

# Fizikalna, kemijska i senzorska svojstva instant kakao praha obogaćenog ekstraktom industrijske konoplje (Cannabis sativa L.)

---

Talan, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:285113>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj, 2019.

Nikola Talan

993/N

**FIZIKALNA, KEMIJSKA I  
SENZORSKA SVOJSTVA  
INSTANT KAKAO PRAHA  
OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE  
(*Cannabis sativa* L.)**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Benković, te uz pomoć dr.sc. Tamare Jurina iz Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Neizmjerne se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Benković na velikoj pomoći, stručnim savjetima, strpljenju, razumijevanju i pristupačnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se dr. sc. Tamari Jurina i doc. dr. sc. Davoru Valingeru na pomoći, strpljenju i uloženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Posebna zahvala mojoj obitelji koji su sve ovo omogućili, i koji su me tijekom studiranja uvijek poticali i podržavali.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### FIZIKALNA, KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA INSTANT KAKAO PRAHA OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

*Nikola Talan, 993/N*

Sažetak: Budući da suvremeni način života karakterizira nepravilna prehrana, sve veći interes potrošača usmjeren je na funkcionalnu hranu koja osim uobičajene namjene ima dodatnih svojstava u svrhu poboljšanja zdravlja ljudi. Jedan od praktičnih načina konzumacije takvih proizvoda su instant napitci. Kakao se u posljednje vrijeme sve više istražuje za svoje pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje, prvenstveno zbog sadržaja polifenola te povezanosti s smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Cilj ovoga rada bio je procesom sušenja u pjenu proizvesti funkcionalne instant kakao praške obogaćene ekstraktom industrijske konoplje. Dobiveni uzorci sadržavali su ekstrakt različitog oblika (mikroinkapsulirani, tekući) i postotka (2,5; 5; 10; 15%), a analizirana su fizikalna, kemijska i senzorska svojstva te *in-vitro* simulacija probavnog sustava. Vrsta dodanog ekstrakta najviše utječe na suhu tvar praha, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet, indeks kohezije i suhu tvar pjene, dok postotak ekstrakta utječe na nasipnu gustoću, senzorska svojstva i sadržaj ukupnih polifenola. Postotak ekstrakta ima značajniji utjecaj na dobivene uzorke te mjerena svojstva nego vrsta dodatka.

**Ključne riječi:** funkcionalni proizvodi, sušenje u pjenu, kakao, industrijska konoplja, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 74 stranice, 12 slika, 12 tablica, 154 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. Maja Benković

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Tamara Jurina

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
2. Doc.dr.sc. Maja Benković
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević

**Datum obrane:** siječanj, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Section for Fundamental Engineering

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### PHYSICAL, CHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF INSTANT COCOA POWDER ENRICHED WITH HEMP EXTRACT (*Cannabis sativa* L.)

*Nikola Talan, 993/N*

**Abstract:** Because an inadequate diet is a characteristic of modern lifestyle, there is an increasing interest for functional foods that, besides their normal function, have additional functional properties for the purpose of improving peoples health. One of the practical ways to implement them are instant beverages. Lately, cocoa has been studied for its health benefits, primarily for its polyphenolic content and association with a risk reduction from cardiovascular diseases. The aim of this study was to, using a foam-mat drying process, produce functional instant cocoa powders enriched with hemp extracts. Produced samples contained hemp extracts of different form (liquid, microencapsulated) and percentage (2,5; 5; 10; 15% w/w), and were analyzed for their physical, chemical, sensory properties, and an *in-vitro* digestion. The type of the added extract affects the following properties: powder dry matter, total polyphenolic content, antioxidant capacity, cohesion indeks and foam dry matter, while the extract percentage affects bulk density, all sensory properties and the total polyphenolic content. Percentage of the added extract had a more significant influence on the produced samples and their properties in comparison to the type of the added extract.

**Keywords:** *functional products, foam-mat drying, cocoa, hemp, antioxidant capacity*

**Thesis contains:** 74 pages, 12 figures, 12 tables, 154 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. Maja Benković, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Tamara Jurina.*

**Reviewers:**

1. *PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor*
2. *PhD Maja Benković, Assistant professor*
3. *PhD Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*
4. *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor (substitution)*

**Thesis defended:** january, 2019.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. FUNKCIONALNA HRANA .....	3
2.1.1. Tipovi funkcionalne hrane .....	5
2.2. KAKAO KAO FUNKCIONALNI PROIZVOD .....	7
2.2.1. Utjecaj kakaa i proizvoda od kakaova zrna na zdravlje .....	8
2.2.2. Instant kakao napitci – značaj i proizvodnja .....	9
2.2.3. Sušenje u pjenu .....	10
2.2.4. Obogaćivanje instant kakao proizvoda i razvoj novih funkcionalnih kakao napitaka .....	12
2.3. INDUSTRIJSKA KONOPLJA .....	13
2.3.1. Taksonomija konoplje .....	13
2.3.2. Sastav industrijske konoplje .....	14
2.3.3. Antioksidativna aktivnost industrijske konoplje .....	16
2.3.4. Upotreba industrijske konoplje u prehrambenim proizvodima .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI .....	18
3.1.1. Otapala i reagensi .....	18
3.1.2. Aparatura i pribor .....	19
3.2. METODE .....	21
3.2.1. Priprema ekstrakata .....	21
3.2.1.1. Priprema tekućeg ekstrakta .....	21
3.2.1.2. Priprema mikroinkapsuliranog ekstrakta .....	21
3.2.2. Sušenje u pjenu: čista kakao mješavina, kakao mješavina s tekućim ekstraktom, kakao mješavina sa mikrokapsuliranim ekstraktom .....	22
3.2.2.1. Gustoća pjene .....	23
3.2.2.2. Stabilnost pjene .....	23
3.2.2.3. Određivanje suhe tvari pjene .....	23
3.2.3. Fizikalna svojstva dobivenih kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje .....	24
3.2.3.1. Raspodjela veličine čestica .....	24
3.2.3.2. Suha tvar prahova .....	24
3.2.3.3. Nasipna gustoća .....	25



3.2.4. Svojstva tečenja kakao prahova .....	25
3.2.4.1. Indeks kohezije .....	25
3.2.4.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača .....	26
3.2.5. Rekonstitucijska svojstva.....	27
3.2.5.1. Disperzibilnost .....	27
3.2.5.2 Topivost.....	27
3.2.4. Kemijska svojstva i <i>in-vitro</i> simulacija probave dobivenih kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje.....	28
3.2.4.1. Priprema acetonskih ekstrakta kakao prahova .....	28
3.2.4.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	28
3.2.4.3 <i>In-vitro</i> model simulacije probave .....	31
3.2.5. Senzorska svojstava dobivenog praha .....	32
3.2.6. Statistička analiza podataka .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
4.1. FIZIKALNA SVOJSTA PJENE I KAKAO MJEŠAVINA OBOGAĆENIH EKSTRAKTOM INDUSTRIJSKE KONOPLJE .....	34
4.1.1. Stabilnost i gustoća pjene.....	34
4.1.2. Sadržaj suhe tvari pjene .....	37
4.1.3. Fizikalna svojstva kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje .....	38
4.1.3.1. Sadržaj suhe tvari praha .....	38
4.1.3.2. Raspodjela veličine čestica .....	39
4.1.3.3. Nasipna gustoća .....	41
4.1.3.4. Svojstva tečenja kakao prahova .....	42
4.1.3.5. Rekonstitucijska svojstva .....	45
4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA DOBIVENIH PRAHOVA .....	48
4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola .....	48
4.2.2. Antioksidacijski kapacitet .....	50
4.3. SENZORSKA SVOJSTVA DOBIVENIH PRAHOVA.....	52
4.4. <i>IN-VITRO</i> MODEL PROBAVE DOBIVENIH PRAHOVA.....	54
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	57
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>63</b>

# 1. UVOD

Trendovi u socio-ekonomskom razvoju i populacijskoj demografiji pokazuju kako je posljednjih godina sve veća potreba za hranom koja ima dodanih pozitivnih utjecaja na zdravlje. Porast očekivanog trajanja života, koji rezultira porastom udjela starije populacije te želje za poboljšanjem kvalitete života (posebice u poodmakloj dobi), kao i porast troškova liječenja potaknuli su vlade, istraživače, zdravstvene djelatnike i prehrambenu industriju na otkrivanje najboljih načina kako bi se poduprijeli takvi trendovi. Samim time dolazi do inicijative za identifikacijom, tkz. funkcionalne hrane koja osim uobičajene uloge ima dodatnih svojstava u svrhu poboljšanja zdravlja i dobrobiti ljudi (Rogovska i Čukanova, 2015).

Jedan od načina proizvodnje funkcionalnih proizvoda je obogaćivanje postojećih proizvoda bioaktivnim spojevima, koji su prirodno prisutni u određenom proizvodu. Takvo povećanje količina bioaktivnih spojeva se pokazalo kao ekonomičan i učinkovit način za poboljšanje proizvoda (Spence, 2006). Na globalnoj razini, najveći je porast broja funkcionalnih napitaka budući da su oni prepoznati kao najbolji medij za funkcionalne sastojke. Od bezalkoholnih napitaka više se ne očekuje samo osvježanje, nego se zahtijevaju i dodatni pozitivni učinci njihovog konzumiranja na očuvanje zdravlja i ljepote. Zdravstveni učinci pojedinih funkcionalnih prehrambenih proizvoda primarno ovise o „aktivnim” sastojcima koji im se dodaju u obliku izoliranih sastojaka i ekstrakata iz prehrambenih proizvoda ili biljaka (Bender, 2008).

Kakao se u ljudskoj prehrani konzumira već tisućama godina te je za pripadnike plemena Maya kakao predstavljao čak i simbol fertlnosti i života te hranu bogova. Dugo vrijeme kakao i čokolada konzumirani su iz čisto hedonističkih razloga, međutim u posljednjih 20-tak godina, istraživači su dokazali kako tamna čokolada (veći udio kaka) te kakao u prahu imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, prvenstveno zbog relativno visoke koncentracije polifenola koje sadrže (Ackar i sur., 2013).

Iako kakao sam posebi već posjeduje određene pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, tržište je pomalo zasićeno mnoštvom instant kakao proizvoda koji su obogaćeni s raznim vitaminima i mineralima, vlaknima ili bioaktivnim komponentama kako bi im se poboljšala funkcionalna svojstva, tj. pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Jedan od novijih načina poboljšanja funkcionalnih svojstava instant kakao praha je obogaćivanje s biljnim ekstraktima.

U posljednjih nekoliko desetljeća čini se kako je uzgoj, razvoj i upotreba industrijske konoplje doživio svojevrstni procvat. Sve se intenzivnije istražuju novi načini primjene uz istodobno oživljavanje nekih starih, unapređujući ih primjenom novih tehnoloških znanja. Osim tradicionalnih namjena poput proizvodnje vlakana, tekstila i papira sve se više istražuju mogućnosti primjene u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Tako je industrijska konoplja sve češće primjenjivana u prehrambenoj industriji sa ciljem povećanja nutritivnih i funkcionalnih svojstava prehrambenih proizvoda, ponajprije zbog prisustva  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina, terpena, visokovrijednih proteina te antioksidativne aktivnosti (Hazekamp 2009).

Stoga je cilj ovog rada bio procesom sušenja u pjenu proizvesti funkcionalne instant kakao praškaste proizvode obogaćene dodatkom ekstrakta industrijske konoplje različite vrste (mikroinkapsuliranog ili tekućeg) ili postotka (2,5; 5; 10 i 15%). Dobivenim proizvodima ispitivana su fizikalna svojstva (veličina čestica, nasipna gustoća, suha tvar, svojstva tečenja, disperzibilnost, topivost), kemijska svojstva (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) te senzorska svojstva. Kako bi se odredilo preživljavanje i biodostupnost polifenola te antioksidacijska aktivnost kakao prahova tijekom probave, provedena je i simulacija probavnog sustava *in-vitro*.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. FUNKCIONALNA HRANA**

Razvoj nutricionizma, mogućnost izolacije i identifikacije nutrijenata koji su potrebni za rast i preživljavanje, otkriće fiziološki aktivnih komponenata u hrani biljnog i životinjskog podrijetla, sve veći interes za vlastito zdravlje, promjene u zakonskim regulativama vezanim uz hranu, brojne tehnološke inovacije te tržište zrelo za uvođenje produkata koji promoviraju zdravlje, doveli su tijekom 1990-tih do kreacije trenda koji je danas poznat kao „funkcionalna hrana“. Samim time, načelo „Neka tvoja hrana bude tvoj lijek, a tvoj lijek neka bude tvoja hrana“ koje je Hipokrat iznio pred gotovo 2500 godina je dobila novu i veću ulogu (Hasler, 1998; Hasler, 2002).

Pojam „funkcionalna hrana“ prvi se puta počeo koristiti u Japanu 1980-tih i odnosio se na prehrambene proizvode obogaćene nutrijentima koji posjeduju korisna fiziološka djelovanja (Hardy, 2000; Kwak i Jukes, 2001; Stanton i sur., 2005). Ministarstvo zdravstva Japana 1991 godine predstavlja pravila za odobrenje specifične zdravstvene kategorije hrane – FOSHU (Food for Specified Health Uses) što uključuje i uspostavljanje pravila za specifične zdravstvene tvrdnje za taj tip hrane (Burdock i sur. 2006; Kwak i Jukes, 2001a; Menrad, 2003; Roberfroid, 2000b).

Prema Ministarstvu zdravstva Japana FOSHU je:

- Hrana za koju se očekuje da zbog svog sastava ima specifične zdravstvene utjecaje ili hrana iz koje su uklonjeni alergeni;
- Hrana kod kojih je utjecaj dodataka ili uklonjenih tvari znanstveno vrednovan i dobivena je dozvola za tvrdnje o specifičnom pozitivnom učinku na zdravlje (Roberfroid, 2000a).

U većini zemalja ne postoje zakonske definicije naziva „funkcionalna hrana“ i postavljanje granice između konvencionalne i funkcionalne hrane je čak iza nutricioniste i prehrambene tehnologije izazov (Mark-Herbert, 2004; Niva, 2007). Također, postoji više različitih definicija funkcionalne hrane (FH). Jedna od definicija koja se najčešće koristi i na jednostavan način objašnjava pojam FH je ta da se hrana može nazvati „funkcionalna“ ako pored svoje osnovne

nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jedan ili više ciljanih funkcija tijela smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Roberfroid, 2000). Funkcionalna hrana može poboljšati opće stanje organizma, smanjiti rizik oboljenja od raznih bolesti, čak se može koristiti tijekom liječenja nekih bolesnih stanja (Mark-Herbert, 2004; Menrad, 2003). Neke od definicija funkcionalne hrane prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Različite definicije pojma „funkcionalna hrana“

<b>Organizacija</b>	<b>Definicija</b>
<b>Academy of Nutrition and Dietetics</b>	“Hrana definirana kao cjelovita hrana zajedno s obogaćenom hranom koja ima potencijalne pozitivne učinke na zdravlje kada se konzumira kao dio raznovrsne prehrane na regularnoj bazi pri efikasnim količinama“ (Crowe i Francis, 2013).
<b>International Food Information Council</b>	“Hrana ili komponente prehrane koje mogu pružite pozitivne učinke na zdravlje iznad uobičajene prehrane i mogu imati ulogu u reduciranju ili minimiziranju rizika od pojedinih bolesti i ostalih zdravstvenih stanja“(IFIC, 2009).
<b>Institute of Food Technologists</b>	“Hrana i komponente hrane koje pružaju pozitivne učinke na zdravlje iznad uobičajene prehrane (za populaciju kojoj je namijenjena)“ (IFT, 2012).
<b>International Life Sciences Institute</b>	“Hrana koja na temelju prisutnosti fiziološki aktivnih komponenti hrane pruža pozitivne učinke na zdravlje iznad uobičajene prehrane” (ILSI, 2012).
<b>European Commission</b>	“Hrana koja povoljno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu, iznad uobičajenih nutritivnih utjecaja, na način koji je relevantan za poboljšanje zdravlja i blagostanja i/ili redukciju rizika od bolesti. Dio je normalnog obrasca hranjenja. Nije tableta, kapsula ili bilo koji oblik dodatka prehrani” (EC, 2012).
<b>Health Canada</b>	“ <i>Funkcionalna hrana</i> je ili konvencionalna hrana ili je slična izgledom konvencionalnoj hrani, konzumira se kao dio normalne

	prehrane i dokazano je da ima fiziološke benefite i/ili reducira rizik od kroničnih bolesti iznad uobičajene prehrane”(HC, 2012).
<b>Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare</b>	“FOSHU (Hrana za specifičnu zdravstvenu upotrebu) odnosi se na hranu koja sadrži sastojke koji imaju funkciju poboljšanja zdravlja i službeno su odobreni tvrditi svoju učinkovitost na ljudsko tijelo. FOSHU je namijenjen konzumiranju s ciljem održavanja / promocije zdravlja i specifičnih zdravstvenih potreba ljudi koji žele kontrolirati svoje zdravstveno stanje, što uključuje krvni tlak te kolesterol u krvi“ (MHLW, 2012).

### 2.1.1. Tipovi funkcionalne hrane

Količina i vrste funkcionalne hrane koja se može razviti je ograničena samo našom maštom, zamijećenim zdravstvenim utjecajem na zdravlje i spremnošću kupca na kupovinu i konzumaciju takvoga proizvoda. Funkcionalnu hranu može se s jednostavnog i praktičnog gledišta podijeliti u pet skupina proizvoda, što je prikazano u Tablici 2. Primjeri za svaki od ovih tipova hrane se mogu se naći na tržištu. Za neke od tih proizvoda je očito da su FH, međutim drugi proizvodi nisu toliko transparentni (Spence, 2006).

**Tablica 2.** Tipovi funkcionalne hrane

Nemodificirana i neprerađena hrana (engl. whole food)	Najjednostavniji oblik funkcionalne hrane, hrana u svom prirodnom obliku
<b>Obogaćeni proizvodi</b>	Povećanje količine postojećih nutrijenata (engl. fortified food)
	Dodatak novih nutrijenata ili komponenti koji nisu normalno prisutni u određenoj hrani (engl. enriched food)

<b>Zmijenjeni proizvodi (engl. altered food)</b>	Zamjena postojeće komponente i/ili antinutrijenta s nutrijentima koji imaju povoljan učinak
<b>Poboljšani proizvodi (engl. enhanced commodities)</b>	Hrana kod koje je jedna ili više komponenta prirodno obogaćena kroz specijalne uvjete uzgoja biljaka, nove formule stočne hrane kod uzgoja životinja, genetske manipulacije i sl.

Na globalnoj razini, najveći je porast broja funkcionalnih napitaka budući da su oni prepoznati kao najbolji medij za funkcionalne sastojke. Tržište funkcionalnih napitaka obuhvaća veliku paletu proizvoda, od energetske do biljnih infuzija, voćnih sokova, mliječnih proizvoda, smoothies (svježe iscijeđeni sokovi od voća i povrća) i slično (Cock i Bechert, 2002).

Zdravstveno i prehrambeno osviješteni potrošači diktiraju razvoj novih proizvoda. Moderni funkcionalni napitci odraz su novih dinamičnih trendova u prehrambenoj industriji. Od bezalkoholnih napitaka više se ne očekuje samo osvježenje, nego se zahtijevaju i dodatni pozitivni učinci njihovog konzumiranja na očuvanje zdravlja i ljepote. Zdravstveni učinci pojedinih funkcionalnih prehrambenih proizvoda primarno ovise o „aktivnim” sastojcima koji im se dodaju u obliku izoliranih sastojaka i ekstrakata iz prehrambenih proizvoda ili biljaka. Što je više znanstvenih dokaza o pozitivnim učincima određenih sastojaka to je veći interes za njihovu primjenu u funkcionalnim proizvodima (Bender, 2008).

## 2.2. KAKAO KAO FUNKCIONALNI PROIZVOD

Kakao i čokolada dobivaju se od zrna kakaovca (*Theobroma cacao L.*). Ova biljka daje velike plodove, oblika ovalnih, izduženih mahuna od kojih se svaki sastoji od 20-60 zrna kakaovca koji su okruženi bijelom, ljepljivom pulpom (Afoakwa, 2010; Cinquanta i sur., 2016; Badrie i sur., 2015).

Kakao je smeđi prah ugodna mirisa, a dobiva se mljevenjem ostatka nakon vrućeg prešanja i izdvajanja kakaova maslaca iz osušenih sjemenaka kakaovca, od kojih se dobivaju i drugi kakaovi proizvodi i čokolada. Sam kakao prah služi i za pripremu istoimenoga napitka s mlijekom (Anonymous, 2018a).

