

Analiza čokoladnih i kakao napitaka s dodatkom eutektskih otapala primjenom elektronskog jezika

Žgela, Marina

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:159:306934>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marina Žgela
1179/USH

**ANALIZA ČOKOLADNIH I
KAKAO NAPITAKA S
DODATKOM EUTEKTIČKIH
OTAPALA PRIMJENOM
ELEKTRONSKOG JEZIKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Saše Drakula, mag. ing..

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Marini Krpan Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stručnom vodstvu, pomoći te susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Saši Drakula, mag. ing. na stručnim savjetima i pomoći tijekom izrade rada.

Također hvala i mojoj obitelji na podršci i razumijevanju tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ANALIZA ČOKOLADNIH I KAKAO NAPITAKA S DODATKOM EUTEKTIČKIH OTAPALA PRIMJENOM ELEKTRONSKOG JEZIKA

Marina Žgela, 1179/USH

Sažetak: U posljednje vrijeme, sve više se istražuje upotreba eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz nusproizvoda prehrambene industrije. Da bi razvili takav proizvod ili poboljšali kvalitetu postojećeg proizvoda, te ispitali ukus potrošača potrebno je provesti senzorsku procjenu kvalitete. Elektronski jezik je senzorski sustav koji oponaša okusni sustav čovjeka. Cilj ovog rada bio je pomoću elektronskog jezika u kombinaciji sa statističkom obradom podataka utvrditi razliku između čokoladnih i kakao napitaka. Također, utvrditi pripadaju li čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorida:glukoza (ChGlc) u skupinu čokoladnih napitaka dostupnih na tržištu, uz pretpostavku da su takvi napitci senzorski prihvatljivi potrošačima te postoji li razlika u okusu takvih proizvoda. Na temelju podataka dobivenih mjerenjem odziva senzora obrađenih multivarijantnom analizom (PCA i SIMCA) može se zaključiti da elektronski jezik prepoznaje razliku između čokoladnog i kakao napitka te da su pripremljeni čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u BGlc i ChGlc svrstani u skupinu napitaka senzorski prihvatljivih potrošačima.

Ključne riječi: čokoladni i kakao napitak, elektronski jezik, eutektičko otapalo, PCA, SIMCA

Rad sadrži: 41 stranica, 10 slika, 8 tablica, 60 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar
2. Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan
3. Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control and Nutrition
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ANALYSIS OF CHOCOLATE AND COCOA DRINKS WITH THE ADDITION OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS USING THE ELECTRONIC TONGUE

Marina Žgela, 1179/USH

Abstract: Recently, the use of deep eutectic solvents in the extraction of biologically active compounds from food by-products has been increasingly explored. In order to develop such a product or improve the quality of an existing product, and to test consumer's taste, a sensory quality assessment should be carried out. Electronic tongue is a sensory system that mimics a person's taste system. The aim of this study was to determine the difference between chocolate and cocoa drinks using electronic tongue in combination with statistical data processing. Also, determine whether chocolate drinks with added extracts in deep eutectic solvents betaine:glucose (BGlc) and choline-chloride:glucose (ChGlc) are in the group of chocolate drinks commercially available, assuming that such drinks are sensory acceptable to consumers and whether there is a difference in the taste of such products. Based on the data obtained by measuring the response of the sensors and subsequently treated by multivariate data analysis (PCA and SIMCA) can be concluded that the electronic tongue recognizes the difference between chocolate and cocoa drinks and that prepared chocolate drinks with the addition of extracts in BGlc and ChGlc are classified as drinks sensory acceptable to consumers.

Keywords: chocolate and cocoa drink, deep eutectic solvent, electronic tongue, PCA, SIMCA

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 8 tables, 60 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 Marina Krpan, Associate Professor

Technical support and assistance: Saša Drakula, MSc.

Reviewers:

1. PhD. Mirjana Hruškar, Full professor
2. PhD. Marina Krpan, Associate professor
3. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
4. PhD. Ines Panjkota Krbavčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 26 September 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Čokoladni napitak	3
2.2. Kakao napitak	3
2.3. Kakao prah.....	4
2.3.1. Kakao zrno kao izvor biološki aktivnih spojeva.....	5
2.4. Eutektička otapala (<i>engl. Deep Eutectic Solvents</i>)	6
2.4.1. Prirodna eutektička otapala (<i>engl. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES</i>).....	7
2.4.2. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičkih otapala	7
2.4.3. Primjena prirodnih eutektičkih otapala.....	10
2.5. Elektronski jezik	11
2.5.1. Princip rada α -ASTREE elektronskog jezika	12
2.5.2. Primjena elektronskog jezika	14
2.5.3. Statistička obrada podataka	15
2.5.3.1. <i>Analiza glavnih komponenti (engl. Principal Components Analysis, PCA)</i>	16
2.5.3.2. <i>SIMCA (engl. Soft Independent Modeling of Class Analogies)</i>	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Uzorci	18
3.1.2. Reagensi	20
3.1.3. Uređaji i oprema	20
3.2. Metode rada	21
3.2.1. Priprema uzoraka napitaka za analizu na elektronskom jeziku	21
3.2.2. Analiza na α -ASTREE elektronskom jeziku	21
3.2.3. Analiza podataka	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Dijagnostički test	25
4.2. Analiza čokoladnih i kakao napitaka elektronskim jezikom, te PCA i SIMCA analiza	27
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Senzorska analiza znanstvena je disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica, a određuje se uz pomoć osjetila mirisa, okusa, njuha, dodira i sluha (Stone i sur., 2012). Jedna je od najstarijih metoda za određivanje kvalitete namirnica. U prehrambenoj industriji senzorska ocjena kvalitete proizvoda primjenjuje se prvenstveno u razvoju novih proizvoda, pri poboljšanju kvalitete postojećih proizvoda, pri procjeni kvalitete proizvoda tijekom skladištenja, pri ispitivanju ukusa potrošača. Senzorska ocjena kvalitete mlijeka podrazumijeva procjenu izgleda, boje, mirisa i okusa mlijeka, te taloga koji se pri stajanju izdvaja na dnu pakiranja. Osoba koja provodi senzorsku procjenu mlijeka i mliječnih proizvoda mora dobro poznavati sastav i svojstva mlijeka i mliječnih proizvoda, uvjete proizvodnje, procese prerade, uvjete skladištenja, ali i utjecaj pojedinih čimbenika tijekom procesa prerade i skladištenja na kemijski sastav proizvoda. Senzorsko ocjenjivanje mlijeka i mliječnih proizvoda obavlja komisija za ocjenjivanje kvalitete najkasnije jedan dan nakon uzimanja uzoraka, a ocjenjuje karakteristike proizvoda poput izgleda, boje, konzistencije, mirisa i okusa (Tratnik i Božanić, 2012).

Iako se do nedavno smatralo da su ljudska osjetila najbolji mjerni instrument u senzorskoj procjeni hrane, danas su djelomično zamijenjena senzorskim sustavima kao brzim i jeftinim metodama u kontroli kvalitete prehrambenih proizvoda. Elektronski jezik je instrumentalni sustav koji oponaša okusni sustav čovjeka. On predstavlja novu, revolucionarnu tehniku brzih analiza okusa različitih tekućih uzoraka. Temelji se na parcijalno specifičnim elektrokemijskim sensorima visoke osjetljivosti i selektivnosti u kombinaciji s multivarijantnim analizama podataka (Hruškar i sur., 2009).

Eutektička otapala su dobro poznata ekološki prihvatljiva alternativa tradicionalnim organskim otapalima, prvenstveno zbog svoje biorazgradivosti i netoksičnosti (Molnar i sur., 2017). Definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Paiva i sur., 2014). Kada su komponente koje izgrađuju eutektičko otapalo najčešće primarni metaboliti takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičnim otapalima. Pripravljena otapala često su biorazgradiva, stabilnija, nisu hlapljiva, manje su toksična prema okolišu i ljudima, te je njihova direktna upotreba u proizvodnji moguća bez dodatnog pročišćavanja. Zbog postojanja širokog spektra spojeva koji mogu tvoriti prirodna eutektička otapala, postoji i mogućnost dizajniranja njihovih

fizikalno-kemijskih svojstava za različite buduće aplikacije kao npr. otapalo ili zamjenski medij u području sinteze, ekstrakcije, biokemije, elektrokemije, kemijske/enzimske katalize, proizvodnji biodzela i slično. U posljednje vrijeme sve više se ispituju postupci primjene prirodnih eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz nusproizvoda prehrambene industrije. U konačnici, obzirom da su komponente eutektičkih otapala prisutne u našoj svakodnevnoj prehrani pripremljeni ekstrakti mogli bi se izravno koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i agrokemijskoj industriji bez dodatnih pročišćavanja (Dai i sur., 2013b).

U ovom radu razmotrit će se moguća primjena ekstrakata otpada nastalog proizvodnjom kakaa pripremljenih pomoću eutektičkih otapala betain:glukoze (BGlc) i kolin-klorida:glukoze (ChGlc) kao sastojka čokoladnih i kakao napitaka i senzorska prihvatljivost takvih proizvoda. Cilj ovog rada bio je pomoću elektronskog jezika u kombinaciji sa statističkom obradom podataka utvrditi razliku između čokoladnih i kakao napitaka. Nadalje, utvrditi pripadaju li u svrhu ovog istraživanja pripremljeni čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc u skupinu čokoladnih napitaka komercijalno dostupnih na tržištu, uz pretpostavku da su takvi napitci senzorski prihvatljivi potrošačima te postoji li razlika u okusu takvih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ČOKOLADNI NAPITAK

Prema Pravilniku o kakao i čokoladnim proizvodima (2005) čokoladni napitak je proizvod koji se sastoji od mješavine kakaovog praha i šećera. Pritom sadrži najmanje 25 % udjela kakaovog praha (NN 73/2005). Poželjne karakteristike čokoladnog napitka su: lagan, osvježavajući i umjereno sladak okus, odgovarajuća boja, aroma i viskoznost, bez vidljivog taloga i slojeva, te bez intenzivnog izdvajanja masti. Sve navedene karakteristike su rezultat odgovarajućeg tehnološkog postupka, ali ovise i o kvaliteti kakao praha koji se koristi kao sirovina (Todorić, 1973).

Za proizvodnju čokoladnog napitka u mliječnim industrijama primjenjuje se sličan tehnološki postupak s različitim recepturama. Tehnološki proces proizvodnje započinje vaganjem i miješanjem kakao praha, 4-8 % šećera i stabilizatora. Potom se navedeni sastojci dodaju u pregrijano mlijeko uz miješanje. Dobivena smjesa se pasteurizira (63-74 °C, 10-30 minuta ili 75-88 °C, 16-60 sekundi), hladi ispod 8 °C i puni u ambalažu. Kod kakao praha moguća je pojava fizikalnih nedostataka kao što je slaba sposobnost vlaženja, niska topljivost te taloženje čestica kakaoo nakon otapanja. Kakao prah je netopljiv i hidrofoban te se kao takav teško dispergira u vodi ili mlijeku (Galet i sur., 2004). Iz tog razloga se čokoladno mlijeko proizvodi uz dodatak stabilizatora. Dodatak stabilizatora sprječava stvaranje taloga tijekom stajanja, a najčešće se koriste natrijev alginat, karboksi-metil celuloza (CMC), topljivi škrob, brašno od tapioke ili karagin (Petričić, 1973).

Na tržištu se nalaze različiti čokoladni napitci obzirom na udio masti, boju, aromu, količinu šećera, viskoznost. Kvaliteta takvog napitka značajno ovisi o sastavu i kvaliteti kakao praha (finoća meljave kakao zrna, sadržaj masti u zrnu, boja, aroma). Istraživanja pokazuju da i pored istog tehnološkog postupka i količine dodanih sastojaka, čokoladni napitak nema ustaljene karakteristike obzirom na boju, okus ili prisutnost taloga. Raznolikost u osobinama također je prisutna i kada se u preradi upotrebljava kakao prah istog proizvođača (Todorić, 1973).

