

Utjecaj ekstrakta moringe (Moringa oleifera) na fermentaciju kozjeg mlijeka

Roksandić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:757864>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Roksandić

0066264403

**UTJECAJ EKSTRAKTA MORINGE (*MORINGA*
OLEIFERA) NA FERMENTACIJU KOZJEG MLIJEKA**
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

Mentor: doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj ekstrakta moringe (*Moringa oleifera*) na fermentaciju kozjeg mlijeka

Petra Roksandić, 0066264403

Sažetak:

Funkcionalni proizvodi sve su više zastupljeni u ljudskoj prehrani zbog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. U današnje vrijeme sve su zastupljenija istraživanja o mogućnosti proizvodnje fermentiranih mliječnih napitaka s dodatkom biljnih ekstrakata. *Moringa oleifera* je biljka iz koje se dobiva nutritivno iznimno bogat ekstrakt s vitaminima, mineralnim tvarima, polifenolima i antioksidansima, pa je kao takva pogodna za obogaćivanje mliječnih proizvoda. Cilj ovog završnog rada bio je proizvesti jogurt s dodatkom ekstrakta moringe i utvrditi kako dodatak ekstrakta utječe na fermentaciju kozjeg mlijeka. Tijekom procesa fermentacije provedene su mikrobiološke i fizikalno-kemijske analize. Rezultat istraživanja ukazuje da dodatak ekstrakta moringe u kozje mlijeko skraćuje vrijeme fermentacije, odnosno pozitivno utječe na rast i razvoj bakterija jogurtne kulture (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*).

Ključne riječi: kozje mlijeko, fermentacija, *Moringa oleifera*, mikrobiološka analiza

Rad sadrži: 36 stranica, 11 slika, 10 tablica, 23 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

Pomoć pri izradi: Željka Mirković, teh. sur.

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of food Engineering
Laboratory for Milk and Dairy Products Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Influence of moringa extract (*Moringa oleifera*) on goat milk fermentation

Petra Roksandić, 0066264403

Abstract:

Functional products are increasingly present in the human diet due to their positive impact on human health. Nowadays, research on the possibility of producing fermented milk drinks with the addition of plant extracts is becoming more common. *Moringa oleifera* is a plant from which an extremely rich nutrient extract with vitamins, minerals, polyphenols and antioxidants is obtained, so as such it is suitable for enriching dairy products. The aim of this final work was to produce yogurt with the addition of moringa extract and to determine how the addition of the extract affects the fermentation of goat's milk. Microbiological and physicochemical analyzes were performed during the fermentation process. The result of the research indicates that the addition of moringa extract to goat's milk shortens the fermentation time, ie has a positive effect on the growth and development of yogurt culture bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*).

Keywords: cow milk, fermentation, *Moringa oleifera*, microbiological analysis

Thesis contains: 36 pages, 11 figures, 10 tables, 23 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD., Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor

Technical support and assistance: Željka Mirković, technician

Thesis defended: June 29, 2022.

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORETSKI DIO.....	2
2.1 KOZJE MLJEKO	2
2.1.2. Sastav kozjeg mlijeka.....	3
2.1.3 Zdravstvena vrijednost kozjeg mlijeka	6
2.2 FERMENTIRANI MLIJEČNI PROIZVOD	6
2.2.1 Proizvodnja jogurta	7
2.3 <i>MORINGA OLEIFERA</i>	10
2.3.1 Nutritivna svojstva i zdravstvena vrijednost moringe.....	12
2.3.2. Dosadašnja dostignuća u mljekarskoj industriji primjenom dodatka moringe	14
3.EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Priprema mlijeka za fermentaciju	20
3.2.2. Priprema ekstrakta moringe	20
3.2.3. Proizvodnja jogurta.....	21
3.2.4. Određivanje kiselosti mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda.....	22
3.2.4.1. Određivanje kiselosti mlijeka pH-metrom	23
3.2.4.2. Titracijska kiselost	23
3.2.5. Mikrobiološka analiza mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda	24
3.2.6. Obrada rezultata	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1 Aktivna i titracijska kiselost mlijeka i jogurta	28
4.2. Mikrobiološka svojstva mlijeka i jogurta.....	30
5.ZAKLJUČCI.....	32
6.LITERATURA	33

1.UVOD

Mlijeko se smatra najkompletnijom prirodnom tekućinom i već je stoljećima neizostavna namirnica ljudske prehrane. Zbog svojih brojnih nutritivnih sastojaka blagotvorno utječe na ljudsko fizičko i psihičko stanje. U svijetu se najviše konzumira kravlje mlijeko, no u zadnje vrijeme sve je više dokaza o netolerantnosti na isto, pa potrošači pronalaze alternativu u drugim vrstama mlijeka kao što su kozje, bivolje, kobilje i magareće ili biljni napitci. Najveći porast primjene kozjeg mlijeka bilježi se u posljednjih 20 godina. Kozje mlijeko bogat je izvor svih hranjivih sastojaka, a zbog drugačijeg sastava mliječne masti i proteina probavljivije je od kravljeg. Vrlo je bogato vitaminima, mineralnim tvarima, veći je udio proteina sirutke, sadrži aminokiselinu taurin, te je iznimno hranjivo. Koristi se kao lijek za regulaciju kolesterola u krvi, zaštite od kardiovaskularnih bolesti, smanjenje krvnog tlaka, suzbijanje bronhitisa i astme, bolesti žuči i žučnog kamenca, te smanjenje rizika od dijabetesa tipa 2 (Tratnik i Božanić, 2012).

Ljudi su već tisućama godina upoznati s dobrobitima ove hranjive tekućine, pa ni ne čudi da od davnina pokušavaju pronaći načine kako dobiti razne proizvode upravo od mlijeka. Pa tako uz proizvodnju sira, maslaca i sladoleda na tržištu je velika ponuda fermentiranih mliječnih napitaka (FMP). FMP koji nastaju pomoću bakterija mliječne kiseline karakterizira bolja probavljivost te veća količina vitamina, mineralnih tvari, esencijalnih aminokiselina, a sve to rezultira i većom prehrambenom vrijednošću. Kako potraga čovjeka za nutritivno boljim proizvodima nikada ne prestaje, tako su sve više zastupljeni i funkcionalni proizvodi, odnosno namirnice obogaćene nutrijentima koji pozitivno utječu na zdravlje. U takve proizvode dodaju se vitamini, mineralne tvari, probiotici te biljni ekstrakti. Biljni ekstrakti svojim bogatim polifenolnim sastavom pozitivno utječu na sam proces proizvodnje i na krajnji nutritivni sastav proizvoda. *Moringa oleifera* je jedna od biljaka koja je vrlo pogodna kao dodatak takvim funkcionalnih proizvodima zbog svog kemijskog sastava. Svi dijelovi biljke mogu se iskoristiti, a najhranjiviji su listovi, te se od njih dobiva ekstrakt koji se kasnije dodaje prilikom proizvodnje određenih proizvoda.

Cilj ovog završnog rada je bio proizvesti jogurt od kozjeg mlijeka s dodatkom ekstrakta lista moringe, odnosno pratiti i usporediti razlike u mikrobiološkoj analizi, pH vrijednosti i titracijskoj kiselosti (SH°) između uzoraka s različitim udjelima dodanog ekstrakta moringe u usporedbi s kontrolnim uzorkom bez dodataka.

2. TEORETSKI DIO

2.1 KOZJE MLIJEKO

“Sirovo mlijeko jest prirodni sekret mliječne žlijezde, dobiveno redovnom i neprekidnom mužnjom jedne ili više zdravih muznih životinja, pravilno hranjenih i držanih, kojem nije ništa dodano niti oduzeto i nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C.

Sirovo mlijeko mora potjecati od muznih životinja kod kojih je do poroda najmanje 30 dana, ili je od poroda prošlo više od osam dana.

Sirovo mlijeko se zavisno od vrste muznih životinja od kojih je dobiveno razvrstava kao kravlje ovčje i kozje (Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka, NN 102/2000).“

Mlijeko nastaje u mliječnim žlijezdama sisavaca, a primarna uloga njegovog stvaranja je prehrana mladunaca. Tijekom složenih biokemijskih procesa unutar mliječne žlijezde dolazi do biosinteze određenih sastojaka mlijeka, a spojevi koji nastaju se biosintetiziraju od sastojaka koji potječu iz krvi, pa tako od glukoze, pomoću biosinteze u mlijeku nastaje mliječni šećer odnosno laktoza, od glicerida nastaje mliječna mast, a od aminokiselina nastaju proteini mlijeka (kazein, α -laktalbumini i β -laktoglobulini). Ostali sastojci koje nalazimo u mlijeku kao što su: mineralne tvari, vitamini, enzimi, te ostali proteini (albumini krvnog seruma i imunoglobulini) u mlijeko difundiraju direktno iz krvi (Tratnik i Božanić, 2012).