Usporednom nutritivnih vrijednosti raznih produkata napravljenih od zrna kakaovca (bilo sirovog ili prženog), najveće razlike između njih nalaze se u njihovoj energetske vrijednosti (kalorijama) te udjelu šećera i masti (Anonymous, 2018b; Anonymous, 2018c). Detaljniji prikaz dan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Pregled odabranih nutritivnih vrijednosti raznih produkata od zrna kakaovca na 28 grama proizvoda (Anonymous, 2018b; Anonymous, 2018c).

	Nezaslađeni kakao prah	Nezaslađena fermentirana kakao zrna	Polu zaslađene čokoladne kapljice	Tamna čokolada, 70% kaka
<b>Energija (kcal)</b>	64	160	140	160
<b>Masti (grama)</b>	3.5	11	8	13
<b>Zasićene masti (grama)</b>	2	2.5	5	8
<b>Proteini (grama)</b>	5	9	1	2
<b>Ugljikohidrati (grama)</b>	16	6	20	14
<b>Šećer (grama)</b>	0	0	18	9
<b>Vlakna (grama)</b>	9	3	1	3
<b>Željezo</b>	22% RDI	4% RDI	12% RDI	30% RDI



Proizvodi od kakaia su izvrstan izvor nekoliko različitih mineralnih tvari, kao što su selen, magnezij, krom i mangan. Generalno gledano, što je čokolada „tamnija“ (što znači da ima veći udio kakaia) to je veći udio mineralnih tvari u njenom sastavu (Cinquanta i sur., 2016).

Iako na nutritivnim deklaracijama nije navedeno, kakao sadrži značajne količine antioksidansa. Njihov udio u pojedinom proizvodu varira te najviše ovisi, među ostalim, o vrsti kakaia, uvjetima njegovog rasta te metodama korištenih kod procesiranja. Opet, generalno gledano, što je manje kakao procesiran, posebice u uvjetima visoke temperature, to je udio antioksidanasa veći (Badrie i sur., 2015; Camu i sur., 2008).

Dugo vrijeme kakao i čokolada konzumirani su iz čisto hedonističkih razloga, međutim u posljednjih 20-tak godina, istraživači su dokazali kako tamna čokolada (veći udio kakaia) te kakao u prahu možebitno imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, prvenstveno zbog relativno visoke koncentracije polifenola koje sadrže (Ackar i sur., 2013). Polifenoli su velika i heterogena grupa biološki aktivnih spojeva. Po strukturi su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku u prirodi, uglavnom su u esterificiranom ili konjugiranom obliku (Čović i sur., 2009). Sekundarni su biljni metaboliti koji služe kao potporni materijal u staničnim stjenkama, biljci daju šarenu boju za privlačenje ptica i insekata te kao obrambeni mehanizam usred raznih stresnih uvjeta u okolišu (ranjavanja, infekcija, pretjeranog svjetla ili UV zračenja) (Hakkinen, 2000).

### **2.2.1. Utjecaj kakaia i proizvoda od kakaiova zrna na zdravlje**

Zrna kakaovca i njegovi proizvodi bogati su izvor bioaktivnih biljnih komponenti, posebice spomenutih polifenola od kojih najviše onih iz grupe flavanola. Mnoga istraživanja su dokazala kako polifenoli/polifenolima bogata hrana imaju pozitivne utjecaje na zdravlje (Han i sur., 2007; Cooper i sur., 2008). Flavanoli imaju, između ostaloga, antioksidativni i antikancerogeni učinak te pozitivno utječu na zdravlje kardiovaskularnog sustava (Ndife i sur., 2013).

Zabilježena je korelacija između povećane konzumacije napitaka od kakaia te sniženih razina krvnoga tlaka, infarkta miokarda, moždanog udara, dijabetesa tipa 2 te karcinoma kod pripadnika Kuna Indijanaca (Hollenberg, 2009). Sličnu pojavu pokazalo je i istraživanje provedeno nad starijim muškarcima koji nisu imali nikakvih kroničnih bolesti. Kod njih je

redukcija krvnog tlaka i rizika od kardiovaskularnog mortaliteta iznosila 45-50% (Buijsse i sur., 2006).

Vrući napitak od kakaia dokazano uspješno reducira količinu LDL kolesterola, povećava količinu HDL kolesterola te supresira oksidaciju LDL-a (Baba i sur., 2007).

Kakao sadrži željezo koje je, za razliku od većine biljnih izvora, odlično bioiskoristivo te zbog toga, prvenstveno, vegani i vegetarijanci mogu imati značajne koristi od njegove konzumacije (Cinquanta i sur., 2016).

Kakao također sadrži triptofan, aminokiselinu koja se u tijelu koristi za sintezu serotonina („hormona sreće“), neurotransmitera koji je zaslužan za osjećaj sreće i relaksiranosti (Badrie i sur., 2015).

### **2.2.2. Instant kakao napitci – značaj i proizvodnja**

Instant napitci bazirani su na aglomeraciji praha čime se omogućava njegovo potpuno otapanje i disperzibilnost u određenoj količini tekućine (Schubert, 1993). Dobar instantizirani proizvod nema čestica koje plutaju po površini ili sedimenta na dnu tekućine. Instant kakao proizvodi se dodaju u hladnu vodu ili mlijeko. Kakao prah odlične kvalitete ima sposobnost slobodnog tečenja, stabilan je ima ujednačenu boju i aromu, dobre je mikrobiološke kvalitete te jednostavan za korištenje (de Muijnck, 2005). Kakao prah se ne raspršuje potpuno u vodi/mlijeku zbog prisustva hidrofobnih dijelova (masti) na površini čestica te ima tendenciju formiranja grumena (Wieland, 1972). Postoji nekoliko metoda kojima se pokušava poboljšati disperzibilnost: prvi način je da se kakao prah pomiješa, u vodi/mlijeku, zajedno s drugim čvrstim komponentama kao što su saharoza i/ili mlijeko u prahu. Drugi način je da se u kakao napitak dodaje lecitin. Lecitin je molekula koja se sastoji od hidrofobnog i hidrofilnog dijela. Hidrofobni dio lecitina okreće se i orijentira prema vanjskom, hidrofobnom dijelu kakao praha, dok je hidrofilni dio tada orijentiran suprotno, prema van. Na taj način stvorena je kakao čestica čiji vanjski sloj ima hidrofilni karakter te se lako disperzibira u vodenoj otopini. Treći način kojim se nastoji poboljšati disperzibilnost kakao praha je stvaranje aglomerata kakaia, šećera i ostalih čvrstih čestica. Aglomeracija se obično definira kao proces čiji je glavni cilj kontrola poroznosti i gustoće materijala čime se utječe na osobine kao što su gustoća i topljivost. Glavni princip na kojem se proces temelji je nastajanje čvrstih ili tekućih mostova, van der Waalsovih

sila, elektrostatskih sila i vezivnih veza između čestica, čime nastaju veće, porozne strukture (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Tijekom ovog procesa, kristali šećera se navlaže vodom ili parom te kakao i ostale čvrste čestice tada imaju mogućnost prijanjanja na vlažne kristale šećera. Nakon toga takvi se aglomerati podvrgavaju procesu sušenja. Na taj način dobivaju se aglomerati kakaa i šećera koji se lagano disperziraju u hladnoj vodi/mlijeku (Anonymous, 1999). Brojne metode mogu se koristiti za aglomeraciju kakao praha: aglomeracija parom, aglomeracija i sušenje u tekućem sloju, termalna aglomeracija i mikser sa visokim smicanjem za mokru aglomeraciju. Sama aglomeracija poboljšava rekonstitucijska svojstva te je zbog toga važno da se stupanj aglomeracije i kompaktnost praha mogu kontrolirati tijekom procesa proizvodnje (Benković i Bauman, 2011; Benković i sur., 2015).

Aglomeracija i sušenje u fluidiziranom sloju najšire je korištena metoda u proizvodnji instant kakao napitaka zbog brojnih prednosti koje ima: brza je i efikasna, sustav za upravljanje je moguće automatizirati čime se omogućava kontinuirano i istovremeno praćenje i mjerenje velikog broja varijabli, itd. (Silva i sur., 2011). Aglomeracija u fluidiziranom sloju kategorizira se kao sistem jedne komore zbog toga jer se svi elementarni procesi zbivaju u istoj komori. U samom procesu aglomerati (porozne čestice) dobivaju se time što se, u komori za sušenje, otopina veziva (najčešće lecitina) raspršuje po smjesi za aglomeraciju, koja se sastoji od šećera i kakaa. Aglomeracija nastupa kada vlažne čestice udaraju jedna o drugu te dolazi do nastajanja tekućih mostova između njih. U samoj komori istovremeno struji i vrući zrak koji služi za sušenje tako dobivenih aglomerata, koji nastaju usred isparavanja otapala te formiranja čvrstih mostova (očvršćivanje vezivne tvari). Kada se takvi procesi vlaženja, sudaranja i sušenja ponavljaju, fluidizirane čestice rastu usred međusobne aglomeracije (Ji i sur., 2015; Benković i Bauman., 2011).

### **2.2.3. Sušenje u pjenu**

Sušenje je važan proces za konzerviranje sirove hrane. Događa se kada se vodena para odstranjuje sa površine materijala u okolinu što rezultira sušenim materijalom koji ima produljeni rok trajanja, reducirani aktivitet vode što dalje dovodi do inhibicije rasta mikroorganizama i smanjenja nepoželjnih enzimatskih reakcija te fizikalnih i kemijskih promjena tijekom skladištenja (Mayor i Sereno, 2004; Falade i Solademi, 2010).

Za proizvodnju instant kakao napitaka sušenje u fluidiziranom sloju je najčešće primjenjivana metoda. Iako je najčešća, ima brojne nedostatke kao što suveliki troškovi instalacije, mala termička efikasnost i visoki utrošak energije (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Glavni princip na

kojem se sušenje u pjenu temelji je konverzija tekuće ili polutekuće hrane u stabilnu pjenu te ugradnja velikog volumena plina u smjesu. Pjena je koloid kod kojeg je plin dispergirani u kontinuiranoj tekućoj fazi. Dispergirana faza (zrak) smatra se internom fazom, dok je kontinuirana faza eksterna faza. Dispergirana faza je veća od kontinuirane faze (German i Phillips 1994; Baniel i sur. 1997). S obzirom na omjer dispergirane prema kontinuiranoj fazi, pjena se može klasificirati u polihedričnu i razrijeđenu mjehuričastu formu pjene (Prins 1988).

Pjena se proizvodi na 3 načina: propuhivanjem zraka, udaranjem/tučenjem i treskanjem. Među njima najčešća je tučenje pjene pomoću raznih blendera ili specijalno dizajniranih miješalica. Pjena se zatim prostire u tankom sloju na podložak i izlaže struji vrućeg zraka do trenutka postizanja željenog sadržaja vlage. Usred nastanka pjene povećava se površina koja je izložena zraku, ubrzava se isparavanje te je zbog toga sušenje moguće izvesti kod nižih temperatura što ju ujedno čini i jeftinijom (Brygidyr i sur, 1977).

Sušenje u pjenu je jednostavna i ekonomična metoda, a glavne prednosti su: održivost svih tipova napitaka, mogućnost brzog sušenja pri nižim temperaturama, očuvanje nutritivnih kvaliteta te jednostavna rekonstrukcija te je uz to značajno jeftinija od vakuum, sušenja smrzanjem ili u fluidiziranom sloju (Sangamithra i sur., 2014; Kadam i sur., 2010; Ratti i Kudra, 2006). Nadalje, postupak ima sve veću komercijalnu primjenu kod sušenja tekućina kao što su mlijeko, voćni napitci, kave i čaja (Bag i sur., 2011) te se koristi za dobivanje slobodno-tekućih prahova iz materijala koji imaju tendenciju prijanjanja na zidove raznih komora (Benković i sur., 2018). Razlika između sušenja u pjenu i ostalih metoda sušenja je u tome što se sušenjem u pjenu mijenja fizikalna struktura sirove hrane time što dolazi do slamanja stanične stijenke te inkorporacije plina, najčešće zraka. Za razliku od toga kod ostalih metoda ne dolazi do fizikalnih promjena (Mounir, 2017).

Stabilna plin-tekućina pjena je primarni uvjet za uspješno sušenje u pjenu. U tu svrhu koriste se različita sredstva za pjenjenje, kao što su proteini, razne gume te ostali emulzifikatori (Mounir, 2017). Sredstva za pjenjenje su surfaktanti, tj. tvari koje smanjuju površinsku napetost između dvije tekućine, ili između tekućine i čvrste tvari te olakšavaju nastajanje pjene. Kvalitete koje takvo sredstvo mora imati uključuju neposrednu mogućnost adsorpcije na granici zrak-tekućina, uzajamnu interakciju između proteina koja nastaje na granici te formiranje jakog kohezivnog i viskozno-elastičnog filma. Proteini daju odličnu stabilnost pjenama zbog svoje hidrofobnosti i mogućih konformacijskih promjena koje omogućuju brzu adsorpciju i nastajanje koherentnog elastičnog adsorptivnog sloja (Dickinson, 1998). Najčešće korištena

sredstva za pjenjenje su bjelanjak, želatina, proteini mlijeka (protein sirutke, kazein) te sojini proteini (Sangamithra i sur., 2014).

U literaturi ne postoje brojni primjeri primjene sušenja u pjenu na kakao prahu, unatoč tome što zbog svega gore navedenog sušenje u pjenu predstavlja zanimljivu alternativu kod proizvodnje instant kakao napitaka te je takav način primjene potrebno dodatno istražiti.

#### **2.2.4 Obogaćivanje instant kakao proizvoda i razvoj novih funkcionalnih kakao napitaka**

Mnoga istraživanja pokazala su da, iako malnutricija nije pretjerano prisutna u razvijenim zemljama, postoje mikronutrijenti koji su često kritični, tj. određene dobne skupine ne unose ih u dovoljnim količinama. Zbog toga obogaćivanje hrane raznim kritičnim mikronutrijentima (npr., kalcij, željezo, jod, magnezij) predstavlja dobru mjeru u cilju povećanja njihova unosa (FAO/WHO, 2014.) U smislu obogaćivanja, napitci predstavljaju odlično rješenje zbog toga jer se lagano konzumiraju uz uobičajeni obrok, a u pogledu instant kakao napitka dodatno i zbog toga jer su česti u prehrani djece koja su jedna od ugroženih skupina po pitanju određenih nutritivnih nedostataka (Mensink i sur., 2013). U današnje doba postoje razni proizvodi instant kakao napitaka koji su dodatno obogaćeni mikronutrijentima. Tako Nestle ima brojne obogaćene proizvode, npr. Nestle Hot Cocoa koji je obogaćen s kalcijem, vitaminima A, C, E, B6, B12 i željezom te Nesquik koji je obogaćen željezom, cinkom i vitaminima D, C i B1. Nadalje, proizvođač Copper moon ima proizvod Hot cocoa koji je također obogaćen vitaminima A, E, B1, B2, B3, B6, B7, B9, B12, K1, D željezom, cinkom, kalcijem i manganom te je također deklariran kao proizvod koji umjesto šećera sadrži sladilo sukralozu. Od hrvatskih proizvođača na tržištu su prisutni proizvodi Kraš express, koji je obogaćen kalcijem te vitaminima A, B, C i D i Lino čoko drink koji je obogaćen vitaminom D i kalcijem. Nedavno, rastom popularnosti „ketogene dijeta“, razvijena je formulacija nazvana „Bulletproof cocoa“ koja umjesto šećera sadrži poliole (ksilitol), a specifična je po puno većem udjelu kakao maslaca od uobičajenih instant kakao proizvoda. U cilju dodatnog poboljšanja pozitivnih utjecaja kakaa na zdravlje, zanimljivo je obogaćivanje instant kakao proizvoda raznim biljnim ekstraktima. Ekstrakt industrijske konoplje predstavlja interesantan dodatak kakao napitku zbog svog antioksidativnog djelovanja te sadržaja terpena i kanabinoida. Uz pozitivne utjecaje na zdravlje ima i zanimljiv miris i okus koji može dodatno obogatiti kakao napitak.

## 2.3. INDUSTRIJSKA KONOPLJA

Konoplja je biljka koja pripada porodici *Cannabaceae* te je najpoznatija po svojim psihoaktivnim svojstvima. Međutim, u posljednje vrijeme sve je češće primjenjivana u prehrambenoj industriji sa ciljem povećanja nutritivnih i funkcionalnih svojstava prehrambenih proizvoda (kruh, peciva, pivo, proteinski prah, čaj, kava, burger, voda, maslac, mlijeko, brašno), ponajprije zbog prisustva  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina, terpena te visokovrijednih proteina (Hazekamp 2009). Pregled osnovnih karakteristika industrijske konoplje dan je u nastavku.

### 2.3.1. Taksonomija konoplje

Prema trenutnoj botaničkoj klasifikaciji konoplja (*Cannabis sativa* L.) pripada porodici *Cannabaceae* (*Cannabaceae* ili *Cannabidaceae*). Konoplja (lat. *Cannabis* = konoplja, podvrsta: *sativa* = korisna) je imala široku primjenu u povijesti. Smatra se da je uzgoj započeo na području Kine prije više tisuća godina. Kinezi su početkom n.e. operirali bolesnike uz pomoć konopljine smole i vina kao anestetika. Njena primjena spominje se u indijskim i perzijskim vjerskim zapisima. Koristila se u prehrani, proizvodnji odjeće, industriji, u liječenju i u duhovne svrhe (Lu, 2014; Snyderman, 2012). Industrijska konoplja se danas koristi u razne svrhe od kojih su najvažnije one za proizvodnju vlakna, sjemenki te ulja (Smeriglio i sur., 2016).

Kao rezultat stoljetnog uzgoja, selekcije i križanja, danas u svijetu postoji velik broj sorata ili kultivara konoplje. Prema Snoijeru (2001) opisano je preko 700 različitih kultivara konoplje, no danas se smatra da je ta brojka puno veća. Do sada je predloženo nekoliko klasifikacija konoplje. Prema Schultes i sur. 1974., postoje tri vrste konoplje: *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* Lam. i *Cannabis ruderalis* Janisch. Small i Cronquist, 1976. smatraju da postoji samo jedna vrsta konoplje, ali s dvije podvrste: *Cannabis sativa* L. spp. *sativa* i *Cannabis sativa* spp. *indica*. No unatoč predloženim klasifikacijama globalno je uvaženo da je konoplja monotipična biljka koja ima samo jednu vrstu *Cannabis sativa* L (Beutler i Der Marderosian, 1978).

Za forenzičke i zakonodavne svrhe vrlo je bitno da se razlikuju dva tipa konoplje, onaj za proizvodnju droge ili lijeka i tip za industrijske svrhe. U Republici Hrvatskoj konoplju sa zakonodavnog stajališta dijelimo na industrijsku konoplju i indijsku konoplju. Glavna i najbitnija razlika između ova dva tipa je udio psihoaktivnog delta-9-tetrahidrokanabinola ( $\Delta^9$ -THC). Ukoliko taj udio prelazi 0,2% THC-a u suhoj tvari onda se konoplja smatra tipom za proizvodnju droge/lijeka, ukoliko ne prelazi navedenu granicu onda se takva konoplja smatra industrijskom. Konoplja koja se koristi za medicinsku upotrebu u većini slučajeva ima visok udio biološki aktivnog THC-a.

### **2.3.2. Sastav industrijske konoplje**

Iako se industrijska konoplja ne upotrebljava za medicinske ili „rekreativne“ svrhe, njezino sjeme nudi niz esencijalnih nezasićenih masnih kiselina, visoki udio lako probavljivih biljnih proteina, uključujući sve esencijalne aminokiseline, velik postotak prehrambenih vlakana, razne bioaktivne fitonutrijente i širok raspon vitamina i minerala (Hazekamp, 2009).

Kanabinoidi se smatraju najvažnijim biološki aktivnim spojevima u biljci konoplje. Uvijek se smatralo da je delta-9-tetrahidrokanabinol (THC) glavna aktivna tvar raznih preparata na bazi konoplje, međutim raznim analizama u proteklih dvadesetak godina otkriveno i opisano oko 66 drugih kanabinoida. Vjerojatno najvažnija nepsihotropna komponenta konoplje je kanabidiol (CBD), koji se u većim koncentracijama nalazi u industrijskoj konoplji. Kultivacija sorti konoplje koje su bogate CBD-om te različitim fenolnim supstancama može biti izuzetno korisna, ne samo kao biljka za proizvodnju vlakna, nego i u cilju liječenja različitih upalnih procesa u tijelu. CBD je prekursorsna molekula u organskom putu kanabinoida. Koncentracija CBD-a ima inverzni odnos s THC-om, zbog toga je industrijska konoplja siromašna THC-om, ali i bogata s CBD-om. Dok je kod indijske (medicinske) konoplje udio THC-a veći, ali udio CBD-a nešto niži. Istraživači su otkrili kako kombinacija THC-a i CBD-a značajno umanjuje anksioznost i psihotropno djelovanje u odnosu na situaciju kada je udio THC-a naprema CBD-u puno veći. Zbog toga CBD, na neki način, djeluje kao kemijski pufer konoplje za psihoaktivna djelovanja kanabinoida. Osim umanjivanja negativni učinaka THC-a, čini se kako CBD može biti koristan kod raznih medicinskih stanja bez iskazivanja nekakvih negativnih učinaka. Među takvim učincima su njegova aktivnost kao antikonvulziv kod epilepsije, kao protuupalno sredstvo, kao pomoć kod kronične insomnije te kao antipsihotik. Kanabidiol (CBD) se pokazao

kao odlično antiinflamatorno sredstvo, čak potentnije nego li je aspirin u liječenju određenih upalnih poremećaja (Conrad, 1997).

