

# Optimiranje procesa proizvodnje praškastih kakao napitaka obogaćenih ekstraktom mente

---

Pižeta, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*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:159:330643>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2018.

Maja Pižeta  
851/N

**OPTIMIRANJE PROCESA  
PROIZVODNJE PRAŠKASTIH  
KAKAO NAPITAKA  
OBOGAĆENIH EKSTRAKTOM  
MENTE**



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 atomatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Benković na strpljenju, prijateljskom pristupu, te stručnim savjetima i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Tamari Jurina i doc.dr.sc. Davoru Valingeru na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom izrade eksperimentalnog djela ovog diplomskog rada.

Veliko hvala Danijeli Šegota Mlinar na susretljivosti, razumijevanju i toleranciji tijekom mog studiranja.

Posebno se zahvaljujem svom dragom, Zoranu Erešu, na svakodnevnoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumijevanju bez kojeg ne bih uspjela ostvariti svoje ciljeve, te također zahvaljujem svojim roditeljima i sestri koji su me uvijek u svemu podržavali.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Dubravki Škevin, teti Vesni, izv.prof.dr.sc. Ivani Kmetič i kolegici Anamariji Buneta, jer svatko je od vas imao svoji mali, ali za mene vrlo značajan doprinos tijekom studiranja.

## 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

### OPTIMIRANJE PROCESA PROIZVODNJE PRAŠKASTIH KAKAO NAPITAKA OBOGAĆENIH EKSTRAKTOM MENTE

*Maja Pižeta, 851/N*

**Sažetak:** Koncept funkcionalne hrane postaje sve popularniji te danas namirnice nisu namijenjene samo zadovoljavanju gladi i pružanju potrebnih nutrijenata već i sprječavanju bolesti povezanih s prehranom te poboljšanju fizičkog i mentalnog zdravlja potrošača. S druge strane, zbog ubrzanog načina života, ljudi sve češće posežu za instant hranom i napitcima zbog čega proizvodnja funkcionalnih instant napitaka zauzima sve veće mjesto na tržištu. Kakao je bogat izvor polifenola koji pokazuju antikancerogeni, protuupalni i vazodilatorni učinak te neke medicinske studije pokazuju povoljnu povezanost konzumacije kaka s manjim rizikom od smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. Stoga, cilj ovog rada bio je razviti i optimirati proces sušenja u pjenu za proizvodnju funkcionalnog praškastog kakao napitka obogaćenog ekstraktom paprene metvice (*Mentha piperita* L.), koja osim svog karakterističnog mirisa i okusa, također predstavlja dobar izvor polifenola. Uzorcima su analizirana fizikalna, kemijska i senzorska svojstva. Temeljem analize rezultata eksperimenata utvrđeno je da za dobivanje kakao mješavina optimalnog sastava, svojstava i prihvatljivosti za potrošača, najprikladniji sastav smjese sadrži 50 g temeljne kakao smjese (30 % kakao, 70 % saharoza), 40 g bjelanjka i 3,75 % ekstrakta paprene metvice uz 3,5 minute miješanja.

**Ključne riječi:** *funkcionalni proizvodi, sušenje u pjenu, kakao, paprena metvica, obogaćeni kakao napitci*

**Rad sadrži:** 66 stranica, 17 slika, 9 tablica, 108 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. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
2. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
3. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
4. Prof.dr.sc. *Jasenska Gajdoš Kljusarić* (zamjena)

**Datum obrane:** rujan, 2018.

## 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

### OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION PROCESS OF POWDERED COCOA BEVERAGES ENRICHED WITH PEPPERMINT EXTRACT

*Maja Pižeta, 851/N*

**Abstract:** The concept of functional food is becoming increasingly popular, as foodstuffs are not intended only to satisfy hunger and provide necessary nutrients but also to prevent nutrition-related diseases and improve physical and mental health of consumers. On the other side, because of a fast way of life, people use instant foods and drinks more frequently and, as a consequence, the functional instant drinks industry has increased its market share. Cocoa is a rich source of polyphenols and exhibits anticarcinogenic, anti-inflammatory and vasodilatory effects. Some medicine studies demonstrate very good correlation between a cocoa consumption and a low-risk of death due to cardiovascular diseases. Therefore, the aim of this work was to develop a foam-mat drying process for production of powdered cocoa drink enriched with peppermint extract (*Mentha piperita* L.), as a good source of polyphenols with characteristic pleasant smell and taste. Physical, chemical and sensory properties of samples were analysed. With respect to the best properties and consumers acceptability, obtained results showed that optimal composition consists of: 50 g of basic cocoa mixture (30 % cocoa, 70 % saccharose), 40 g egg white and 3.7% peppermint extract, with stirring time of 3.5 minutes.

**Keywords:** *functional products, foam-mat drying, cocoa, peppermint, enriched cocoa beverages*

**Thesis contains:** 66 pages, 17 figures, 9 tables, 108 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. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
2. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
3. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
4. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusarić*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** september, 2018.



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. FUNKCIONALNI PREHRAMBENI PROIZVODI .....	3
2.2. KAKAO KAO FUNKCIONALNI PREHRAMBENI PROIZVOD .....	4
2.2.1. Proizvodnja kakao praha .....	6
2.2.1.1. <i>Berba</i> .....	6
2.2.1.2. <i>Fermentacija i sušenje</i> .....	7
2.2.1.3. <i>Čišćenje i ljuštenje</i> .....	8
2.2.1.4. <i>Alkalizacija</i> .....	8
2.2.1.5. <i>Pečenje</i> .....	8
2.2.1.6. <i>Mljevenje</i> .....	8
2.2.1.7. <i>Prešanje i usitnjavanje</i> .....	8
2.3. PROIZVODNJA INSTANT KAKAO NAPITAKA .....	9
2.3.1. Aglomeracija i sušenje u fluidiziranom sloju .....	10
2.3.3. Sušenje u pjenu .....	11
2.4. OBOGAĆIVANJE INSTANT KAKAO NAPITAKA .....	14
2.5. PARENJE METVICA ( <i>Mentha piperita</i> L.) .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Reagensi i otapala.....	16
3.1.2. Aparatura i pribor .....	16
3.2. METODE .....	18
3.2.1. Priprema temeljne kakao smjese .....	18
3.2.2. Priprema ekstrakta mente .....	18
3.2.3. Priprema mješavina za sušenje u pjenu.....	18
3.2.3.1. <i>Gustoća i stabilnost pjene</i> .....	19
3.2.4. Fizikalna svojstva mentom obogaćenih kakao napitaka sušenih u pjenu .....	20
3.2.4.1. <i>Raspodjela veličine čestica</i> .....	20
3.2.4.2. <i>Nasipna gustoća</i> .....	20
3.2.4.3. <i>Određivanje značajki tečenja</i> .....	21
3.2.4.4. <i>Sadržaj vlage</i> .....	23
3.2.4.5. <i>Disperzibilnost</i> .....	24
3.2.4.6. <i>Topljivost</i> .....	24
3.2.5. Kemijska svojstva mentom obogaćenih kakao napitaka sušenih u pjenu.....	25
3.2.5.1. <i>Priprema ekstrakta obogaćenih kakao prahova</i> .....	25
3.2.5.2. <i>Određivanje ukupnih polifenola</i> .....	25
3.2.5.3. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i> .....	26
3.2.6. Senzorska analiza .....	27
3.2.6.1. <i>Priprema uzorka za senzorsku analizu</i> .....	27
3.2.6.2. <i>Provođenje senzorske analize</i> .....	27
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	28

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	29
4.1. SVOJSTVA PJENE.....	29
4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA.....	32
4.2.1. Raspodjela veličine čestica.....	32
4.2.2. Nasipna gustoća.....	33
4.2.3. Svojstva tečenja.....	34
4.2.4. Sadržaj vlage .....	35
4.2.5. Rekonstitucijska svojstva .....	36
4.2.5.1. <i>Topljivost i disperzibilnost</i> .....	36
4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA .....	38
4.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola.....	38
4.3.2. Antioksidacijski kapacitet .....	40
4.4. SENZORSKA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA.....	42
4.5. STATISTIČKA OBRADA MJERENIH PODATAKA .....	43
4.6. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA .....	49
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	56
<b>6. LITERATURA</b> .....	57

# 1. UVOD

Zbog ubrzanog načina života i manjka vremena, konzumacija instant napitaka postala je jedan od zaštitnih znakova današnjeg vremena. Od toplih napitaka najviše se konzumiraju kava, čaj i kakao napitci (Gluszek i Kosicka, 2014). Prednost kakao napitka je brza priprema, može se konzumirati kao hladni ili topli napitak, finog je okusa, i sadrži manje kofeina (Kumar i sur., 2018). Smatra se da u pojedinim zemljama, naročito u zemljama u razvoju, ljudi ne konzumiraju dovoljno voća i povrća, pa samim time ne unose dovoljne količine polifenola hranom (Hu, 2007). S obzirom na tu činjenicu, iako je konzumacija voća i povrća važnija, konzumacijom kakao napitaka, koji su vrlo jednostavni i brzi za pripremu, mogao bi se povećati i nadoknaditi dnevni unos polifenola. Kakao i njegovi proizvodi, konzumiraju se širom svijeta zbog vrlo dobrih organoleptičkih svojstava, a smatra se da je potrošnja u stalnom porastu, pa je tako svjetska potrošnja po glavi stanovnika 2002. godine bila oko 0,54 kg, a 2010. godine 0,61 kg, dok su Europske regije najveći potrošači kakaa sa 48% ukupne svjetske potrošnje (Caligiani i sur., 2015). Procjenjuje se da u Španjolskoj, proizvodi od kakaa čine 10% ukupnog hranom unesenih antioksidansa (Tabernerero i sur., 2006), a u nekim regijama kao na primjer Belgija i Luxemburg, potrošnja kakaovih proizvoda doseže do 6 kg po osobi godišnje, dok je u Hrvatskoj prosječna godišnja potrošnja kakao proizvoda 2,14 kg po osobi (Afoakwa, 2010). Osim što se smatra da je kakao bogat izvor polifenola, bogat je izvor i prehrambenih vlakana, te sadrži minerale kao što su magnezij, kalcij i kalij, te vitamine A, E, B i folnu kiselinu (Ramiro-Puig i Castell, 2009). Na hrvatskom tržištu mogu se naći brojni proizvodi na bazi kakaa, te razni praškasti proizvodi za izradu kakao napitaka od raznih proizvođača, međutim kakao praha obogaćen raznim ekstraktima baš i ne nalazimo. Zanimljiv aspekt razvoja kakao napitaka jest obogaćivanje biljnim ekstraktima. U ovom je radu korištena paprena metvica (*Mentha piperita* L.), čiji listovi sadrže 19 – 23% ukupnih polifenola (12% flavonoida), te se ekstrakcijom može ekstrahirati 75% ukupnog sadržaja polifenola (Duband i sur., 1992).

U ovom radu cilj je razviti i optimirati proces sušenja u pjenu za proizvodnju funkcionalnog praškastog kakao napitaka obogaćenog ekstraktom paprene metvice (*Mentha piperita* L.) kako bi se dobio proizvod sa što boljim fizikalnim, kemijskim i senzorskim svojstvima. Kao plan pokusa korišten je Box-Behnken dizajn eksperimenta prema kojem je proizvedeno 15 uzoraka obogaćenih kakao mješavina. Uzorcima su analizirana fizikalna,

kemijska i senzorska svojstva te su temeljem analize rezultata eksperimenata utvrđeni uvjeti za dobivanje kakao mješavina optimalnog sastava, svojstava i prihvatljivosti za potrošača.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FUNKCIONALNI PREHRAMBENI PROIZVODI

Povećana svijest potrošača o pozitivnim učincima bioaktivnih spojeva na zdravlje dovodi do sve većih zahtjeva za razvojem novih, funkcionalnih prehrambenih proizvoda te time stavlja novi izazov pred proizvođače hrane. Danas namirnice nisu namijenjene samo zadovoljavanju gladi i pružanju potrebnih nutrijenata, već i spriječavanju bolesti povezanih sa prehranom, te poboljšanu fizičkog i mentalnog blagostanja potrošača (Roberfroid, 2000; Menrad, 2003). Sve bolje razumijevanje odnosa prehrane i zdravlja potpomoglo je razvoju koncepta funkcionalne hrane.

Sam naziv „funkcionalna hrana“ prvi je puta korišten u Japanu, 1980. godine za prehrambene proizvode koji sadrže posebne sastojke koji imaju povoljne fiziološke učinke. Japanski su znanstvenici proučavali odnose između prehrane, osjetilnog zadovoljstva, te fiziološkog utjecaja hrane. Od 1991. godine japansko Ministarstvo zdravlja uvelo je pravila za odobravanje određene kategorije zdravih namirnica za koje postoje znanstveni dokazi da mogu imati povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka, te je Japan prva zemlja koja je zakonskom regulativom definirala funkcionalnu hranu kao „hrana za specifične zdravstvene potrebe“ i nose oznaku FOSFU (Food for specified health use) (Bailey, 2005).

Bilo je više pokušaja definiranja pojma funkcionalne hrane, pa tako postoji i više definicija funkcionalne hrane. Neke od najčešće korištenih su: „hrana koja može pružiti pozitivne učinke na zdravlje izvan osnovne prehrane“, te „hrana slična konvencionalnoj hrani koja se konzumira kao dio normalne prehrane, ali je primijenjena kako bi podupirala fiziološke uloge osim pružanja jednostavnih hranjivih tvari“ (Bech-Larsen i Grunert, 2003). Europska komisija u koordinaciji sa International Life Science Institute (ILSI) definira funkcionalnu hranu kao prehrambeni proizvod koji uz nutritivnu funkciju ima i dobrobiti na jednu ili više funkcija organizma i na taj način poboljšava opće i fizičko stanje, te smanjuje rizik za razvoj bolesti (Diplock i sur., 1999).

U mnogim zemljama je funkcionalna hrana bila uvedena na tržište prije provedbe zakona koji pružaju detaljnu regulativu za ovu kategoriju proizvoda. Za razliku od Japana, Europsko zakonodavstvo ne smatra funkcionalnu hranu kao specifičnu kategoriju hrane, već kao koncept. Stoga može biti zahvaćena općom uredbom o hrani, te zakonima o GMO hrani, dodacima prehrani ili novoj hrani, ovisno o prirodi funkcionalne hrane i njejoj upotrebi (Siro

i sur, 2008). Postoji više podjela funkcionalne hrane a jedna od njih dijeli funkcionalnu hranu na slijedeće kategorije:

- Nepromijenjeni proizvod - hrana koja prirodno sadrži visoke koncentracije funkcionalnih komponenata
- Ojačani proizvodi - hrana koja je obogaćena hranjivim tvarima koje inače prirodno sadrži
- Obogaćeni proizvodi - hrana koja je obogaćena nutrijentima koje inače ne sadrži
- Promijenjeni proizvodi - hrana kojoj su štetne komponente uklonjene, smanjene ili zamijenjene nekom drugom nutritivnom komponentom
- Poboljšani proizvodi - hrana kojoj je jedna komponenta prirodno poboljšana posebnim uvjetima uzgoja, genetskom manipulacijom ili nekom drugom metodom (Zdunczyk i Jankowski, 2013).

Kako je funkcionalna hrana danas sve popularnija, njeno tržište stalno raste, a potrošači su spremni platiti višu cijenu za proizvod za koji smatraju da spada u funkcionalne proizvode (Micale i sur., 2018). Prema izvješću Steina i Rodriguez-Cereza (2008) najveći udio na tržištu funkcionalne hrane imaju mliječni proizvodi, pa zatim razni obogaćeni napitci, pa žitarice. Proizvodi se najviše obogaćuju probiotičkim bakterijama, vlaknima, a na trećem mjestu su biljni ekstrakti (Stein i Rodriguez-Cerez, 2008).

## **2.2. KAKAO KAO FUNKCIONALNI PREHRAMBENI PROIZVOD**

Biljka kakao pripada obitelji *Malvaceae* i rodu *Theobroma* (De Almeida i Valle, 2007). Rod *Theobroma* ima 22 vrste od kojih je samo *Theobroma cacao* L. od velikog ekonomskog značenja u svijetu zbog vrijednosti i konzumacije njenog zrna, koji je glavna sirovina za proizvodnju čokolade, kakao praha (koji je korišten u prehrambenoj industriji npr. u proizvodnji kakao praha za pripremu kakao napitaka, peciva, sladoleda i sl.), te kakao maslaca koji uz svoju konditorsku upotrebu ima primjenu i u kozmetičkom i farmakološkom sektoru (Caligiani i sur., 2015; Kongor i sur., 2016).

Kakao se već tisućama godina koristi u ljudskoj prehrani. Prvi koji su koristili kakao bili su Maye i Asteci. Maye su kakao smatrali simbolom plodnosti, života, te smatrali su ga hranom bogova, dok su Asteci vjerovali da konzumacija kakaoa daje mudrost i moć, te su kakao koristili i kao valutu. Asteci i Maye pili su kakao kao crni gorki napitak koji su nazivali

xocoalt, što znači gorka voda. Otkrićem Amerike, Columbo je 1492. godine donio kakao iz Amerike u Europu, međutim Europljani u to doba nisu bili zainteresirani za kakao. Tek 1528. kada se Cortez vraća iz Amerike u Španjolsku sa kakao zrnima i receptom za čokoladni napitak počinje interes za kakao. Španjolci su zatim u originalni recept dodali šećer, vaniliju, muškadni oraščić, klinčić, cimet, te se na taj način kakao počeo širiti Europom (Ackar i sur., 2013).

Kakao stablo, višegodišnje je stablo visine 8-15 m (Fowler, 2008). Za svoj rast zahtjeva vlažnu i toplu klimu s temperaturama od 20-30 °C. Takvi se pogodni uvjeti za uzgoj kakaia uglavnom nalaze na oko 20° zemljopisne širine sjeverno i južno od ekvatora. Kakao stablo je poprilično osjetljivo, te ne podnosi izravne jake udare vjetra ni izravnu sunčevu svjetlost, pa se iz tog razloga obično uzgaja u sjeni drugih visokih stabala kao što su npr. banane i kokos. (Caligiani i sur., 2015) Najveći uzgajivači kakaia su Gana, Obala Bjelokosti, Kamerun i Nigerija (Schwam i Wheals, 2004). U Gani više od 6,3 milijuna stanovnika ovisi o proizvodnji kakaia, te kakao doprinosi prosječno 4,9 % ukupnog BDP-a (Gockowsky i sur., 2013; Mahrizal i sur., 2014). Afrika je kontinent sa najvećom svjetskom proizvodnjom od 67 %, dok je najveći državni proizvođač Obala Bjelokosti sa 30 % ukupne svjetske proizvodnje (Prabhakaran, 2010). Danas se uglavnom uzgajaju tri sorte kakaia, a to su: Forastero, Criollo, Trinitario (Afoakwa i sur., 2011), a postoji i četvrta sorta uzgojena u Ekvadoru, nazvana Nacional (Saltini i sur., 2013). Sorte se razlikuju u izgledu mahune, prinosu, karakterističnom okusu i otpornosti na različite bolesti.

Criollo se smatra izvornim kakaom, autohtono na sjeveru, jugu i središnjoj Americi (Fowler, 1999). Zrno je bijele ili blijedo ljubičaste boje, međutim stablo ima mali prinos i osjetljiv je na razne nametnike pa se zbog toga rijetko uzgaja (De Almeida i Valle, 2007). Criollo čini svega 5 % ukupne svjetske proizvodnje, a danas ga se može naći u Meksiku, Kolumbiji i Venezueli (Lima i sur., 2011).

Forastero čini 85 % - 95 % ukupne svjetske proizvodnje kakaia jer je otporan na bolesti i stablo je vrlo produktivno (Aprotosoia i sur., 2014). Zrno je ljubičaste boje zbog prisutnosti antocijana. Nakon fermentacije i sušenja, Forastero zrno ima viši pH u usporedbi sa Criollo zrnom, pa je čokolada proizvedena iz Forastero zrna manje gorka i manje kisela u usporedbi sa čokoladom proizvedenom od Criollo zrna (De Bertorelli i sur., 2009).

Trinitario je uzgojeni hibrid između Foastera i Criolla (Risterucci i sur., 2000). Zrno može biti promjenjive boje, iako je vrlo rijetko bijeli, a koristi se za dobivanje kvalitetne tamne čokolade (Fowler, 1999).

Kakao sorte Nacional pokazuje vrlo nisku količinu reduciranih šećera nakon fermentacije i nisku razinu pirazina, te su čokolade proizvedene iz ove sorte, vrlo nježnog okusa (Saltini i sur., 2013).

Dugi niz godina, kakao i čokolada koristili su se isključivo zbog zadovoljstva, ali su istraživanja u posljednjih 20 godina pokazala da bi kakao i čokolada mogli imati koristi za ljudsko zdravlje zbog visokog udjela polifenola (Ackar i sur., 2013). Polifenoli u kakao grahu pohranjeni su u pigmentnim stanicama i ovisno o količini antocijana, boja može varirati od bijele do tamno ljubičaste. U kakao najznačajnije su tri skupine polifenola, to su: flavonoidi (oko 37 %), antocijani (oko 4 %) i proantocijanidi (oko 58 %) (Wollgsat i Anklam, 2000). Polifenoli iz kakaa pokazuju antikancerogeni, (Oleaga i sur., 2012), vazodilatorni (Vlachojannis i sur., 2016), protuupalni učinak (Dugo i sur., 2017), djeluju kao antioksidansi (Serafini i Peluso, 2016), neke epidemiološke studije pokazale su povoljnu povezanost konzumacije kaka s manjim rizikom od smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (Corti i sur., 2009).

### **2.2.1. Proizvodnja kakao praha**

Sirovi kakao ima gorak i trpak okus, stoga potrebno ga je provesti kroz niz faza u kojima se kakao zrno pretvara u proizvode koji se dalje mogu koristiti za formulaciju različitih namirnica (Loullis i Pinakoulaki, 2018). Načelo prerade kaka nije se mijenjalo u posljednjih 150 godina (Beg i sur., 2017). Prilikom procesa proizvodnje, dolazi do oksidacije polifenola, čime se smanjuje gorčina i povećava karakterističan okus kaka (Nazaruddin i sur., 2006). Dolazi i do promjene sastava, pa tako svježe zrno sadrži 32-39 % vode, 30-32 % masti, 10-15 % proteina, 5-6 % polifenola, 4-6 % škroba, 2-3 % celuloze, 2-3 % saharoze (Lopez i Dimick, 1995).

#### **2.2.1.1. Berba**

*Theobroma cacao* L. obično počinje imati plodove nakon 3 godine, a maksimalni prinos plodova je nakon 8-9 godina. Berba kakaovih mahuna vrši se ručno uz pomoć noževa (Beg i sur., 2017). Berba se provodi dva puta godišnje (veljača/ožujak i travanj/srpanj). Smatra se da se prilikom ljetne berbe obično dobiju plodovi bolje kvalitete (Prabhakaran, 2010, Schwan i Wheals, 2004). Nakon berbe, mahune se pregledaju i odabiru se samo zdravi i optimalno zreli plodovi. Bitno je da se berba kakaovih mahuna vrši u vrijeme optimalne zrelosti. Ukoliko su plodovi prezreli povećava se rizik od truljenja i klijanja sjemena, dok će nezreli plodovi negativno utjecati na proces fermentacije. Zreli plodovi se prepoznaju prema



boji samog ploda koja varira od žute, crvene ili ljubičaste, ovisno o sorti, dok su nezreli plodovi zelene boje. Nakon berbe mahune se otvaraju i sakupljaju se zrna kakaa koji nakon čišćenja idu u fermentaciju (Gutierrez, 2017). Kakao mahune obično sadrže oko 30-40 zrna kakaa ugrađenih u pulpu (Schwan i Wheals, 2004).