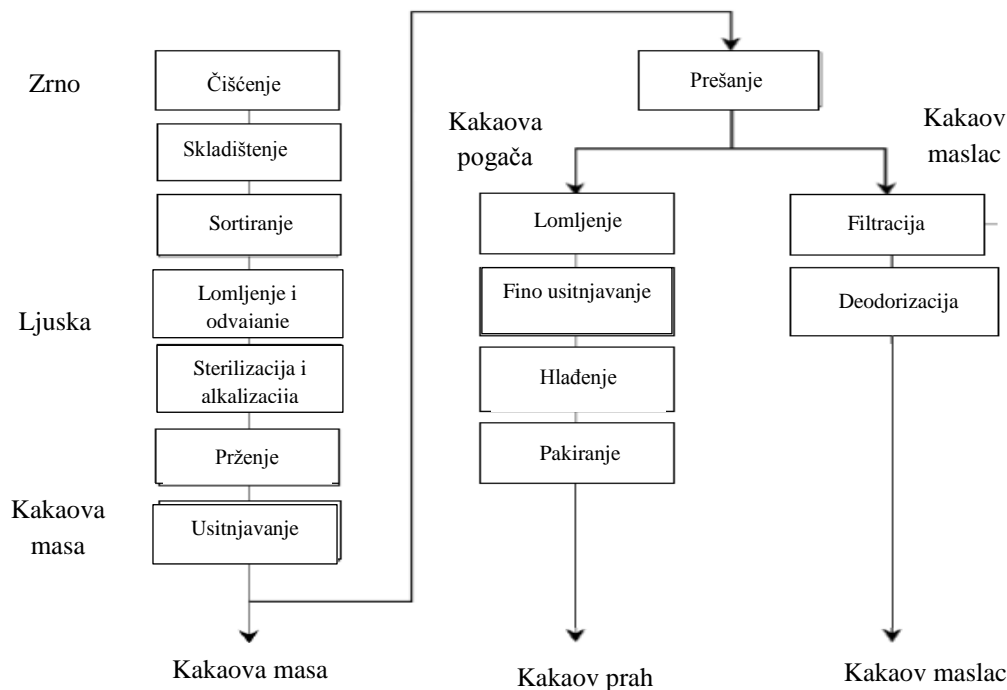
2.2. KAKAO NAPITAK

Kakao napitci predstavljaju vrlo popularno piće kod djece i kod odraslih konzumenata. Takvi se napitci proizvode miješanjem osnovnih sastojaka (kakao praha, šećera, vitamina i lecitina) nakon čega slijedi aglomeracija (Benković i Bauman, 2011). Prema Pravilniku o kakao

i čokoladnim proizvodima (2005) kakao napitak kao mješavina kakaovog praha i šećera, mora sadržavati minimalno 25 % udjela kakaovog praha (NN 73/2005).

2.3. KAKAO PRAH

Prema Pravilniku o kakao i čokoladnim proizvodima (2005) kakao prah je proizvod dobiven od očišćenih, oljuštenih i prženih kakaovih zrna, koji sadrži najmanje 20 % kakaovog maslaca, računato na suhu tvar, i najviše 9 % vode (NN 73/2005). Dobiva se iz kakao mase prešanjem. Na slici 1 prikazan je tehnološki proces proizvodnje kakao praha.



Slika 1. Tehnološki proces proizvodnje kakao praha (De Muijnck, 2005)

U samom početku prerade zrno se mora dobro očistiti od stranih primjesa radi postizanja dobre kakvoće kakao proizvoda i sprječavanja oštećenja strojeva i opreme. Sirovo kakao zrno slaže se u posude ili bazene gdje utjecajem kvasca i bakterija nastupa spontana fermentacija pri temperaturi 45-52 °C. Prilikom procesa fermentacije dolazi do promjena u okusu, mirisu, boji i izgledu, a sam proces se zaustavlja u trenutku kada octena kiselina, koja nastaje iz šećera, još uvijek nije prešla u maslačnu. Tako fermentirano zrno se suši na zraku, a potom se prži u pržionicima i drobi pri čemu dolazi do odvajanja zrna od ljuske. Prženje je termička obrada kakao zrna s ciljem smanjenja kiselosti i trpkosti, te sadržaja vode zrna na 1-2 %, a konačan cilj je oblikovanje kakao arome i okusa te smanjenje čvrstoće zrna. Nakon prženja, zrna se hlade

na temperaturu nižu od 40-50 °C kako bi se zaustavili procesi termičke razgradnje sastojaka zrna. Vrlo je važno za daljnju proizvodnju ukloniti ljusku, klicu, sitne čestice zemlje pri čemu se dobije kakao lom, kakao sitnež i kakao ljuska. Dobivena kakao masa se zatim preša pri čemu se odvaja kakao maslac, a zaostaje kakao pogača. Grubo i fino mljevenje se provodi kako bi se iz kakao loma usitnjavanjem dobila kakao masa fine homogene strukture koja se kao takva upotrebljava za proizvodnju kakao praha. Dobiveni fini kakao prah se hladi i pakira u odgovarajuću ambalažu. Karakteristike tako dobivenog kakao praha ovise o sirovini, ali i o različitim procesnim parametrima kao što je vrijeme prešanja te vrsta i stupanj alkalizacije kakao praha (De Muijnck, 2005).

Stupanj finoće čestica kakao praha ima najveći utjecaj na kvalitetu praha. Preporučljivo je da veličina čestica ne bude veća od 20 mikrona. Boja kakao praha ovisi o vrsti upotrijebljenog kakao zrna i udjelu kakao mase u ukupnoj količini kakao praha, dok aromu praha određuje udio i kvaliteta kakao maslaca. Osim neujednačenog kemijskog sastava i strukture kakao praha, količina šećera može negativno utjecati na okus napitka na način da veća količina šećera može izazvati suviše sladak okus (Todorčić, 1973).

2.3.1. Kakao zrno kao izvor biološki aktivnih spojeva

Fermentirano i osušeno kakao zrno primarna je sirovina za dobivanje kakao prah (Oracz i sur., 2013). Poznato je da je kakao zrno bogat izvor fitokemikalija i biološki aktivnih spojeva s korisnim učincima na ljudsko zdravlje (Baharum i sur., 2016). Fenolni spojevi kakao zrna imaju važnu ulogu u oblikovanju senzorskih svojstava zrna i proizvoda dobivenih njegovom preradom, jer formiraju komplekse s polisaharidima i proteinima. Također, odgovorni su za oštar i gorak okus sirovog zrna i utječu na stabilnost i probavljivost kakao zrna (Oracz i sur., 2013).

Kakao zrno je bogat izvor polifenola različitih struktura, od monomernih do oligomernih i polimernih. Tri su glavne skupine polifenolnih spojeva u kakao zrnu: flavan-3-oli ili katehini (oko 37 %), procijanidini (58 %) i antocijani (oko 4 %) (Hii i sur., 2009; Baharum i sur., 2016). Najzastupljeniji su flavanoli koji se javljaju kao aglikoni u monomernom ili polimeriziranom obliku. U monomerne oblike pripadaju flavan-3-oli od kojih je (-)-epikatehin najzastupljeniji i čini 35 % ukupnog sadržaja polifenola u zrnu. Prisutne su i manje količine (+)-katehina i tragovi (+)-galokatehina, (-)-epigalokatehina i (-)-epikatehin-3-O-galata (Oracz i sur., 2015). U sirovom kakao zrnu polimerni flavan-3-oli (procijanidini) čine oko 58 % ukupnog sadržaja polifenola. Uglavnom se sastoji od jedinica (-)-epikatehina (Brahem i sur.,

2018). Netopljivi i topljivi tanini su odgovorni za tipičnu trpkost i gorčinu svježe ubranog zrna zbog sposobnosti formiranja kompleksa s proteinima. Antocijanini čine 4 % ukupnih fenolnih spojeva u kakaovom zrnu, a najzastupljeniji su glikozidi cijanidin-3- α -galaktozid i cijanidin-3- β -arabinozid (Oracz i sur., 2013).

2.4. EUTEKTIČKA OTAPALA (*engl. Deep Eutectic Solvents*)

Razvoj industrijske proizvodnje uzrokuje onečišćenje prirode i narušavanje ekološke ravnoteže. Unutar zelene kemije intenzivno se istražuju novi, ekološki prihvatljiviji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koje bi zamijenile opasna organska otapala sveprisutna u industriji. Prema smjernicama zelene kemije idealno otapalo trebalo bi biti kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, jednostavno za uporabu te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). To bi se moglo postići provođenjem sinteze bez prisutnosti otapala ili zamjenom postojećih otapala vodom, superkritičnim otapalima ili tzv. novim „zelenim“ otapalima, odnosno ionskim tekućinama i eutektičkim otapalima (Sander, 2012).

Abbott i sur. prvi put spominju eutektička otapala (*engl. Deep Eutectic Solvents, DES*) 2001. godine, a 2003. godine ističu brojne prednosti pripreme eutektičkih otopina uree i raznih kvarternih amonijevih soli, kao što su stabilnost otopine, biorazgradivost te mogućnost prilagodbe otapala različitim aplikacijama (Abbott i sur., 2003). Danas su eutektička otapala priznata kao četvrta generacija ionskih tekućina zbog mnogih zajedničkih fizikalno-kemijskih karakteristika, no ipak treba istaknuti da su to zapravo dvije različite vrste otapala. Eutektička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika (*engl. Hydrogen Bonding Donor, HBD*) (Gorke, 2010) gdje su komponente povezane jakim vodikovim vezama. Delokalizacija naboja koja se javlja tijekom nastajanja vodikove veze je odgovorna za sniženje temperature tališta smjese komponenata u odnosu na točke tališta pojedinačnih komponenata (Abbott i sur., 2004). S obzirom na kemijsku prirodu komponenata, DES-ovi su smjese Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina i baza, te mogu sadržavati različite anione i katione. Za razliku od njih, ionske tekućine se formiraju prvenstveno od jedne izolirane vrste kationa i aniona (Smith i sur., 2014).

S obzirom da različite komponente mogu tvoriti eutektička otapala, u tablici 1. prikazana su definirana četiri tipa DES-ova.

Tablica 1. Tipovi eutektičkih otapala (Smith i sur., 2014)

Tip	Opis	Primjer
I	kombinacija metala i organske soli	ZnCl ₂ + kolin-klorid
II	kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	CoCl ₂ ·6H ₂ O + kolin-klorid
III	kombinacija HDB i organske soli	urea + kolin-klorid
IV	kombinacija metalnog klorida i HDB	MCl _x + urea/etilen glikol

2.4.1. Prirodna eutektička otapala (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES)

Da bi se proširila primjena eutektičkih smjesa kao zelenih otapala, sve više se usmjerava prema sirovinama prirodnog podrijetla kao komponentama eutektičkih smjesa. Takve smjese nazivaju se prirodna eutektička otapala (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) (Paiva i sur., 2014). U sirovine prirodnog podrijetla ubrajaju se primarni metaboliti stanice poput organskih kiselina, aminokiselina, derivata kolina i uree (Kudlak i sur., 2015).

Ideja za prirodna eutektička otapala potiče od mikrobnih, biljnih i životinjskih stanica u kojima su primarni metaboliti kao što su šećeri, aminokiseline, organske kiseline (jabučna, limunska i mliječna kiselina), te kolin prisutni u visokim koncentracijama. Prirodni spojevi su idealan izvor za sintezu eutektičkih otapala zbog njihove kemijske različitosti, biorazgradivih svojstava, održivosti i prihvatljive toksičnosti. Općenito, NADES se dobivaju kompleksiranjem akceptora i donora vodika, te bi ih se moglo klasificirati kao treći tip eutektičkih otapala. Najčešći donori vodika su alkoholi, kiseline, amidi, amini ili šećeri. Kao akceptor vodika široku primjenu u pripremi eutektičkih otapala ima organska sol kolin-klorid (ChCl) koja ulazi u interakciju s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika (urea, glicerol, polioli iz ugljikohidrata ili karboksilne kiseline dobivene iz različitih izvora) (Zhao i sur., 2013). Kolin-klorid predstavlja kvarternu amonijevu sol koja se može ekstrahirati iz biomase ili sintetizirati iz fosilnih goriva, a zadovoljava karakteristike biorazgradivosti, netoksičnosti i ekonomičnosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

2.4.2. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičkih otapala

Kombinacijom različitih akceptora i donora vodikovih veza, kreiraju se eutektička otapala točno željenih kemijskih i fizikalnih svojstava. Na taj način moguće je postići točno željenu kiselost, gustoću, polarnost, viskoznost, točku tališta, ionsku vodljivost (Zhang i sur., 2012).

2.4.2.1. Točka tališta

Kao što je već i spomenuto, eutektička smjesa nastaje miješanjem dviju krutina, najčešće kvartarne amonijeve soli i donora vodikove veze, visokih tališta u nekom molarnom omjeru, uz zagrijavanje (Maugeri, 2014). Taljenjem krutina nastaje nova smjesa, pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, s izrazito niskim talištem u odnosu na tališta pojedinih komponenti. Na točku tališta utječe odabir donora vodikove veze, omjer tvari koje se miješaju i izbor organske soli. Primjerice, kombinacijom dvije čiste krutine kao što su urea (temperatura taljenja, $T_t = 133\text{ }^\circ\text{C}$) i kolin-klorid ($T_t = 302\text{ }^\circ\text{C}$) u molarnom odnosu 2:1 dobiva se eutektičko otapalo na temperaturi od $15\text{ }^\circ\text{C}$, što je znatno niže od temperatura taljenja čistih komponenata (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Eutektičke smjese najčešće imaju talište ispod $150\text{ }^\circ\text{C}$. Položaj točke tališta eutektičke smjese ovisi o jačini međumolekulskih veza između komponenata smjese. Također, asimetrični veliki ioni od kojih su najčešće građene eutektičke smjese posjeduju nisku energiju kristalne rešetke, što također uzrokuje nisko talište smjese (Smith i sur., 2014).