Ulje konoplje s visokim udjelom CBD-a istražuje se u brojnim *in-vitro* i istraživanjima na životinjama, a tijekom posljednjih godina provedeno je i više originalnih kliničkih istraživanja. Temeljna područja u kojima se CBD istražuje su epilepsija (Dravet sindrom), tjeskoba i nesanica, neurodegenerativne bolesti, upale, bolovi, te različite autoimune bolesti i bolesti kože, budući da se promovira i topikalna primjena. Također, istražuje se i suportivna primjena CBD-a kod malignih bolesti (Pisanti i sur., 2017).

Pregled sveukupnih mehanističkih učinaka CBD-a prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Multifaktorijalan učinak CBD-a na zdravlje (Pisanti i sur., 2017).

Pored kanabinoida i njihovog učinka na zdravlje, identificiran je i velik broj terpenoida prisutnih u biljci konoplje, uključujući 58 monoterpenoida, 38 seskviterpenoida, jedan diterpenoid, dva triterpenoida i još nekoliko drugih terpenoida (Hazeckamp, 2007).



Terpeni mogu proizvesti vlastite farmakološke učinke; neki od njih su moćni antibiotici, dok drugi, na primjer, imaju analgetička ili protuupalna svojstva (Hazekamp, 2009).

### **2.3.3. Antioksidativna aktivnost industrijske konoplje**

Industrijska konoplja, poglavito sjemenke konoplje identificirane su kao vrijedan izvor antioksidansa (Chen i sur., 2012).

Ulje sjemenke konoplje sadrži velike količine polifenola od čega 2780,4 mg ekvivalenta kvercentina na 100 grama ukupnih flavonoida. Značajna antioksidativna aktivnost konoplje dolazi od flavonoida, od kojih najviše flavanona, flavanola, flavonola i izoflavona (Smeriglio i sur., 2016).

Sjemenke i klice konoplje bogati su izvor fitokemikalija, od kojih najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju kafeoil tiramin te kanabisini A, B, C. Kanabisini spadaju u skupinu fenolnih amina i lignan amida, a najprisutniji kanabisin je kanabisin B nakon njega C te najmanje kanabisin A. Prepoznato je antiproliferativno djelovanje kanabisina B, zbog čega se smatra odličnim kemoprotektivnim agensom kod hepatoblastoma (Chen i sur., 2013). Isto tako je opisano kako kanabisini te kafeoil tiramin izolirani iz sjemenke konoplje imaju značajnu inhibicijsku aktivnost na DPPH radikal te protektivni učinak na *in-vitro* oksidaciju ljudskih LDL-a (lipoproteina niske gustoće) (Chen i sur., 2012). Bioaktivne komponente konoplje posjeduju *in-vitro* i *ex-vivo* antioksidativnu aktivnost, te antimutageni aktivnost čime imaju veliki potencijal kod primjene u prehrambene svrhe (Frassinetti i sur., 2018).

Sjemenke konoplje također su bogat izvor vitamina E i minerala kao što su fosfor, kalij, natrij, magnezij, sumpor, kalcij, željezo i cink (Callaway, 2004). Vitamin E u značajnoj mjeri, zajedno s flavonoidima, doprinosi antioksidativnoj aktivnosti ulju sjemenke konoplje (Smeriglio i sur., 2016).

Značajnu antioksidativnu aktivnost posjeduju i izolati proteina sjemenke konoplje. Izolati proteina zajedno s njihovim ultrafiltriranim frakcijama posjeduju *in-vitro* antioksidativnu aktivnost. Dokazana je njihova djelotvornost za inhibiciju aktivnosti DPPH i hidroksil radikala, reduciranje iona željeza, u feri obliku, te keliranje iona metala čime imaju značajnih

pozitivnih utjecaja na poboljšanje raznih metaboličkih poremećaja koji dolaze od pretjeranih razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) u organizmu (Girgih i sur., 2011).

Kao što je već prikazano na Slici 1., kanabidiol također ima antioksidativnu aktivnost. Kanabidiol može prevenirati neurotoksični učinak glutamata te smrt stanice induciranu reaktivnim kisikovim vrstama. Takav neuroprotektivni učinak je zabilježen i kada je umetnut antagonist kanabinoidnih receptora u tijelu, što znači da kanabidiol ima antioksidativni učinak koji je neovisan o endogenom kanabinoidnom sistemu, koji je među ostalim odgovoran i za psihoaktivno djelovanje kanabinoida. Koristeći *in-vitro* model neuronske toksičnosti glutamata, kanabidiol se pokazao kao značajno više protektivan nego što su to uobičajeni antioksidativni vitamini,  $\beta$ -tokoferol (vitamin E) i askorbinska kiselina (vitamin C). Nedavna *in-vivo* istraživanja kod miševa pokazala su da je njegovo djelovanje na toksičnost glutamata vrlo slična onome što znamo iz prethodnih *in-vitro* istraživanja (Hampson i sur., 2006).

#### **2.3.4 Upotreba industrijske konoplje u prehrambenim proizvodima**

Od kada je prepoznata kao odličan izvor raznih nutrijenata i bioaktivnih spojeva, industrijska konoplja doživjela je procvat upotrebe u prehrambenim proizvodima. Koristi se u razne svrhe, a dostupna je u obliku sjemenki konoplje, ulja sjemenki konoplje, proteinskog praha sjemenke konoplje, čaja od konoplje, maslaca sjemenki konoplje, konopljinog mlijeka, konopljinog brašno za proizvodnju raznih pekarskih proizvoda (kruh, pecivo). Nadalje, konoplja se upotrebljava i u proizvodnji energetskih pločica, kave s konopljom, burgera i „Hot dog-ova“ s konopljom, „Hemp2O“ – vode s konopljom, pive i vodke od konoplje te granole/žitnih pahuljica od konoplje.

S obzirom na brojne pozitivne učinke kako kakaa, tako i industrijske konoplje na zdravlje te njezinu sve veću upotrebu u prehrambenim proizvodima, cilj ovog rada bio je proizvesti nov, funkcionalan proizvod: instant kakao prah obogaćen ekstraktom industrijske konoplje. Prah je dobiven sušenjem u pjenu i mljevenjem te je istraživ utjecaj tipa (vodeni i mikroinkapsulirani) i količine dodanog ekstrakta na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva praha i njegovu stabilnost prilikom prolaska kroz probavni sustav.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

- Industrijska konoplja (*Cannabis sativa L.*) iz Međimurske županije; berba 2017. (OPG Levačić, Prelog, Hrvatska).
- Želatina mljevena goveđa (Podravka d.d., Koprivnica, Hrvatska)
- Suncokretovo ulje (Tvornica ulja Čepin d.d., Čepin, Hrvatska)
- Bjelanjak (Elcon prehrambeni proizvodi, Zlatar Bistrica, Hrvatska)
- Kakao (Kraš, Zagreb, Hrvatska)
- Šećer (Kraš, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pa. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Slovenija)
- Galna kiselina, 98% (AcrosOrganics, SAD)
- Trolox (Fluka, Švicarska)
- Glicerol, 85% (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, Hrvatska)
- Fosfatni pufer,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$
- Klorovodična kiselina (HCl),  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Paris, Francuska)
- $\alpha$  amilaza (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)

- Natrijev klorid (NaCl) (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>) (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Pepsin (Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrijev hidrogenkarbonat (Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>) (Frank, Zagreb, Hrvatska)
- Pankreatin (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Žučne soli (SigmaAldrich, Auckland, Novi Zeland)

### 3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Latvija)
- Centrifuga (Hettich EBA 8, Njemačka)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- Aparatura za vakuum filtraciju (Rocker 300 – LF 30, New Taipei City, Taiwan)
- Klipna pumpa (NE-300, New Era Pump Systems, Farmingdale NY, SAD)
- Vibracioni volumetar (laboratorijska izrada)
- Analizator veličine čestica (Malvern Mastersizer 2000, Velika Britanija)
- Analizator tečenja prahova (Powder Flow Analyser, Stable Micro Systems, Velika Britanija)

Pribor:

- Filter papir od celuloze (veličina pora 20  $\mu\text{m}$ )
- Stakleni ljevak
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Menzura volumena 250 mL
- Metalna špatulica
- Aluminijske posudice s poklopcem
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Mikropipete volumena 100  $\mu\text{L}$  i 500  $\mu\text{L}$
- Kiveta od kvarcnog stakla
- Falkon kivete 15 ml
- Pasteur pipeta
- Aluminijski pladanj (dimenzije 21 cm x 25 cm)
- Šprica
- Eppendorf kivete

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema ekstrakata

#### 3.2.1.1. Priprema tekućeg ekstrakta

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva temelji se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010). Provodi se na način da se u staklenu čašu volumena 200 mL odvaže 2 g uzorka usitnjenog osušenog bilja te se prelije sa 100 mL destilirane vode zagrijane na temperaturu od 80 °C. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na 80 °C u uljnoj kupelji s integriranom miješalicom pri 250 rpm tijekom 60 minuta. Nakon isteka zadanog vremena ekstrakcije, vrući uzorak se profiltrira pomoću filter papira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze te se skladišti u zamrzivaču do daljnje upotrebe.

#### 3.2.1.2. Priprema mikroinkapsuliranog ekstrakta

Mikroinkapsulacija je proces oblaganja bioaktivne komponente nekom drugom tvari s ciljem očuvanja bioaktivnih svojstava obložene tvari. Oblikovane mikrokapsule su obično male kuglice čiji promjer može iznositi od nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara (Estevinho i sur., 2013).

Proizvodnja mikroinkapsuliranog ekstrakta provodi se na način da se u Falcon kivetu volumena 50 mL odvaže 1,6 g glicerola i doda 40 mL prethodno pripremljenog tekućeg ekstrakta. Otopina se stavi u hladnjak kako bi se dobro ohladila. Nakon toga izvaže se 4 g želatine u prahu i doda se ohlađenoj otopini ekstrakta i glicerola. Ostavi se stajati 10 minuta da želatina nabubri. Nakon 10 minuta otopina se zagrije dok se sva želatina ne otopi, pri čemu je važno pripremiti da se smjesa ne počne kuhati. Pripremljena vruća otopina prenese se u špricu na koju se stavljaju mikrokapsule. Šprica sa mikrokapsulama montira se na klipnu pumpu podešenu na protok 1000  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Istovremeno se pripremi čaša sa ohlađenim uljem koja se smjesti na izlaz kapilare. Pokrene se pumpa i kapljice se skupljaju u čašu s ohlađenim uljem, potrebno je stalno pomicati čašu da ne dođe do spajanja čestica u ulju. Nakon pripreme mikrokapsula smjesa se ostavi stajati 1 h te se nakon toga ocijedi ulje. Tako pripremljene mikrokapsule drže se u hladnjaku do upotrebe.

### 3.2.2. Sušenje u pjeni: čista kakao mješavina, kakao mješavina s tekućim ekstraktom, kakao mješavina sa mikroinkapsuliranim ekstraktom

Prvo se priprema temeljna kakao/šećer smjesa. U tu se smjesu dodaje instant želatina. Bjelanjak se izmiješa sa ekstraktom 4 min pri maksimalnoj brzini te se nakon miješanja pažljivo ručno umiješavaju suhi sastojci. Od tako pripremljene pjene uzima se 10 mL u prethodno izvaganu Falcon kivetu od 50 mL za određivanje gustoće i stabilnosti pjene. Pripremljena pjena ravnomjerno se rasporedi po aluminijskom pladnju i suši preko noći na 60 °C. Nakon završenog sušenja aluminijski pladnjevi se izvade i ostave ohladiti. Ohlađeni uzorci se tada izmelje kako bi se dobio prah. Sastav smjesa i uvjeti proizvodnje pjena prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Sastav smjesa i uzoraka kakao praha

Set 1: kontrolni uzorak	Set 2: dodatak tekućeg ekstrakta	Set 2: dodatak mikroinkapsuliranog ekstrakta
<b>Uzorak K: 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine</b>	<b>Uzorak E2,5:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 2,5% w/w tekućeg ekstrakta	<b>Uzorak A2,5:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 2,5% w/w mikroinkapsuliranog ekstrakta
	<b>Uzorak E5:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 5% w/w tekućeg ekstrakta	<b>Uzorak A5:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 5% w/w mikroinkapsuliranog ekstrakta
	<b>Uzorak E10:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 10% w/w tekućeg ekstrakta	<b>Uzorak A10:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 10% w/w mikroinkapsuliranog ekstrakta
	<b>Uzorak E15:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 15% w/w tekućeg ekstrakta	<b>Uzorak A15:</b> 50 g temeljne smjese kakao/šećer (30:70), 80 g bjelanjka, 0,5% w/w želatine, 15% w/w mikroinkapsuliranog ekstrakta

### 3.2.2.1. *Gustoća pjene*

Određivanje gustoće pjene provodi se tako što se od prethodno pripremljene pjene uzima 10 mL u prethodno izvaganu Falcon kivetu od 50 ml. Nakon toga uzorak koji se nalazi u Falcon kiveti izvaže se na analitičkoj vagi. Gustoća se izračunava tako što se od mase uzorka zajedno s Falcon kivetom oduzma masa prazne Falcon kivete te se ta masa podijeli s volumenom uzorka koji je stavljen u Falcon kivetu.

### 3.2.2.2. *Stabilnost pjene*

Analiza stabilnosti pjene provodi se tako što se od iste prethodno pripremljene pjene uzima 10 mL i stavlja u Falcon kivetu od 50 ml. Nakon toga se očita početni volumen uzorak u Falcon kiveti te se ostavlja stajati 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se ponovo očitava volumen. Stabilnost pjene se izražava kao postotak konačnog volumena u odnosu na početni volumen uzorka u Falcon kiveti.

### 3.2.2.3 *Određivanje suhe tvari pjene*

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem odvaži se 3 g uzorka. Sušenje uzorka traje 3 sata pri 105°C u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari odnosno vode. Izračun suhe tvari provodi se prema jednadžbama 1 i 2:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi:

$$\% \text{ vode} = (a - b) \cdot 100 / m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)



b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

Provode se tri paralelna mjerenja.

### **3.2.3. Fizikalna svojstva dobivenih kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje**

#### *3.2.3.1. Raspodjela veličine čestica*

Mjerenja se provode uz pomoć laserskog analizatora veličine čestica (Mastersizer 2000) i jedinice za suhu disperziju (Scirocco 2000). Laserska difrakcija mjeri distribuciju veličine čestica na način da mjeri kutnu varijaciju u intenzitetu svjetlosti koji se rasprši usred prolaska laserske zrake kroz dispezni uzorak čestica. Podaci o kutnom raspršivanju intenziteta svjetlosti se tada analiziraju te se koristi Mie teorija o raspršivanju svjetlosti kako bi se izračunala veličina čestica koje su dovele do takvog obrasca raspršivanja (Fu i Sun, 2001).

Uzorak se usipa u kadicu jedinice za suhu disperziju koja je opremljena sitom za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Prije mjerenja provodi se mjerenje pozadinskog šuma koji nastaje kao rezultat struje zraka kroz mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake podešava se na 2 – 6%, za svaki su uzorak provode se 3 paralelna mjerenja, svako u trajanju od 10 sekundi.

#### *3.2.3.2. Suha tvar prahova*

Postupak određivanja suhe tvari prahova provodi se kao što je prethodno opisano u odjeljku 3.2.2.3.

### 3.2.3.3. Nasipna gustoća

Određivanje nasipne gustoće provodi se na način da se uzorak slobodno nasipa u menzuru do ukupnog volumena 250 mL te se izvaže. Nakon očitavanja početne mase i volumena menzura se pričvršćuje na postolje vibracionog volumetra. Volumetar radi na principu sabijanja praha vibracijama duž vertikalne osi koje uzrokuju istiskivanje zraka iz šupljina među česticama, što kao posljedicu ima smanjenje volumena praha u menzuri, a time ujedno i povećanje vrijednosti nasipne gustoće. U prvom se ciklusu provodi 10 vibracija menzure s uzorkom i zabilježi se volumen praha. U drugom se ciklusu provodi 100 vibracija i zabilježi se volumen praha te se ukupno provode 3 paralelna mjerenja.

## 3.2.4. Svojstva tečenja kakao prahova

### 3.2.4.1. Indeks kohezije

Kohezivnost je sklonost čestica materijala da prijanjaju jedna uz drugu i nakupljaju se u veće čestice – aglomerate. Svojstva kohezije praha određuju se pomoću reometra za analizu svojstva tečenja prahova TA.HDPlus Powder Flow Analyser (StableMicro Systems, Godalming, United Kingdom). Uzorak volumena od 160 mL izvaže se i stavlja u staklenu posudu. Prije nego se obavlja mjerenje uzorka, instrument provodi 2 pripremna ciklusa mjerenja. Staklena posuda fiksira se na predviđeno mjesto na instrumentu te se na računalu pokrene postupak mjerenja. Svojstva zbijanja ispitivana su i mjerena kada se rotirajuća oštrica instrumenta kretala prema dolje, a svojstva kohezije mjerena su u trenutku kada se rotirajuća oštrica kretala prema gore pri najvećoj brzini od  $50 \text{ mm s}^{-1}$ . Tijekom kretanja oštrice prema dolje mjereno je koeficijent kohezije kao površina ispod negativnog dijela krivulje. Indeks kohezije je tada računat dijeljenjem koeficijenta s masom uzorka. Indeks kohezije koristi se za kategorizaciju prahova kao što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Kategorizacija prahova prema indeksu kohezije (Shah i sur., 2008; Janjatović, 2011; Benković i sur., 2013)

Indeks kohezije	Svojstvo tečenja praha
> 19	Izrazito kohezivan
16 – 19	Vrlo kohezivan
14 – 16	Kohezivan
11 – 14	Lako teče
< 11	Slobodno teče

#### 3.2.4.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Test sposobnosti stvaranja čvrstog kolača također je proveden koristeći TA.HDPlus Powder Flow Analyser te je započeo s dva ciklusa kondicioniranja. Oštrica uređaja izravnavava vrh kolone praha i mjere visinu same kolone. Nakon toga oštrica se kreću kroz kolonu prema dolje s brzinom od  $20 \text{ mm s}^{-1}$  i zbijaju prah do unaprijed određenom silom od 750 g. Kada je oštrica dosegla zadanu silu kretale su se kroz prah brzinom od  $10 \text{ mm s}^{-1}$  i ponovile ciklus sabijanja još 4 puta. Na početku svakog ciklusa oštrica je izmjerila visinu kolone te je također zabilježena visina praha kada je postignuta zadana sila. Kada je peti puta dosegnuta zadana sila, oštrica mijenja smjer i reže kolač koji se formirao u posudi. Uređaj bilježi promjene u visini stupca prilikom sabijanja mješavine (Abu-hardan i Hill, 2010), a rezultati su prikazani kao prosječna čvrstoća kolača [gmm].

### 3.2.5. Rekonstitucijska svojstva

#### 3.2.5.1. Disperzibilnost

Disperzibilnost praha određuje se testom miješanja i definirana je kao vrijeme u sekundama potrebno da se određena količina praha u potpunosti rasprši u određenoj količini vode pri određenoj temperaturi. Test se provodi na način da se u čašu ulije 50 mL vode temperature 24 °C. Izvaži se 5 g uzorka te se uzorak usipa u čašu, a istovremeno se pokrene štoperica te se ručno miješa (cca 25 okretaja u 15 sekundi). Miješa se sve dok se prah u potpunosti ne otopi te se tada zaustavi i štoperica. Sama disperzibilnost se izražava kao sekunde od početka miješanja do potpunog raspršivanja uzorka.

#### 3.2.5.2 Topivost

Topivost se izražava kao tzv. indeks topivosti koji je definiran kao sposobnost praha da se otopi u vodi. Test se provodi na način da se izvaži 2 grama uzorka te se uzorak doda u Falcon kivetu u kojoj se već nalazi 10 mL vode temperature 24 °C. Promiješa se 90 sekundi te se mješavina ostavi na sobnoj temperaturi 15 minuta kako bi se istaložila. Falcon kivete se nakon što prođe 15 minuta stave u centrifugu te se centrifugira, na 6000 min<sup>-1</sup>, 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se pomoću Pasteur pipeta pažljivo ukloni, pri čemu je jako važno ne pipetirati talog. Falcon kiveta se ponovo napuni s 10 mL destilirane vode temperature 24 °C, promiješa i ponovo centrifugira pod istim uvjetima (6000 min<sup>-1</sup>, 5 minuta). Indeks topivosti izražava se kao volumen (u mililitrima) zaostalog taloga u Falcon kiveti.