Sastav kozjeg mlijeka, kao i ostalih vrsta mlijeka je promjenjiv, a ovisi o čimbenicima kao što su: pasmina i zdravstveno stanje životinje, dužini, redosljedu i stadiju laktacije, načinu i vrsti hranidbe, individualnim karakteristikama same životinje (ponajviše tjelesnoj masi), te o mužnji (vrsta, dobi, broju).

Iako je u svijetu kao konzumno mlijeko najzastupljenije kravlje mlijeko, sve se više ističu prednosti kozjeg mlijeka. Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 136/2020) kozje mlijeko mora sadržavati najmanje 2,5 % mliječne masti (iako je to najvarijabilniji sastojak mlijeka, te može biti 2,0-6 %), 2,5 % proteina, 7,5 % suhe tvari bez masti, dok kiselinjski stupanj mora biti između 6,5 do 8,0 stupnjeva po Soxhlet-Henkelu (°SH), a pH vrijednost od 6,4 do 6,7

jedinica. Voda se u mlijeku nalazi uglavnom kao slobodna, a može biti od 86-89 % (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.2. Sastav kozjeg mlijeka

Mliječna mast

Mliječna mast, kako je već spomenuto je najpromjenjiviji sastojak mlijeka, a izravno utječe na okus i aromu, konzistenciju i teksturu gotovih proizvoda. Mliječna mast ima utjecaja i na boju mlijeka ovisno o količini β -karotena. Mliječna mast je kompleks različitih lipidnih tvari koja se nalazu i obliku globula, a najvećim djelom je građena od triacilglicerola (97-98 %). Drugi sastojci mliječne masti kao što su: sastojci arome (aldehidi i ketoni), vitamini, mineralne tvari koje potječu od enzima i proteina, te proteini iz plazme mlijeka koje se apsorbiraju na površinu membrane mliječne masti, važni su pri određivanju senzorskih i nutritivnih karakteristika. Kozje mlijeko je do 2,5 puta probavljivije od kravljeg mlijeka, a tome velikim dijelom doprinosi upravo sastav i građa mliječne masti. Globule m.m. kozjeg mlijeka su manjeg promjera, te su u većem broju nego globule kravljeg mlijeka, a sadrže i manju količinu kolesterola koji može uzrokovati aterosklerozu. Globule se sastoje od većeg udjela kratko lančanih, srednje lančanih, te slobodnih masnih kiselina kao što su kapronska, kaprilna i kaprinska što utječe na karakterističan okus i miris (Tratnik i Božanić, 2012).

Proteini

Ukupne dušične tvari u mlijeku dijele se na proteine oko 95 %, te neproteinske dušične tvari oko 5 %. Glavni proteini mlijeka su kazein (80 %) i proteini sirutke (20 %). Kazein je građen u obliku micela koje su građene od frakcija (α , β , γ , κ) koje oblikuju koloidne čestice. Frakcije kazeina polimeriziraju, te zbog Ca^{2+} nastaju submicelle koje se povezuju preko Ca-fosfata koji gradi mostove između fosfoserinskih α i β frakcija. U unutrašnjosti micela nalazi se najviše β -kazeina, a na površini α -kazeina, koji sadrži negativan naboj te omogućava povezivanje submicela u micelle. U kozjem mlijeku se nalazi puno manje α -kazeina, a to rezultira manjim promjerom micela (omjer α -kazein : β -kazein : κ -kazein u kozjem mlijeku je 25 : 55 : 20 %, a u kravljem 49 : 38 : 13 %) (Tratnik i Božanić, 2012).

Kozje mlijeko sadrži nešto više proteina sirutke (albumina i globulina) i neproteinskog dušika, što rezultira većom biološkom vrijednošću. Također, kozje mlijeko sadrži nešto veću količinu slobodnih aminokiselina, te veći udio esencijalnih aminokiselina. Od slobodnih aminokiselina u najvećoj koncentraciji se nalazi taurin koji je nužan za rast i razvoj mozga dojenčadi i djece, a od esencijalnih aminokiselina najviše su zastupljene leucin i lizin, dok valina i leucina ima više nego u kravljem mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012).

Laktoza

Glavni i jedini ugljikohidrat koji se pronalazi u svim vrstama mlijeka, pa tako i u kozjem mlijeku je laktoza. Laktoza je šećer disaharid sastavljen od glukoze i galaktoze, a dio laktoze u mlijeku najmanje je promjenjiva vrijednost (Joha, 2016).

Vitamini i mineralne tvari

Mlijeko je također izvor vitamina topljivih u mastima, te vitamina B kompleksa. Nažalost količina vitamina u mlijeku nije dovoljna da bi zadovoljila dnevne potrebe našeg organizma za istima, uz iznimku vitamina A, B2 i B12 (Dorić i sur.).

Kozje mlijeko sadrži više vitamina A nego karotenoida, te je zbog toga specifične bijele boje. Sadržaj vitamina u kozjem mlijeku vrlo je slično onome u humanom mlijeku. U usporedbi s kravljim mlijekom, kozje mlijeko sadrži više vitamina D, C, te nikotinske kiseline, a 7-8 puta manje folne kiseline (Tratnik i Božanić, 2012).

Mineralne tvari koje pronalazimo u mlijeku nalaze se u tragovima, a najvažnije su kalcij, magnezij, kalij, magnezij, željezo, te fosfor, a svi oni su zastupljeniji u kozjem mlijeku u usporedbi s kravljim. S obzirom da kozje mlijeko ima više imunoglobulina i antimikrobnih tvari možemo reći da ima bolje izražena bakteriocidna i imunološka svojstva od kravljeg mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012).

Tablicom 1 prikazana je usporedba određenih vitamina i mineralnih tvari u kozjem i kravljem mlijeku.

Tablica 1. Usporedba udjela određenih vitamina i mineralnih tvari kozjeg i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2002)

Nutrijent	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
Kalcij (mg/L)	1304	1200
Fosfor (mg/L)	1080	950
Magnezij (mg/L)	136	130
Kalij (mg/L)	1996	1500
Vitamin A (retinol) (mg/100g)	0,040	0,035
Katoren) (mg/100g)	0,0	0,021
Vitamin D (kalciferol)) (mg/100g)	0,06	0,08
Vitamin B1 (tiamin) (mg/100g)	0,05	0,04
Vitamin B3 (niacin)) (mg/100g)	0,27	0,09

Tablicom 2 je prikazana usporedba kemijskog sastava i energetske vrijednosti kozjeg i kravljeg mlijeka.

Tablica 2. Usporedba kemijskog sastava i energetske vrijednosti kozjeg i kravljeg mlijeka (Božanić i sur., 2018)

Nutrijent	Kozje mlijeko	Kravlje mlijeko
Energijska vrijednost (kJ/100 mL)	293,10	288,90
Suha tvar (%)	11,94	12,89
Mliječna mast (%)	3,60	4,10
Proteini (%)	3,10	3,38
Laktoza (%)	4,60	4,60
Pepeo (%)	0,77	0,79
Slobodne masne kiseline (mg/L)	8,10	7,50
Kolesterol (mg/100 g)	10,0	13,0

2.1.3 Zdravstvena vrijednost kozjeg mlijeka

Kozje mlijeko se od ostalih vrsti mlijeka razlikuje u nekoliko karakteristika: bolja probavljivost, viši puferski kapacitet, terapijska i hranjiva vrijednost. Veći puferski kapacitet pripisan je visokom udjelu proteina, neproteinskog dušika i kazeina, te različitom rasporedu fosfata. Puferski kapacitet pokazuje koliko je potrebno dodati jake kiseline ili lužine u 1 dm³ da se pH-vrijednost promijeni za jednu jedincu. Tijekom probave hrane dolazi do promjene pH vrijednosti unutar organizma, a što je puferski kapacitet viši, veći je balans održavanja optimalne vrijednosti koja je potrebna za aktivnost probavnih enzima (Tratnik i Božanić, 2012). Zbog upravo te karakteristike kozje mlijeko idealna je namirnica za liječenje čira na želudcu odnosno pomaže kod problema s viškom kiseline (Haenlein, 2004).

Bolja probavljivost mlijeka rezultat je većeg udjela masnih globula i manjeg promjera kazeinskih micela, a bolje apsorpcija pojedinih sastojaka pripisana je boljoj homogeniziranosti kozjeg mlijeka. Biološka vrijednost označava omjer zadržanog i resorbiranog dušika izražen u %, a ona za kozje mlijeko iznosi 89,29 %, dok je za ribe 70 %, a kukuruza 36 %. U kozjem mlijeku izrazito je velik koeficijent probavljivosti kazeina, te apsorpcije aminokiselina (Jandal, 1996).