2.4.2.2. Gustoća

Gustoća je jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava otapala. Općenito, gustoća NADES je veća nego gustoća vode, te je usporediva sa ionskim tekućinama čija gustoća varira između $1,1$ i $2,4\text{ g cm}^{-3}$. Razlike u gustoći su posljedica drugačije organizacije molekula odnosno molekulske mase i jakosti međumolekulske sile. Molekule veće mase i s jačim međumolekulskim silama imaju veću gustoću i obratno. Povećanjem temperature smanjuje se gustoća eutektičke smjese kao posljedica bržeg gibanja molekula i povećanja slobodnog prostora između istih pri većim temperaturama. Osim toga, gustoća ovisi i o udjelu vode te je primijećeno da povećanje udjela vode do 50% u NADES uzrokuje linearno smanjivanje gustoće (Dai i sur., 2015), a dokazano je i da molarni omjer organske soli i donora vodikove veze, kao i njihova kemijska priroda, utječu na njenu vrijednost (Smith i sur., 2014).

2.4.2.3. Viskoznost

Viskoznost opisuje unutarne trenje gibajućeg fluida tj. otpornost tvari prema tečenju. Najveći nedostatak eutektičkih otapala je vrlo visoka viskoznost ($200\text{-}500\text{ mm}^2\text{ s}^{-1}$ na $40\text{ }^\circ\text{C}$) što dovodi do nekih praktičnih problema kao što je dugotrajan prijenos mase u postupcima ekstrakcije (Dai i sur., 2013b). Visoka viskoznost istih često se pripisuje nazočnosti mreža vodikovih veza između komponenata, velikim dimenzijama iona, posjedovanjem malog

volumena slobodnog prostora među jedinkama otapala, ali i doprinosu elektrostatskih odnosno Van der Waalsovih sila (Zhang i sur., 2012). Viskoznost većine eutektičkih otapala se mijenja ovisno o temperaturi prateći Arrheniusov model, tj. porast temperature povećava prosječnu brzinu molekula u otapalu što smanjuje jačinu međumolekulske sile i u konačnici uzrokuje pucanje vodikovih veza. Na viskoznost se može utjecati i dodatkom vode. Voda utječe na prisutne vodikove veze koje postupno oslabljuju čime se viskoznost eutektičkog otapala smanjuje. No, kada udio vode prijeđe 50 %, gubi se struktura NADES (povećava se broj slobodnih molekula) (Dai i sur., 2015).

Uz temperaturu, veliki utjecaj na viskoznost imaju molarni odnos i kemijska priroda komponenata NADES (Kareem i sur., 2010). S obzirom na omjer komponenata u nekim slučajevima se pokazalo da NADES sa najnižom temperaturom taljenja imaju i najnižu viskoznost u testiranom rasponu temperature. S obzirom na sastav, Mulia i sur. (2015) pokazali su da je viskoznost NADES baziranih na kolin-kloridu i alkoholima kao HBD niža nego viskoznost NADES koji kao HBD sadrže šećer ili organsku kiselinu. Što HBD ima više hidroksilnih skupina, više vodikovih veza može tvoriti sa kolin-kloridom što utječe na jače povezivanje komponenata i povećanje viskoznosti. Kada se uspoređuju NADES koji sadrže različite organske soli, NADES bazirani na fosfonijevom ionu i različitim HBD imaju nižu viskoznost nego NADES bazirani na kolin-kloridu i šećerima (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013).

2.4.2.4. Ostala fizikalno-kemijska svojstva

Polarnost eutektičkih otapala je također vrlo važno svojstvo budući da utječe na kapacitet topljivosti. Eutektička otapala na bazi organskih kiselina su najpolarnija, dok su najmanje polarna ona na bazi šećera i šećernih alkohola (Dai i sur., 2013a).

Na električnu vodljivost NADES utječe sastav, udio vode u otapalu, temperatura i viskoznost. Zbog relativno visoke viskoznosti, većina NADES ima nisku električnu vodljivost ($< 2 \text{ mS cm}^{-1}$ na sobnoj temperaturi) (Zhang i sur., 2012). Ovisnost električne vodljivosti i temperature, kao i kod viskoznosti, može se opisati Arrhenius-ovom jednadžbom. Također, na električnu vodljivost može se utjecati i dodatkom vode (do 50 %) čime se električna vodljivost NADES povećava čak i do 100 puta (Dai i sur., 2015). S obzirom na sastav NADES električna vodljivost opada u smjeru baza:polialkohol > baza:organska kiselina \approx baza:šećer > organska kiselina:aminokiselina (nepolarna) > organska kiselina:šećer > šećer:šećer, što znači da kolin-

klorid (baza) i organske kiseline pokazuju veću vodljivost nego kolin-klorid i nepolarne aminokiseline (Dai i sur., 2015).

Na pH vrijednost eutektičke smjese utječe kemijska priroda donora vodika i promjena temperature, tako što povećanjem temperature dolazi do smanjenja kiselosti (povećanja pH vrijednosti) zbog redukcije vodikovih veza koje utječu na kiselost smjese (Zhang i sur., 2012). Istraživanja potvrđuju da eutektička otapala koja sadrže kolin-klorid i šećerne alkohole kao HBD uvijek pokazuju neutralni pH (Maugeri i Domínguez de María, 2012). Na sobnoj temperaturi pH NADES koji sadrže šećere kreće se u rasponu od 6,1 do 7,1, no postupno povećanje temperature uzrokuje smanjivanje pH (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013). Također, NADES koji sadrže organske kiseline kao HBD imaju osobito niske vrijednosti pH (manje od 3) i zbog svojih kiselih svojstva su poželjniji u ekstrakcijskim procesima (Dai i sur., 2013b).

2.4.3. Primjena prirodnih eutektičkih otapala

Primjena zelenih otapala u industrijskim procesima eksponencijalno raste tijekom posljednjih desetljeća. Razvoj ovih otapala privukao je pozornost u elektrokemiji, procesima separacije/ekstrakcije, procesima otapanja, organskoj sintezi, katalizi i biokatalizi.

Sposobnost NADES da doniraju odnosno prime elektronski par ili protone kako bi formirali vodikovu vezu potvrđuje njihova dobra svojstva otapanja raznih molekula poput soli, proteina, aminokiselina, šećera i polisaharida (Abbott i sur., 2011; Durand i sur., 2013). Također, otapaju različite metalne okside, pa se mogu koristiti u elektrokemijskim procesima kao što su izdvajanje metala, završna obrada metala (elektronanošenje, elektropoliranje) ili odvajanje metala (Abbott i sur., 2009). Osim toga pokazalo se da su NADES pogodni za otapanje CO₂ te se zbog toga mogu koristiti u raznim kemijskim procesima separacije i pročišćavanja plinova, kemijske fiksacije CO₂ ili katalize (Li i sur., 2008; Su i sur., 2009). Još jedna zanimljiva primjena eutektičkih otapala jest u obliku ekstrakcijskih agenasa, točnije pri ekstrakciji glicerola iz biodizela. Eutektička otapala se mogu koristiti i kao medij koji poboljšava kontakt između reaktanata i na taj način promiču organsku sintezu ili biokatalizu. Nadalje, također se mogu koristiti kao katalizator i/ili kao medij prihvatljiv za okoliš u elektrofilnim supstitucijama, nukleofilnim reakcijama, Diels-Alder kondenzacijama, kopolimerizacijama, dehidraciji ugljikohidrata, katalitičkom sparivanju C-C veza, reakcijama redukcije te multikomponentnim reakcijama (Durand i sur., 2013).

U posljednje vrijeme sve više se ispituje primjena NADES u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva. Mnoga istraživanja pokazuju da NADES imaju visoki potencijal u ekstrakciji fenolnih spojeva, što je povezano sa stvaranjem vodikovih veza između fenolnih spojeva i molekula unutar NADES. Fizikalna svojstva NADES, kao što su polarnost i viskoznost, imaju veliki utjecaj na ekstrakciju, te njihovim optimiranjem mogu se postići veći prinosi fenolnih spojeva u usporedbi s konvencionalnim otapalima kao što su voda i etanol. Nekoliko studija je pokazalo kako je ekstrakcija biološki aktivnih spojeva 10-100 puta učinkovitija u eutektičkim otapalima nego u vodi ili lipidima (Dai i sur., 2013b; Bi i sur., 2013). U konačnici, pošto su komponente eutektičkih otapala prisutne u našoj svakodnevnoj prehrani pripremljeni ekstrakti mogli bi se izravno koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i agrokemijskoj industriji bez dodatnih pročišćavanja (Dai i sur., 2013b).

2.5. ELEKTRONSKI JEZIK

Kako bi se odredila senzorska kvaliteta proizvoda ili razvio novi proizvod u prehrambenoj industriji potrebno je provesti senzorsku analizu istog. Glavni mjerni instrument u senzorskoj procjeni hrane jest čovjek odnosno izobraženi senzorski analitičari, panel grupe ili eksperti te se upravo zbog toga javljaju brojna ograničenja. Ljudi nemaju mogućnost razlikovati svaku kemijsku tvar koja se nalazi u namirnicama, već osjet okusa grupira sve prikupljene informacije u 5 osnovnih okusa: slano, slatko, gorko, kiselo i umami. Poznato je da proteo-lipidne membrane osjetilnih stanica, uokusnim pupoljcima, detektiraju tvari i tako proizvode osjet okusa, ali nije sigurno da li pojedini receptor reagira selektivno ili globalno na tvari koje izazivaju okus (Riul i sur., 2003). Također, nepouzdanost ljudskih osjetila (promjene tijekom vremena, zdravstveno stanje, smetnje iz okoline, senzorni umor), prirođena promjenjivost gustoće receptora na jeziku i nepcu, subjektivnost analitičara ili moguće predrasude prema određenim proizvodima utječu na uspjeh senzorske analize. Stoga se posljednjih godina te ljudske nedostatke u procjeni okusa nastoji prevladati pomoću različitih senzorskih sustava. S druge strane, tradicionalne analitičke metode za analizu pojedinih sastojaka prehrambenih proizvoda, poput različitih vrsta kromatografije ili spektroskopije, veoma su selektivne i pouzdane, ali zahtijevaju skupe uređaje, pažljivu pripremu uzorka i stručnost pri analizi. U industriji postoji sve veće zanimanje za brzim i jeftinim metodama procjene kvalitete sirovina i prehrambenih proizvoda. Također, postoji potreba za procjenom okusa i ukupne kvalitete proizvoda, što je ujedno i najvažnija karakteristika za krajnjeg potrošača. Okus i aromu proizvoda može pouzdano procijeniti samo izobraženi senzorski panel. Procjena okusa

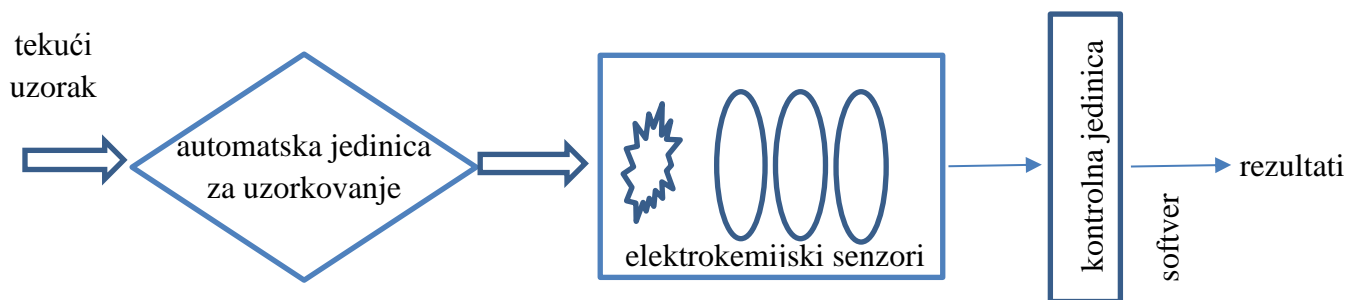
proizvoda je skup i dugotrajan proces zbog dugotrajnog osposobljavanja senzorskih analitičara i ograničenog broja analiza na dan, kako bi se u konačnici dobili pouzdani rezultati. Pritom različiti paneli koriste različito nazivlje za parametre koje procjenjuju i takvi se parametri ne mogu eksplicitno međusobno uspoređivati niti generalizirati (Legin i sur., 2003b).

Senzorski sustavi su obećavajući primjer razvoja brzih i jeftinih metoda za kontrolu kvalitete prehrambenih proizvoda (Legin i sur., 2003b). Posljednjih godina razvijen je novi način provođenja senzorskih ocjenjivanja, i to pomoću elektronskog jezika. Elektronski jezik je instrumentalni sustav koji predstavlja novu, revolucionarnu tehniku brzih analiza okusa različitih tekućih uzoraka. To je analitički instrument izveden od niza nespecifičnih, nisko-selektivnih elektrokemijskih senzora s parcijalnom specifičnošću (kros-selektivnošću) za različite sastojke u otopini. Upravo taj niz senzora koristi kako bi pridobio informacije o parametrima senzorske kvalitete poput stanja uzorka, stanja procesa ili očekivane ljudske percepcije (Winqvist i sur., 2005). Obično je dizajniran za stacionarna mjerenja (sustav elektroda umočene u otopinu uzorka) (Ciosek i sur., 2006), a analiza u prehrambenoj industriji je uglavnom usmjerena prema identifikaciji različitih proizvoda ili brandova iste hrane i procjeni njihove usklađenosti s odgovarajućim standardima kvalitete, kao i utvrđivanju autentičnosti. Zahvaljujući svojoj visokoj osjetljivosti, sposoban je procijeniti kemijske razlike koje ne mogu biti uočene uobičajenim metodama procjene okusa, odnosno metodama koje uključuju procjenu od strane panel grupe senzorskih analitičara (Baldwin i sur., 2011).