### **3.2.4. Kemijska svojstva i *in-vitro* simulacija probave dobivenih kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje**

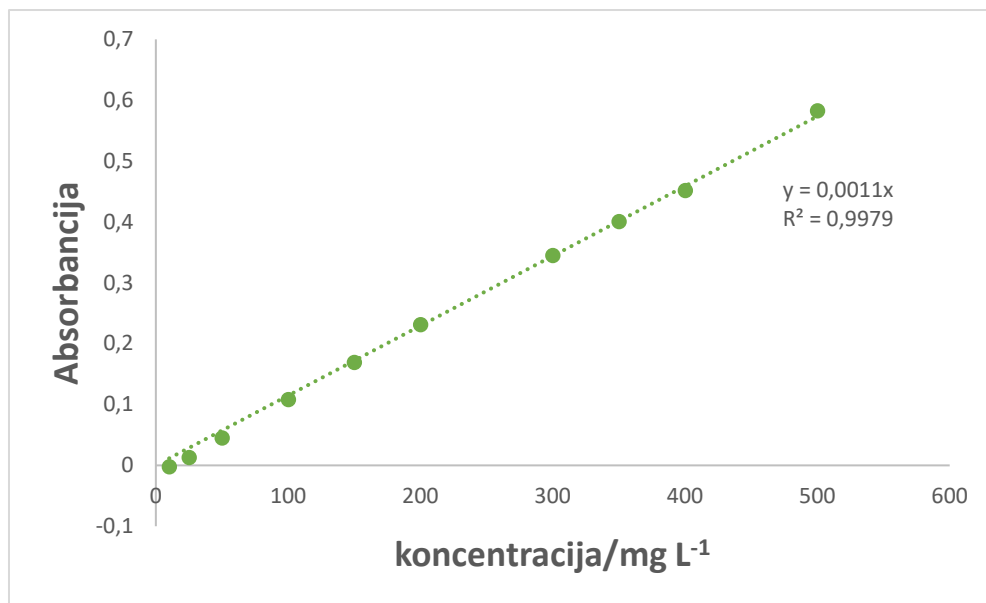
#### *3.2.4.1. Priprema acetonskih ekstrakta kakao prahova*

Izvaže se 2 g praha i usipa u čašu sa 25 mL 75% acetona prethodno zagrijanog na 70 °C. Ekstrakcija se provodi 30 min na 70 °C u uljnoj kupelji. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira pomoću aparature za vakuum filtraciju.

#### *3.2.4.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Količina ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijski korištenjem Folin – Ciocalteu metode. Metoda se temelji se na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, daju plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

Smjesa se priprema tako da se u epruvetu otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 mL uzorka i 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa te se dodatkom 1,5 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pokreće reakcija nakon čega uzorci stoje dva sata na sobnoj temperaturi. Za svaki uzorak rade se dvije paralelne probe, a za rezultat uzima se srednja vrijednost. Osim smjese sa uzorcima, priprema se i slijepa proba tako da se umjesto 100 mL uzorka stavlja 100 mL destilirane vode. Zatim se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija, tj. intenzitet plavog obojenja pri 765 nm koji je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku. Na osnovi baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg L<sup>-1</sup>) (Slika 2.) određena je jednadžba pravca na temelju koje se izračuna udio polifenola [3] te se rezultati izraze kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri, ili gramu uzorka.



Slika 2. Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0011x \quad [3]$$

gdje je:

y– apsorbancija pri 765 nm,

x – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>).

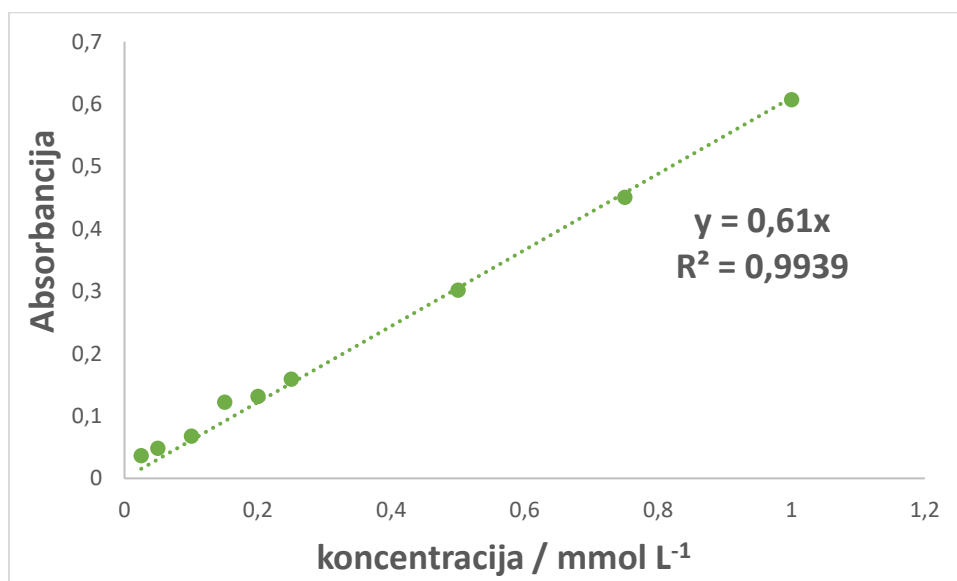
R<sup>2</sup>- koeficijent determinacije

### 3.2.4.3 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidativni kapacitet može se odrediti redukcijom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) koji u metanolnoj otopini zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora, antioksidansa, dolazi do sparivanja elektrona, stabilizacije DPPH radikala, te do promjene iz ljubičaste boje otopine u

žutu. Ta promjena boje koja je uzrokovana prelaskom radikala iz oksidiranog u reducirani oblik mjeri se promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilen kiseline (Trolox, analog vitamina E topljivog u vodi).

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te se smjesa dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Iz dobivenih vrijednosti i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a (koji se uzima kao standard) konstruira baždarni pravac. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se promjena apsorbancije DPPH radikala ( $\Delta A$ ) nakon reakcije. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca [4] (Slika 3.) u koncentracije ( $\text{mmol L}^{-1}$  Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) ili maseni udjel ( $\mu\text{g g}^{-1}$  uzorka) ekvivalenta Troloxa.



Slika 3. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,61x \quad [4]$$

gdje je:

y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 515 nm

x = ekvivalent troloxa (TAE) ( $\text{mM L}^{-1}$ )

$R^2$ - koeficijent determinacije

#### 3.2.4.3 *In-vitro* model simulacije probave

*In-vitro* simulacija probavnog procesa započinje korakom koji simulira uvjete u ustima. Odvaže se 40 mg  $\alpha$ -amilaze i otopi u 40 mL fosfatnog pufera zajedno s 0,04% NaCl-a i 0,004%  $\text{CaCl}_2$ . Tako pripremljena otopina stavi se u uljnu kupelj i zagrije na temperaturu od 37 °C. Kada se dostigne potrebna temperatura, doda se 4 grama praškastog uzorka i pokrene štoperica. Inkubacija traje 5 minuta.

Nakon inkubacije koja je trajala 5 minuta, pH reakcijske mješavine se namjesti na pH=2 pomoću koncentrirane klorovodične kiseline (HCl), čime se simuliraju uvjeti probave u želucu. Nakon što je pH namješten, dodaje se suspenzija pepsina (6 mg pepsina otopljenog u 4 mL 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  HCl) te se reakcijska mješavina inkubira na 2 sata pri 37 °C.

Nakon završetka inkubacije, pH se podesi na pH=6,5 dodatkom  $\text{NaHCO}_3$ , što odgovara uvjetima u tankom crijevu. Nakon što je pH namješten dodaje se suspenzija pankreatina (0,08 grama pankreatina otopljenog u 10 mL fosfatnog pufera). Mješavina se inkubira na 2 sata pri 37 °C. Nakon završetka inkubacije, uzima 500  $\mu\text{L}$  uzorka reakcijske mješavine i razrijedi u Eppendorf kiveti s 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode te se kiveta odmah stavlja na hlađenje.

Uzorcima dobivenim nakon inkubacije (nakon koraka tanko crijevo) određuje se sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet na način prethodno prikazan u točkama 3.2.4.2. i 3.2.4.3.



### **3.2.5. Senzorska svojstava dobivenog praha**

Senzorsko ocjenjivanje prahova provedeno je uz pomoć panela od 5 educiranih osoba te tako što je od prahova pripremljen napitak te ocijenjen na hedonističkoj skali od 1 do 9. Svi napitci pripremljeni su na isti način, otapanjem 10 g praha u 200 mL zavrelog mlijeka.

Ocjenjivano je 6 svojstava: izgled, boja, miris, slatkoća, naknadni okus i biljni okus. Svaki ispitivani parametar ocijenjen je u rasponu ocjena od 1 (najlošije prihvaćen) do 9 (najpoželjnije).

### **3.2.6. Statistička analiza podataka**

Procjena utjecaja vrste dodatka (mikroinkapsulirani ili tekući ekstrakt) te koncentracije dodanog ekstrakta na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje provedena je pomoću Wilcoxon testa ekvivalentnih parova. Tim testom provedena je usporedba zavisnih uzoraka, a značajnim su se smatrale razlike pri  $p < 0,05$ . Kako bi se dodatno utvrdilo koji je faktor (vrsta dodatka ili koncentracija dodatka) imao dominantan utjecaj na svako pojedino svojstvo i svaki pojedini uzorak, provedena je i analiza glavnih komponentata (engl. Principal Component Analysis tj. PCA). Analize su provedene upotrebom softverskih paketa Statistica v 10.0 (Wilcoxon test) (StatSoft, Tulsa, USA), MS Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) te XLStat dodatka (Addinsoft, Pariz, Francuska) za MS Office Excel (PCA analiza).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proizvedeni su instant kakao prahovi obogaćeni ekstraktom industrijske konoplje. Isto tako istraživana je utjecaj dodatka ekstrakta industrijske konoplje različitih postotaka i različitog oblika (tekući i mikroinkapsulirani) instant kakao prahovima na njihova fizikalna, kemijska i senzorska svojstva te ponašanje prilikom *in-vitro* modela probave. Najprije su proizvedeni vodeni i mikroinkapsulirani ekstrakti industrijske konoplje te su u različitim postocima (2,5; 5; 10 ili 15%) dodani u smjesu koja je kasnije sušena u pjenu kako bi se dobili instant kakao prahovi obogaćenim ekstraktom industrijske konoplje različitih postotaka i oblika.

Prilikom istraživanja određivane su fizikalna svojstva pjene (stabilnost, gustoća i suha tvar pjene) koja su prikazana tablicama 6, 7 i 8. Također su istraživana fizikalna svojstva dobivenih kakao prahova (udio suhe tvari, raspodjela veličine čestica, nasipna gustoća, svojstva tečenja određena reometarskom metodom (indeks kohezije i sposobnost stvaranja čvrstog kolača) i rekonstitucijska svojstva (topljivost i disperzibilnost)). Dobiveni rezultati za udio suhe tvari, raspodjelu veličine čestica, indeks kohezije i sposobnost stvaranja čvrstog kolača prikazani su tablicama 9, 10, 11 i 12, dok su dobiveni rezultati za nasipnu gustoću, topljivost i disperzibilnost prikazani grafički sa slikama 4, 5 i 6.

Uz fizikalna svojstva određivana su i kemijska svojstva dobivenih instant kakao prahova (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost). Dobiveni rezultati za ukupne polifenole, koji su određivani spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, prikazani su slikom 7, dok su rezultati za antioksidacijsku aktivnost, koja je određena primjenom DPPH metode, prikazani na Slici 8.

Nadalje je provedena i senzorska analiza dobivenih instant kakao prahova, tj. njima dobivenih napitaka. Dobiveni rezultati senzorske analize prikazani su na Slici 9.

U istraživanju je napravljena i *in-vitro* simulacija probavnog trakta radi određivanja postotka očuvanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti nakon prolaska kroz simulirani gornji dio probavnog sustava. Rezultati za količinu ukupnih polifenola prije prolaska kroz *in-vitro* model probave, nakon prolaska te postotak očuvanja prikazani su na slici 10, dok su rezultati za antioksidacijsku aktivnost prije prolaska kroz *in-vitro* model probave, nakon prolaska te postotak očuvanja antioksidacijske aktivnosti prikazani su na Slici 11.

## 4.1. FIZIKALNA SVOJSTA PJENE I KAKAO MJEŠAVINA OBOGAĆENIH EKSTRAKTOM INDUSTRIJSKE KONOPLJE

### 4.1.1. Stabilnost i gustoća pjene

Pjena je visoko-volumenska frakcijska disperzija plina (zrak) u tekućini ili krutini. Stabilnost pjene je sposobnost pjene i njene kontinuirane faze da zadrži plinsku fazu u svojoj strukturi na određeni vremenski period. Ukoliko pjena ima sposobnost da zadrži plin na duži vremenski period, njena stabilnost će biti veća te obrnuto (Narsimhan i Xiang, 2018). Stabilnost pjene se smatra izrazito važnom kako zbog održavanja velike površine za sušenje tijekom procesa dehidracije, a ukoliko je stabilnost pjene loša to dovodi do produljenja vremena sušenja te u konačnici do proizvoda lošije kvalitete (Eduardo i sur., 2001; Abbasi i Azizpour, 2015). U Tablici 6. prikazani su rezultati određivanja stabilnosti pjene (%) za svih 9 uzoraka.

Tablica 6. Dobiveni rezultati određivanja stabilnosti pjene prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 2)

Oznaka uzorka	Stabilnost pjene (%)
<b>Kontrola</b>	100,000 $\pm$ 0,000
<b>A2,5</b>	93,305 $\pm$ 0,445
<b>A5</b>	97,825 $\pm$ 2,175
<b>A10</b>	95,725 $\pm$ 0,275
<b>A15</b>	97,620 $\pm$ 2,380
<b>E2,5</b>	94,865 $\pm$ 1,565
<b>E5</b>	94,050 $\pm$ 2,380
<b>E10</b>	95,740 $\pm$ 0,090
<b>E15</b>	92,295 $\pm$ 0,295

Najveću stabilnost pjene ima kontrola (uzorak u koji nije dodan ekstrakt ili mikroinkapsulirani oblik ekstrakta industrijske konoplje, 50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 0% ekstrakta) čija je stabilnost pjene iznosila 100,000%, dok najnižu stabilnost pjene ima uzorak E15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 15% tekućeg ekstrakta) čija je stabilnost pjene iznosila 92,295%. Nešto veću stabilnost pjene ima uzorak A2,5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija stabilnost pjene iznosi 93,305%, slične stabilnosti pjene imaju uzorci E2,5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 2,5% tekućeg ekstrakta) čija je stabilnost pjene 94,865% te uzorak E5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 5% tekućeg ekstrakta) čija je stabilnost pjene 94,050%. Nešto više stabilnosti pjene imaju uzorci A10 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija je stabilnost pjene 95,725% i E10 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 10% tekućeg ekstrakta) čija je stabilnost pjene 95,740%. Od uzoraka s prisutnim mikroinkapsuliranim ekstraktom najviše vrijednosti stabilnosti pjene imaju uzorci A5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija je stabilnost pjene 97,825% i A15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka i 15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija je stabilnost pjene 97,620%. Iz prikazanih podataka vidljivo je da je stabilnost pjene uzoraka koji sadrže mikroinkapsulirani ekstrakt u prosjeku nešto viša od uzoraka koji sadrže tekući ekstrakt te da se stabilnost pjene dodatkom bilo mikroinkapsuliranog, bilo tekućeg ekstrakta smanjuje u usporedbi sa stabilnosti pjene kontrolnog uzorka. Međutim, sve vrijednosti stabilnosti pjene su veće od 90% što sugerira da je koncentracija bjelanjka u svim uzorcima bila dovoljna te se ovime potvrđuje kako je bjelanjak dobar odabir sredstva za upjenjavanje (Rajkumar i sur., 2007).

Gustoća pjene koristi se za procjenu sposobnosti pjenjenja uzorka te ju mnogi autori koriste kao glavni parametar za procjenu kvalitete pjene (Falade i Okocha, 2010; Bag i sur., 2011). Što je više zraka zarobljeno tijekom pjenjenja to je niža gustoća pjene te je uz to povećana i sposobnost tučenja pjene (Falade i sur., 2003). Posljedično, veće vrijednosti gustoće pjene rezultiraju produljenim vremenom sušenja te time i krajnjim produktima koji su lošije kvalitete. Tablica 7. prikazuje rezultate dobivene određivanjem gustoće pjene za svih 9 uzoraka.

Tablica 7. Rezultati dobiveni određivanjem gustoće pjene prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 2)

Oznaka uzorka	Gustoća pjene (g mL <sup>-1</sup> )
<b>Kontrola</b>	0,745 $\pm$ 0,005
<b>A2.5</b>	0,525 $\pm$ 0,005
<b>A5</b>	0,630 $\pm$ 0,000
<b>A10</b>	0,590 $\pm$ 0,010
<b>A15</b>	0,645 $\pm$ 0,015
<b>E2.5</b>	0,510 $\pm$ 0,020
<b>E5</b>	0,595 $\pm$ 0,015
<b>E10</b>	0,610 $\pm$ 0,020
<b>E15</b>	0,550 $\pm$ 0,010

Najveću gustoću pjene ima kontrola (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 0% ekstrakta), a ona iznosi 0,745 g mL<sup>-1</sup>. Najmanju gustoću pjene imaju uzorci s 2,5% ekstrakta, uzorak E2,5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 2,5% tekućeg ekstrakta) i uzorak A2,5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta), njihove gustoće iznose 0,510 i 0,525 g mL<sup>-1</sup>. Nešto više gustoće pjene imaju uzorci E15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 15% tekućeg ekstrakta) čija gustoća pjene iznosi 0,550 g mL<sup>-1</sup>, A10 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija gustoća pjene iznosi 0,590 g mL<sup>-1</sup> te E5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 5% tekućeg ekstrakta) čija gustoća pjene iznosi 0,595 g mL<sup>-1</sup>. Najviše vrijednosti gustoće pjene, od uzoraka koji sadrže ekstrakt, imaju uzorci E10 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 10% tekućeg ekstrakta) koja iznosi 0,610 g mL<sup>-1</sup> te A15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) koja iznosi 0,645 g mL<sup>-1</sup>. Iz rezultata vidljivo je da dodatkom ekstrakata dolazi do smanjenja gustoće pjene, što predstavlja pozitivan utjecaj s obzirom da pjene manje gustoće imaju više inkorporiranog zraka, a samim time i veću površinu za izmjenu topline pri sušenju. Samo smanjenje gustoće

pjene se ne razlikuje značajno između uzoraka koji sadrže ekstrakt u tekućem ili mikroinkapsuliranom obliku. Mnoga istraživanja indicirala su kako su optimalne vrijednosti gustoće pjene za proces sušenja u pjenu između 0,2 i 0,6 g mL<sup>-1</sup> čime su vrijednosti za gustoću pjene koje su dobivene u ovom radu na gornjoj granici tog optimalnog intervala s obzirom da se vrijednosti kreću oko 0,6 g mL<sup>-1</sup>, a samo su vrijednosti za 3 uzorka (A5, A15, E10) minimalno izvan takvog optimalnog intervala (Azizpour i sur., 2016).

#### 4.1.2. Sadržaj suhe tvari pjene

Suha tvar pjene kreće se u rasponu od 39,985 do 46,808%, pri čemu je najveću vrijednost suhe tvari pjene imala kontrola (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 0% ekstrakta), dok je najmanju vrijednost suhe tvari pjene imao uzorak E15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 15% tekućeg ekstrakta), kao što je prikazano u Tablici 8.