### **2.2.1.2 Fermentacija i sušenje**

Fermentacija se najčešće vrši u drvenim kutijama ili košarama prekrivenim listovima od banana. Trajanje same fermentacije ovisi o sorti, pa tako kod sorte Criollo traje 2-3 dana dok kod sorti Trinitario i Forastero traje 5-8 dana. Fermentacija je vrlo bitna jer dolazi do razgradnje pulpe, inaktivacije klice, te dolazi do razvoja prekursora arome. Fermentaciju možemo podijeliti u dvije faze, anaerobnu i aerobnu. Svježa pulpa ima visoki sadržaj šećera (8-24 %), limunsku kiselinu, te niski pH (3,4-4,0) pa je dobra podloga za rast anaerobnih kvasaca (*Saccharomyces* spp. i *Betabacterium* spp.) koji dominiraju tijekom prvih 24 – 36 h fermentacije. Kvasci započinju alkoholnu fermentaciju, pretvaraju šećere u alkohol i ugljikov dioksid, te metaboliziraju limunsku kiselinu. Gubitkom limunske kiseline dolazi do porasta pH, koji uz povećanu koncentraciju alkohola i bolje prozračivanje (uzrokovano miješanjem), pogoduje bakterijama mliječne kiseline koje počinju dominirati, te dolazi do egzotermne oksidacije alkohola i povećanja temperature na 45-50 °C. Tijekom fermentacije dolazi do reduciranja šećera i enzimatske razgradnje proteina u slobodne aminokiseline i peptide, fenolni spojevi oksidiraju i polimeriziraju što dovodi do smanjenja gorčine. Nastaju i hlapljivi spojevi kao što su alkoholi, organske kiseline, esteri i aldehidi, što u konačnici doprinosi stvaranju arome kakaa (Loullis i Pinakoulaki, 2018; Lopez i Dimick, 1995). Nakon fermentacije slijedi sušenje. Tijekom sušenja dovršavaju se oksidativni procesi koji su započeli tijekom fermentacije, pa se time smanjuje gorčina i kiselost, te se razvija smeđa boja koja nastaje reakcijom kondenzacije između kinona i proteina nakon enzimske oksidacije polifenola. Sušenje se vrši do smanjenja sadržaja vlage do 7-8% kako bi se omogućio siguran transport i skladištenje. Sušenje se obično vrši na suncu, međutim ukoliko klimatski uvjeti nisu pogodni, može se primijeniti umjetno sušenje propuhivanjem vrućeg zraka. Sušenje se provodi na nižim temperaturama kroz duže vrijeme. Osušena zrna kakaa pakiraju se u jutene vreće i skladište do daljnje obrade (Gutierrez, 2017).

### **2.2.1.3. Čišćenje i ljuštenje**

Prije daljnje obrade kakao zrna treba pregledati i očistiti od nečistoća. Ljuštenje kakao zrna može se vršiti prije ili nakon prženja. Ljuska se odstranjuje dok jezgra (kotiledon) ide u daljnju obradu. Odvajanje ljuske od jezgre vrši se u mlatilicama ili winnowing uređajima.

### **2.2.1.4. Alkalizacija**

Alkalizacija je proces tretiranja kakao zrna alkalnim otopinama kalijevo-karbonata ili natrijevog hidroksida. Parametri procesa koji određuju krajnju boju i okus proizvoda su vrijeme obrade, temperatura, vrsta i koncentracija alkalnog sredstva, količina vlage, zraka i tlak. Proces alkalizacije je opcionalan i može se uvesti u različite faze procesa (Lopez i Dimick, 1995). Tijekom alkalizacije dolazi do oksidacije fenolnih spojeva, što dovodi do nastanka smeđeg pigmenta (Giacometti i sur., 2014). Li i sur. (2014) potvrdili su da je kakao prah tamniji kada je smanjen ukupni sadržaj polifenola, reakcija je bila brža na višim temperaturama i više je antocijanina bilo transformirano u smeđe polimere povećanjem koncentracije alkalizirajućeg sredstva. Alkalizirani kakao prah imao je bolju kvalitetu boje i bio je manje trpak u odnosu na nealkalizirani kakao prah.

### **2.2.1.5. Pečenje**

Pečenje je jedan od bitnijih koraka koji utječu na krajnju kvalitetu i okus kakaovih proizvoda. Provodi se na temperaturi od 110 – 160 °C kroz 5-120 minuta. Tijekom pečenja sadržaj vlage se smanjuje na oko 2 % te neželjene hlapljive kiseline koje pridonose kiselosti i gorčini isparavaju. Kroz Maillardove reakcije aminokiseline, peptidi i reducirani šećeri, proizvedeni tijekom fermentacije i sušenja, međusobno djeluju kako bi proizveli poželjne komponente okusa kakaa kao što su alkoholi, esteri, furani, kiseline i dr. (Loullis i Pinakoulaki, 2018).

### **2.2.1.6. Mljevenje**

Mljevenjem dolazi do razaranja staničnih stjenki čime se oslobađa kakao maslac. Trenje povećava temperaturu smjese, te masa prelazi u tekuće stanje. Dobivena kakao masa čuva se do daljnje obrade na temperaturi od 40 – 45 °C.

### **2.2.1.7. Prešanje i usitnjavanje**

Kakao masa se preša hidrauličkim prešama porastom pritiska od 40 -50 MPa tijekom određenog vremenskog razdoblja. Prešanjem se izdvaja kakao maslac, koji se koristi za proizvodnju raznih čokoladnih proizvoda. Pogača odvojena od kakao maslaca se zatim usitnjava i pretvara u kakao prah. Kakao prah je bogat izvor vlakana (26-40 %), te sadrži

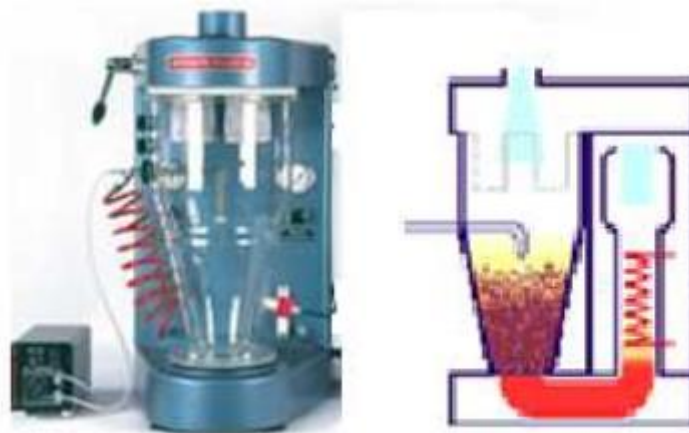
proteine (15-20 %), ugljikohidrate (oko 15 %), lipide (10-24 %), a sadrži i minerale kao što su K, Mg, Ca i vitamine kao npr. A, E, B i folnu kiselinu (Ramiro-Puig i Castell, 2009).

### **2.3. PROIZVODNJA INSTANT KAKAO NAPITAKA**

Instant kakao napitci ubrajaju se među prehrambene prahove. Općenito gledajući, prah je definiran kao kruti materijal složenog oblika koji se sastoji od velikog broja pojedinačnih čestica koje se u mnogim slučajevima međusobno razlikuju. Svojstva prehrambenih prahova mogu se klasificirati kao primarna svojstva (gustoća čestica, poroznost čestica, oblik, promjer, površinska svojstva, tvrdoća ili ljepljivost) ili sekundarna svojstva (nasipna gustoća, poroznost smjese, raspodjela veličine čestica, sadržaj vlage). Sekundarna svojstva pružaju kvantitativno poznavanje praha kao smjese. Prehrambeni prahovi čine veliku skupinu prahova koja ima vrlo malo zajedničkih osobina osim činjenice da se koriste u prehrambene svrhe (Barbosa-Canovas i sur., 2005). U prehrambenoj industriji prahovi mogu biti krajnji proizvod (npr. kava, kakao, sol) ili međuproizvodi koji se koriste za proizvodnju konačnog proizvoda (npr. jaja, žitarice, škrob i sl.) (Murrieta-Pazos i sur., 2012). Instant kakao proizvodi u prahu dobivaju se primjenom procesa sušenja. Procesom sušenja i proizvodnjom praškastih proizvoda uklanja se voda iz proizvoda s ciljem smanjenja mikrobne aktivnosti, te enzimatskih i neenzimatskih procesa u proizvodu kako bi se produžio rok trajanja samog proizvoda. Osim produženja roka trajanja, smanjuje se težina proizvoda, smanjuju se troškovi i olakšava se pakiranje, rukovanje i transport konačnog proizvoda, dok se nastoje očuvati nutritivna i senzorska svojstva (Karam i sur., 2016; Hardy i Jideani, 2017). Za proizvodnju instant kakao prahova, a u današnje vrijeme razvijeno je više metoda sušenja, kao što su sušenje u fluidiziranom sloju, sušenje u pjenu, i sušenje smrzanjem (Vadivambal i Jayas, 2007; Duan i sur., 2015). Izbor metode sušenja ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući fizikalna svojstva i primjenu proizvoda, konačnu kvalitetu proizvoda te ekonomski aspekt procesa. Primijenjena temperatura jedan je od ključnih parametara koji utječu na kvalitetu konačnog proizvoda. Primjenom viših temperatura sušenja, smanjuje se potrebno vrijeme sušenja ali će često imati negativan utjecaj na kvalitetu proizvoda, dok primjenom niže temperature održava se kvaliteta proizvoda, ali sam postupak sušenja duže traje (Langford i sur., 2018).

### 2.3.1. Aglomeracija i sušenje u fluidiziranom sloju

U ovom procesu proizvodnje instant kakaovih napitaka kombinira se proces aglomeracije i sušenja u fluidiziranom sloju. Temeljna smjesa za aglomeraciju (najčešće sastavljena od šećera i kakao praha uz dodatak stabilizatora) uvodi se u komoru za sušenje. Pri vrhu komore smještena je sapnica pomoću koje se na prah raspršuje otopina veziva (najčešće lecitina) koja u dodiru sa prahom omogućuje stvaranje poroznih nakupina čestica (aglomerata) koji se istovremeno suše u dodiru sa vrućim zrakom koji struji u komori (Benković i Bauman, 2011; Benković i sur., 2015). Jedna od izvedbi uređaja za aglomeraciju i sušenje prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Uređaj za aglomeraciju i sušenje (Benković et al., 2011)

Fizikalno – kemijska svojstva instant kakao praha proizvedenih na ovaj način ovise o procesnim varijablama kao što su karakteristike tekuće hrane (viskoznost, veličina čestica, brzini snabdijevanja), zraka za sušenje (temperatura i tlak) kao i vrsta raspršivača (Krishnaiah i sur., 2014). Ovisno o vrsti energije koja se koristi za raspršivanje, raspršivači se mogu podijeliti u četiri glavne kategorije: centrifugalni, tlačni, kinetički i ultrazvučni (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Prilikom raspršivanja stvaraju se sitne kapljice (10-200  $\mu\text{m}$ ) čime se povećava površina sušenja, te je vrijeme sušenja vrlo kratko (Santivarangkna i sur., 2007) u usporedbi sa drugim metodama, pa se mogu očuvati komponente boje i okusa (Rodriguez-Hernandez i sur., 2005), međutim, kod korištenja povišenih temperatura sušenja, može doći do gubitka hranjivih tvari osjetljivih na temperaturu kao što su vitamin C, antocijani, karotenoidi i sl. (Goula i Adamopoulos, 2006).

Problemi kod ovog načina sušenja mogu nastati zbog visokog sadržaja šećera u temeljnoj smjesi. Tehničke teškoće sušenja proizvoda bogatih šećerom povezana je s fizičkim svojstvima mješavine šećera male molekulske mase posebno saharoze, maltoze, glukoze i fruktoze koji imaju nisku temperaturu kristalizacije, te prelaze u gumene i termoplastične materijale pa stvaraju visoko higroskopne praške koji su skloni problemima ljepljivosti i protoka. Moguće posljedice uključuju smanjenu stabilnost proizvoda i smanjene prinose (zbog ljepljivosti na zidovima komore). Kako bi se prevladali problemi ljepljivosti u smjesu se dodaju pomagala za sušenje (maltodekstrin sa različitim ekvivalentima dekstroze, guma arabica, CTG (heteropolisaharid ekstrahiran iz drva indijskog oraščića), inulin, glukozni sirup i sl.) koji imaju veliku molekularnu masu i povećavaju temperaturu kristalizacije otopine. Osim kao pomagalo za sušenje, maltodekstrini i guma arabica, služe i za inkapsulaciju prilikom sušenja raspršivanjem te na taj način doprinose očuvanju nutritivnih i termolabilnih komponenti (Rodriguez-Hernandez i sur., 2005; Moreira i sur., 2009; Barbosa i Teixeira, 2017).

Unatoč navedenim problemima, ova metoda je najšire korištena u proizvodnji instant kakao prahova zbog brojnih prednosti: može se dizajnirati za sve potrebne kapacitete, brza je i efikasno, sustav upravljanja se može potpuno automatizirati te omogućava kontinuirano i istovremeno praćenje i mjerenje velikog broja procesnih varijabli, dostupan je širok raspon raspršivača, može se koristiti i za termostabilne i termolabilne proizvode, omogućuje kontrolu nad veličinom čestica te kvaliteta praha ostaje konstantna tijekom cijelog procesa proizvodnje (Silva i sur., 2011).

### **2.3.3. Sušenje u pjenu**

Sušenje u pjenu potječe još iz 1917. godine kada je Campbell patentirao svoju metodu za sušenje mlijeka u pjenu (Ratti i Kudra, 2006). Tijekom proteklih desetljeća ova relativno stara tehnologija ponovno dobiva na važnosti zbog različitih značajki kao što su brzina sušenja, dobivanje proizvoda željenih svojstava, mogućnost zadržavanja hlapljivih tvari i sl. (Ratti i Kudra, 2006; Kadam i Balasubramanian, 2011). Sušenje u pjenu je proces u kojem se tekuća ili polutekuća hrana pretvaraju u stabilnu pjenu, ugrađivanjem velikog volumena plina u smjesu uz dodatak sredstva za pjenjenje i stabilizatora pjene. Zatim se pjena rasprostire na podložak i izlaže struji vrućeg zraka pod atmosferskim tlakom, sve dok se ne osuši do željenog sadržaja vlage, nakon čega se dehidrirani produkt melje u prah. Pjenjenjem se povećava

površina izložena zraku za sušenje, te se materijal suši lakše i brže nego isti materijal koji nije upjenjen, a suši se pod istim uvjetima (Rajkumar i sur., 2007a).

Pjena se može dobiti na tri načina, propuhivanjem zraka, udaranjem i treskanjem.

Propuhivanjem se uvodi poznata količina zraka u željenu tekućinu. Podešavanjem promjera otvora upuha zraka može se kontrolirati veličina upuhanih mjehurića. Ova se metoda uglavnom ne koristi u prehrambenoj industriji (Arzhavitina i Steckel, 2010).

Metoda stvaranja pjene udaranjem je vrlo brza metoda dobivanja pjene i najkorištenija je metoda u prehrambenoj industriji. Može se provoditi u ručnim ili automatskim miješalima koji agitiraju tekućinu kako bi stvorili sučelje sa plinskom fazom. Ovom metodom se ugrađuje neograničena količina zraka u tekućinu. Volumen zraka ugrađen u pjenu raste sa povećanjem intenziteta udaranja. Prvo nastaju veći mjehurići koji se zbog mehaničkog miješanja pretvaraju u manje mjehuriće. Konačna veličina mjehurića ovisi o brzini miješanja, geometriji uređaja i reološkim svojstvima tekućine (Arzhavitina i Steckel, 2010).

Kod metode treskanjem volumen pjene ovisi o faktorima kao što su amplituda i učestalost treskanja, oblik i volumen spremnika za pjenu, sadržaj proteina i temperatura tekućine. Ova je metoda sporija od dvije prethodno spomenute metode te se stoga ne koristi u prehrambenoj industriji (Arzhavitina i Steckel, 2010).

Na karakteristike i svojstva pjene utječu sastav hrane, vrijeme miješanja, te tip i koncentracija sredstva za upjenjavanje (Rajkumar i sur., 2007a). Neke namirnice prirodno sadrže topive proteine i monogliceride te mogu proizvesti pjenu, međutim te pjene nisu dovoljno stabilne za postupak sušenja. Pjena je prirodno nestabilna zbog površinske napetosti na granici tekuće i plinovite faze. Padanje pjene tijekom sušenja dovodi do produljenja samog procesa sušenja, te se smanjuje kvaliteta proizvoda, pa je bitno da pjena ostane stabilna i zadrži tipičnu strukturu kako bi se olakšalo sušenje. Stoga je potrebno dodati sredstvo za pjenjenje i stabilizatore (Sankat i Castaigne, 2004). Sredstva za pjenjenje smanjuju površinsku napetost između tekuće i plinovite faze te na taj način pomažu stvaranju pjene. Dobra sredstva za pjenjenje trebala bi imati sljedeća svojstva:

- Brzo i učinkovito stabiliziranje pjene pri niskoj koncentraciji
- Učinkovitost u rasponu pH, koji se nalazi u raznoj hrani
- Učinkovitost u mediju s inhibitorima pjene kao što su masti, alkoholi ili razne komponente okusa (Zayas, 1997; Dehghannya i sur., 2018).

Kao sredstvo za pjenjenje koriste se proteini, gume i razni emulgatori. Proteini daju dobru topljivost i visoku stabilnost pjene kroz svoju hidrofobnost i mogućnost

konformacijskog preuređenja, čime omogućuje brzu adsorpciju na granici zraka i vode te dovodi do formiranja elastičnog adsorbiranog sloja. Najčešće korišteni proteini su proteini bjelanjka, želatina, kazein ili drugi proteini mlijeka, proteini sirutke, te proteini soje (Zayas, 1997).

Bjelanjak jajeta kao sredstvo za upjenjavanje, sastoji se od mnogih bjelančevina s različitom površinskom napetošću i spodobnosti pjenjenja. Pokazalo se da su svojstva izoliranih proteina bjelanjka bila niža od korištenog bjelanjka u cijelosti, što potvrđuje interakcije među proteinima (Lomakina i Mikova, 2006). Povećanjem koncentracije bjelanjka, smanjuje se gustoća pjene, te se ubrzava sušenje (Falade i sur., 2003). Prilikom miješanja proteini bjelanjka denaturiraju na granici tekuće i plinovite faze i ulaze u međusobne interakcije kako bi se formirao stabilan i visoko elastičan međufazni film. Vrijeme pjenjenja je znatno kraće od ostalih sredstava za pjenjenje, što podrazumijeva da se bjelančevine bjelanjka brzo apsorbiraju na sučelju plina i tekućine i brže denaturiraju od ostalih proteina (Townsend i Nakai, 1983). Međutim, upotreba komercijalno dostupnog albumina jajeta za pjenjenje predstavlja nekoliko nedostataka kao što su ograničeni pH i raznolikost ionske jakosti za odgovarajuću učinkovitost (Mleko i sur., 2007). Vrijeme miješanja ima utjecaja na čvrstoću i stabilnost pjene. Smatra se da su proteini jaja stabilni do 20 minuta miješanja, nakon čega pjena gubi stabilnost, te se povećava njena gustoća, (Thuwapanichayanan i sur., 2008). Pjena koja ne propada najmanje kroz jedan sat, stajanjem na zraku, smatra se mehanički i toplinski stabilnom za cijeli postupak sušenja (Ratti i Kudra, 2006).

Prilikom sušenja u pjeni, zbog povećane površine izložene toplom zraku, ubrzava se isparavanje, te se mogu koristiti niske temperature što ovu metodu čini jeftinijom u usporedbi sa drugim metodama. Prikladna je za sušenje svih vrsta sokova, viskozne i ljepljive hrane koja sadrži visoki sadržaj šećera (De Freitas i sur., 2018), koja se ne može sušiti raspršivanjem, te hranu koja je osjetljiva na visoke temperature (Rajkumar i sur., 2007b). Krajnji proizvodi imaju poboljšana rekonstrukcijska svojstva zbog svoje pjenaste strukture, te zadržavaju hranjive tvari koje bi se izgubile korištenjem drugog oblika sušenja (Ratti i Kudra, 2006). Iako u literaturi ne postoje brojni primjeri primjene procesa sušenja u pjeni na kakao proizvode, zbog gore navedenih prednosti procesa javlja se zanimljiva mogućnost primjene sušenja u pjeni za proizvodnju instant obogaćenih kakao prahova, što će i biti istraženo u ovom radu.

## 2.4. OBOGAĆIVANJE INSTANT KAKAO NAPITAKA

Obogaćivanje instant napitaka vitaminima i mineralima pridonosi njihovoj povećanoj opskrbi što može utjecati na smanjenje nedostatka mikronutrijenata (Renc i sur., 2016). Kakao instant napitci su, uz čaj i kavu, najčešće konzumirani topli napitci s toga predstavljaju zanimljiv aspekt obogaćivanja. Na tržištu se mogu naći razni obogaćeni kakao napitci kao što je na primjer Kraš express koji je obogaćen vitaminima (A, C, D i B skupine) i kalcijem (Kraš), te Nesquik koji je dodatno obogaćen vitaminom D, željezom i cinkom (Nestle), Lumpi cocoa obogaćen vitaminima (C, D, E, B6, B12, niacin, tiamin) i sl. S obzirom da su kakao napitci na tržištu uglavnom obogaćeni sintetičkim vitaminima i mineralima, zanimljivi bi bili proizvodi obogaćeni iz prirodnih izvora kao što su biljni ekstrakti. Obogaćivanje biljnim ekstraktima ne vrši se samo zbog njihovog pozitivnog učinka na zdravlje, već često i zbog njihove boje ili okusa (Stein i Rodriguez – Cerezo, 2008). Ekstrakt paprene metvice (*Mentha piperita* L.) predstavlja zanimljiv dodatak kakao napitku zbog svog karakterističnog mirisa i okusa, te zbog bogatog sadržaja polifenola.

## 2.5 PARENNA METVICA (*Mentha piperita* L.)

Paprena metvica (*Mentha piperita* L.) višegodišnja je biljka uzgajana u mnogim dijelovima svijeta, a posebno raste u područjima s visokim kapacitetom zadržavanja vlage. Paprena metvica sterilni je hibrid *Menthe spicata* L. i *Menthe aquatica* L. Najpoznatija je po svojim svojstvima okusa i mirisa te se njeno svježe ili osušeno lišće kao i njena esencijalna ulja često koriste u mnogim prehrambenim, kozmetičkim ili farmaceutskim proizvodima (McKay i Blumberg, 2006). Okus mente je jedan od najvažnijih i najkorištenijih okusa u svijetu, odmah nakon okusa vanilije i citrusa (Arslan i sur., 2010). Karakterističan okus hlađenja i miris mente potječe od mentola, mentona i izomentona (Kamatou i sur., 2013). Esencijalna ulja paprene metvice sadrže oko 28-42 % mentola, te 18-28 % mentona (Isan i sur., 2002).

Kemijske komponente paprene metvice i ulja razlikuju se ovisno o vegetacijskoj zrelosti, raznolikosti, geografskoj regiji i uvjetima obrade (McKay i Blumberg, 2006). Smatra se da infuzija paprene metvice sadrži 750 mg L<sup>-1</sup> fenolnih spojeva (Duband i sur., 1992), pa konzumacija dvije šalice čaja može osigurati 375 mg fenola. Od ukupnih polifenola mente, 53% čine flavonoidi, 42 % fenolne kiseline, dok lignani i stilbeni čine 2,5 % (Riachi i De Maria, 2015).



