

# Utjecaj prirodnih zamjenskih sladila na bioaktivna i senzorska svojstva čokolada

---

**Bernat, Miroslava**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:459371>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2020.

Miroslava Bernat 1074/N

**UTJECAJ PRIRODNIH  
ZAMJENSKIH SLADILA NA  
BIOAKTIVNA I SENZORSKA  
SVOJSTVA ČOKOLADA**

Rad je izrađen u Odjelu razvoja novih proizvoda Kraš d.d. prehrambena industrija te u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambena-tehnološko inženjerstvo Prehrambena-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes.

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Draženki Komes, za pomoć u otvaranju puta u prehrambenu industriju Kraš d.d., a posebno na nesebično udijeljenom vremenu i korisnim stručnim savjetima tijekom planiranja i izvođenja eksperimenata te pisanja samoga rada. Ljudski pristup i srdačnost su mi, uz ustupljeno znanje, bili velika motivacija za savladavanje svih prepreka u obradi ove teme.

Zahvalu dugujem Ani Manduri mag. ing. techn. aliment. za stručne savjete pri izvedbi eksperimenata te prijateljskom poticanju prilikom izrade samoga rada.

Zahvaljujem se i Ivani Abramović, dipl. ing. prehrambena industrija Kraš d.d., na pomoći tijekom izrade čokoladnih masa i prikupljanju rezultata.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ PRIRODNIH ZAMJENSKIH SLADILA NA BIOAKTIVNA I SENZORSKA SVOJSTVA ČOKOLADA

*Miroslava Bernat, 1074/N*

**Sažetak:** Promjene prehrambenih navika potrošača rezultirale su potrebom razvoja konditorskih proizvoda, uključujući čokoladu, u čijem sastavu je saharoza zamijenjena drugim prirodnim sladilima. Cilj ovoga rada bio je proizvesti čokolade s četiri prirodna zamjenska sladila te ispitati utjecaj njihovog dodatka na fizikalno-kemijska, bioaktivna i senzorska svojstva čokolada s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova. U tu svrhu u recepturama čokolada saharoza je zamijenjena agavinim i kokosovim šećerom te rižinim i ječmenim sladom. U karakterizaciji parametara čokolade primijenjene su standardne analitičke (udio vode, proteina, masti), spektrofotometrijske (udio bezmasne suhe tvari, neflavonoida, flavanoida, flavan-3-ola, proantocijanidina, antioksidacijski kapacitet), kromatografske (udio šećera, teobromina, kafeina, epikatehina) i senzorske metode. Čokolade s 59,69% kakaovih dijelova imale su bogatiji bioaktivni profil te veći udio masti, proteina, bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i manji udio šećera u odnosu na čokolade s 49,69% kakaovih dijelova. Primjena zamjenskih sladila povećala je bioaktivna svojstva čokolada u odnosu na čokoladu sa saharozom, što je posebno izraženo kod čokolada s 59,69% kakaovih dijelova uz dodatak rižinog slada i kokosovog šećera. Uz čokoladu s 59,69% kakaovih dijelova sa saharozom, senzorski je najbolje ocijenjena čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom, a najlošije čokolada s 59,69% kakaovih dijelova uz dodatak agavinog šećera.

**Ključne riječi:** čokolada, polifenoli, prirodna sladila, rižin slad, saharoza, senzorska analiza

**Rad sadrži:** 74 stranica, 42 slike, 5 tablica, 170 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Draženka Komes

**Pomoć pri izradi:** Ana Mandura mag. ing. techn. aliment.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
2. Prof. dr. sc. Draženka Komes
3. Prof. dr. sc. Zvonimir Štalić
4. Prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjena)

**Datum obrane:** 29. travnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### IMPACT OF NATURAL SUBSTITUTE SWEETENERS ON BIOACTIVE AND SENSORY PROPERTIES OF CHOCOLATES

*Miroslava Bernat, 1074/N*

**Abstract:** Changes in consumer eating habits have resulted in the need to develop confectionery products, including chocolate, in which sucrose has been replaced by other natural sweeteners. The aim of this study was to produce chocolates with four natural sweeteners as sucrose alternatives and to examine the effect of their addition on the physicochemical, bioactive and sensory properties of chocolates with 49,69% and 59,69% cocoa parts. To this end, sucrose chocolate in the formulations was replaced by agave sugar, coconut sugar, rice and barley malt. In the characterization of chocolate parameters, standard analytical (content of water, protein and fat), spectrophotometric (content of nonfat cocoa solids, neoflavonoids, flavanoids, flavan-3-ol, proanthocyanidin, antioxidant capacity), chromatographic (content of theobromine, caffeine and epicatechin) and sensory methods were used. Chocolates with 59,69% cocoa parts had a greater bioactive profile and a higher content of fats, proteins, nonfat cocoa solids and lower sugar content than chocolates with 49,69% cocoa parts. The use of natural sweeteners as sucrose alternatives in chocolate has increased the bioactive properties in comparison to chocolate with sucrose, which is especially pronounced in chocolates with 59,69% cocoa parts with the addition of rice malt and coconut sugar. The highest rated chocolate in sensory testing is chocolate with 59,69% cocoa parts with sucrose and chocolate with 49,69% cocoa parts with coconut sugar and the lowest rated chocolate is with 59,69% cocoa parts with agave sugar.

**Keywords:** chocolate, natural sweeteners, polyphenols, rice malt, sensory analysis, sucrose

**Thesis contains:** 74 pages, 42 figures, 5 tables, 170 references, 1 supplement

**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 Draženka Komes, Full professor

**Technical support and assistance:** Ana Mandura, mag. ing. techn. aliment.

#### **Reviewers:**

1. PhD Ksenija Marković, Full professor
2. PhD Draženka Komes, Full professor
3. PhD Zvonimir Štalić, Full professor
4. PhD Nada Vahčić, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** April 29, 2020

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1. FUNKCIONALNA HRANA</b> .....	<b>1</b>
<b>2.2. POVIJEST RAZVOJA ČOKOLADE</b> .....	<b>2</b>
<b>2.3. POLIFENOLI U KAKAOVOM ZRNU I NJIHOVA BIORASPOLOŽIVOST</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4. POLIFENOLI I UTJECAJ NA ZDRAVLJE</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5. SAHAROZA U ČOKOLADI</b> .....	<b>6</b>
<b>2.6. ALTERNATIVNI IZVORI SLATKOĆE U ČOKOLADI</b> .....	<b>8</b>
2.6.1. Ekstenzivna sladila.....	8
2.6.2. Intenzivna sladila .....	11
<b>2.7. NOVITETI U KONDITORSKOJ INDUSTRIJI</b> .....	<b>13</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	<b>16</b>
3.1.1. Razvoj receptura i proizvodnje čokolada.....	16
3.1.2. Kemikalije.....	16
3.1.3. Pribor i aparatura.....	19
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>21</b>
3.2.1. Formiranje ankete .....	21
3.2.2. Proizvodnja čokolada.....	21
3.2.3. Određivanje udjela suhe tvari .....	21
3.2.4. Određivanje udjela ukupnog i direktnog inverta po Luff-Schoorlu .....	22
3.2.5. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahl-u .....	24
3.2.6. Određivanje udjela ukupne masti po Soxhlet-u .....	24
3.2.7. Određivanje udjela bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova .....	25
3.2.8. Priprema uzoraka za određivanje bioaktivnog sastava .....	26
3.2.9. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC).....	27
3.2.10. Određivanje udjela ukupnih flavonoida i neflavonoida .....	28
3.2.11. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s <i>p</i> -dimetilamino-cinamaldehydom ( <i>p</i> -DAC) reagensom .....	28
3.2.12. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom.....	29
3.2.13. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina metodom po Bate-Smithu .....	29
3.2.14. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	30
3.2.15. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	31
3.2.16. Određivanje udjela teobromina, kafeina i (-)-epikatehina HPLC-DAD metodom .....	31
3.2.17. Senzorska analiza.....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1. REZULTATI ANKETE</b> .....	<b>35</b>



<b>4.2. SASTAV ŠEĆERA U ČOKOLADAMA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI ČOKOLADA .....</b>	<b>47</b>
4.3.1. Udio proteina i masti.....	47
4.3.2. Udio vode.....	48
4.3.3. Udio ukupnog i direktnog inverta .....	49
4.3.4. Udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova.....	51
<b>4.4. BIOAKTIVNI SASTAV ČOKOLADA .....</b>	<b>51</b>
4.4.1. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida.....	51
4.4.2. Udio ukupnih flavan-3-ola .....	53
4.4.3. Udio ukupnih proantocijanidina.....	54
4.4.4. Antioksidacijski kapacitet .....	55
4.4.5. Korelacijski koeficijenti .....	56
4.4.6. Udio teobromina, kafeina i (-)-epikatehina određen HPLC-DAD metodom.....	57
<b>4.5. SENZORSKA ANALIZA.....</b>	<b>58</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>60</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>61</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>72</b>
<b>7.1. ANKETA O KONZUMACIJI ČOKOLADE.....</b>	<b>72</b>

# 1. UVOD

Funkcionalna hrana definira se kao hrana koja, uz svoju osnovnu nutritivnu ulogu, ima dokazanu ulogu u očuvanju zdravlja (Doyon i Labercque, 2008). Čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova zahvaljujući visokom udjelu polifenola također se ubraja u funkcionalnu hranu jer dokazano smanjuje rizik od pojave depresije, dijabetesa tip 2, nekih tipova raka, a dokazana je i obrnuta povezanost između konzumacije čokolade i incidencije kardiovaskularnih bolesti te srčanog udara (Álvarez i sur., 2012; Jackson i sur., 2019; Mooradian i sur., 2017; Roura i sur., 2007).

Polifenoli su najpoznatiji prirodni antioksidansi, u niskom udjelu zastupljeni i u čokoladi te je njihov udio proporcionalan antioksidacijskoj aktivnosti čokolade (Crozier i sur., 2011). Na udio polifenola u kakaovom zrnju i čokoladi utječu brojni unutarnji i vanjski faktori poput sorte, uvjeta uzgoja, načina procesiranja kakaovog zrna te procesa proizvodnje čokolade (Saltini i sur., 2013; Wollgast i Anklam, 2000).

U kontekstu funkcionalne hrane, uz razinu polifenola, u čokoladi je posebna pažnja usmjerena i na ostale sirovine korištene u proizvodnji, kao što su masti, emulgatori te posebice vrsta i udio šećera. Naime, rastuća pojava pretilosti i dijabetesa tipa 2 te kroničnih bolesti koje se povezuju s konzumacijom saharoze, stavljaju svojevrni izazov pred konditorsku industriju da udio saharoze u čokoladi smanji ili u potpunosti zamijeni sladilima poput šećernih alkohola, prirodnih i intenzivnih sladila. Proizvodnja čokolada sa zamjenskim sladilima u globalnim razmjerima još uvijek je relativno mala, u odnosu na proizvodnju čokolade sa saharozom, ali tendencije uporabe sladila uzlaznog su karaktera nagovještavajući širenje asortimana takvih proizvoda u narednim godinama (Vahedi i Mousazadeh, 2016).

Sukladno tendencijama suvremenog tržišta funkcionalnih proizvoda, sve više proizvoda, uključujući čokoladu, na pakiranju ima oznake „*low sugars*“, „*sugars free*“, „*Fair Trade*“ i „*organic*“ kako bi se naglasila dodana vrijednost proizvoda i omogućio probitak na tržište. I dok je povećana svijest potrošača o zdravlju ranije utjecala na porast potražnje za čokoladama povećanog udjela kakaovih dijelova, u novije vrijeme tom zahtjevu se pridaje i niža energijska vrijednost i/ili prisustvo zamjenskih sladila u recepturama.

Cilj ovoga rada je proizvesti čokolade s prirodnim zamjenskim sladilima te ispitati utjecaj njihovog dodatka na fizikalno-kemijska, bioaktivna i senzorska svojstva čokolada s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova.

U tu svrhu u recepturama čokolada saharozu će se zamijeniti agavinim i kokosovim šećerom te rižinim i ječmenim sladom, a rezultati će se usporediti sa standardnim uzorkom (sa saharozom).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FUNKCIONALNA HRANA

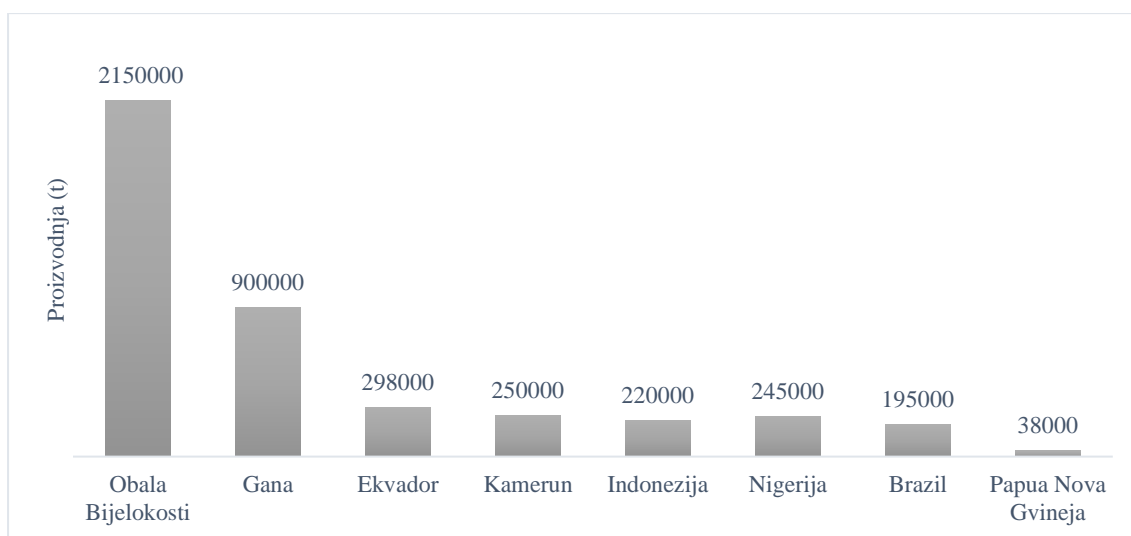
Pojam funkcionalna hrana odnosi se na hranu koja sadrži bioaktivne komponente za koje je dokazano da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi. Pojam se prvotno počeo koristiti u Japanu 1980-ih godina, a označavao je proizvode kojima su dodani sastojci koji imaju pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi (Hardy, 2000). Funkcionalna hrana pored svoje nutritivne vrijednosti, zahvaljujući sastavu, na pozitivan način utječe na jednu ili više ciljanih funkcija organizma smanjujući rizik od pojave bolesti. Može se proizvesti dodavanjem komponenata koje djeluju pozitivno na zdravlje (obogaćivanje voćnih sokova mineralnim tvarima ili vlaknima) ili uklanjanjem tzv. „nepoželjnih“ komponenata (smanjivanje udjela saharoze u čokoladi ili potpuna zamjena nekim drugim sladilom). Iako postoje različite podjele funkcionalne hrane, najčešće je podjela na:

- 1) nemodificirana i neprerađenu hrana koja se pojavljuje u svom izvornom obliku (voće, povrće, začini)
- 2) proizvodi obogaćeni nutrijentima koji se prirodno nalaze u hrani (voćni sokovi s vitaminima A, C, E, mlijeko s vitaminom D)
- 3) proizvodi obogaćeni nutrijentima koji se prirodno ne nalaze u hrani (margarin sa sterolima, voćni sokovi s dodatkom kalcija)
- 4) izmijenjeni proizvodi kojima je postojeći antinutrijent zamijenjen s nutrijentom s povoljnim učinkom (vlakna kao zamjena za masti)
- 5) poboljšani proizvodi (kukuruz s visokim udjelom lizina, krumpir s karotenoidima) (Friganović i sur., 2011; Kotilainen i sur., 2006; Spence, 2006)

Prema danoj klasifikaciji čokolada kojoj se povećava udio kakaovih dijelova smatrana je poboljšanim ili izmijenjenim proizvodom jer se na taj način smanjuje udio šećera i povećava udio flavonoida u čokoladi. Istraživanja na području znanosti o prehrani potvrdila su brojne zdravstvene dobrobiti konzumacije čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova na zdravlje čovjeka (prevencija kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, depresije i nekih tipova raka) zahvaljujući visokom udjelu flavonoida (Ding i sur., 2006).

## 2.2. POVIJEST RAZVOJA ČOKOLADE

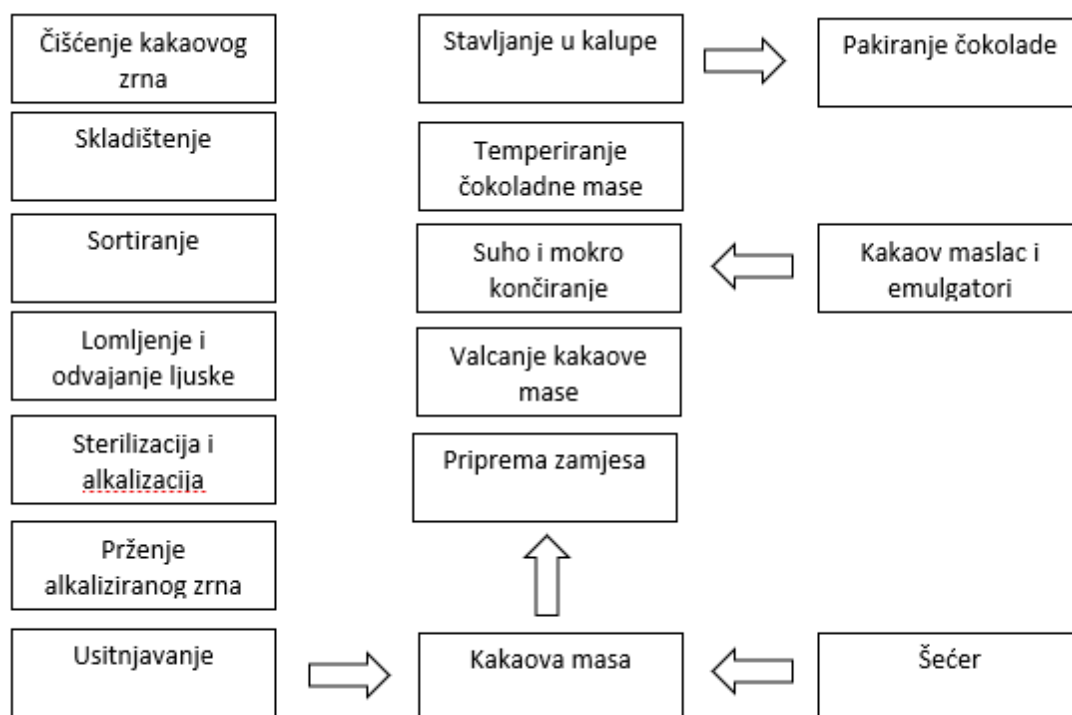
Plod biljke kakaovca *Theobroma cacao* L. sirovina je za proizvodnju najpoznatijeg i najpoželjnijeg prehrambenog proizvoda, čokolade. O važnosti i značaju kakaovca dovoljno govori činjenica da prijevod naziva *Theobroma cacao* znači hrana bogova. Biljka kakaovac potječe iz srednje i južne Amerike, a najbolje uspijeva u pojasu između 20° sjeverno i 20° južno od ekvatora i najviše se uzgaja u Africi. Proizvodnja kakaovog zrna prema najvećim proizvođačima za 2018/19. godinu prikazana je na slici 1.



Slika 1. Proizvodnja kakaovog zrna po državama za 2018/19. godinu (Statista 1, 2020)

Podrijetlo kakaovog zrna datira iz vremena civilizacija Maya i Asteka koji su ga koristili kao bazu gorkog čokoladnog napitka, a koristio se u terapijske i medicinske svrhe (Dillinger i sur., 2000). Asteški naziv za čokoladni napitak bio je *chocolatl* iz kojeg je izveden i sam naziv čokolade (Goldoni, 2004). Napitak se pripremao tako da se provotno zamijesila pogača od prženih i mljevenih kakaovih zrna, kukuruza i začina, a dio te pogače miješao se s vodom. Zrna su se, osim kao baza gorkog čokoladnog napitka, koristila kao sredstvo razmjene (Prabhakaran Nair, 2010). Prvi zabilježeni „europski susret“ s kakaovcem dogodio se 1502. godine kada je Christopher Columbo zajedno sa svojom posadom naišao na vreću nepoznatih sjemenki bademastog oblika, ne znajući da je riječ o kakaovim zrnima i ne sluteći važnost istih. Pravu vrijednost kakaovih zrna otkrivaju Španjolci 20 godina poslije na čelu s Hernánom Cortésom koji 1528. donosi uzorke čokoladne pogače u Španjolsku. Španjolicima se nije sviđao gorak okus napitka pa su dodavali šećer trske i komercijalizirali napitak postavljajući nasade kakaovca i šećerne trske širom Meksika. Međutim, nisu uspjeli dugo sačuvati tajnu o nasadima kakaovca pa su tako postupno svoje plantaže u kolonijama zasadili Francuzi, Britanci te mnogo kasnije Nizozemci, Portugalci, Nijemci i Belgijanci.

Krajem 18. i početkom 19. stoljeća počele su se otvarati tvornice u kojima se proizvodio čokoladni napitak. Prvi stroj za valcanje kakaove mase postavljen je u tvornici Fry&Sons u Bristolu u Engleskoj, zatim u tvornici Walter Baker&Co. u Massachusettsu (SAD). Tvornice su proizvodile čokoladni napitak u čijoj se izradi iz kakaove mase nije izdvajao kakaov maslac, već se kakaova masa razrjeđivala tvarima bogatim škrobom, slično kao što su radili i Asteci. Coenraad Johannes Van Houten 1822. u svojoj tvornici Van Houten&Zoon napravio je revolucionaran potez koji je značajno utjecao na daljni razvoj industrije čokolade. Naime, njegova tvornica je prešanjem kakaove mase i odvajanjem kakaovog maslaca proizvela prvi kakaov prah. Isprešavanje kakaovog maslaca iz kakaove mase omogućilo je proizvodnju čokolade obradom kakaovog maslaca, kakaove mase i fino mljevenog šećera, a prvu takvu čokoladu proizvela je tvrtka Fry&Sons 1847. godine. Tridestak godina kasnije (1876.) u tvornici Nestlé, Daniel Peter proizveo je prvu mliječnu čokoladu u čvrstom obliku zahvaljujući proizvodnji kondenziranog mlijeka (Goldoni, 2004). Danas se čokolada proizvodi iz kakaove mase, a dodaju joj se sladila, kakaov maslac i emulgatori. Proces se može sažeti u nekoliko glavnih koraka: priprema zamjesa šećera i kakaove mase, valcanje, končiranje, temperiranje i stavljanje u kalupe (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje čokolade (Ferrigno i sur., 2013)

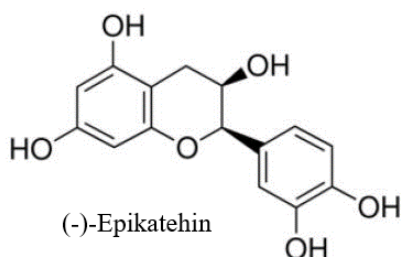
Pravilnikom o kakau i čokoladnim proizvodima (Pravilnik, 2005) definirano je da je čokolada proizvod dobiven od kakaovih proizvoda i šećera koji sadrži najmanje 35% ukupne suhe tvari kakaovih dijelova, uključujući najmanje 18% kakaovog maslaca i najmanje 14% bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova. Minimalni udjeli sastojaka u čokoladi propisani su europskim pravilnicima prije svega Direktivom EZ 2000/36 i navedeni su u tablici 1., a vrijede za sve zemlje članice, uključujući i Hrvatsku.

Tablica 1. Recepture čokolada prema EU direktivi (Direktiva, 2000)

Sastojak	Mliječna čokolada (udio %)	Bijela čokolada (udio %)	Čokolada (udio %)
<b>Kakaova masa</b>	25,0	-	35,0
<b>Kakaov maslac</b>	18,0	20,0	18,0
<b>Bezmasni kakaovi dijelovi</b>	12,0	-	14,0
<b>Biljna mast</b>	5,0	5,0	5,0
<b>Mliječna mast</b>	3,5	3,5	-
<b>Mlijeko u prahu</b>	12	14	-
<b>Ukupne masnoće</b>	31,5	36,4	35,4

### 2.3. POLIFENOLI U KAKAOVOM ZRNU I NJIHOVA BIORASPOLOŽIVOST

Bioaktivni spojevi kakaovog zrna su flavonoidi, a u sirovom kakaovom zrnju najzastupljenije su tri skupine: flavan-3-oli, antocijanini i proantocijanidini (Jinap i sur., 2004). Flavan-3-oli su izomeri katehina i epikatehina, a glavni katehin kakaovog zrna je (-)-epikatehin (slika 3.), koji čini 35% ukupnih polifenolnih spojeva zrna i njegov udio može varirati od 34,65 do 43,27 mg g<sup>-1</sup> svježeg odmašćenog uzorka (Kim i Keeney, 1984).



Slika 3. Strukturna formula najzastupljenijeg polifenola u čokoladi (Dos Reis i sur., 2013.)