Tablica 8. Sadržaj suhe tvari pjene prikazan kao srednja vrijednost ± SD (n = 2)

Uzorak	Suha tvar pjene (%)
<b>Kontrola</b>	46,808 ± 1,269
<b>A2,5</b>	46,684 ± 0,198
<b>A5</b>	45,960 ± 1,131
<b>A10</b>	43,548 ± 0,427
<b>A15</b>	43,672 ± 0,621
<b>E2,5</b>	46,767 ± 0,265
<b>E5</b>	43,803 ± 2,399
<b>E10</b>	42,072 ± 0,497
<b>E15</b>	39,985 ± 1,351

Usporedbom vrijednosti može se primijetiti kako se suha tvar pjene smanjuje dodatkom ekstrakta te što je veći postotak dodanog ekstrakta, veće je smanjenje količine suhe tvari pjene. Dobiveni rezultati mogu se objasniti samim dodatkom određenog postotka suhe tvari ekstrakta. Naime, ekstrakt koji je dodavan kao vodena otopina ili kao mikrokapsule, sadržavao je samo 0,375% suhe tvari (rezultati nisu prikazani u tablici), te je njegovim dodatkom u pjenu došlo do efekta razrjeđivanja smjese, čime su se smanjile i vrijednosti suhe tvari. Posljedično, dodatkom većeg postotka dodanog ekstrakta dolazi do većeg smanjenja gustoće pjene uzoraka. Također, dodatkom tekućeg ekstrakta smanjenje sadržaja suhe tvari pjene je izraženije.

### 4.1.3. Fizikalna svojstva kakao prahova obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje

#### 4.1.3.1. Sadržaj suhe tvari praha

U Tablici 9. prikazane su vrijednosti za postotak suhe tvari praha kod uzoraka te kontrole. Vrijednosti suhe tvari kreće se u rasponu od 97,164 do 97,937%.

Tablica 9. Sadržaj suhe tvari praha prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 2)

Uzorak	Suha tvar praha (%)
<b>Kontrola</b>	97,548 $\pm$ 0,022
<b>A2,5</b>	97,744 $\pm$ 0,026
<b>A5</b>	97,626 $\pm$ 0,026
<b>A10</b>	97,406 $\pm$ 0,042
<b>A15</b>	97,226 $\pm$ 0,024
<b>E2,5</b>	97,937 $\pm$ 0,0116
<b>E5</b>	97,414 $\pm$ 0,054
<b>E10</b>	97,164 $\pm$ 0,022
<b>E15</b>	97,342 $\pm$ 0,005

Najveću vrijednost imaju uzorci A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznose 97,744 te 97,937%. Najniže vrijednosti suhe tvari praha imaju uzorci A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E10 (10% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznose 97,226 te 97,164%. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako dodatkom ekstrakta u većoj koncentraciji dolazi do jačeg smanjenja postotka suhe tvari praha te je takvo smanjenje postotka suhe tvari izraženije kod uzoraka koji sadrže tekući oblik ekstrakta.

Suhe tvari praha imaju puno veće vrijednosti od suhe tvari pjene zbog toga što je pjena podvrgnuta procesu sušenja prilikom proizvodnje prahova. Procesom sušenja došlo je do isparavanja vode čime se njezin udio u prahovima značajno smanjio. Usporedbom vrijednosti pjene i prahova može se primijeniti podudaranje, tj. ukoliko su vrijednosti suhe tvari u pjeni kod određenog uzorka bile više, takve su i vrijednosti kod suhe tvari praha.

#### *4.1.3.2. Raspodjela veličine čestica*

Kod karakterizacije fizikalnih svojstava prahova, raspodjela veličine čestica je jedna od ključnih karakteristika. Čestice različitih veličina i raspodjela veličina pokazuju različita svojstva prilikom transporta, mješanja i tečenja. Primjerice, manje čestice imaju veću specifičnu površinu i nasipnu gustoću, a poroznost, brzina tečenja i topljivost značajno se razlikuju od većih čestica (Felton, 2013). Analiza veličine čestica laserskom svjetlosnom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice prolaskom kroz izvor svjetlosti odnosno lasersku zraku raspršuju svjetlo pod kutom koji se logaritamski povećava sa smanjenjem veličine čestica. O veličini čestica ovisi i intenzitet raspršenja koji se smanjuje sa smanjenjem volumena čestice. Čestice većih dimenzija raspršuju svjetlost pod ostrim (odnosno malim) kutovima s velikim intenzitetom, dok čestice manjih dimenzija svjetlost raspršuju pod širim kutovima, ali s niskim intenzitetom (Jillavenkatesa i sur., 2001).



Tablica 10. Raspodjela veličine čestica prahova prikazanih kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 3)

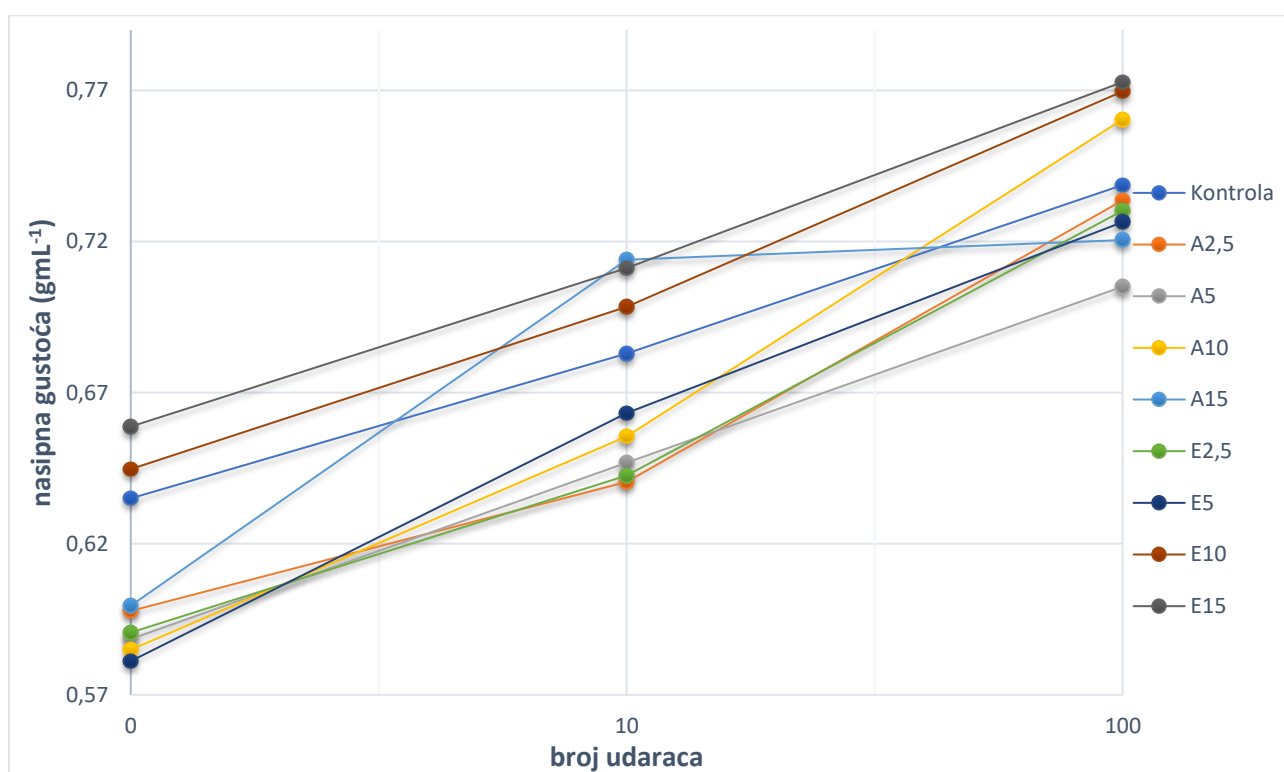
Uzorak	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	D [3,2] ( $\mu\text{m}$ )
<b>Kontrola</b>	186,656 $\pm$ 4,409	66,327 $\pm$ 2,325
<b>A2,5</b>	134,243 $\pm$ 0,437	54,012 $\pm$ 0,091
<b>A5</b>	174,078 $\pm$ 3,150	74,053 $\pm$ 1,036
<b>A10</b>	173,190 $\pm$ 0,528	70,143 $\pm$ 0,080
<b>A15</b>	184,730 $\pm$ 3,667	83,283 $\pm$ 1,719
<b>E2,5</b>	132,141 $\pm$ 1,411	49,927 $\pm$ 1,266
<b>E5</b>	165,541 $\pm$ 0,558	67,281 $\pm$ 0,158
<b>E10</b>	180,024 $\pm$ 1,842	71,353 $\pm$ 0,699
<b>E15</b>	141,153 $\pm$ 1,269	53,420 $\pm$ 0,139

Raspodjela veličine čestica u ovom radu prikazana je pomoću d(0,5) i D[3,2], a rezultati su prikazani na Tablici 10. Parametar d(0,5) pokazuje vrijednost za srednji promjer volumenske raspodjele, a izražava se u mikronima (mikrometrima) i pokazuje veličinu čestica od koje je 50% uzoraka manje vrijednosti, a 50% uzoraka je veće od te vrijednosti, dok parametar D[3,2] označava površinski srednji promjer ili tzv. Sauterov promjer (Rawler, 2007; Stojanović i Marković, 2010). Uzimajući u obzir parametre d(0,5) i D[3,2], najveću veličinu čestica ima uzorak A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čije vrijednosti iznose 184,730 i 83,283  $\mu\text{m}$ . Najmanju veličinu čestica ima uzorak E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznose 132,141 i 49,927  $\mu\text{m}$ . Iz rezultata se može primijetiti kako, u pravilu, veličina čestica raste što je veći postotak ekstrakta dodan u kakao prahove, dok oblik u kojem je ekstrakt dodan (mikroinkapsulirani ili tekući) nema značajni utjecaj na veličinu čestica. Općenito, vrijednosti veličine čestica ovise o nekoliko faktora: tipu primijenjenog uređaja za mljevenje, vremenu trajanja mljevenja te samim svojstvima materijala (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

#### 4.1.3.3. Nasipna gustoća

Nasipna gustoća predstavlja omjer mase granuliranog materijala i volumena koji takav materijal zauzima u mjernom cilindru podvrgnutom vibracijama zbog kojih dolazi do promjene volumena praha u mjernom cilindru. Iz tog mjerenja moguće je izračunati vibracionu, nasipnu gustoću materijala (Werner i sur., 2007a; Werner i sur., 2007b).

Materijali koji značajnije mijenjaju svoju gustoću nakon djelovanja vibracija, imaju promjenjive osobine. Oni obično imaju dobar protok kad je materijal u opuštenom stanju, a loš protok kad je materijal slegnuti. Sklonost materijala da reducira volumen prilikom djelovanja vibracija se također smatra značajkom tečnosti materijala (Barbosa-Canovas i sur., 2005).



Slika 4. Nasipna gustoća obogaćenih kakao prahova pri 0, 10 i 100 udaraca

Nasipna gustoća je kod svih uzoraka porasla s rastom broja vibracija usred smanjenja udjela zraka među granuliranim česticama praha. Dobivene vrijednosti za nasipnu gustoću (slobodna te nakon 10 i 100 udaraca) prikazane su Slikom 4. Vrijednosti slobodne nasipne gustoću (pri 0 udaraca) kreću se u rasponu od 0,581 do 0,659 g mL<sup>-1</sup>, za nasipnu gustoću nakon 10 udaraca od 0,640 do 0,714 g mL<sup>-1</sup>, dok su za nasipnu gustoću kod 100 udaraca vrijednosti bile u rasponu od 0,705 do 0,773 g mL<sup>-1</sup>. Najmanju promjenu vrijednosti nasipne gustoće pokazuje kontrolni

uzorak (0% ekstrakta) te ona iznosi 0,104 g mL<sup>-1</sup>, dok je najveću promjenu nasipne gustoće pokazao uzorak A10 (10% mikroinkapsuliranog ekstrakta), a iznosi 0,174 g mL<sup>-1</sup>. Uzorci s određenim udjelom ekstrakta koji pokazuju najmanju promjenu nasipne gustoće su A5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čije vrijednosti promjene nasipne gustoće iznose 0,116 i 0,0114 g mL<sup>-1</sup>. Ovi uzorci pokazuju najbolje poželjne osobine (prilagodba skladištenju, distribuciji, preradi, pakiranju) zbog toga jer imaju najmanju promjenu vrijednosti nasipne gustoće te najnižu kompresibilnost, dok uzorci A10 i E5 pokazuju najveću promjenu nasipne gustoće i najveću kompresibilnost te zbog toga imaju najlošije osobine. Postotak dodanog ekstrakta nije imao utjecaja na nasipnu gustoću kakao prahova, međutim iz rezultata se može vidjeti da je vrsta dodatka imala utjecaj. Dodatak ekstrakta u obliku mikrokapsula doveo je do nešto većih promjena vrijednosti nasipne gustoće.

#### 4.1.3.4. *Svojstva tečenja kakao prahova*

Svojstva tečenja prahova razlikuju se usred kombinacija fizikalno-kemijskih svojstava praha - gustoća praha, veličina i oblik čestica, struktura i karakteristike površine praha te sadržaj vlage, bjelančevina i masnoća (Liu i sur., 2008). Kohezivnost praha raste usred smanjenja veličine čestica praha. Što je manja veličina čestica, veća je dodirna površina po jedinici mase praha i zbog toga raste kombinirani utjecaji privlačenja van der Waalsovih silama između različitih čestica (Fitzpatrick, 2005). Svojstva tečenja koja su određena testom kohezivnosti prikazana su u Tablici 11, a izražena su kao indeks kohezije te je s obzirom na određeni indeks kohezije koji prahovi imaju napravljena kategorizacija u sljedeće kategorije: indeks kohezije (CI) = < 11 – prah slobodno teče, CI = 11- 14 - prah lako teče, CI = 14 – 16 – prah je kohezivan, CI = 16- 19 – prah je vrlo kohezivan CI = > 19 – prah je izrazito kohezivan.

Tablica 11. Indeks kohezije te svojstvo tečenja prahova prikazanih kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 3)

Uzorak	Indeks kohezije (mm)	Svojstvo tečenja praha
<b>Kontrola</b>	11,886 $\pm$ 0,082	Lako teče
<b>A2,5</b>	21,078 $\pm$ 0,715	Izrazito je kohezivan
<b>A5</b>	15,446 $\pm$ 0,078	Kohezivan je
<b>A10</b>	16,156 $\pm$ 0,364	Vrlo je kohezivan
<b>A15</b>	16,132 $\pm$ 0,364	Vrlo je kohezivan
<b>E2,5</b>	16,690 $\pm$ 1,517	Vrlo je kohezivan
<b>E5</b>	10,459 $\pm$ 0,391	Slobodno teče
<b>E10</b>	12,152 $\pm$ 0,477	Lako teče
<b>E15</b>	12,915 $\pm$ 0,177	Lako teče

S obzirom na dobivene vrijednosti indeksa kohezije, prikazanih u Tablici 11., prahovi su kategorizirani na sljedeći način: slobodno teče: uzorak E5; lako teče: kontrola i uzorci E10 i E15; kohezivan je: uzorak A5; loše teče: A10, A15 i E2,5; izrazito loše teče: A2,5. Uzorci koji su sadržavali tekuće ekstrakte industrijske konoplje pokazali su se kao manje kohezivni, u usporedbi s uzorcima koji su imali mikroinkapsulirani ekstrakt u sastavu koji jako dižu indeks kohezije. Indeksi kohezije tekućih ekstrakata kretali su se u rasponu od 10,459 do 16,690, dok su se indeksi kohezije uzoraka s mikroinkapsuliranim ekstraktima kretali u rasponu od 15,446 do 21,078. Kakao prahovi imaju općenito čestice vrlo malih veličina, što dovodi do povećanja površine te na kraju do povećanja indeksa kohezivnosti, čime možemo kategorizirati kakao prahove kao kohezivne i izrazito kohezivne. Rezultati ovoga rada slažu se, djelomično, s rezultatima prijašnjih radova koji su kakao prah okarakterizirali kao izrazito kohezivan (Belščak i sur., 2011; Benković i sur., 2013).

Tablica 12. Rezultati procjene sposobnosti stvaranja čvrstog kolača prikazane kao srednje vrijednosti snage čvrstog kolača i prosječne snage čvrstog kolača  $\pm$  SD (n = 3)

Uzorak	Prosječna čvrstoća kolača (g)
<b>Kontrola</b>	62,548 $\pm$ 15,582
<b>A2,5</b>	107,009 $\pm$ 5,448
<b>A5</b>	80,314 $\pm$ 9,237
<b>A10</b>	72,714 $\pm$ 1,799
<b>A15</b>	103,906 $\pm$ 7,421
<b>E2,5</b>	119,915 $\pm$ 4,897
<b>E5</b>	134,399 $\pm$ 3,433
<b>E10</b>	59,948 $\pm$ 4,995
<b>E15</b>	137,253 $\pm$ 2,600

Sposobnost stvaranja čvrstog kolača je štetan fenomen kod kojeg dolazi do transformacije amorfne hrane, u ovom slučaju praha, u nepoželjni, ljepljivi materijal što rezultira umanjenom funkcionalnošću i slabijom kvalitetom proizvoda (Aguilera i sur., 1995). Smatra se da prahovi tvore čvrsti kolač kada se dvije ili više makro čestica, od kojih svaka ima sposobnost zasebnog načina translacije (gibanje krutoga tijela pri kojemu se svi dijelovi tijela gibaju po jednakim putanjama i bez rotacije), dođu u dodir te ulaze u interakciju čime dolazi do sljepljivanja, tj. stvaranja skupa čestica u kojem čestice više nemaju mogućnost zasebne kretnje (Griffith, 1991). Prahovi s manjom veličinom čestica pokazuju veću sposobnost kohezije zbog veće površine i jačih van der Waalsovih sila što dovodi do veće mogućnosti za tvorbu čvrstog kolača (Fitzpatrick, 2005). Na samu sposobnost praha za stvaranjem čvrstog kolača utječu sastav materijala, veličina i oblik čestica, sadržaj vlage, varijacije tlaka i temperature tijekom proizvodnje i skladištenja (Chen i Chou, 1993). Rezultati prosječne čvrstoće kolača prikazani su Tablicom 12. Najveću prosječnu čvrstoću kolača pokazuju uzorci E5 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 5% tekućeg ekstrakta) i E15 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 15% tekućeg ekstrakta) čije su srednje vrijednosti čvrstoće kolača iznosile 134,399

i 137,253 g. Najnižu vrijednost prosječne čvrstoće kolača imala je kontrola (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 0% ekstrakta) i E10 (50 g temeljne smjese kakao/šećer, 80 g bjelanjka, 10% tekućeg ekstrakta) čije su vrijednosti iznosile 62,548 i 59,948 g. Vrijednosti za uzorke s mikroinkapsuliranim ekstraktom kretale su se od 72,714 do 107,009 g, dok su se vrijednosti za uzorke s tekućim ekstraktima kretale od 59,948 do 137,253 g. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako uzorci s tekućim ekstraktom imaju prosječno veće vrijednosti čvrstoće kolača od uzoraka s mikroinkapsuliranim ekstraktom. Iako je kod uzoraka koji sadrže ekstrakt u mikroinkapsuliranom obliku korištena želatina, koja se smatra vezivnim sredstvom zbog svoje visoke viskoznosti, a korištena je za samo stvaranje kapsula, vrijednosti za takve uzorke su niže što je suprotno od očekivanja (Barbosa-Canovas, 2005).

#### *4.1.3.5. Rekonstitucijska svojstva*

U većini slučajeva, prahovi moraju biti dobro topljivi kako bi bili korisni i funkcionalni (Fang i sur., 2007). Topljivost je u ovom radu prikazana kao indeks topljivosti, tj. kao količina zaostalog taloga, u mL, u Falcon epruveti nakon centrifugiranja. S obzirom da je topljivost važan pokazatelj sposobnosti prahova da ostanu homogeno pomiješani s vodom (Franco i sur., 2016) i činjenicu da što je manji volumen zaostalog taloga to znači da prah pokazuje bolju topljivost, prahovi kod kojih je prisutna manja količina zaostalog taloga smatraju se prahovima s boljom topljivošću.



Slika 5. Topljivost kakao mješavina prikazana kao srednja vrijednost zaostalog taloga (mL)  $\pm$  SD (n = 2)

Na Slici 5. prikazani su dobiveni rezultati iz kojih se može uočiti kako uzorci kontrola (0% ekstrakta) i E5 (5% tekućeg ekstrakta) imaju najlošiju topljivost koja iznosi 1,375 i 1,475 mL zaostalog taloga, dok uzorci A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) imaju najbolju topljivost, tj. najmanji volumen zaostalog taloga koji iznosi 1,15 i 1,1 mL. Generalno, dodatkom ekstrakata u kakao prah dolazi do smanjenja količine zaostalog taloga, tj. do poboljšanja topljivosti te se isto tako može uočiti kako do većeg poboljšanja topljivosti dolazi usred dodatka mikroinkapsuliranog ekstrakta, u usporedbi s dodatkom tekućeg ekstrakta.