Osim polifenola suho lišće paprene metvice sadrži i razne minerale, kao na primjer sadrži: Ca ( $15,3 \text{ g kg}^{-1}$ ), Mg ( $5,8 \text{ g kg}^{-1}$ ), Fe ( $239 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $188 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $51 \text{ g kg}^{-1}$ ), Cu ( $12 \text{ g kg}^{-1}$ ), Cr ( $941 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), I ( $325 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), te Se ( $147 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ). Koncentracije tih minerala pronađene u infuziji suhog lišće pripremljene na  $95^{\circ}\text{C}$  kroz 15 min, bile su 8 – 60% koncentracije suhog lišća, pa su iznosile: Ca ( $2,9 \text{ g kg}^{-1}$ ), Mg ( $2,2 \text{ g kg}^{-1}$ ), Fe ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $27 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Cu ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Cr ( $390 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), I ( $206 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), Se ( $87 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Lozak i sur., 2002).

*In vitro* studije pokazuju da paprena metvica ima značajna antibakterijska (Acs i sur., 2018) i antivirusna svojstva, jaka antioksidacijska (Dragland i sur., 2003) i protu-upalna djelovanja (Zaia i sur., 2016), te antialergijski potencijal. Studije na životinjskim modelima pokazuju da ima opuštajući učinak na gastrointestinalni sustav, te da može djelovati kao analgetik i anestetik. Zabilježeno je povoljno djelovanje na gastrointestinalni i respiratorni sustav čovjeka, međutim nedostaju klinička ispitivanja, te su istraživanja ograničena (McKay i Blumberg, 2006; Fadavi i Beglaryan, 2013).

Kao što je već navedeno u uvodnom djelu, cilj ovog rada je razviti i optimirati proces sušenja u pjenu za proizvodnju funkcionalnog praškastog kakao napitaka obogaćenog ekstraktom paprene metvice (*Mentha piperita* L.) kako bi se dobio proizvod sa što boljim fizikalnim, kemijskim i senzorskim svojstva.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom djelu ovog diplomskog rada korišteni su slijedeći materijali:

Kakao prah ( $d(0,5)=13,32 \mu\text{m}$ ) (Kraš d.d., Zagreb, Hrvatska)

Želatina (Podravka, Koprivnica, Hrvatska)

Šećer ( $d(0,5)=847,20 \mu\text{m}$ ) (Kraš d.d., Zagreb, Hrvatska)

Bjelanjak (Elcon prehrambeni proizvodi d.o.o., Zlatar Bistrica, Hrvatska)

Sojin lecitin (dm drogerie market, Karlsruhe, Njemačka)

Sušeni listići mente (*Mentha piperita* L.) iz Osječko- Baranjske županije; berba 2015 (Suban, Strmec samoborski, Hrvatska)

Svježe mlijeko, 3,2% m.m. (Vindija d.d., Varaždin, Hrvatska)

#### 3.1.1. Reagensi i otapala

Od reagensa i otapala korišteni su:

Destilirana voda

Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), p.a. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)

Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)

Galna kiselina, 98 % (AcrosOrganics, New Jersey, SAD)

Trolox (Fluka, Buchs, Švicarska)

Aceton, 99,9 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.2. Aparatura i pribor

##### Aparatura:

Uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Staufen, Njemačka)

UNI-T UT33C digitalni multimetar, UNI Trend, DongGuan, Kina)

Analitička vaga Sartorius TE214-S0CE, (Sartorius, Goettingen, Njemačka)

pH metar Jenco 601A (Jenco, San Diego, SAD)

Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Zagreb, Hrvatska)

Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)  
Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija)  
Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)  
Uređaj za miješanje Philips HR7628 (Philips, Amsterdam, Nizozemska)  
IKA Tube Mill (IKA, Staufen, Njemačka)  
TA.HD Plus Texture Analyser sa Powder Flow Analyserom (Stable Micro Systems, Surrey, Velika Britanija)  
Centrifuga D-78532 (Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)  
Sustav za vakuum filtraciju Rocker 300-LF30(Rocker Scientific Co., Ltd., New Taipei City, Tajvan)

**Pribor:**

Limeni pladanj dimenzija 21 x 25 cm  
Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL, i 500 mL  
Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL  
Menzura volumena 100 mL  
Boca sisaljka  
Filter papir od celuloze (veličina pora 5-13  $\mu\text{m}$ ) (LLG Labware Meckenheim, Njemačka)  
Stalak za epruvete  
Staklene epruvete  
Stakleni cilindar volumena 200 mL  
Aluminijske posudice s poklopcem  
Metalna špatulica  
Pinceta  
Plastične falkon kivete  
Stakleni štapić  
Pipete volumena 5 mL i 10 mL  
Mikropipete volumena 100  $\mu\text{L}$  i 500  $\mu\text{L}$   
Kiveta od kvarcnog stakla (Hellma Analytics, Müllheim, Njemačka)

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Priprema temeljne kakao smjese**

Kakao smjesa korištena u ovom radu sastoji se od 30 % kakao praha ( $d(0,5)=13,32 \mu\text{m}$ ) (Kraš, Zagreb, Hrvatska), te 70 % šećera ( $d(0,5)=847,20 \mu\text{m}$ ) (Kraš, Zagreb, Hrvatska). U ukupnu smjesu dodaje se 1 % (w/w) sojinog lecitina (dm drogerie market, Karlsruhe, Njemačka).

### **3.2.2. Priprema ekstrakta mente**

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata bazira se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010).

Za pripremu ekstrakta korišten je osušen biljni materijal (*Mentha piperita* L.) (proizvođač Suban d.o.o., Strmec samoborski, Zagreb, berba 2015. godine) koji je prethodno izmljeven i prosijan na veličinu čestica  $<100 \mu\text{m}$ . Uvjeti ekstrakcije odabrani su temeljen prethodno provedenog eksperimenta optimiranja, čiji rezultati nisu prikazani u ovom radu.

Izvaže se 4 g mljevenog uzorka mente i prelije s 200 mL destilirane vode prethodno temperirane na  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Čaša s uzorkom stavi se u uljnu kupelji na  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , s brzinom miješanja magnetskog miješala 500 rpm te se ekstrakcija provodi 90 minuta. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira kroz filter papir veličine pora 5-13  $\mu\text{m}$  (LLG Labware, Meckenheim, Njemačka) uz pomoć sustava za vakuum filtraciju Rocker 300-LF30 (Rocker Scientific Co., Ltd., New Taipei City, Tajvan). Dobivenom ekstraktu određene su sljedeće fizikalne karakteristike:  $\text{pH} = 5,8$ ; vodljivost =  $1265 \mu\text{S cm}^{-1}$  i TDS (ukupne otopljene tvari) =  $606 \text{ mg L}^{-1}$ . Tako pripremljeni ekstrakt dalje se koristi u proizvodnji obogaćenih mješavina.

### **3.2.3. Priprema mješavina za sušenje u pjenu**

Za pripremu pjena korišten je Box-Behnken dizajn eksperimenta upotrebom softverskog paketa Statistica v.10.0 (StatSoft, Tulsa, SAD). Dizajn eksperimenta prikazan je u tablici 1.

**Tablica 1.** Dizajn eksperimenta za proizvodnju obogaćenih kakao mješavina sušenih u pjenu

Oznaka uzorka	m (g) (bjelanjka)	% ekstrakta	Vrijeme mješanja (min)
1	80	2,5	6
2	60	2,5	4
3	60	5,0	6
4	80	0,0	4
5	40	2,5	6
6	40	0,0	4
7	40	5,0	4
8	60	0,0	6
9	80	2,5	2
10	60	2,5	4
11	60	0,0	2
12	40	2,5	2
13	60	5,0	2
14	60	2,5	4
15	80	5,0	4

Odgovarajuća masa bjelanjka s odgovarajućim postotkom ekstrakta izmiješa se u uređaju za miješanje Philips HR7628 (Philips, Amsterdam, Nizozemska) kako bi se dobila pjena od bjelanjaka u koju se zatim ručno umiješa 50 g kakao smijese i 0,5 % (w/w) želatine. Dobivena se smjesa ravnomjerno rasporedi u limene pladnjeve dimenzija 21 x 25 cm te stavi u laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Zagreb, Hrvatska) na 50 °C, preko noći. Nakon sušenja, uzorci se samelju koristeći IKA Tube Mill (IKA, Staufen, Njemačka), čime se dobije praškasti proizvod koji se koristi za daljnja mjerenja i analize. Dobiveni praškasti proizvod pakira se u HDPE vrećice i skladišti pri 6 °C u hladnjaku do daljnjih analiza.

### ***3.2.3.1. Gustoća i stabilnost pjene***

Od tako pripremljene pjene uzima se 10 mL u prethodno izvaganu Falcon kivetu od 50 mL za određivanje gustoće (na analitičkoj vagi izvaže se kiveta sa uzorkom) i stabilnosti pjene (uzorak se ostavlja da stoji 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se očitava volumen). Stabilnost pjene izračunava se kao omjer volumena pjene nakon 2 sata stajanja i početnog volumena.

### 3.2.4. Fizikalna svojstva mentom obogaćenih kakao napitaka sušenih u pjenu

#### 3.2.4.1. Raspodjela veličine čestica

Raspodjela veličine čestica određivana je metodom laserske difrakcije. Analiza veličine čestica laserskom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice tokom prolaza kroz izvor svjetlosti raspršuju svjetlost pod određenim kutom koji ovise o samoj veličini čestica. Čestice većeg promjera raspršuju svjetlo pod manjim kutom i većim intenzitetom u odnosu na čestice manjeg promjera koje raspršuju svjetlo pod većim kutom i slabijim intenzitetom.

Za mjerenje raspodjele veličine čestica korišten je uređaj Mastersizer 2000 sa jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Royston, Velika Britanija). Mjerenja su provedena pri tlaku od 1 bar i stupnju snabdijevanja ćelije uzorkom od 65 %. Rezultati su prikazani pomoću sljedećih parametara raspodjele veličine čestica:

- $d(0,5)$  (mass median diameter) predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima veći, odnosno manji promjer od tog promjera.
- $d(0,1)$  veličina čestica od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka
- $d(0,9)$  veličina čestica od koje je manje 90 % cijelog uzorka
- $D [4,3]$  (volume weighted mean)
- $D [3,2]$  (surface weighted mean) ili Sauterov promjer

#### 3.2.4.2. Nasipna gustoća

U ovom diplomskom radu mjerena je vibracijska nasipna gustoća određena kao omjer mase uzorka u cilindru i volumena koji uzorak zauzima na samom početku mjerenja, nakon 10 udaraca, te nakon 100 udaraca. Uređaj za određivanje vibracijske nasipne gustoće prikazan je na slici 2.

U prethodno izvagani plastični cilindar volumena 250 mL usipa se praškasti uzorak, te mu se odredi masa i volumen na samom početku mjerenja, te nakon 10 i 100 udaraca.

Nasipnu gustoću izračunamo pomoću slijedeće formule:

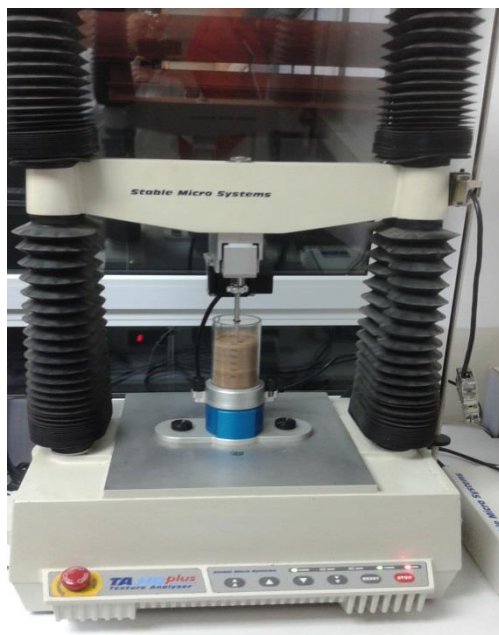
$$\text{Nasipna gustoća (g/cm}^3\text{)} = \frac{m \text{ uzorka (g)}}{V \text{ uzorka (cm}^3\text{)}} \quad [1]$$



**Slika 2.** Uređaj za određivanje vibracijske nasipne gustoće (Vlastita fotografija)

#### ***3.2.4.3. Određivanje značajki tečenja***

Značajke tečenja naših uzoraka određene su Powder Flow Analyser-om (Stable Micro Systems, Surrey, Velika Britanija) (slika 3).



**Slika 3.** Powder Flow Analyser (Stable Micro Systems) (Vlastita fotografija)

Za svaki uzorak provedena su dva testa: test kohezivnosti i test stvaranja čvrstog kolača (caking). Svaki test daje kvantitativne podatke o protoku praha na temelju različitih načina kontrole tečenja. Prije početka mjerenja, uzorkom se napuni, prethodno izvagani, stakleni cilindar do volumena 160 mL, te se odredi masa uzorka u cilindru.

### **Test kohezivnosti**

Kohezivnost je sklonost čestica praškastog materijala da prijanjaju jedna uz drugu i nakupljaju se u veće čestice (aglomerate). Test počinje sa dva ciklusa kondicioniranja uzorka, nakon čega se oštrica spušta kroz kolonu uzrokujući što manje sabijanje. Kada se oštrica počinje kretati prema gore kroz uzorak, brzinom od  $50 \text{ mm s}^{-1}$ , bilježi se sila kojom prah djeluje na bazu posude. Kohezivniji prahovi će se prilijepiti uz oštricu čime će se smanjiti sila koja djeluje na bazu posude. Koeficijent kohezije se na grafu prikazuje kao površina ispod negativnog djela krivulje. Indeks kohezije računa se kao omjer koeficijenta kohezije i mase uzorka.

S obzirom na indeks kohezije, praškaste proizvode možemo podijeliti na: izrazito kohezivne, vrlo kohezivne, kohezivne, te prahove koji lako teku i koji slobodno teku (tablica 2) (Benković, i sur., 2013).



**Tablica 2.** Podjela praškastih proizvoda s obzirom na indeks kohezije

Indeks kohezije	Svojstva tečenja prahova
>19	Izrazito kohezivan
16-19	Vrlo kohezivan
14-16	Kohezivan
11-14	Lako teče
<11	Slobodno teče

### **Test stvaranja čvrstog kolača (caking)**

Stvaranje čvrstog kolača je fenomen kojim se praškasti proizvodi pretvaraju u ljepljivi materijal što često rezultira gubitkom funkcionalnosti i smanjenjem kvalitete (Aguilera i sur., 1995). U rijetkim slučajevima je sposobnost stvaranja kolača pozitivna pojava, kao na primjer kod tabletiranja, gdje je kohezivnost poželjna osobina čestica (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Mnogi praškasti proizvodi imaju problema sa stvaranjem kolača te se smatra da je 25% zastoja na linijama za pakiranje, uzrokovano upravo zbog stvaranja kolača u proizvodu (Griffith, 1991). Na stvaranje kolača utječu sastav materijala, veličina i oblik čestica, sadržaj vlage, varijacije tlaka i temperature prilikom proizvodnje i skladištenja (Chen i Chou, 1993). Test stvaranja čvrstog kolača počinje sa dva ciklusa kondicioniranja uzorka, nakon čega se oštrica spušta na vrh stupca uzorka, ravna uzorak i mjeri mu visinu. Nakon mjerenja visine, oštrica sabija uzorak brzinom od  $20 \text{ mm s}^{-1}$ , do sile od 7,355 N. Kada se postigne odgovarajuća sila, oštrica se diže i ciklus se ponavlja još četiri puta. Uređaj mjeri i bilježi promjene u visini stupca i visine nastalog kolača prilikom sabijanja uzorka. U konačnici se mogu izračunati omjer visine stupca, omjer visine kolača, te čvrstoća nastalog kolača. Ukoliko se omjer visine kolača ne mijenja tijekom mjerenja, prah nema ili pokazuje vrlo malu sklonost stvaranju kolača. Ukoliko je zabilježen veliki rast omjera visine kolača, znači da prah ima veliku tendenciju za stvaranje kolača. Rezultati su prikazani kao srednja čvrstoća kolača (N).

#### **3.2.4.4. Sadržaj vlage**

Povećan sadržaj vlage povezan je sa povećanom kohezivnosti prahova, slabijom protočnoscima, rehidracijom i disperzibilnosti proizvoda, može doći do povećanja oksidacije lipida, gubitka okusa i organoleptičkih svojstava, skraćenim rokom trajanja, te lakšim

stvaranjem čvrstog kolača (Barbosa-Canovas i sur., 2005) Sadržaj vlage određen je prema standardiziranoj AOAC gravimetrijskoj metodi (AOAC, 1995).

Na prethodno izvaganu suhu metalnu posudicu, uz pomoć analitičke vage (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka) izvaže se 3 g uzorka praha. Zabilježi se masa prazne posudice i posudice sa uzorkom. Otklopljene posudice sa uzorkom i poklopci stave se u laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska) na 105 °C kroz 3 sata. Nakon sušenja, posudice se zaklope poklopcem i stave u eksikator (kako bi se spriječilo da uzorak apsorbira vlagu iz zraka) na hlađenje do sobne temperature. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu posudice sa uzorkom se ponovno izvažu i zabilježi se masa.

Sadržaj vlage, izražen u postocima, izračunava se po formuli:

$$\%vlage = \frac{(a-b) \cdot 100}{m} \quad [2]$$

Gdje su:

*a*- masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

*b*- masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

*m*- masa uzorka (g)

#### **3.2.4.5. Disperzibilnost**

Disperzibilnost praha je vrijeme, izraženo u sekundama, koje je potrebno da se određena količina praha dispergira u određenoj količini tekućine na određenoj temperaturi.

Destiliranu vodu zagrije se na 24 °C. U zagrijanu vodu ubaci se 5 g praha i istovremeno počinje sa miješanjem i mjerenjem vremena potrebnog dok se sve grudice ne dispergiraju.

Disperzibilnost je izražena kao sekunde potrebne da se cijela količina praha rasprši vodi.

#### **3.2.4.6. Topljivost**

Indeks topljivosti je sposobnost praha da se otopi u vodi i izražava se kao volumen sedimenta u mL. Topljivost u vodi uglavnom ovisi o kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima praha (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

U epruvetu izvaže se 1 g uzorka koji se prelije sa 5 mL prethodno zagrijane destilirane vode na 20 °C. Smjesa se dobro promiješa oko 90 sekundi te ostavi mirovati kroz 15 min. Nakon

15 minuta, uzorak se promiješa te centrifugira (Hettich zentrifugen, D-78532, Tuttlingen, Njemačka) 5 minuta pri  $600 \text{ min}^{-1}$ . Pažljivo se ukloni supernatant, te doda 5 mL destilirane vode zagrijane na  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzorak se promiješamo uz pomoć vorteksa (BiosanVortex V1 Pus, Riga, Latvija) i još jedanput centrifugira kroz 5 minuta. Nakon drugog centrifugiranja odredi se volumen sedimenta (mL) što predstavlja indeks topljivosti.

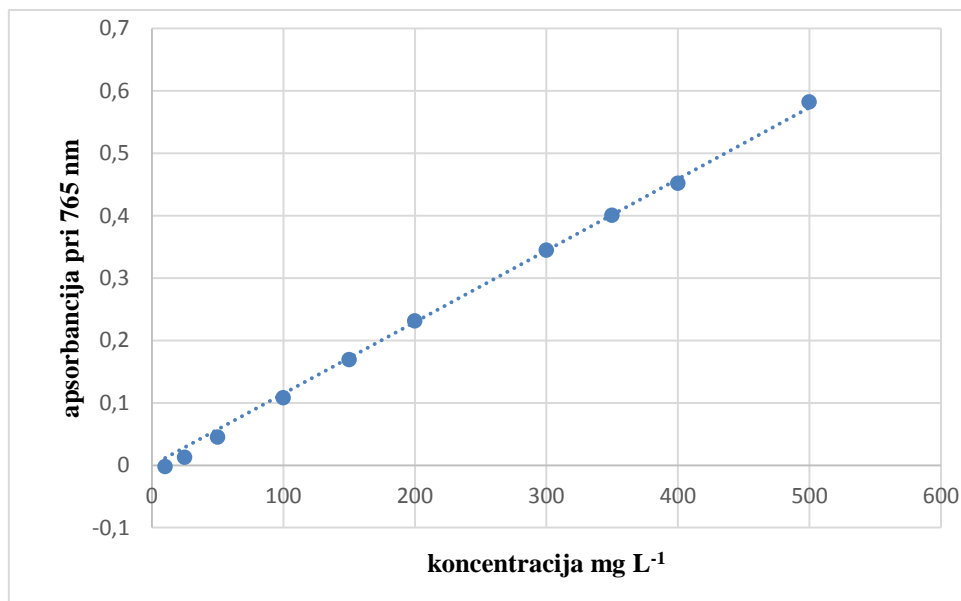
### **3.2.5. Kemijska svojstva mentom obogaćenih kakao napitaka sušenih u pjenu**

#### ***3.2.5.1. Priprema ekstrakta obogaćenih kakao prahova***

1 g uzorka prelije se sa 12,5 mL acetona (70 %, v/v) te stavi u uljnu kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka) na temperaturu od  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 30 min uz miješanje od  $150 \text{ min}^{-1}$ . Nakon 30 minuta uzorci se profiltriraju kroz filter papir veličine pora 5-13  $\mu\text{m}$  uz pomoć sustava za vakuum filtraciju Rocker 300-LF 30 (Rocker Scientific Co., Ltd., New Taipei City, Tajvan) i dobiveni se ekstrakt ostavi na zraku kako bi ispario aceton. Nakon isparavanja acetona ekstraktu se odredi masa, te nadopuni destiliranom vodom do ukupnog volumena od 10 mL. Ovako pripremljen ekstrakt koristi se za daljnje kemijske analize.

#### ***3.2.5.2. Određivanje ukupnih polifenola***

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolidben kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a FC reagens reducira, te dolazi do promjene boje iz žute (FC reagens) u plavo obojeni volframov i molidbenov oksid. U staklenu epruvetu otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu\text{L}$  uzorka, 500  $\mu\text{L}$  FC reagens, te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata čime počinje reakcija. Slijepa proba, pripremi se na jednak način, ali se umjesto uzorka doda 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Uzorci se otave stajati na sobnoj temperaturi kroz 2 sata, nakon čega se mjeri apsorbancija uz pomoć spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Engleska) na valnoj duljini od 765 nm. Za svaki se uzorak pripremaju dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (slika 4) ( $0\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ ), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline  $\text{GAE L}^{-1}$ .