Glavna namjena elektronskog jezika je kvalitativna analiza, odnosno prepoznavanje, klasifikacija ili identifikacija uzoraka, što ovisi o materijalu senzora i statističkim metodama korištenim za analizu rezultata (Dias i sur., 2009; Escuder-Gilabert i Peris, 2010). Prednosti ovog uređaja su mogućnosti razlikovanja složenih tekućih uzoraka, niski troškovi analiza, jednostavno korištenje, brzina analize te očuvanje uzorka (Legin i sur., 2003a; Beullenes i sur., 2008). Podaci dobiveni s elektronskog jezika obrađuju se multivarijantnom analizom podataka (MVA), prvenstveno analizom glavnih komponenata (PCA) koja objašnjava varijancu u eksperimentalnim podacima (Hruškar i sur., 2009).

2.5.1. Princip rada α -ASTREE elektronskog jezika

Elektronski jezik je tzv. „analizator okusa“, odnosno instrument procjene okusa koji oponaša okusni sustav čovjeka. Jedinstveno mu je odličje sposobnost uspostave korelacije između instrumentalnih rezultata mjerenja i ljudske percepcije okusa (Pioggia i sur., 2007). Na slici 2 prikazane su osnovne komponente elektronskog jezika.



Slika 2. Komponente elektronskog jezika (Escuder-Gilabert i Peris, 2010)

Kod čovjeka je organ zaslužan za osjet okusa jezik. Istu funkciju kod elektronskog jezika čini 7 elektrokemijskih senzora, koji tijekom analize daju tzv. senzorske odgovore. Podražaj se, kod čovjeka, prenosi živčanim vlaknima od jezika do mozga te na kraju mozak prepoznaje okus kao slani, slatki, kiseli, gorki ili umami. Kod elektronskog jezika ulogu živčanih vlakana imaju žice, koje prenose odgovore senzora do elektronske jedinice za mjerenje, odnosno u konačnici do samog računala (Alpha M.O.S., 2003).

Princip rada α -ASTREE elektronskog jezika temelji se na potenciometriji. Potenciometrija je elektroanalitička metoda u kojoj se mjeri razlika potencijala između elektroda elektrokemijske ćelije uz ravnotežne uvjete. Mjerenje napona ćelije provodi se na način da kroz ćeliju teče tako malena električna struja da ne utječe mjerljivo na stanje ravnoteže na elektrodama (Piljac, 2010). Načelo metode je detektiranje promjena u jakosti napona (mV) između kemijskog senzora i Ag/AgCl referentne elektrode (Wei i sur., 2009), pri čemu se senzor smatra indikatorskom elektrodom. Potencijali ovise o prirodi i koncentraciji ionske vrste u otopini kao i o materijalu i vrsti elektrode (Pioggia i sur., 2007). Nedostatak potenciometrijskog elektronskog jezika je osjetljivost na temperaturu okoline i adsorpcija sastojaka otopine koji utječu na potencijal membrane (Ciosek i Wróblewski, 2007; Escuder-Gilabert i Peris, 2010).

α -ASTREE elektronski jezik sastoji se od automatskog sklopa za uzorkovanje s 16 pozicija za laboratorijske čaše s tekućim uzorcima, mehaničke miješalice, seta senzora, elektronske jedinice za obradu podataka dobivenih mjerenjem senzora i programske podrške. Uređaj je priključen na računalo na koje je specijalno konfiguriran i instaliran prema uputama softver Astree 3.0. koji prikuplja i pohranjuje izlazne odzive senzora. Set senzora uključuje 7 elektrokemijskih senzora (ZZ, BA, BB, CA, GA, HA i JB) načinjenih od silikonskih tranzistora s organskom presvlakom čija je svrha osigurati ponovljivost, osjetljivost i selektivnost (Alpha M.O.S., 2003). Svaki senzor sastoji se od organske presvlake osjetljive na različite spojeve u

uzorcima i pretvarača koji odgovor membrane pretvara u signale za analizu (Baldwin i sur., 2011).

Uređaj radi na principu da prisutnost osjetljivog materijala u vanjskoj membrani senzora izaziva specifične interakcije (vodikove veze, Van der Waals-ove interakcije) s velikim brojem otopljenih kemijskih sastojaka. Uranjanjem senzora u uzorak dolazi do interakcije između sastojaka uzorka i vanjske membrane svakog senzora, što izaziva potencijal vanjske membrane. Razlika potencijala između referentne elektrode i svakog senzora mjeri se pomoću osjetljivih mjernih uređaja s velikim ulaznim otporom. Te mjerne naprave omogućuju mjerenje razlike potencijala uz minimalan protok električne struje kroz elektrokemijsku ćeliju (Piljac, 2010). Naposljetku se ta kemijska informacija prevodi u električni signal. Obzirom da je potencijal referentne elektrode stalan, izmjerena razlika u potencijalu je direktno povezana s varijancama potencijala vanjske membrane senzora koji ovisi o sastojcima prisutnim u ispitivanom uzorku. Svaki senzor ima različitu vanjsku membranu u svrhu detektiranja bilo kojeg od sastojaka uzorka. Najvažnija karakteristika elektrokemijskih senzora jest parcijalna specifičnost, odnosno njihov odgovor na prisutnost različitih spojeva i istovremeno veća specifičnost za neke spojeve. Mogu detektirati veliki broj interakcija povezanih s različitim kemijskim grupama otopljenih sastojaka odgovornih za okus. Kombinacija elektrokemijskih senzora i odgovarajuće obrade podataka multivarijantnim statističkim analizama omogućuje uspoređivanje i korelaciju velikog broja varijabli (Baldwin i sur., 2011).

2.5.2. Primjena elektronskog jezika

Elektronski jezik ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Razlog tome jest njegova objektivnost mjerenja i mogućnost dobivanja velikog broja rezultata u kratkom vremenskom periodu. Da bi se uzorak mogao analizirati elektronskim jezikom, on mora biti u tekućem stanju. Primjena u prehrambenoj industriji uključuje procjenu kvalitete, kvantifikaciju pojedinih sastojaka, optimizaciju okusa, studije roka trajanja ili detekciju kontaminacije (Baldwin i sur., 2011).

U usporedbi s panelom senzorskih analitičara, elektronski jezik je brz i siguran, jer uzima u obzir „nepoznate“ ili toksične sastojke. Uspoređujući ga s ljudskim jezikom, nema zamora posebno u slučaju mjerenja gorčine. Elektronski jezik je također objektivniji, dok je glavna karakteristika senzorskog panela subjektivnost. Upotrebom elektronskog jezika minimizirana je potreba senzorske procjene okusa od strane ljudi u specifičnim slučajevima. Tako se on koristi prilikom testiranja proizvoda koji nisu odobreni kao GRAS (*engl.* Generally

Recognized As Safe), te kada je potrebno smanjiti rizik prilikom testiranja aktivnih sastojaka koji su odobreni od strane FDA (ali mogu biti toksični) ili nisu odobreni od strane FDA (*engl.* Food and Drug Administration). Ključni doprinos elektronskog jezika je ušteda vremena i troškova dajući objektivne, pouzdane, sigurne i brze rezultate mjerenja okusa u svrhu optimiziranja kvalitete proizvoda (Baldwin i sur., 2011).

Pregledom znanstvene literature je utvrđeno da se elektronski jezik većinom primjenjuje za nadziranje procesa proizvodnje, procjenu svježine i istraživanja vezana uz rok trajanja proizvoda, procjenu autentičnosti, detekciju komponenata hrane, kvantitativnu analizu te u ostalim studijama kontrole kvalitete (Escuder-Gilabert i Peris, 2010). Winqvist i sur. (2005) koriste voltometrijski elektronski jezik za praćenje okusa sirovog mlijeka (ulazna sirovina) koje dolazi na toplinsku obradu i za praćenje postupka čišćenja tijekom samog procesa. Elektronski jezik je uspješno odvojio različita mlijeka obzirom na izvor sirovine i kvalitetu. Također, uređaj se pokazao kao vrsta sigurnosne mjere koja će spriječiti moguću kontaminaciju ulaskom neodgovarajućeg sirovog mlijeka u tvornicu, a ujedno će i spriječiti mogući ekonomski gubitak (Winqvist i sur., 2005). Hruškar i sur. (2009) su pomoću potenciometrijskog elektronskog jezika željeli raspoznati različite uzorke mlijeka i jogurta različitih proizvođača te različite mliječne proizvode jednog proizvođača. Uređaj je uspješno uočio razlike između pet uzoraka mlijeka različitih proizvođača kupljenih na hrvatskom tržištu, pet uzoraka jogurta različitih proizvođača kupljenih također na hrvatskom tržištu, te između različitih mliječnih proizvoda jednog proizvođača (Hruškar i sur., 2009). Istraživanje koje je provedeno na različitim uzorcima kravljeg i kozjeg mlijeka te njihovim mješavinama pokazalo je da je elektronski jezik uspješno odvojio i klasificirao svaki od uzoraka obzirom na senzorsko svojstvo okusa. Kao takav može se uspješno koristiti kao brza i jeftina metoda za utvrđivanje patvorenja kozjeg sirovog mlijeka kravljim mlijekom. Međutim, također je istaknuto ukoliko bi se elektronski jezik koristio kao rutinska metoda u mliječnoj industriji potrebni su senzori koji će biti osjetljiviji na varijacije u sastavu mlijeka (Dias i sur., 2009).

2.5.3. Statistička obrada podataka

Nakon provedene analize na elektronskom jeziku, dobivene podatke u obliku odziva senzora potrebno je obraditi odgovarajućom statističkom metodom. Analitički postupci koji analiziraju više varijabli istovremeno na jednom ili više uzoraka jedinki nazivaju se multivarijantni ili multidimenzionalni analitički postupci (Živojinović, 2013). Primjenjuju se u situacijama gdje se promatra veliki broj varijabli koje su u međusobnim odnosima, te gdje se

zahtijeva utvrđivanje osnovnih odnosa među podacima. Metode MVA mogu se podijeliti u 3 kategorije: analize zavisnosti varijabli (regresija, t-test, višestruka regresija, ANOVA, MANOVA), analize međuzavisnosti varijabli (jednostavna korelacija, analiza glavnih komponenata, faktorska analiza, dvosmjerna tablica kontigencije, loglinearni modeli, višesmjerna tablica kontigencije, analiza korespodencije) i metode za analizu promjena nekog skupa varijabli (vremenske serije) (Pecina, 2006).

2.5.3.1. Analiza glavnih komponenti (engl. Principal Components Analysis, PCA)

Analiza glavnih komponenata (PCA) je jedna od najjednostavnijih i najpopularnijih metoda multivarijantne statistike koja se koristi u gotovo svim znanstvenim disciplinama. Mogućnosti PCA analize prvi je opisao Karl Pearson (1901.) s pretpostavkom da ju je moguće upotrijebiti za rješavanje kompleksnijeg problema s više od dvije ispitivane varijable, a praktične računске metode razradio je Hotelling puno kasnije (1933.) (Pecina, 2006). Međutim, široka primjena PCA analize započela je tek razvojem računala (Hartigan, 1975) kada se olakšao dugotrajan i kompliciran postupak izračuna u brojnim znanstvenim istraživanjima.

PCA je statistička metoda koja se primjenjuje za redukciju opsežnog broja ulaznih podataka i njihovu interpretaciju. Osnovni cilj je načiniti novi koordinatni sustav s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glavne uzroke varijacija podataka (Hartigan, 1975). Takav koordinatni sustav može pokazati grupacije ili polarizaciju uzoraka koja ne bi mogla biti uočena pregledom velikog broja varijabli. Redukcija dimenzionalnosti podataka podrazumijeva smanjenje broja izvornih varijabli na mali broj faktora koji su linearna kombinacija istih i koji se zovu „glavne komponente“ (*engl. principal components, PC*). Pritom se podrazumijeva zadržavanje onih podataka koji najviše doprinose varijanci. U interpretaciji podataka glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najsazetiji način, pri čemu se pokazuju neke skrivene povezanosti i međuodnosi istih (Hartigan, 1975). Prva glavna komponenta objašnjava koliko je moguća varijabilnost u podacima, a svaka slijedeća komponenta izvještava za koliko je moguća preostala varijabilnost (Lorenz i sur., 2009). Često je moguće objasniti i 75 % do 90 % ukupnih razlika u skupu podataka koji sadrži 25 do 30 varijabli koristeći samo 2 ili 3 glavne komponente (Meilgaard i sur., 2016).