Flavan-3-oli kojih u kakaovom zrnu ima manjim udjelima su (+)-katehin, (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin. Antocijaninska frakcija sastoji se od cijanidin-3- $\alpha$ -1-arabinozida i cijanidin-3- $\beta$ -d-galaktozida, a proantocijanidine čine flavan-3,4-dioli, dimeri i trimeri sastavljeni od epikatehina povezanih 4 $\rightarrow$ 8 ili 4 $\rightarrow$ 6 vezama (Belitz i sur., 2004). Udjel polifenola varira ovisno o sorti i postupcima obrade kakaovog zrna i kakaove mase. Forastero sorta u odmašćenoj masi sadrži od 15 do 20% polifenola, a Criolo od 10 do 12% jer ne sadrži antocijanine (Lange i Fincke, 1970). Tijekom fermentacije i sušenja odvijaju se enzimske i neenzimske reakcije koji dovode do oksidacije polifenola i stvaranja visokomolekularnih tanina, a tijekom procesa poizvodnje značajno se smanjuje udio proantocijanina (94%). Na razinu polifenola utječe i postupak alkalizacije te drugi tehnološki postupci u proizvodnji čokolade (Wollgast i Anklam, 2000). Istraživanje Crozier i suradnika (2011) pokazalo je da nealkalizirani kakaov prah, u usporedbi s alkaliziranim, ima veći udio polifenola i veću antioksidacijsku aktivnost. Na bioraspoloživost polifenola u hrani utječe kemijska struktura polifenola, stupanj polimerizacije, prehrambeni matriks, odnosno prisutnost proteina, masti i šećera, način pripreme hrane i interakcije s drugim komponentama u hrani. Proteini smanjuju apsorpciju polifenola, dok je prisutnost masti i šećera povećavaju (Barberan i sur., 2012). Apsorpcija u organizmu ovisi o genetik, spolu, dobi, fiziološkom stanju, sastavu mikrobiote i aktivnosti enzima u debelom crijevu (D'Archivio i sur., 2010). Polifenoli se apsorbiraju u tankom crijevu, maksimalnu koncentraciju u plazmi dostižu 2 h nakon konzumacije, a iz organizma se izlučuju nakon 6 h (Lotito i sur., 2000). Izoflavoni i fenolne kiseline imaju najveću apsorpciju, slijede ih katehini te antocijanidini i procijanidini s najslabijom apsorpcijom. Nakon apsorpcije u tankom crijevu polifenoli se pretvaraju u konjugirane i metilirane metabolite koji se mogu detektirati u plazmi i urinu, a polimerne oblike, koji se ne uspiju apsorbirati, metabolizira crijevna mikrobiota kataboličkim procesom čime nastaju metaboliti valerijanske kiseline (Han i sur., 2007).

## **2.4. POLIFENOLI I UTJECAJ NA ZDRAVLJE**

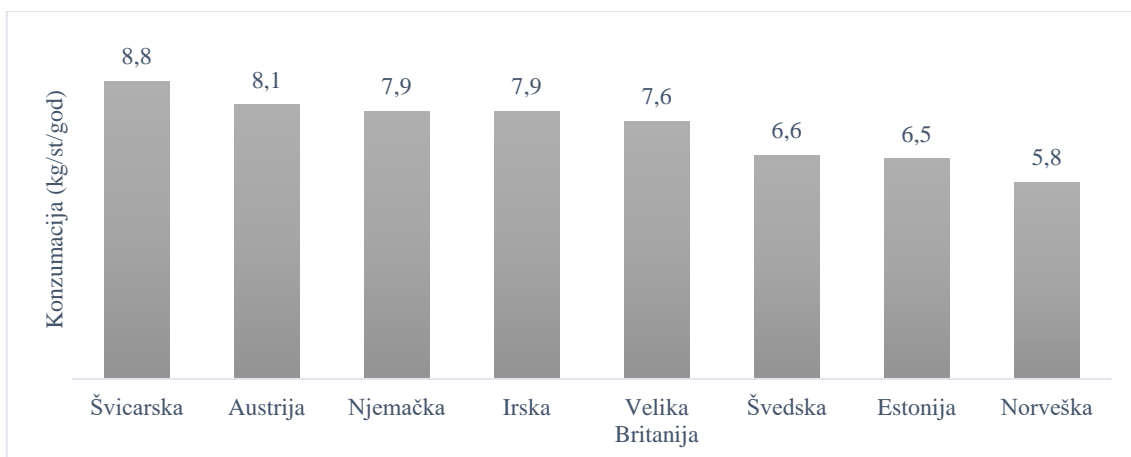
Donedavno se uz čokoladu vezala percepcija proizvoda visoke energijske, a smanjene nutritivne vrijednosti zbog povećanog udjela masti i šećera u sastavu (Florez-Mendez i sur., 2019). Međutim, otkrićem polifenola u kakaovom zrnu ta percepcija se počela mijenjati što je potaknulo brojna istraživanja o zdravstvenim učincima tih spojeva (Latif, 2013). Utjecaj flavonoida na zdravlje ljudi može se sažeti u tri glavne uloge: antioksidacijska, prevencija kardiovaskularnih oboljenja i prevencija pojave nekih tumora (Lamuela-Raventós i sur., 2005). Za antioksidacijsku ulogu u čokoladi u najvećoj su mjeri odgovorni flavan-3-oli, koji prema ORAC metodi pokazuju najveći antioksidacijski potencijal. Prema toj metodi čokolada ima najveći antioksidacijski potencijal, u

usporedbi s drugim namirnicama koje obiluju flavan-3-olima kao što su češnjak, jagode i borovnice (Baba i sur., 2005; Kalt i sur., 2001). Antioksidacijsko djelovanje flavonoida rezultat je njihove strukture u kojoj su reaktivni spojevi zarobljeni u strukturi što sprječava oksidaciju. Mehanizam prevencije kardiovaskularnih bolesti bazira se na sprječavanju oksidacije liposoma i LDL čestica (lipoproteini niske gustoće) kisikovim i dušikovim vrstama, a antioksidacijska aktivnost dokazana je za epikatehine (Lotito i sur., 2000). Dokazano je i da se povećanjem udjela epihatehina ingestijom čokolade povećava antioksidacijski kapacitet plazme (Rein i sur., 2000a; Wang i sur., 2000). Drugi mogući mehanizam sprječavanja oksidacije jest inhibicija aktivacije trombocita i stvaranja agregata (Rein i sur., 2000b) te inhibicija vezanja monocita na vaskularni endotel (Hooper i sur., 2012). Može se zaključiti da je glavni doprinos čokolade njezin preventivni učinak na pojavu i razvoj kardiovaskularnih bolesti no, ne treba zanemariti preventivni utjecaj na pojavu dijabetesa (Haritha i sur., 2014). Prema studiji Davison i suradnika (2008) pretilim se ispitanicima s metaboličkim sindromom nakon konzumacije kakaovog praha s visokim udjelom polifenola značajno popravila inzulinska osjetljivost, a prema drugoj studiji konzumacija kakaovog praha kroz razdoblje od dva tjedna djelovala je na snižavanje povišenog šećera u krvi kod ispitanika s dijabetesom tipa 2 (Almoosawi i sur., 2010). Unos flavonoida je obrnuto povezan s incidencijom karcinoma dojke, želuca i debelog crijeva (Arts i sur., 2000; Garcia-Closas i sur., 1999; Peterson i sur., 2003). Mehanizam djelovanja je inhibicija različitih faza karcinogeneze te proliferacije stanica (Lamuela-Raventós i sur., 2005; Ramljak i sur., 2005).

## 2.5. SAHAROZA U ČOKOLADI

Za većinu ljudi čokolada je proizvod koji poboljšava raspoloženje i izaziva pozitivne emocije (Macht i Dettmer, 2006), a najčešće se konzumira zbog jedinstvenog slatkog okusa i teksture, dok je zadovoljenje nutritivnih potreba od sporednog značenja. Budući da sastavom dominiraju masti i saharoza, smatra se visoko energetske proizvodom pa se preporuča umjerena konzumacija. Konzumacija čokolade *per capita* najviša je u zemljama sjeverne Europe, a zemlje s najvećom *per capita* potrošnjom prikazane su na slici 4., za usporedbu, potrošnja čokolade u Hrvatskoj je 4 kg *per capita* godišnje. Posljednjih 50 godina konzumacija saharoze povećala se trostruko, a rezultati epidemioloških studija pokazuju da prekomjerna konzumacija saharoze, osim što uzrokuje povećanje energijskog unosa, negativno utječe na zdravlje inducirajući poremećaje povezane s metaboličkim sindromom – hipertenziju, visoku razinu triglicerida u krvi i inzulinsku rezistenciju (WHO, 2003; Tappy i sur., 2010). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procijenila je da je 39% odraslih prekomjerne tjelesne mase te da će se u narednim godinama te brojke povećavati (WHO, 2016).





Slika 4. Države s najvećom *per capita* konzumacijom čokolade (Statista 2, 2017)

Uz prekomjernu tjelesnu masu, rastući je trend pojave dijabetesa tipa 2, nezarazne kronične bolesti za čije je širenje odgovorno prekomjerno konzumiranje hrane bogate brzim ugljikohidratima (Livesey, 2003). Dokazana je i povećana pojava karijesa s povećanjem konzumacije hrane bogate saharozom. U posljednjem desetljeću se zbog toga osobama s dijabetesom, pretilim osobama i srčanim bolesnicima preporučuje konzumacija hrane bez dodanog šećera (Shourideh i sur., 2012), a za zdravu populaciju preporuke Svjetske zdravstvene organizacije su da dodani šećer ne prelazi 10% ukupnog energijskog unosa čime je postupno porasla potražnja za proizvodima smanjenog udjela saharoze. Promjene prehrambenih navika utjecale su i na proizvodnju čokolade pa se tako počinju koristiti zamjenska sladila koja imaju manju energijsku vrijednost od saharoze, niži glikemijski indeks te akariogeno djelovanje. Na tržištu se pojavljuju proizvodi sa „*low sugars*“ ili „*sugars-free*“ oznakama, a navedene oznake predstavljaju prehrambene tvrdnje regulirane uredbom Europske komisije (Uredba, 2006):

- a) „*low sugar*“ ima proizvod koji ne sadrži više od 5 g šećera na 100 g čvrste tvari ili 2,5 g šećera na 100 mL tekućine
- b) „*sugars-free*“ ima proizvod koji ne sadrži više od 0,5 g šećera na 100 g čvrste tvari ili 100 mL tekućine
- c) „*with no added sugars*“ može biti na proizvodima koji sadrže isključivo prirodno prisutne šećere.

Prehrambena tvrdnja označava svaku tvrdnju koja navodi, sugerira ili implicira da hrana ima posebna korisna hranjiva svojstva, bilo u pogledu energijske vrijednosti koju pruža, pruža po smanjenoj ili povećanoj stopi, ne pruža; bilo u pogledu hranjive tvari druge tvari koju sadrži, sadrži u

smanjenim ili povećanim udjelima, ne sadrži. Potražnja za proizvodima s navedenim oznakama dovodi do povećane primjene zamjenskih sladila koja zamjenjuju šećer unutar konditorske, mliječne te posebice industrije bezalkoholnih pića (Vahedi i Mousazadeh, 2016).

## 2.6. ALTERNATIVNI IZVORI SLATKOĆE U ČOKOLADI

Sladila se mogu podijeliti u nekoliko grupa ovisno o energijskoj vrijednosti, podrijetlu, intenzitetu slatkoće i kemijskoj strukturi. Prema energijskoj vrijednosti dijele na nutritivna i nenutritivna sladila, prema podrijetlu na prirodna i sintetska sladila, prema kemijskoj strukturi na ugljikohidratna i neugljikohidratna te prema intenzitetu slatkoće na ekstenzivna i intenzivna (Mitchell, 2008).

### 2.6.1. Ekstenzivna sladila

Ekstenzivna sladila su manjeg ili približno istog intenziteta slatkoće kao saharoza, a u njih spadaju i sladila koja nadomještaju volumen proizvoda. Engleski izraz „bulk sweetners“ naziv je za sladila koja nadomještaju volumen čokolada bez saharoze, a u tu svrhu najčešće se koriste polioli: eritritol, sorbitol, manitol, maltitol, izomalt, laktitol, ksilitol. Karakteristike triju ekstenzivnih sladila u industrijskoj primjeni prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Karakteristike triju ekstenzivnih sladila (Irwin i Straeter, 1991; Mendoza i sur., 2005; Nabors 2012; Vranić, 2015).

Vrsta sladila	Izomaltuloza	Trehaloza	Tagatoza
<b>Izvori</b>	šećerna repa i med	gljive i sjemenke	<i>Sterculia setigera</i>
<b>Tip ugljikohidrata</b>	disaharid	disaharid	monosaharid
<b>Karakteristike</b>	akariogenost i bez naknadnog okusa	visoka tehnološka stabilnost	akariogenost
<b>Primjena</b>	pekarski proizvodi, bomboni, gume za žvakanje, konditorski proizvodi, sportska pića i paste za zube	pojačivač okusa, pekarski proizvodi, bomboni, konditorski proizvodi, sportska pića i paste za zube	kozmetika i medicina, sterilizirano mlijeko, čokolada (Dambert Nutrition)

*Polioli ili šećerni alkoholi* nastaju katalitičkom hidrogenacijom reaktivnih aldehidnih ili ketonskih grupa šećera, a opća formula im je  $(CHOH)_nH_2$  gdje je n od 4 do 6. Budući da se tijekom nastajanja reduciraju samo reaktivne grupe u strukturi funkcionalna svojstva ostaju zadržana, slatkoća je bliska saharozi uz 50% manju energijsku vrijednost pa predstavljaju relativno dobru zamjenu za saharozu (Jamieson, 2008). Jedina iznimka kod poliola je eritritol čija energijska vrijednost iznosi 0

kcal g<sup>-1</sup>. Samostalno zamjenjuju saharozu u proizvodima no, zahvaljujući mogućnosti maskiranja naknadnog okusa u proizvode se dodaju u kombinaciji s drugim sladilima (Grembecka, 2015). Za polirole je karakterističan efekt hlađenja koji se pojavljuje prilikom otapanja u ustima, nepoželjan je za čokoladu no, dobrodošao je primjerice u proizvodnji bombona ili guma za žvakanje (O'Donnell i Kearsley, 2012). Druga nepoželjna karakteristika poliola je laksativni učinak do kojeg dolazi zbog slabije apsorpcije i nepotpune probavljivosti (Kroger i sur., 2006). Taj učinak posebno je izražen kod manitola i sorbitola te se na nutritivnoj deklaraciji proizvoda ističe da treba voditi računa prilikom konzumacije zbog mogućeg laksativnog učinka (Payne i sur., 1997).

Zbog slatkoće i okusa *med* se često koristi kao zamjena za saharozu u prehranbenim proizvodima (Pyrzynska i Biesaga, 2009). Šećeri su glavni sastojci meda (95% suhe tvari), a dominantni su fruktoza i glukoza čiji udjeli variraju ovisno o vrsti meda. Prosječni udjeli fruktoze u cvjetnom medu kreću se između 30 i 45%, a glukoze između 24 i 40% (Bogdanov, 2011). Osim šećera, med sadrži mineralne tvari, vitamine i polifenole koji podižu nutritivnu vrijednost proizvoda. Zahvaljujući polifenolima med ima antioksidacijsko djelovanje, a dokazano je i antimikrobno, protuupalno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Schramm i sur., 2003, McLoone i sur., 2016; Erejuwa i sur., 2014). Primjeri čokolada s dodatkom meda prikazani su na slici 5.



Slika 5. Neke od čokolada s dodatkom meda na tržištu (Toblerone itd., 2020)

*Kokosov*, odnosno *šećer kokosove palme*, sadrži proteine, reducirajuće šećere i relativno veliki udio vode (Apriyantono i sur., 2002; Phaichamnan i sur., 2010). U sastavu dominiraju saharoza (50-80%) i fruktoza (3-24%). Smatra se boljom alternativom saharozi zbog nižeg glikemijskog indeksa te prisutnosti vitamina i mineralnih tvari, a zbog toga je i bolja opcija za dijabetičare (Muchtar i Diza, 2011; Trinidad i sur., 2010). Fizikalno-kemijske karakteristike slične su saharozi pa se koristi kao zamjensko sladilo u čokoladi (slika 6.), međutim prisutnost proteina, čestica manje gustoće i vode u sastavu kokosovog šećera utječe na reološka svojstva čokolade (Srikao i Thongta, 2015). U nekoliko studija Saputre i suradnika (2017a, 2018) zaključeno je da njegovim prisustvom u čokoladi dolazi do

povećane aglomeracije čestica, tvorbe hlapljivih komponenata arome kao primjerice octene kiseline, što negativno utječe na finoću, teksturalni doživljaj i aromu čokolade.



Slika 6. Neke od čokolada s kokosovim šećerom na svjetskom tržištu (Pinterest itd., 2020)

*Agavin sirup* ima nizak glikemijski indeks, visok antioksidacijski kapacitet (Mellado-Mojica i López, 2015) i 1,8 puta je slađi od saharoze (Praznik i sur., 2003). Dobiva se iz soka biljke *Agave tequilana* (slika 7.) i *Agave salmiana* koja potječe iz zapadnog Meksika, a sastoji se od fruktoze (90%), glukoze (6%) i drugih šećera (4%) (Latulippe i Skoog, 2011). Zahvaljujući visokom udjelu fruktoze u sastavu biljke, agava se koristi za industrijsko dobivanje visoko fruktoznog sirupa (Soto i sur., 2011). Fruktoza je molekula koja se u ljudskom organizmu metabolizira jedino u jetri pa se višak fruktoze, koja se ne uspije metabolizirati, pretvara u mast što dovodi pojave masne jetre i povećanja razine triglicerida u krvi (Faeh i sur., 2005). Zbog toga je prehrana bogata fruktozom povezana sa smanjenjem osjetljivosti na inzulin, metaboličkim sindromom i dijabetesom tipa 2 (Stanhope i sur., 2013). Unatoč nižem glikemijskom indeksu zbog visokog udjela fruktoze konzumacija agavinog šećera se ne smatra zdravijom alternativom (Hooshmand i sur., 2014).

*Nisko probavljivi ugljikohidratni polimeri* sastavljeni su od šećera glukoze, fruktoze i manoze povezane na način kojima im je probavljivost i energijska vrijednost smanjena. Primjeri takvih nisko probavljivih ugljikohidrata koji se koriste kao zamjena za saharozu u čokoladi su polidekstroza, oligofruktoza, maltodekstrin i inulin, od kojih je potonji najčešće korišten (Aidoo i sur., 2015).



Slika 7. *Agava tequilana* (Anonymous, 2020)

*Inulin* je razgranati fruktozni polimer s glikozidnom vezom iza svakog oligomernog i polimernog lanca, a glavni izvori inulina su cikorija i artičoka. Zahvaljujući supresiji rasta patogenih bakterija u crijevima, inulin posjeduje imunostimulirajući i prebiotički učinak pa se smatra funkcionalnim sastojkom (Farzanmehr i Abbasi, 2009). Uz zdravstvene benefite, u tehnologiji se koristi kao modifikator teksture i zamjena za mast u različitim proizvodima (Shah i sur., 2010). Neutralnog je okusa, a u čokoladi modificira osjet hlađenja u ustima, izazvan dodatkom drugih sladila, zbog čega utječe na poboljšanje okusa i teksture čokolade (Golob i sur., 2004). Ima slabi utjecaj na viskoznost čokolade pa ne dovodi do promjena reoloških i senzorskih svojstava kada je dodan u niskim koncentracijama (Kalyani Nair i sur., 2010). Neke od čokolada sa zamjenskim sladilima na tržištu prikazane su na slici 8.

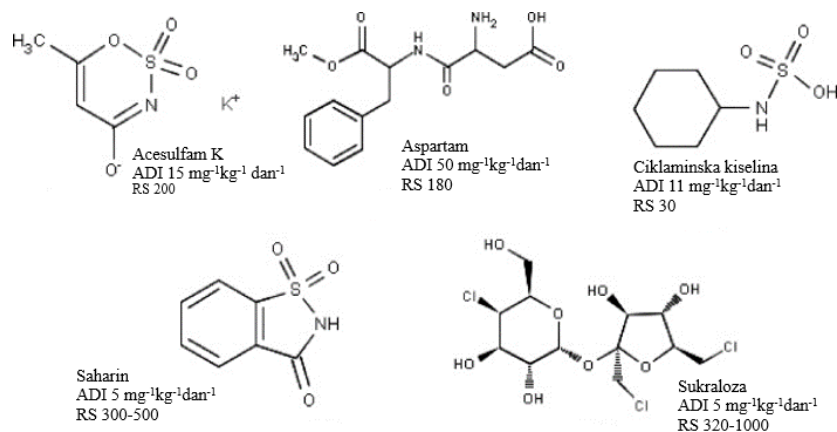


Slika 8. Čokolade sa zamjenskim sladilima kompanija (Cavalier itd., 2020)

### 2.6.2. Intenzivna sladila

Intenzivna sladila su 100 do 8000 puta slađa u odnosu na saharozu pa se dodaju u ppm “*parts per million*” količinama. Iz tog razloga najčešće se miješaju s drugim sladilima koja nadomještaju nedostatak u volumenu. Suvremeni potrošač u potrazi je za sladilom koje neće izazivati povećanje apetita, a hrani će dati slatki okus. Upravo su u tom segmentu „zakazala“ sintetska sladila za koje su studije pokazale da utječu na povećani unos hrane, a konzumacija je povezana s glavoboljama, vrtoglavicom i smušenošću (Avena i sur., 2008; Lipton i sur., 1989; Yang, 2010). Nekoliko velikih kohortnih studija dokazalo je pozitivnu korelaciju između unosa sintetskih sladila i povećanja tjelesne mase (Fowler i sur., 2008). Razlog povećanja tjelesne mase objašnjen je mehanizmom nepotpune aktivacije centara za nagradu u mozgu što može potaknuti želju i žudnju za hranom izazivajući prekomjerno jedenje. Nekoliko meta analiza navodi povezanost između konzumacije sintetskih sladila i incidencije dijabetesa tipa 2 (Mooradian i sur., 2017). U studiji Suez i suradnika (2014) provedenoj na miševima otkriveno je da sintetska sladila (saharin, sukraloza, aspartam) utječu na promjenu crijevnih mikrobiota na način da se osjetljivost na glukozu smanjuje. Bez obzira na kontroverze vezane

uz njihovu konzumaciju i utjecaj na zdravlje nekoliko je dopuštenih sintetskih sladila na tržištu Europe, a njihove strukturne formule, preporučeni dnevni unos (ADI) i intenzitet slatkoće (RS) prikazani su na slici 9.



Slika 9. Neka od intenzivnih sintetskih sladila odobrena od EFSA-e (EFSA, 2011)

Na tržištu je velik izbor intenzivnih sladila koji dolaze u mnoštvo oblika pa potrošači mogu birati žele li aktivnu komponentu prirodnog sladila u prahu, u sirupu, tableticu ili u kristalnom obliku. Poseban naglasak je na prirodnim intenzivnim sladila kojima raste preferencija kod potrošača (Sylvetsky i Rother, 2016). Jedno od čestih intenzivnih prirodnih sladila u konditorskoj industriji je *stevija* koja je na tržište Europe stigla 2011. i održala popularnost do danas (Sylvetsky i Rother, 2016). Podrijetlom je iz Paragvaja, a izolirana je iz listova biljke *Stevia rebaudiana*. Za sladak okus stevije odgovorni su steviozidi i rebaudiozidi (A, B, C, D i E) te je zbog njih slatkoća stevije između 200 i 300 puta veća od saharoze. Rebaudiozid A pokazuje najbolju kvalitetu okusa i slatkoću, dok se kod steviozida javlja gorak naknadni okus (Gardana i sur., 2010; Lemus-Mondaca i sur., 2012). Zbog visokog intenziteta slatkoće dodaje se zajedno sa sladilima koja nadomještaju volumen, poput polidekstroze i inulina, te u toj kombinaciji ispunjava reološke i senzorske karakteristike proizvoda u koji se dodaje (Shah i sur., 2010).



Slika 10. Primjeri čokolada sa stevijom na svjetskom tržištu (Russel Stover itd., 2020)

Ne metabolizira se u organizmu i ima nizak glikemijski indeks pa je mogu konzumirati dijabetičari zbog čega je vrlo popularna u konditorskim proizvodima (slika 10.) i bezalkoholnim pićima, a isti imaju oznake „bez šećera“ ili „čokolade sa stevijom“ (Shah i sur., 2010). Još jedno zanimljivo sladilo biljnog podrijetla je *taumatin*, izoliran iz biljke *Thaumatococcus daniellii*, podrijetlom iz zapadne Afrike. Taumatin je protein koji dolazi u 5 formi, Taumatin I i II te a, b i c, 100 000 puta je slađi od saharoze na molekularnoj razini, a zbog naknadnog okusa koji podsjeća na sladić koristi se u kombinaciji s drugim sladilima (Calvino i sur., 2000). Dodaje se u konditorske proizvode, bombone i gume za žvakanje, a najveći asortiman proizvoda s dodatkom taumatina je na azijskom tržištu (slika 11.).



Slika 11. Bomboni s dodatkom taumatina na tržištu Japana (Meiji, 2020)

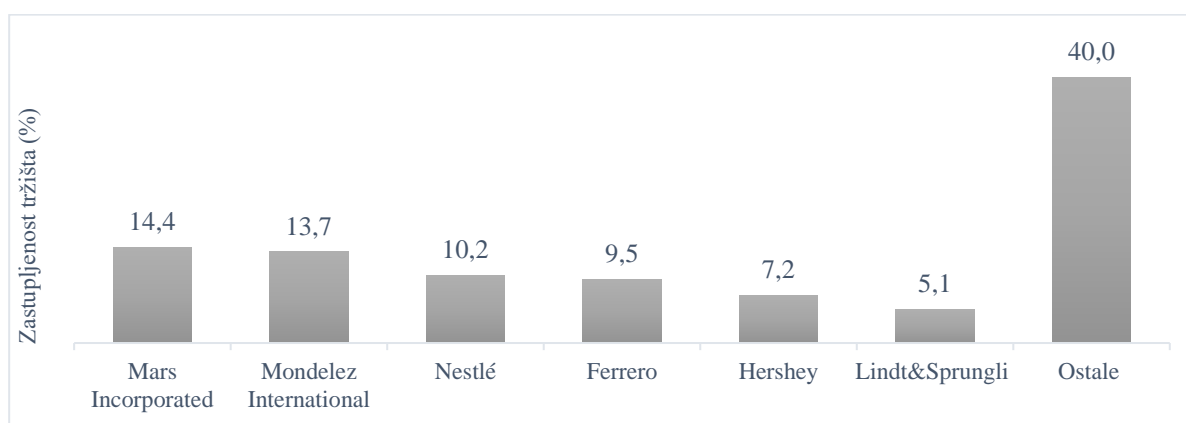
## 2.7. NOVITETI U KONDITORSKOJ INDUSTRIJI

Čokolade smanjenog udjela ili bez šećera prema razini slatkoće jednake su konvencionalnima, ali se odlikuju nižim glikemijskim indeksom, nižom energijskom vrijednošću i akariogenim potencijalom. Te čokolade često imaju lošija senzorska svojstva, posebice u pogledu topljivosti u ustima što predstavlja ograničavajući faktor za širu uporabu pa je njihova konzumacija u početku bila ograničena na potrošače s određenim zdravstvenim problemima vezanima uz hranu no, to se posljednjih godina mijenja (Afoakwa, 2010; Belščak-Cvitanović i sur., 2015). Rastući broj pretilih osoba i osoba s povišenom tjelesnom masom doveo je do porasta popularnosti proizvoda bez šećera i niže energetske vrijednosti, no unatoč tome čokolada je i dalje proizvod koji se komercijalno u vrlo malim količinama proizvodi bez šećera. Od zamjenskih sladila u primjeni su uglavnom šećerni alkoholi i stevija, a u čitavom asortimanu velikih kompanija takvih je vrsta čokolada malo.