Slika 4. Baždarni pravac galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y=0,00115x \quad [3]$$

$$R^2=0,9992$$

Gdje je:  $y$ =apsorbancija pri 765 nm

$x$ = koncentracija galne kiseline mg L<sup>-1</sup>

### 3.2.5.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

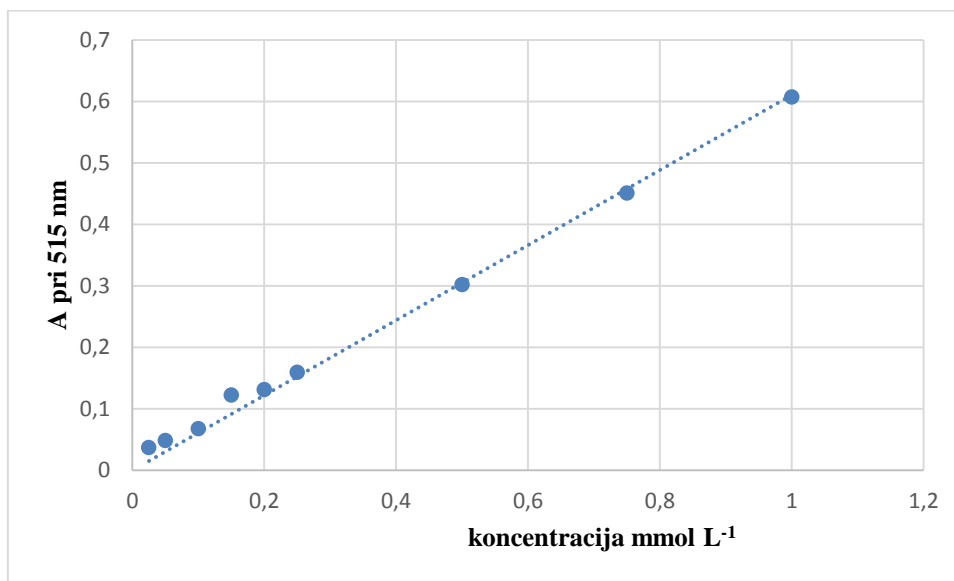
DPPH metoda temelji se na redukciji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala u metanolnoj otopini uz djelovanje antioksidansa, pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste (oksidirani oblik DPPH) u žutu (reducirani oblik DPPH) (Brand-Williams i sur., 1995).

Pripremi se 0,094 mM otopinu DPPH u metanolu (HPLC grade). U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μL uzorka te doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Uz pomoć vorteksa (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija) otopine se dobro homogeniziraju i ostave stajati kroz 30 minuta u mraku. Obavezno treba pripremiti i slijepu probu koja umjesto uzorka sadrži 100 μL metanola (HPLC grade). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele te se u konačnici uzima srednja vrijednost.

Nakon odgovarajućeg vremena mjeri se apsorbanca na spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) pri 515 nm. Dobivena apsorbanca uzorka (srednju vrijednost

dvije probe) oduzima se od asorbancije slijepe probe te se rezultat preračuna prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije ( $\text{mmol L}^{-1}$  Trolox ekvivalenta) i izražava se kao molarni ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) ili maseni udio ( $\mu\text{g g}^{-1}$  uzorka) ekvivalenta Trolox-a. Baždarni pravac za Trolox prikazan je na slici 5.

Baždarni pravac dobiven je mjerenjem apsorbanci poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda.



**Slika 5.** Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y=0,6100x$$

[4]

$$R^2=0,9974$$

Gdje je:  $y$  = razlika asorbancije uzorka i slijepe probe pri 515 nm

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

### 3.2.6. Senzorska analiza

#### 3.2.6.1. Priprema uzorka za senzorsku analizu

Za senzorsku analizu nastoje se simulirati „kućne uvjete”, odnosno pripremiti napitak na način na koji bi potrošači konzumirali proizvod. 3,65 g uzorka prelije se s 100 mL kipućeg mlijeka s 3,2% mliječne masti (Vindija d.d., Varaždin, Hrvatska) te miješa nekoliko minuta. Tako pripremljeni napitci preliju se u čašice za kušanje.

### 3.2.6.2. Provođenje senzorske analize

Senzorska analiza provodi se uz pomoć panel skupine metodom deskriptivne analize. Prilikom ocjenjivanja, kušači koriste isključivo osjetila njuha, vida, mirisa i okusa. Kod uzoraka obogaćenih kakao napitaka ocjenjivala su se sljedeća svojstva: izgled, boja, miris, slatkoća, naknadni okus i biljni okus. Ocjene su bile od 1-9, s time da 1 znači uopće mi se ne sviđa, dok 9 znači jako mi se sviđa.

Jedino kod osobine „biljni okus” skala ocjenjivanja bila je obrnuta, odnosno 1 znači jaki biljni okus, dok 9 znači da biljni okus uopće nije izražen.

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je u programskom sustavu Statistica u kojem je i napravljen Box-Benhen dizajn eksperimenta sa 3 faktora na 3 razine. Podaci su analizirani primjenom analize varijance (ANOVA) sa razinom značajnosti  $p < 0,05$ .

Također su razvijeni i predikcijski modeli prema sljedećoj jednažbi:

$$Y_{pred} = O + (L_1 \cdot masa\ bjelanjka) + (Q_1 \cdot masa\ bjelanjka^2) + (L_2 \cdot (\% ekstrakta)) + (Q_2 \cdot (\% ekstrakta)^2) + (L_3 \cdot (vrijeme\ miješanja)) + Q_3 \cdot (vrijeme\ miješanja)^2 \quad [5]$$

Gdje je  $Y_{pred}$  predviđena vrijednost promatranog parametra  $Y$ .  $O$  je odsječak na oordinati dobiven modelom,  $Q_n$  kvadratni regresijski koeficijent, a  $L_n$  linearni regresijski koeficijent. Budući da je analiza eksperimenata uključivala i metodu odzivnih površina, predikcijski modeli osim linearnih regresijskih koeficijenata ( $L$ ) uključuju i kvadratne regresijske koeficijente ( $Q$ ).

Nadalje, kako bi se utvrdili optimalni uvjeti procesa, dobiveni rezultati podijeljeni su u 5 zasebnih grupa te je optimiranje provedeno sa svakom grupom svojstava zasebno. Grupa su obuhvaćale sljedeća svojstva:

- svojstva pjene: gustoća i stabilnost pjene
- fizikalna svojstva prahova: parametri raspodjele veličine čestica, nasipne gustoće, vlage i svojstava tečenja
- rekonstitucijska svojstva: topljivost i disperzibilnost
- kemijska svojstva: sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet
- senzorska svojstva.

Optimiranje je također provedeno u programskom sustavu Statistica.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Sušenje u pjenu je proces u kojem se miješanjem inkorporiraju veće količine zraka u tekuću ili polutekuću hranu uz prisustvo sredstva za pjenjenje, te se tako dobivena pjena naknadno suši (Abbasi i Azizpour, 2015). U ovom radu proces sušenja u pjenu korišten je za razvoj funkcionalnih kakao mješavina obogaćenih ekstraktom mente. U tu je svrhu proveden Box-Behnken dizajn eksperimenta pri čemu su kao nezavisne varijable korišteni sadržaj bjelanjka (40, 60 i 80 g) kao sredstava za pjenjenje, sadržaj ekstrakta (0, 2,5 i 5 %) te vrijeme miješanja (2, 4 i 6 min). Prema dizajnu eksperimenta, proizvedeno je 15 uzoraka obogaćenih kakao mješavina kojima su analizirana fizikalna, kemijska i senzorska svojstva, te su rezultati analizirani primjenom analize varijance (ANOVA) sa razinom značajnosti  $p < 0,05$ .

U ovom poglavlju prikazani su rezultati analiza fizikalnih, kemijskih i senzorskih svojstava kakao mješavina obogaćenih ekstraktom mente te statistička obrada eksperimentalnih podataka. Rezultati su prikazani u šest potpoglavlja: svojstva pjene, fizikalna svojstva kakao mješavina, kemijska svojstva kakao mješavina, senzorska svojstva kakao mješavina i statistička obrada mjerenih podataka, te optimiranje uvjeta procesa.

### **4.1. SVOJSTVA PJENE**

Prilikom procesa proizvodnje, kako bi se pjena što bolje osušila, bitan parametar na koji treba obratiti pozornost jest stabilnost pjene. Stabilnost pjene je sposobnost pjene da u svojoj strukturi zadrži plinsku fazu kroz određeno vremensko razdoblje (Narsimhan i Xiang, 2018). Ukoliko je stabilnost pjene loša, produljuje se vrijeme sušenja (što dovodi do većih troškova procesa) i smanjuje se kvaliteta konačnog proizvoda (Abbasi i Azizpour, 2015). Rezultati stabilnosti i gustoće pjene prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Stabilnost i gustoća pjene prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

Uzorak	stabilnost pjene (%)	gustoća pjene (g mL <sup>-1</sup> )
1	96,000 $\pm$ 0,707	0,646 $\pm$ 0,009
2	100,000 $\pm$ 0,000	0,698 $\pm$ 0,005
3	95,000 $\pm$ 7,071	0,616 $\pm$ 0,035
4	90,830 $\pm$ 1,174	0,578 $\pm$ 0,090
5	93,665 $\pm$ 0,474	0,841 $\pm$ 0,009
6	100,000 $\pm$ 0,000	0,898 $\pm$ 0,066
7	93,428 $\pm$ 0,808	0,741 $\pm$ 0,160
8	100,000 $\pm$ 0,000	0,688 $\pm$ 0,061
9	95,000 $\pm$ 7,071	0,551 $\pm$ 0,012
10	100,000 $\pm$ 0,000	0,695 $\pm$ 0,011
11	86,665 $\pm$ 4,716	0,636 $\pm$ 0,146
12	98,571 $\pm$ 2,021	0,944 $\pm$ 0,106
13	94,665 $\pm$ 1,888	0,520 $\pm$ 0,014
14	90,830 $\pm$ 1,174	0,616 $\pm$ 0,015
15	93,665 $\pm$ 0,474	0,558 $\pm$ 0,043

Najnižu stabilnost pokazao je uzorak broj 11 (60 g bjelanjka, 0 % ekstrakta i 2 minute miješanja) čija je stabilnost pjene 86,665 %, dok uzorak broj 8 (60 g bjelanjka, 0 % ekstrakta, 6 minuta miješanja) koji je jednakog sastava, ali različitog vremena miješanja ima odličnu stabilnost pjene od 100 %. Uzorak 14 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta, 4 minute miješanja) pokazuje nešto bolju stabilnost pjene koja iznosi 90,83 %, dok uzorci 2 i 10 (identičnog sastava i vremena miješanja kao i uzorak 14) pokazuju odličnu stabilnost pjene od 100 %. Uzorak broj 7 (40 g bjelanjka, 5 % ekstrakta i 4 minute miješanja) ima stabilnost pjene od 93,428% što je nešto manja od uzoraka 5 (40 g bjelanjka, 2,5 % ekstrakta i 6 minuta miješanja) i 15 (80 g bjelanjka, 5 % ekstrakta i 4 minute miješanja) čije su stabilnosti pjene od 93,665 %. Uzorak broj 13 (60 g bjelanjka, 5 % ekstrakta i 2 minute miješanja) ima stabilnost pjene od 94,665 % što je približno slično uzorku 3 (60 g bjelanjka, 5 % ekstrakta i 6 minuta miješanja) koji je jednakog sastava kao i uzorak 13, a ima stabilnost pjene od 95 %, kao i uzorak broj 9 (80 g bjelanjka, 2,5 % ekstrakta i 2 minute miješanja). Uzorak broj 1 (80 g bjelanjka, 2,5 % ekstrakta i 6 minuta miješanja) ima jednak sastav kao i uzorak 9 međutim ima duže vrijeme miješanja, od 6 minuta i pokazuje malo bolju stabilnost pjene koja iznosi 96 %. Uzorak broj 12 (40 g bjelanjka, 2,5 % ekstrakta i 2 minute miješanja) ima stabilnost pjene od 98,571 %. U radu autora Rajkumar i suradnika, među ostalim, potvrđeno je da povećanje razine albumina jaja u smjesi povećava se stabilnost pjene, te se stabilnost pjene povećala za 24 % kada je povećana količina bjelanjka sa 5 na 10 % (Rajkumar i sur., 2007a).



S obzirom da se u gotovo svim uzorcima ispitanih u ovom radu stabilnost pjene kretala od 90-100 % možemo potvrditi da se u svim uzorcima nalazi dovoljna količina bjelanjka, te se potvrđuje prikladnost korištenje bjelanjka kao sredstva za upjenjavanje.

Najmanju gustoću pjene ima uzorak broj 13 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta i 2 minute miješanja) koja iznosi  $0,520 \text{ g mL}^{-1}$ . Uzorci 4 (80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), 9 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 15 (80 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) imaju istu količinu bjelanjka (80 g) i približno sličnu gustoću koja se kreće od  $0,551$  do  $0,578 \text{ g mL}^{-1}$ . Nešto višu gustoću pjene koja se kreće od  $0,616 \text{ g mL}^{-1}$  do  $0,636 \text{ g mL}^{-1}$  imaju uzorci 3 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), 11 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 14 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) koji sadrže različit postotak ekstrakta, ali jednaku masu bjelanjka od 60 g. Uzorci 10 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), 8 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 2 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) također imaju 60 g bjelanjka i približno slične vrijednosti gustoće pjene koja se kreće od  $0,688 \text{ g mL}^{-1}$  do  $0,698 \text{ g mL}^{-1}$ , dok se gustoća pjene u uzorcima 5 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) koji sadrže 40 g bjelanjka kreće od  $0,741$  -  $0,841 \text{ g mL}^{-1}$ . Najveću gustoću imaju uzorci 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta)  $0,898 \text{ g mL}^{-1}$  i uzorak broj 12 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) čija gustoća pjene iznosi  $0,944 \text{ g mL}^{-1}$ . Prema navedenim rezultatima primjećuje se da smanjenjem mase bjelanjka dolazi do povećanja gustoće pjene. Razlog tome možemo pripisati samom sastavu pjene bjelanjka i vremenu miješanja, odnosno, što je masa sredstva za upjenjavanje veća, to će se prilikom miješanja u pjenu inkorporirati više zraka, odnosno pore u pjenu će biti veće i samim time će njena gustoća biti manja (Shaari i sur., 2018). Isti trend se primjećuje u radu autora Sankat i Castaigne (2004) prilikom korištenja sojinih proteina kao sredstvo upjenjavanja u koncentraciji od 2,5 %, 5 %, 7,5 % i 10 %. Najveća gustoća pjene bila je pri koncentraciji od 2,5 %, dok je najmanja gustoća pjene bila pri koncentraciji od 10 %.

## 4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA

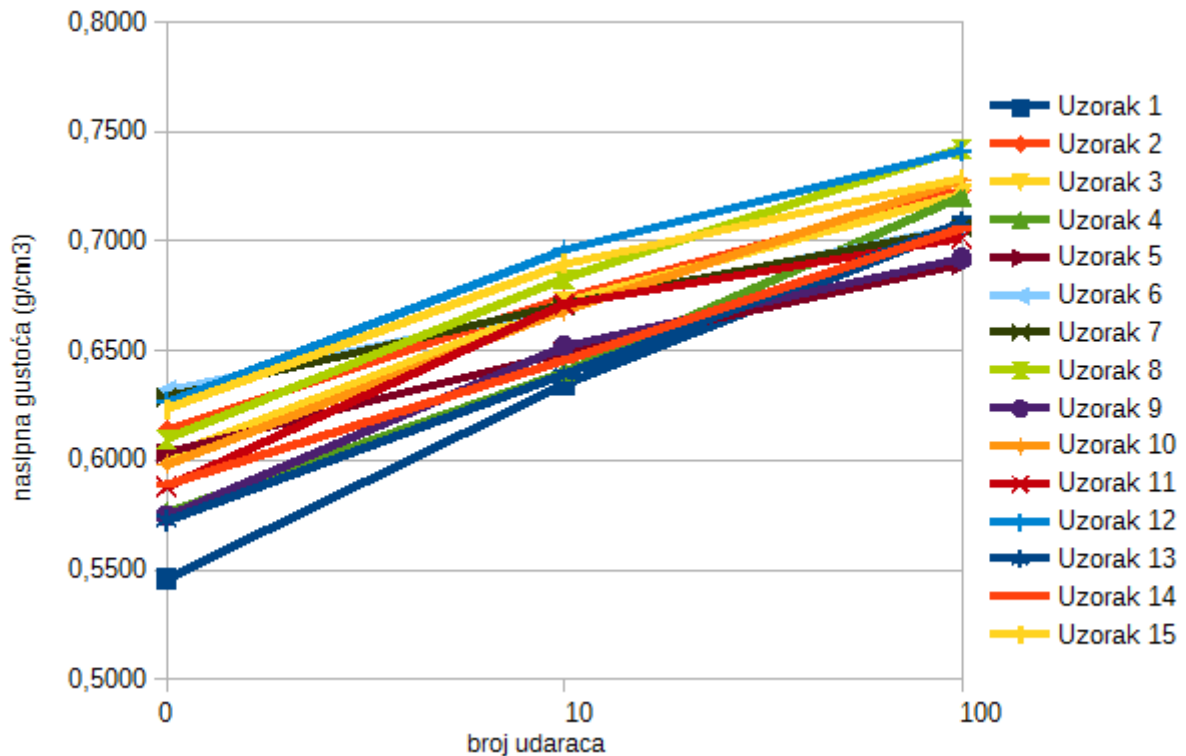
### 4.2.1. Raspodjela veličine čestica

Tablica 4. Parametri raspodjele veličine čestica prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

uzorci	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	D[3,2]	D[4,3]
1	26,62 $\pm$ 1,56	161,14 $\pm$ 9,41	396,03 $\pm$ 23,82	58,42 $\pm$ 2,81	189,79 $\pm$ 11,34
2	29,65 $\pm$ 0,37	192,43 $\pm$ 3,66	506,56 $\pm$ 13,18	65,05 $\pm$ 0,84	235,39 $\pm$ 5,31
3	28,96 $\pm$ 1,30	183,92 $\pm$ 6,21	463,43 $\pm$ 18,29	63,34 $\pm$ 2,70	219,20 $\pm$ 8,34
4	29,63 $\pm$ 0,45	175,35 $\pm$ 2,06	431,16 $\pm$ 9,27	62,98 $\pm$ 1,16	206,77 $\pm$ 3,57
5	52,95 $\pm$ 8,81	266,53 $\pm$ 42,59	657,94 $\pm$ 44,94	111,71 $\pm$ 15,60	313,95 $\pm$ 33,40
6	61,11 $\pm$ 9,93	296,35 $\pm$ 53,81	708,27 $\pm$ 69,15	119,11 $\pm$ 16,42	342,32 $\pm$ 44,99
7	53,08 $\pm$ 4,82	263,25 $\pm$ 26,58	671,94 $\pm$ 39,13	113,39 $\pm$ 8,96	315,52 $\pm$ 23,37
8	29,88 $\pm$ 2,54	200,91 $\pm$ 12,17	535,11 $\pm$ 25,33	65,86 $\pm$ 4,62	246,62 $\pm$ 12,90
9	25,78 $\pm$ 1,14	126,35 $\pm$ 5,67	313,29 $\pm$ 18,34	52,30 $\pm$ 2,11	151,26 $\pm$ 8,00
10	31,24 $\pm$ 1,39	197,61 $\pm$ 7,16	519,86 $\pm$ 11,55	67,60 $\pm$ 2,28	242,17 $\pm$ 6,58
11	34,46 $\pm$ 0,56	206,07 $\pm$ 4,22	556,16 $\pm$ 5,62	71,41 $\pm$ 0,95	255,61 $\pm$ 3,47
12	45,04 $\pm$ 6,95	248,96 $\pm$ 43,61	647,44 $\pm$ 85,62	91,75 $\pm$ 11,57	300,92 $\pm$ 43,37
13	29,24 $\pm$ 0,68	159,26 $\pm$ 2,88	433,63 $\pm$ 12,47	60,76 $\pm$ 1,14	201,10 $\pm$ 5,32
14	30,37 $\pm$ 0,32	188,53 $\pm$ 1,32	501,90 $\pm$ 7,06	65,93 $\pm$ 0,45	232,63 $\pm$ 2,62
15	30,86 $\pm$ 0,92	178,00 $\pm$ 2,70	440,22 $\pm$ 9,23	65,13 $\pm$ 1,82	210,91 $\pm$ 3,65

Rezultati mjerenja raspodjele veličine čestica prikazani su tablici 4. Najmanje vrijednosti prikazuje uzorak 9 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) dok najveće uzorak broj 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta). Raspon kretanja parametara je slijedeći: d(0.1) kreće se od 25,75 – 61,11  $\mu$ m, d(0.5) od 126,35 – 296,35  $\mu$ m, d(0.9) od 313,29 – 708,27  $\mu$ m, D[3,2] od 52,30 – 119,11  $\mu$ m, D[4,3] od 151,26 – 342,32  $\mu$ m. Prema literaturnim podacima, veličina čestica praškastih proizvoda proizvedenih procesom mljevenja ovisi o nekoliko faktora: tipu primijenjenog uređaja za mljevenje, vremenu trajanja mljevenja te svojstvima materijala koji se melje (Barbosa-Canovas i sur., 2005). U ovom je slučaju korištena metoda mljevenja zasnovana na usitnjavanju primjenom oštrice te je ista za sve proizvedene mješavine, isto kao i primijenjeno vrijeme mljevenja, čime preostaju svojstva materijala kao jedini faktor koji je mogao utjecati na razlike u veličini čestica.

#### 4.2.2. Nasipna gustoća



**Slika 6.** Vrijednosti nasipne gustoće pri 0, 10 i 100 udaraca obogaćenih kakao mješavina

Svi uzorci su pokazali rast nasipne gustoće (slika 6) sa povećanjem broja vibracija, kao posljedica istiskivanja zraka iz međučestičnog prostora. Najveću promjenu vrijednosti nasipne gustoće pokazuje uzorak broj 1 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), a zatim uzorak broj 4 (80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), sa vrijednostima za 0 udaraca  $0,5459 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,5765 \text{ g cm}^{-3}$ , za 10 udaraca  $0,6346 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,6405 \text{ g cm}^{-3}$ , te za 100 udaraca  $0,7071 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,7206 \text{ g cm}^{-3}$ , dok se najmanja promjena uočava u uzorcima broj 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) sa vrijednostima za 0 udaraca  $0,6318 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,6288 \text{ g cm}^{-3}$ , za 10 udaraca  $0,6704 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,6708 \text{ g cm}^{-3}$ , te za 100 udaraca  $0,7065 \text{ g cm}^{-3}$  i  $0,7061 \text{ g cm}^{-3}$ . Vrijednosti u svim ostalim uzorcima kretale su se za 0 udaraca od  $0,5726 \text{ g cm}^{-3}$  do  $0,6265 \text{ g cm}^{-3}$ , za 10 udaraca od  $0,6390 \text{ g cm}^{-3}$  do  $0,6962 \text{ g cm}^{-3}$ , te za 100 udaraca od  $0,6894 \text{ g cm}^{-3}$  do  $0,7420 \text{ g cm}^{-3}$ .