PCA analiza koristi se za elektronski jezik da bi se omogućila ponovljivost analitičke metode, da bi se odredili nepodobni članovi grupe (podaci koji odstupaju od drugih podataka) i da bi se odredile razlike i sličnosti između uzoraka i grupa (Meilgaard i sur., 2016).

2.5.3.2. SIMCA (*engl. Soft Independent Modeling of Class Analogies*)

SIMCA je tehnika modeliranja koja prilikom obrade informacija formira grupe podataka, pri čemu je svaka grupa zasebno modelirana koristeći PCA analizu i može biti opisana pomoću različitog broja glavnih komponentata (Berrueta i sur., 2007). Kombinacija je nelinearne PLS regresijske analize (*engl. Partial Least Squares*) i PCA analize (Granato i sur., 2018). Analizirani skup uzoraka obično se dijeli na modelni i testni uzorak pri čemu se za modelni skup odabere oko 70-75 % ukupnog broja uzoraka iz svake skupine, a preostali uzorci su uključeni u test skup. Za mali broj uzoraka koristi se tehnika unakrsne validacije koja procjenjuju postotak pogrešno klasificiranih uzoraka. Na taj način zadržan je dovoljan broj glavnih komponenti s obzirom na najveći broj varijacija u svakom razredu. Rezultati dobiveni SIMCA analizom mogu se prikazati grafički. Grafički prikaz učitanih površina i rezultati PCA analize izvedeni za referentni uzorak pružaju informaciju o izvan-graničnim podgrupama i unutar-graničnim strukturama (Berrueta i sur., 2007).

Jedna od glavnih prednosti SIMCA analize je da se jedna varijabla može klasificirati u jedan, više ili u nijedan razred. Ako nepoznata varijabla pripada više od jednom razredu, to može ukazivati da karakteristike koje su se koristile za postavljanje metode nemaju zadovoljavajuću moć razlučivanja ili da postoji greška u mjerenju. Glavni nedostatak SIMCA analize je to što zahtjeva prethodno provođenje PCA analize pri čemu rezultati ovise o izboru glavnih komponentata. Nedostatak je također to što ne može proizvesti klasifikaciju vjerojatnosti i to što broj odgovora i uzoraka koji se koriste u klasifikaciji utječu na točnost metode. Osim toga, SIMCA je osjetljiva na izvan-granične varijable koje mogu biti prepoznate ovom metodom (Granato i sur., 2018).

SIMCA analiza koristi se u prehrambenoj industriji za kontrolu kvalitete i provjeru autentičnosti hrane (Granato i sur., 2018). Točnije našla je primjenu prilikom određivanja autentičnosti maslinovog ulja, vina, alkoholnih pića, octa, bezalkoholnih pića, kave, mlijeka, sira, mesa, povrća i meda (Oliveri i Downey, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu provedeno je istraživanje na uzorcima čokoladnog i kakao napitaka dostupnih na tržištu i uzorcima čokoladnog napitka s dodatkom ekstrakata otpada nastalog proizvodnjom kakaa pripremljenih pomoću eutektičkih otapala betain:glukoze (BGlc) i kolin-klorida:glukoze (ChGlc). Ekstrakti su pripremljeni i okarakterizirani u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koncentracija polifenola u pripremljenim ekstraktima pomoću BGlc i ChGlc su $15,33 \pm 1,12$ i $21,62 \pm 1,06$ mg $g_{s.tv.}^{-1}$. Senzorska analiza navedenih uzoraka provedena je pomoću α -ASTREE elektronskog jezika, a dobiveni rezultati analize statistički su obrađeni PCA i SIMCA analizom.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Materijali korišteni za izradu ovog rada su čokoladni mliječni napitak, čokoladni mliječni napitak s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc, kakao mliječni napitak, kakao napitak na biljnoj bazi (soja, riža) te instant kakao mliječni napitak pripremljen prema uputi proizvođača. Sveukupno je analizirano 16 uzoraka čokoladnog i kakao napitka različitih proizvođača i 6 uzoraka pripremljenog čokoladnog napitka s dodatkom ekstrakta u BGlc i ChGlc različitih koncentracija. U tablici 2 su prikazane vrste i oznake uzoraka napitaka korištenih u ovom istraživanju.

Tablica 2. Vrste i oznake uzoraka korištenih u ovom istraživanju

Kategorizacija uzorka	Oznaka uzorka
čokoladni mliječni napitak	Č1
čokoladni mliječni napitak	Č2
čokoladni mliječni napitak	Č3
čokoladni mliječni napitak	Č4
čokoladni mliječni napitak	Č5
čokoladni mliječni napitak	Č6
čokoladni mliječni napitak s 10 % ekstrakta u BGlc	10BG
čokoladni mliječni napitak s 10 % ekstrakta u ChGlc	10KK
čokoladni mliječni napitak s 5 % ekstrakta u BGlc	5BG
čokoladni mliječni napitak s 5 % ekstrakta u ChGlc	5KK
čokoladni mliječni napitak s 1 % ekstrakta u BGlc	1BG
čokoladni mliječni napitak s 1 % ekstrakta u ChGlc	1KK
kakao mliječni napitak	K1
kakao mliječni napitak	K2
kakao mliječni napitak	K3
kakao mliječni napitak	K4
kakao napitak na biljnoj bazi (riža)	Kb1
kakao napitak na biljnoj bazi (soja)	Kb2
kakao napitak na biljnoj bazi (soja)	Kb3
kakao napitak na biljnoj bazi (soja)	Kb4
instant kakao mliječni napitak pripremljen prema uputi proizvođača	Kp1
instant kakao mliječni napitak pripremljen prema uputi proizvođača	Kp2

3.1.2. Reagensi

- 37 % klorovodična kiselina (HCl), 0,01 mol L⁻¹ (Carl Erba, Španjolska)
- natrij glutamat (MSG), 0,01 mol L⁻¹ (Merck, Njemačka)
- natrij klorid (NaCl), 0,01 mol L⁻¹ (Kemika, Hrvatska)
- destilirana voda

3.1.3. Uređaji i oprema

- elektronski jezik α -ASTREE 2 (Alpha MOS, Francuska)
- laboratorijske čaše, 150 mL
- odmjerne tikvice, 50 mL
- odmjerna tikvica, 1000 mL
- stakleni lijevak
- pipete, 10 mL
- propipeta
- automatska pipeta
- menzura, 100 mL
- metalna žlica
- tehnička vaga tip 1111, Tehnica, Železniki
- analitička vaga tip 2615, Tehnica, Železniki
- stakleni štapić
- aluminijska folija

3.2. METODE RADA

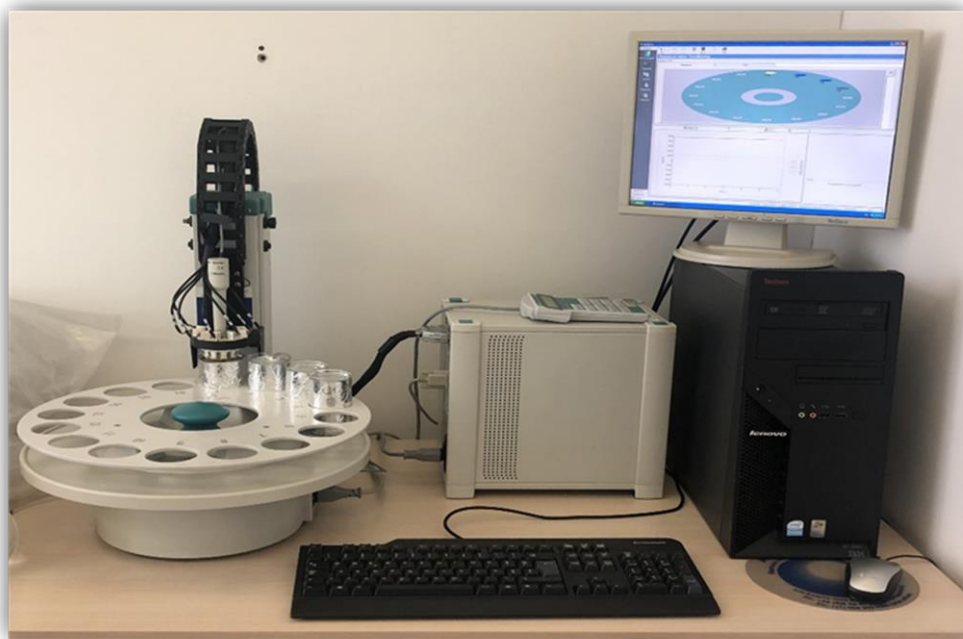
3.2.1. Priprema uzoraka napitaka za analizu na elektronskom jeziku

Priprema uzoraka provedena je neposredno prije analize uzoraka elektronskim jezikom. Uzorci napitaka su prije početka analize temperirani na sobnoj temperaturi i dobro homogenizirani. Instant kakao mliječni napitci pripremljeni su prema uputi proizvođača. Za pripremu čokoladnog mliječnog napitka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc, korišten je Č1 čokoladni mliječni napitak kojemu je dodano 1, 5 ili 10 % (v/v) ekstrakta u otapalu.

U laboratorijsku čašu volumena 150 mL preneseno je 80 mL pripremljenog uzorka.

3.2.2. Analiza na α -ASTREE elektronskom jeziku

Za analizu uzoraka korišten je α -Astree elektronski jezik, koji je prikazan na slici 3.



Slika 3. α -ASTREE elektronski jezik (vlastita fotografija)

Princip mjerenja α -ASTREE elektronskog jezika temelji se na potenciometriji, te interakciji spojeva u uzorku i osjetljivog premaza senzora pri čemu se stvara potencijal membrane (Hruškar i sur., 2009). Tijekom analize uzorka mjeri se razlika napona između senzora i referentne elektrode Ag/AgCl. Osjetljivost senzora je različita u prisutnosti 5 različitih okusa (slano, slatko, kiselo, gorko, umami). Membrane na svakom od 7 senzora se međusobno

razlikuju po svom sastavu i građi što je razlog različitih reakcija koje se odvijaju na pojedinom senzoru. Svaki senzor daje jedinstven odziv za ispitivani uzorak. Uređaj se sastoji od 16 mjesta za postavljanje uzoraka i otopina za ispiranje te se automatski okreće (Baldwin i sur., 2011; Alpha M.O.S., 2003). Softver Astree 3.0. elektronskog jezika skuplja i pohranjuje izlazne odzive senzora.

3.2.2.1. Dijagnostički test

Za provođenje dijagnostičkog testa, odnosno da bi se provjerila sposobnost senzora za razlikovanje osnovnih okusa, pripremljene su sljedeće otopine: 0,01 mol L⁻¹ klorovodične kiseline, 0,01 mol L⁻¹ natrij glutamata i 0,01 mol L⁻¹ natrij klorida. Prije provođenja dijagnostičkog testa senzori su kondicionirani s 0,01 mol L⁻¹ klorovodične kiseline do postizanja stabilnog signala. Vrijeme analize svakog uzorka iznosilo je 120 sekundi, nakon čega je slijedilo ispiranje senzora u destiliranoj vodi u trajanju od deset sekundi. Analiza je provedena u šest ponavljanja za svaki uzorak, a vrijeme provedenog testa iznosilo je 40 minuta.

3.2.2.2. Analiza uzoraka

Za postizanje stabilnog odziva senzora, prije analize uzoraka provedeno je kondicioniranje u Č1 čokoladnom napitku. Na pozicijama broj 1, 2 i 3 nalazile su se laboratorijske čaše s 80 mL destilirane vode, a na ostalim pozicijama nalazili su se uzorci napitaka kao što je i prikazano na slici 4. Destilirana voda korištena je za ispiranje i čišćenje senzora između svakog uzorka.



Slika 4. Položaj uzoraka na uređaju (vlastita fotografija)

Vrijeme analize svakog uzorka iznosilo je 300 sekundi, nakon čega je slijedilo ispiranje senzora u destiliranoj vodi u trajanju od deset sekundi. Analiza je provedena u četiri ponavljanja za svaki uzorak. Nakon provedene analize očitani su konačni odzivi senzora.

3.2.3. Analiza podataka

Dobiveni izlazni odzivi senzora prvotno su obrađeni u programu Microsoft Excel 2013 kako bi se odredila srednja vrijednost i standardna devijacija. Iako je svaki uzorak analiziran uzastopno četiri puta, mjerenja koja odstupaju su izuzeta u obradi podataka. Za daljnju statističku obradu podataka korištena je PCA i SIMCA analiza. Statistička obrada provedena je u računalnom programu Astree 2, verzija 3.0.1. i Statistica 10.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati procjene senzorskog svojstva okusa čokoladnih i kakao napitaka različitih proizvođača te pripremljenog čokoladnog napitka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc pomoću elektronskog jezika.

Cilj rada bio je prvotno utvrditi mogućnost razlikovanja čokoladnih i kakao napitaka pomoću elektronskog jezika, a potom utvrditi razlikuju li se značajno čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc od senzorski prihvatljivih napitaka dostupnih na tržištu.