Većina proizvođača čokolada sa zamjenskim sladilima manje su obiteljske kompanije koje u novije vrijeme proizvode označavaju oznakama „*organic*“ i „*Fair Trade*“ i tako naglašavaju dodatnu vrijednost svojim proizvodima. „*Fair trade*“ naziv je za trgovačko partnerstvo temeljeno na transparentnosti i poštovanju kojemu je cilj povećanje jednakosti u međunarodnoj razmjeni u korist marginaliziranih proizvođača i radnika kojima se nastoji osigurati pripadajuća prava. „*Organic*“ označava način uzgoja bez uporabe pesticida. Danas se nastoje upotrijebiti zamjenska sladila što

sličnija saharozi u svrhu dobivanja proizvoda odličnih senzorskih karakteristika unatoč smanjenom udjelu šećera (Kiumarsi i sur., 2017). Do sada su među zamjenama šećera u čokoladi najčešće korišteni šećerni alkoholi poput izomalta, maltitola, laktitola, sorbitola i ksilitola, prirodna intenzivna sladila (stevija, taumatin) i sintetska intenzivna sladila poput aspartama, sukraloze i acesulfama K (De Melo i sur., 2009) te prebiotička sladila poput inulina, maltodekstrina i oligofruktoze (Kiumarsi i sur., 2017; Rapaille i sur., 1994). Stella Bernair je svjetska kompanija koja proizvodi čokolade sa zamjenskim sladilima, kokosovim šećerom i agavom. Ta švicarska kompanija postoji od 1991. i proizvodi čokolade označene „*organic*“ i „*Fair Trade*“ oznakama.

Najveća hrvatska kompanija koja se bavi proizvodnjom konditorskih proizvoda je Kraš d.d. koja je ujedno i jedna od najvećih u jugoistočnoj Europi. Kompanija postoji i proizvodi od 1911. tri grupe konditorskih proizvoda: kakaove proizvode, kekse i vafle te bombonske proizvode. Druge dvije hrvatske kompanije u konditorskoj industriji su Zvečevo d.d. i Kandit d.o.o., a zajedno s Krašom zauzimaju najveći dio tržišta konditorskih proizvoda u Hrvatskoj (Fina, 2015). Vodeće svjetske kompanije u proizvodnji čokolade prema tržišnoj zastupljenosti prikazane su na slici 12. Uz najvećeg svjetskog proizvođača konditorskih proizvoda Mars Wrigley vežu se brendovi M&M<sup>®</sup>, SNICKERS<sup>®</sup>, TWIX<sup>®</sup>, MARS<sup>®</sup>, ORBIT<sup>®</sup>, EXTRA<sup>®</sup> i Skittles<sup>®</sup>. Uz SNICKERS<sup>®</sup>, za koju tvrde da je najprodavanija čokoladica na svijetu, razvijena je još jedna pod istim brendom, no umjesto kikirikija u recepturu su stavljeni bademi (slika 14.). Od 2018. MARS<sup>®</sup> i SNICKERS<sup>®</sup> čokoladice moguće je kupiti s 40% manje šećera i većim udjelom proteina jer je šećer nadomješten dodatkom inulina, a kao izvor proteina korišteni su proteini sirutke. Brend Cadbury, kompanije Mondelez International proizveo je mliječnu čokoladu označenu s 30% manje šećera, a umjesto šećera stavljen je maltodekstrin.



Slika 12. Tržišna zastupljenost (%) vodećih kompanija na svjetskom konditorskom tržištu (Statista 3, 2020)

Nestlé je u ovom nizu napravio najveće inovacije, proizvevši čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova i sa 70% manje šećera te bez dodanog šećera. Riječ je o čokoladi gdje sav šećer



potječe od prirodno prisutnog šećera u kakaovom zrnju. Prvo lansiranje takve čokolade očekuje se 2020. godine u Japanu. Brend Cadbury, kompanije Mondelez International proizveo je mliječnu čokoladu označenu s 30% manje šećera, a umjesto šećera stavljen je maltodekstrin. Druga inovacija je „Ruby“ čokolada (slika 13.) koja se prvotno pojavila na tržištu Japana i Sjeverne Koreje od kud se širila na druga tržišta. „Ruby“ čokolada je blago ružičaste boje, odlikuje je voćna i bobičasta aroma s blago kiselim notama, a dobiva se iz posebnih kakaovih zrna koja se uzgajaju jedino u Brazilu, Ekvadoru i Obali Bjelokosti.



Slika 13. Lindt mliječna čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova i „Ruby“ čokoladica (Lindt, 2020; Kit Kat, 2020)

Brend poznat po asortimanu čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova, Lindt, 2016. godine lansirao je dvije vrste čokolada bez šećera. Mliječnu i čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova, a šećer je zamijenjen šećernim alkoholom maltitolom. Maltitol kao zamjena za šećer koristi se i u čokoladama bez šećera kompanije Hershey's. Novost na tržištu mliječnih čokolada je proizvodnja mliječne čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova pa se tako pod brendom Lindt može nabaviti mliječna čokolada s 45, 55 ili čak 65% kakaovih dijelova (slika 13). Mliječna, bijela i čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova čine bazu u recepturama svih čokolada vodećih kompanija. Isključivo steviju u čokoladama koristi proizvođač Cavalier koji je ujedno prvi proizvođač koji je čokoladu sa stevijom lansirao na tržište. Od lansiranja čokolade u prosincu 2011. pa sve do danas Cavalier u svim svojim proizvodima sadrži steviju.



Slika 14. Nove recepture čokoladica kompanije Mars Incorporated (Snickers, 2020)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Razvoj receptura i proizvodnje čokolada

U ovom radu formulirano je pet čokolada s 49,69%-tnim udjelom kakaovih dijelova i pet čokolada s 59,69%-tnim udjelom kakaovih dijelova, pri čemu je udio kakaovog maslaca u svim čokoladama bio isti, a kakaova masa prilagođena željenom udjelu ukupnih kakaovih dijelova. S ciljem ispitivanja uspješnosti primjene supstituta za šećer u pogledu bioaktivnog potencijala i senzorske prihvatljivosti formuliranih čokolada, uz saharozu korištene su četiri različite vrste šećera: ječmeni slad u prahu (Diastatische producten; Leiden, Nizozemska), rižin slad u prahu (Diastatische producten; Leiden, Nizozemska), kokosov šećer u prahu (Hafen-Muhlen-Werke GmbH, Gnarrengurg, Njemačka) i agava u prahu (Hafen-Muhlen-Werke GmbH; Gnarrengurg, Njemačka). Udjeli lecitina i vanilina bili su jednaki za sve formulacije. U Tablici 3. prikazani su udjeli svih korištenih sastojaka za pripremu čokolada.

Tablica 3. Sastav formuliranih čokolada analiziranih u istraživanju

Sastojci	Udio sastojka (%)	
	49,69 % k.d.	59,69% k.d.
Šećer (S/KŠ/AG/JS/RS)	50	40
Kakaova masa	40	50
Kakaov maslac	9,69	9,69
Vanilin	0,01	0,01
Lecitin	0.3	0,3

S – saharoza; KŠ – kokosov šećer; RS – rižin slad; JS – ječmeni slad; AG – agava u prahu;

##### 3.1.2. Kemikalije

###### 3.1.2.1. Određivanje udjela ukupnog i direktnog inverta po Luff-Schoorlu

Limunska kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev tiosulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Koncentrirana sumporna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Indikator fenoftalein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)  
Kalijev jodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)  
Cinkov acetat dihidrat, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)  
Kalijev heksacijanoferat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Bakrov sulfat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Natrijev karbonat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

#### *3.1.2.2. Određivanje udjela proteina Kjeltec metodom*

Koncentrirana sumporna kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)  
Katalizator Kjeldahl tablete, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Njemačka)  
Borna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)  
Natrijev hidroksid, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)  
Koncentrirana klorovodična kiselina, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Indikator brom krezol zeleno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Indikator metiloranž, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Amonijev sulfat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)  
Natrijev karbonat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

#### *3.1.2.3. Određivanje udjela masti metodom po Soxhletu*

Koncentrirana klorovodična kiselina, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Petroleter, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.4. Određivanje udjela bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova*

Olovni acetat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)  
Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)  
Otopina klorovodične kiseline, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)  
Teobromin, Matrix Marketing GmbH (Sevelen, Švicarska)

#### *3.1.2.5. Odmašćivanje čokolada*

n-Heksan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.6. Ekstrakcija polifenolnih spojeva i metilksantina iz odmašćenih čokolada*

Metanol (70%, v/v), J.T. Baker (Pennsylvania, SAD)

#### *3.1.2.7. Određivanje udjela ukupnih fenola*

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev karbonat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.8. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i ukupnih flavonoida*

Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Formaldehid, Alkaloid AD (Skopje, Makedonija)

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev karbonat, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom*

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

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

#### *3.1.2.11. Određivanje udjela flavan-3-ola*

*Metoda s vanilin reagensom*

Vanilin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

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

*Metoda s p-dimetilamino-cinamaldehyd reagensom (p-DAC)*

p-dimetilamino-cinamaldehyd, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

#### *3.1.2.12. Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate-Smithu*

n-butanol, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Amonijev željezo (II) sulfat dodekahidrat (2%, w/v), Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

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

*3.1.2.13. Određivanje udjela fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti*

Acetonitril, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Fosforna kiselina, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Pribor i aparatura

1) *Priprema čokolada*

- kitchen Aid Heavy Duty mikser (St. Joseph, SAD)
- uređaj za valcanje Bühler (Uzwil, Švicarska)
- konča Hans Ströter Bege B.V. (Düsseldorf, Njemačka)
- laboratorijsko posuđe (stakleni lijevak, Erlenmeyerova tikvica, satno staklo, odmjerna tikvica)

2) *Fizikalno-kemijske analize čokolada*

- Kjeltec 8100 Distillation Unit Foss (Hillerod, Danska)
- automatska bireta, Isolab (Eschau, Njemačka)
- Soxhlet aparat, Soxtec™ 8000 Extraction Unit, FOSS (Hilleroed, Danska)
- analitička vaga BM-5D, A&D Company (Tokyo, Japan)
- magnetska miješalica RT 5 power, Ikamag (Steinheim, Njemačka)
- laboratorijski sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- vodena kupelj Bodalec TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)
- automatska pipeta 2-20, 20-200 i 500-500 µL (Wisconsin, SAD)
- pipete volumena 10 i 25 mL
- indikator papir, sa skalom pH 1-11
- hladilo po Liebig-u, volumena 40 mL

3) *Odmaščivanje čokolada i priprema ekstrakta*

- magnetska miješalica RT 5 power, Ikamag (Steinheim, Njemačka)
- analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga SL8 R y 8R, Thermoscientific (Massachusetts, SAD)

4) *Spektrofotometrijske analize*

- odmjerne tikvice volumena 10 mL i 1000 mL

- mikropipeta volumena 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
- pipete volumena 1, 5 i 10 mL
- staklene epruvete
- mikrofilteri PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, SAD)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma Schmidbauer GmbH (Singen, Njemačka)
- spektrofotometar, Genesys 10s UV-Vis, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

5) *HPLC analiza ekstrakata*

- Erlenmeyerova tikvica volumena 250 mL
- menzure volumena 25, 50 i 100 mL
- odmjerne tikvice volumena 10, 100 i 200 mL
- stakleni lijevak
- mikropipeta volumena 100  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$
- pipete volumena 1, 5 i 10 mL
- 1200 Infinity II LC System, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- mikrofilteri PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, SAD)
- HPLC kolona C-18 (Kinetex 150 mm x 4,6 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Formiranje ankete

U svrhu prikupljanja podataka o preferencijama konzumacije čokolada samostalno je osmišljena *online* anketa koristeći google obrasce. Anketa je sadržavala 30 pitanja podijeljenih u sekcije s ciljem otkrivanja stavova, preferencija i učestalosti konzumacije na slučajnom uzorku. Prva sekcija „Demografski parametri“ sadržavala je osnovna pitanja o spolu, dobi, razini obrazovanja, prihodima u kućanstvu te mjestu stanovanja. Druga sekcija „Osobne navike i učestalost konzumacije“ sadržavala je pitanja o vrsti (mliječna, tamna, čokolada s lješnjacima...) i obliku (tabla čokolade, praline, čokoladni kolač...) konzumirane čokolade. Sekcija „Preferencije“ ispitala je stav ispitanika prema čokoladi s povećanim udjelom kakaovih dijelova, a obuhvaćena su pitanja o razlozima koji utječu na odluku o kupovini čokolade (postotak kakaovih dijelova u čokoladi, nutritivna deklaracija, udio šećera, mjesto kupovine, okus, cijena, brend). Sekcija „Osnovna znanja“ sadržavala je pitanja vezana uz proizvodnju i nutritivni sastav čokolade. Žudnja i krivnja vezani uz konzumaciju čokolade ispitani su u sekciji „Emocionalni aspekt konzumiranja čokolade“, a zadnja sekcija sadržavala je pitanja o interesu za probavanje novih okusa i novih tipova čokolada. Anketa je javno objavljena 22. veljače 2019., službeno zatvorena 09. studenog 2019, a ispunilo ju je 1042 ispitanika.

### 3.2.2. Proizvodnja čokolada

Čokoladne mase pripremljene su prema recepturama prikazanim u tablici 3. Polovica kakaove mase se otopi i pomiješa sa šećerom za pripremu zamjesa, a druga se polovica neotopljene kakaove mase dodaje direktno na dno konče. Nakon pripreme zamjesa provodi se valcanje te potom suho i mokro končiranje. Suho končiranje provodi se 5 h na temperaturi od 80 °C, mokro 2h uz dodatak kakaovog maslaca na istoj temperaturi. Zadnjih sat vremena temperatura se snižava na 55 °C nakon čega se dodaje lecitin u smjesu. Temperiranje se provodi ručno na način da se čokoladna masa razvlači do postizanja temperature od 29,5 °C stavlja u kalupe i hladi u dvije faze: 15 min na 14 °C i 30 min na 8 °C nakon čega se gotova čokolada pakira u aluminijsku foliju i čuva na 18 °C.

### 3.2.3. Određivanje udjela suhe tvari

#### *Princip metode*

Za određivanje udjela suhe tvari u ispitivanim uzorcima korištena je modificirana AOAC 930.15 (1990) metoda.

### *Postupak rada*

U aluminijsku zdjelicu odvaži se 5 g kvarcnog pijeska, suši u sušioniku 4 h na  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  do konstantne mase. 6 g homogeniziranog uzorka s točnošću  $\pm 0,001\text{ g}$  prenosi se u osušenu posudu, posuda i uzorak se važu te se suše 4 h pri  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon čega se hlade i ponovno važu. Postupak sušenja se ponavlja do postizanja konstantne mase. Postotak vode računa se prema formuli [1], a udio suhe tvari prema formuli [2]:

$$\% \text{ vode u uzorku} = \frac{a-b}{c} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

*a* – masa posudice sa uzorkom prije sušenja (g)

*b* – masa posudice sa uzorkom nakon sušenja (g)

*c* – masa uzorka (g)

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

### 3.2.4. Određivanje udjela ukupnog i direktnog inverta po Luff-Schoorlu

#### *Princip metode*

Metoda se temelji na principu prevođenja bakrovog sulfata iz Luffove otopine u bakar (I) oksid pomoću reducirajućih šećera (direktni invert). Neutrošena količina bakrovih iona ( $\text{Cu}^{2+}$ ) određuje se dodatkom kalijevog jodida, pri čemu se izlučuju ekvivalentne količine elementarnog joda koji se, uz škrob kao indikator, određuje titracijom s natrijevim tiosulfatom ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Nereducirajući disaharid (saharoza) mora se prethodno invertirati, odnosno hidrolizirati na reducirajuće šećere pomoću klorovodične kiseline. Razlika između dobivenog ukupnog i direktnog inverta daje udio reducirajućih šećera nastalih inverzijom saharoze.

#### *Postupak rada*

5 g uzorka otopi se u 50 mL destilirane vode, prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL doda se 5 mL otopine Carez I i 5 mL otopine Carez II nakon čega se otopina profiltrira. U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 25 mL profiltrira otopine nakon čega se dopuni destiliranom vodom do oznake. U Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL doda se 25 mL Luffova reagensa i 25 mL razrijeđenog filtrata. Tikvica se spoji s hladilom i zagrije do vrenja nakon čega se kuhanje nastavi još 10 min pri čemu se dodaje 10 mL 33%-tni (w/v) kalijev jodid i 25 mL koncentrirane sulfatne kiseline. Otopina se titrira sa 0,1 M natrijevim tiosulfatom uz dodatak 1% (w/v) otopine škroba do prelaska plave boje u blijedo



žutu. U potpuno istim uvjetima pripremi se slijepa proba s istom količinom Luffova reagensa, no umjesto filtrata dodaje se 25 mL destilirane vode. Direktni invert računa se prema formuli [3]:

$$\frac{250 \times 100 \times d \times 100}{c \times 25 \times 25 \times 100} \times 4 \times \frac{d}{c} \times F \quad [3]$$

gdje je:

$c$  - masa uzorka (g)

$d$  – masa invertnog šećera izračunat iz razlika  $a$  i  $b$

$a$  – otopina natrijevog tiosulfata utrošena za slijepu probu (mL)

$b$  – utrošeni volumen otopine natrijevog tiosulfata (mL)

$F$  – faktor korekcije koncentracije

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 10 mL filtrata I, 30 mL destilirane vode i 0,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Tikvica se stavlja u vruću kupelj 30 min i potom neutralizira otopinom 1M natrijevog hidroksida uz indikator lakmus papir i dopuni destiliranom vodom do oznake. U Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL dodaje se 25 mL prethodno pripremljene Luffove otopine i 25 mL otopine šećera i nadalje se postupa kao s direktnim invertom. Ukupni invert računa se prema formuli [4]:

$$\frac{250 \times 100 \times d \times 100}{c \times 25 \times 25 \times 100} \times 10 \times \frac{d}{c} \times F \quad [4]$$

gdje je:

$c$  – masa uzorka (g)

$d$  – masa invertnog šećera (mg), na osnovi razlika ( $a-b$ ) utrošenih mL otopine natrijevog tiosulfata za slijepu probu i za pokus

$a$  – otopina natrijevog tiosulfata utrošena za slijepu probu (mL)

$F$  – faktor korekcije koncentracije

Udio saharoze se računa prema formuli [5]:

$$\% \text{ saharoza} = (b - a) \times 0,95 \quad [5]$$

gdje je:

$a$  – prirodni direktni invert (%)

$b$  – ukupni invert (%)

### 3.2.5. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahl-u

#### *Princip metode*

Za određivanje udjela proteina u ispitivanim uzorcima čokolada korištena je poluautomatizirana metoda po Kjeldahlu (AOAC 976.05).

#### *Postupak rada*

0,5 g uzorka odvaže se u digestijske tube zajedno s 2 Kjeldahl tablete i 12 mL koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Digestijske tube stavljaju se u digestijski blok gdje se vrši spaljivanje uzorka na 420 °C kroz 50 min, a završetak procesa je obilježen nastankom bistre plavo-zelene tekućine. Nakon spaljivanja digestijska tuba se prenosi u destilacijsku jedinicu u kojoj instrument automatski ubacuje 80 mL H<sub>2</sub>O i 60 mL (35% w/v) NaOH u uzorak. Destilacija traje 4 min, a destilat se hvata u Erlenmeyerovu tikvicu u koju je prethodno dodano 30 mL borne kiseline. Dobiveni ružičasto obojeni destilat titrira se sa 0,1 M klorovodičnom kiselinom do plavo sivog obojenja. Udio dušika računa se prema formuli [6], a dobivena vrijednost uvrštava se formulu [7] iz koje se dobiva ukupan udio proteina.

$$\text{dušik(\%)} = \frac{0,1 \times (a - b) \times F \times 14,007 \times 100}{c \times 1000} \quad [6]$$

gdje je:

*a* - utrošak HCl 0,1 M potrebnog za titraciju uzorka

*b* - utrošak HCl 0,1 M potrebnog za titraciju slijepa probe

*c* - masa uzorka (g)

*F* - faktor normaliteta titranta

6,25 - faktor za preračunavanje dušika u proteine

$$\% \text{ proteina} = \text{dušik \%} \times 6,25 \quad [7]$$

### 3.2.6. Određivanje udjela ukupne masti po Soxhlet-u

#### *Princip metode*

Nakon hidrolize kiselinom u hidrolizatoru, mast postaje dostupna za ekstrakciju organskim otapalom, koja se vrši na instrumentu Soxtec<sup>TM</sup> Extraction unit.

#### *Postupak rada*

1 g uzorka odvaže se i pomiješa sa 1000 mL koncentrirane klorovodične kiseline zagrije do vrenja i ostavi u tom stanju 60 min. Nakon kuhanja uzorak se ispiri do pH 7 i suši se na 60 °C preko

noći. Idući dan se u uzorak dodaje 60 mL destilirane vode i 35 mL HCl (36% v/v), zagrije do vrenja i ostavi u tom stanju 20 min. Zatim se vruća suspenzija filtrira kroz vlažni filter papir do pojave bistrog filtrata, a filter papir suši 50 min na 125 °C. Tako osušen filter papir prenese se na kolonu za ekstrakciju u Soxtec aparat pri čemu se dodaje 50 mL petroletera. Ekstrakcija se provodi u tri faze na temperaturi od 50 °C u trajanju od 105 min, a kada je gotova ekstrakcijske posude se suše na 103 °C 30 min nakon čega se hlade i važu. Postotak masti računa se prema formuli [8], pri čemu se dobivena vrijednost uvrštava u formulu [9] za dobivanje udjela ukupne masti [9]:

$$\% \text{ mast} = \frac{W3-W2}{W1} \times 100 \quad [8]$$

gdje je:

$W1$  – masa uzorka (g)

$W2$  – masa ekstrakcijske posudice (g)

$W3$  – ekstrakcijska posudica + masa ekstrahiranog ostatka (g)

$$\% \text{ ukupne masti} = \frac{a}{b} \times 100 \quad [9]$$

gdje je:

$a$  – masa ekstrahirane masti (g)

$b$  – masa uzorka uzetog za analizu (g)

### 3.2.7. Određivanje udjela bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova

#### *Princip metode*

Alkaloidi – teobromin i kofein, ekstrahiraju se iz ispitivanih uzoraka kuhanjem uzoraka s vodom. Balastne tvari talože se pomoću olovnog acetata, a višak se ukloni natrijevim bikarbonatom. U filtratu se određuje ukupna količina alkaloida i izrazi kao postotak teobromina. Na temelju količine teobromina izračuna se količina suhih bezmasnih kakaovih dijelova.

#### *Postupak rada*

1,0 g kakaove mase odvaži se u tikvicu, doda se 80 mL destilirane vode, zagrije do vrenja i ostavi 5 min u stanju vrenja. Zatim se doda 4 mL otopine bazičnog olovnog acetata, sadržaj se profiltrira te se u 50 mL tog filtrata doda 0,5 g usitnjenog natrijevog bikarbonata i ponovno profiltrira. Nakon dvije filtracije otopina se kvantitativno prenese u tikvicu volumena 100 mL, razrijedi s 0,5 mL priređene HCl (10% v/v) i dopuni destiliranom vodom do oznake. Izmjerene apsorbancije na 272 nm

i 306 nm koriste se za izračun ukupnih alkaloida [10] pri čemu se dobivena vrijednost koristi za dobivanje udjela bezmasne suhe tvari u uzorku [11].

$$T = \frac{1,77 \times (A_{272} - A_{306}) \times 10}{a \times v} \times 0,95 \quad [10]$$

gdje je:

$A_{272}$  - apsorbancija na 272

$A_{306}$  - apsorbancija na 306

$a$  - masa uzorka uzetog za analizu

$v$  - volumen filtrata uzet za razrjeđenje

1,77 - faktor preračunavanja za teobromin

0,95 - faktor korekcije volumena otopine

$T$  - ukupni alkaloidi izraženi u uzorku za analizu izraženi kao (%) teobromina

Određivanje suhih i bezmasnih kakaovih dijelova

$$KD = \frac{T}{Tm} \times 100 - (m + v) \quad [11]$$

gdje je:

$T$  - ukupni alkaloidi u uzorku (%) teobromina

$Tm$  - ukupni alkaloidi u uzorku kakaove mase (%) teobromina

$m$  - udio kakaovog maslaca u uzorku kakaove mase (%)

$v$  - udio vode u uzorku kakaove mase (%)

$KD$  - suhi i bezmasni kakaovi dijelovi u uzorku (%)

### 3.2.8. Priprema uzoraka za određivanje bioaktivnog sastava

#### 3.2.8.1. Odmašičvanje čokolada

##### *Princip metode*

Postupak odmašičvanja čokolada proveden je prema metodi Adamson i suradnika (1999).

##### *Postupak rada*

Odvaže se 2 g prethodno usitnjenih čokolada u plastičnu kivetu, doda 10 mL n-heksana te se postavi na magnetnu mješalicu u trajanju od 5 min. Nakon toga se smjesa centrifugira na 9500 okretaja/min 10 min, a dobiveni supernatant se oddekanira. Postupak ekstrakcije iz taloga se ponavlja

dva puta dodatkom iste količine otapala. Odmašćeni uzorci se ostavljaju preko noći da ostaci otapala ispare i potom koriste za daljnje analize.