Slika 6. Disperzibilnost kakao mješavina prikazana kao srednja vrijednost potrebnog vremena (s)  $\pm$  SD (n = 2)

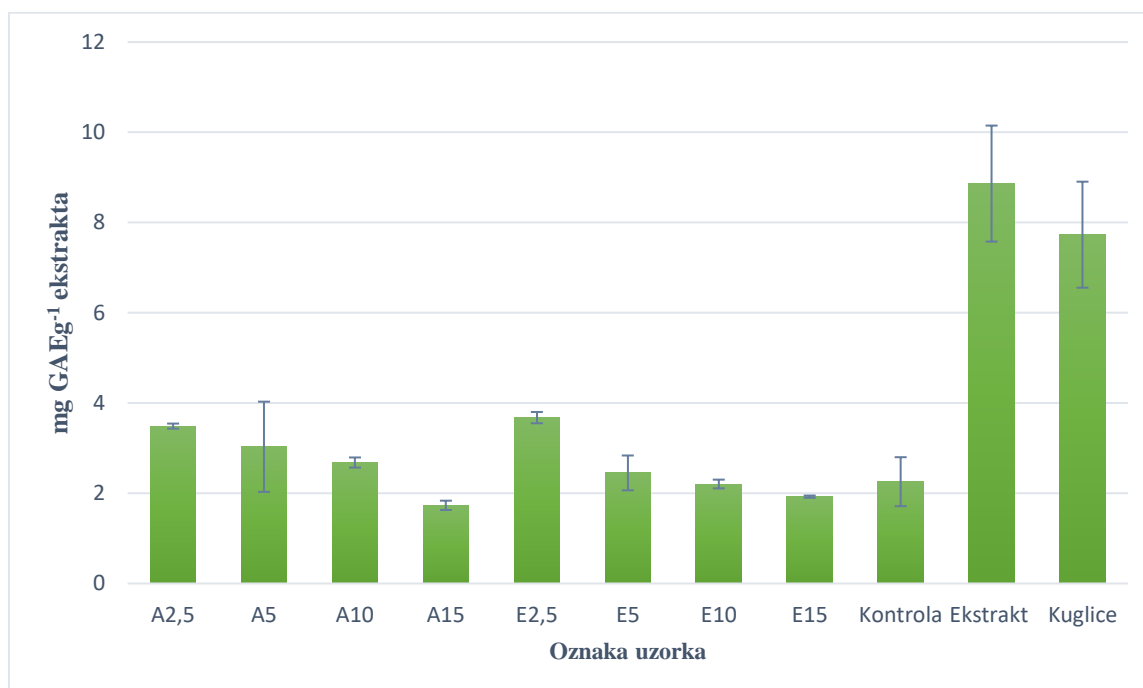
Kako bi se postigla maksimalna funkcionalnost, prahovi moraju biti lako disperzibilni u željenom mediju te ostati otopljeni ili suspendirani tijekom vremena bez obzira na okolišne uvjete (Gaiani i sur., 2007), a sama disperzibilnost je svojstvo praha da se u potpunosti rasprši u određenoj količini odgovarajućeg medija (najčešće voda) pri određenoj temperaturi (Fang i sur., 2007). Na Slici 6. prikazani su rezultati za disperzibilnost. Vremena disperzibilnosti kreću se u rasponu od 25,5 do 34,5 sekunde. Najmanju disperzibilnost, tj. najduže vrijeme potrebno da se postigne potpuno raspršivanje u vodi pokazuju uzorci A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta), E10 (10% tekućeg ekstrakta) i E15 (15% tekućeg ekstrakta) čija vremena iznose 32, 34 i 34,5 sekunde. Najbolju disperzibilnost pokazuje uzorak kontrola (0% ekstrakta) koja iznosi 25,5 sekunde, dok ostali uzorci imaju relativnu sličnu disperzibilnost koja se kreće oko 30 sekundi. Iz rezultata se može zaključiti kako je dodatak ekstrakta u kakao mješavinu doveo do povećanja vremena potrebnog za potpuno raspršivanje, tj. umanjio je disperzibilnost kakao mješavina. Pri tome je vidljivo da je dodatkom veće količine ekstrakta došlo do većeg smanjenja disperzibilnosti uzoraka te je isto tako primjetno da je dodatak ekstrakta u tekućem obliku doveo do većeg povećanja disperzibilnosti uzoraka, u odnosu na ekstrakt u mikroinkapsuliranom obliku.



## 4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA DOBIVENIH PRAHOVA

### 4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola

Kakao prah prirodno je bogati izvor antioksidansa, ponajviše polifenola, među kojima su najvažniji flavonoidi (Maleyki i Ismail, 2010; Rimbach i sur., 2009). Njihova antioksidativna aktivnost i povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje dokazana je brojnim istraživanjima. Među najvažnije farmakološke učinke polifenola ubrajamo inhibiciju lipidne peroksidacije, zaštitu LDL kolesterola od oksidacije te povećanje otpornosti organizma od štetnog djelovanja pojačanog oksidacijskog stresa (Andujar i sur., 2012; Stoclet i sur., 2004). Najzastupljenije grupe flavonoida u kakau su: flavan-3-oli (37%), antocijani (4%) i proantocijanidini (58%) s prosječnim sadržajem od 120 – 180 g kg<sup>-1</sup> (Rusconi i Conti, 2010). Lee i suradnici (2003), u svom istraživanju, odredili su kako kakao sadrži 611 mg ekvivalenta galne kiseline po serviranju (7,3 grama kakao praha) te 564 mg ekvivalenta epikatehina po serviranju. Također je određeno da su takve vrijednosti ekvivalenta galne kiseline za oko 1,8; 3,7 i 4,9 puta veće nego vrijednosti dobivene kod crnoga vina, zelenoga čaja i crnoga čaja.

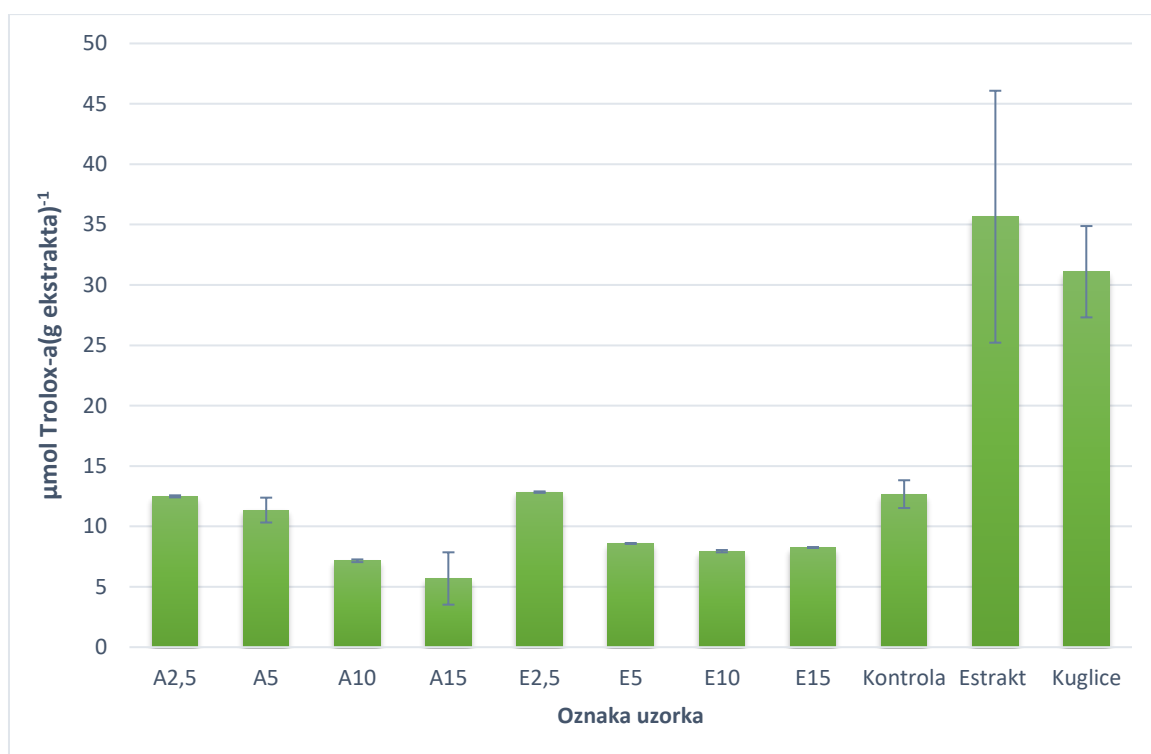


Slika 7. Sadržaj ukupnih polifenola kakao mješavina te čistog ekstrakta u tekućem i mikroinkapsuliranom obliku prikazan kao srednja vrijednost ± SD (n = 2)

U ovom radu, udjel ukupnih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom. Dobiveni rezultati udjela ukupnih polifenola (mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta) u prahu s različitim koncentracijama (2,5; 5; 10 i 1%) i obliku dodanog ekstrakta (tekući, mikroinkapsulirani) te čistim ekstraktima prikazani su na Slici 13. Najveći udjel polifenola prisutnim u pripremljenim kakao smjesama pokazuju uzorci A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta), te iznose 3,488 i 3,676 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta. Sljedeći je uzorak A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija vrijednosti iznosi 3,03 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta. Nakon toga uzorci A10 (10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E5 (5% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznose 2,681 te 2,451 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta. Kontrola (0% ekstrakta) sadrži 2,256 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta, dok najmanju vrijednost ukupnih polifenola pokazuju uzorci A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E15 (15% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznosi 1,732 i 1,924 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je, suprotno očekivanju, odnos dodanog ekstrakta i ukupnog sadržaja polifenola obrnuto proporcionalni. Što znači da su najveću vrijednost ukupnog sadržaja polifenola pokazali uzorci s najmanjim postotkom dodanog ekstrakta (2,5%). Uzorci koji su u svom sastavu imali veće postotke dodanog ekstrakta imali su manji udio ukupnih polifenola pa su tako uzorci s najvećim postotkom dodanog ekstrakta (15%) imali najmanje vrijednosti ukupnih polifenola. Iako postoji jasan utjecaj postotka dodanog ekstrakta na sadržaj ukupnih polifenola, oblik dodanog ekstrakta (tekući ili mikroinkapsulirani) nije imao značaj utjecaj. Slične rezultati dobiveni su u radu Pižeta (2018). Naime, u tom je istraživanju utvrđeno da dodatak biljnog ekstrakta povoljno djeluje na kemijska svojstva kakao mješavina sušenih u pjenu samo do određene (optimalne) razine (w = 3.75% ekstrakta), dok bilo koji drugi dodatak ekstrakta u količinama višim od optimalne dovodi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola.

#### 4.2.2. Antioksidacijski kapacitet

U istraživanju Lee i suradnika (2003) vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod kakaa mjerena je DPPH metodom te je iznosila 836 mg ekvivalenta askorbinske kiseline po serviranju (7,3 grama). Antioksidacijski kapacitet kakao mješavina u ovom radu određen je DPPH metodom ( $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta). Metoda se temelji na detekciji potencijalnog antioksidansa koji donira (prenosi) jedan elektron čime se smanjuje koncentracija slobodnog radikala DPPH, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14.



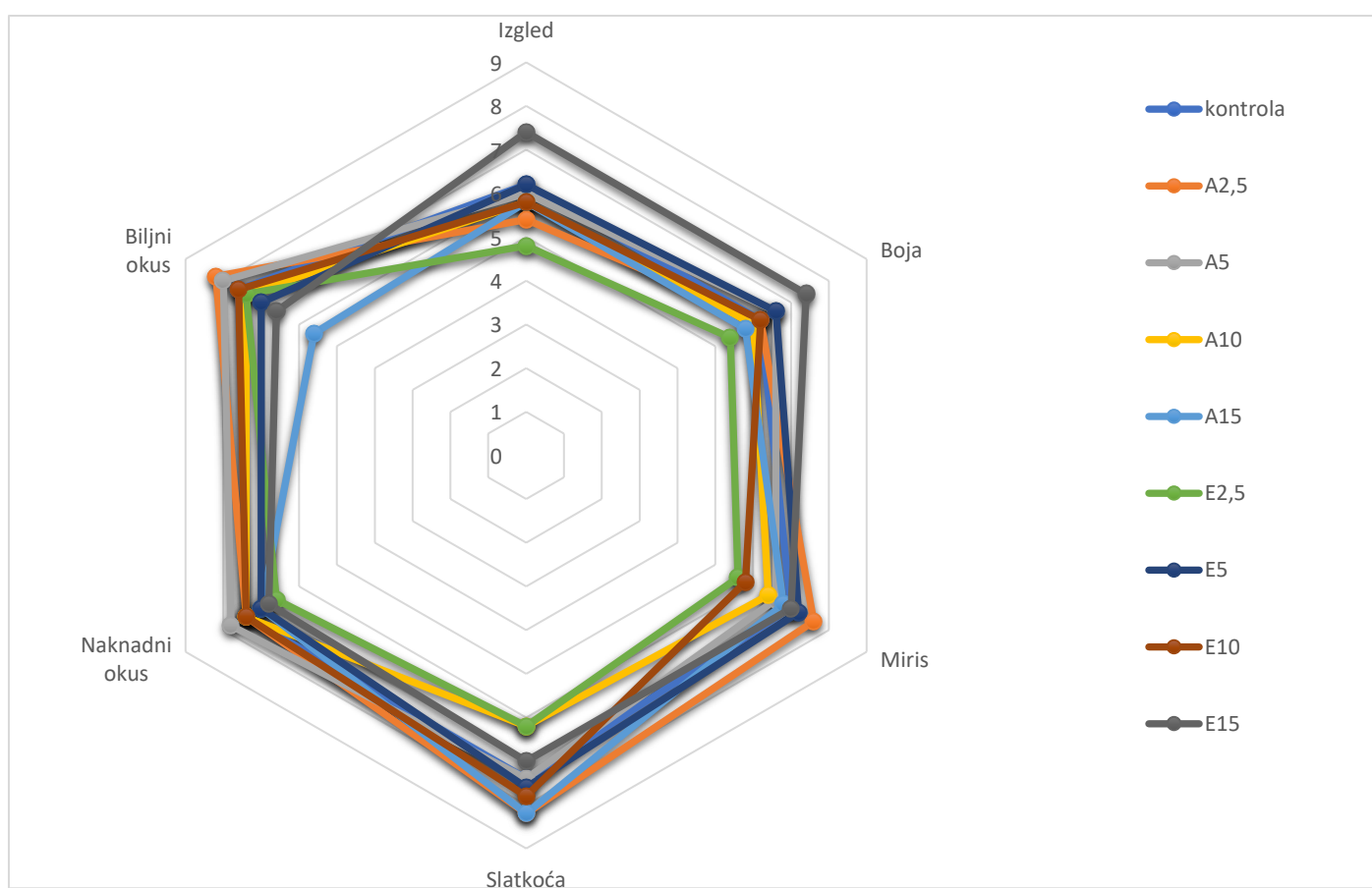
Slika 8. Antioksidacijski kapacitet kakao mješavina te čistog ekstrakta u tekućem i mikroinkapsuliranom obliku prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 2$ )

Najveći antioksidativni kapacitet utvrđen je, slično kao i kod udjela polifenola, kod uzoraka E2,5 ( $12,842 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta) i A2,5 ( $12,491 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta), ali i kod kontrole ( $12,674 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta). Jednako kao i kod ukupnog sadržaja polifenola (Slika 13.) što je veći postotak dodanog ekstrakta to je manja vrijednost antioksidacijski kapaciteta. Tako nadalje slijede A5 ( $11,354 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta), E5 ( $8,588 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta), E15 ( $8,255 \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta), E10

(7,951  $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta) i A10 (7,156  $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta). Najnižu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ima uzorak A15 i ona iznosi 5,690  $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}$  ekstrakta. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pokazuje sličan trend kao i udjel ukupnih polifenola određen Folin-Ciocalteu metodom, povećanjem postotka dodanog ekstrakta dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Također, iz rezultat se može primijetiti kako ima određene razliku ovisno o obliku u kojem je ekstrakt dodan, pri čemu su više vrijednosti dobivene za uzorke kod kojih je ekstrakt dodan u tekućem obliku. Ovi se rezultati mogu objasniti efektom razrjeđivanja pjene. Naime, veće količina dodanog ekstrakta u pjenu uvodi i veći postotak vode koji posljedično smanjuje količinu antioksidansa. Slični su rezultati postignuti i u istraživanjima Pižete (2018) i Buljat (2018).

### 4.3. SENZORSKA SVOJSTVA DOBIVENIH PRAHOVA

Senzorska analiza dobivenih kakao uzoraka, provedena je pomoću panel skupine (5 ocjenjivača) koja je ocjenjivala 6 različitih senzorskih svojstva: izgled, boju, miris, slatkoću, naknadni okus i biljni okus. Navedena svojstva ocjenjivana su hedonističkom skalom gdje je za svaki parametar dodijeljena ocjena od 1 do 9 (pri čemu 1 označava najmanje sviđanje, dok 9 označava najveće sviđanje). Rezultati senzorske analize prikazani su na Slici 9.



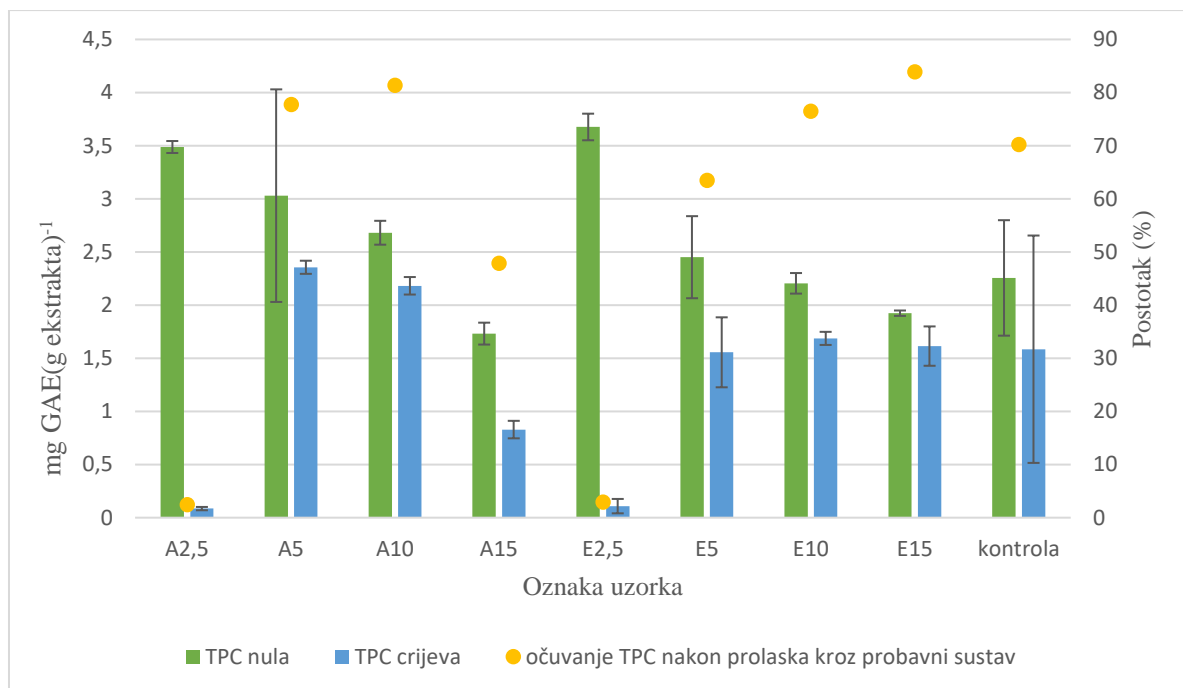
Slika 9. Rezultati senzorske analize dobivenih kakao prahova prikazane kao srednja vrijednost

Na temelju dobivenih ocjena, najbolje senzorski ocijenjeni uzorci su A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta), A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E15 (15% tekućeg ekstrakta), dok je najlošije ocijenjeni uzorak E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta). Za svojstvo izgleda, najbolje ocijenjeni uzorak je E15 (15% tekućeg ekstrakta) s prosječnom ocjenom od 7,4, dok je najlošije ocijenjeni uzorak A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) s ocjenom od 5,4. Za svojstvo boje, najbolju ocjenu ima uzorak E15 (15% tekućeg ekstrakta) s ocjenom