U tablici 3 i na slici 5 prikazani su dobiveni rezultati dijagnostičkog testa. Tablica 4 prikazuje izračunate relativne standardne devijacije ponovljenih analiza uzoraka. PCA analiza je statistička metoda koja ističe sličnosti i razlike između skupina analiziranih podataka na način da smanjuje količinu ulaznih podataka na manji broj novo izvedenih varijabli koje adekvatno predstavljaju izvorne podatke (Hruškar i sur., 2009). PCA analiza uzoraka je prikazana u tablicama 5, 6, 7 i 8 te na slikama 6, 7, 8 i 9. Slika 10 prikazuje rezultate SIMCA analize.

4.1. DIJAGNOSTIČKI TEST

Dijagnostički test omogućava provjeru mogućnosti razlikovanja okusa pomoću seta senzora elektronskog jezika, a provodi se analizom otopina natrijevog klorida, natrijevog glutamata i klorovodične kiseline. U tablici 3 prikazani su rezultati provedenog dijagnostičkog testa za analizirane otopine (NaCl, MSG, HCl).

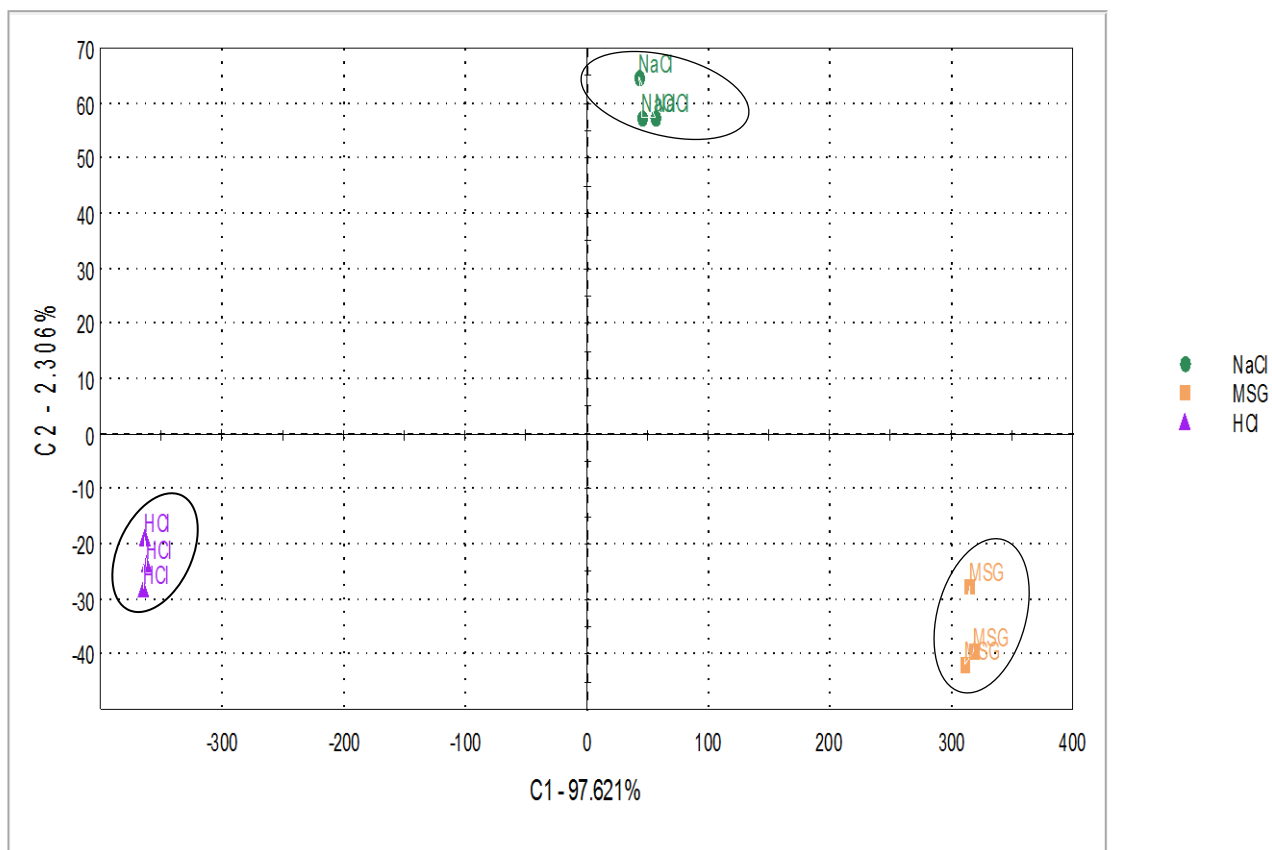
Tablica 3. Relativne standardne devijacije za analizirane otopine natrijevog klorida, natrijevog glutamata i klorovodične kiseline

Uzorci	Senzori						
	ZZ	JE	BB	CA	GA	HA	JB
NaCl	1,28	1,97	1,38	0,27	0,50	0,65	1,87
MSG	1,19	1,41	1,61	0,34	0,45	0,51	1,78
HCl	1,06	1,86	1,69	0,53	0,40	1,00	2,34

Vrijednost relativne standardne devijacije kreće se u rasponu od 0,27 do 2,34.

Na slici 5 nalazi se prikaz PCA analize rezultata provedenog dijagnostičkog testa za analizirane otopine natrijevog klorida, natrijevog glutamata i klorovodične kiseline.

Discrimination index = 98.37



Slika 5. Faktorski bodovi za prve dvije glavne komponente PCA analize uzoraka klorovodične kiseline, natrijevog glutamata i natrijevog klorida

Iz dobivene slike 5, odnosno PCA analize rezultata provedenog dijagnostičkog testa, vidljivo je da su ponovljena mjerenja za 3 različita uzorka (NaCl, MSG, HCl) međusobno slična, a da su se različite otopine međusobno odvojile. Diskriminacijski indeks veći od 94 smatra se prihvatljivim, a postignut diskriminacijski indeks iznosi 98,37. Na temelju provedenog dijagnostičkog testa može se zaključiti da je elektronski jezik sposoban razlikovati analizirane otopine obzirom na senzorsko svojstvo okusa.

4.2. ANALIZA ČOKOLADNIH I KAKAO NAPITAKA ELEKTRONSKIM JEZIKOM, TE PCA I SIMCA ANALIZA

Relativna standardna devijacija ili varijanca je mjera rasipanja podataka oko aritmetičke sredine. Računanjem relativne standardne devijacije ponovljenih analiza uzoraka, cilj je bio utvrditi ponovljivost mjerenja. Što je vrijednost relativne standardne devijacije manja, provedena mjerenja su preciznija. U tablici 4 dan je prikaz dobivenih relativnih standardnih devijacija ponovljenih analiza uzoraka.

Tablica 4. Relativne standardne devijacije ponovljenih analiza uzoraka

Uzorci	Senzori						
	ZZ	JE	BB	CA	GA	HA	JB
Č1	3,14	1,39	0,71	1,46	0	5,44	0,85
Č2	0,46	2,32	1,06	0,36	1,88	7,86	2,11
Č3	3,77	4,81	3,57	0,71	0,36	10,58	3,51
Č4	0,97	2,27	1,47	0,70	2,13	9,91	3,82
Č5	0,87	0,86	1,16	0,35	1,29	8,93	2,73
Č6	0,95	0,92	3,72	0,72	1,47	10,44	5,79
10BG	0,91	2,75	1,01	0,36	1,14	7,07	10,81
10KK	1,37	5,10	3,82	0,71	1,50	4,29	4,31
5BG	0	2,81	0	0	2,34	4,50	3,63
5KK	4,50	2,83	1,67	0,71	1,83	3,18	2,90
1BG	0,45	7,24	0,34	1,08	0	5,44	2,42
1KK	1,18	1,84	0,68	0,71	0	5,05	5,05
K1	0,28	3,78	4,18	0,70	2,68	1,00	4,88
K2	0,62	4,04	5,94	0,35	0,63	0	3,84
K3	6,50	2,84	5,35	0,35	0	0	7,26
K4	5,44	2,37	2,12	1,07	1,82	4,49	4,50
Kb1	0	0	5,34	0,36	0,36	1,08	7,49
Kb2	0	0,37	3,82	0	2,16	1,77	3,77
Kb3	0,25	0	5,01	1,06	1,71	2,85	4,96
Kb4	4,51	1,61	0,96	1,83	3,45	0	1,91
Kp1	7,24	3,20	1,77	0,71	1,81	6,73	5,24
Kp2	7,70	2,37	7,95	0,36	5,48	8,57	0,42

Najmanje vrijednosti relativne standardne devijacije zabilježene su kod senzora CA, a najveće kod senzora JB.

U tablici 5 dan je prikaz Eigen-vrijednosti dobivenih PCA analizom za uzorke čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc.

Tablica 5. Eigen-vrijednosti dobivene PCA analizom uzoraka čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc

Glavne komponente (faktori)	Eigen-vrijednost	% varijance	Eigen-vrijednosti (kumulativno)	% varijance (kumulativno)
1	2,92	41,71	2,92	41,71
2	2,68	38,23	5,60	79,94
3	0,67	9,62	6,27	89,56
4	0,48	6,82	6,75	96,38
5	0,21	3,06	6,96	99,45
6	0,02	0,31	6,98	99,76
7	0,02	0,24	7,00	100,00

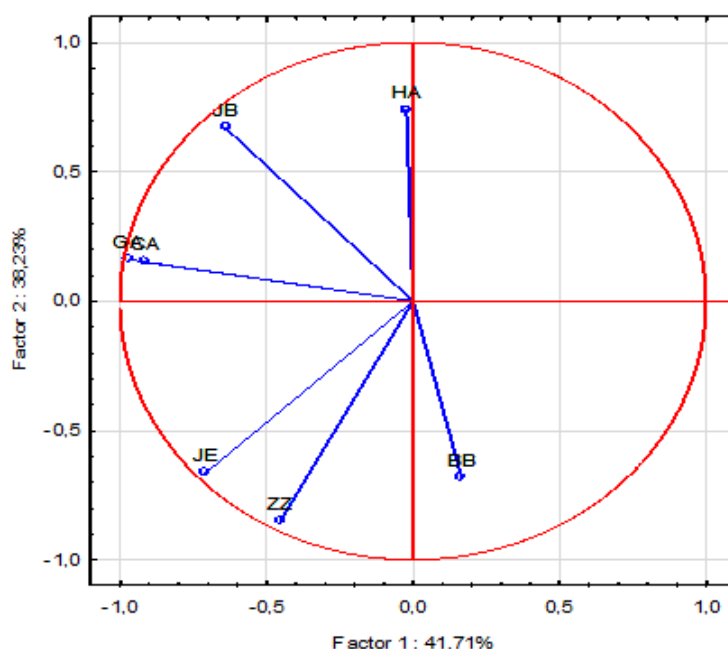
Iz rezultata PCA analize prikazanih u tablici 5 za Eigen-vrijednosti analiziranih uzoraka, vidljivo je da prva glavna komponenta (faktor 1) opisuje 41,71 % ukupne varijance između odziva senzora elektronskog jezika, uz Eigen-vrijednost 2,92. Druga glavna komponenta (faktor 2) opisuje 38,23 % ukupne varijance, uz Eigen-vrijednost 2,68. Pomoću prve dvije glavne komponente opisano je 79,94 % ukupne varijance. Također, vidljivo je da preostale komponente obuhvaćaju sve manji postotak ukupne varijance. PCA analizom je postignuto željeno smanjenje broja varijabli te se rezultati mjerenja elektronskim jezikom mogu promatrati pomoću novog koordinatnog sustava kojeg čine prve dvije glavne komponente (faktor 1 i faktor 2).

U tablici 6 dan je prikaz doprinosa pojedinog senzora elektronskog jezika glavnim komponentama PCA analize za uzorke čokoladnih i kakao napitaka te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc.