### 3.2.8.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva i metilksantina

#### *Princip metode*

Ekstrakcija se provodila prema metodama Guyot i suradnika (1998) i Hammerstone i suradnika (1999).

#### *Postupak rada*

Odvaže se 2 g uzorka u plastičnu kivetu i pomiješa sa 5 mL 70% metanola (v/v). Ekstrakcija se provodi u ultrazvučnoj kupelji u vremenu od 30 min i nakon toga centrifugira na 9000 okretaja/min, 10 min. Dobiveni supernatant se oddekanira u odmjernu tikvicu od 10 mL, a postupak se ponavlja 2 puta nakon čega se, po potrebi, dopuni do oznake sa 70%-tnim metanolom. Ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na -18 °C do daljnjih analiza.

### 3.2.9. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC)

#### *Princip metode*

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteau reagensa i nekog reducirajućeg reagensa (fenolni spojevi) (Singleton i sur., 1999), pri čemu se fenoksid ion iz uzorka oksidira, a Folin-Ciocalteau kao smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet razvijenog plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski te je proporcionalan apsorbanciji i koncentraciji analiziranih spojeva.

#### *Postupak rada*

U staklene epruvetu otpipetira se redom 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa i 1,5 mL (20% w/v) otopine natrijevog karbonata, a nakon 2 h uzorcima se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način osim što se umjesto uzorka otpipetira jednaka količina destilirane vode. Udio ukupnih polifenola računa se iz jednadžbe baždarne krivulje [12], a rezultati se prikazuju u mg ekvivalenta galne kiseline (EGK) po gramu uzorka (Singleton i sur., 1999).

$$y = 0,0010 x - 0,0001$$

[12]

gdje je:

$x$  – udjel ukupnih polifenola ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$y$  – izmjerene apsorbancije pri 765 nm

### 3.2.10. Određivanje udjela ukupnih flavonoida i neflavonoida

#### *Princip metode*

Metoda se zasniva na reakciji formaldehida na C-6 ili C-8 5,7-dihidroksi flavonoidu pri čemu dolazi do stvaranja metilol derivata koji reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima na istim C položajima.

#### *Postupak rada*

U plastičnu epruvetu otpipetira se 0,5 mL ekstrakta, 250  $\mu\text{L}$  razrijeđene koncentrirane klorovodične kiseline (1:4 v/v) i 250  $\mu\text{L}$  formaldehida (36% v/v). Reakcija se odvija tijekom 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se uzorak filtrira, a u filtratu zaostaju neflavonoidi. Udjel ukupnih neflavonoida se određuje prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988), dok se udio ukupnih flavonoida odredi indirektno razlikom vrijednosti ukupnih fenola i ukupnih neflavonoida. Dobiveni rezultati se izražavaju se u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu uzorka i prikazuju kao srednje vrijednosti paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.11. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s *p*-dimetilamino-cinamaldehydom (*p*-DAC) reagensom

#### *Princip metode*

Metoda se temelji na istom principu kao i reakcija s vanilinom, ali s nešto većom selektivnošću jer *p*-DAC reagens reagira samo s OH skupinom na položaju C-8 u molekuli flavan-3-ola (Di Stefano i sur., 1989).

#### *Postupak rada*

2,5 mL pripremljenog *p*-DAC reagensa pomiješa se sa 0,5 mL mikrofiltriranog uzorka u staklenoj epruveti. Paralelno se pripreme 2 slijepe probe: u jednu se dodaje 2,5 mL *p*-DAC reagensa i 0,5 mL vode, a u drugu 2,5 mL vode i 0,5 mL uzorka. Apsorbancija se mjeri nakon 10 min pri 640 nm. Udio (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema formulama [13] i [14]. Rezultati se izražavaju u mg (+)-katehina po gramu uzorka kao srednje vrijednosti paralelnih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

$$\text{mg (+)-katehina g}^{-1} = 32,1 \times \Delta A \times \text{razrjeđenje} \quad [13]$$

gdje je:

$$\Delta A = a - b - c \quad [14]$$

a - razlika apsorbanija između uzorka i reagensa

b - razlika apsorbanija između vode i reagensa

c - razlika apsorbanija između uzorka i vode

### 3.2.12. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom

#### *Princip metode*

Određivanje udjela (+)-katehina i proantocijanidina provodi se prema kolorimetrijskoj metodi temeljem reakcije vanilina s OH skupinama na položajima C-6 i C-8 u molekulama flavan-3-ola što se očituje kroz formiranje crveno obojenog kompleksa.

#### *Postupak rada*

Otpipetira se 0,5 mL mikrofiltriranog uzorka i 3 mL prethodno pripremljene otopine vanilina u metanolu (4% w/v) u staklenu epruvetu. Neposredno prije dodatka 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline, epruvete se postave u hladnu vodenu kupelj kako ne bi došlo do zagrijavanja uslijed egzotermne prirode same reakcije. Paralelno za svaki uzorak pripremi se slijepa proba, no umjesto vanilina otpipetira se jednaka količina čistog metanola. Reakcija traje 15 minuta nakon čega se očitava apsorbanija na 500 nm. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg (+)-katehina po gramu uzorka [15].

$$\text{mg (+)-katehina L}^{-1} = 290,8 \times \Delta A \times \text{razrjeđenje} \quad [15]$$

gdje je:

$\Delta A$  razlika apsorbanije između uzorka i slijepa probe.

### 3.2.13. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina metodom po Bate-Smithu

#### *Princip metode*

Određivanje ukupnih proantocijanidina provodi se prema modificiranoj metodi Bate-Smith (1973), a bazira se na kiselinskoj hidrolizi molekula procijanidina s klorovodičnom kiselinom čime nastaju jednostavni cijanidini. Reakcija je obilježena nastankom crvenog obojenja otopine čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm.

### *Postupak rada*

Redom se u toplinski otporne staklene epruvete otpipetira: 2 mL uzorka, potom 4 mL otopine *n*-butanol/HCl (95:5, v/v) i 200  $\mu$ L  $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$  u 2M HCl (2%, w/v). U slijepu probu se umjesto uzorka stavlja metanol. Epruvete se začepe i stave u vodenu kupelj (95 °C) na 45 min. Po završetku, hidrolizirani uzorci se ohlade te se provede spektrofotometrijsko mjerenje pri 550 nm. Prema jednadžbi baždarnog dijagrama, rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta cijanidin klorida (CyE) po gramu uzorka kao srednje vrijednosti paralelnih mjerenja uz pripadajuće standardne devijacije [16].

$$y = 0,0321 x + 0,0574 \quad R^2 = 0,9901 \quad [16]$$

gdje je:

$x$  – poznata koncentracija otopine cijanidin klorida ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$y$  – imjerenje vrijednosti apsorbancije pri 550 nm

### 3.2.14. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### *Princip metode*

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta provedena je prema metodi Re i suradnika (1999), a bazira se na redukciji radikal kationa 2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), tj. ABTS radikal-kationa pomoću prisutnih antioksidanasa, pri čemu je reakcija popraćena smanjenjem intenziteta plavo-zelene boje kao posljedice prisutne reakcije.

#### *Postupak rada*

Otopina  $\text{ABTS}^+$  radikal kationa pripremi se prema metodi Re i suradnika (1999) kemijskom oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa s kalijevim persulfatom, pri čemu apsorbancija tako pripremljene plavo-zelene obojene otopine mora iznositi  $0,700 \pm 0,2$  pri 734 nm. 20  $\mu$ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine  $\text{ABTS}^+$  radikal kationa, ostavi se na tamnom mjestu 6 minuta te se izmjeri apsorbancija na 734 nm. Paralelno s uzorkom pripremi se slijepa proba, no umjesto uzorka doda se 20  $\mu$ L destilirane vode. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$  koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, odredi se antioksidacijski kapacitet izražen u  $\text{mmol Troloxa g}^{-1}$  uzorka [17]. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

$$y = 0,303 x + 0,0006 \quad [17]$$

gdje je:



x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a L<sup>-1</sup>)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm

### 3.2.15. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

#### *Princip metode*

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH radikala provedena je prema metodi Brand-Williams i suradnika (1995), a zasniva se na redukciji nesparenog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH radikala) ljubičaste boje od strane elektron donora prisutnog antioksidansa što se prati mjerenjem smanjenja intenziteta obojenja.

#### *Postupak rada*

U staklenu epruvetu otpipetira se 100 µL uzorka i 3,9 mL metanolne otopine DPPH radikala (0,094 mM) i reakcija se odvija 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm. Paralelno se pripremi slijepa proba u koju se umjesto uzorka doda 100 µL metanola. Razlikom apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe (mora iznositi 1±0,2) dobiva se vrijednost ΔA koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarnog dijagrama konstruirane za standard Trolox-a određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku [18]. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa po gramu uzorka (Blois, 1958).

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [18]$$

gdje je:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L<sup>-1</sup>)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

### 3.2.16. Određivanje udjela teobromina, kafeina i (-)-epikatehina HPLC-DAD metodom

Identifikacija i kvantifikacija pojedinih bioaktivnih spojeva provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) Agilent Technologies seriji 1200 s binarnom pompom, autosamplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Spojevi su razdvojeni na nepolarnoj C18 koloni (Kinetex 150 mm x 4,6 mm, 2,5 µm, 100 Å), a uvjeti analize razvijeni su u laboratoriju. Korištene su dvije mobilne faze s promjenjivim volumnim udjelom tijekom eluiranja (mobilna faza A-0,1% (v/v) otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u acetonitrilu, mobilna faza B-0,1% (v/v) otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u vodi. Protok mobilnih faza iznosio je 0,5 mL min<sup>-1</sup>, a primijenjeni gradijent prikazan je u Tablici 4. Kolona je

termostatirana na 25 °C, a količina injektiranog uzorka iznosila je 5 µm. Kromatogrami su snimani na valnim duljinama od 260, 280, 320 i 360 nm.

Tablica 4. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

<i>t</i> (min)	% A	% B
0	93	7
5	93	7
45	60	40
47	30	70
52	30	70

Identifikacija je provedena pomoću standarda teobormina, kafeina i (-)-epikatehina, a točan udio svakog analita u uzorku računat je prema pripadajućoj jednadžbi baždarnog pravca standarda. Konstruirani su baždarne krivulje za standarde teobromin, kafein i epikatehin s pripadajućim rasponima koncentracija koje su iznosile za teobromin 60 µg mL<sup>-1</sup> do 200 µg mL<sup>-1</sup>, kafein 40 µg mL<sup>-1</sup> do 200 µg mL<sup>-1</sup> i (-)-epikatehin 1 µg mL<sup>-1</sup> do 60 µg mL<sup>-1</sup>. Formula baždarne krivulje za teobromin prikazana je jednadžbom [19], kafein jednadžbom [20], a epikatehin jednadžbom [21]. Uvrštavanjem vrijednosti retencijskog vremena u baždarnu krivulju za svaki analit dobivena je koncentracija koja je uvrštena u formulu [22] iz koje se dobila konačna koncentracija analita u masi neodmašćene čokolade.

$$y = 30,599x - 3,8781 \quad [19]$$

$$y = 30,599x - 3,8781 \quad [20]$$

$$y = 7,3542x - 2,0847 \quad [21]$$

Dobivena koncentracija (x) uvrštena je u formulu (23)

$$c \text{ (spoja)} = \frac{x \times V}{m} / 1000 \quad [22]$$

gdje je:

*c* – koncentracija spoja u odvaganoj uzorku (mg g<sup>-1</sup>)

*x* – koncentracija spoja u ekstraktu (µg mL<sup>-1</sup>)

*V* – volumen ekstrakta (mL)

*m* – masa uzorka korištena za ekstrakciju (g)

### 3.2.17. Senzorska analiza

Uzorci čokolada s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova sa saharozom, kokosovim šećerom, agavinim šećerom te ječmenim i rižinim sladom procijenjeni su senzorskim metodama (Meilgaard i sur., 1999). Svi uzorci čokolada su bili upločeni u jednake forme i analizirani su u 2 grupe po 5 uzoraka, a svaku grupu uzoraka ocjenjivalo je 7 senzorskih analitičara.

#### 1. Grupa:

1. Čokolada s 49, 69% kakaovih dijelova (Kokosov šećer)
2. Čokolada s 49, 69% kakaovih dijelova (Ječmeni slad)
3. Čokolada s 49, 69% kakaovih dijelova (Rižin slad)
4. Čokolada s 49, 69% kakaovih dijelova (Saharoza)
5. Čokolada s 49, 69% kakaovih dijelova (Agava u prahu)

#### 2. Grupa

1. Čokolada s 59, 69% kakaovih dijelova (Kokosov šećer)
2. Čokolada s 59, 69% kakaovih dijelova (Ječmeni slad)
3. Čokolada s 59, 69% kakaovih dijelova (Rižin slad)
4. Čokolada s 59, 69% kakaovih dijelova (Saharoza)
5. Čokolada s 59, 69% kakaovih dijelova (Agava u prahu)

Analiza je provedena u senzorskom laboratoriju koji je opremljen prema standardnoj normi EN ISO 8589:2010. U prvom dijelu analize ocjenjivane su karakteristike kvalitete prema intenzitetu na 7-bodovnoj ljestvici od 0 – 6, gdje 0 opisuje slabo izraženu, a 6 jako izraženu karakteristiku kvalitete. Ocjenjivano je ukupno 6 svojstava: boja, struktura, topljivost, kakaov okus, okus vanilije i slatkoća. Drugi dio analize odnosio se na test rangiranja uzoraka prema kojoj su analitičari u testu trebali prema ukupnom dojmu rangirati uzorke čokolada od najboljeg (1) prema najlošijem (5). Provedena je statistička analiza rezultata koristeći t-test (0,05) za manji broj uzoraka ( $N < 30$ ) prema formuli [23].

$$t = \frac{M_1 - M_2}{SD \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}; df = (N_1 - 1) + (N_2 - 1) \quad [23]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

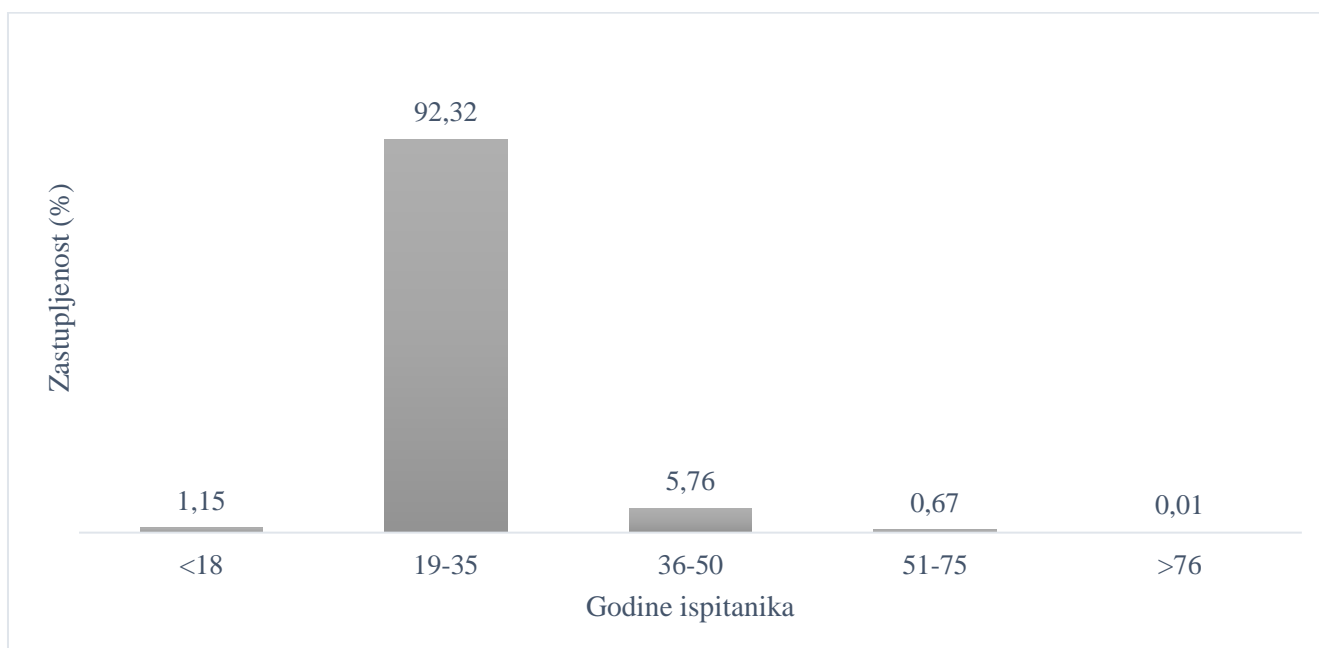
Čokolada je popularan proizvod, ne samo u Hrvatskoj, već širom svijeta. Prijašnjih godina bila je percipirana kao proizvod visoke energijske, a niske nutritivne vrijednosti međutim, otkrićem bioaktivnih spojeva u kakaovom zrnu, čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova postaje funkcionalni proizvod, a hipoteze o njezinom pozitivnom utjecaju na zdravlje ljudi potvrđene su znanstvenim dokazima. Prva klinička studija na ljudima Kondo i suradnika (1996) otkrila je da konzumacija 35 g odmašćenog uzorka čokolade smanjuje oksidaciju LDL nakon 2 do 4 h od oralne konzumacije. Zahvaljujući raširenoj konzumaciji čokolade s polifenolima ona predstavlja značajan izvor antioksidanasa u prehrani. Literaturni podaci navode da 40 g čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova osigurava u prosjeku od 395 do 951 mg antioksidanasa (Vinson i sur., 2001), odnosno u američkoj populaciji 20% ukupnih antioksidanasa u prehrani potječe iz čokolade, a u Europi je taj postotak i veći, posebno kod djece (Lamuela-Raventós i sur., 2005). Međutim, nisu sve čokolade jednako bogate antioksidansima, budući da na udio polifenola utječu različiti faktori, kao što je porijeklo kakaovog zrna te sama proizvodnja čokolade, ali i dodatak drugih komponenta čokoladi, kao što je primjerice mlijeko (Afoakwa i sur., 2015; Serafini i sur., 1996).

Promjenom prehrambenih navika potrošača sahara u čokoladi postepeno se zamjenjuje zamjenskim sladilima. Promjeni prehrambenih navika doprinjele su i smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) da se udio sahara u prehrani smanji. Smanjivanje sahara najveći je izazov za konditorsku industriju, ponajprije proizvodnju čokolade, jer sahara kao sladilu najboljih tehnoloških i senzorskih karakteristika nije jednostavno naći zamjenu. U širu primjenu su zbog toga ušla zamjenska sladila koja su svojim reološkim i senzorskim svojstvima najbliže onima kakve ima sahara, a ta sladila su šećerni alkoholi, visoko ugljikohidratni polimeri (inulin, maltodekstrin) i intenzivno prirodno sladilo stevija. Budući da prirodna zamjenska sladila kao, primjerice šećeri porijeklom iz biljaka agave, ječma, riže i kokosa nisu u komercijalnoj primjeni te njihov bioaktivni doprinos, kao i utjecaj na fizikalna svojstva čokolade, nije dovoljno literaturno potkrjepljen, cilj ovoga rada bio je proizvesti čokolade s upravo tim sladilima te ispitati utjecaj njihovog dodatka na fizikalno-kemijska, bioaktivna i senzorska svojstva čokolada s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova. U sklopu istraživanja, a u cilju dobivanja informacija o učestalosti konzumacije i preferencijama u sastavu čokolade provedena je i kratka *online* anketa na uzorku od 1042 ispitanika.

## 4.1. REZULTATI ANKETE

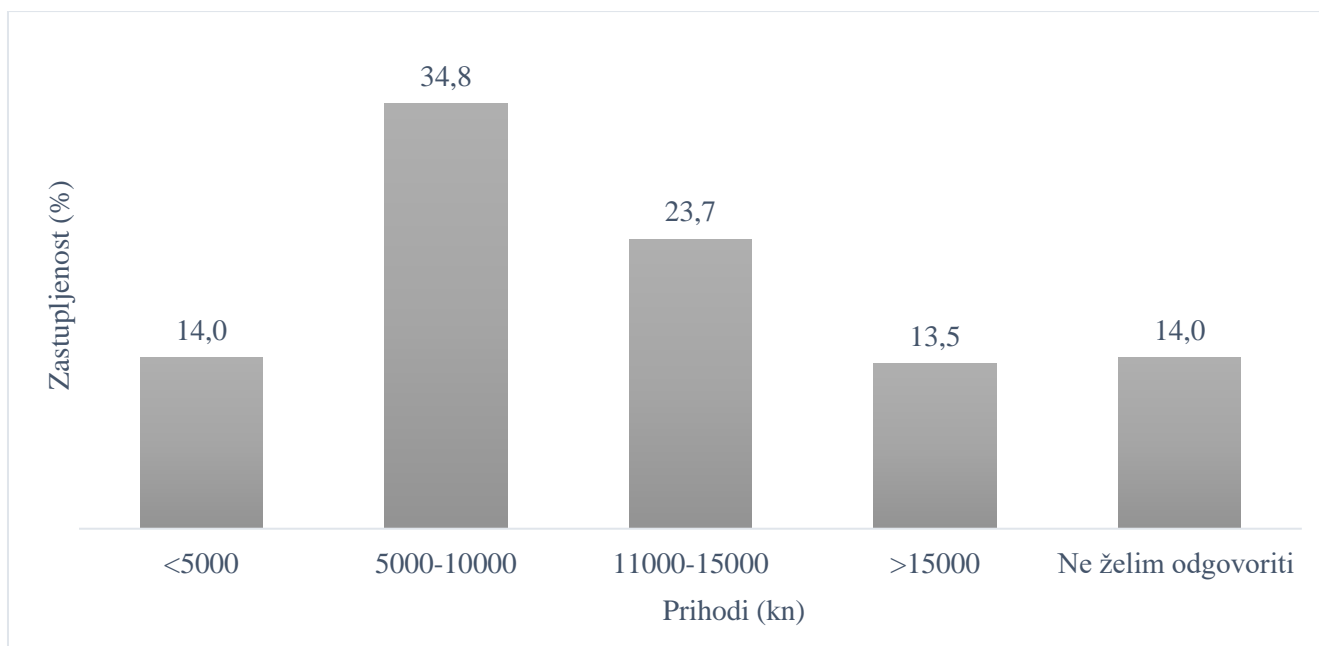
### 1. Sekcija demografski parametri

Od ukupnog broja ispitanika žena je 83,4%, a muškaraca 16,6%, a raspodjela po dobi je prikazana na slici 15. Činjenica da je uzorak ispitanika slučajan mogao bi predstavljati nedostatak budući da nije dovoljno reprezentativan s obzirom na cjelokupnu populaciju.

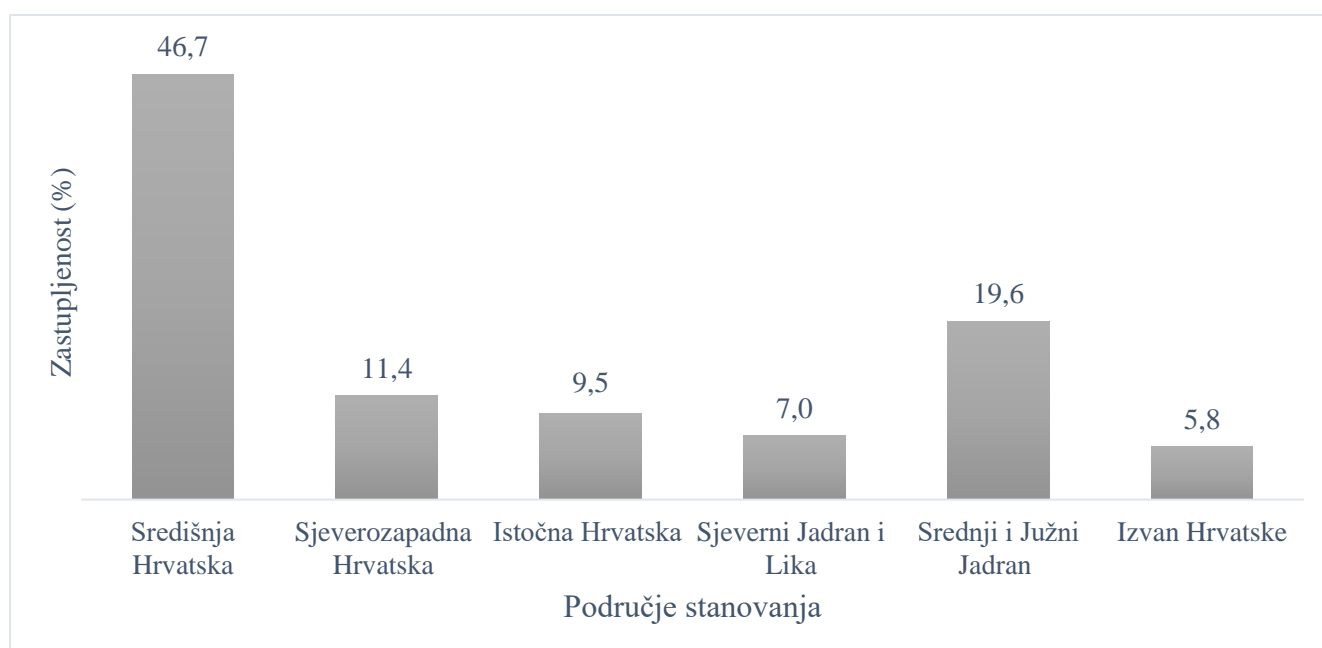


Slika 15. Prikaz raspodjele ispitanika prema dobnim granicama

Većina ispitanika nalazi se u dobnom intervalu od 19 do 35 godina, imaju visoko i više obrazovanje i stanuju na području Središnje Hrvatske. Visoko i više obrazovanih je 75,2%, srednje (srednja škola) obrazovanje ima 22,6% ispitanika, dok 1,8% ispitanika označuje da ima obrazovanje nakon srednje škole koje nije niti više niti visoko (usavršavanja, tečajevi). Prihodi po kućanstvu prikazani su na slici 16., a područje stanovanja na slici 17.