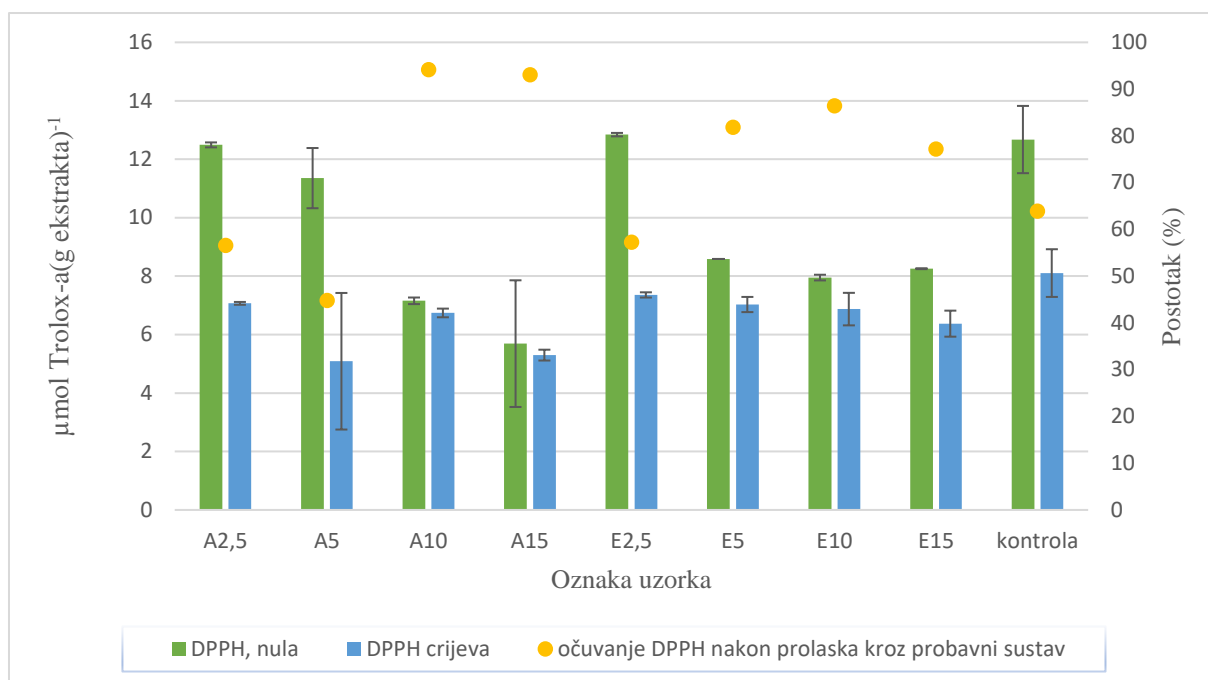
7,4, dok je najlošije ocijenjen uzorak E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) s ocjenom 5,4. Za svojstvo mirisa, najbolje ocijenjeni je uzorak A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) s ocjenom 7,6, dok je najlošije ocijenjeni uzorak E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) s ocjenom 5,6. Najvišu prosječnu ocjenu za svojstvo slatkoće imaju uzorci A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) s ocjenom 8,2, dok najlošiju ocjenu, koja iznosi 6,2, imaju uzorci A10 (10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta). Za svojstvo naknadnog okusa, najvišu ocjenu, koja iznosi 7,8, ima uzorak A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta), dok najnižu ocjenu ima uzorak E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta). Najvišu prosječnu ocjenu za svojstvo biljnog okusa ima A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) koja iznosi 8,2, dok najnižu ocjenu ima A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) te ona iznosi 5,6. Pregledom rezultata može se primijetiti kako dodatak različitih koncentracija ekstrakta nije doveo do boljih, odnosno lošijih senzorskih rezultata pa se tako prosječna ocjena za sva uzorke kreće između i oko 6 i 7. Međutim, primjetne razlike prisutne su ako uspoređujemo oblik u kojem je ekstrakt dodan. Uzorci s prisutnim ekstraktom u obliku mikrokapsulica bolje su ocijenjeni za svojstva biljnog okusa, naknadnog okusa i slatkoće, dok su uzorci s dodanim tekućim ekstraktom bolje ocijenjeni za svojstva izgleda i boje.

#### 4.4. IN-VITRO MODEL PROBAVE DOBIVENIH PRAHOVA

Kako bi se odredilo preživljavanje i biodostupnost polifenola te antioksidacijska aktivnost kakao prahova proveden je *in-vitro* model probave koji simulira pH i enzimatske aktivnosti u ustima, želucu i crijevima. *In-vitro* biodostupnost definirana je kao postotak ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta koji je određen u uzorcima nakon prolaska kroz probavni sustav *in-vitro* u odnosu na početne vrijednosti.



Slika 10. Sadržaj ukupnih polifenola kakao mješavina te čistog ekstrakta u tekućem i mikroinkapsuliranom obliku prije i nakon prolaska kroz *in-vitro* model probave prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 2) te postotak očuvanja ukupnih polifenola



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet kakao mješavina te čistog ekstrakta u tekućem i mikroinkapsuliranom obliku prije i nakon prolaska kroz *in-vitro* model probave prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 2$ ) te postotak očuvanja antioksidacijskog kapaciteta

Na Slici 10. prikazani su rezultati za početne vrijednosti ukupnih polifenola uzoraka, vrijednosti nakon prolaska kroz probavni sustav *in-vitro* te postotak njihova očuvanja. Uzorci A10 (10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E15 (15% tekućeg ekstrakta) imali su najveći postotak očuvanja ukupnih polifenola koji iznosi 81,4 te 83,9%. Nakon njih, padajućim redoslijedom slijede uzorci A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta), E10 (10% tekućeg ekstrakta) i kontrola (0% ekstrakta) čije vrijednosti iznose 77,8; 76,5 i 70,3%. Nešto niže vrijednosti imaju uzorci E5 (5% tekućeg ekstrakta) i A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čije vrijednosti iznose 63,5 i 47,9%, dok daleko najniže vrijednosti očuvanja ukupnih polifenola pokazuju uzorci A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti iznose 2,5 i 3,0%. Iz rezultata se može primijetiti kako se bolji rezultati očuvanja ukupnih polifenola postižu s većim koncentracijama dodanog ekstrakta (10 i 15%), dok nema značajne razlike između očuvanja ukupnih polifenola između uzoraka koji su ekstrakt imali u mikrokapsuliranom ili tekućem obliku. Međutim, iako su rezultati postotka očuvanja ukupnih polifenola slični, zbog većih početnih koncentracija polifenola u uzorcima koji sadrže mikroinkapsulirani ekstrakt kod njih je prisutna i veća krajnja koncentracija ukupnih polifenola.

Na Slici 11. prikazani su rezultati za početne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka, vrijednosti nakon prolaska kroz probavni sustav *in-vitro* te postotak njihovog očuvanja. Najveći



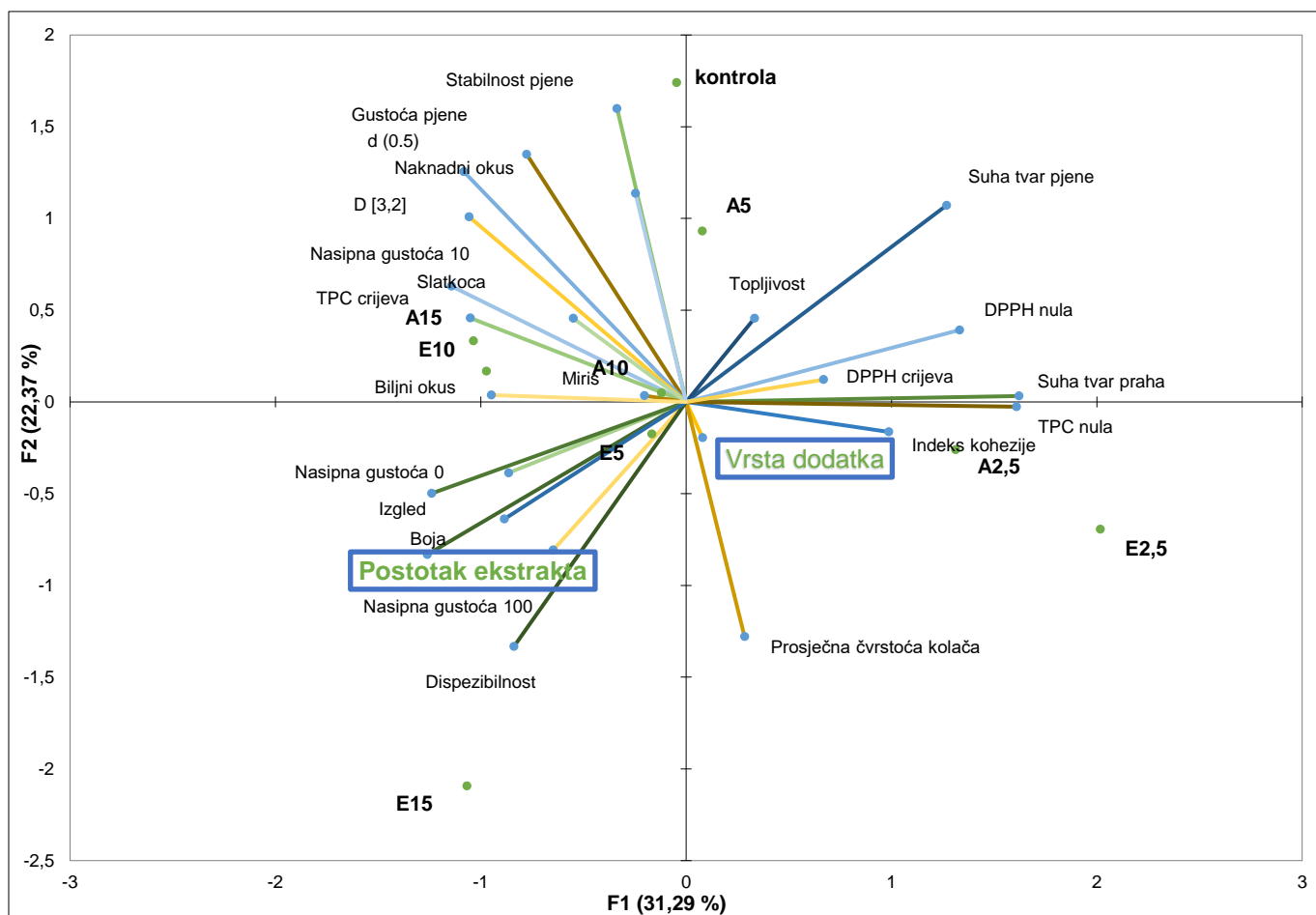
postotak očuvanja antioksidacijske aktivnosti pokazali su uzorci A10 (10% mikroinkapsuliranog ekstrakta) i A15 (15% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čije vrijednosti iznose 94,2 i 93,1%. Nakon njih, slijede uzorci E10 (10% tekućeg ekstrakta), E5 (5% tekućeg ekstrakta) i E15 (15% tekućeg ekstrakta) čije vrijednosti redom iznose 86,4; 81,8 te 77,2. Uzorak kontrola (0% ekstrakta) ima očuvanje od 63,9%, dok nešto niže vrijednosti imaju uzorci E2,5 (2,5% tekućeg ekstrakta) i A2,5 (2,5% mikroinkapsuliranog ekstrakta). Najnižu vrijednost očuvanja antioksidacijske aktivnosti ima uzorak A5 (5% mikroinkapsuliranog ekstrakta) čija vrijednost iznosi 44,8%. Iz dobivenih rezultata se može primijetiti kako, slično kao i kod ukupnih polifenola, u pravilu što je veći postotak dodanog ekstrakta to je veće i očuvanje antioksidacijske aktivnosti, dok nema značajne razlike u očuvanju antioksidacijske aktivnosti između uzoraka koji su imali dodani ekstrakt u obliku mikrokapsulica ili u tekućem obliku.

## 4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Procjena utjecaja vrste dodataka te različitih koncentracija dodanog ekstrakta na različita fizikalna, kemijska i senzorska svojstva dobivenih kakao mješavina obogaćenih ekstraktom industrijske konoplje provedena je pomoću Wilcoxon testa ekvivalentnih parova. Vrste dodataka korištene u ovom radu su tekući i mikroinkapsulirani ekstrakti industrijske konoplje koji su dodani u pripremljene kakao mješavine te su svi zajedno sušeni u pjenu. Iz statističke analize Wilcoxon testa vrste dodataka imale su utjecaja na određene fizikalne, kemijske te senzorske parametre. Vrsta dodatka imala je značajan utjecaj na stabilnost pjene ( $p=0,0077$ ), pri tome su obje vrste snižavale njene vrijednosti što sugerira da dodatkom ekstrakta dolazi do destabilizacije integriteta pjene te je dodatak mikroinkapsuliranih ekstrakata doveo je do većih vrijednosti za stabilnosti pjene. Gustoća ( $p=0,0077$ ) te suha tvar pjene ( $p=0,0077$ ) snižene su dodatkom obje vrste dodatka te je njihova vrijednost niža kod uzoraka koji sadrže ekstrakt u tekućem obliku. Suha tvar praha ( $p=0,0077$ ) snižena je dodatkom obje vrste ekstrakata. Vrste dodataka, isto tako, imale su značajan utjecaj na  $d(0,5)$  i  $D[3,2]$ . Indeksi kohezije ( $p=0,0077$ ) su povećani dodatkom ekstrakta obje vrste te je veće povećanje indeksa kohezije postignuto dodatkom ekstrakta u obliku mikrokapsulica što se može objasniti uporabom želatine za proizvodnju samih mikrokapsulica. Nadalje, vrste dodatka imaju statistički značajan utjecaj i na nasipnu gustoću (0, 10, 100) ( $p=0,0077$ ) te prosječnu čvrstoću kolača ( $p=0,0077$ ) pri čemu su obje vrste dodatka dovele do njihova povećanja, a takvo je povećanje veće kod uzoraka kojima je ekstrakt dodan u tekućem obliku. Što se tiče rekonstitucijskih svojstva, vrsta dodatka značajno utječe na svojstvo disperzibilnosti ( $p=0,0077$ ) pri čemu obje vrste dodatka povećavaju disperzibilnost (negativno utječu), a takvo povećanje je značajnije kod uzoraka koji imaju dodatak u tekućem obliku. Kod kemijskog dijela analize, vrste dodataka imaju pozitivan utjecaj na sadržaj ukupnih polifenola ( $p=0,0108$ ). Također, vrste dodataka imale su negativan utjecaj i na rezultate antioksidativne aktivnosti nakon simulacije probavnog sustava *in-vitro* ( $p=0,0076$ ). Kod senzorske analize, vrste dodataka imale su statistički značajan utjecaj na sve komponente senzorske analize (izgled, boju, miris, slatkoću, naknadni okus, biljni okus) ( $p=0,0076$ ).

Postotak ekstrakta ima značajan utjecaj na suhu tvar pjene ( $p=0,0077$ ) pri čemu povećanjem postotka ekstrakta dolazi do smanjenja suhe tvari pjene, a također ima statistički značajan utjecaj na ostala fizikalna svojstva pjene: gustoću ( $p=0,0077$ ) te stabilnost pjene ( $p=0,0076$ ). Kod fizikalnih svojstava praha, postotak ekstrakta ima statistički značajan utjecaj na suhu tvar

praha ( $p= 0,0076$ ) pri čemu, slično kao i kod suhe tvari pjene, veći postoci dodanog ekstrakta dovode do većeg sniženja vrijednosti suhe tvari praha. Nadalje, statistički značajno utječe na indeks kohezije ( $p= 0,0151$ ), prosječnu čvrstoću kolača ( $p= 0,0076$ ) te nasipnu gustoću (0, 10, 100) ( $p= 0,0077$ ). Postotak ekstrakta isto tako je imao značajan utjecaj na  $d$  (0,5) i  $D$  [3,2] parametre veličine čestica ( $p= 0,0077$ ) te je, u pravilu, veličina čestica rasla što je veći postotak ekstrakta dodan u kakao prahove. Što se tiče rekonstitucijskih svojstva, postotak ekstrakta značajno utječe na svojstva topljivosti ( $p= 0,0208$ ) i disperzibilnosti ( $p= 0,0076$ ) pri čemu dodatkom većeg postotka ekstrakta dolazi do većeg povećanja disperzibilnosti (negativni utjecaj). Što se tiče kemijskih svojstava, postotak ekstrakta jedino je značajno utjecao na rezultate ukupnih polifenola dobivene nakon prolaska kroz *in-vitro* model probave ( $p= 0,010863$ ). Kod senzorskog dijela analize, postotak dodanog ekstrakta nije statistički utjecao ni na jedno od promatranih svojstava, već ona primarno ovise o preferencijama potrošača.



Slika 12. PCA analiza svih uzoraka te mjerenih fizikalnih, kemijskih i senzorskih svojstava s obzirom na faktore vrste dodatka i postotka ekstrakta

Analiza glavnih komponentata (engl. Principal Component Analysis, tj. PCA) provedena je s ciljem dodatnog utvrđivanja koji je faktor (vrsta dodatka ili koncentracija dodatka) imao dominantan utjecaj na svako pojedino svojstvo i svaki pojedini uzorak. PCA uočava razlike u izmjerenim vrijednostima, te ih obrađuje tako da se dobiju najvažnije karakteristike iz kojih se dobivaju nove ortogonalne varijable koje zovemo „principal components“. Iz njih se računaju „faktori“ za svaki uzorak, koji je linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka koji je od relativne važnosti za model (Valinger i sur., 2017). Zbog toga što je faktor ovisan i izračunat na temelju spektralnih karakteristika, uzorci koji su prema određenim komponentama slični, biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju, bit će udaljeniji (Valinger i sur., 2017). Abdi i Williams (2010) navode kako PCA daje uvid u sličnostima i različitostima između podataka, tako da ih smješta na određenu poziciju na grafu. Faktori predstavljaju razlike u karakteristikama uzorka, tj. u njihovom kemijskom sastavu, no

ne može se točno znati o kojim spojevima se radi. Na Slici 12. grafički su prikazani rezultati PCA analize svih svojstava i uzoraka. Na temelju rezultata može se primijetiti kako vrsta dodatka najviše utječe na sljedeća svojstva: suha tvar praha, TPC nula, DPPH nula, indeks kohezije, suha tvar pjene, DPPH crijeva, topljivost te prosječna čvrstoća kolača, dok kod uzoraka najviše utječe na: E2,5; A2,5; i A5. S druge strane, postotak ekstrakta utječe na sljedeća svojstva: nasipna gustoća pri 0 i 100 udaraca, kompletna senzorska svojstva, TPC crijeva, D [3,2], disperzibilnost, d (0,5), gustoća i stabilnost pjene. Što se tiče uzoraka najviše utječe na: E10, A15, E15, E5 I A10. Također je moguće primijetiti kako PCA analiza potvrđuje rezultate dobivene Wilcoxon testa, što se lijepo može vidjeti na slici zbog toga jer su Postotak ekstrakta i npr., suha tvar pjene I dijagonalno suprotnom kvadrantu. S obzirom na dobivene rezultate PCA analize, može se zaključiti kako je postotak ekstrakta imao značajniji utjecaj na dobivene uzorke te mjerena svojstva nego vrsta dodatka.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i analize rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Dodatak ekstrakta industrijske konoplje dovodi do smanjenja stabilnosti i gustoće pjene. Suha tvari pjene smanjuje se proporcionalno s povećanjem postotka dodanog ekstrakta.
2. Dodatak ekstrakta dovodi do smanjenja postotka suhe tvari praha, s time da je takvo smanjenje izraženije kod uzoraka koji sadrže tekući oblik ekstrakta.
3. Dodatkom ekstrakta dolazi do povećanja vrijednosti indeksa kohezije te su takvi prahovi okarakterizirani kao kohezivni te vrlo kohezivni prahovi. Uzorci koji su sadržavali mikroinkapsulirane ekstrakte industrijske konoplje pokazali su se kao kohezivniji u usporedbi s uzorcima sa dodanim tekućim ekstraktom.
4. Dodatkom ekstrakta dolazi do povećanja vrijednosti prosječne čvrstoće kolača pri čemu uzorci s tekućim ekstraktom imaju prosječno veće vrijednosti čvrstoće kolača od uzoraka s mikroinkapsuliranim ekstraktom.
5. Dodatak mikroinkapsuliranog ekstrakta dovodi do poboljšanja topljivosti prahova, dok dodatak tekućeg ekstrakta povećava disperzibilnost prahova.
6. Najveću vrijednost ukupnog sadržaja polifenola pokazuju uzorci s 2,5% dodanog ekstrakta.
7. Uzorci s prisutnim ekstraktom u obliku mikrokapsulica bolje su ocijenjeni za svojstva biljnog okusa, naknadnog okusa i slatkoće, dok su uzorci s dodanim tekućim ekstraktom bolje ocijenjeni za svojstva izgleda i boje.
8. Bolji rezultati očuvanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti postižu se s većim koncentracijama dodanog ekstrakta (10 i 15%).

9. PCA analiza pokazala je kako je postotak dodanog ekstrakta imao značajniji utjecaj na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva prahova nego vrsta dodanog ekstrakta.
10. Dodatak ekstrakta konoplje u koncentracijama 2,5 i 5% w/w doveo je do najboljeg poboljšanja kemijskih (ukupni udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost) i senzorskih svojstava, dok su veće koncentracije ekstrakta imale niže vrijednosti kemijskih svojstava te su slabije senzorski ocjenjene zbog intenzivnog naknadnog i biljnog okusa.
11. Ekstrakt industrijske konoplje pokazao se kao pogodan dodatak, a instant kakao prak kao pogodni nosač za proizvodnju funkcionalog napitka.