S obzirom da je nasipna gustoća bitna u proizvodnji za prilagodbu skladištenja, prerade, pakiranja i distribucije konačnog proizvoda, te jedna je od svojstava koje se koriste kao dio specifikacija za određeni konačni proizvod dobiven sušenjem, uzorci broj 6 i 7

pokazuju najbolje osobine iz razloga što pokazuju najmanju promjenu vrijednosti nasipne gustoće prilikom povećanja broja udaraca, a time i najnižu kompresibilnost, dok uzorci broj 1 i 4 imaju najlošije osobine, jer prikazuju najveću promjenu vrijednosti nasipne gustoće. Ukoliko, primjerice, nasipna gustoća prelazi raspon specifikacija, proizvod će zauzeti manji dio volumena predviđenog pakiranja, te će se dobiti dojam da u pakovanju nedostaje proizvoda iako je neto masa točna, dok u slučaju da je nasipna gustoća manja od specificirane, proizvod će zauzeti veći volumen od samog pakovanja, te će se kao rezultat toga, dobiti pakovanje sa manjom neto masom od deklarirane (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

#### 4.2.3. Svojstva tečenja

**Tablica 5.** Prikaz rezultata značajke tečenja prikazanih kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

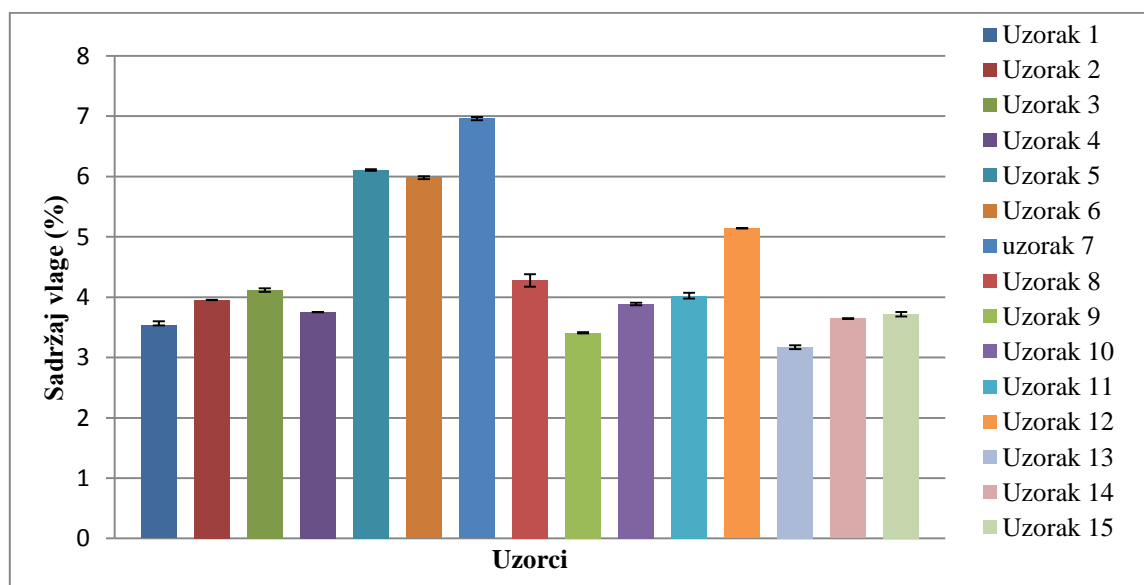
Uzorak	Indeks kohezije	Svojstva tečenja prahova	Čvrstoća kolača (N mm)	Prosječna čvrstoća kolača (N)
1	11,31	lako teče	14,41 $\pm$ 2,63	0,66 $\pm$ 0,01
2	10,54	slobodno teče	6,45 $\pm$ 0,53	0,37 $\pm$ 0,11
3	11,25	lako teče	9,31 $\pm$ 0,41	0,77 $\pm$ 0,02
4	11,88	lako teče	5,67 $\pm$ 0,80	0,37 $\pm$ 0,14
5	8,21	slobodno teče	65,93 $\pm$ 5,09	3,73 $\pm$ 0,15
6	8,84	slobodno teče	10,06 $\pm$ 2,97	0,64 $\pm$ 0,07
7	8,35	slobodno teče	7,21 $\pm$ 0,53	1,00 $\pm$ 0,84
8	9,74	slobodno teče	4,52 $\pm$ 0,32	0,69 $\pm$ 0,9
9	11,13	lako teče	5,09 $\pm$ 0,37	0,65 $\pm$ 0,7
10	10,82	slobodno teče	6,22 $\pm$ 1,16	0,60 $\pm$ 0,13
11	11,09	lako teče	5,05 $\pm$ 1,06	0,63 $\pm$ 0,13
12	9,35	slobodno teče	7,99 $\pm$ 0,85	0,83 $\pm$ 0,05
13	11,52	lako teče	5,57 $\pm$ 0,84	0,41 $\pm$ 0,08
14	12,39	lako teče	4,89 $\pm$ 0,61	0,42 $\pm$ 0,14
15	13,47	lako teče	3,99 $\pm$ 0,95	0,37 $\pm$ 0,14

Svi ispitani uzorci u ispitivanju svojstva tečenja praha (tablica 5), temeljem određenog indeksa kohezije, slobodno teku ili lako teku. Prema radu Benković i sur. (2013), temeljem određenog indeksa kohezije prahovi se mogu kategorizirati u sljedeće skupine: indeks kohezije (CI) < 11 – prah slobodno teče; CI= 11-14 prah lako teče, CI=14 – 16 prah je kohezivan; CI=16 – 19 prah loše teče i CI>19 prah je izrazito loše teče (izrazito je kohezivan). Prahovi dobiveni u ovom radu, prema indeksu kohezije, pokazuju vrlo dobra svojstva tečenja, čime se ujedno pretpostavlja da bi transport, skladištenje i obrada takvih prahova u

industrijskim postrojenjima bila uvelike olakšana u usporedbi sa izrazito kohezivnom prahovima.

Na stvaranje kolača utječu sastav materijala, veličina i oblik čestica, sadržaj vlage, varijacije tlaka i temperature prilikom proizvodnje i skladištenja (Chen i Chou, 1993). Najveću prosječnu čvrstoću kolača pokazuju uzorci 5 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) sa vrijednostima  $3,73 \pm 0,15$  N mm i  $1,00 \pm 0,84$  N, a ujedno sadrže i najveći postotak vlage (slika 7). Vrijednosti prosječne čvrstoće kolača u ostalim uzorcima kreću se od 0,37 N (uzorci 2, 4 i 15) do 0,83 N (uzorak 12). Najveću čvrstoću kolača također pokazuje uzorak broj 5 sa vrijednosti  $65,93 \pm 5,09$  N mm, dok se vrijednosti u ostalim uzorcima kreću od 4,52 N mm (uzorak 8) do 14,41 N mm (uzorak 1). Dobivene vrijednosti čvrstoće kolača također potvrđuju da prahove dobivene metodom sušenja u pjenu karakteriziraju izvrsna svojstva tečenja.

#### 4.2.4. Sadržaj vlage



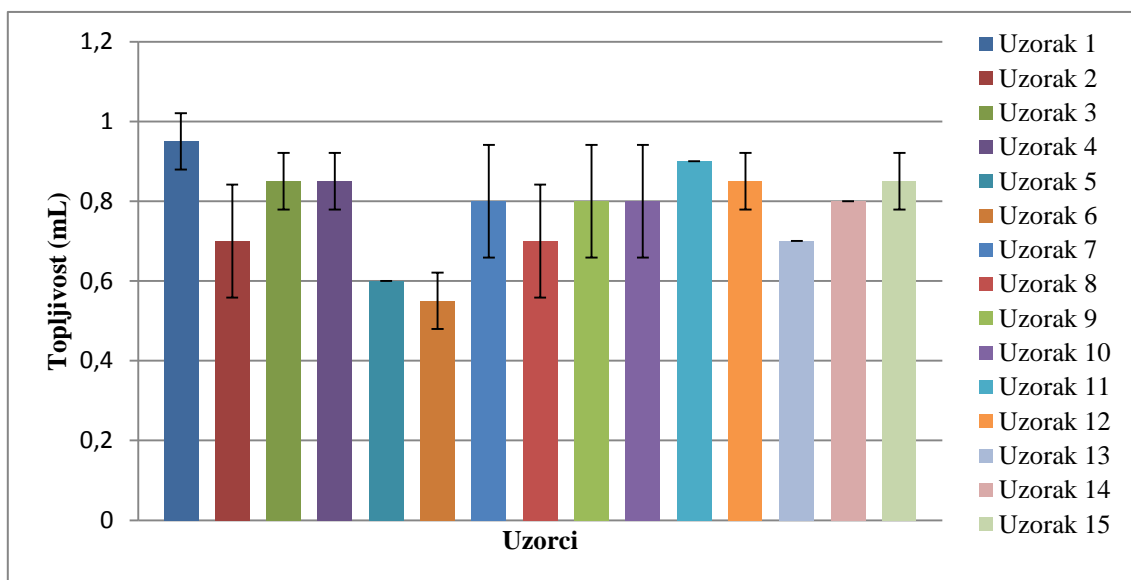
**Slika 7.** Sadržaj vlage kakao mješavina prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (n=2)

Postotak vlage je važan pokazatelj kvalitete kakao praha. Povećan postotak vlage može smanjiti kvalitetu proizvoda, utječe na senzorska svojstva, skraćuje rok trajanja i povećava kohezivnost prahova (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Poželjno je da postotak vlage u praškastim kakao proizvodima bude ispod 5 % (Belščak-Cvitanović i sur., 2010). Rezultati mjerenja sadržaja vlage prikazani su na slici 7. Postotak vlage kreće se od 3,17 % (uzorak broj

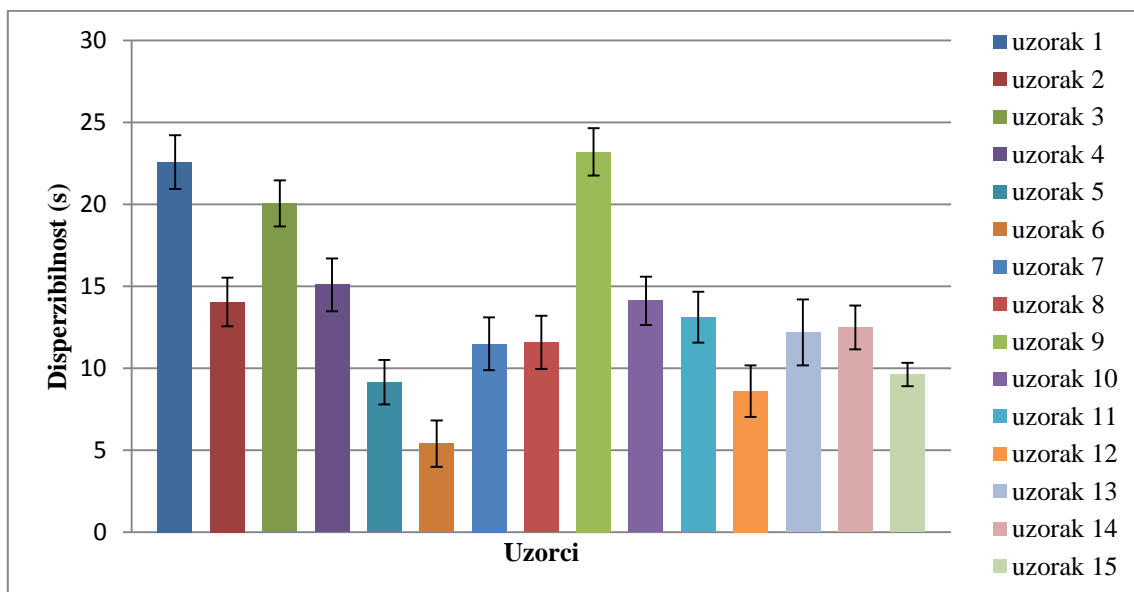
13) do 6,96 % (uzorak 6). Uzorci 5,6,7 i 12 sadrže svega 40 g bjelanjka i pokazuju postotak vlage iznad 5 %. Postotak vlage u uzorcima 2, 3, 8, 10 i 11 (60 g bjelanjka) kreće se oko 4 %, dok je u svim ostalim uzorcima, 1, 4, 9 i 15 (80 g bjelanjka) postotak vlage ispod 4 %. Najmanji postotak vlage primjećuje se u uzorku 13 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) i ona iznosi 3,17 %. Na postotak vlage može utjecati proces sušenja i skladištenja, međutim svi uzorci su sušeni i skladišteni pod istim uvjetima, te na razliku postotak vlage može imati utjecaj i sastav smjese. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se postotak vlage mijenja u ovisnosti o masi bjelanjka. Ovakav utjecaj mase bjelanjka na postotak vlage u krajnjem proizvodu možemo pripisati samom sastavu pjene, odnosno što je masa bjelanjka veća, u pjenu će se inkorporirati više zraka, gustoća pjene će biti manja (Shaari i sur., 2018). Što je gustoća pjene manja, difuzija vode biti lakša i samim tim će se pjena bolje osušiti u procesu sušenja (Kadam i Balasubramanian, 2011).

#### 4.2.5. Rekonstitucijska svojstva

##### 4.2.5.1. Topljivost i disperzibilnost



**Slika 8.** Topljivost kakao mješavina prikazana kao srednja vrijednost volumena taloga (mL) zaostalog u kivetu nakon otapanja  $\pm$ SD (n=2)



**Slika 9.** Disperzibilnost kakao mješavina

Za instant praškaste proizvode je poželjno je da imaju što bolju topljivost i disperzibilnost kako bi pripremljeni napitak bio što boljeg izgleda i okusa te samim time bio privlačniji i prihvatljiviji krajnjem kupcu. Schubert (1993) smatra da bi se dobro proizveden instant prah, nakon kratkog miješanja, trebao potpuno dispergirati i otopiti u specifičnoj količini tekućine (vode ili mlijeka). Kakao prah je teško topiv u vodi ili mlijeku iz razloga što sadrži visok postotak masti (10 – 25 %) te veliki broj polisaharidnih hidrofobnih ugljikovodika (Omobuwajo i sur., 2000). Dodatak šećera i lecitina u smjesu kakao praškastih proizvoda može poboljšati topljivost i disperzibilnost samog proizvoda (Vissotto i sur., 2006; Belščak-Cvitanović i sur., 2010). Osim toga, s obzirom da kakao ima gorak okus, dodatak šećera poboljšava okus samog kakao napitka, dajući mu slatkoću.

U ovom radu, najbolju topljivost i disperzibilnost (slike 8 i 9) ima uzorak broj 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta). Na dobru topljivost i disperzibilnost uzorka broj 6 mogući utjecaj ima visoki postotak vlage u samom uzorku. Približnu topljivost pokazuje uzorak 5 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i ona iznosi 0,6 mL, ali ima slabiju disperzibilnost koja iznosi 9,15 s. Uzorci 2 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), 8 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 13 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) sadrže jednaku masu bjelanjka i istu topljivost od 0,7 mL, dok su im vrijednosti disperzibilnosti različite i one iznose 14,04 s, 11,58 s i 12,19 s. Uzorci 2 i 10 jednakog su sastava (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) te imaju gotovo jednaku disperzibilnost od 14,04 s, odnosno 14,11 s, dok im vrijednosti topljivosti iznose 0,7 mL odnosno 0,8 mL.

Uzorci 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), 9 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), 10 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 14 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) imaju topljivost od 0,8 mL dok su im vrijednosti disperzibilnosti slijedeće: 11,49 s, 23,2 s, 14,11 s i 12,49 s. Uzorci 3 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), 4 (80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), 12 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 15 (80 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) sadrže topljivost od 0,85 mL, a disperzibilnost 20,05 s, 15,09 s, 8,61 s, 9,62 s, dok uzorci 1 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 11 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) pokazuju najslabiju topljivost od 0,95 mL i 0,9 mL, a disperzibilnost za uzorak broj 11 je 13,11 s dok uzorak broj 1 pokazuje najlošiju disperzibilnost sa 22,58 s.

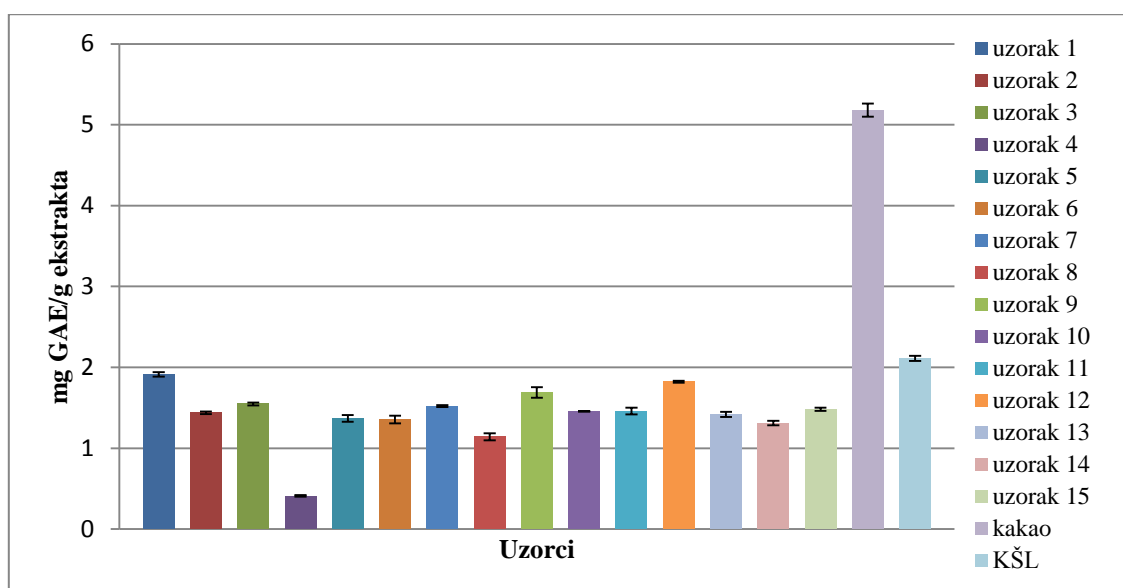
Statističkom obradom svih uzoraka i mjerenja nije se dokazalo da sastav pjene, odnosno masa bjelanjka, postotak ekstrakta ili vrijeme miješanja imaju značajan utjecaj na disperzibilnost i topljivost uzorka. Razlog tome može biti i sama metoda mjerenja s obzirom da se pri mjerenju disperzibilnosti koristi i subjektivna procjena osobe koja vrši ispitivanje, pa postoji mogućnost da dođe do greške mjerenja. Time se zaključuje da je za ovakvu vrstu prahova bolje primijeniti neku drugu metodu koju karakterizira viša preciznost.

### **4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA**

#### **4.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola**

Brojna istraživanja pokazala su da polifenoli imaju povoljan učinak na ljudsko zdravlje, sprečavaju oksidaciju LDL kolesterola te štite od kardiovaskularnih bolesti (Stoclet i sur., 2004; Corti i sur, 2009). Smatra se da je kakao bogat izvor polifenola. Polifenoli u kakau skladišteni su u pigmentnim stanicama koje se nazivaju i polifenol – skladišne stanice, a najzastupljenije grupe polifenola u kakau su: flavan-3-oli (oko 37 %), antocijani (oko 4 %) i proantocijanidini (oko 58 %) s prosječnim sadržajem od 120 – 180 g kg<sup>-1</sup> (Rusconi i Conti, 2010). Prilikom prerade kakao graha, naročito fermentacijom i prženjem, smanjuje se količina polifenola u krajnjem proizvodu (Corti i sur., 2009). Prema istraživanju Croziera i sur. (2011), sadržaj ukupnih polifenola u kakao prahu je  $48,2 \pm 2,1$  mg g<sup>-1</sup>. Sadržaj ukupnih polifenola u ovom radu izražen je kao mg GAE/g ekstrakta i prikazani su na slici 10. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima kreće se od 0,41 mg GAE/g ekstrakta (uzorak 4) do 1,92 mg GAE/g ekstrakta (uzorak 1), dok je najveći sadržaj ukupnih polifenola od 5,18 mg GAE/g ekstrakta izmjeren u samom kakau.



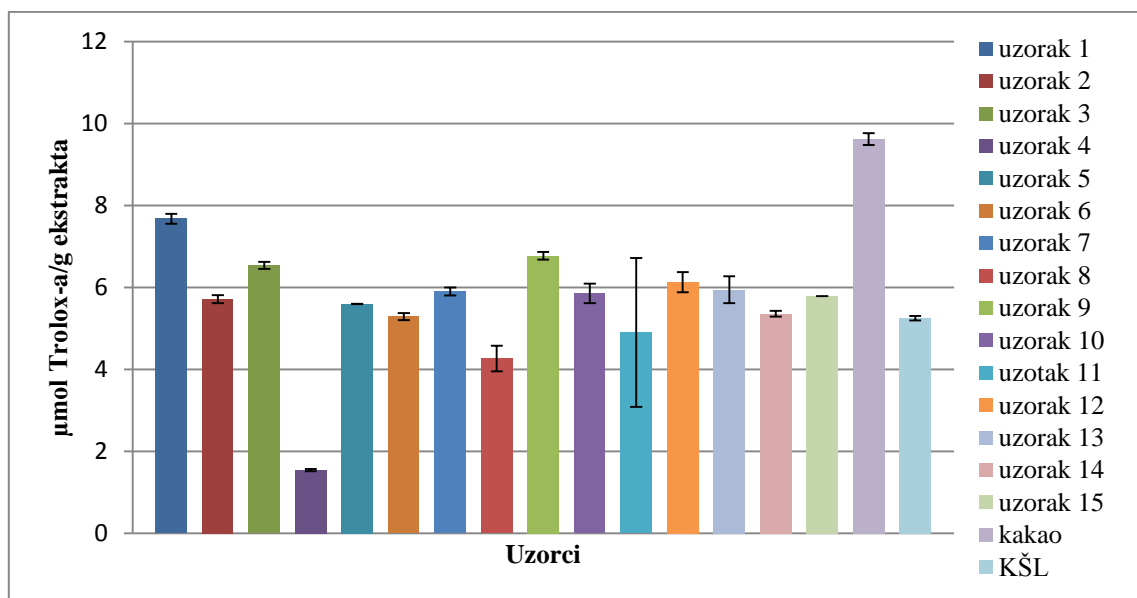


**Slika 10.** Sadržaj ukupnih polifenola pripremljenih kakao mješavina prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (n=2), (KŠL= temeljna smjesa kakaa, šećera i lecitina)

Pretpostavilo bi se da uzorci koji sadrže najveći postotak ekstrakta mente, ujedno imaju i veći sadržaj polifenola, međutim to se u ovim mjerenjima nije pokazalo točnim. Vidljivo je da uzorci 3 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), 13 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) i 15 (80 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) koji sadrže 5 % ekstrakta mente imaju različit sadržaj polifenola koji se kreće od 1,419 do 1,547 mg GAE/g ekstrakta mente, dok uzorci 9 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) i 12 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) imaju manji postotak ekstrakta mente u sastavu, a sadržaj polifenola im je veći i iznosi 1,69 i 1,822 mg GAE/g ekstrakta. Uzorci 8 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 11 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) ne sadrže ekstrakt mente u svom sastavu a sadržaj polifenola im se kreće od 1,141 do 1,46 mg GAE/g ekstrakta. Primjećujemo da uzorak 11 (1,46 mg GAE/g ekstrakta) sadrži nešto više polifenola od uzorka 13 (1,419 mg GAE/g ekstrakta) koji sadrži 5 % ekstrakta mente. Uzorci 2, 10 i 14, jednakog su sastava (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta mente), a sadržaj polifenola kreće se od 1,31 do 1,439 mg GAE/g ekstrakta. Uzorak 5 (40 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta) sadrži više ekstrakta mente, a ima manji sadržaj polifenola (1,369 mg GAE/g ekstrakta) od uzorka 11 (1,46 mg GAE/g ekstrakta) koji u svome sastavu ne sadrži ekstrakt mente. Sadržaj ukupnih polifenola analiziran je i na temeljnoj smjesi kakaa, šećera i lecitina (uzorak KŠL). Dobivena vrijednost sadržaja ukupnih polifenola iznosila je 2,111 mg GAE/g ekstrakta, temeljem čega se može zaključiti da i

povećanjem udjela šećera u kakao smjesama dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenola. U smjesama koje su sušene taj je udio još dodatno smanjen dodatkom bjelanjaka u smjesu za proizvodnju pjena.