Najznačajnije terapijsko svojstvo kozjeg mlijeka je hipoalergenost, te je ono zbog svojih antialergijskih svojstava dobra zamjena za kravlje mlijeko. U razlici hipoalergenosti kozjeg i kravljeg mlijeka dolazi zbog strukture proteina. Frakcija α_1 -kazein uzrokuje alergije kod djece, te je zbog njenog vrlo malog sadržaja ili potpunog izostanka u kozjem mlijeko upravo ono pogodno za njihovu prehranu. Osjetljivost djece i odraslih se također može javiti i na β -laktoglobulin, te se i u tom slučaju kozje mlijeko pokazalo kao bolji odabir za konzumaciju (Antunac i sur., 2000).

2.2 FERMENTIRANI MLIJEČNI PROIZVOD

U današnje vrijeme u prehrani ljudi sve se više koriste fermentirani mliječni proizvodi kojima se pripisuju terapijska svojstva, te karakterističan izgled, okus, aromu i konzistenciju. Takvi proizvodi nastaju vrenjem mlijeka uz odabrane mikroorganizme, koji će proizvodu dati određena senzorska svojstva. U procesu mliječno-kiselog vrenja laktoza prelazi u mliječnu kiselinu

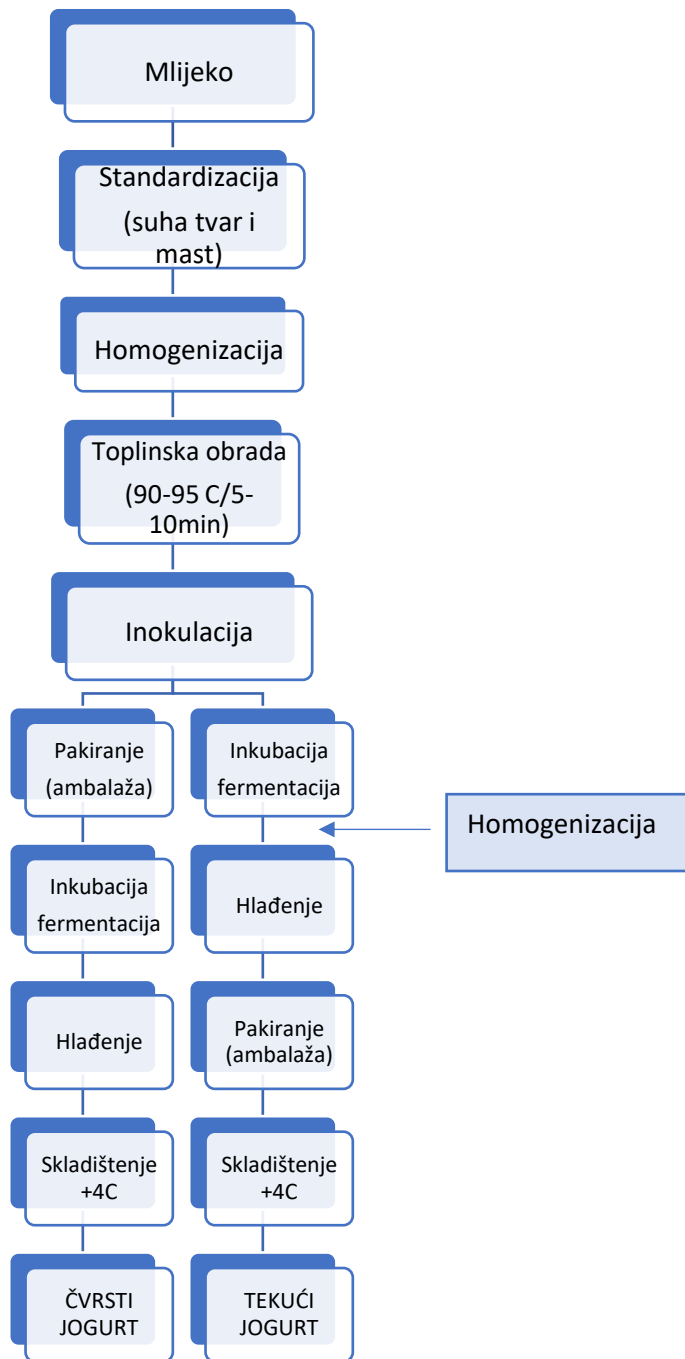
djelovanjem bakterija mliječne kiseline, tijekom procesa nastaju brojni međuprodukti i energija. Mliječna kiselina koja nastane tijekom fermentacije daje fermentiranom mlijeku svježeg kiseli okus, te zbog nastale kisele sredine sprječava rast acidofobnih mikroorganizama. Do pojave karakteristične konzistencija dolazi zbog koagulacije kazeina pod utjecajem nastale kiseline, a na konzistenciju utječe i sastav sirovine i njezin prethodna obrada (visoka toplinska obrada i homogenizacija). Nastali međuprodukti, odnosno metaboliti bakterija mliječne kiseline (nastali razgradnjom ugljikohidrata, citrata) utječu na aromu proizvoda.

Na tvorbu arome i konzistenciju proizvoda, također će utjecati proteinaze i peptidaze, odnosno određeni stupanj proteolize, iako su bakterije mliječne kiseline slabi proteoliti. Ako se želi postići viši stupanj proteolite, tada se može primijeniti viša temperatura, pH vrijednost, mogu se dodati neki drugi sojevi bakterija ili se proizvod može staviti na produljeno čuvanje. Tada će doći do bolje probavljivosti fermentiranih proizvoda, no struktura gruš bit će slabija, a može doći i do pojave gorkastog okusa (ako je proteoliza prekomjerna) kod vrlo starog jogurta ili kefir (Tratnik, Božanić, 2012).

2.2.1 Proizvodnja jogurta

Najpoznatiji fermentirani proizvod na današnjem tržištu je jogurt. Jogurt se proizvodi kontroliranom fermentacijom pomoću „jogurnih kultura“ *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ove bakterije mogu se koristiti i kao monokulture, no kao takve se rijetko upotrebljavaju jer njihovim zajedničkim rastom i fermentacijom nastaje više i brže mliječne kiseline, te su tako efikasnije. Ono što karakterizira ove bakterije je njihovo sinergističko djelovanje, laktobacili tijekom svoga rasta proizvode aminokiseline koje stimuliraju rast streptokoka, a streptokoki proizvode CO₂ i mravlju kiselinu, čime stimuliraju rast laktobacila. Njihova optimalna temperatura za rast i razmnožavanje je 42 °C. Ove „jogurtne kulture“ tijekom svoje aktivnosti povećavaju količinu topljivog kazeina i slobodnih aminokiselina, što utječe na bolju probavljivost jogurta. Ovisno o konzistenciji jogurti se dijele na tekuće i čvrste jogurte. Ključna razlika u njihovom procesu proizvodnje je način inkubacije. Inkubacija čvrstih jogurta se provodi u ambalaži, a tekućih u spremniku za vrenje i to prije pakiranja. U proizvodnji jogurta uz bakterije „jogurtne kulture“ koriste se i probiotičke bakterije (Tratnik, Božanić, 2012).

Odabrano mlijeko za fermentaciju ne smije sadržavati antibiotike, inhibitorne tvari, bakteriofage, kemijska sredstva, niti pesticide, a mora imati najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti, a kiselost ne smije biti viša od 6,8 °SH ili niža od pH 6,5. Nakon odabira takvog mlijeka slijedi standardizacija mliječne masti, homogenizacija, te toplinska obrada. Pri proizvodnji se koristi visoka toplinska obrada (90-95 °C, 5-10 min), nakon koje slijedi inokulacija uz intenzivno miješanje. Na slici 1 prikazan je dijagram proizvodnje čvrstog i tekućeg jogurta. Ako se proizvodi čvrsti jogurt slijedi pakiranje u ambalažu u kojoj dolazi do inkubacije i fermentacije, unutar komore za inkubaciju. Temperatura komore je pogodna za rast i razmnožavanje mikrobne kulture. Kada je proces fermentacije završen slijedi hlađenje i skladištenje proizvoda. Ako se proizvodi tekući jogurt, inkubacija i fermentacija se provode u spremniku za vrenje, prije punjenja u ambalažu, na temperaturi od 20 do 25 °C do oblikovanja čvrstog koaguluma. Trajanje inkubacije ovisi o temperaturi, te količini i aktivnosti dodane kulture, najčešće do 20 sati uz blago miješanje svaka 2 do 3 sata. Nakon vrenja nastali koagulum se homogenizira, te razbija i postaje tekuć. Nakon toga slijedi hlađenje, punjenje u ambalažu i skladištenje. Pakiranje fermentiranih mliječnih napitaka se obično provodi u plastične čašice koje se zatvaraju aluminijskim poklopcem ili u kartonsku ambalažu, ali u oba slučaja hermetički u aseptičkim uvjetima. Na kraju se proizvod skladišti na +4 °C (Tratnik, Božanić, 2012).