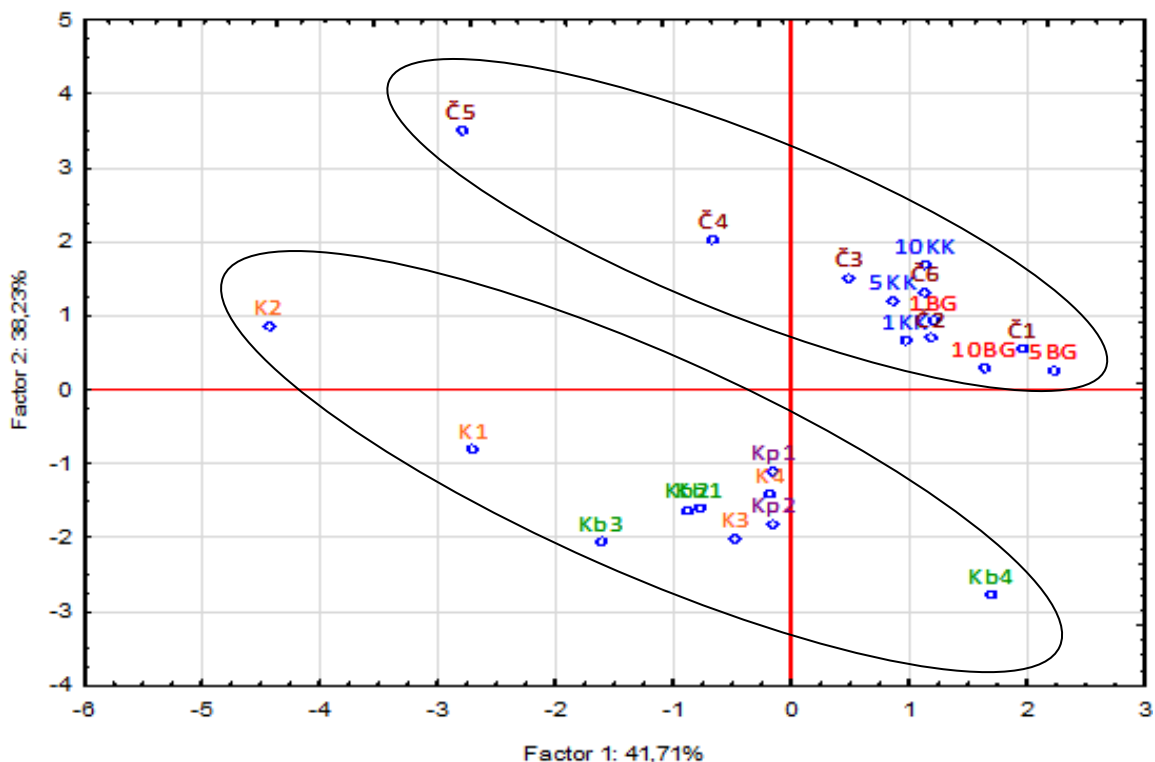
Tablica 6. Doprinos pojedinog senzora glavnim komponentama (faktorima) PCA analize uzoraka čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc

Senzori	Faktor 1	Faktor 2
ZZ	-0,45	-0,85
JE	-0,71	-0,66
BB	0,17	-0,68
CA	-0,91	0,15
GA	-0,97	0,16
HA	-0,02	0,74
JB	-0,64	0,67

Najveći doprinos faktoru 1 imaju senzori JE, CA i GA, a faktoru 2 senzori ZZ i HA. Slike 6 i 7 prikazuju rezultate PCA analize s prve dvije glavne komponente (faktor 1 i faktor 2) za uzorke čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc.



Slika 6. Faktorsko opterećenje za prve dvije glavne komponente PCA analize uzoraka čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc



Slika 7. Faktorski bodovi za prve dvije glavne komponente PCA analize uzoraka čokoladnih i kakao napitaka, te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc

Vidljivo je da su se odvojile 2 skupine uzoraka – čokoladni i kakao napitci. Uzorci čokoladnih mliječnih napitaka (Č1, Č2, Č3, Č4, Č5, Č6) i čokoladnih mliječnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc (1KK, 5KK, 10KK, 1BG, 5BG, 10BG) čine jednu skupinu. Drugu skupinu čine uzorci kakao mliječnih napitaka (K1, K2, K3, K4), kakao napitaka na biljnoj bazi (Kb1, Kb2, Kb3, Kb4) te instant kakao mliječnih napitaka pripremljenih prema uputi proizvođača (Kp1 i Kp2). Uzorci napitaka koji formiraju istu skupinu su međusobno sličniji obzirom na senzorsko svojstvo okusa. Na temelju analize elektronskim jezikom i PCA analize čokoladnih i kakao napitaka te čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc, može se zaključiti da elektronski jezik uspješno razlikuje uzorke čokoladnog napitka od uzoraka kakao napitka. Također, čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc nisu stvršani u zasebnu skupinu, već su svrstani u skupinu čokoladnih napitaka.

U tablici 7 dan je prikaz Eigen-vrijednosti dobivenih PCA analizom za uzorke kakao napitaka.

Tablica 7. Eigen-vrijednosti dobivene PCA analizom uzoraka kakao napitaka

Glavne komponente (faktori)	Eigen- vrijednost	% varijance	Eigen- vrijednost (kumulativno)	% varijance (kumulativno)
1	3,94	56,27	3,94	56,27
2	1,63	23,32	5,57	79,58
3	1,00	14,28	6,57	93,86
4	0,26	3,75	6,83	97,61
5	0,13	1,89	6,97	99,50
6	0,03	0,48	7,00	99,98
7	0,00	0,02	7,00	100,00

Iz rezultata PCA analize prikazanih u tablici 7 za Eigen-vrijednosti uzoraka kakao napitaka, vidljivo je da prva glavna komponenta (faktor 1) opisuje 56,27 % ukupne varijance između odziva senzora elektronskog jezika, uz Eigen-vrijednost 3,94. Druga glavna komponenta (faktor 2) opisuje 23,32 % ukupne varijance, uz Eigen-vrijednost 1,63. Ukupna varijanca opisana pomoću prve dvije glavne komponente iznosi 79,58 %. Također, vidljivo je da preostale komponente obuhvaćaju sve manji postotak ukupne varijance i sve manje utječu na varijabilnosti između odziva senzora. PCA analizom je postignuto željeno smanjenje broja varijabli i rezultati mjerenja elektronskim jezikom mogu se promatrati pomoću novog koordinatnog sustava kojeg čine prve dvije glavne komponente (faktor 1 i faktor 2).

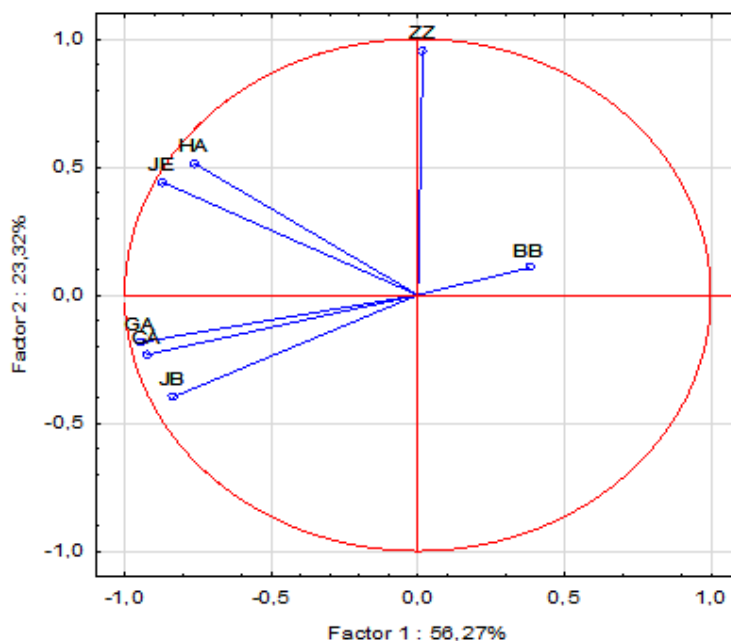
U tablici 8 dan je prikaz doprinosa pojedinog senzora elektronskog jezika glavnim komponentama PCA analize za uzorke kakao napitaka.

Tablica 8. Doprinos pojedinog senzora glavnim komponentama (faktorima) PCA analize uzoraka kakao napitaka

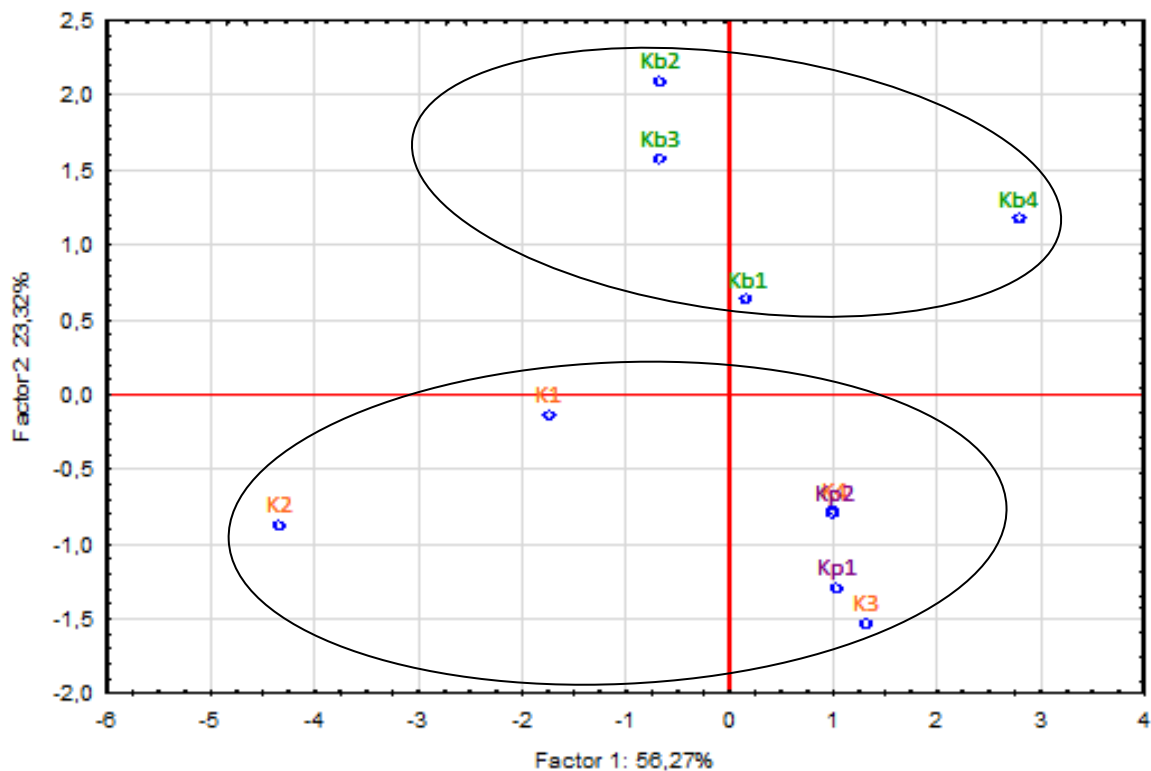
Senzori	Faktor 1	Faktor 2
ZZ	0,02	0,96
JE	-0,87	0,44
BB	0,38	0,11
CA	-0,92	-0,23
GA	-0,95	-0,18
HA	-0,77	0,52
JB	-0,84	-0,40

Najveći doprinos faktoru 1 imaju senzori JE, CA, GA, HA i JB, a faktoru 2 senzor ZZ.

Kako bi se utvrdilo može li se analizom elektronskog jezika utvrditi razlika između kakao mliječnog napitka, kakao napitka na biljnoj bazi (soja, riža) i instant kakao mliječnog napitka pripremljenog prema uputi proizvođača, provedena je PCA analiza samo navedenih uzoraka. Slike 8 i 9 prikazuju rezultate PCA analize s prve dvije glavne komponente (faktor 1 i faktor 2) za uzorke kakao napitaka.



Slika 8. Faktorsko opterećenje za prve dvije glavne komponente PCA analize uzoraka kakao napitaka

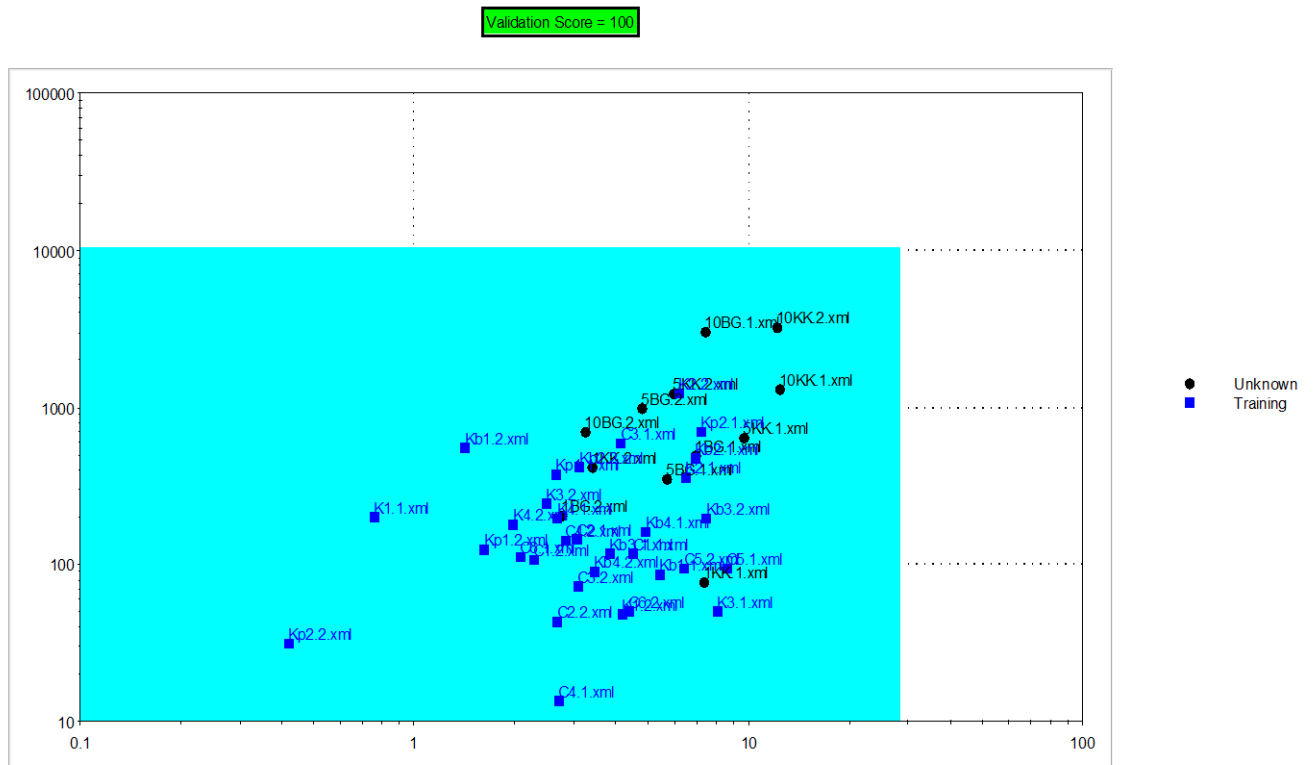


Slika 9. Faktorski bodovi za prve dvije glavne komponente PCA analize uzoraka kakao napitaka