#### 4.3.2. Antioksidacijski kapacitet



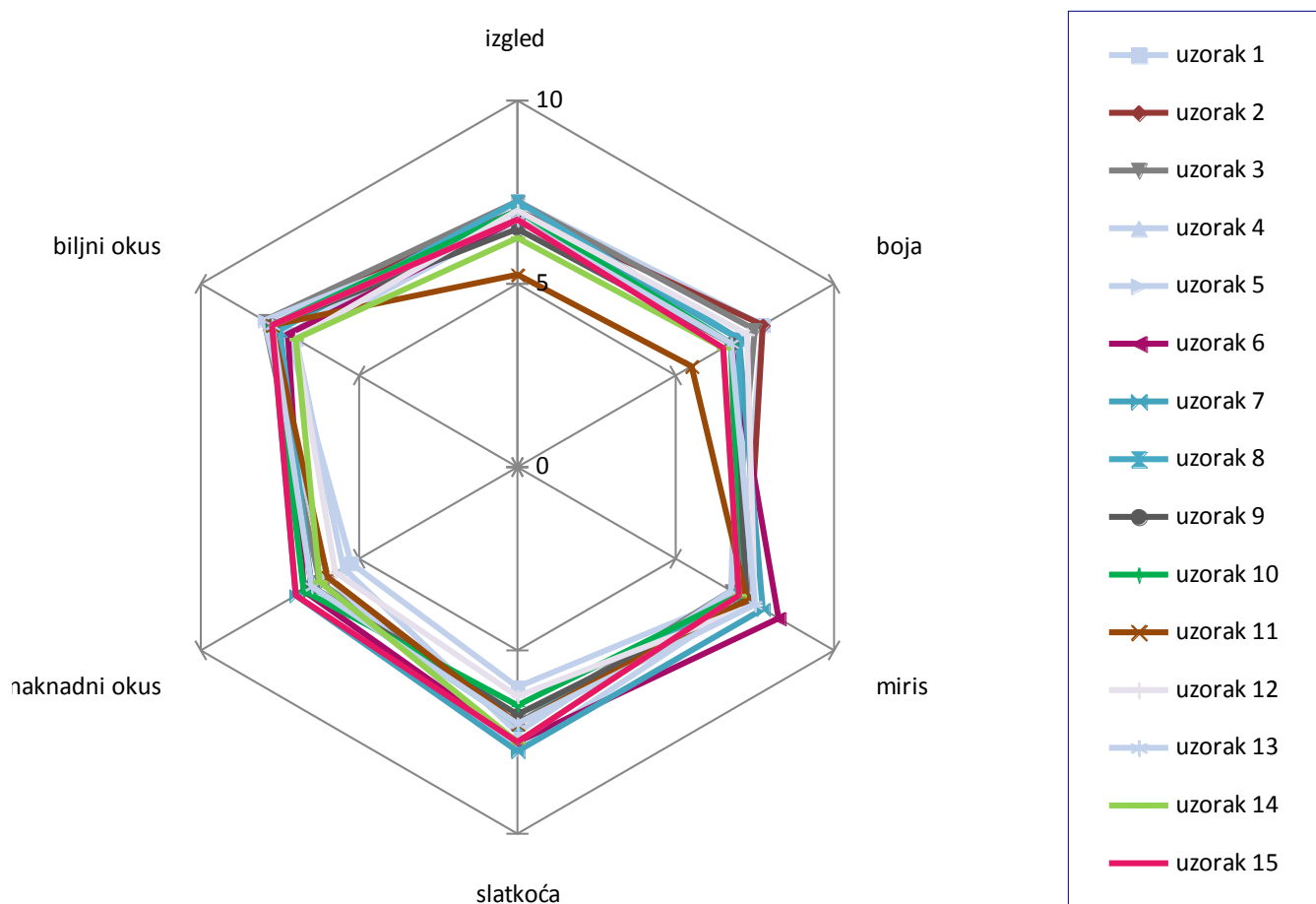
**Slika 11.** Antioksidacijski kapacitet kakao mješavina određena DPPH metodom i izražena kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2), (KŠL= temeljna smjesa kaka, šećera i lecitina)

Antioksidacijski kapacitet kakao mješavina određen je DPPH metodom. Rezultati su prikazani na slici 11 i izraženi kao  $\mu\text{mol Trolox-a/g}$  ekstrakta. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kakao mješavina kreću se od 1,547  $\mu\text{mol Trolox-a/g}$  ekstrakta (uzorak 4, 80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) do 7,674  $\mu\text{mol Trolox-a/g}$  ekstrakta (uzorak 1, 80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), dok se najviši antioksidacijski kapacitet primjećuje u samom kakau te iznosi 9,62  $\mu\text{mol Trolox-a/g}$  ekstrakta.

Jednako kao i kod ukupnog sadržaja polifenola (slika 10) očekivalo bi se da uzorci sa najvećim postotkom ekstrakta mente u svome sastavu imaju i najvišu antioksidacijsku aktivnost, međutim to nije pokazalo potpuno točnim. Uzorci 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), 8 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) i 11 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta) ne sadrže ekstrakt mente u svome sastavu i pokazuju najniže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta koji se kreće od 4,266 do 5,287  $\mu\text{mol Trolox-a/g}$  ekstrakta. Uzorci 3, 7, 13 i 15 u svome sastavu sadrže 5 % ekstrakta mente i antioksidacijski kapacitet kreće se od 5,785 do 6,536

$\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta, dok uzorci 2, 5, 9, 10, 12 i 14 u svome sastavu sadrže 2,5 % ekstrakta mente i antioksidacijski kapacitet im se kreće od 5,358 do 6,774  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta. Možemo primijetiti da uzorak 9 (6,774  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta) uz manji sadržaj ekstrakta mente pokazuje bolji antioksidacijski kapacitet od svih prethodno navedenih uzoraka s 5 % ekstrakta mente u svome sastavu, također i uzorak broj 12 (6,129  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta) uz 2,5 % ekstrakta pokazuje viši antioksidacijski kapacitet od uzoraka 7 (5,901  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta), 13 (5,946  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta) i 15 (5,785  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta) koji u svome sastavu sadrže 5 % ekstrakta mente. Najniži antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod uzorka 4 (1,547  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta), te slijedi trend koji je zabilježen za isti uzorak u koncentraciji ukupnih polifenola. Taj uzorak karakterizira najviši sadržaj bjelanjka (80 g) te odsustvo ekstrakta mente. Uzrok niskog antioksidacijskog kapaciteta navedenog uzorka je visok sadržaj bjelanjaka, koji, kao što je prije navedeno, dovodi do smanjenja bioaktivnih komponenti u smjesi te isto tako, nedostatak ekstrakta koji bi mogao djelovati na povećanje antioksidacijskog kapaciteta. Antioksidacijski kapacitet u temeljnoj kakao smjesi (KŠL) iznosila je 5,247  $\mu\text{mol Troloxa/g}$  ekstrakta.

#### 4.4. SENZORSKA SVOJSTVA KAKAO MJEŠAVINA



**Slika 12.** Ocjene senzorske analize pripremljenih kakao napitaka

Senzorska analiza provedena je pomoću panel skupine koja je, koristeći isključivo svoja osjetila (vid, okus, njuh), ocjenjivala slijedeća svojstva: izgled, boju, miris, slatkoću, naknadni okus i biljni okus. Ocjene senzorske analize kakao mješavina prikazane su na slici 12. Najbolje ocjene dobio je uzorak broj 7 (sadrži 40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), dok su najlošije ocjene kod uzorka broj 11 (60 g bjelanjka, 0 % ekstrakta). Za svojstvo izgleda, najbolju prosječnu ocjenu od 7,25, imaju uzorci 1 (80 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), 3 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) i 8 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), dok najlošiju prosječnu ocjenu od 5,25 dobio je uzorak broj 11 (60 g bjelanjka i 0 % ekstrakta). Za svojstvo boje, najbolju prosječnu ocjenu od 7,75 imaju uzorci 1 i 2 (60 g bjelanjka i 2,5 % ekstrakta), dok najlošiju ocjenu od 5,5 ima uzorak 11. Za svojstvo mirisa, najbolju prosječnu ocjenu od 8,25 ima uzorak broj 6 (40 g bjelanjka i 0 % ekstrakta), dok najlošiju od 6,75 imaju uzorci 3 (60 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) i 4 (80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta). Uzorci 5 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) i 4 (80 g bjelanjka i 0 % ekstrakta).

ekstrakta) i 7 (40 g bjelanjka i 5 % ekstrakta) imaju najbolju prosječnu ocjenu za svojstvo slatkoće koja iznosi 7,75, dok uzorak broj 1 ima najslabiju ocjenu 6. Najvišu prosječnu ocjenu (7) za naknadni okus imaju uzorci 5 i 15 (80 g bjelanjka i 5 % ekstrakta), dok je ona najmanja (5,25) kod uzorka 1. Senzorskom analizom primijetilo se da su biljni okus i miris ekstrakta, odnosno mente, u konačnom napitku slabo dolazili do izražaja, te su ocjene ujednačene kod svih uzoraka i kreću se od 7-8, te da bi se, i ukoliko se u napitku želi dodatno istaknuti aroma mente, treba povećati udio dodanog ekstrakta.

#### 4.5. STATISTIČKA OBRADA MJERENIH PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je u programskom sustavu Statistica u kojem je i napravljen Box-Behnken dizajn eksperimenta sa 3 faktora na 3 razine. Podaci su analizirani primjenom analize varijance (ANOVA) sa razinom značajnosti  $p < 0,05$  te je provedena analiza utjecaja 3 faktora (sadržaj bjelanjka, ekstrakta i vremena miješanja) na promatrana fizikalna, kemijska i senzorska svojstva pjene i prahova. Rezultati su prikazani tabelarno pomoću regresijskih koeficijenata i koeficijentima determinacije ( $R^2$ ). Utjecaj faktora koji su se pokazali značajnim na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva mješavina dalje je prikazan pomoću odzivnih površina.

**Tablica 6.** Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenta za svojstva pjene ( $p=0,05$ )

Analizirano svojstvo	Odsječak na koordinati (O)	Parametar	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni)	P	$R^2$	$R^2$ adj.
Gustoća pjene [g/cm <sup>3</sup> ]	0,6842*	Masa bjelanjka [g]	<b>-0,2741* (L)</b> -0,0733* (Q)	<b>0,0001(L)</b> 0,0255(Q)	0,9055	0,8346
		% ekstrakta [%]	<b>-0,0907* (L)</b> 0,0559 (Q)	<b>0,0372 (L)</b> 0,0702 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,0333 (L) 0,0054 (Q)	0,3861 (L) 0,8453 (Q)		
Stabilnost pjene [%]	95,2629*	Masa bjelanjka [g]	-2,4586 (L) -0,1660 (Q)	0,4676 (L) 0,9459 (Q)	0,2130	0,0000
		% ekstrakta [%]	1,3159 (L) 1,4768 (Q)	0,6939 (L) 0,5511(Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	2,3572 (L) 1,7324 (Q)	0,4856(L) 0,4862 (Q)		

U svojstva pjene ubrajaju se gustoća i stabilnost pjene. Analiziran je utjecaj mase bjelanjka, postotka dodanog ekstrakta i vremena miješanja na gustoću i stabilnost pjene. Iz regresijskih koeficijenata prikazanih u tablici 6 vidljivo je da je gustoća pjene pokazala

najveću statistički značajnu ( $p < 0,05$ ) i obrnuto proporcionalnu ovisnost o sadržaju bjelanjka u mješavini. Što je veći sadržaj bjelanjka, gustoća pjene je niža. Također je utvrđena i linearna ovisnost sadržaja ekstrakta i gustoće pjene: dodatak veće količine ekstrakta ujedno je i značio smanjenje gustoće pjene. Dobiven predikcijski model koji opisuje ovisnost gustoće pjene o promatranim faktorima (masa bjelanjka, sadržaj dodanog ekstrakta i vrijeme miješanja) izvrsno opisuje dobivene eksperimentalne podatke, s obzirom da je vrijednost koeficijenta determinacije iznosila  $R^2 = 0,9055$  ( $R^2_{adj} = 0,8346$ ).

Što se stabilnosti pjene tiče primijenjeni modeli ne opisuju dobro utjecaj mase bjelanjka, postotak ekstrakta i vremena miješanja na samu stabilnost pjene što se vidi iz izrazito niskih koeficijenata determinacije te regresijskih koeficijenata od kojih ni jedan nije ispod razine statističke značajnosti.

**Tablica 7.** Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenta za svojstva prahova (ANOVA pri  $p=0,05$ )

Analizirano svojstvo	Odsječak na oordinati (O)	Parametar	Regresijski koeficijent	P	$R^2$	$R^2$ adj.
d(0,1) [ $\mu\text{m}$ ]	37,3008*	Masa bjelanjka [g]	<b>-24,8237* (L)</b> <b>-10,1060* (Q)</b>	<0,0001 (L) <0,0001 (Q)	0,9600	0,9299
		% ekstrakta [%]	-3,2338 (L) -3,1450 (Q)	0,1641 (L) 0,0775 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,9765 (L) 2,9313 (Q)	0,6560 (L) 0,0959 (Q)		
d(0,5) [ $\mu\text{m}$ ]	205,5060*	Masa bjelanjka [g]	<b>-108,5610* (L)</b> -24,2920 (Q)	<0,0001 (L) 0,0030 (Q)	0,9671	0,9245
		% ekstrakta [%]	<b>-23,5630* (L)</b> -11,0870 (Q)	0,0172 (L) 0,0919 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	17,9650 (L) <b>16,4050* (Q)</b>	0,0518 (L) 0,0221 (Q)		
d(0,9) [ $\mu\text{m}$ ]	521,2190*	Masa bjelanjka [g]	<b>-276,2207* (L)</b> -30,0228 (Q)	<0,0001 (L) 0,1050 (Q)	0,9555	0,9220
		% ekstrakta [%]	<b>-55,3680* (L)</b> -23,4305 (Q)	0,0380 (L) 0,1915 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	25,4983 (L) 35,7907 (Q)	0,2862 (L) 0,0609 (Q)		
D[3,2] [ $\mu\text{m}$ ]	78,0136*	Masa bjelanjka [g]	<b>-49,2805* (L)</b> <b>-18,5816* (Q)</b>	<0,0001 (L) <0,0001 (Q)	0,9678	0,9436
		% ekstrakta [%]	-4,1830 (L) -5,3796 (Q)	0,2892 (L) 0,0826 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	5,7785 (L) 6,2289 (Q)	0,1555 (L) 0,0507 (Q)		
D[4,3] [ $\mu\text{m}$ ]	246,1644*	Masa bjelanjka [g]	<b>-128,4902* (L)</b> <b>-20,2506* (Q)</b>	<0,0001 (L) <0,0001 (Q)	0,9638	0,9366
		% ekstrakta [%]	<b>-26,1477* (L)</b> -11,9011 (Q)	0,0248 (L) 0,1266 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	15,1670 (L) <b>17,9971* (Q)</b>	0,1485 (L) 0,0327 (Q)		
Vlaga [%]	4,5158*	Masa bjelanjka [g]	<b>-2,4447* (L)</b> <b>-0,9621* (Q)</b>	<0,0001 (L) <0,0001 (Q)	0,9298	0,8771

		% ekstrakta [%]	-0,0168 (L) -0,3155 (Q)	0,9537 (L) 0,1696 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,5732 (L) 0,2120 (Q)	0,0752 (L) 0,2747 (Q)		
$\rho_0$ [kg m <sup>-3</sup> ]	0,5985*	Masa bjelanjka [g]	<b>-0,0425* (L)</b> -0,0047 (Q)	0,0160 (L) 0,6571 (Q)	0,6326	0,3570
		% ekstrakta [%]	0,0051 (L) -0,0102 (Q)	0,7227 (L) 0,3582 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,0004 (L) 0,0175 (Q)	0,9790 (L) 0,1278 (Q)		
$\rho_{10}$ [kg m <sup>-3</sup> ]	0,6641*	Masa bjelanjka [g]	-0,0175 (L) 0,0014 (Q)	0,3100 (L) 0,9102 (Q)	0,1751	0,0000
		% ekstrakta [%]	0,0018 (L) -0,0067 (Q)	0,9144 (L) 0,5900 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,0048 (L) 0,0030 (Q)	0,7760 (L) 0,8062 (Q)		
$\rho_{100}$ [kg m <sup>-3</sup> ]	0,7137*	Masa bjelanjka [g]	0,0012 (L) 0,0072 (Q)	0,9331 (L) 0,5087 (Q)	0,1014	0,0000
		% ekstrakta [%]	-0,0014 (L) -0,0038 (Q)	0,9235 (L) 0,7232 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,0043 (L) 0,0041 (Q)	0,7708 (L) 0,7039 (Q)		
Indeks kohezije [mm]	10,5124*	Masa bjelanjka [g]	<b>3,2560* (L)</b> 0,7579 (Q)	0,0005 (L) 0,1103 (Q)	0,8331	0,7079
		% ekstrakta [%]	0,7618 (L) -0,1456 (Q)	0,2207 (L) 0,7389 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,6465 (L) 0,4899 (Q)	0,2923 (L) 0,2792 (Q)		
Prosječna čvrstoća kolača [Nmm]	91,2534*	Masa bjelanjka [g]	-105,9719 (L) -49,5058 (Q)	0,0618 (L) 0,2057 (Q)	0,6185	0,3324
		% ekstrakta [%]	5,1656 (L) 36,1130 (Q)	0,9184 (L) 0,3444 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	84,9466 (L) -52,5967 (Q)	0,1201 (L) 0,1815 (Q)		
Disperzibilnost [s]	13,5233*	Masa bjelanjka [g]	<b>9,0075* (L)</b> 0,7208 (Q)	0,0111 (L) 0,7301 (Q)	0,6663	0,4160
		% ekstrakta [%]	2,0400 (L) 2,4233 (Q)	0,4780 (L) 0,2640 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	1,6125 (L) -3,1092 (Q)	0,5726 (L) 0,1618 (Q)		
Topljivost [s]	0,7833*	Masa bjelanjka [g]	0,1625 (L) -0,0042 (Q)	0,0795 (L) 0,9459 (Q)	0,3799	0,0000
		% ekstrakta [%]	0,0500 (L) 0,0083 (Q)	0,5539 (L) 0,8922 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,0375 (L) -0,0292 (Q)	0,6375 (L) 0,6375 (Q)		

Analiziran je utjecaj mase bjelanjka, postotak ekstrakta i vremena miješanja na svojstva prahova. Rezultati analize prikazani su u tablici 7. Iz regresijskih koeficijenata vidljivo je da sastav kakao smijese ima statistički značajan utjecaj na svaki promatrani parametar raspodjele veličine čestica. Vrijednost  $d(0,1)$  pokazala je statistički značajnu ovisnost o masi bjelanjka: što je masa bjelanjka veća, to je vrijednost  $d(0,1)$  manja. I u ovom je slučaju potrebno naglasiti vrijednosti regresijskih koeficijenata za utjecaj sadržaja ekstrakta na  $d(0,1)$  koji, iako izvan razine vjerojatnosti od  $p=0,05$ , pokazuje određen utjecaj obrnuto

proporcionalan utjecaj na  $d(0,1)$ . Temeljem vrijednosti  $R^2=0,9600$  utvrđeno je da dobiven predikcijski model izvrsno opisuje povezanost sadržaja mješavine, % ekstrakta i vremena miješanja sa  $d(0,1)$ .

Svojstvo  $d(0,5)$  pokazuje statistički značajnu ovisnost o svim ispitanim parametrima, s time da masa bjelanjka i postotak ekstrakta pokazuju obrnuto proporcionalnu ovisnost, dok vrijeme miješanja pokazuje proporcionalnu ovisnost. Primjenom regresijskih modela utvrđena je značajna ovisnost svojstva  $d(0,5)$  o analiziranim parametrima što je vidljivo iz koeficijenta determinacije ( $R^2=0,9671$ ), te je primijenjenim modelima objašnjeno preko 92 % pojave.

Svojstvo  $d(0,9)$  pokazuje statistički značajnu ovisnost o masi bjelanjka i % ekstrakta, s time da masa bjelanjka pokazuje obrnuto proporcionalnu ovisnost, odnosno što je masa bjelanjka veća to su vrijednosti svojstva  $d(0,9)$  manje. Nadalje, povišeni sadržaj ekstrakta smanjuje vrijednost  $d(0,9)$ . Koeficijenti determinacije ( $R^2=0,9555$ ) potvrđuju nam da primijenjeni modeli dobro opisuju ovisnost svojstva  $d(0,9)$  o analiziranim parametrima, te da je objašnjeno preko 92 % pojave.

Svojstvo  $D[3,2]$  pokazuje statistički značajnu ovisnost o masi bjelanjka, s time da  $D[3,2]$  pokazuje obrnuto proporcionalnu ovisnost o masi bjelanjka. Iz koeficijenata determinacije vidimo da primijenjeni modeli dobro opisuju ovisnost svojstva  $D[3,2]$  o masi bjelanjka, postotku ekstrakata i vremenu miješanja ( $R^2=0,9687$ ), te da je primjenom ovog modela objašnjeno preko 94 % pojave.

Svojstvo  $D[4,3]$  pokazuje statistički značajnu ( $p<0,5$ ) ovisnost o svim ispitanim parametrima. Iz regresijskih koeficijenata vidimo da masa bjelanjka i postotak ekstrakta pokazuju obrnuto proporcionalnu ovisnost, pa što je veća masa bjelanjka i postotak ekstrakta, to će vrijednosti  $D[4,3]$  biti manje, dok vrijeme miješanja pokazuje proporcionalnu ovisnost, pa će vrijednosti  $D[4,3]$  biti više, što je vrijeme miješanja duže. Primjenom regresijskih modela utvrđena je značajna ovisnost svojstva  $D[4,3]$  o svim ispitanim parametrima ( $R^2=0,9638$ ), te primjenom ovih modela objašnjeno je preko 93 % pojave.

Postotak vlage pokazuje najveću statistički značajnu i obrnuto proporcionalnu ovisnost o masi bjelanjka. Što je masa bjelanjka veća to je postotak vlage u konačnom proizvodu manji. Primijenjeni modeli pokazuju značajnu ovisnost ( $R^2=0,9298$ ) postotka vlage o ispitanim parametrima, pri čemu je statistički značajna masa bjelanjka. Primjenom ovog modela objašnjeno je preko 87 % pojave.

Nasipna gustoća uzoraka analizirana je primjenom vibracijskog volumetra pri 0, 10 i 100 udaraca. Statističkom analizom utvrđen je značajan utjecaj mase bjelanjka na slobodnu (lijevanu) nasipnu gustoću, dok takav utjecaj nije utvrđen niti za jedan drugi parametar



nasipne gustoće za bilo koji analizirani faktor (masa bjelanjka, sadržaj ekstrakta i vrijeme miješanja). Budući da je slobodna nasipna gustoća ( $\rho_0$ ) uvelike ovisna o načinu nasipavanja i rukovanju mjernim uređajem, kao takva je i najviše podložna greškama prilikom mjerenja. Budući da ostale vrijednosti nasipne gustoće, koje slove kao pouzdaniji parametri s obzirom na način određivanja i ujednačeni broj vibracija, nisu pokazivale istu ovisnost, mora se uzeti u obzir da ovako određen regresijski koeficijent ne opisuje pravo stanje stvari slobodne nasipne gustoće u analiziranim uzorcima.

Indeks kohezije najveću statistički značajnu i proporcionalnu ovisnost pokazuje o masi bjelanjka. Što je masa bjelanjka veća, to je indeks kohezije veći. Koeficijent determinacije pokazuje da primijenjeni model dobro opisuje ovisnost indeksa kohezije o masi bjelanjka, postotku ekstrakta i vremenu miješanja, te primjenom ovog modela objašnjeno je preko 70 % pojave.

Statističkom analizom eksperimentalnih podataka pokazalo se da prosječna čvrstoća kolača ne ovisi niti o jednom promatranom faktoru.