Slika 1. Dijagram tijeka proizvodnje jogurta (Tratnik i Božanić, 2012)

2.3 MORINGA OLEIFERA

Porodica *Moringaceae* obuhvaća 13 vrsti biljaka, a najpoznatija i najčešće kultivirana je upravo *Moringa oleifera*. *Moringa oleifera* se može pronaći kao divlja ili kultivirana, a rasprostranjena je u tropskim i suptropskim krajevima po dijelovima Afrike i Azije (Anwar i sur.,2007).

U tablici 3 prikazana je taksonomija *Moringe oleifere*

Tablica 3. Taksonomija *Moringa oleifera* (Falowo i sur., 2018)

Carstvo	<i>Plantae</i>
Koljeno	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Brassicales</i>
Porodica	<i>Moringaceae</i>
Rod	<i>Moringa</i>

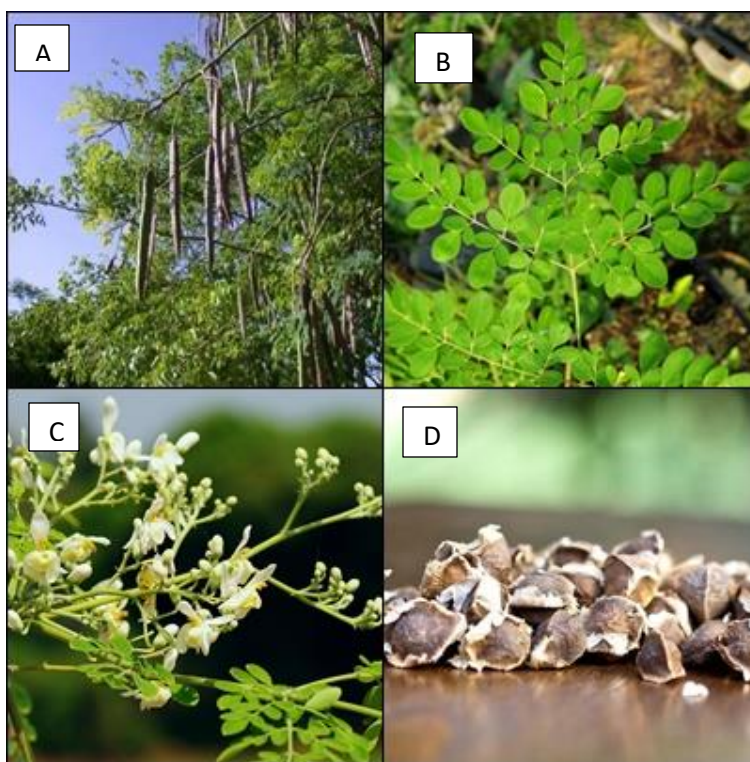
Stablo zrele biljke može narasti od 5 do 10 metara, a promjer debla može biti i do 45 centimetara. Na stablu rastu cvjetovi žućkasto- bijelih latica, dok je kora drveta bjelkasto-sive boje. Sjemenke mogu biti okruglog ili trokutastog oblika koje su omotane u smeđkaste polupropusne ljuske, poredane na dugoj mahuni (Falowo i sur., 2018).

Na slici 2 prikazano je stablo *Moringe oleifere*, dok slika 3 prikazuje njezine plodove, list, cvijet i sjemenke.

Moringa oleifera izrazito je izdržljiva biljka koja može podnijeti temperature do 48 °C , ali i mraz zimi, dok najbolje raste na temperaturama od 25 do 35 °C. Ako se biljka nalazi u hladnijim područjima tada cvjeta jednom godišnje, najčešće u kasno proljeće ili rano ljeto, a ako je zasađena u toplijim krajevima tada cvjeta dva puta godišnje ili čak kroz cijelu godinu. Najveći potrošač moringe je Indija s proizvodnjom 1,1 - 1,3 milijuna tona plodova godišnje (Pandey i sur., 2011).



Slika 2. Zrelo drvo *Moringa Oleifera* (M Singh, 2017)



Slika 3. Dijelovi biljke *Moringa oleifera* - A (plod) , B (list), C (cvijet), D (sjemenke)
(Anonymus)

2.3.1 Nutritivna svojstva i zdravstvena vrijednost moringe

Moringa oleifera je izrazito pogodna za uzgoj zato što se cijela biljka može u potpunosti iskoristiti u prehrambene ili komercijalne svrhe. Kao visoko nutritivne namirnice se koriste plodovi, listovi i cvjetovi.

Listovi biljke su bogati mineralnim tvarima i vitaminima. Od mineralnih tvari se najviše ističu kalcij, željezo, magnezij, kalij i cink, a najzastupljeniji vitamin u svježim listovima je vitamin E, dok u osušenim listovima dominira vitamin C. Ostali vitamini koji se mogu pronaći u listovima su vitamini B skupine, vitamin A, te vitamin D. Osim vitamina i mineralnih tvari listovi moringe vrlo su bogati fitokemikalijama odnosno karotenoidima, polifenolima, flavonoidima, folnim kiselinama i taninima (Vergara-Jimenez i sur., 2017).

Zbog svog bogatog kemijskog sastava (viši sadržaj kalcija nego u mlijeko, više vitamina C nego u narančama i više željeza nego u špinatu) listovi biljke su iznimno dobri za liječenje pothranjenosti dojenčadi i dojilja (Gopalakrishnan i sur., 2016).

Tablica 4 prikazuje nutritivni sastav listova *Moringe oleifere* sadržan u 100g biljnog materijala.

Tablica 4. Nutritivni sastav listova moringe na 100 g biljnog materijala (Gopalakrishnan i sur., 2016)

Nutrijent	Svježi listovi	Osušeni listovi
Kalorije (kcal)	92	329
Proteini (g)	6,7	29,4
Masti (g)	1,7	5,2
Ugljikohidrati(g)	12,5	41,2
Vlakna (g)	0,9	12,5
Vitamin B3 (mg)	0,8	7,6
Vitamin C (mg)	220	15,8
Vitamin E (mg)	448	10,8
Kalcija (mg)	440	2185
Magnezij (mg)	42	448
Kalij (mg)	259	1236
Fosfor (mg)	70	252

Moringa je vjerojatno najhranjivija biljka na zemlji, a cijela biljka može se u potpunosti iskoristiti (korijen, deblo, kora, cvjetovi, sjemenke). Osim što štiti naš organizam, može se koristiti i u industriji parfema, te u aroma terapiji. Brojna istraživanja pokazala su da moringa ima antikancerogeno, antimikrobno, antioksidacijsko, te antiastmatičko i antifugalno djelovanje, zacjeljuje rane, a zbog sadržaja vitamina doprinosi smanjenju iscrpljenosti (Anwar i surr., 2007).

Prah od lista ovog "čudesnog drveta" koriste se kod dijabetesa, za regulaciju krvnog tlaka u slučaju gubitka energije i težine, pothranjenosti, prekomjerne težine, lupusa, upalnih promjena na koži, bolesti dišnog sustava, poremećaja probavnog sustava, čireva, osteoporoze, impotencije, menstrualnih tegoba, tumora, Chronove bolesti, artritisa, anemije, širokog spektra bolesti jetre. Za borbu protiv mnogih navedenih simptoma (kardiovaskularne bolesti, pojava raka) zaslužni su upravo flavonoidi koji se sintetiziraju direktno u biljci. Neki od važnijih su miricetin, kampferol i kvercetin koji ima jaka antioksidacijska svojstva (Vergara-Jimenez i sur., 2017).

Ulje sjemenki sastoji se od 20 % zasićenih od kojih je najzastupljenija behenijska kiselina i 80 % nezasićenih masnih kiselina od kojih je najzastupljenija oleinska masna kiselina. Polinezasićena oleinska kiselina uz linolnu i linolensku kiselinu ima sposobnost kontrole lošeg kolesterola (Lalas i Tsaknis, 2002).

Moringa oleifera također je i dobar izvor proteina, a osušeni listovi biljke sadrže 16 aminokiselina. U listovima se nalazi 44 % esencijalnih aminokiselina, dok se u mahunama i cvjetovima pronalazi 30 %. Najzastupljenije aminokiseline su arginin, glutaminska i asparaginska kiselina, a od ostalih važnijih aminokiselina važno je spomenuti metionin i tirozin (Sanchez-Machado i sur., 2010).

2.3.2. Dosadašnja dostignuća u mljekarskoj industriji primjenom dodatka moringe

Moringa olifera u prijevodu konjska rotkvica, biljka je poznata još pod nazivom "stablo hrena" ili "stablo bubnjeva". Ovo domorodačko stablo porijeklom iz Indije koristi se od davnina u prehrambene i medicinske svrhe zbog svog izrazitog nutritivnog i bogatog bioaktivnog sastava (Gopalakrishnan i sur., 2016).