Slika 16. Prikaz zastupljenosti ispitanika ovisno o prihodima po kućanstvu

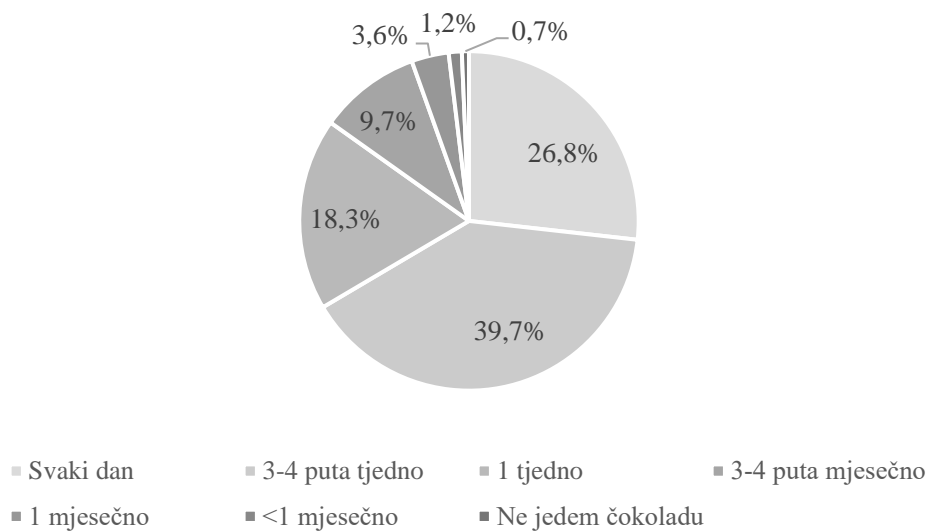


Slika 17. Raspodjela ispitanika prema području stanovanja

Povezanost demografskih parametara i konzumacije čokolade ovim istraživanjem nije utvrđena pa se zaključak istraživanja ne može pripojiti onom Doherty i Tranchell (2005) koji glasi da je spol jedan od demografskih parametara koji utječu na konzumaciju čokolade. Sličan zaključak o utjecaju spola na konzumaciju čokolade dobiven je u istraživanju Yuker (1997) prema kojem čokoladu svakodnevno konzumira gotovo 2 puta više žena nego muškaraca.

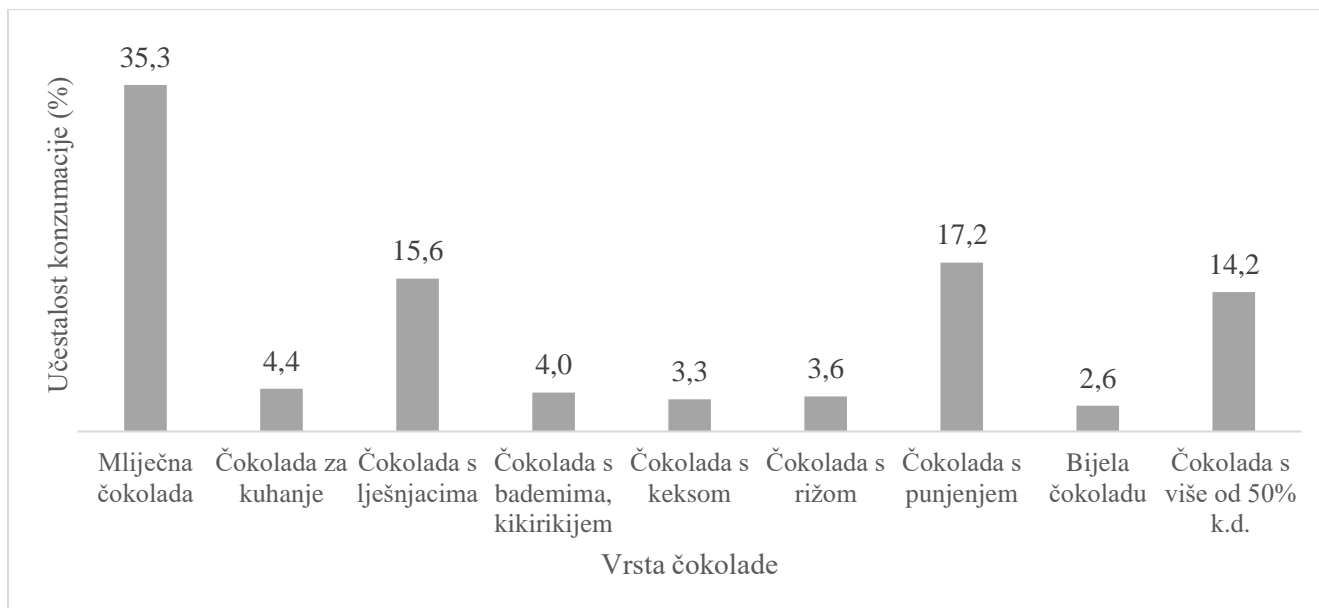
## 2. Sekcija osobne navike i učestalost konzumacije

Najviše ispitanika čokoladu konzumira nakon ručka (78,3%), zatim nakon večere (10,2%), između doručka i ručka (9,0%) te nakon doručka (2,5%). Većina konzumirane čokolade odnosi se na čokoladu (64,6%), manje čokoladice npr. Snickers, Mars (12,9%) te čokoladne kekse (10,2%). Najmanje čokolade pojede se u obliku čokoladnog kolača ili torte (6,8%) te pralina (1,2%). Učestalost konzumacije čokolade prikazana je na slici 18.



Slika 18. Vremenska učestalost konzumacije čokolade

U studiji Velarde i suradnika (2018) čokolada se u najvećem postotku konzumirala 1 do 2 puta tjedno što je manje učestalo nego u ovom istraživanju. Vrste čokolade koje ispitanici najčešće konzumiraju prikazane su na slici 19. Čokolada se najviše konzumira u obliku table čokolade, a ovisno o vrsti čokolade najčešće se konzumira mliječna, zatim slijede čokolada s punjenjem i s lješnjacima. U studiji Chawla i Sondhi (2016) ispitivana je konzumacija čokolade u indijskoj populaciji u kojoj se prema rezultatima najčešće konzumira čokolada s lješnjacima, a potom mliječna čokolada.



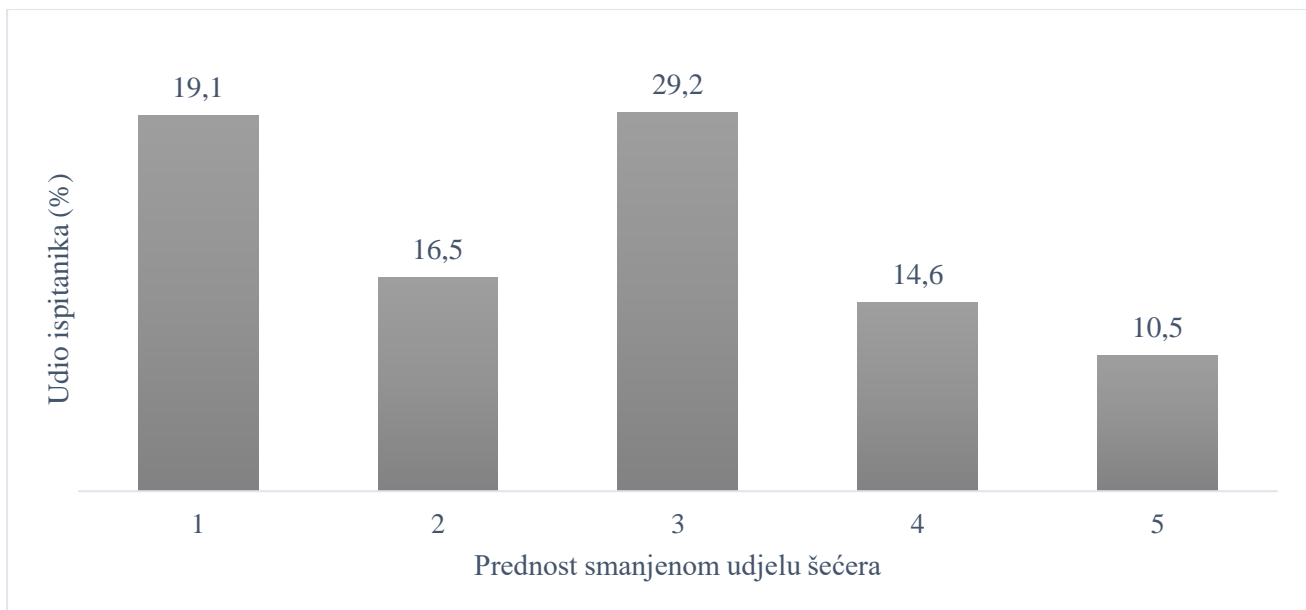
Slika 19. Pregled učestalosti konzumacije pojedinih vrsta čokolade

Čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova nije čokolada koja se najviše konzumira unatoč povećanju interesa prema toj čokoladi u posljednjem desetljeću kao potencijalnom funkcionalnom proizvodu. Najveći broj ispitanika deklaraciju ne čita (69,9%), a od 69,9% njih 21,1% čita postotak kakaovih dijelova čime se može zaključiti da ispitanici informaciju o postotku kakaovih dijelova ne doživljavaju kao dio nutritivne deklaracije.

### 3. Sekcija preferencije

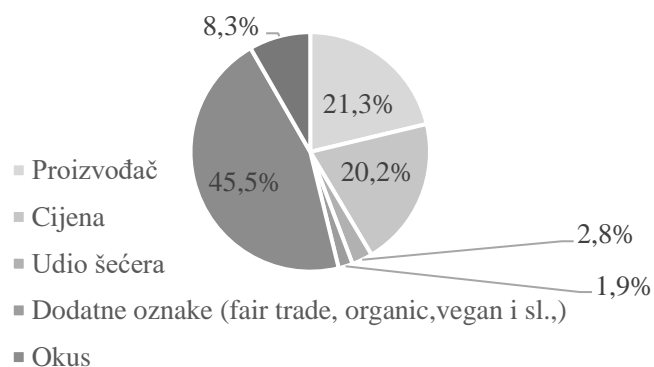
Zanimljivo je da u ovom istraživanju čak 72,4 % ispitanika navodi kako voli čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova, a od tih koji navode da vole čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova tek 19,9% čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova najčešće jede. Razlozi zbog kojih ispitanici ne vole čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova jesu gorak okus (86%) i otežana topljivost u ustima (7,2%). Prema studiji Berg i suradnika (2012) čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova konzumira većinom starija populacija što je suprotno u odnosu na ovo istraživanje gdje većinom mlađa populacija konzumira čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova. Raspodjela važnosti smanjenog udjela šećera u čokoladi prikazana je na slici 20. Najvećem broju ispitanika okus je najbitniji prilikom izbora čokolade, na drugom mjestu je proizvođač, zatim cijena (slika 21.). U studiji Chuin i Mohamad (2012) proizvođač i zemlja podrijetla su se nametnuli kao bitni parametri prilikom izbora čokolade. Ispitanicima s prihodima većim od 15 000 kuna po kućanstvu okus je prvi parametar pri izboru čokolade, zatim proizvođač, cijena, udio kakaovih dijelova i na zadnjem mjestu udio šećera i oznake „Fair trade“ i „Organic“.





Slika 20. Raspodjela odgovora o važnosti smanjenog udjela šećera u čokoladi (1 jako bitno, 5 nebitno)

Ispitanicima s prihodima manjim od 5 000 kuna po kućanstvu prvi parametar je isto tako okus, zatim cijena, proizvođač, udio kakaovih dijelova i šećer, dok niti jednom ispitaniku ovog intervala oznake „Fair Trade“ i „Organic“ nisu bile važne prilikom izbora čokolade. Do sličnih spoznaja su došli Sahoo i Garg (2012) kod kojih je neposredno nakon okusa uslijedila energijska vrijednost kao bitan parametar prilikom izbora čokolade. Za razliku od ovog, kao i istraživanja Sahoo i Garg (2012) u kojima cijena nije bila odlučujući faktor prilikom kupovine čokolade, u istraživanju Patwardhana i suradnika (2010) pokazalo se da kupci odluku o kupovini čokolade ipak najviše vežu uz cijenu. Prema našem istraživanju cijena nije bila presudan faktor prilikom kupovine čokolade čak niti za ispitanike s prihodima manjim od 5000 kuna po kućanstvu. Mjesto kupovine čokolada većine ispitanika (96,7%) su prodavaonice široke potrošnje (npr. Konzum, Lidl, Spar), manjem broju prodavaonice zdrave hrane (2,2%) i specijalizirane prodavaonice čokolade (1,1%).



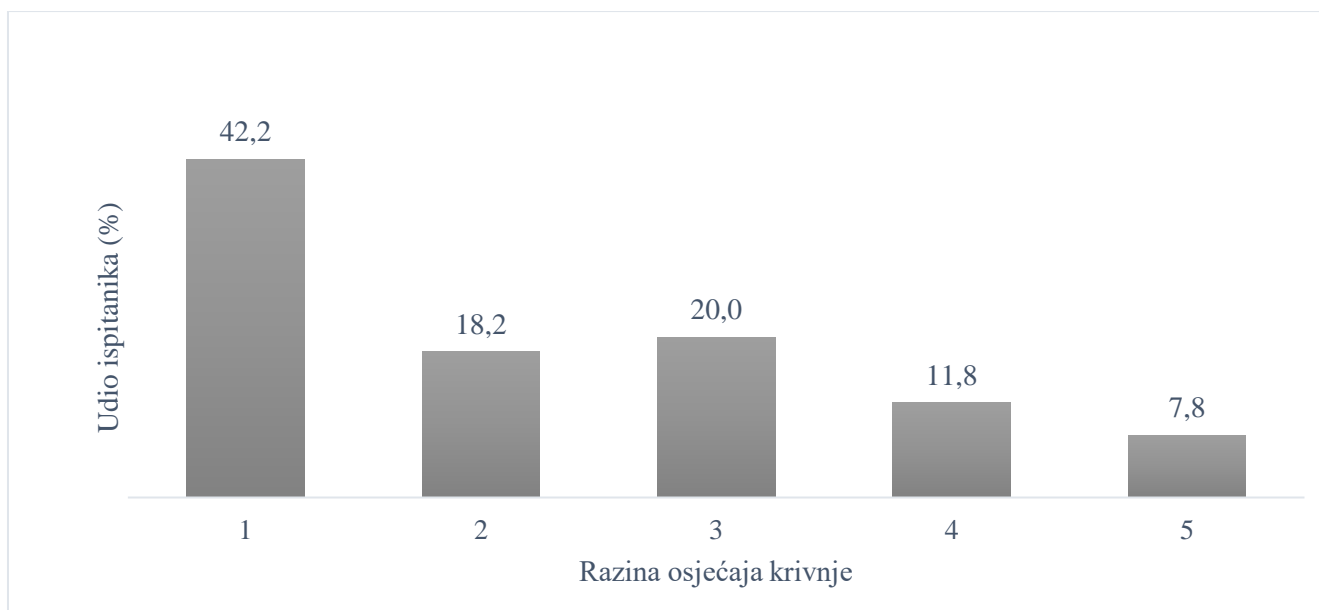
Slika 21. Raspodjela parametara koji utječu na odluku o izboru čokolade

#### 4. *Sekcija osnovno znanje o čokoladi*

56,9% ispitanika zaokružilo je točne sirovine za proizvodnju čokolade (kakaov maslac, kakaova masa i šećer), 28,2% smatra kako su osnovne sirovine kakaov maslac, kakaova masa, voda i šećer, a 14,9% navodi magarin, kakaovu masu i šećer. 84,9% ispitanika zaokružilo je da je navod „Čokolada za kuhanje sadrži manje šećera i veći udio kakaovih dijelova od mliječne čokolade“ točan te 94,6% ispitanika zaokružilo je da mliječna čokolada sadrži manje antioksidanasa od čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova. 92,3% smatra kako je čokolada s povećanim udjelom kakaovih dijelova bogatija antioksidansima pa time i zdravija za konzumaciju, 65,6% ispitanika točno je zaokružilo kako kofein prisutan u čokoladi potječe od kakaove mase, 11% smatra kako kofein potječe od arome, 10,6% misli da je od emulgatora, 8,9% od kakaovog maslaca, a 3,9% od šećera. 95,4% ispitanika smatra kako čokolada može biti dio pravilne i uravnotežene prehrane što je puno veći postotak nego u studiji Velarde i suradnika (2018). Među onima koji smatraju da čokolada može biti dio pravilne i uravnotežene prehrane 22,4% navodi kako je čokolada izvor praznih kalorija i da bi je trebalo izbjegavati. Na pitanja vezana uz osnovna znanja o čokoladi većina ispitanika pokazuje dobro opće znanje, a uočena je i povezanost s razinom obrazovanja, jer među ispitanicima koji odgovaraju točno na postavljena pitanja većina je visoko obrazovanih.

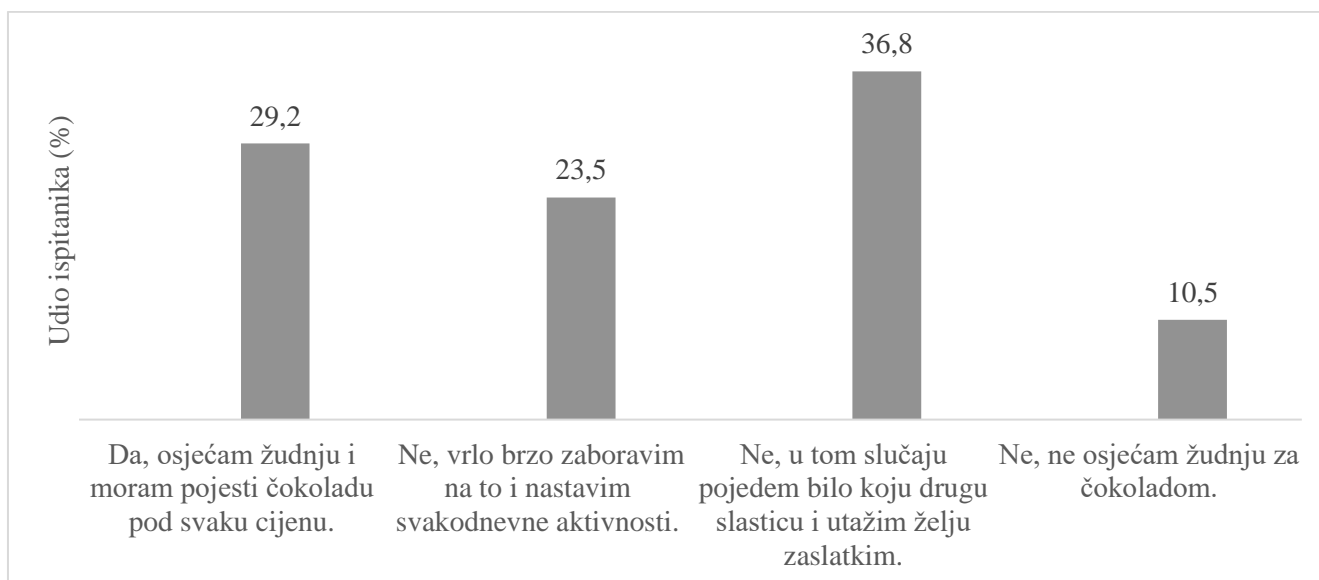
#### 5. *Sekcija emocionalni aspekt konzumiranja čokolade*

60,7% ispitanika jede čokoladu neovisno o raspoloženju, 12,9% navodi druge razloge koji utječu na konzumaciju čokolade, 8,4% ispitanika čokoladu jede iz navike, 6,9% jede ju kao nagradu, 6,6% kad su loše volje, 3,5% iz dosade i 1,2% kad su dobre volje. 7,8% ispitanika osjeća krivnju kada pojede čokoladu, dok je 42,3% ispitanika uopće ne osjeća i procjenjuje ocjenom 1 (nebitno) osjećaj krivnje na skali od 1 do 5. 20% ispitanika krivnju označuje ocjenom 3, 18,2% ocjenom 2, a 11,8% ispitanika ocjenom 4. Žudnju za čokoladom osjeća 29,2% ispitanika, 36,8% ispitanika osjeća žudnju za bilo kojim slatkim proizvodom, a ne isključivo čokoladom. Od ispitanika koji osjećaju žudnju za čokoladom 83,8% njih navodi da pojedu više čokolade nego što misle da bi trebali, 66,9% ne može misliti ni na što drugo tijekom žudnje za čokoladom, a 23,5% ispitanika može se svakodnevnim aktivnostima oduprijeti žudnji za čokoladom. Na slici 22. prikazan je stav o tome osjećaju li ispitanici krivnju jer misle da će konzumacija čokolade rezultirati povećanjem tjelesne mase, a na slici 23. raspodjelu odgovora o mogućnosti konzumacije nekog drugog proizvoda umjesto čokolade kad osjete žudnju.



Slika 22. Razina slaganja s tvrdnjom „Osjećam krivnju kada pojedem čokoladu jer mislim da će rezultirati povećanjem tjelesne mase.“ (1 bez osjećaja krivnje, 5 jako izražen osjećaj krivnje)

Osjećaj krivnje nakon konzumacije čokolade imalo je tek 7,8% ispitanika što je različito u odnosu na istraživanje Velarde i suradnika (2018), gdje je krivnja bila značajno viša i smanjivala se s povećanjem dobi, a taj je trend uočen i u ovom istraživanju.



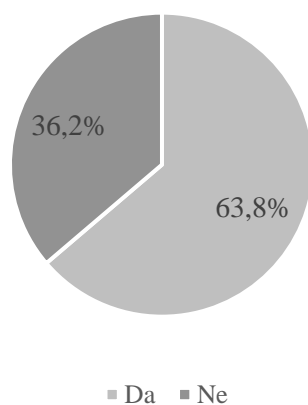
Slika 23. Pitanje „Ukoliko ne pojedem čokoladu kada mi se jede, osjećam snažnu žudnju za njom.“

Žudnja za hranom povezana je s većim uobičajenim konzumiranjem hrane za kojom se osjeća žudnja, a čokolada je namirnica za kojom se najčešće žudi (Chao i sur., 2014.). U ovom istraživanju 60,7% ispitanika jede čokoladu neovisno o raspoloženju, a samo 6,6% ispitanika čokoladu jedu kad

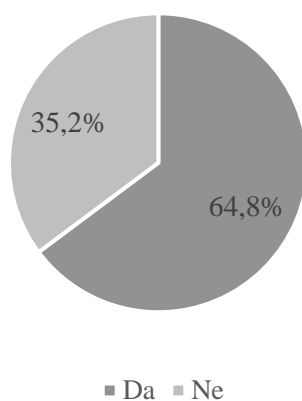
su loše volje. Iako se konzumacija čokolade povezuje s poboljšanjem raspoloženja može se desiti i obrnuta situacija tj. pojava negativnih emocija poput krivnje jer je čokolada percipirana kao namirnica bogata šećerom i mastima (Rogers i Smit, 2000).

#### 6. Sekcija otvorenost prema konzumaciji novih okusa

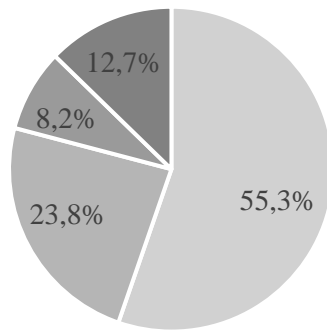
Posljednja sekcija odnosila se na pitanja o voljnosti i otvorenosti prema konzumaciji čokolada s netipičnim dodacima i sladilima, a raspodjela odgovora prikazana je na slikama 24-27.



Slika 24. Jeste li ikada probali čokoladu s netipičnim dodacima (čili, kadulja, papar, curry, bundeva, vino...)

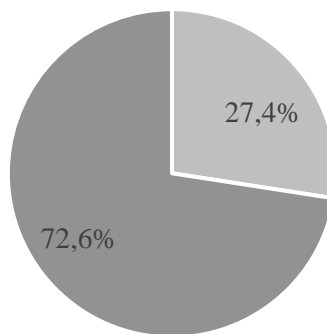


Slika 25. Biste li ikada probali čokoladu s netipičnim dodacima?



- U redu je, no više volim klasične dodatke čokoladi
- Jako mi se svidio okus
- Nije mi se svidio okus
- Nije mi se svidio okus, ali nije mi ni odbojna takva čokolada

Slika 26. Što mislite o okusu čokolade u kojoj je dodan netipičan dodatak (čili, papar, kadulja...)



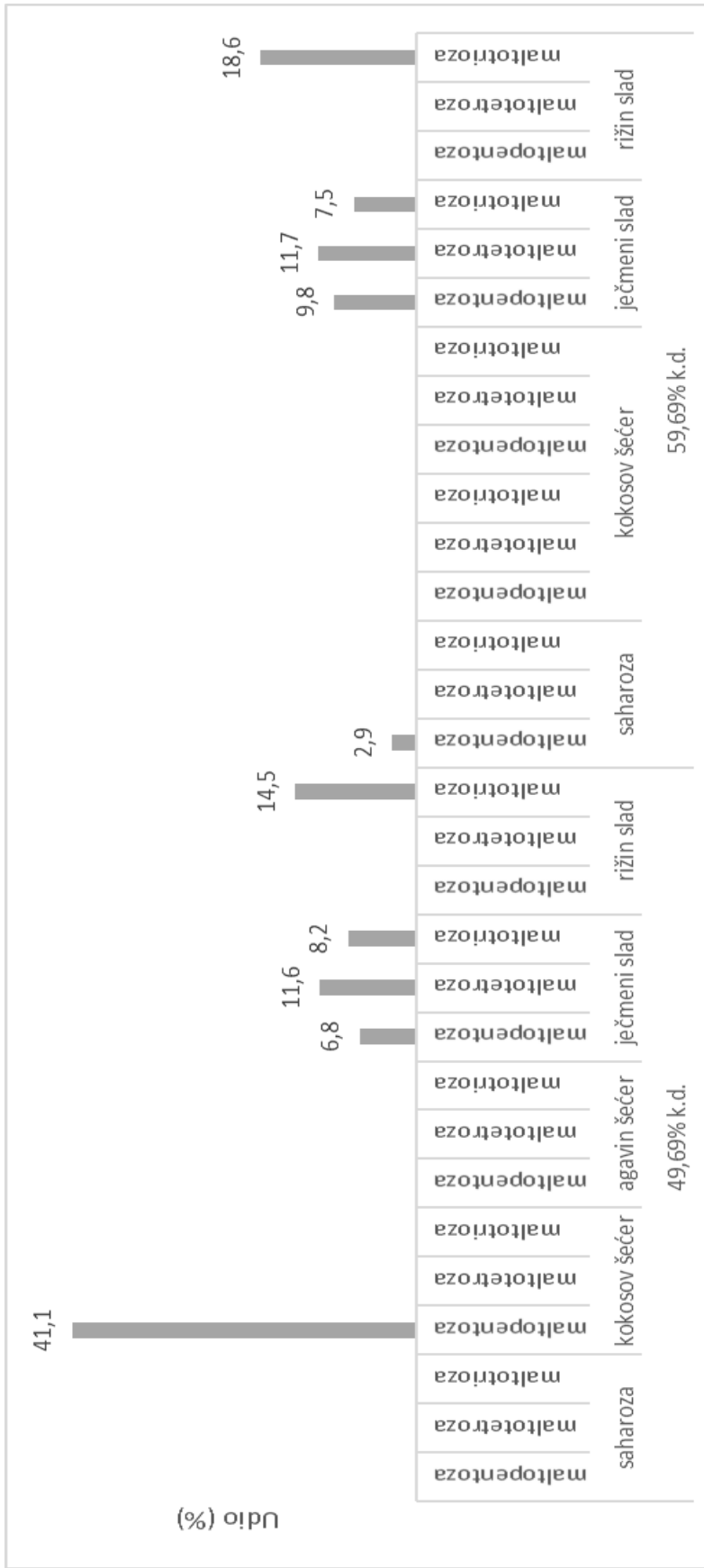
- Da
- Ne

Slika 27. Jeste li probali čokoladu kojoj je dodano netipično sladilo (npr. kokosov šećer, agava u prahu)?