Od rekonstitucijskih svojstava dobivenih prahova utvrđeno je da disperzibilnost praha ovisi o masi bjelanjka: veća masa dodanog bjelanjaka ujedno je i značila povišenje vremena potrebnog za raspršivanje uzorka. Budući da je za vrijednosti disperzibilnosti poželjno da budu čim kraće, može se zaključiti da veća masa dodanog bjelanjaka negativno utječe na disperzibilnost praha. U slučaju topljivosti nije utvrđena niti jedna statistički značajna međuovisnost, uz napomenu da se temeljem niske vrijednosti vjerojatnosti ( $p=0,0795$ ) ne može u potpunosti isključiti utjecaj dodatka bjelanjaka i na svojstvo topljivosti..

**Tablica 8.** Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenta za kemijska svojstva obogaćenih kakao napitaka ( $p=0,05$ )

Analizirano svojstvo	Odsječak na oordinati (O)	Parametar	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni)	P	$R^2$	$R^2$ adj.
Ukupni polifenoli [mg GAE/L ekstrakta]	1,5102*	Masa bjelanjka [g]	0,1083 (L) -0,1738 (Q)	0,7616 (L) 0,5131 (Q)	0,4641	0,0622
		% ekstrakta [%]	0,4006 (L) 0,3841 (Q)	0,2791 (L) 0,1689 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,1462 (L) -0,3738 (Q)	0,6829 (L) 0,1792 (Q)		
Antioksidacijski kapacitet [mmol Trolox/g ekstrakta]	5,8175*	Masa bjelanjka [g]	-0,5836 (L) -0,1931 (Q)	0,6503 (L) 0,6036 (Q)	0,5264	0,1712
		% ekstrakta [%]	2,0416 (L) 1,5047 (Q)	0,1382 (L) 0,1377 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,9475 (L) -1,2757 (Q)	0,4666 (L) 0,1996 (Q)		

Analiziran je utjecaj mase bjelanjka, postotak ekstrakta i vremena miješanja na kemijska svojstva kakao napitaka. Iz tablice 8 vidimo da primijenjeni modeli ne opisuju dobro utjecaj analiziranih parametara na sadržaj ukupnih polifenola, što se vidi iz niskih koeficijenata determinacije, te regresijskih koeficijenata. Unatoč tome što ni u slučaju antioksidacijskog kapaciteta niti jedan regresijski koeficijent nije ispod razine statističke značajnosti, bitno je naglasiti regresijske koeficijente koji opisuju utjecaj % ekstrakta na antioksidacijski kapacitet: Naime, ti su koeficijenti određeni sa  $p = 0,1382$  te  $p = 0,1377$ , čime se ne može u potpunosti zanemariti utjecaj dodatka ekstrakta na antioksidacijski kapacitet.

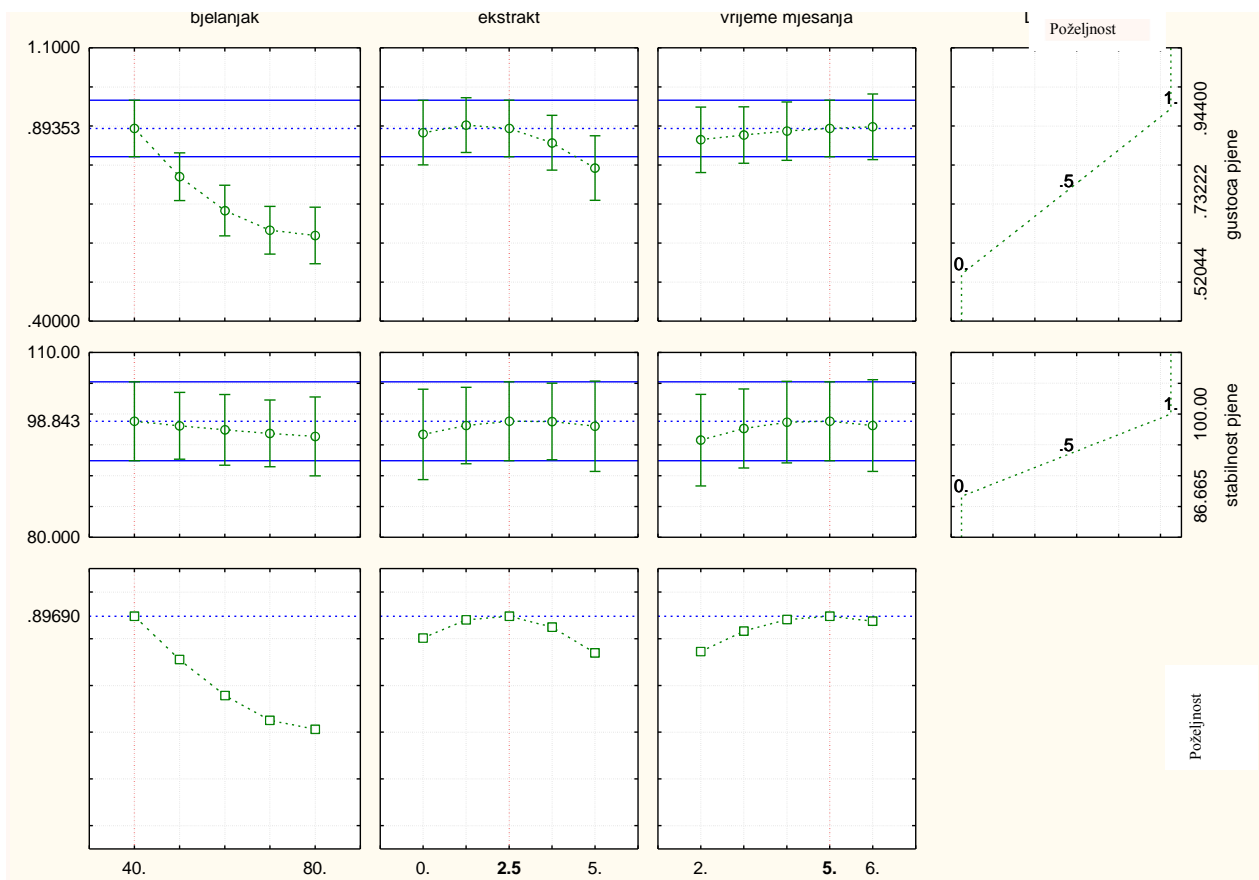
**Tablica 9.** Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenta za senzorska svojstva obogaćenih kakao napitaka ( $p=0,05$ )

Analizirano svojstvo	Odsječak na ordinati (O)	Parametar	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni)	P	$R^2$	$R^2$ adj.
izgled	6,7708*	Masa bjelanjka [g]	-0,0625 (L) -0,1563 (Q)	0,8608 (L) 0,5555 (Q)	0,4643	0,0625
		% ekstrakta [%]	0,4375 (L) 0,0937 (Q)	0,2406 (L) 0,7217 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,7500 (L) 0,0313 (Q)	0,0615 (L) 0,9051 (Q)		
boja	6,8958*	Masa bjelanjka [g]	0,0000 (L) -0,1563 (Q)	1,0000 (L) 0,5946 (Q)	0,4555	0,0472
		% ekstrakta [%]	0,3750 (L) 0,3437 (Q)	0,3574 (L) 0,2585 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,7500 (L) -0,0313 (Q)	0,3840 (L) 0,2826 (Q)		
miris	7,2725*	Masa bjelanjka [g]	<b>-0,6875* (L)</b> -0,2371 (Q)	<b>0,0097 (L)</b> 0,1522 (Q)	0,6964	0,4688
		% ekstrakta [%]	-0,0675 (L) -0,1171 (Q)	0,7487 (L) 0,4570 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,3800 (L) 0,0704 (Q)	0,0989 (L) 0,6509 (Q)		
slatkoća	7,0625*	Masa bjelanjka [g]	-0,4375 (L) -0,4375 (Q)	0,2442 (L) 0,7238 (Q)	0,6033	0,3057
		% ekstrakta [%]	0,1250 (L) -0,4063 (Q)	0,7287 (L) 0,1513 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	0,1875 (L) 0,4063 (Q)	0,6047 (L) 0,1586 (Q)		
naknadni okus	6,2292*	Masa bjelanjka [g]	-0,3125 (L) 0,0729 (Q)	0,4236 (L) 0,7960 (Q)	0,4328	0,0074
		% ekstrakta [%]	0,4375 (L) -0,3021 (Q)	0,2717 (L) 0,3003 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,2500 (L) 0,3854 (Q)	0,5189 (L) 0,1954 (Q)		
okus ekstrakta	1,4375*	Masa bjelanjka [g]	0,0625 (L) -0,1979 (Q)	0,8314 (L) 0,3716 (Q)	0,3319	0,0000
		% ekstrakta [%]	-0,4375 (L) 0,0508 (Q)	0,1622 (L) 0,8096 (Q)		
		Vrijeme miješanja [s]	-0,1250 (L) 0,1146 (Q)	0,6716 (L) 0,5987 (Q)		

Iz tablice 9 vidljivo je da primijenjeni modeli ne opisuju dobro utjecaj mase bjelanjka, postotak ekstrakta i vremena miješanja na senzorička svojstva, što se vidi iz izrazito niskih koeficijenta determinacije. Iznimku čine ocjene za miris napitka, pri čemu je utvrđena linearna obrnuto proporcionalna ovisnost o masi bjelanjka dodanog u mješavinu. Tijekom senzorske analize pripremljenih napitaka, izrazito visok sadržaj bjelanjaka (80 g) odrazio se i na miris napitka: veći sadržaj bjelanjka smanjio je intenzivan doživljaj mirisa kakao praha u mješavini.

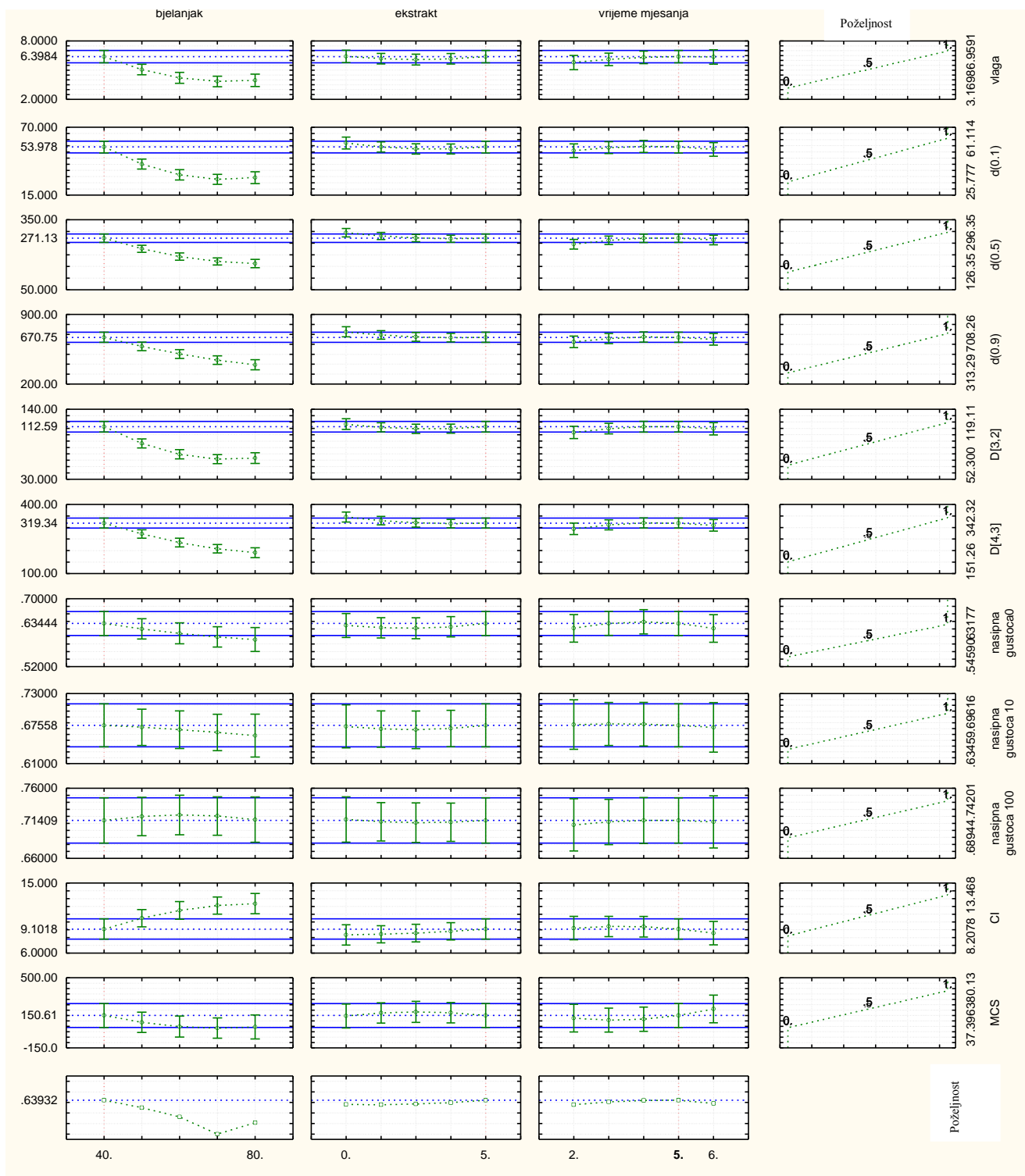
#### 4.6. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA

Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti procesa, dobiveni rezultati podijeljeni su u 5 grupa te je optimiranje provedeno sa svakoj grupi svojstava zasebno. Rezultati su prikazani na slikama 13 – 17.



Slika 13. Rezultati optimiranja uvjeta procesa s obzirom na svojstva pjene

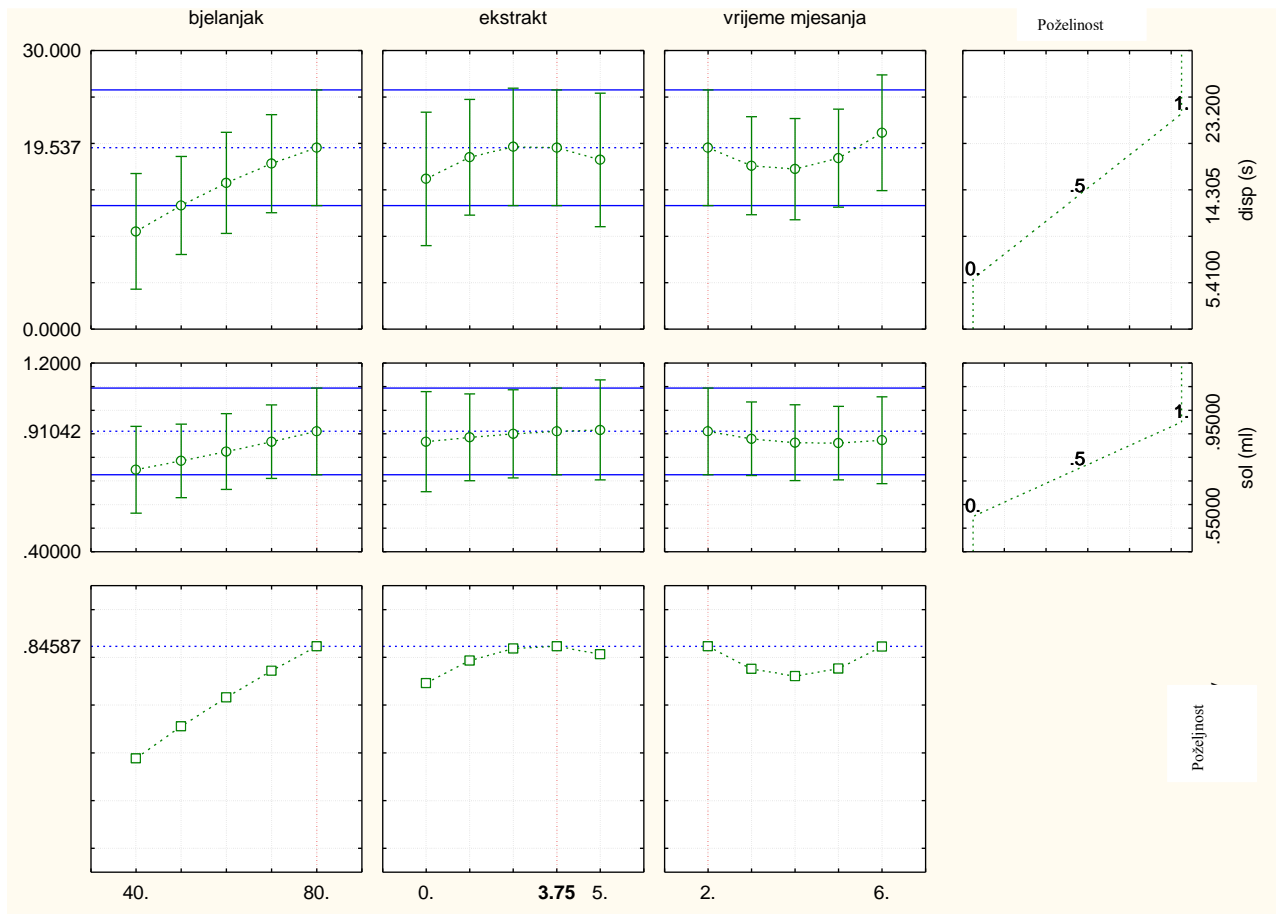
Svojstva pjene tijekom optimiranja činila su zasebnu skupinu analiziranih svojstava. Temeljem rezultata prikazanih na slici 13, vidljivo je da, ukoliko se promatraju gustoća i stabilnost pjene kao međusobno zavisna svojstva prilikom optimiranja, utvrđeni optimalni uvjeti procesa su sljedeći: 40 g bjelanjka, 2,5 % dodanog ekstrakta te miješanje u trajanju od 5 minuta. Tijekom procesa poželjno je da vrijednosti stabilnosti pjene budu čim više, dok je za gustoću pjene poželjno da bude u rasponu 0,3 do 0,6 g mL<sup>-1</sup> (Ratti i Kudra, 2006). Sljedeću grupaciju svojstava koja su zajedno korištena u optimiranju činila su fizikalna svojstva dobivenih prahova. Rezultati su prikazani na slici 14.



**Slika 14.** Rezultati optimiranja procesa za fizikalna svojstva dobivenih prahova (CI= indeks kohezije; MCS= prosječna čvrstoća kolača)

U grupaciji fizikalnih svojstava zajedno je provedeno optimiranje svih parametara dobivenih analizom raspodjele veličine čestica ( $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ ,  $d(0,9)$ ,  $D[3,2]$ ,  $D[4,3]$ ), nasipna gustoća pri 0, 10 i 100 udaraca, te indeks kohezije i prosječna čvrstoća kolača kao svojstva tečenja. Već je primjenom regresijskih modela utvrđeno da je najveći utjecaj na fizikalna svojstva ima masa dodanog bjelanjka, dok je u nekim slučajevima zabilježen i utjecaj dodanog ekstrakta (primjerice na svojstva  $d(0,5)$  i  $d(0,9)$ ). Primjenom optimiranja utvrđeni su sljedeći uvjeti procesa primjenom kojih se dobivaju prahovi sa poželjnim fizikalnim svojstvima: 40 g bjelanjka, 5 % ekstrakta i miješanje u trajanju od 5 minuta.

Rezultati optimiranja procesa sušenja u pjenu za dobivanje proizvoda s optimalnim rekonstitucijskim svojstvima u vidu disperzibilnosti i topljivosti prikazani su na slici 15.

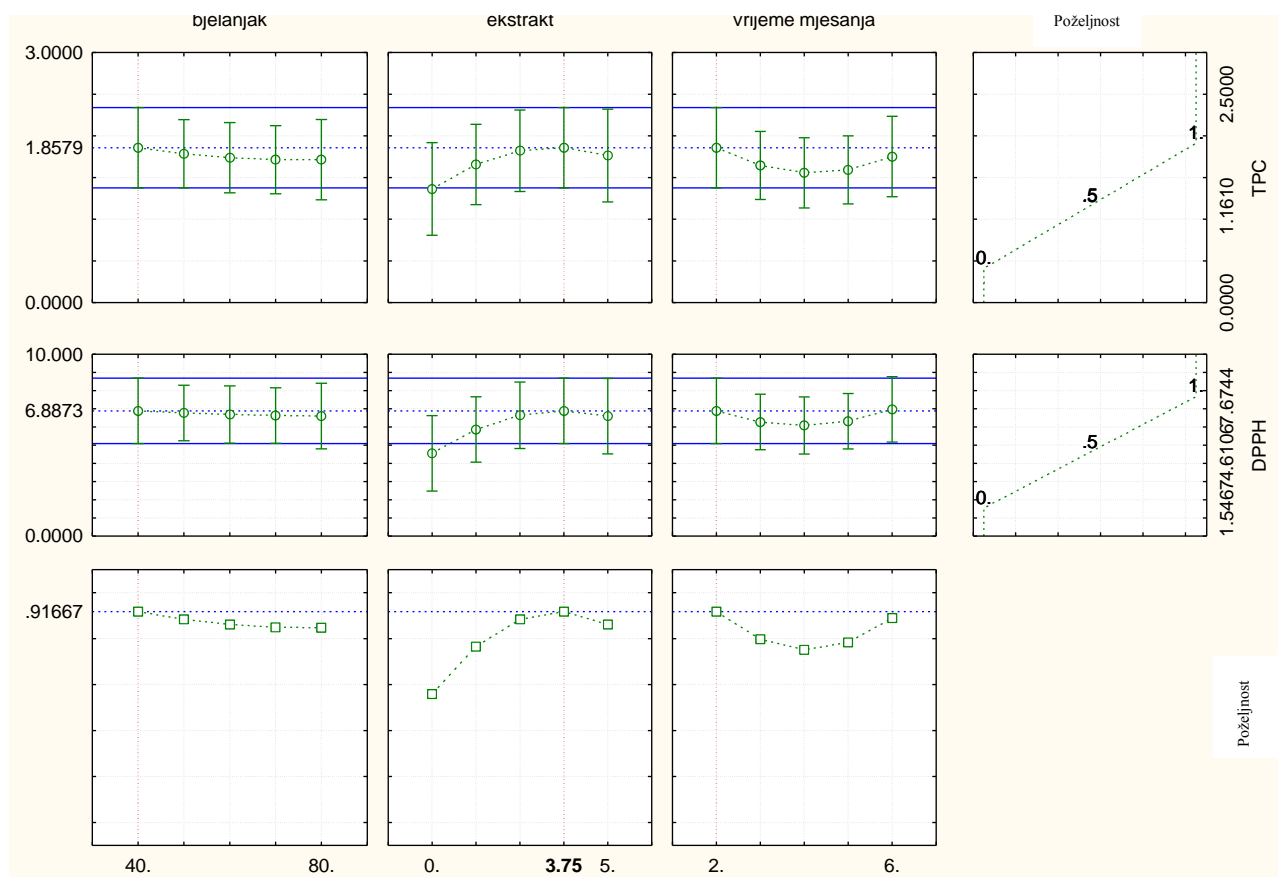


**Slika 15.** Rezultati optimiranja procesa sušenja u pjenu za rekonstitucijska svojstva (disp= disperzibilnost, sol= topljivost)

Kako bi kakao proizvod bio privlačan krajnjim kupcima izrazito je bitno da ima dobra rekonstitucijska svojstva. To je naročito bitno budući da je poznata činjenica da kakao, zbog povećanog sadržaja masti, ima lošu topljivost i disperzibilnost te se primjenjuju različite metode instantizacije (sušenje raspršivanjem, liofolizacija) kako bi mu se poboljšala

rekonstitucijska svojstva (De Muijnck, 2005). Provedbom optimiranja utvrđeni su sljedeći optimalni uvjeti: 80 g bjelanjka, 3,75 % ekstrakta te 2 minute miješanja. Ovdje je potrebno napomenuti da, kao što je i prije bilo navedeno, veća masa dodanog bjelanjka ujedno i znači povećanje vremena potrebnog za disperzibilnost, te je stoga tak parametar potrebno optimirati kako bi se dobio čim niža moguća vrijednost disperzibilnosti. U takvom slučaju na optimum je potrebno gledati iz drugačije perspektive: manja masa bjelanjka znači i bolju rekonstituciju. Drugim riječima, unatoč prikladnosti programskog sustava Statistica za provedbu optimiranja, u ovom je slučaju potrebno napomenuti da dobiveni optimum ne odgovara stvarnom stanju stvari te je pravi optimum mase bjelanjaka zapravo 40 grama.