U današnje vrijeme prehrambena industrija, pa tako i mliječna se sve više okreću proizvodnji funkcionalnih proizvoda koji imaju poboljšana fizikalno-kemijska i nutritivna svojstva. Kako je već navedeno lišće moringe vrlo je dobar izvor prirodnih sastojaka kao što su proteini, mineralne tvari, fenoli, vitamini i fitonutritijenti, te je samim time dobar dodatak za poboljšanje nutritivne vrijednosti prehrambenih proizvoda (Zhang i sur, 2019).

Hassan i sur. (2016), te Zhang i sur. (2019) objavili su istraživanja u kojima su proučavali kako dodatak lišća moringe utječe na proizvodnju jogurta i njegovo skladištenje, odnosno kako će dodatak moringe utjecati na kemijska i senzorska svojstva dobivenog jogurta te na rast i razmnožavanje jogurtne kulture (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*).

Hassan i sur. (2016) su pomoću bivoljeg mlijeka i dodatka ekstrakta lišća moringe proučavali proces fermentacije te analizirali konačni proizvod senzorskim i kemijskim analizama. Ekstrakt moringe u mlijeko dodavali su u udjelima od 0,5, 1 i 2 %. Fermentaciju su provodili na 45 °C nakon čega su dobiveni proizvod skladištili 15 dan. Na kraju istraživanja mjerili su pH vrijednosti i viskoznost, količinu suhe tvari, te ukupni proteini, topivi dušik, aminokiseline i hlapljive masne kiseline. Dodatak moringe rezultirao je višim udjelom suhe tvari, proteina, većom kiselošću i nižom pH vrijednošću. Senzorske analize pokazale su da je ipak kontrolni uzorak najbolje ocijenjen, no nakon njega odmah je slijedio uzorak s dodatkom od 0,5 % ekstrakta moringe. Kako je dodatak 0,5 % moringe utjecao na bolja kemijska svojstva jogurta, osim viskoznosti koja je bila nešto niža, Hassan i surr. (2016) zaključili su da je jogurt s upravo najmanjim postotkom moringe optimalan za proizvodnju, zbog boljih hranjivih vrijednosti, a ne puno lošije senzorske ocjene.

Slično istraživanje proveli su i Zhang i sur. (2019), no njihovo je istraživanje bilo usmjereno na praćenje rasta bakterija mliječne kiseline te antioksidacijskih svojstava proizvedenog jogurta.

Prilikom proizvodnje jogurta koristili su obrano kravlje mlijeko i prah lista moringe od kojega je također napravljen ekstrakt. Dobiveni ekstrakt dodan je u mlijeko u udjelima od 0,05, 0,1 i 0,2 %. U rezultatima istraživanja iznijeli su da je ekstrakt dodane moringe smanjio vrijeme fermentacije, odnosno potaknuo je rast jogurtne kulture. Istraživanje je rezultiralo kraćim vremenom fermentacije uslijed bržeg pada pH vrijednosti. Organske kisline, flavonoidi te folna kiselina također utječu pozitivno na rast i razvoj bakterija mliječne kiseline. Osim toga, Zhang i sur. (2019) su dokazali da dodatak moringe ima utjecaja na povećanu viskoznost, smanjenu sinerezu te nešto lošija senzorska svojstva u odnosu na kontrolni uzorak bez dodane moringe.

Zhang i sur. (2019) zaključili su da je na povećanu viskoznost jogurta utjecaj imala interakcija proteina i polifenola. Polifenoli tvore komplekse s proteinima, koji doprinose smanjenoj sinerezi i povećanom kapacitetu zadržavanja vode u jogurta. Jogurt obogaćen ekstraktom moringe također je pokazao bolja antioksidacijska svojstva od kontrolnog uzorka. Prilikom provedbe senzorske analize zaključili su da je dodatak većeg udjela moringe utjecao na pojavu gorčine, blago kisele arome, te na manju opću prihvatljivost samog proizvoda. Prilikom senzorske analize, ispitivači su između svih uzoraka s dodatkom moringe najbolje ocijenili onaj s 0,05% dodanog ekstrakta. Kako je upravo taj proizvod najbolje ocjenjen nakon kontrolnog uzorka, zaključeno je da je on najprihvatljiviji za daljnje istraživanje i eventualnu proizvodnju.

Aznury i surr. (2020) istraživali su kako dodatak ekstrakta moringe utječe na količinu vitamina C i mliječne kiseline u gotovom proizvodu, te utjecaj na vrijeme fermentacije i senzorskih svojstva. U istraživanju su koristili pasteurizirano kravlje mlijeko, a ekstrakt moringe dodan je u udjelima od 3, 5, i 7 %. Provedene su 3 fermentacije u trajanju od 4, 6 i 8 h za sve tri dodane koncentracije na temperaturi od 35 ° C.

Izmjerena pH vrijednosti svih uzoraka tijekom fermentacija bile su u rasponu od 4-5 pH jedinica.

Ukupna kiselost jogurta, odnosno mliječna kiselina trebala bi biti u rasponu od 0,5-2,0 %. Svi uzorci s dodatkom moringe za vrijeme trajanja fermentacije od 8 h su udovoljavali navedenom rasponu, dok su uzorci tijekom fermentacije u trajanju između 4 i 6 h imali manje od 0,5 % mliječne kiseline, odnosno 0,23-0,35 %.

Mjerenjem ukupne kiselosti zaključili su da što je veća količina ekstrakta u jogurtu, to je kiselost veća, pa je tako najveća kiselosti bila u jogurtu s dodatkom od 7 % moringe. Zaključili su da

sadržaj histidina u moringi utječe na povećanu kiselost tako što potiče rast i razvoj laktobacila. Laktobacili stimuliraju streptokoke otpuštanjem glicina i histidina u hranjivi medij, a streptokoki utječu na smanjenje pH vrijednosti, a to pozitivno utječe na rast laktobacila. Dakle, što je više dodanog ekstrakta moringe, više je histidina, pa je veći sadržaj mliječne kiseline i niža pH vrijednost.

Najveća količina vitamina C detektirana je u uzorcima s dodatkom 7 % moringe zbog njegove visoke koncentracije u listovima te zbog dobre otpornosti vitamina C na oksidaciju tijekom fermentacije. Osim koncentracije moringe na količinu vitamina C utječe i temperatura fermentacije, pa ako je ona viša od optimalne, tada će i sadržaj vitamina C biti manji.

Senzorskom analizom su najbolje ocjenjeni uzorci s dodatkom 3 i 5 % moringe vremenom fermentacije od 8 h. Uzorak s dodatkom 5% moringe dobio je najvišu ocjenu za boju, dok je uzorak s dodatkom 3 % ekstrakta najbolje ocjenjen što se tiče arome i okusa. Na kraju istraživanja zaključeno je da je dodatak moringe pozitivno utjecao na bakterije mliječne kiseline, smanjenje pH vrijednosti te na povećanje ukupne količine vitamina C. U usporedbi s kontrolnim uzorkom jogurta, autori su zaključili da se uzorci s dodatkom 3 i 5 % moringe (fermentacija u trajanju od 8 h) mogu komercijalno proizvoditi.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada korišteno je svježe kozje mlijeko s 3 % mliječne masti (slika 4) proizvođača OPG Moravec (Proizvodnja mlijeka i proizvodnja sira Moravec, Nova Ves Petrijanečka, Hrvatska) s prosječnom nutritivnom vrijednosti u 100g svježeg kozjeg mlijeka prikazanom u tablici 5.

Za fermentaciju mlijeka korištena je jogurtna kultura Danisco, YO-MIX 883 LYO 50 DCU (Danisco, Francuska).

Za pripremu ekstrakta moringe korištena je moringa u prahu bio&bio superfood. Biovega d.o.o. (slika 5) s prosječnom hranjivom vrijednosti praha na 100g proizvoda prikazanom u tablici 6.

Prilikom mikrobiološke analize korištene su podloge (slika 6):

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Biolife, Milano,Italija) za određivanje bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*,

M17 (Biolife, Milano,Italija) za određivanje bakterija *Streptococcus thermophilus*

Sabouraud dextrose (SDA) agar (Biolife, Milano,Italija) za određivanje kvasca i plijesni te

Violet red bile glusoce (VRBG) agar (Biolife, Milano,Italija) za određivanje enterobakterija.

