnik o pravilima uspostave sustava i postupaka temeljenih na načelima HACCP sustava (2015) *Narodne novine* **68**, Zagreb.
- Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2017) *Narodne novine* **27**, Zagreb.
- Raina, B. L. (2003) Olives. U: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. izd. (Trugo, L., Finglas, P. M.), Academic Press, San Diego, str. 4260-4267.
- Rodino, S., Butu, M. (2019) Herbal Extracts – New Trend sin Functional and Medicinal Beverages. U: *Natural Beverages* (Grumezescu, A. M., Holban, A. M.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 73-108.
- Samaržija, D. (2015) Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Senadeera, S. S., Prasanna, P. H. P., Jayawardana, N. W. I. A., Gunasekara, D. C. S., Senadeera, P., Chandrasekara, A. (2018) Antioxidant, physicochemical, microbiological, and sensory properties of probiotic yoghurt incorporated with various *Annona* species pulp. *Heliyon* **4**, 1-18.
- Senel, E., Atamer, M., Gürsoy, A., Öztekin, F. S. (2011) Changes in some properties of strained (Süzme) goat's yoghurt during storage. *Small Ruminant Res.* **99**, 171-177.

Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Simic, M. G., Jovanovic, S. V. (1994) Inactivation of Oxygen Radicals by Dietary Phenolic Compounds in Anticarcinogenesis. U: *Food Phytochemicals for Cancer Prevention* (Ho, C.-T., Osawa, T., Huang, M.-T., Rosen, R. T.), American Chemical Society, Washington, D.C., str. 20-32.

Skaltsounis, A.-L., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Xynos, N. (2015) Recovery of High Added Value Compounds from Olive Tree Products and Olive Processing Byproducts. U: *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* (Boskou, D.), AOCS Press, Urbana, str. 333-356.

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gomez-Caravaca, A. M., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.* **77**, 92-108.

Talhaoui, N., Vezza, T., Gomez-Caravaca, A. M., Fernandez-Gutierrez, A., Galvez, J., Segura-Carretero, A. (2016) Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. *J. Funct. Foods* **22**, 270-277.

Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M., Katouzian, I. (2018) Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Yogurt Enriched by Olive Leaf Phenolics within Nanoliposomes. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 9231-9240.

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

Tsimidou, M. Z., Papoti, V. T. (2010) Bioactive Ingredients in Olive Leaves. U: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (Preedy, V. R., Watson, R. R.), Academic Press, London, str. 349-356.

Turkmen, N. (2017) The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. U: *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (Watson, R. R., Collier, R. J., Preedy, V. R.), Academic Press, London, str: 441-449.

UREDBA (EZ) br. 396/2005 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla (2005) *Službeni listu Europske unije*, Strasbourg.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.-L. (2012) Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *J. of Supercrit. Fluids* **67**, 89-93.

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013) *Narodne novine* **81**, Zagreb.

Zoidou, E., Magiatis, P., Melliou, E., Constantinou, M., Haroutounian, S., Skaltsounis, A.-L. (2014) Oleuropein as a bioactive constituent added in milk and yogurt. *Food Chem.* **158**, 319-324.

Zoidou, E., Melliou, E., Moatsou, G., Magiatis, P. (2017) Preparation of Functional Yogurt Enriched With Olive-Derived Products. U: *Yogurt in Health and Disease Prevention* (Shah, N. P.), Academic Press, London, str. 203-220.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Iva Devčić

Iva Devčić