## 4.2. SASTAV ŠEĆERA U ČOKOLADAMA

Sastav šećera u čokoladi ovisi o sastavu sirovine iz koje se dobiva. Na udio šećera utjecaj imaju unutarnji i vanjski uvjeti u kojima biljka raste te način procesiranja polazišne sirovine za proizvodnju šećera. Na slikama 28. i 29. prikazan je udio šećera u ispitivanim čokoladama u ovisnosti o udjelu kakaovih dijelova i vrsti sladila u čokoladi. Čokolade s 49,69% k.d. sadrže veći udio svih šećera u odnosu na čokolade s 59,69% k.d., a najveći udio viših šećera sadrži čokolada s rižinim sladom. Jednak trend raspodjele viših šećera je i u čokoladama s 59,69% kakaovih dijelova. Najveći udio oligosaharida maltopentoze, malatotetroze i maltotrioze sadrži čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s ječmenim sladom, a udjeli su u skladu s onima dobivenim u studiji Ofoedu i suradnika (2019). Huang i suradnici (2016) metodom infracrvene spektroskopije mjerili su sastav ječmenog slada i dobili malo više udjele oligosaharida nego u ovom istraživanju, a ta mala razlika može se pripisati različitim metodama kvantifikacije. Najveći udio maltopentoze sadrži čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom, a najveći udio maltotrioze čokolada s rižinim sladom. Prisutnost oligosaharida u skladu je s literaturnim podacima (Edney i sur., 2014; Szwajgier, 2015). Saharozu u velikom udjelu sadrži čokolada s kokosovim šećerom te znatno manje čokolada s agavinim šećerom i ječmenim sladom.

Zanimljivo, čokolada s kokosovim šećerom ne sadrži glukozu, što je suprotno s literaturnim podacima dobivenim u istraživanjima Purnomo i suradnika (2018) i Asghar i suradnika (2019). Istovremeno, u čokoladi s 59,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom izmjeren je veći udio fruktoze i manji udio saharoze u odnosu na čokoladu s 49,69% kakaovih dijelova. Takav sastav čokolade s 59,69% k.d. bi mogao utjecati na smanjivanje glikemijskog indeksa čokolade (Saputro i sur., 2017a) jer fruktoza, za razliku od saharoze, za apsorpciju u stanicu ne zahtjeva inzulin. Najveći udio disaharida maltoze je u čokoladi s rižinim sladom (28,5%). Ofoedu i suradnici (2019) su HPLC analizom sastava rižinih sirupa različitih varijeteta odredili gotovo dvostruko veći udio (50%) maltoze u sirupima. Od monosaharida, najveći udio fruktoze sadrži čokoladi s 49,69% kakaovih dijelova s agavinim šećerom, a rezultati su u skladu sa studijom Willems i Low (2012), te bi zahvaljujući većem udjelu fruktoze čokolada s agavom prema literaturnim podacima trebala imati nizak glikemijski indeks. Udjeli ostalih izmjerenih šećera u čokoladama poklapaju se s rezultatima Saputro i suradnika (2017b), Phaichamnan i suradnika (2010), Apriyantono i suradnika (2002). U navedenim radovima udio fruktoze u kokosovom šećeru može biti od 3 do 24%, odnosno od 50 do 80% saharoze. Glukozu sadrži čokolada s 59,69% k.d. s ječmenim sladom i s agavinim šećerom te čokolada s 49,69% k.d. s rižinim sladom.



Slika 28. Udio oligosaharida u čokoladi s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova

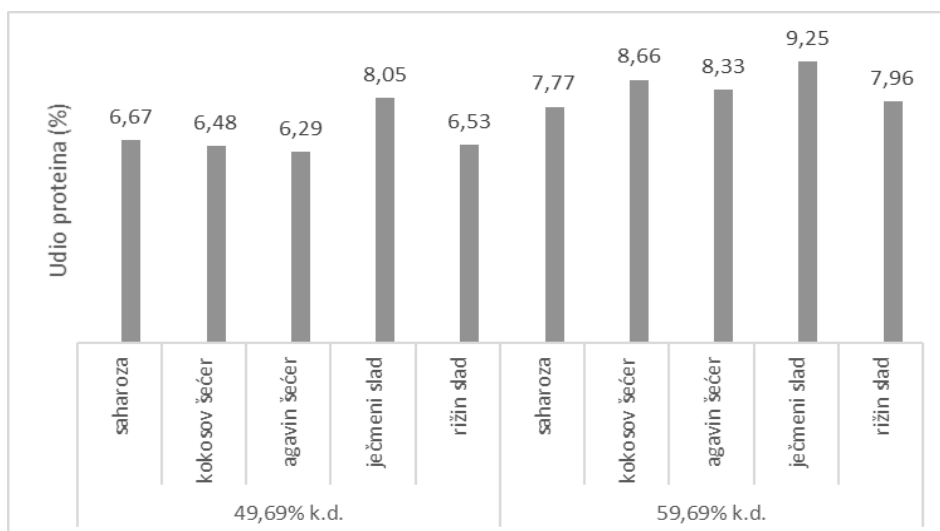




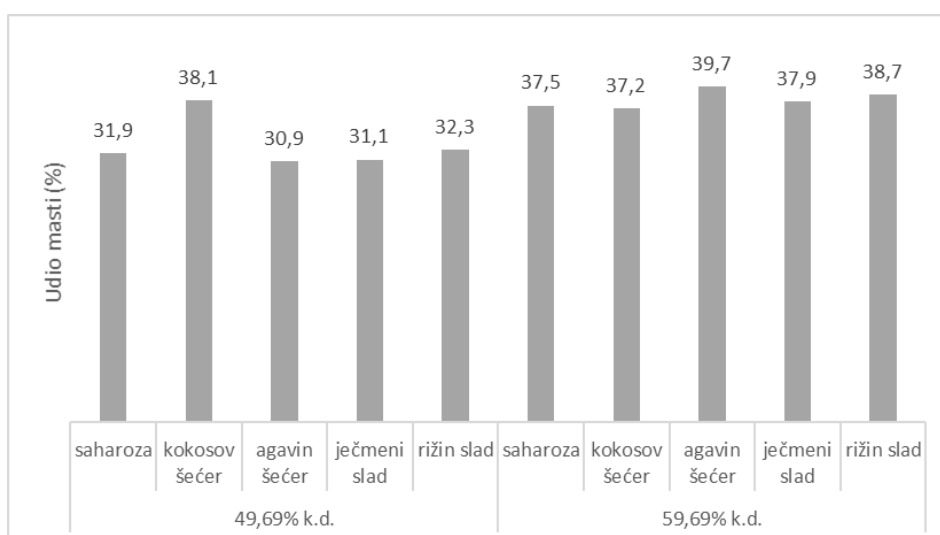
### 4.3. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI ČOKOLADA

#### 4.3.1. Udio proteina i masti

Udio masti i proteina veći je u čokoladama s 59,69% kakaovih dijelova u odnosu na čokolade s 49,69% k.d (slika 30. i 31.). Može se zaključiti da veći udio proteina i masti dolazi od kakaove mase jer prema istraživanju Bertazzo i suradnika (2011) svježe kakaovo zrno sadrži oko 32-39% vode, 30-32% masti te 10-15% proteina pa se može očekivati da određen udio proteina i masti zaostaje u čokoladi. Na vrstu i udio proteina u kakaovom zrnu utječe genotip, što onda utječe na tip i vrstu prekursora koji nastaju tijekom fermentacije i sušenja, a odgovorni su za formiranje konačne arome i okusa čokolade (Afoakwa i sur., 2008). Doprinos udjelu proteina mogao bi biti i od samog sladila. Naime, u studiji Edney i suradnika (2014) navodi se kompleksan sastav ječmenog slada u kojem su proteini također važan dio. To je potencijalni razlog zašto najveći udio proteina (9,25%) sadrži čokolada s 59,69% k.d. s ječmenim slodom. Najmanji udio proteina (6,29%) sadrži čokolada s 49,69% k.d. s agavinim šećerom. Udio masti veći je kod čokolada s 59,69% kakaovih dijelova u odnosu na 49,69% kakaovih dijelova što je u skladu s literaturnim podacima jer mast potječe od kakaove mase. U studiji Vahedi i suradnika (2016) ispitala su se fizikalno-kemijska svojstva čokolade kojoj se udio saharoze postupno zamijenjivao s agavinim šećerom i stevijom. Rezultati su pokazali da se udio proteina i masti nije signifikantno promijenio kod čokolade s agavinim šećerom, u usporedbi sa standardom, međutim, u čokoladi sa stevijom udio proteina i masti značajno se povećao. Može se zaključiti da zamjena saharoze drugim sladilima utječe na promjenu fizikalno-kemijskih svojstva čokolada. Prema ovom istraživanju, nije bilo značajne razlike između udjela proteina i masti u čokoladama s 49,69% kakaovih dijelova i zamjenskih sladila u odnosu na iste sa saharozom, međutim zapažene su blago veće razlike u udjelu proteina i masti kod čokolada s 59,69% kakaovih dijelova, uz zamjenska sladila, u odnosu na čokoladu sa saharozom.



Slika 30. Udio proteina u ovisnosti o vrsti šećera u čokoladi s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova

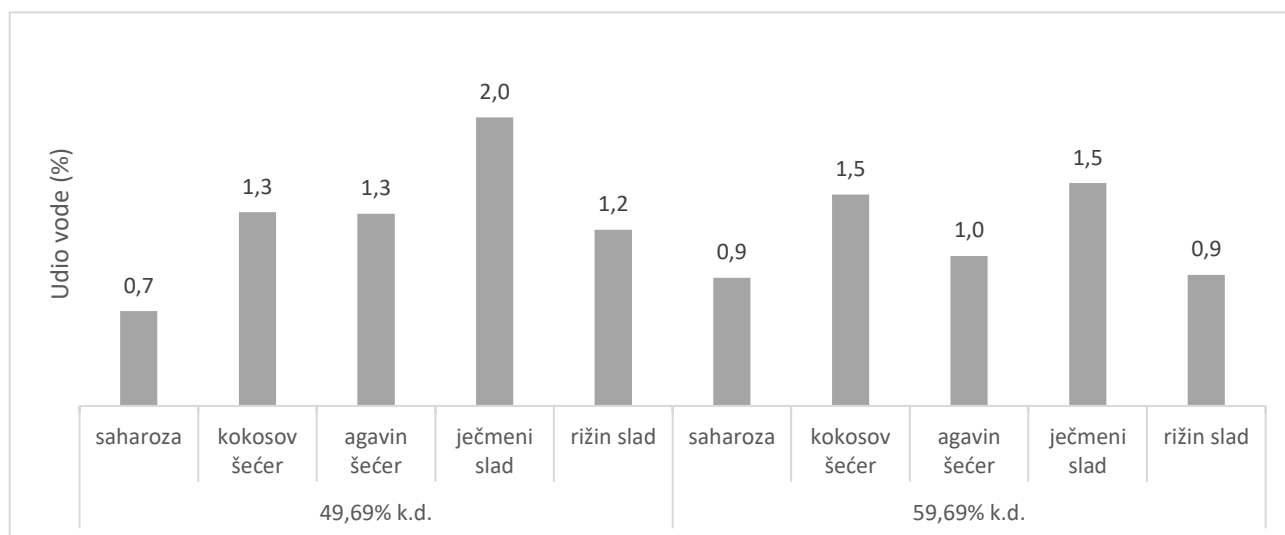


Slika 31. Udio masti u ovisnosti o vrsti šećera u čokoladi s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova

#### 4.3.2. Udio vode

Udio vode, saharoze, ukupnog i direktnog inverta te udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova za čokolade s 49,69% i 59,69% k.d. s različitim sladilima prikazani su na slikama 32. i 33. Udio vode u čokoladama s 49,69% k.d. kretao se u rasponu od 0,65 do 1,98%, a u čokoladama s 59,69% k.d. od 0,88 do 1,53% (slika 32.). Najveći udio vode uočen je kod čokolade s 49,69% k.d. s ječmenim sladom, a najmanji kod čokolada sa saharozom. Udio vode u čokoladi se negativno odražava na reološke i senzorske karakteristike pa bi zapravo udio vode trebao biti što sličniji optimalnom udjelu vode, kakav ima čokolada sa saharozom. Glukoza i fruktoza koje se nalaze u sastavu kokosovog šećera zbog higroskopnosti dovode do povećanja razine vode (Saputro i sur., 2017a), što se može vidjeti i u rezultatima ovog istraživanja. Na slici 32. može se vidjeti kako se udio vode kod svih čokolada povećao

se u odnosu na standard (sa saharozom), a najviše u čokoladi s 49,69% k.d. s ječmenim sladom. Povećanje udjela vode u čokoladi s 49,69% k.d. s agavinim šećerom iznosilo je 53,1% što je u skladu s povećanjem udjela vode u čokoladi (54,8%) izmjenjenim u studiji Arentz (2018). Iz rezultata je vidljivo da dodatak zamjenskog sladila utječe na povećanje udjela vode, što bi moglo utjecati na senzorske i reološke karakteristike čokolade (Beckett, 2000). Reološke karakteristike su uvjetovane udjelom vode u čokoladi koja bi za optimalne karakteristike trebala biti što manja.



Slika 32. Udio vode u ovisnosti o vrsti šećera u čokoladi s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova

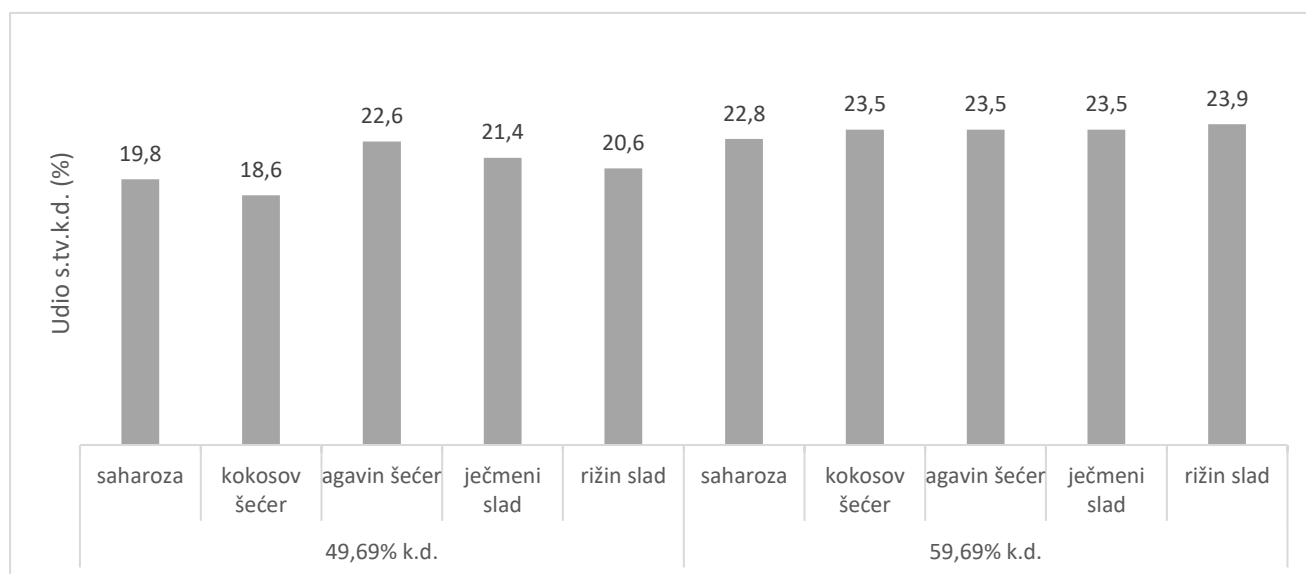
#### 4.3.3. Udio ukupnog i direktnog inverta

Prirodan ili direktni invert čine reducirajući šećeri (glukoza, fruktoza, maltoza, laktoza), dok je ukupni invert rezultat sume prirodnog inverta i šećera koji nakon hidrolize reduciraju metalne ione. Ukupan invert za čokolade s 49,59% k.d. iznosio je od 26,0 do 53,20%, a za čokolade s 59,69% od 28,60 do 42,20% i prikazan je na slici 33. Najveći udio ukupnog inverta imala je čokolada s 49,69% k.d. s agavom u prahu, a najmanji čokolada s 59,69% k.d. s rižinim sladom. U proizvodnom procesu reološka svojstva čokolade su definirana s dva parametra: plastičnom viskoznošću i granicom naprezanja (Gonçalves i Lannes, 2010). Na ta svojstva izravan utjecaj ima udio masti, raspodjela veličine čestica, udio vode, prisutnost emulgatora te tip ugljikohidrata, dakle povećanje proteina, masti, vode i šećera moglo bi utjecati na reološka svojstva čokolade, prvenstveno na viskoznost i teksturu (Afoakwa i sur., 2007). Činjenica kako ovi parametri utječu na promjenu reoloških parametara čokolade prije svega na viskoznost, utvrđena je i u istraživanju Saputro i suradnika (2017a). Najveći udio ukupnog inverta ima čokolada s 49,69% k.d. s agavom u prahu (slika 33.) čija je tekstura u senzorskim testovima opisana kao grublja i manje fina, a sastav šećera u agavinom sirupu u skladu s istraživanjem Willems i Low (2012).



#### 4.3.4. Udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova

Prema literaturnim podacima udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova izvor je polifenola i nemali broj studija navodi bezmasnu suhu tvar kakaovih dijelova kao marker udjela polifenola. Miller i suradnici (2006) otkrili su jaku vezu između bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i antioksidacijske aktivnosti, udjela ukupnih polifenola i proantocijanidina. U istraživanju Gu i suradnika (2006) uočena je također jaka povezanost između udjela bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i proantocijanidina te je zapaženo da je udio proantocijanidina proporcionalan udjelu kakaovih dijelova u čokoladi. U ovom istraživanju je udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova veći u svim čokoladama s 59,69% k.d. u odnosu na čokolade s 49,69% k.d. (slika 34.) pa se na temelju navedenih podataka može zaključiti kako udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova raste s povećanjem udjela kakaovih dijelova. Isto je istaknuto i u studiji Belščak-Cvitanović i suradnika (2009). Najveći udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova ima čokolada s 59,69% k.d. s rižinim slodom, a najmanji čokolada s 49,69% s kokosovim šećerom.



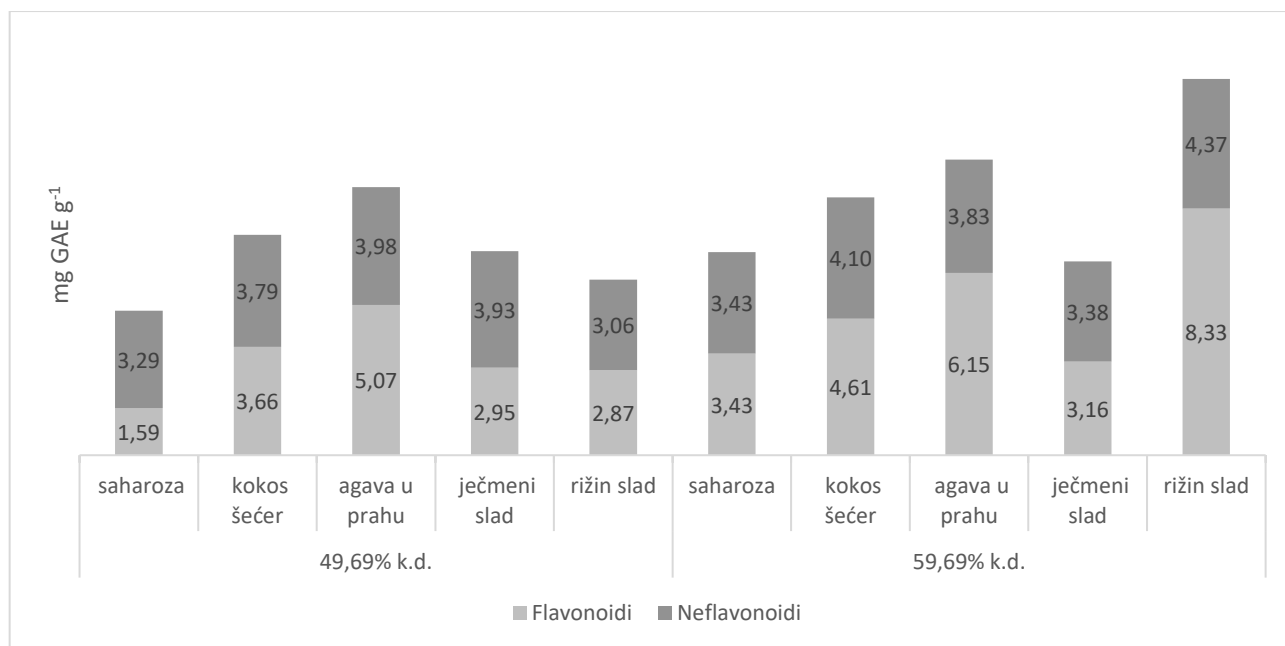
Slika 34. Udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova u ovisnosti o vrsti šećera u čokoladi s 49,69% i 59,69% kakaovih dijelova

## 4.4. BIOAKTIVNI SASTAV ČOKOLADA

### 4.4.1. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida

Udio ukupnih neflavonoida određivao se indirektno oduzimanjem vrijednosti ukupnih neflavonoida od udjela ukupnih polifenola. Udio ukupnih polifenola odredio se spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim reagensom. Reakcija je oksido-redukcijska pri čemu fenoli

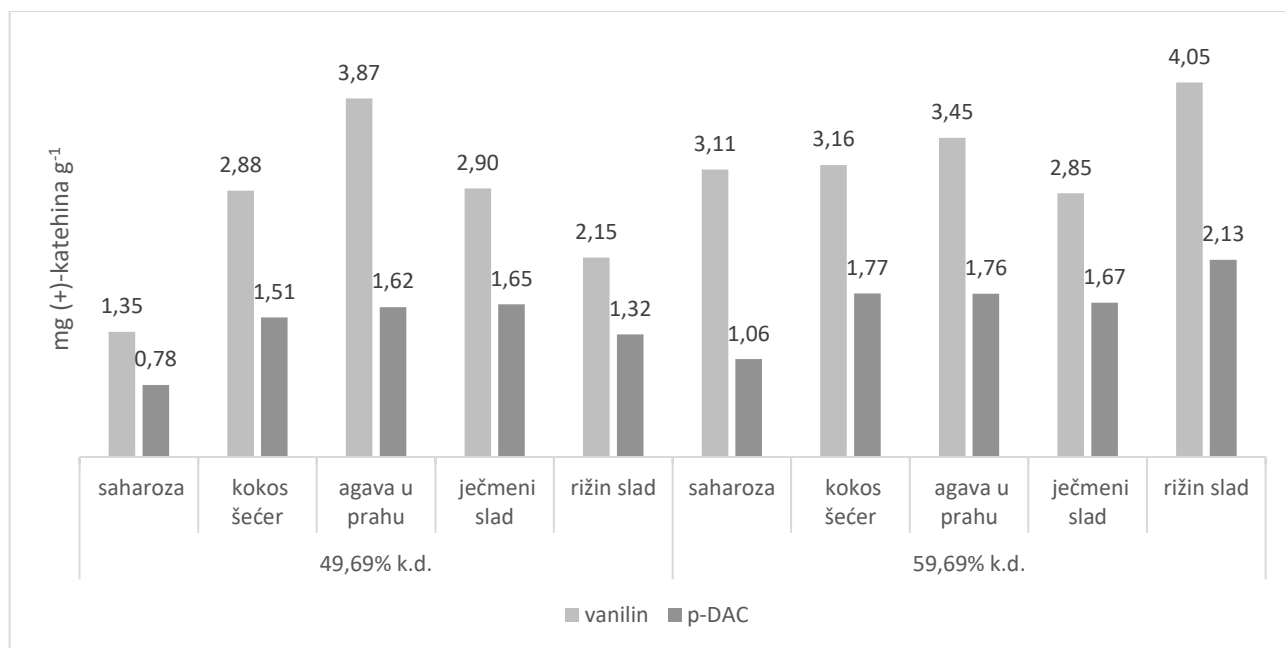
reduciraju reagens, a sami se oksidiraju pri čemu nastaje plavo obojenje. Folin-Ciocalteuov reagens osim s fenolima može reagirati i s drugim spojevi primjerice proteinima, šećerima, L-askorbinskom kiselinom, sumporov (IV) oksidom što utječe na spektrofotometrijska očitavanja (Vinson i sur., 2001). Čokolade s 59,69% k.d. imale su veći udio ukupnih polifenola koji se kretao od 6,54 do 12,70 mg GAE po gramu uzorka, u odnosu na čokolade s 49,69% k.d. u kojima je udio ukupnih polifenola bio u rasponu od 4,88 do 9,05 mg GAE po gramu uzorka (slika 35.). Najveći udio polifenola (12,70 mg GAE g<sup>-1</sup>) određen je u čokoladi s 59,69% k.d. s rižinim sladom, a najmanji udio u čokoladi s 49,69% k.d. sa saharozom (4,74 mg GAE g<sup>-1</sup>). Rezultati su u skladu s rezultatima sličnih istraživanja prema kojima čokolade s većim udjelom kakaovih dijelova imaju veći udio polifenola (Belščak-Cvitanović i sur., 2015; Nazir i Azad, 2017). Miller i suradnici (2006) određivali su udio ukupnih polifenola u različitim vrstama čokolada na tržištu SAD-a. Vrijednosti ukupnih polifenola kod čokolada s 50, 55 i 70% kakaovih dijelova iznosili su redom 12,30 mg GAE g<sup>-1</sup>, 11,73 mg GAE g<sup>-1</sup> i 14,88 mg GAE g<sup>-1</sup>, što je malo više od onih dobivenih ovim istraživanjem. Ibrić i Čavar (2014) mjerili su udio ukupnih polifenola u kakaovoj masi i različitim vrstama čokolada gdje su se udjeli kupnih polifenola kretali od 0,046 do 0,376 mg GAE g<sup>-1</sup> što su dosta niže vrijednosti u odnosu na ovo, kao i istraživanje Miller i suradnika (2006). Udio ukupnih polifenola u čokoladi sa 43% k.d. prema istraživanju Ibrić i Čavar (2014) iznosio je 0,135 mg GAE g<sup>-1</sup>, u čokoladi sa 55% k.d. 0,147 mg GAE g<sup>-1</sup>, u čokoladi sa 100% k.d. 0,376 mg GAE g<sup>-1</sup>. Nešto niže vrijednosti ukupnih polifenola mogu se objasniti interferencijom šećera s Folin-Ciocalteuovim reagensom i upotrebom različitog otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva jer prema literaturnim podacima vrsta otapala također utječe na sposobnost ekstrakcije, a potom i na udio polifenola (Waterhouse i sur., 1996; Vinson i sur., 2001). Waterhouse i suradnici (1996) određivali su udio polifenola u metanolnom ekstraktu kakaovog praha, čokoladi s povećanim udjelom kakaovih dijelova i mliječnoj čokoladi i dobili su redom vrijednosti od 20 mg GAE g<sup>-1</sup>, 8,4 mg GAE g<sup>-1</sup> i 5 mg GAE g<sup>-1</sup>, dakle vrijednosti ukupnih polifenola povećavale su se s povećanjem udjela kakaovih dijelova. Čokolada s 59,69% k.d. s rižinim sladom ima najveći udio flavonoida i neflavonoida, dok najmanji vrijednosti istih parametara ima čokolada s 49,69% kakaovih dijelova sa saharozom. Udio flavonoida veći je kod čokolada s 59,69% k.d. u odnosu na čokolade s 49,69% k.d. što je u skladu s rezultatima Pimentel i suradnika (2010) koji su uspoređivali vrijednosti ukupnih flavonoida u čokoladama s različitim udjelom kakaovih dijelova. Prema njihovim rezultatima čokolada sa 70% k.d. imala je također veću vrijednost ukupnih flavonoida i fenola od čokolade s 40% k.d.