Tablica 5. Prosječna nutritivna vrijednost u 100g svježeg kozjeg mlijeka

Sastojak	Vrijednost
Energija	233kJ / 56 kcal
Masti	3,0 g
-od toga zasićene masne kiseline	2,1 g
Ugljikohidrati	4,3 g
-od toga šećeri	4,3 g
Bjelančevine	2,9 g
Sol	0,3 g



Slika 4. Svježe kozje mlijeko (vlastita fotografija)

Tablica 6. Prosječna hranjiva vrijednost praha moringe na 100 g proizvoda

Sastojak	Vrijednost
Energija	1349 kj / 320 kcal
Masti	2,3 g
-od kojih zasićene masne kiseline	0,6 g
Ugljikohidrati	38,2 g
-od kojih šećeri	14,7 g
Vlakna	19,2 g
Bjelančevine	27,1 g
Sol	0,3 g
Vitamin A	16300 µg
Vitamin E	113 mg
Tiamin (B1)	2,6 mg

Tablica 6. Prosječna hranjiva vrijednost praha moringe na 100 g proizvoda - nastavak

Riboflavin (B2)	20,5 mg
Niacin (B3)	8,2 mg
Kalcij	2003 mg
Kalij	1324 mg
Magnezij	368 mg
Željezo	28,2 mg
Cink	3,3 mg
Bakar	0,6 mg



Slika 5. Moringa u prahu (vlastita fotografija)



Slika 6. Podloge korištene prilikom mikrobiološke analize (vlastita fotografija)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema mlijeka za fermentaciju

Prije provođenja postupka fermentacije mlijeku je izmjerena kiselost (pH i °SH vrijednost). Nakon utvrđivanja odgovarajuće kvalitete, 8 L svježeg kozjeg mlijeka podvrgnuto je pasterizaciji na temperaturi od 95 °C /5-10 minuta. Nakon pasterizacije mlijeko je ohlađeno na temperaturu od 42 °C koja je optimalna za djelovanje jogurtne kulture.

3.2.2. Priprema ekstrakta moringe

Pomoću analitičke vage odvagano je 10 g praha moringe u laboratorijsku čašu od 500 mL. Destilirana voda zagrijana je do vrenja, te je s 200 mL kipuće vode prelijevan prah od moringe.

Laboratorijska čaša poklopljena je s aluminijskom folijom (slika 7) i otopina se lagano kuhala 30 minuta na magnetskog mješalici (Rotamix 550, Tehnica). Nakon 30 minuta otopina je ohlađena na oko 60 °C i profiltrirana je pomoću filter papira (Whatman™, 150mm).



Slika 7. Priprema otopine ekstrakta moringe (vlastita fotografija)

3.2.3. Proizvodnja jogurta

Nakon što je 8 L mlijeka ohlađeno na 42 °C u njega je dodano, prema napatku proizvođača, 0,1688 g jogurtne kulture, prethodno izvagane na analitičkoj vagi (KERN KB, Balingen, Njemačka). Mlijeko je raspoređeno u staklene bočice na način da je u 6 bočica razliveno po 2 L mlijeka koje su služile kao kontrolni uzorak bez dodatka moringe, a ostalih 6 L mlijeka korišteno je za fermentaciju sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta moringe (1 % (v/v), 3 % (v/v) i 5 % (v/v)). Preostalih 6 L mlijeka podijeljeno je u 3 staklene čaše volumena 2 L (slika 8), nakon čega je u svaku pojedinačnu čašu dodana određena koncentracija ekstrakta moringe (1 % (v/v) , 3 % (v/v) i 5 % (v/v)), te je ukupni volumen mlijeka s određenom koncentracijom raspoređen u 6 staklenih bočica za fermentaciju. Staklene bočice su poklopljene aluminijskom folijom, te nakon

toga stavljene na fermentaciju u termostat (INKO, Zagreb) na 42 °C. Tijekom procesa fermentacije mjerena je pH vrijednost pH metrom te određivan broj laktobacila i streptokoka. Kada je pH vrijednost dosegla 4,6 fermentacija je završena na način da su staklene bočice izvađene iz termostata, te ohlađene i stavljene na temperaturu hladnjaka.



Slika 8. Raspodjela uzoraka mlijeka prema dodanoj koncentraciji moringe u staklene bočice (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje kiselosti mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda

Određivanje kiselosti mlijeka jedan je od način provjere njegove svježine, a pojava povećane kiselosti često može onemogućiti njegovu daljnju preradu u mliječne proizvode, odnosno takvo mlijeko se onda ne smije zagrijavati na temperaturu pasterizacije. Zagrijavanjem mlijeka s povećanom kiselošću došlo bi do pojave gruš, kao rezultat djelovanja mliječne kiseline i visoke temperature na kazein (Sabadoš, 1998.).

pH vrijednost i titracijska kiselost ($^{\circ}\text{SH}$) određene su prije same fermentacije u sirovom, pasteriziranom, te inokuliranom mlijeku (bez dodatka moringe). Tijekom fermentacije kiselost je mjerena u inokuliranim uzorcima s i bez dodatka moringe.

Za vrijeme fermentacije stvarna kiselost mjerena je svakih sat vremena, a kako se fermentacija bližila kraju mjerenja su bila učestalija kako bi se što točnije odredio sam kraj fermentacije, odnosno, fermentacija je vođena do postizanja pH vrijednosti od 4,6 jedinica.

Titracijska kiselost uzoraka mjerena je svakih sat vremena te je također izmjerena u uzorcima na kraju fermentacije.

3.2.4.1. Određivanje kiselosti mlijeka pH-metrom

pH vrijednost označava negativan logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini te je mjerilo za aktivnu (stvarnu) kiselost svježeg mlijeka. Koncentracija vodikovih iona najčešće se mjeri pH-metrom ili potenciometrima (Božanić i sur., 2010).

Prije početka mjerenja pH, elektroda pH-metra (WTW pH3110, Njemačka) isprana je destiliranom vodom, te osušena staničevinom. Prije same analize provedena je kalibracija uređaja, prema uputama proizvođača. Elektroda je potom uronjena u čašicu s mlijekom, nakon čega je očitana pH vrijednost kada se vrijednost stabilizirala. Nakon očitavanja vrijednosti, elektroda je ponovno isprana destiliranom vodom, osušena staničevinom te uronjena u 3M otopinu KCl-a do sljedećeg mjerenja.

3.2.4.2. Titracijska kiselost

U mljekarskoj industriji najčešće se mjeri kiselost uzrokovana slobodnim kiselinama u mlijeku, a ta se kiselost izražava provođenjem titracije te ju nazivamo titracijska kiselost. Određuje se metodom po Soxhlet-Henkeli, pomoću 0,25 M natrijeve lužine uz dodatak fenolftaleina kao indikatora, a rezultat se izražava kao stupnjevi Soxhlet-Henkela ($^{\circ}\text{SH}$). Stupnjevi po Soxhlet-Henkeli ($^{\circ}\text{SH}$) jednaki su broju mililitara 0,25 mol/L NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator (Sabadoš, 1998).

Postupak titracije započet je pripremom standardne boje koja predstavlja boju prema kojoj se vodi daljnja titracija. Standardna boja pripremljena je na način da je u jednu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirano 20 mL uzorka mlijeka i 0,4 mL 5 %-tne otopine kobaltovog sulfata ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

U drugu tikvicu otpipetirano je 20 mL mlijeka prethodnog temperiranog na 20 °C, te je dodano 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina. Smjesa je promiješana i titrirana s 0,1 M natrijevom lužinom do postizanja blijedo ružičaste boje, koja je uspoređena sa standardnom bojom, a boja mora biti postojana 1 minutu.

Postupak fermentacije mlijeka djelovao je na gustoću samog proizvoda, pa je neke uzorke zbog gušće konzistencije bilo potrebno razrijediti destiliranom vodom. Postupak je proveden na način da je 20 g uzorka pomiješano s 20 mL destilirane vode, potom je dodan 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina, te je uzorak titriran s 0,1 M natrijevom lužinom.

Izračun kiselosti mlijeka proveden je prema izrazu:

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

gdje je:

a broj= mL 0,1 NaOH utrošenih za neutralizaciju uzorka, a

f predstavlja= faktor otopine NaOH= 0,1 mol/L te iznosi =1 za korištenu otopinu.

3.2.5. Mikrobiološka analiza mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda

Prije same mikrobiološke analize potrebno je pripremiti hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama ovisno o njihovim potrebama za rast i razvoj. Hranjive podloge pripremljene su prema uputama proizvođača, kuhanjem s destiliranom vodom do postizanja temperature vrenja. Nakon kuhanja podvrgnute su sterilizaciji u autoklavu (osim podloge za određivanje enterobakterija) pri temperaturi od 121 °C, 15 minuta, te su ohlađene na temperaturu od 45 °C. Mikrobiološka analiza odrađena je u svrhu određivanja broja živih stanica bakterija *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* tijekom fermentacije uzoraka s dodatkom moringe, a u uzorcima svježeg, pasteriziranog i inokuliranog mlijeka također je utvrđivan broj živih stanica kvasaca i plijesni, te prisutnost enterobakterija.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* rastu u simbiozi, te su sastavi hranjivih podloga za njihovu izolaciju vrlo slični.

Za izolaciju laktobacila korišten je MRS agar (Biolife, Milano-Italija) koji u svome sastavu sadrži: peptone, ekstrakt mesa i kvasca, glukozu, di-kalijev hidrogenfosfat, magnezijev i manganov sulfat, amonijev citrat, natrijev acetat agar, te Tween 80.