Rezultati optimiranja s obzirom na kemijska svojstva mješavina prikazani su na slici 16.

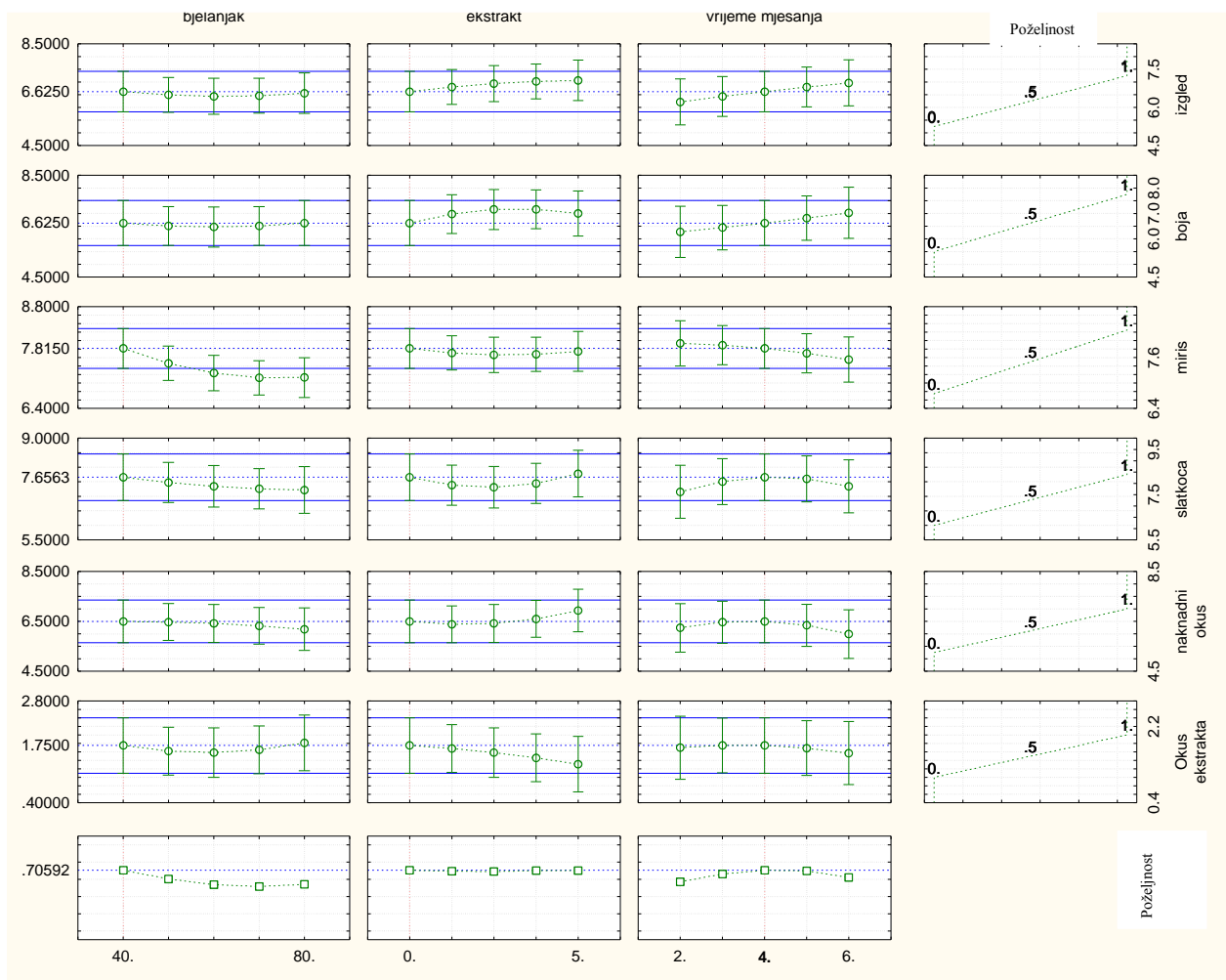


**Slika 16.** Rezultati optimiranja procesa sušenja u pjenu za kemijska svojstva (TPC predstavlja ukupne polifenole a DPPH antioksidacijski kapacitet)

Razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda provodi se zbog dva razloga. Prvi je da se proizvodu koji nema funkcionalna svojstva ta svojstva daju dodatkom funkcionalnih sastojaka, a drugi je da se već postojećem funkcionalnom proizvodu poboljšaju već prisutna

funkcionalna svojstva (Lofti i sur., 1996). U ovom se slučaju kakao prahu, koji već posjeduje funkcionalna svojstva, dodatno povećava funkcionalnost dodatkom ekstrakta mente. Optimalni sadržaj ekstrakta procijenjen je na 3,75 % uz 40 g bjelanjka i 2 minute miješanja. Bitno je napomenuti da bilo kakav drugi dodatak ekstrakta iznad navedene vrijednosti ne rezultira poboljšanjem kemijskih svojstava funkcionalnih kakao napitaka sušenih u pjenu proizvedenih tijekom provedbe ovog istraživanja.

Senzorska svojstva proizvoda zapravo su ona na temelju kojih krajnji kupac procjenjuje proizvod te je stoga provedeno optimiranje procesa s obzirom na ovu skupinu svojstava. Rezultati su prikazani na slici 17.



**Slika 17.** Rezultati optimiranja procesa sušenja u pjenu za senzorska svojstva

Temeljem prikazanog na slici 17, vidljivo je da su uvjeti procesa kojim se postižu najbolja senzorska svojstva dodatak 40 g bjelanjka, 0 % ekstrakta te 4 minute miješanja. Zanimljiva je opservacija da, kako bi proizvod bio senzorski prihvatljiv, nije potrebno



dodavati ekstrakt. Naime, iako se pokazalo da dodatak ekstrakta do koncentracije 3,75 % doprinosi poboljšanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, senzorskom analizom nije primijećena razlika u okusu, mirisu i ostalim senzorskim svojstvima gotovog proizvoda.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Upotrebom bjelanjka kao sredstva za pjenjenje dobivena je pjena odlične stabilnosti.
2. Postotak ekstrakta i masa bjelanjka u smjesi imaju obrnuto proporcionalni utjecaj na gustoću pjene.
3. Sastav kakao smijese ima statistički značajan utjecaj na svaki promatrani parametar raspodjele veličine čestica.
4. Postotak vlage u konačnom praškastom proizvodu pokazuje obrnuto proporcionalnu ovisnost o masi bjelanjka u smjesi.
5. Povećanje mase bjelanjka ima negativan utjecaj na disperzibilnost i indeks kohezije.
6. Dodatkom šećera i bjelanjka u kakao smjesu smanjuje se udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet.
7. Dodatak više od 3,75% ekstrakta mente ne rezultira poboljšanjem kemijskih svojstava funkcionalnih kakao napitaka.
8. Dodatak ekstrakta mente nema utjecaj na senzorska svojstva funkcionalnih kakao napitaka.
9. Optimalan sastav smjese za dobivanje funkcionalnog praškastog kakao proizvoda sa što boljim fizikalnim, kemijskim i senzorskim svojstvima je slijedeći: 50 g temeljne smjese (70 % saharoza i 30 % kakao praha), 40 g bjelanjka, 3,75 % ekstrakta i 3,5 minute miješanja.

## 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.

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.

Acs, K., Balazs, V. L., Kocsis, B., Bencsik, T., Boszormenyi, A., Horvath, G. (2018) Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complem. Altern. M.* **18**, 227 – 236.

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

Afoakwa, O. E., Quao, J., Simpson Budu, A., Takrama, J., Saalia, F., K. (2011) Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Int. J. food Sci. Nutr.* **62**, 755-764.

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

AOAC (1995) Official methods of analysis, Association of Analytical Chemist, **16th ed.**, Arlington VA, USA

Aprotosoai, A. C., Luca, S. V. I Miron, A. (2014) Flavor chemistry of cocoa and cocoa products. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **15**, 73-91.

Arslan, D., Ozcan, M. M., Menges, H. O. (2010) Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Energ. Convers. Manage.* **51**, 2769 – 2775.

Arzhavitina, A. i Steckel, H. (2010) Foams for pharmaceutical and cosmetic application. *Int. J. Pharm.* **394**, 1 – 17.

Bailey, R. (2005) Functional foods in Japan: FOSHU (“Foods for Specific health Uses”) and “Foods with Nutrient Function Claims”. U: Regulation of Functional Foods and Nutraceuticals (Hasler, C. M., ured.), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, str. 247 – 261.

Barbosa, J. I Teixeira, P. (2017) Development of probiotic fruit juice powders by spray drying: a review. *Food Rev. Int.* **33**, 335 – 358.

Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. (2005) Food Powders, Physical Properties, Processing and Functionality, 1. izd., Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Bech – Larsen, T. i Grunert, K. G. (2003) The perceived healthiness of functional foods: A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. *Appetite.* **40**, 9 – 14.

Beg, M.S., Ahmas, S., Jan, K., Bashir, K. (2017) Status, supply chain and processing of cocoa -a review. *Trends. Food Sci. Tech.* **66**, 108 – 116.

Belščak-Cvitanović, A., Benković, M., Komes, D., Bauman, I., Horžić, D., Dujmić, F., Matijašec, M. (2010) Physical Properties and Bioactive Constituents of Powdered Mixtures and Drinks Prepared with Cocoa and Various Sweeteners. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7187 – 7195.

Benković, M., Bauman, I. (2011) Agglomeration Of Cocoa Powder Mixtures – Influence Of Process Conditions On Physical Properties Of The Agglomerates. *J. Process Energy Agr.* **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. and Technol.* **64**, 140-148.

Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow Properties of Commonly Used Food Powders and Their Mixtures. *Food Bioprocess. Technol.* **6**, 2525 – 2537.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Sci. Technol.* **28**, 25.

- Caligiani, A., Marseglia, A., Palla, G. (2015) Cocoa: Production, Chemistry and Use, U: Encyclopedia of food and health (Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, 2016, str. 185-190.
- Chen, Y. L. i Chou, J. Y. (1993) Selection of anticaking agents through crystallization. *Powder Technol.* **77**, 1-6.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., Luscher, T. F. (2009) Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation.* **119**, 1433 – 1441.
- Crozier, S. J., Preston, A. G., Hurst, J. W., Payne, M. J., Mann, J., Hainly, L., Miller, D. L., (2011) Cacao seeds are a “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products, *Chem. Cent. J.***5**, 1-6
- De Almeida, A.A.F. i Valle, R. R. (2007) Ecophysiology of the cacao tree. *Braz. J. Plant Psihol.* **19(4)**, 425-448.
- De Bertorelli, O. L., De Farinas, G. L., Rovedas, G. L. (2009) Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agron. Trop.* **59**, 119–127.
- De Freitas, B. S. M., Cavalcante, M. D., Cagnin, C., Da Silva, R. M., Placido, G. R., De Oliveira, D. E. C. (2018) Physical-chemical characterization of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) foam-mat drying at different temperatures. *Rev. Bras. Eng .Agr. Amb.* **22**, 430 – 435.
- De Muijnck, L. (2005) Cocoa. U: Encapsuled and Powdered Foods (Onwulata, C., ured.), CRC Press, Boca Raton, FL, str. 451-473.
- Dehghannya, J., Pourahmad, M., Ghanbarzadeh, B., Ghaffari, H. (2018) Influence of foam thickness on production of lime juice powder during foam-mat drying: Experimental and numerical investigation. *Powder Technol.* **328**, 470 – 484.
- Diplock. A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Robertfroid, M. B. (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus document. *Brit. J. Nutr.* **81**, S1 – S27.

- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R. (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr.* **133**, 1286 – 1290.
- Duan, X., Yang, X., Ren, G., Pang, Y., Liu, L., Liu, Y. (2016) Technical aspects in freeze-drying of foods. *Dry Technol.* **34**, 1271 - 1285.
- Duband, F., Carnat, A.P., Carnat, A., Petitjean- Freytet, C., Clair, G., Lamaison, J.L. (1992) The aromatic and polyphenolic composition of peppermint (*Mentha piperita* L.) tea. *Ann. Pharm. Fr.* **50**, 146-155.
- Dugo, L., Belluomo, M. G., Fanali, C., Russo, M., Cacciola, F., MacCarrone, M., Sardenelli, A. M. (2017) Effect of cocoa polyphenolic extract on macrophage polarization from proinflammatory M1 to anti-inflammatory M2 state. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1-11.
- Fadavi, A. i Beglaryan, R. (2013) Optimization of UF-Feta cheese preparation, enriched by peppermint extract. *J. Food Sci. Tech.* **52**, 952 – 959.
- 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.
- Fowler, M. S. (1999) Cocoa beans: from tree to factory. U: Industrial chocolate manufacture and use, 3 izd. ( Beckett, S. T. ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 8 - 35.
- 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, SAD, str. 10-47.
- Giacometti, J., Jolić, S.M., Josić, D. (2014) Cocoa Processing and Impact on Composition. U: Processing and Impact on Active Components in Food (Preedy, V., ured.), Elsevier Inc., Philadelphia, str. 605 – 612.
- Gluszek, J. i Kosicka, T. (2014) The effect of coffee, tea, cocoa on blood pressure and cardiovascular system. *Nadcisnienie Tetnicze.* **18**, 1-8.
- Gockowski, J., Afari-Sefa, V., Sarpong, D. B., Osei-Asare, Y. B., Agyeman, N. F. (2013) Improving the productivity and income of Ghanaian cocoa farmers while maintaining environmental services: what role for certification? *Int. J. Agric. Sustain.* **11**, 331-346.

Goula, A. M. i Adamopoulos, K. G. (2006) Retention of ascorbic acid during drying of tomato halves and tomato pulp. *Dry Technol.* **24**, 57 - 64.

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

Gutierrez, T.J. (2017) State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **16**, 1313 – 1344.

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

Hu, M. (2007) Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Mol. Pharm.* **4**, 803 – 806.

Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuglu, M., Baser, K. H. C., Demirci, F. (2002) Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3943 – 3946.

Kadam, D. M. i Balasubramanian, S. (2011) Foam mat drying of tomato juice. *J. Food Process. Pres.* **35**, 488 - 495.

Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Alvaro, M. Viljoen, A., M., Lawrence, B., M. (2013) Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry.* **96**, 15-25.

Karam, M. C., Petit,J., Zimmer, D., Djantou, E. B., Scher, J. (2016) Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *J. Food Eng.* **188**, 32 - 49.

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

Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Wallw, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016) Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *Food Res. Int.* **82**, 44-52.

Karaš < <http://www.kras.hr/hr/proizvodi/djecji-asortiman/kras-express>> Pristupljeno 3.9.2018.

- Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., Sarbatly, R. (2014) A critical review on the spray drying of fruit extract: Effect of additives on physiochemical proprieties. *Crit. Rev. Food Sci.* **54**, 449 - 473.
- Kumar, V., Kaur, J., Panghal, A., Kaur, S., Handa, V. (2018) Caffeine: a boon or bane. *Nutri. Food Sci.* **48**, 61-75.
- 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.
- Li, Y., Zhu, S., Feng, Y., Xu, F., Ma, Y., Zhong, F. (2014) Influence of alkalization treatment on the color quality and the total phenolic and anthocyanin contents in cocoa powder. *Food Sci. Biotech.* **23**, 59 – 63.
- Lima, J. R. L., Almeida, H. M., Nout, M. J. R., Zwietering, H. M. (2011) Theobroma cacao L., “The Food of the Gods”: Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans. *Crit. Rev. Food Sci.* **51**, 731–761.
- Lofti, M., Venkatesh Mannar, M. G., Merx, R., Naber, van den Heuvel, P. (1996) Micronutrient fortification of foods – Current practices, research and oppotunities.
- Lomakina, K. i Mikova, K. (2006) A study of the factors affecting the foaming properties of egg white – a review. *Czech. J. Food Sci.* **24**, 110 – 118.
- Lopez, A. S. i Dimick, P. S. (1995) Cocoa fermentation. U: Biotechnology, 2. Izd. (Rhem, H. J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P., ured.), VCH, Weinheim, Njemačka, str. 561 – 557.
- Loullis, A. i Pinakoulaki, E. (2018) Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications, *Eur. Food Res. Technol.* **244**, 959 – 977.
- Lozak, A., Soltyk, K., Ostapczuk, P., Fijalek, Z. (2002) Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. *Sci. Total Environ.* **289**, 33 – 40.
- Mahrizal, Nalley, L. L., Dixoni, B. L., Popp, J. S. (2014) An optional phased replanting approach for cocoa trees with application to Ghana. *Agr. Econ.* **45**, 291-302.



- McKay, D. L. i Blumberg, J. B. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phyto. Res.* **20**, 619 – 633.
- Menrad, K. (2003) Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.* **56**, 181-188.
- Micale, R., Giallanza, A., Enea, M., La Scalia, G. (2018) Economic assessment based on scenario analysis for the production of a new functional pasta. *J. Food Eng.* **237**, 171-176.
- Mleko, S., Kristinsson, H.G., Liang, Y., Gustaw, W. (2007) Rheological properties of foams generated from egg albumin after pH treatment. *Lwt-Food Sci. Technol.* **40**, 908 - 914.
- Moreira, G. E. G., Maia Costa, M. G., de Souza, A. C. R., de Brito, E. S., de Fatima, M.d.D., Azeredo, H. M. C. (2009) Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *LWT - Food Sci. and Technol.* **42**, 641-645.
- Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Calvet, R., Cuq, B., Scher, J. (2012) Food powders: Surface and form characterization revisited. *J. Food Eng.* **112**, 1 - 21.
- Narsimhan, G. i Xiang, N. (2018) Role of Proteins on Formation, Drainage, and Stability of Liquid Food Foams. *Annu. Rev. Food Sci T.* **9**, 45 – 63.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., Said, M. (2006) Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Ind. Crop. prod.* **24**, 87-94.
- Nestle - <https://www.nestle.hr/brands/nesquik/nesquikprah> Pristupljeno 3.9.2018.
- Oleaga, C., García, M., Solé, A., Ciudad, C. J., Izquierdo-Pulido, M., & Noé, V. (2012) CYP1A1 is over expressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic. *Euro. J. Nutri.* **51**, 465- 476.
- Omobuwajo, T. O., Busari, O. T., Osemwegie, A. A. (2000) Thermal agglomeration of chocolate drink powder. *J. Food Eng.* **46**, 73 – 81.
- Prabhakaran Nair, K. P. (2010) Cocoa (*Theobroma cacao* L.). U: The agronomy and economy of important tree crops of the developing world (Prabhakaran Nair, K. P. , ured.), Elsevier, London, str 132 – 180.

- Rajkumar P., Kailappan R., Viswanathan R., Raghavan G. S. V., Ratti C. (2007a) Foam Mat Drying of Alphonso Mango Pulp. *Dry Technol.* **25**, 357-365.
- Rajkumar, P., Kailappan, R., Viswanathan, R., Raghavan, G. S. V., (2007b), Drying characteristics of foamed alphonso mango pulp in a continuous type foam mat dryer, *J. Food Eng.* **79**, 1452-1459.
- Ramiro- Puig, E. I Castell, M. (2009) Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Brit. J. Nutr.* **101**, 931-940.
- 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**, 1115 – 1125.
- Riachi, L. G. i De Maria, C. A. B. (2015) Peppermint antioxidants revisited. *Food Chem.* **176**, 72 – 81.
- Risterucci, A. M., Grivet, L., N'Goran, J.A.K., Pieretti, I., Flament, M. H., Lanaud, C. (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 948-955.
- Roberfroid, M. B. (2000) A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. *Nutrition.* **16**, 689 – 691.
- Rodriguez-Hernandez, G. R., Gonzalez-Garcia, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M.A. (2005) Spray drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Tech.* **23**, 955 - 973
- Rusconi, M., Conti, A. (2010) *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol. Res.* **61**, 5-13.
- Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S. (2013) Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control.* **29**, 167 - 187.
- Sankat, C. K. i Castaigne, F. (2004) Foaming and drying behaviour of ripe bananas. *Lwt-Food Sci. Technol.* **37**, 517-525.

- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.* **23**, 302 - 315.
- Schubert H. (1993) Instantization of powdered food products. *Int. Chem. Eng.* **33**, 28- 45.
- Schwan, R. F. i Wheals, A. E. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci.* **44**, 205–221.
- Schwan, R. F. i Wheals, A. E. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci.* **44**, 205–221.
- Serafini, M., Peluso, I. (2016) Functional foods for health: The interrelated antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, species and cocoa in humans. *Curr. Pharm. Design.* **22**, 6701-6715.
- Shaari, N. A., Sulaiman, R., Rahman, R. A., Bakar, J. (2018) Production of pineapple fruit (*Ananas comosus*) powder using foam mat drying: Effect of whipping time and egg albumen concentration. *J. Food Process. Pres.* **42**, e13467.
- Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P., Teixeira, P. (2011) Spray drying for the production of dried cultures. *Int. J. Dairy Technol.* **64**, 321 - 335.
- Singleton, V. L. Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite.* **51**, 456 – 467.
- Stein, A. J. i Rodriguez – Cerezo (2008, kolovoz) Functional Food in the European Union, <<http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=1719>>. Pristupljeno 14. Kolovoza 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.
- Tabernero, M., Serrano, J., Saura-Calixto, F. (2006) The antioxidant capacity of cocoa products: contribution of the Spanish diet. *Int. J. food Sci. Tech.* **41**, 28-32.

- Thuwapanichayanan, R., Prachayawarakorn, S., Soponronnarit, S. (2008) Drying characteristics and quality of banana foam mat. *J. Food Eng.* **86**, 573 - 583.
- Townsend, A. A. i Nakai, S. (1983) Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.* **48**, 588 – 594.
- Vadivambal, R. i Jayas, D. S. (2007) Changes in quality of microwave-treated agricultural products-a review. *Biosyst. Eng.* **98**, 1 – 16.
- Vissotto, F. Z., Montenegro, F. M., Dos Santos, J. M., Rodrigues de Oliveira S. J. (2006) Evaluation of the influence of lecithination and agglomeration on the physical properties of a cocoa powder beverage (cocoa powder beverage lecithination and agglomeration). *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.* **26**, 666-671.
- Vlachojannis, J., Erne, P., Zimmermann, B., Chrubasik- Hausmann, S. (2016) The impact of cocoa flavonols on cardiovascular Health. *Phytother. res.* **30**, 1641-1657.
- Wollgast, J. i Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* **33**, 423-447.
- Zaia, M. G., Cagnazzo, T. O., Feitosa, K. A., Soares, E. G., Faccioli, L. H., Allegretti, S. M., Afonso, A., Anibal, F. F. (2016) Anti-inflammatory properties of menthol and menthone in *Schistosoma mansoni* infection. *Front. Pharmacol.* **7**, 170.
- Zayas, J. F. (1997) *Functionality of proteins in food*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Zdunczyk, Z. i Jankowski, J. (2013) Poultry meat as functional food: Modification of the fatty acid profile – a review. *Ann. Anim. Sci.* **13**, 463 – 480.

## Izjava o izvornosti

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

---

(ime i prezime studenta)