Vidljivo je da su se odvojile dvije skupine uzoraka – kakao mliječni napitci i kakao napitci na biljnoj bazi (soja, riža). Uzorci kakao napitaka na biljnoj bazi (Kb1, Kb2, Kb3 i Kb4) čine jednu skupinu. Drugu skupinu čine uzorci kakao mliječnih napitaka (K1, K2, K3, K4) i instant kakao mliječnih napitaka pripremljenih prema uputi proizvođača (Kp1 i Kp2). Na temelju analize elektronskim jezikom i PCA analize kakao napitaka, može se zaključiti da elektronski jezik uspješno razlikuje uzorke kakao mliječnog napitka od uzoraka kakao napitka na biljnoj bazi (soja, riža), dok ne razlikuje uzorke instant kakao mliječnog napitka pripremljenog prema uputi proizvođača od uzoraka kakao mliječnog napitka dostupnog na tržištu.

SIMCA analiza temelji se na izradi modela koji svrstava nepoznate uzorke unutar ili izvan prethodno definirane grupe. Elektronski jezik treniran je s uzorcima čokoladnih i kakao napitaka dostupnim na tržištu, pod pretpostavkom da su oni senzorski prihvatljivi potrošačima. Na temelju dobivenih rezultata analize elektronskim jezikom, SIMCA analizom izrađen je model s definiranim granicama za grupu prihvatljivih proizvoda. Ukoliko se nepoznati uzorci nalaze unutar područja definirane grupe, oni se smatraju pripadnicima grupe, odnosno prihvatljivima (Alpha M.O.S., 2003). Nakon izrade modela, ispitano je pripadaju li uzorci

čokoladnih napitaka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc definiranoj grupi ili ne pripadaju. Na slici 10 prikazan je grafički prikaz rezultata SIMCA analize.



Slika 10. Grafički prikaz rezultata SIMCA analize

Na slici 10 vidljivo je da se analizirani uzorci čokoladnog mliječnog napitka s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc nalaze unutar definirane grupe, odnosno područja prihvatljivosti. Na temelju polazne pretpostavke da su čokoladni i kakao napitci dostupni na tržištu senzorski prihvatljivi potrošačima i rezultata SIMCA analize rezultata analize uzoraka elektronskim jezikom, može se zaključiti da bi čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektičkim otapalima BGlc i ChGlc bili senzorski prihvatljivi.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju analize provedene elektronskim jezikom te rezultata dobivenih obradom podataka multivarijantnim metodama PCA i SIMCA, može se zaključiti sljedeće:

1. Elektronski jezik u kombinaciji s PCA analizom može uspješno razlikovati čokoladne mliječne napitke od kakao napitaka te razlikovati kakao napitke na bazi kravljeg mlijeka i na biljnoj bazi.
2. SIMCA analizom dobivenih rezultata analiza elektronskim jezikom su čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektskim otapalima BGlc i ChGlc svrstani u skupinu čokoladnih i kakao napitaka.
3. Pod pretpostavkom da su čokoladni i kakao napitci dostupni na tržištu senzorski prihvatljivi potrošačima, može se zaključiti kako bi i čokoladni napitci s dodatkom ekstrakata u eutektskim otapalima BGlc i ChGlc također bili prihvatljivi.
4. Analiza elektronskim jezikom, kao instrumentalna metoda procjene senzorskih svojstava, ima veliki potencijal za primjenu u razvoju inovativnih prehrambenih proizvoda s dodatkom ekstrakata u eutektskim otapalima.

6. LITERATURA

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* **9** (1), 70–71.

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004) Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142–9147.

Abbott, A. P., El Ttaib, K., Frisch, G., McKenzie, K. J., Ryder, K. S. (2009) Electrodeposition of copper composites from deep eutectic solvents based on choline chloride. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 4269–4277.

Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F., Mantle, M. D. (2011) Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem.* **13**, 82–90.

Alpha M.O.S. (2003) α -Astree Manual, Electronic Tongue for Liquid and Taste Analysis, Software Version 3.0, Issue-Rev 1.1, ALPHA M.O.S., Toulouse.

Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., Kasran, R. (2016) Theobroma cacao: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Trop. Life Sci. Res.* **27**, 21-42.

Baldwin, E. A., Bai, J., Plotto, A., Dea, S. (2011) Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries. *Adv. S. Sens.* **11**, 4744–4766.

Benković, M., Bauman, I. (2011) Agglomeration of cocoa powder mixtures-influence of process conditions on physical properties of the agglomerates. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **15** (1), 46-49.

Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., Héberger, K. (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *J. Chromatogr. A* **1158**, 196–214.

Beullens, K., Mészáros, P., Vermeir, S., Kirsanov, D., Legin, A., Buysens, S., Cap, N., Nicolai, B. M., Lammertyn, J. (2008) Analysis of tomato taste using two types of electronic tongues. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **131**, 10–17.

- Bi, W., Tian, M., Row, K. H. (2013) Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A*. **1285**, 22-30.
- Brahem, M., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., Watrelot, A. A. Bourvellec, C. L. (2018) Pear ripeness and tissue type impact procyanidin-cell wall interactions. *Food Chem.* **275**, 754-762.
- Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Metode priprave eutektičkih otapala/Methods for deep eutectics solvents preparation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11** (3-4), 164-168.
- Ciosek, P., Brzózka, Z., Wróblewski, W. (2006) Electronic tongue for flow-through analysis of beverages. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **118**, 454–460.
- Ciosek, P., Wróblewski, W. (2007) Sensor arrays for liquid sensing - electronic tongue systems. *Analyst* **132**, 963–978.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**, 61–68.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius L.* *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **187**, 14–19.
- De Muijnck, L. (2005) Cocoa. U: Encapsuled and powdered foods, (Onwulata, C., ured.), CRC Press, Boca Raton, USA, str. 451-473.
- Dias, L. A., Peres, A. M., Veloso, A. C. A., Reis, F. S., Vilas-Boas, M., Machado, A. A. S. C. (2009) An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **136**, 209–217.
- Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **115**, 379–385.
- Escuder-Gilabert, L., Peris, M. (2010) Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Anal. Chim. Acta* **665**, 15–25.

- Galet, L., Vu, T. O., Oulahna, D., Fages, J. (2004) The wetting behaviour and dispersion rate of cocoa powder in water. *Food Bioprod. Process.* **82** (4), 298–303.
- Gorke, J. T. (2010) Application of deep eutetic solvents and ionic liquids to hydrolase-catalyzed reactions, Doktorska disertacija, University of Minnesota.
- Granato, D., Putnik, P., Bursač Kovačević, D., Sousa Santos, J., Calado, V., Rocha, R. S., Gomes Da Cruz, A., Jarvis, B., Ye Rodionova, O., Pomerantsev, A. (2018) Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**, 663–677.
- Hartigan, J. A. (1975) Clustering Algorithms, John Wiley & Sons, Canada/USA.
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta* **541**, 70-75.
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., Hashim, M. A. (2013) Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J.Mol. Liq.* **178**, 137-141.
- Hii, C.L., Law, C. L., Suzannah, S., Cloke, M., Cloke, M. (2009) Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag-Ind.* **2**, 702-722.
- Hruškar, M., Major, N., Krpan, M., Panjkota Krbavčić, I., Šarić, G., Marković, K., Vahčić, N. (2009) Evaluation of milk and dairy products by electronic tongue. *Mljekarstvo* **59** (3), 193–200.
- Kareem, M. A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2010) Phosphonium-Based Ionic Liquids Analogues and Their Physical Properties. *J. Chem. Eng. Data* **55**, 4632-4637.
- Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents - a review. *Environ. Sci. Pollut. R.* **22** (16), 11975–11992.
- Legin, A., Rudnitskaya, A., Lvova, L., Vlasov, Y., Di Natale, C., D’Amico, A. (2003a) Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception. *Anal. Chim. Acta* **484**, 33–44.
- Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y. (2003b) Electronic tongues: new analytical perspective for chemical sensors. *Comprehensive Analytical Chemistry* **39**, 437–486.

- Li, X., Hou, M., Han, B., Wang, X., Zou, L. (2008) Solubility of CO₂ in a Choline Chloride+Urea Eutectic Mixture. *J. Chem. Eng. Data* **53**, 548–550.
- Lorenz, J. K., Reo, J. P., Hendl, O., Worthington, J. H., Petrossian, V. D. (2009) Evaluation of a taste sensor instrument (electronic tongue) for use in formulation development. *Int. J. Pharm.* **367**, 65–72.
- Maugeri, Z., Domínguez De María, P. (2012) Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: Levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Adv.* **2**, 421–425.
- Maugeri, Z. (2014) Deep eutectic solvents: properties and biocatalytic applications. Faculty of Mathematics, IT and Natural Sciences RWTH Aachen, Italien.
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., Carr, B. T. (2016) Sensory Evaluation Techniques, 5. izd., Taylor & Francis, London.
- Molnar, M., Klenkar, J., Tarnai, T. (2017) Eco-Friendly Rapid Synthesis of 3-Substituted-2-Thioxo-2,3-Dihydroquinazolin-4(1H)-Ones in Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvent. *Synthetic Commun.* **47** (11), 1040–1045.
- Mulia, K., Krisanti, E. A., Terahadi, F., Putri, S. (2015) Selected natural deep eutectic solvents for the extraction of α -Mangostin from mangosteen (*Garcinia Mangostana L.*) pericarp. *Int. J. Technol. Des. Ed.* **7**, 1211-1220.
- Oliveri, P., Downey, G. (2012) Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. *Trac.-Trend. Anal. Chem.* **35**, 74–86.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2013) The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao L.*), depending on variety, growing region, and processing operations: A review. *Food Sci. Nutr.* **55**, 1176–1192.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Pecina, M. (2006) Metode multivarijantne analize, Agronomski fakultete Sveučilišta u Zagrebu.

- Petričić, A. (1973) Pravci razvoja tehnologije slatkih mlječnih napitaka. *Mljekarstvo* **23** (3), 59-66.
- Piljac, I. (2010) Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, Sveučilište u Zagrebu, str. 211.
- Pioggia, G., Di Francesco, F., Marchetti, A., Ferro, M., Ahluwalia, A. (2007) A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part I. Characterization. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2618–2623.
- Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) *Narodne novine* **73**, Zagreb.
- Riul, A., Soto, A. M. G., Mello, S. V., Bone, S., Taylor, D. M., Mattoso, L. H. C. (2003) An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline. *Synthetic Met.* **132**, 109–116.
- Sander, A. (2012). Ionske kapljevine u službi zelene kemije. *Polimeri* **33** (3–4), 127–129.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.
- Stone, H., Bleibaum, R. N., Thomas, H. A. (2012) Sensory Evaluation Practices, 4. izd., Elsevier Inc., UK, str. 15.
- Su, W. C., Wong, D. S. H., Li, M. H. (2009) Effect of Water on Solubility of Carbon Dioxide in (Aminomethanamide + 2-Hydroxy-N,N,N-trimethylethanaminium Chloride). *J. Chem. Eng. Data* **54**, 1951–1955.
- Todorić, R. (1973) Čokoladni prah kao značajan faktor kvaliteta sterilizovanog čokoladnog mleka. *Mljekarstvo* **23** (11), 253-257.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Zhao, H., Zhang, C., Crittle, T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **85–86**, 243–247.
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–7146.

Živojinović, Z. D. (2013) Razvoj i primena hemometrijskih metoda za klasifikaciju i procenu kvaliteta voda, Tehnološko-metalurški fakultete Sveučilišta u Beogradu.

Wei, Z., Wang, J., Liao, W. (2009) Technique potential for classification of honey by electronic tongue. *J. Food Eng.* **94**, 260–266.

Winqvist, F., Bjorklund, R., Krantz-Rülcker, C., Lundström, I., Östergren, K., Skoglund, T. (2005) An electronic tongue in the dairy industry. *Sensor Actuat. B-Chem.* **111–112**, 299–304.

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.

Marina Žgela

Ime i prezime studenta