Slika 35. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida u čokoladama ovisno o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova

#### 4.4.2. Udio ukupnih flavan-3-ola

Udjeli ukupnih flavan-3-ola određeni su dvjema metodama, vanilin i *p*-DAC, od kojih je metoda s *p*-DAC-om specifičnija zbog čega su primjenom te metode dobivene manje vrijednosti flavan-3-ola što se može vidjeti na slici 36. Razlika u specifičnosti odnosi se na princip reakcija pa tako vanilin reagira sa C-6 i C-8 položajima u molekulama flavan-3-ola, a *p*-DAC samo sa C-6 položajima flavan-3-ola. Prema rezultatima metode s *p*-DAC reagensom može se zaključiti da udio flavan-3-ola raste s povećanjem udjela kakaovih dijelova i da su s obzirom na standardni uzorak, čokoladu sa saharozom, vrijednosti flavan-3-ola veće kod svih vrsta čokolada. Prema obje metode najveću vrijednost udjela flavan-3-ola karakterizira čokoladu s 59,69% k.d. s rižinim sladom, a najmanji udio čokoladu s 49,69% k.d. sa saharozom. U ovome je istraživanju korelacija udjela flavonoida, neflavonoida, ukupnih polifenola s udjelima flavan-3-ola dobivenim metodom s vanilinom izrazito visoka kao i međusobna korelacija *p*-DAC i vanilin metode (tablica 5). U istraživanju Šeremet i suradnika (2019) u čokoladi s povećanim udjelom kakaovih dijelova (> 50% k.d.) udio flavan-3-ola iznosio je 3,71 mg katehina po gramu uzorka i smanjivao se proporcionalno udjelu kakaovih dijelova te dodatkom mlijeka i sušenog voća čokoladi. U ovome istraživanju uočeno je da dodatak sladila, različitog od saharoze, utječe na povećanje udjela flavan-3-ola u čokoladi.

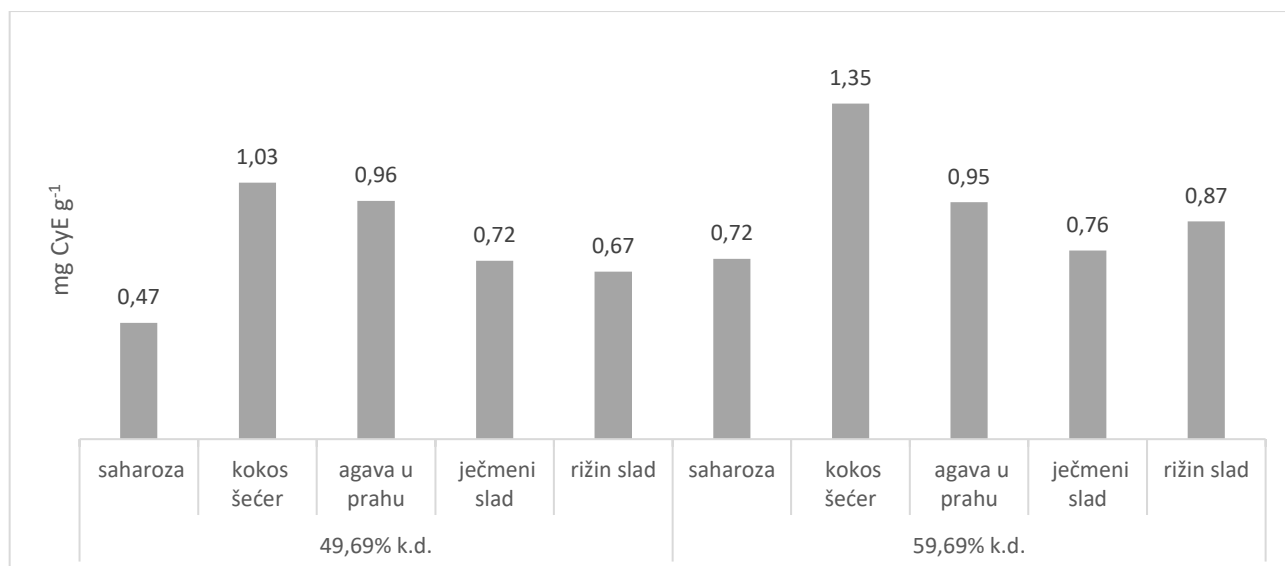


Slika 36. Udio ukupnih flavan-3-ola u čokoladama u ovisnosti o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova određen vanilin i *p*-DAC metodom

#### 4.4.3. Udio ukupnih proantocijanidina

Proantocijanidini su oligomeri i polimeri flavan-3-ola pa se očekivalo da trend raspodjele njihovog udjela u čokoladi prati udio flavan-3-ola, međutim korelacija je relativno slaba i bolja je kod metode s *p*-DAC-om u odnosu na vanilin ( $r=0,62$ ). Udjeli proantocijanidina u ovisnosti o tipu sladila i udjelu kakaovih dijelova prikazani su na slici 37. Iz rezultata je vidljivo da udjeli proantocijanidina rastu s povećanjem udjela kakaovih dijelova, kao i uz dodatak zamjenskih sladila te je veći udio kod čokolada s 59,69% k.d. u odnosu na čokolade s 49,69% k.d. Najveći udio proantocijanidina ( $1,35 \text{ mg CyE g}^{-1}$ ) imala je čokolada s 59,69% k.d. s kokosovim šećerom, a najmanji udio ( $0,47 \text{ mg CyE g}^{-1}$ ) imala je čokolada s 49,69% k.d. sa saharozom. S obzirom na rezultate Miller i suradnika (2006), udio proantocijanidina dobiven ovim istraživanjem nešto je niži za čokolade s istim udjelom kakaovih dijelova sa saharozom. Isto je uočeno u radu Todorović i suradnika (2015) gdje su vrijednosti udjela proantocijanidina bile veće u odnosu na ovo istraživanje. Čokolada sa saharozom imala je najmanju vrijednost proantocijanidina u usporedbi s čokoladama s dodatkom drugih šećera. Manji udio proantocijanidina određen je i u čokoladi s ječmenim sladom za koju su fizikalno-kemijske analize pokazale da sadrži dosta proteina pa bi razlog manjoj vrijednosti proantocijanidina mogla biti tvorba kompleksa proantocijanidina s proteinima (Davis i Hosney, 1979).

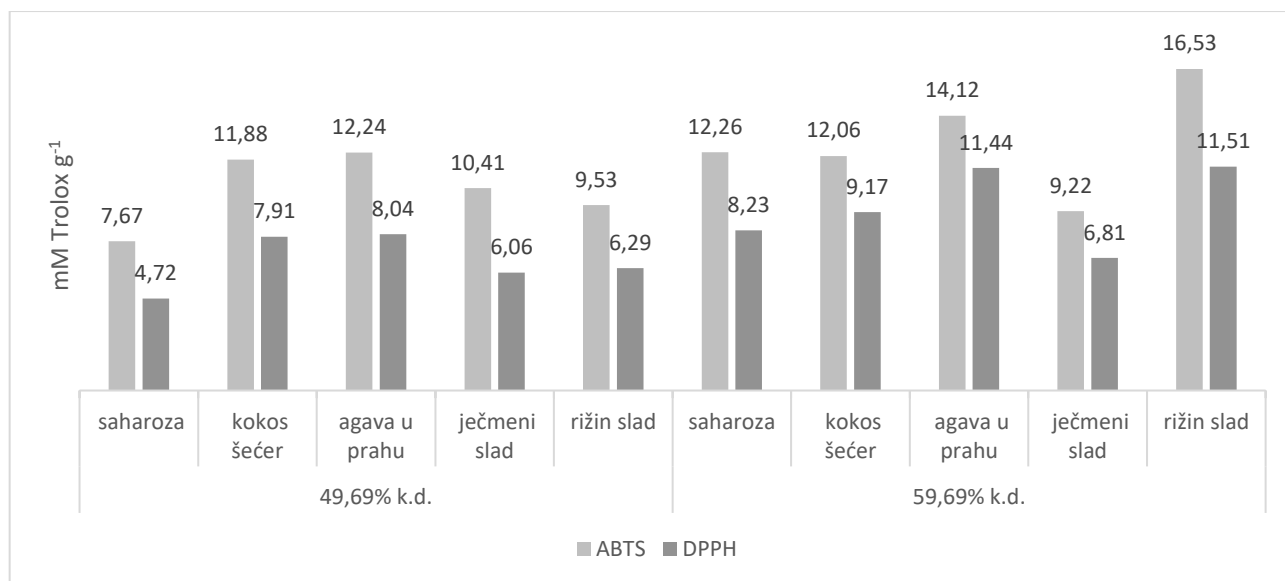




Slika 37. Udio ukupnih proantocijanidina u čokoladama ovisno o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova

#### 4.4.4. Antioksidacijski kapacitet

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u hrani i piću ne postoji standardizirana metoda pa se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koristi nekoliko metoda. Najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta *in vitro* su ABTS, DPPH, ORAC i TRAP (Todorovic i sur., 2015.). U ovom istraživanju korištene su dvije metode, ABTS i DPPH, koje se temelje na mjerenju mogućnosti hvatanja slobodnih radikala od strane uzorka, a rezultati su prikazani na slici 38. Čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova imaju veći antioksidacijski kapacitet. Prema rezultatima obje metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta čokolada, čokolada s 59,69% k.d. s rižinim sladom ima najveći antioksidacijski kapacitet, a najniži čokolada s 49,69% k.d. sa saharozom. Isto tako, antioksidacijski kapacitet čokolada sa zamjenskim sladilima viši je u odnosu na standard, čokoladu sa saharozom. Utvrđena je dobra korelacija antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS i DPPH metodama s udjelom ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida (tablica 5.). Isto tako, čokolada s rižinim sladom imala je najveću vrijednost bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i ovdje se pokazalo da ima najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta pa su rezultati u skladu s literaturnima. Uočeno je da antioksidacijski kapacitet raste u ovisnosti o udjelu kakaovih dijelova i da bezmasna suha tvar kakaovih dijelova može poslužiti kao dobar marker za antioksidacijski potencijal i udio polifenola.



Slika 38. Antioksidacijski kapacitet u ovisnosti o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova određen ABTS i DPPH metodom

#### 4.4.5. Korelacijski koeficijenti

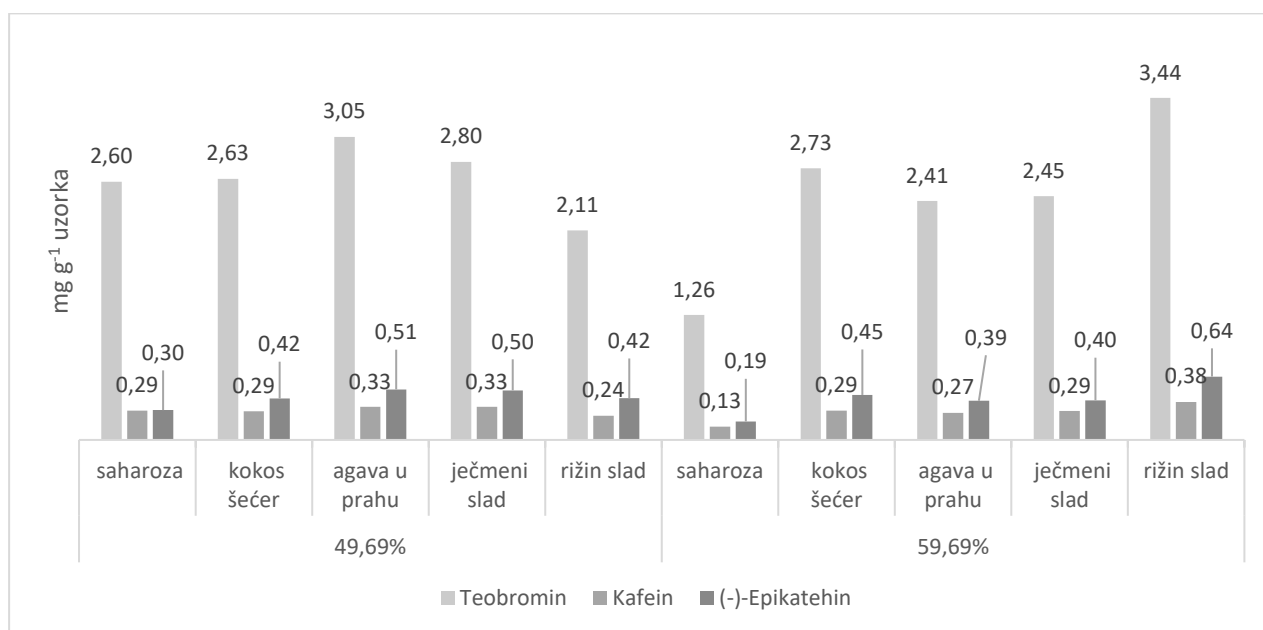
U tablici 5. prikazani su korelacijski koeficijenti metoda određivanja ukupnog sadržaja polifenolnih spojeva i antioksidacijskih metoda. Prikazane korelacije su korelacije metoda ukupnog udjela polifenola (TPC), neflavonoida (TNC), flavonoida (TFC), flavan-3-ola (metodom s p-DAC i vanilinom) i metoda antioksidacijskog kapaciteta pomoću ABTS i DPPH reagensa.

Tablica 5. Prikaz korelacijskih koeficijenata između rezultata spektrofotometrijskih mjerenja

49 % k.d.		TPC	TNC	TFC	ABTS	DPPH	p-DAC	vanilin
	TPC	1	0,98	0,80	0,95	0,90	0,82	0,99
	TNC	0,98	1	0,66	0,93	0,93	0,78	0,96
	TFC	0,80	0,66	1	0,75	0,59	0,72	0,81
	ABTS	0,95	0,93	0,75	1	0,97	0,88	0,94
	DPPH	0,90	0,93	0,59	0,97	1	0,76	0,86
	p-DAC	0,82	0,78	0,72	0,88	0,76	1	0,89
	vanilin	0,99	0,96	0,81	0,94	0,86	0,89	1
59 % k.d.		TPC	TNC	TFC	ABTS	DPPH	p-DAC	vanilin
	TPC	1	0,97	0,85	0,98	0,91	0,62	0,99
	TNC	0,97	1	0,87	0,93	0,92	0,77	0,98
	TFC	0,85	0,87	1	0,79	0,78	0,79	0,83
	ABTS	0,98	0,93	0,79	1	0,93	0,50	0,97
	DPPH	0,91	0,92	0,78	0,93	1	0,59	0,88
	p-DAC	0,62	0,77	0,79	0,50	0,59	1	0,65
	vanilin	0,99	0,98	0,83	0,97	0,88	0,65	1

#### 4.4.6. Udio teobromina, kafeina i (-)-epikatehina određen HPLC-DAD metodom

HPLC analizom uzoraka čokolada kvantificirana je prisutnost dva alkaloida, kafeina i teobromina te flavan-3-ola (-)-epikatehina. Najveći udio teobromina određen je u čokoladi s 59,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom i iznosio je 3,44 mg g<sup>-1</sup> uzorka. Udjeli teobromina i kafeina bili su veći u čokoladama s 59,69% kakaovih dijelova u usporedbi s čokoladama s 49,69% kakaovih dijelova te su iznimno dobro korelirali s udjelom bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova te ukupnim polifenolima, flavonoidima, neflavonoidima te flavan-3-olima. Udio teobromina izmjeren u standardnom uzorku sa saharozom u studiji Belščak-Cvitanović i suradnika (2009) iznosio je 4,41 mg g<sup>-1</sup>, a udio kafeina 0,48 mg g<sup>-1</sup> uzorka što je više odnosu na čokolade sa zamjenskim sladilima.



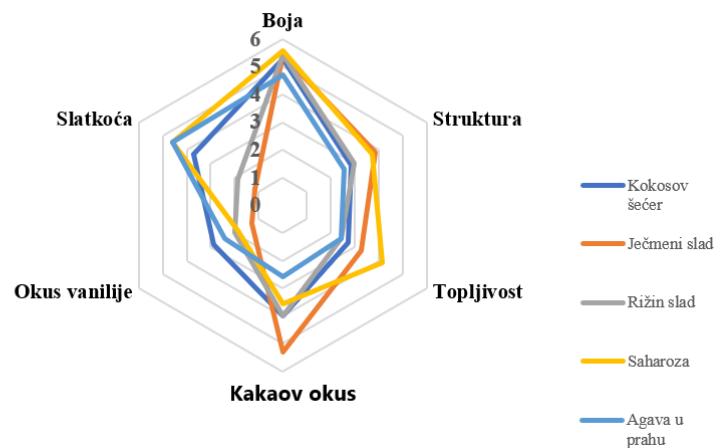
Slika 39. Udio teobromina, kafeina i (-)-epikatehina u čokoladama u ovisnosti o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova

U ovom istraživanju udio kafeina bio je značajno niži i kretao se u rasponu od 0,13 mg g<sup>-1</sup> uzorka za čokoladu s 59,69% kakaovih dijelova sa saharozom do 0,38 mg g<sup>-1</sup> uzorka za čokoladu s 59,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom. Dobivene vrijednosti teobromina i kafeina u čokoladama bile su i do 50% niže u odnosu na one dobivene studijom Zoumas i suradnika (1980) koji su ispitivali sadržaj teobromina i kafeina u kakovom prahu i mliječnoj čokoladi, međutim metode pripreme uzoraka su bile različite. Udio teobromina u čokoladi s povećanim udjelom kakaovih dijelova određen u istraživanju Meng i suradnika (2008) bio je veći i iznosio je 8,83 mg g<sup>-1</sup> uzorka. Od flavan-3-ola kvantificiran je bio (-)-epikatehin s najvećim udjelom u čokoladi s 59,69% k.d. s rižinim sladom (0,64 mg g<sup>-1</sup> uzorka), a najmanji u čokoladi s 59,69% k.d. sa saharozom (0,19 mg g<sup>-1</sup> uzorka) pa je dobro

korelirao s udjelima alkaloida, ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola. Udio epikatehina bio je manji od onog određenog u istraživanju Meng i suradnika (2009) te Gu i suradnika (2006) čiji su udjeli iznosili 2,74 mg g<sup>-1</sup> uzorka čokolade, također u tim studijama identificiran je i katehin s udjelom od 1,84 mg g<sup>-1</sup> uzorka što nije određeno ovim istraživanjem, a mogući razlog višem udjelu flavan-3-ola je razlika u pripremi uzoraka za analizu. Udio epikatehina u standardnom uzorku čokolade s 50% k.d. u studiji Belščak-Cvitanović iznosio je 0,62 mg po gramu uzorka i također se smanjivao u čokoladama sa zamjenskim sladilima.

#### 4.5. SENZORSKA ANALIZA

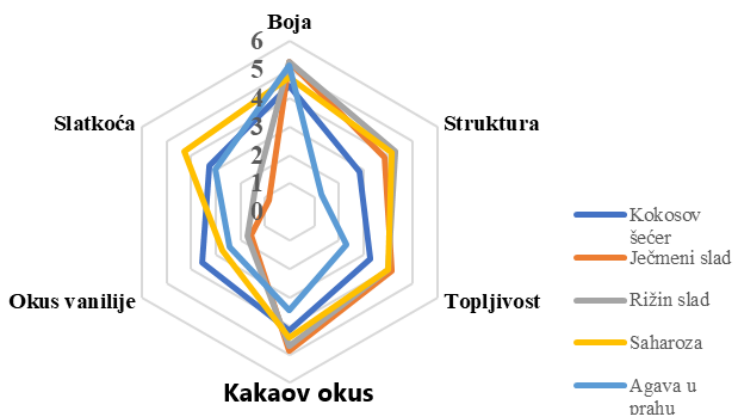
Upotrebom zamjenskih sladila u proizvodima očekuje se da isti ne utječu znatnije na promjenu senzorskih svojstava u bilo kojoj senzorskoj karakteristici, u odnosu na proizvode sa saharozom. Senzorska analiza obuhvaćala je evaluaciju 6 senzorskih svojstava prema metodi kvantitativne deskriptivne analize (QDA) i t-testu. Odredilo se da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u slatkoći i kakaovom okusu između čokolada s 49,69% kakaovih dijelova (t-test  $> 2,18$ ). Izrazito manji intenzitet slatkoće određen je u čokoladama s ječmenim i rižinim slodom (slika 40.) što je za očekivati budući da navedene čokolade sadrže šećere manje relativne slatkoće. Najveći intenzitet slatkoće karakterizira čokolade sa saharozom. Slabiji intenzitet kakaovog okusa određen je u čokoladi s agavom u prahu, a jači intenzitet u čokoladi s ječmenim slodom, u odnosu na ostale čokolade.



Slika 40. Rezultati senzorske analize čokolade s 49,69% kakaovih dijelova u ovisnosti o vrsti šećera

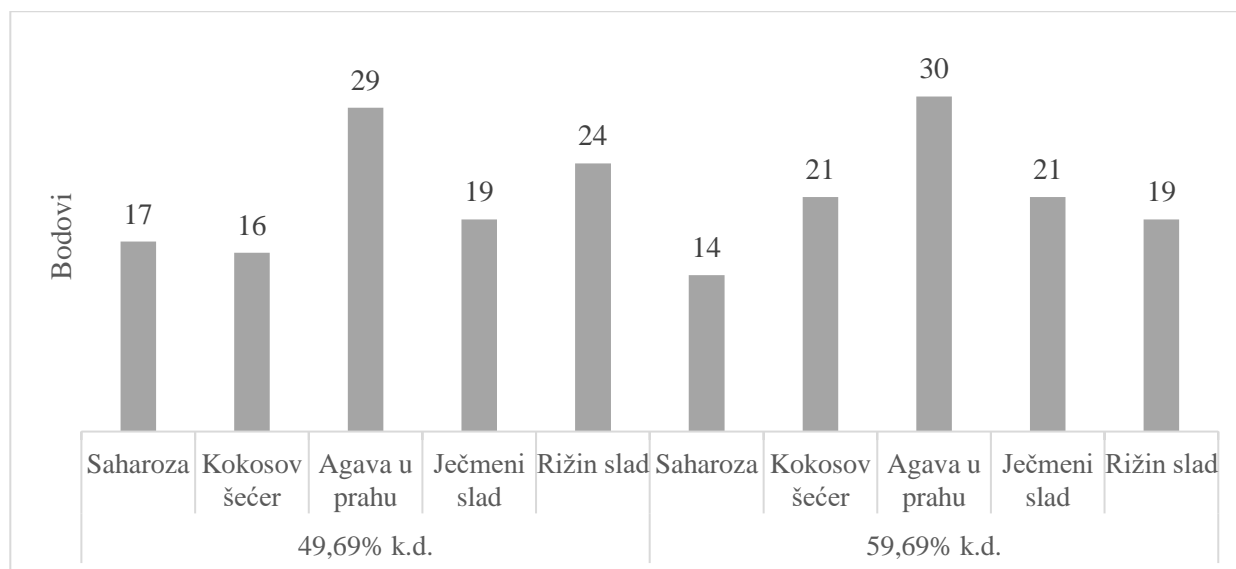
Prema metodi kvantitativne deskriptivne analize (QDA) i rezultatima t-testa, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u slatkoći, topljivosti i strukturi između čokolada s 59,69% kakaovih dijelova (t-test  $> 2,18$ ). Izrazito slabiji intenzitet slatkoće određen je u čokoladama s ječmenim i rižinim slodom (slika 41.), u odnosu na ostale čokolade, dok izrazito veći intenzitet slatkoće karakterizira čokolade sa saharozom. Čokolada s agavom u prahu ima slabiju topljivost i manje finu (grublju)

strukturu u odnosu na ostale uzroke, a i svi drugi promatrani parametri (kakaov okus, okus vanilije i slatkoća) najslabije su ocijenjeni u čokoladi s agavinim šećerom.