Za izolaciju streptokoka korišten je M17 (Biolife, Milano-Italija) agar, koji u svome sastavu sadrži: kazein, peptone, ekstrakt mesa i kvasca, magnezijev sulfat, askorbinsku kiselinu, laktozu, agar, te natrijev glicerolfosfat koji inhibira rast i razvoj laktobacila.

Mikrobiološka analiza započeta je s uzorcima svježeg, pasteriziranog i inokuliranog mlijeka bez dodatka moringe. Prilikom izvođenja analize potrebno je osigurati sterilne uvjete kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka. Pomoću suhe sterilizacije laboratorijskog posuđa, dezinficiranjem radne površine pomoću etanola, te provođenjem analize pri otvorenom plamenu i uz zatvorenu prostoriju postignuti su aseptični uvjeti. U navedenim uzorcima korištene su podloge M17, De Man, Rogosa and Sharpe agar, Sabouraud dextrose agar (Biolife, Milano-Italija) za izolaciju kvasaca i plijesni, a ukupna prisutnost enterobakterija popraćena izolacijom na Violet red bile glusoce agar, (Biolife, Milano-Italija).

Uzorak mlijeka prethodno je homogeniziran, te je 1 mL uzorka sterilnom mikropipetom prenesen u epruvetu koja je sadržala 9mL fiziološke otopine. Dobiveno razrjeđenje se nakon toga homogeniziralo na vorteks uređaju, te se iz epruvete s novim sterilnim nastavkom prene 1 mL nastalog razrjeđenja u novu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavljao do željenog razrjeđenja, a navedena metoda se zove Kochova metoda decimalnih razrjeđenja (Božanić i sur., 2009).

U označene prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice se potom nacjepi 1mL homogeniziranog uzorka određenog razrijeđenja (slika 10), te se prelije odgovarajućom hranjivom podlogom (slika 11). Podloge za izolaciju laktobacila, streptokoka i enterobakterija (u početnim uzorcima) stavljene su na inkubaciju pri 37 °C, dok su podloge za izolaciju kvasaca i plijesni ostavljene pri sobnoj temperaturi.

Tijekom fermentacije svakih sat vremena, te na kraju (pH=4,6) provedena je mikrobiološka analiza na uzorcima inokuliranog mlijeka bez i s dodatkom različitih koncentracija moringe. Pri tim

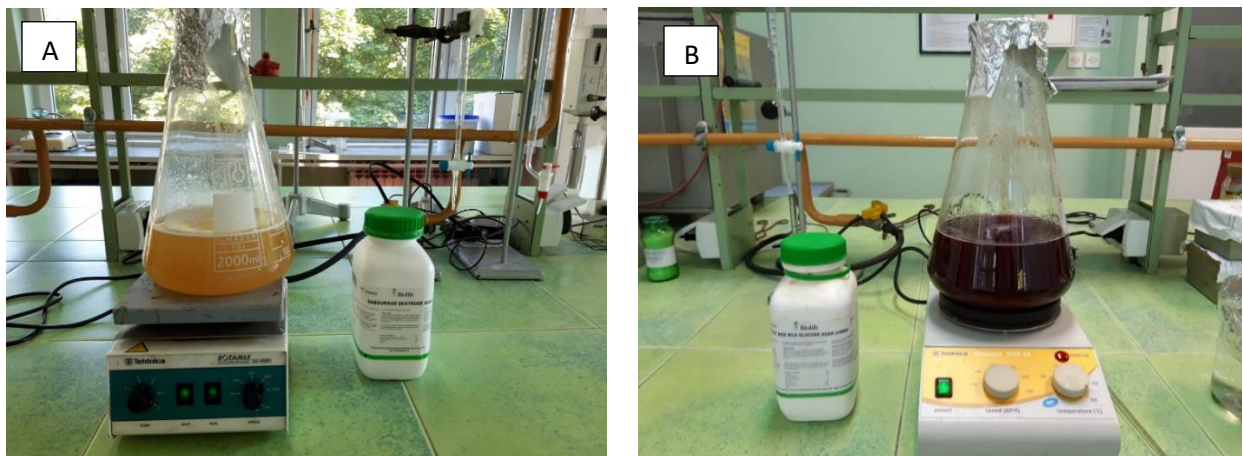
analizama korištene su samo podloge MRS i M17, nakon čega su naciepljeni uzorci također stavljeni na inkubaciju.

Očitavanje rezultata

Nakon završene inkubacije Petrijevih ploča, koja je trajala 3 dana pri 37 °C, uočene su narasle kolonije na podlogama, a pri odabiru brojanja kolonija odabrane su one na kojima je broj poraslih kolonija bio između 30 i 300.

Izračunat je broj naraslih kolonija po mL odnosno CFU (colony forming unit)/mL po formuli:

$$\frac{CFU}{ml} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nasaden volumen} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}} \quad [2]$$



Slika 9.

- a) Priprema hranjive podloge Sabouraud dextrose agar i Violet red bile glukoze (b)
(vlastita fotografija)



Slika 10. Nacijepljeni uzorci u Petrijevim zdjelicama prije ulijevanja hranjivog agara (vlastita fotografija)



Slika 11. Nacijepljeni uzorci mlijeka s hranjivim podlogama spremni za inkubaciju (vlastita fotografija)

3.2.6. Obrada rezultata

Svi pokusi su provedeni dva puta, a prikazani rezultati su srednje vrijednosti dobivenih rezultata. Grafovi i tablice su obrađeni u MS excel programu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je praćenje tijeka fermentacije kozjeg mlijeka, odnosno određivanje utjecaja dodatka ekstrakta moringe na fermentaciju. Praćena je kiselost (aktivna i titracijska), te su tijekom fermentacije rađene mikrobiološke analize kozjeg mlijeka. Vrijeme fermentacije te ostale analize su određivane za kontrolni uzorak te za uzorke u koje je dodano 1, 3 i 5 % (v/v) moringe.

4.1 Aktivna i titracijska kiselost mlijeka i jogurta

U tablici 7 prikazane su srednje pH vrijednosti mlijeka i jogurta prije te tijekom procesa fermentacije, gdje je vidljivo kako dodatak moringe utječe na skraćivanje vremena fermentacije. Fermentacija kontrolnog uzorka trajala je 5 h i 30 min, dok su fermentacije u uzorcima s dodatkom 1, 3 i 5 % moringe trajale sat vremena kraće. Nakon 4 h fermentacije pH uzoraka s dodatkom moringe bio je vrlo blizu završnoj pH vrijednosti od 4,6 jedinica, no iako se i pH vrijednost kontrolnog uzorka nije brojčano mnogo razlikovala (razlika oko 0,07 pH jedinica), uzorci u koje je dodan ekstrakt moringe su puno brže došli do kraja procesa fermentacije (kroz 30 minuta, za razliku od kontrolnog uzorka kojem je trebalo još 1h i 30 min). Iz rezultata je vidljivo da je već nakon 3h fermentacije postignuta razlika u pH između kontrolnog uzorka i onih s dodatkom moringe od oko 0,4 pH jedinice. Prema dobivenim rezultatima može se reći da dodatak ekstrakta moringe u svježje kozje mlijeko neposredno prije fermentacije rezultira bržim padom pH vrijednosti, te tako skraćuje trajanje fermentacije. Osim toga, iz dobivenih rezultata se može vidjeti (tablica 7) kako različite količine dodatka ekstrakta moringe (1, 3 i 5 % (v/v)) nisu imale utjecaja na različito trajanje fermentacije. Do istih rezultata su došli i Zang i sur. (2018), kada su prilikom svog eksperimenta zaključili da dodatak ekstrakta moringe utječe na brže snižavanje pH

vrijednosti zbog pozitivnog utjecaja samog ekstrakta na rast i razvoj *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, odnosno bakterija jogurtne kulture.

Tablica 7. Srednje pH vrijednosti mlijeka i jogurta prije, tijekom i na završetku fermentacije

Uzorak		pH tijekom fermentacije					
		(prije)	1h	2h	3h	4h	završetak
Mlijeko	Svježe	6,59	/	/	/	/	/
	Pasterizirano	6,4	/	/	/	/	/
	Inokulirano	6,27	/	/	/	/	/
Jogurt s	(Kontrola)	6,40	6,04	6,01	5,56	4,84	4,65 ^{*1}
dodatakom	1	6,39	5,99	5,88	5,13	4,79	4,66 ^{*2}
moringe	3	6,38	6,03	5,55	5,06	4,77	4,67 ^{*3}
(%)	5	6,37	6,05	5,59	5,06	4,76	4,67 ^{*4}

*1 nakon 5h i 30 minuta

*2 nakon 4h i 25 minuta

*3 nakon 4h i 25 minuta

*4 nakon 4h i 25 minuta

U tablici 8 prikazane su srednje °SH vrijednosti kontrolnog uzorka i uzoraka obogaćenih ekstraktom moringe, prije i tijekom procesa fermentacije. Prikazana je i °SH vrijednost za svježe, pasterizirano i inokulirano mlijeko. °SH vrijednosti na kraju fermentacije svih uzoraka otprilike su podjednake, no vidljivo je da jogurt s dodatkom 5 % moringe ima najveću titracijsku kiselost. Kontrolni uzorak je u prva 2h imao najmanja odstupanja od početne °SH vrijednosti, a između 3 h i kraja fermentacije vrijednost se brojčano najviše povećala u odnosu na druge uzorke. Uzorak s dodatkom 1% moringe od svih obogaćenih uzoraka imao je najmanju vrijednost °SH, a najveći porast kiselosti dogodio se nakon 2 h.