## 6. LITERATURA

Abbasi, E. i Azizpour, M. (2015) Evaluation of Physicochemical Properties of Foam Mat Dried Sour Cherry Powder. *LWT – Food Sci. Technol.* **68**, 105-110.

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal Component Analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2**, 433-459.

Abu-Hardan, M., Hill, S.E. (2010) Handling properties of cereal materials in the presence of moisture and oil. *Powder Technol.* **198**, 16-24.

Ackar, Đ., Valek Lendić, K., Valek, M., Šubarić, D., Miličević, B., Babić, J., Nedić, I. (2013) Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? *J. Chem-ny.* **2013**, 1-7.

Afoakwa, E. (2010) Chocolate science and technology, Wiley-Blackwell. Hoboken, SAD.

Aguilera, J. M., Valle, J. M., Karel, M. (1995) Review: caking phenomena in food powders. *Trends Food Sci. Tech.* **6**, 149-154.

Andujar, I., Recio, M.C., Giner, R.M., Rios, J.L. (2012) Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-23.

Anonymous (1999) De Zaan Cocoa Product Manual. ADM Cocoa.

Anonymous (2018a) < <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=29824> >. Pristupljeno 2. studenog 2018.

Anonymous (2018b) < <https://nutritiondata.self.com/facts/sweets/5471/2> >. Pristupljeno 2. studenog 2018.

Anonymous (2018c) < <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list> >. Pristupljeno 2. studenog 2018.

Anonymous (2018d) < <https://ministryofhemp.com/blog/hemp-products-list/#food> >. Pristupljeno 9. studenog 2018.



- Azizpour, M., Mohebbi, M., Khodaparast, M.H.H. (2016) Effects of foam-mat drying temperature on physico-chemical and microstructural properties of shrimp powder. *Innov. Food Sci. Emern.* **34**, 122-126.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A. (2007) Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J. Nutr.* **137(6)**, 1436-1441.
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., Sikora, M. (2015) Cocoa agronomy, quality, nutritional, and health aspects. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **55(5)**, 620-659.
- Bag, S., Srivastav, P., and Mishra, H. (2011) Optimization of process parameters for foaming of bael (*Aegle marmelos*; L.) fruit pulp. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 1450 -1458
- Baniel, A., Fain, S.A., Popineau, Y. (1997) Foaming properties of egg albumin with a bubbling apparatus compared with whipping. *J. Food Sci.* **62**, 377-381.
- Barbosa-Canovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Pablo, J. & Hong, Y. (2005) Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality, 1.izd., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Belščak, A., Benković, M., Komes, D., Bauman, I., Horžić, D., Dujmić, F., Matijašec, M. (2011) Physical properties and bioactive constituents of powder mixtures and drinks prepared with cocoa and various sweeteners. *J. Arg. Food Chem.* **58**, 7187-7195.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., Bauman, I. (2012) Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Res. Int.* **48(2)**, 820-830.
- Bender, D. V. (2008) < <http://www.vitamini.hr/4400.aspx> >. Pristupljeno 16. listopada 2018.
- Benković, M., Bauman, I. (2009) Flow characteristics of powdered infant formula. *J. Process Energ. Arg.* **13(1)**, 67-70.
- Benković, M., Bauman, I. (2011) Agglomeration of Cocoa Powder Mixtures – Influence Of Process Conditions On Physical Properties Of The Agglomerates. *J. Process Energ. Arg.* **15**, 46-49

- Benković, M., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Lenart, A., Domian, E., Komes, D., Bauman, I. (2015) Artificial neural network modelling of changes in physical and chemical properties of cocoa powder mixtures during agglomeration. *J. Food Sci. Technol.* **64**, 140-148.
- Benković, M., Radić, K., Vitali Čepo, K., Jaškunas, E., Janutis, L., Morkunaite, M., Srećec, S. (2018) Production of cocoa and carob-based drink powders by foam mat drying. *J. Food Process. Eng.* **41**, 1-11.
- Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow properties of commonly used powders and their mixtures. *Food Bioprocess Technol.* **6(9)**, 2525-2537.
- Beutler, J., Der Marderosian, A. (1978) Crossbreeding between *Cannabis sativa* and *C. ruderalis*, with analysis of cannabinoid content. *Econ. Bot.* 378-394.
- Brygidyr, A., Rzepecka, M., McConnell, M. (1977) Characterization and drying of tomato paste foam by hot air and microwave energy. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **10**, 313-319.
- Buijsse, B., Feskens, J.M., Kok, F.J. (2006) Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch. Intern. Med.* **166(4)**, 411-417.
- Buljat, A.M. (2018) Razvoj funkcionalnih kakao praškastih proizvoda obogaćenih ekstraktima lavande (*Lavandula x hybrida L.*). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Burdock, G. A., Carabin, I. G., & Griffiths, J. C. (2006) The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries, *Toxicology.* **221**, 17–27.
- Callaway, J.C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica.* **140**, 65–72.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S.K., Takrama, J.S., Bernaet, H., De Vuyst, L. (2008) Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J. Sci. Food. Arg.* **88(3)**, 2288-2297.
- Chen, T., He, J., Zhang, J., Li, X., Zhang, H., Hao, J., Li, L. (2012) The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa L.*). *Food Chem.* **134**, 1010-1017.

- Chen, R., Zhang, J., Fan, N., Teng, Z.Q., Wu, Y., Yang, H. (2013) Delta 9 THC- caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. *Cell*. **155(5)**, 1154-1165.
- Chen, Y.L., and Chou, J.Y. (1993) Selection of Anti-Caking Agents through Crystallization, *Powder Technol.* **77(1)**, 1-6.
- Cinquanta, L., Di Cesare, C., Manoni, R., Piano, A., Roberti, P., Salvatori, G. (2016) Mineral essential elements for nutrition in different chocolate products. *Int. J. FoodSci. Nutr.* **67(7)**, 773-778.
- Cock, P., Bechert, C.L. (2002) Erythritol. Functionality in noncaloric functional beverages. *Pure Appl. Chem.* **74 (7)**, 1281-1289.
- Conrad, C. (1997) Hemp for Health: The Medicinal and Nutritional Uses of Cannabis Sativa, 1. izd., healing Arts Press, Rochester.
- Cooper, K.A., Donovan, J.L., Waterhouse, A.I., Williamson, G. (2008) Cocoa and health: a decade of research. *Brit. J. Nutr.* **99(1)**, 1-11.
- Crowe, K.M., Francis, C. (2013) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. *J. Acad. Nutr. Diet.* **8**, 1096-1103.
- Čović D., Bojić M., Medić-Šarić M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik.* **65**, 693-704.
- De Muijnck, L. (2005) Cocoa. U: Encapsulated and Powdered Foods (Onwulata, C., ured.), CRC Press, Boca Raton, USA.
- Dickinson, E. (1998) Proteins at interfaces and in emulsions Stability, rheology and interactions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **94**, 1657-1669.
- Eduardo, J.V., Gilberto, E.P., Beristain, C.I., Hipolito, R.T. (2001) Effect of foaming agents on the stability rheological properties, drying kinetics and flavour retention of tamarind foam-mats. *Food Res. Int.* **34(7)**, 587-598.
- Ekpong, A., Phomkong, W., Onsaard, E. (2015) The effects of maltodextrin as a drying aid and drying temperature on production of tamarind powder and consumer acceptance of the powder. *Int. Food Res. J.* **23(1)**, 300-308.

- Estevinho, B.N., Rocha, F.A., Santos, L., Alves, A. (2013) Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends Food Sci. Tech.* **31(2)**, 138-155.
- Falade, K.O., Adeyanju, K.I., Uzo-Peters, P.I. (2003) Foam-mat drying of cowpea (*Vigna unguiculata*) using glyceryl monostearate and egg albumin as foaming agents. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 486-491.
- Falade, K.O., Okocha, J.O. (2010) Foam-Mat Drying of Plantain and Cooking Banana (*Musa spp.*). *Food Bioproc. Technol.* **5(4)**, 1173-1180
- Falade, K.O., Solademi, O.J. (2010) Modelling of air drying of fresh and blanched sweet potato slices. *Int. J. Food Sci. Tech.* **45(2)**, 278-288.
- Fang, Y., Selomulya, C., Chen, X.D. (2007) On Measurement of Food Powder Reconstitution Properties. *Dry Technol.* **26(1)**, 3-14.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 510-525.
- Felton, L.A. (2013) Mechanisms of polymeric film formation. *Int. J. Pharm.* **457(2)**, 423-427.
- Fitzpatrick, J.J. (2005) Food powder flowability. U: Encapsulated and powdered foods (Onwulata, C., ured.) CRC, Florida, str. 247-258.
- Food for specialized health uses (1998) Japan Ministry of Health, Labour, and Welfare, Tokyo.
- Fowler, M.S. (2008) Cocoa beans: from tree to factory. U: Industrial chocolate manufacture and use, 4. izd. (Beckett, S.T., ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 8-35.
- Franco, T.S., Perussello, C.A., Ellendersen, L.N., Masson, M.L. (2016) Effects of foam mat drying on physicochemical and microstructural properties of yacon juice powder. *LWT-Food Sci. Technol.* **66**, 503-513.
- Frassinetti, S., Moccia, E., Caltavuturo, L., Gabriele, M., Longo, V., Bellani, L., Giorgi, G., Giorgetti, L. (2018) Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chem.* **262**, 56-66.
- Functional foods: Opportunities and challenges. (2005) Institute of Food Technologists, Chicago.

Functional foods-Scientific and global perspectives (2001) International Life Sciences Institute Europe Functional Food Task Force, Brussels.

Fu, Q., Sun, W. (2001) Mie Theory for Light Scattering by a Spherical Particle in an Absorbing Medium. *Appl. Optics*. **40(9)**, 1354-1361.

Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S. (2007) Dairy Powder Rehydration: Influence of Protein State, Incorporation Mode, and Agglomeration. *J. Dairy Sci.* **90(2)**, 570-581.

German, J.B., Phillips, L. (1994) Protein interactions in foams: Protein-gas phase interactions. U: Protein Functionality in Food Systems (Hettiarachchy, N.S., Ziegler, G.R., ured.) Marcel Dekker. Inc, New York, USA, str. 181-208.

Girgih, A.T., Udenigwe, C., Aluko, R. (2011) In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88(3)**, 381-389.

Griffith, E.J. (1991) Cake formation in particulate systems, VCH Publisher, Inc., New York.

Hakkinen, S. (2000) Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Ph.D. dissertation. Faculty of Medicine, Kupio, Finland.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D. (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95(14)**, 8268-8273.

Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8(9)**, 950-988.

Hardy, G. (2000) Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition*. **16**, 688-697.

Hardy, Z. i Jideani, V.A. (2017) Foam-mat drying technology: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **57**, 2560-2572.

Hasler, C. M. (1998) Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.* **52**, 63-70.

Hasler, C.M. (2002) Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* **12**, 3772-3781.

Hazekamp, A. (2007) Cannabis; Extracting the medicine. Leiden: Proefschrift Universiteit Leiden.

Hazekamp, A. (2009) Medicinal use of Cannabis; a review. Leiden: Leiden University.

Hazekamp, A. (2013) An introduction to Medicinal Cannabis. Leiden: Arno Hazekamp.

Hollenberg, N.K., Fisher, N.D.L., McCullough, M.L. (2009) Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *J. Am. Soc. Hypertens.* **3(2)**, 105-112.

Janjatović, D. (2011) Ispitivanje značajki tečenja sipkih koncentrata juha. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Ji, J., Cronin, K., Fitzpatrick, J., Fenelon, M., Miao, S. (2015) Effects of fluid bed agglomeration on the structure modification and reconstitution behaviour of milk protein isolate powders. *J. Food Eng.* **167**, 175-182.

Jillavenkatesa, A., Dapkunas, S.J., Lin-Sein, L. (2001) Particle Size Characterization. *NIST Spec. Publ.* 960-971.

Kadam, D.M., Wilson, R.A., Kaur, S. (2010) Determination of biochemical properties of foam-mat dried mango powder. *Ing. J. Food Sci. Technol.* **45**, 1626-1632.

Kadam, D.M., Rai, D.R., Patil, R., Wilson, R.A., Kaur, S., Kumar, R. (2011) Quality of fresh and stored foam mat dried Mandarin powder. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 793-799.

Kadam, D.M., Wilson, R.A., Kaur, V., Chadha, S., Kaushik, P. Kaur, S., Patil, R.T., Rai, D.R. (2012) Physicochemical and microbial quality evaluation of foam-mat-dried pineapple powder. *Int. J. Food Sci. Technol.* **47**, 1654-1659.

Kaushik, R., Pradeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. Tech.* **47**, 23-33.

Komes, D. (2008) Tehnologija konditorskih proizvoda. Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Zagreb.

Kraš, < <http://www.kras.hr/hr/proizvodi/djecji-asortiman/kras-express> >. Pristupljeno 4. studenoga 2018.

- Kwak, N. S., Jukes, D. J. (2001) Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*. **12**, 99–107.
- Langford, A., Bhatnagar, B., Walters, R., Tchessalov, S., Ohtake, S. (2018) Drying of Biopharmaceuticals: Recent Developments, New Technologies and Future Direction. *Jpn. J. Food Eng.* **19**, 15-25.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003) Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7292-7295.
- Liu, L., Marziano, I., Bentham, A., Lister, J., White, E., Howes, T. (2008) Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. *Int. J. Pharm.* **362(1)**, 109-117.
- Lu, Y.F., Goldstein, D.B., Angrist, M., Cavalleri, G. (2014) Personalized medicine and human genetic diversity. *Cold Spring Harbor M.* **4 (9)**: a008581.
- Maleyki, M.J.A., Ismail, A. (2010) Antioxidant properties of cocoa powder. *J. Food Biochem.* **34(1)**, 111-128.
- Malvern Instruments Ltd. (2007) Mastersizer 2000 user manual. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd.
- Mark-Herbert, C. (2004) Innovation of a new product category—Functional foods. *Technovation*. **24**, 713–719.
- Martirosyan, D.M., Singh, J. (2015) A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *J. Funct. Foods.* **5(6)**, 209-223.
- Mayor, L., Sereno, A.M. (2004) Modeling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *J. Food Eng.* **61(3)**, 373-386.
- Menrad, K. (2003) Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.* **56**, 181-188.
- Mensink, G.B.M., Fletcher, R., Gurinic, M., Huybrechts, I., Lafay, L., Serra-Majer, L., Szponar, I., Tetens, I., Varkaik-Kloosterman, J., Baka, A., Stephen, A.M. (2013) Mapping low intake of micronutrients across Europe. *Br. J. Nutr.* **110(4)**, 755-773.

Mounir, S. (2017) Foam Mat Drying. U: Drying Technologies for Foods : Fundamentals and Applications (Nema, P.K., Pal Kaur, B., Mujumdar, A.S., ured.) New India Publishing Agency, New Delhi, India, str. 169-191.

Narsimhan, G., Xiang, N. (2018) Role of Proteins on Formation, Drainage, and Stability of Liquid Food Foams. *Annu. Rev. Food Sci.* **9**, 1-21.

Ndife, J., Bolaji, P., Atoyebi, D., Umezuruike, C. (2013) Production and quality evaluation of cocoa products (plain cocoa powder and chocolate). *Am. J. Food. Nutr.* **3(1)**, 31-38.

Neilson, A.P., George, J.C., Janle, E.M., Mattes, R.D., Rudolph, R., Matusheski, N.V., Ferruzzi, M.G. (2009) Influence of Chocolate Matrix Composition on Cocoa Flavan-3-ol Bioaccessibility In Vitro and Bioavailability in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9418-9426.

Nestle, < <http://nestle.hr/brands/nesquik/nesquikprah> >. Pristupljeno 4. studenoga 2018.

Niva, M. (2007) All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite.* **48**, (384–393)

Ortega, N., reguant, J., Romero, M.P., Macia, A., Motilva, M.J. (2009) Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an in Vitro Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5743-5749.

Perspectives on ILSI's international activities on functional foods (2011) International Food Information Council, Washington.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* **53(6)**, 2111-2117.

Pisanti, S., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M.C., Fiore, D., Laezza, C., Bifulco, M. (2017) Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* **175**, 133-150.

Pižeta, M. (2018) Optimiranje procesa proizvodnje praškastih kakao napitaka obogaćenih ekstraktom mente.. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Policy paper- Nutraceuticals/functional foods and health claims on food (1998) Health Canada, Ottawa.



- Prins, A. (1988) Principles of foam stability. U: Advances in food emulsions and foams (Dickinson, E. i Stainsby, G. ured.), Elsevier, London,UK. str. 91-122.
- Rajkumar, P., Kailappan, R., Viswanathan, R., Raghavan, G.S.V. (2007) Drying characteristics of foamed alphonso mango pulp in a continuous type foam mat dryer. *J. Food Eng.* **79**, 1452-1459.
- Ratti, C. i Kudra, T. (2006) Drying of Foamed Biological Materials: Opportunities and Challenges. *Dry Tech.* **24**, 1101-1108.
- Renc, P., Sicinska, E., Jeruszka-Bielak, M. (2016) Analysis of food with added minerals available on the Warsaw market. *J. Elem.* **21(4)**, 1115-1125.
- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J., Wagner, A.E. (2009) Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.* **10(10)**, 4290-4309.
- Roberfroid M.B. (2000a) Defining functional foods. U: Functional foods Concept to product, (Gibson G. R., & Williams C. M ured.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press -LLC, Cambridge, str. 9-25.
- Roberfroid, M.B. (2000b) A European Consensus Of Scientific Concepts of Functional Foods. *Nutrition.* **16**, 689-691.
- Rogovska, V. i Čukanova, M. (2015) Chocolate as funtional food. 10.13140/RG.2.1.4507.4403.
- Rusconi, M. i Conti, A. (2010) *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol. Res.* **61**, 5-13.
- Russo, E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **163(7)**, 1344-1364.
- Sangamithra, A., Sivakumar, V., Swamy, G.J., Kannan, K. (2014) Foam mat drying of food materials: A review. *J. Food. Process Press.* **39**, 3165-3174.
- Schubert, H. (1993) Instantization of powdered food products. *Int. Chem. Eng.* **33**, 28-45.
- Schultes, R.E., Klein, W.M., Plowman, T., Lockwood, T.E. (1974) Cannabis, an example of taxonomic neglect. *Bot. Mus. Leafl. Harv. Univ.* **23**, 337-367.

- Serafini, M., Peluso, I. (2016) Functional foods for health: The interrelated antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, spices and cocoa in humans. *Curr. Pharm. Design.* **22**, 6701-6715.
- Shah, R.B., Tawakkul, M.A., Khan, M.A. (2008) Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS Pharm Sci Tech.* **9(1)**, 250-258.
- Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P., Teixeira, P. (2011) Spray drying for the production of dried cultures. *Int. J. Dairy Technol.* **64**, 321-335.
- Small, E. i Cronquist, A. (1976) A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis, *Taxon*, **25**, (4), 405-435.
- Smeriglio, S., Galati, E.M., Monforte, M.T., Lanuzza, F., D'Angelo, V., Circosta, C. (2016) Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of Cold-Pressed Seed Oil from Finola Cultivar of Cannabis sativa L. *Phytother. Res.* **30**, 1298–1307.
- Snoijer, W. (2001) A checklist of some Cannabaceae cultivars, Part 1. Cannabis. Leiden/Amsterdam: Centre for drug research, The Netherlands.
- Snyderman, R. (2012) Personalized health care from theory to practice. *Biotechnol. J.* **7(8)**, 973-979.
- Spence, J.T. (2006) Challenges Related to the composition of functional foods. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 4-6.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Curr. Opin. Biotech.* **16**, 198–203.
- Stein, A.J. i Rodriguez – Cerezo. (2008) Functional Food in the European Union, <<http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=1719>>. Pristupljeno 23.listopada 2018.
- Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B. (2004) Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 299-313.
- Valinger, D., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I. (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *PTEP.* **21**, 17-22.

Wang Y, Williams R.O III. (2013) *Powders U: Remington Essentials of Pharmaceutics*. (Felton LA, ured.), London, Pharmaceutical Press, str. 411-433.

Werner, S.R.L., Jones, J.R., Peterson, A.H.J., Archer, R.H., Pearce, D.L. (2007a) Air-suspension coating in the food industry: Part II-microlevel process approach. *Powder Technol.* **171(1)**, 34-45.

Werner, S.R.L., Jones, J.R., Peterson, A.H.J., Archer, R.H., Pearce, D.L. (2007b) Air-suspension particle in the food industry: Part I-microlevel process approach. *Powder Technol.* **171(1)**, 25-33.

WHO/FAO (2004) *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, 2nd izd., Geneva, World Health Organization.

Wieland H. (1972) Cocoa and chocolate processing. *J. Food Eng.* **46**, 73-81.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime studenta