Tablica 8. Srednje °SH vrijednosti mlijeka i jogurta prije, tijekom i na završetku fermentacije

Uzorak		°SH tijekom fermentacije					
		(prije)	1h	2h	3h	4h	završetak
Mlijeko	Svježe	6,0	/	/	/	/	/
	Pasterizirano	7,3	/	/	/	/	/
	Inokulirano	7,3	/	/	/	/	/
Jogurt s dodatkom moringe (%)	(Kontrola)	7,3	9,0	9,5	17,8	24,1	29,0*1
	1	7,4	10,0	12,1	22,9	28,2	29,2*2
	3	7,2	10,2	14,3	23,1	25,1	28,5*3
	5	7,2	10,1	14,9	24,4	25,8	29,5*4

*1-nakon 5h i 30 minuta

*2-nakon 4h i 25 minuta

*3-nakon 4h i 25 minuta

*4-nakon 4h i 25 minuta

4.2. Mikrobiološka svojstva mlijeka i jogurta

Tablica 9 prikazuje broj poraslih kolonija *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta. Iz tablice je vidljivo da se dodatak 5 % moringe pokazao kao najbolji odabir za rast laktobacila. Porast kolonija nakon dodatka 1 % i 3 % moringe također je vidljiv s obzirom na kontrolni uzorak mlijeka, no taj porast manje je uočen nego kod uzorka s dodatkom 5 % moringe. Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima provedenog eksperimenta od strane Zhanga i sur. (2019) u kojemu navode kako je dodatak ekstrakta utjecao na smanjenja vremena fermentacije i brži pad pH vrijednosti. Na brži rast i razvoj laktobacila utjecaj su imale organske kiseline, polifenoli, flavonoidi, te folna kiselina koje pronalazimo u dodanom ekstraktu moringe.

Tablica 10 prikazuje broj poraslih kolonija *Streptococcus thermophilus* tijekom fermentacije jogurta, te je u njoj također vidljivo da uzorak s dodatkom 5 % moringe pokazuje najveći porast

kolonija streptokoka. Dodatak 3 % moringe također je uzrokovao porast broja kolonija s obzirom na kontrolni uzorak mlijeka, no on je bio nešto manji nego u uzorku s 5 % moringe. Iako je nakon 1 h trajanja fermentacije uzorak s 1 % moringe sadržavao veći broj kolonija streptokoka od kontrolnog uzorka, na kraju fermentacije u kontrolnom uzorku pronalazimo više kolonija.

Tablica 9. Prosječan broj poraslih kolonija (log(CFU) mL⁻¹) *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* u jogurtu tijekom fermentacije

Dodatak moringe %	Nakon 1h	Nakon 2h	Nakon 3h	Nakon 4h	Kraj fermentacije
(Kontrola)	4,64	4,82	4,89	4,94	5,66
1	4,36	4,89	5,64	5,77	5,84
3	4,7	5,02	5,18	5,98	6,14
5	4,33	4,97	5,52	5,59	6,23

Dobiveni rezultati prate rezultate dobivene praćenjem rasta laktobacila. Kako je dodani ekstrakt moringe pozitivno utjecao na rast laktobacila, tako je pozitivno utjecao i na rast streptokoka. Stimulirani laktobacili proizvodili su neke aminokiseline (valin, histidin, leucin) koje su pozitivno utjecale na rast streptokoka koji su počeli proizvoditi CO₂ i mravlju kiselinu koja je dodatno potakla rast laktobacila. Možemo reći da je ovaj sinergistički efekt djelovanja jogurtne kulture dodatno pospješen dodatkom ekstrakta i njegovim bogatim nutritivnim sastavom.

Tablica 10. Prosječan broj poraslih kolonija (log(CFU) mL⁻¹) *Streptococcus thermophilus* u jogurtu tijekom fermentacije

Dodatak moringe %	Nakon 1h	Nakon 2h	Nakon 3h	Nakon 4h	Kraj fermentacije
(Kontrola)	5,74	8,2	8,24	8,25	9,67
1%	6,78	8,11	8,31	8,59	8,64
3%	8,23	8,31	8,46	8,76	9,06
5%	6,86	8,55	8,92	9,30	10,49

5.ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja fizikalno-kemijskih i mikrobioloških analiza mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Dodatak ekstrakta moringe u uzorak mlijeka prije samog procesa fermentacije skratio je vrijeme fermentacije za nešto više od sat vremena.
2. Količina dodanog ekstrakta moringe nije imala utjecaja na različito trajanje fermentacije.
3. Uzorci s dodatkom ekstrakta moringe imaju nešto veću °SH vrijednost od kontrolnog uzorka, uz izuzetak uzorka s dodatkom 3% moringe koja je za 0,5 °SH manja od samog kontrolnog uzorka.
4. Dodani ekstrakt lista moringe povećao je broj kolonija *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* tijekom fermentacije, što je i očekivano zbog bogatog polifenolnog sastava ekstrakta moringe.
5. Može se reći da dodatak ekstrakta moringe potiče rast i razvoj jogurtne kulture te utječe na brži pad pH vrijednosti, odnosno skraćuje trajanja fermentacije.

6.LITERATURA

- Anonymus 1, https://en.wikipedia.org/wiki/Moringa_oleifera. Pristupljeno 22.travnja 2022.
- Antunac, N., Samaržija, D., Havranek, J. (2000) Hranidbena i terapijska vrijednost kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo*, 50(4), 297-304.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A. H. (2007) *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21, 17-25.
- Aznury, M., Margerty, E., Melianti, Sofiah, Yuniar, Awwaliyah, S. (2020) Effect of Fermentation Time and Percentage of *Moringa (Moringa oleifera)* Flour Variations on Vitamin C of Yogurt. *Atlantis Highlights in Engineering*, 7, 376-381.
- Božanić, R., Jelčić, I., Bilušić, T. (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda*, Plejada, Zagreb.
- Božanić, R., Tratnik, Lj., Drgalić, I., (2002) *Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti*. *Mljekarstvo*, 52(3), 207-237.
- Dorić, I., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., Božanić, R. (2019) Utjecaj mlijeka na zdravlje čovjeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 14(1-2), 24 – 32.
- Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J., Muchenje, V. (2018) Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food. Res. Int.* 106, 315-334.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D. S. (2016) *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*. 5, 49-56.
- Haenlein, G.F.W. (2004) Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51, 155-163.
- Hasan, M. M., Sharmeen, I. A., Anwar, Y., Alharby, H. F., Hasanuzzaman, M., Hajar, A. S., i sur. (2019) Evidence-Based Assessment of *Moringa oleifera* Used for the Treatment of Human Ailments. *Plant and Human Health*. 2, 121-132
- Jandal, J.M. (1996) Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22, 177-185.
- Joha, M. (2016) *Kemijski sastav kravljeg mlijeka i čimbenici o kojima ovisi*. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Zagreb.

- Kratz, S. (2016) Moringa-besmrtno drvo prirodni lijek za tlo.
<https://www.agroklub.com/sumarstvo/moringa-besmrtno-drvo-prirodni-lijek-za-tlo/23875/>.
Pristupljeno 24 travnja 2022.
- Lalas, S., Tsaknis, J. (2002) Characterization of Moringa oleifera seed oil variety "Periyakulam 1". Journal of Food Composition and Analysis. 15, 65-77.
- Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (2010), Narodne novine 102, Zagreb.
- Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2020), Narodne novine 136, Zagreb.
- Sabadoš, D., (1998) Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb.
- Sanchez-Machado, D. I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes, J. (2010) Nutritional quality of edible parts of Moringa oleifera. Food Anal. Methods. 3, 175-180.
- Singh, R., (2016) The tree of life: *Moringa Oleifera*-onlinekhabar.
<https://english.onlinekhabar.com/the-tree-of-life-moringa-oleifera.html>. Pristupljeno 24.travnja 2022.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi (urednik: Bašić, Z.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., Fernandez, M. L. (2017) Bioactive components in Moringa Oleifera leaves protect against chronic disease. Antioxidants, 6 (4), 91.
- Zhang, T., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Bae, H., Geuk Seo, H., Petriello, M. C., Han, S. G. (2019) Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. LWT - Food Science and Technology. 101, 276 – 284.