Slika 41. Rezultati senzorske analize čokolade s 59,69% kakaovih dijelova u ovisnosti o vrsti šećera

Rezultati su u skladu s onima dobivenim pri senzorskoj analizi čokolade s agavinim šećerom u studiji Vahedi i suradnika (2016) koji su utvrdili veću čvrstoću i lošiju teksturu u odnosu na čokoladu sa saharozom. Čokolade dobre topljivosti su čokolada s ječmenim sladom i čokolada sa saharozom. Rezultati preferencije prema ukupnom dojmu pokazali su da je među čokoladama s 49,69% kakaovih dijelova najbolja ona s kokosovim šećerom, a među čokoladama s 59,69% kakaovih dijelova čokolada sa saharozom (rang 1). U obje grupe, čokolade s agavom u prahu najlošije su rangirane (rang 5). Rezultati testa preferencije prikazani su na slici 42.



Slika 42. Rezultati testa preferencije čokolada u ovisnosti o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova prema bodovnoj ljestvici (1 - najbolja - 5 najlošija)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Prema rezultatima ankete najveći broj ispitanika čokoladu konzumira 3-4 puta tjedno, najčešće se konzumira mliječna i to nakon ručka. Najbitniji parametar prilikom kupnje čokolade je okus, a konzumacija je neovisna o raspoloženju.
2. Čokolade s 59,69% kakaovih dijelova sadrže veći udio proteina, masti i bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova te manji udio ukupnih šećera u odnosu na čokolade s 49,69% kakaovih dijelova.
3. Najveći udio fruktoze sadrži čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s agavinim šećerom, najveći udio maltopentoze sadrži čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom i najveći udio viših šećera sadrži čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom.
4. Najveći udio proteina sadrži čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s ječmenim sladom, najveći udio masti čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s agavinim šećerom i najveći udio bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova sadrži čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom.
5. Najveći udio flavonoida i neflavonoida, flavan-3-ola i najveću vrijednost antioksidacijskog potencijala sadrži čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom, a najmanji udio istih karakterizira čokoladu s 49,69% kakaovih dijelova sa saharozom.
6. Najveći udio teobromina, kafeina i (-)- epikatehina ima čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom, a najniži čokolada s 49,69% kakaovih dijelova sa saharozom.
7. Čokoladu s rižinim sladom s 59,69% kakaovih dijelova karakterizira najmanji intenzitet slatkoće, dok je najslađa čokolada s 49,69% kakaovih dijelova sa saharozom.
8. Najjači intenzitet kakaovog okusa ima čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s ječmenim sladom, a najslabiji čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s agavom u prahu.
9. Čokolada s 59,69% kakaovih dijelova s agavom u prahu najslabije je topljiva i grublje strukture, dok najbolju topljivost i najpoželjniju strukturu ima čokolada s 49,69% kakaovih dijelova sa saharozom.
10. Testom preferencije uz čokoladu s 59,69% kakaovih dijelova sa saharozom, najpoželjnija je čokolada s 49,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom.

## 6. LITERATURA

- Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., Schmitz, H. H. (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 4184-4188.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M. (2007) Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate—a review. *Food Sci. Technol.* **18**, 290-298.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008) Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 840–857
- Afoakwa, E. O. (2010) Chocolate production and consumption patterns. Chocolate science and technology. Wiley & Blackwell, West Sussex, str. 1-11.
- Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O., Dewettinck, K. (2015) Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. *Food Sci. Technol.* **62**, 592-597.
- Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., Al-Dujaili, E. (2010) The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *Brit. J. Nutr.* **103**, 842-850.
- Álvarez, C., Pérez, E., Cros, E., Lares, M., Assemat, S., Boulanger, R., Davrieux, F. (2012). The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (–)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo cocoa. *J. Near. Infrared Spec.* **20**, 307-315.
- AOAC 930.15 (1990a) Određivanje proteina u hrani za životinje (osnovna referentna metoda)
- Anonymous (2020) Agave tequilana, <<https://www.anniesannuals.com/plants/view/?id=4208>>. Pristupljeno 31. siječnja 2020.
- Apriyantono, A., Aristyani, A., Lidya, Y., Budiyanto, S., Soekarto, S. T. (2002) Rate of browning reaction during preparation of coconut and palm sugar. *Int. Congr.* **1245**, 275-278.
- Arentz, H. M. (2018). Lowering sugars in dark chocolate through alternative sweeteners. Magistarski rad. Manhattan: The Pennsylvania State University.
- Arts, I. C., van de Putte, B., Hollman, P. C. (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 1746-1751.

- Asghar, M. T., Yusof, Y. A., Mokhtar, M. N., Ya'acob, M. E., Mohd. Ghazali, H., Chang, L. S., Manaf, Y. N. (2019) Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *Food Sci. Nutr* **2**, 267-275.
- Avena, N. M., Rada, P., Hoebel, B. G. (2008) Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. R.* **32**, 20-39.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Muto, Y., Hiyoshi, T., Terao, J. (2005) Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur. J. Nutr.* **44**, 1-9.
- Barberan, F. A., Lacueva, C. A. (2012) Polyphenols and health: current state and progress. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 8773-8775.
- Bate-Smith, E. C. (1973) Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* **12**, 907-912.
- Beckett, S. T. (2000) Chocolate ingredients. In *The Science of Chocolate*. *R. Soc. Chem.* **1**, 8-30.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) Coffee, tea, cocoa. *Food Chem.* **2**, 938-970.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Rajka, B. (2009). Milk Powder as an Ingredient for the Production of Milk Chocolate. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. N.* **4**, 109-115.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Dujmović, M., Karlović, S., Biškić, M., Brnčić, M., Ježek, D. (2015) Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chem.* **167**, 61-70
- Berg, K., Goemann, S., Lindtner, O., Heinemeyer, G. (2012) Consumption of Dark Chocolate in Germany Results of an ad hoc survey in the population. *Ernahrungs Umschau* **59**, 626-631.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bogdanov, S. (2011) *Book of honey*. Springer, New York.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28**, 25-30.
- Calvino, A., Garrido, D., García, M. (2000) Potency of sweetness of aspartame, d-tryptophan and thaumatin evaluated by single value and time-intensity measurements. *J. Sens. Stud.* **15**, 47-64
- Carvalho, D. O., Curto, A. F., Guido, L. F. (2015). Determination of phenolic content in different



barley varieties and corresponding malts by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Antioxidants* **4**, 563-576.

Cavalier itd (2020) Cavalier, <<https://www.waitrose.com/ecom/products/cavalier-ft-dark-85-cocoa-w-stevia/663287-437718-437719>>; Food navigator <<https://www.foodnavigator.com/article/2012/10/19/Nestle-UK-dark-chocolate-production-at-York-site>>; Stella Bernrain, <<https://www.swisschocolate.ch/en/welcome-to-the-e-shop/products/chocolates/agave/dark-chocolate-with-agave-nectar.html>>; Kraš Hrvatska, <<https://www.kras.hr/hr/proizvodi/cokolade/dorina/dorina-tamna-bez-dodanih-secera>>.

Pristupljeno 04. siječnja 2020

Chao, A., Grilo, C. M., White, M. A., Sinha, R. (2014). Food cravings, food intake, and weight status in a community-based sample. *Eat. behav.* **15**, 478-482.

Chawla, D., Sondhi, N. (2016). Attitude and consumption patterns of the Indian chocolate consumer: An exploratory study. *Glo. Bus. Rev.* **17**, 1412-1426.

Chuin, T. P., Mohamad, O. (2012) Young Malaysians' chocolate brand familiarity: the effect of brand's country of origin and consumer consumption level. *J. Bus. Strategy.* **1**, 9-11.

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.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1321-1342.

Davis, A. B., Hosney, R. C. (1979). Grain sorghum condensed tannins. I. Isolation, estimation, and selective adsorption by starch. *Cereal Chem.* **56**, 310-314.

Davison, K., Coates, A. M., Buckley, J. D., Howe, P. R. C. (2008) Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Int. J. Obes.* **32**, 1289-1296.

Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., Girotra, S. (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr. Metab.* **3**, 51-55.

Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća od 23. lipnja 2000. o kakau i čokoladnim proizvodima namijenjenim prehrani ljudi (2000), *Eur-Lex* **36**, Bruxelles.

Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini.

*L'enotecnico* **25**, 83-89.

Doherty, B., Tranchell, S. (2005) New thinking in international trade? A case study of The Day Chocolate Company. *Sustain. Dev.* **13**, 166-176.

Dos Reis, M. B. G., Manjolin, L. C., Carmo Maquiaveli, C., Santos-Filho, O. A., Silva, E. R. (2013) Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and rat arginases by green tea EGCG,(+)-catechin and (-)-epicatechin: a comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. *Plos. One* **8**. 7-11.

Doyon, M., Labrecque, J. (2008) Functional foods: a conceptual definition. *Brit. Food J.* **10**, 1133-1149.

Dillinger, T. L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Lowe, D. S., Grivetti, L. E. (2000) Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J. Nutr.* **130**, 2057-2072.

Edney, M. J., O'Donovan, J. T., Turkington, T. K., Clayton, G. W., McKenzie, R., Juskiw, P., Johnson, E. (2012) Effects of seeding rate, nitrogen rate and cultivar on barley malt quality. *J. Sci. Food Agri.* **92**, 2672-2678.

EFSA (2011) Sweeteners. EFSA - European Food and Safety Authority <<http://www.efsa.europa.eu/en/search/site/authorised%20sweeteners?page=2>>. Pristupljeno 04. siječnja 2020.

EN ISO 8589/2010, Senzorske analize - Opće uputstvo za projektiranje prostorija za ispitivanje (osnovna referentna metoda)

Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A. (2014) Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules* **19**, 2497-2522.

Farzanmehr, H., Abbasi, S. (2009) Effects of inulin and bulking agents on some physicochemical, textural and sensory properties of milk chocolate. *J. Texture Stud.* **40**, 536-553.

Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J. M., Periasamy, R., Park, S., Tappy, L. (2005) Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* **54**, 1907-1913.

Ferrigno, F., Murino, T., Romano, E., Akkerman, R. (2013) Salmonella contamination in chocolate products: Simulation model and scenario analysis. In Proceedings of the 12th International Conference on System Science and Simulation In Engineering (ICOSSE13), str. 61-67.

Fina (2015) Poslovanje poduzetnika u konditorskoj industriji za 2015. godinu, FINA - Financijska agencija <[https://www.fina.hr/pretraga?p\\_p\\_id=net\\_croz\\_liferay7\\_sitesearch\\_web\\_portlet\\_search\\_result\\_SearchResultPortlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view](https://www.fina.hr/pretraga?p_p_id=net_croz_liferay7_sitesearch_web_portlet_search_result_SearchResultPortlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view)>.

Pristupljeno 10. veljače 2020.

Florez-Mendez, J., Flórez, J. Y., Pérez, E., Lares, M. (2019) Effect of the consumption of chocolate enriched with tryptophan and resveratrol on biochemical markers and oxidative stress in a healthy population. *Vitae* **26**, 8-16.

Fowler, S. P., Williams, K., Resendez, R. G., Hunt, K. J., Hazuda, H. P., Stern, M. P. (2008) Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity* **16**, 1894-1900.

Friganović, E., Čalić S., Maleš V., Mustapić A. (2011) "Funkcionalna hrana i potrošači." *Practical Manag. J.* **2**, 51-57.

Garcia-Closas, R., Gonzalez, C. A., Agudo, A., Riboli, E. (1999) Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Cause Control* **10**, 71-75.

Gardana, C., Scaglianti, M., Simonetti, P. (2010) Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogra. A.* **1217**, 1463-1470.

Goldoni L. (2004) Tehnologija Konditorskih Proizvoda - Kakao i čokolada, Kugler, Zagreb.

Golob, T., Micovic, E., Bertoncej, J., Jamnik, M. (2004) Sensory acceptability of chocolate with inulin. *Acta. Agr. Slo.* **83**, 221-231.

Gonçalves, E. V., Lannes, S. C. D. S. (2010) Chocolate rheology. *Food Sci. Technol.* **30**, 845-851.

Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4057-4061.

Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J. F. (1998) Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien) *J. Agr. Food Chem.* **46**, 1698-1705.

Grembecka, M. (2015) Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 1-14.

Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., Schmitz, H. H. (1999) Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance

- liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 490-496.
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 950-988.
- Hardy, G. (2000) Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition* **16**, 688–697.
- Haritha, K., Kalyani, L., Rao, A. L. (2014) Health benefits of dark chocolate. *J. Adv. Deliv.* **1**, 184-194.
- Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P. A., Cohn, J. S., Rimm, E. B., Cassidy, A. (2012) Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 740-751.
- Hooshmand, S., Holloway, B., Nemoseck, T., Cole, S., Petrisko, Y., Hong, M. Y., Kern, M. (2014) Effects of agave nectar versus sucrose on weight gain, adiposity, blood glucose, insulin, and lipid responses in mice. *J. Med. Food* **17**, 1017-1021.
- Huang, Y., Carragher, J., Cozzolino, D. (2016) Measurement of fructose, glucose, maltose and sucrose in barley malt using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. *Food Anal. Method* **9**, 1079-1085.
- Ibrić, A., Čavar, S. (2014). Phenolic compounds and antioxidant activity of cocoa and chocolate products. *Glas. hem. tehnol. Bosne Herceg.* **42**, 37-40.
- Irwin, W. E., Sträter, P. J. (1991) Isomaltulose. Alternative sweeteners, (L. O. Nabors, R. C. Gelardi, R. C., ured.), Marcel Dekker Inc, New York, str. 299-307.
- Jackson, B. P., Taylor, V. F., Karagas, M. R., Punshon, T., Cottingham, K. L. (2012) Arsenic, organic foods, and brown rice syrup. *Environ. Health Perspect.* **120**, 623-626.
- Jackson, S. E., Smith, L., Firth, J., Grabovac, I., Soysal, P., Koyanagi, A., Zhu, X. (2019) Is there a relationship between chocolate consumption and symptoms of depression? A cross-sectional survey of 13,626 US adults. *J. Depress. Anxiety* **36**, 987-995.
- Jamieson, P. (2008) The sugarfree toolbox—bulk ingredients and intense sweeteners. *Manuf. Confect.* **88**, 33-46.
- Jinap, S., Jamilah, B., Nazamid, S. (2004) Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chem.* **85**, 73-80.
- Kalt, W., Ryan, D. A., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K., Vander Kloet, S. P. (2001)

Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.) *J. Agr. Food. Chem.* **49**, 4761-4767.

Kalyani Nair, K., Kharb, S., Thompkinson, D. K. (2010) Inulin dietary fiber with functional and health attributes - a review. *Food Rev. Int.* **26**, 189-203.

Kim, H., Keeney, P. G. (1984) (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food. Sci.* **49**, 1090-1092.

Kit Kat (2020) Amazon, <<https://www.amazon.co.uk/Kit-Kat-12-Fruity-Chocolate-Limited/dp/B07DHRRCMK>>. Pristupljeno 09. siječnja 2020.

Kiumarsi, M., Rafe, A., Yeganehzad, S. (2017) Effect of different bulk sweeteners on the dynamic oscillatory and shear rheology of chocolate. *Appl. Rheol.* **27**, 11-19.

Kondo, K., R. Hirano, A. Matsumoto, O. Igarashr, H. Ltahura (1996) Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* **348**,1514.

Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. (2006) Health Enhancing Foods: Opportunities for Strengthening the Sector in Developing Countries. *Processing* **3**, 2-5.

Kroger, M., Meister, K., Kava, R. (2006) Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Compr. Rev. Food. Sci. F.* **5**, 35-47.

Kruger, C. (2009) *Industrial chocolate manufacture and use*, Wiley & Sons, New Jersey.

Lamuella-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C., Tornero, A. (2005) Health effects of cocoa flavonoids. *Food Sci. Technol. Int.* **11**, 159-176.

Lange, H., Fincke, A. (1970) Kakao und schokolade. Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz, Springer, Berlin, str. 210-309.

Latif, R. (2013) Chocolate/cocoa and human health: a review. *Neth. J. Med.* **71**, str. 63-8.

Latulippe, M. E., Skoog, S. M. (2011) Fructose malabsorption and intolerance: effects of fructose with and without simultaneous glucose ingestion. *Crc. Cr. Rev. Food. Sci.* **51**, 583-592.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012) Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* **132**, 1121-1132.

Lily's (2020) Lily's, <<https://naturamarket.ca/lilys-chocolate-stevia-sweetened-dark-chocolate-bar-original-85g.html>>. Pristupljeno 04. ožujka 2020.

Lindt (2020) Lindt, <<https://www.confectionerynews.com/Article/2019/10/03/Lindt-sees-niche-in-high-cocoa-milk-chocolate-range>>. Pristupljno 31. siječnja 2020.

Lipton, R. B., Newman, L. C., Cohen, J. S., Solomon, S. (1989) Aspartame as a dietary trigger of headache. *J. Headache Pain* **29**, 90-92.

Livesey, G. (2003) Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutr. Res. Rev.* **16**, 163-191.

Lotito, S. B., Actis-Goretta, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., Fraga, C. G. (2000) Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **276**, 945-951.

Macht, M., Dettmer, D. (2006) Everyday mood and emotions after eating a chocolate bar or an apple. *Appetite* **46**, 332-336.

McLoone, P., Warnock, M., Fyfe, L. (2016) Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *J. Microbiol.* **49**, 161-167.

Meiji (2020) Amazon <<https://www.amazon.com/Meiji-Five-Chocolate-Candy>>. Pristupljeno 04. ožujka 2020.

Meilgaard, M. C., Carr, B. T., Civille, G. V. (1999) Sensory evaluation techniques, CRC Press, Boca Raton.

Mellado-Mojica, E., López, M. G. (2015) Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food chem.* **167**, 349-357.

Meng, C. C., Jalil, A. M. M., Ismail, A. (2009) Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules* **14**, 200-209.

De Melo, L., Bolini, H. M. A., Efraim, P. (2009) Storage time study of sugar-free and reduced calorie milk chocolates. *J. Food. Qual.* **32**, 577-589.

Mendoza, M. R., Olano, A., Villamiel, M. (2005) Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2995-2999.

Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A., Hurst, W. J. (2006) Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 4062-4068.

Mitchell, H. (2008) Sweeteners and sugar alternatives in food technology, Wiley & Sons, New Jersey.

Mooradian, A. D., Smith, M., Tokuda, M. (2017) The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clin. Nutr. Esp.* **18**, 1-8.

Muchtar, H., Diza, Y. H. (2011) Pengaruh Penambahan Crude Stearin Minyak Kelapa Sawit Terhadap Kestabilan Dark Chocolate. *J. Lit. Ind.* **1**, 1-7.

Nabors, L. O., Gelardi, R. (2001) Alternative sweeteners: an overview. Marcel Dekker, New York, str. 1-12

Nazir, S., Azad, Z. R. A. A. (2017) Technological and quality parameters of reduced-calorie chocolates: a review. *Nutrafoods* **17**, 33-40.

O'Donnell, K., Kearsley, M. W. (2012) Other sweeteners. Trehalose. *J. Food. Technol.* 417-431.

Ofoedu, C. E., Osuji, C. M., Ojukwu, M. (2019) Sugar Profile of Syrups from Malted and Unmalted Rice of Different Varieties. *J. Food Res.* **8**, 35-39.

Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wines. Wiley & Sons, New Yersey.

Patwardhan, M., Flora, P., Gupta, A. (2010) Identification of secondary factors that influence consumer's buying behavior for soaps and chocolates. *J. Mark. Manag.* **9**, 55.

Payne, M. L., Craig, W. J., Williams, A. C. (1997) Sorbitol is a possible risk factor for diarrhea in young children. *J. Acad. Nutr. Diet.* **97**, 532.

Peterson, J., Lagiou, P., Samoli, E., Lagiou, A., Katsouyanni, K., La Vecchia, C., Trichopoulos, D. (2003) Flavonoid intake and breast cancer risk: a case–control study in Greece. *Br. J. Cancer* **89**, 1255-1259.

Phaichamnan, M., Posri, W., Meenune, M. (2010) Quality profile of palm sugar concentrate produced in Songkhla province, Thailand. *Int. Food Res. J.* **17**, 425-432.

Pimentel, F. A., Nitzke, J. A., Klipel, C. B., de Jong, E. V. (2010) Chocolate and red wine–A comparison between flavonoids content. *Food chem.* **120**, 109-112.

Pinterest (2020) Kalpa, <<https://www.pinterest.com/pin/802555596068132339/>>. HSN store, <<https://www.hsnstore.com/buy/hsn-foods/dark-choco-with-coconut-sugar-free-100g>>; Tajo online, <<https://www.tajonline.com/gifts>>; Equal exchange, <<https://shop.equalexchange.coop/collections/chocolate-bars/products/organic-chocolate-with>

coconut-milk-55-cacao>.Pristupljeno 04. siječnja 2020.

Prabhakaran Nair, K.P. (2010) The agronomy and economy of important tree crops of the developing world. Elsevier, New York.

Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) *Narodne novine* **73**, Zagreb.

Praznik, W., Cieslik, E., Huber, A. (2003) Fructans. Occurrence and Application in Food. Chemical and functional properties of food saccharides, Taylor & Francis, London, str. 6.

Purnomo, H. (1992) Sugar components of coconut sugar in Indonesia. *AF J.* **7**, 200-201.

Pyrzynska, K., Biesaga, M. (2009) Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **5**, 893-902.

Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. (2015) A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS) *Food chem.* **169**, 336-343.

Ramljak, D., Romanczyk, L. J., Metheny-Barlow, L. J., Thompson, N., Knezevic, V., Galperin, M., Dickson, R. B. (2005) Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* **4**, 537-546.

Rapaille, A., Gonze, M., Schueren, F. (1994) The ideal sweetener for sugar-free chocolate. Confectionery Production, Bell Publishing Ltd, Gravesend, str. 35-39.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.

Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G. (2000a) Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J. Nutr.* **130**, 2109-2114.

Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., Keen, C. L. (2000b) Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 30-35.

Rogers, P. J., Smit, H. J. (2000) Food craving and food “addiction”: a critical review of the evidence from a biopsychosocial perspective. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 3-14.

Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Mata-Bilbao, M. L., Izquierdo-Pulido, M., Waterhouse, A. L., Lamuela-Raventós, R. M. (2007) Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Ann. Nutr. Metab.* **51**, 493-498.



Russel Stover itd. (2020) Russel Stover, <<https://www.russellstover.com/sugar-free-milk-chocolate-almond-3-oz-bar-9554>>; Trapa, <<https://triaennaria.com/bg-product-details-1453.html>>; Lily's, <<https://naturamarket.ca/lilys-chocolate-stevia-sweetened-dark-chocolate-bar-original-85g.html>>; Valor, <<https://www.amazon.com/Valor-Sugar-Free-ChocolateCacao/dp/B003I7MONI>>. Pristupljeno 04. ožujka 2020.

Sahoo, D., Garg, S. (2012) Buying Motives in the purchase of Cadbury Chocolate among Young Indians. *Rom. J. Mark.* **4**, 4-7.

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.

Saputro, A. D., Van de Walle, D., Kadivar, S., Sintang, M. D. B., Van der Meeren, P., Dewettinck, K. (2017a) Investigating the rheological, microstructural and textural properties of chocolates sweetened with palm sap-based sugar by partial replacement. *Eur. Food Res. Technol.* **243**, 1729-1738.

Saputro, A. D., Van de Walle, D., Aidoo, R. P., Mensah, M. A., Delbaere, C., De Clercq, N., Dewettinck, K. (2017b) Quality attributes of dark chocolates formulated with palm sap-based sugar as nutritious and natural alternative sweetener. *Eur. Food Res. Technol.* **243**, 177-191.

Saputro, A. D., Van de Walle, D., Hinneh, M., Van Durme, J., Dewettinck, K. (2018) Aroma profile and appearance of dark chocolate formulated with palm sugar–sucrose blends. *Eur. Food Res. Technol.* **244**, 1281-1292.

Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Cardetti, M., Keen, C. L. (2003) Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agr. Food chem.* **51**, 1732-1735.

Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. (1996) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, 28-32.

Šeremet, D., Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Oskomić, M., Champion, E., Martinić, A., Komes, D. (2019) Ruby chocolate-bioactive potential and sensory quality characteristics compared with dark, milk and white chocolate. *J. Nutr. Diet.* **8**, 89-96.

Shah, A. B., Jones, G. P., Vasiljevic, T. (2010) Sucrose-free chocolate sweetened with Stevia rebaudiana extract and containing different bulking agents—effects on physicochemical and sensory properties. *Int. Food Sci. Tech.* **45**, 1426-1435.

Shourideh, M., Taslimi, A., Azizi, M. H., Mohammadifar, M. A. (2012) Effects of D-Tagatose and

inulin on some physicochemical, rheological and sensory properties of dark chocolate. *Int. J. Biosci. Biochem. B.* **2**, 314.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* **299**, 152-178.

Snickers (2020) Amazon, <<https://www.amazon.com/SNICKERS-Almond-Singles-Chocolate-1-76-Ounce/dp/B000Q5L3L4>>. Pristupljeno 31. siječnja 2020.

Soto, J. L. M., González, J. V., Nicanor, A. B., Ramírez, E. G. R. (2011) Enzymatic production of high fructose syrup from Agave tequilana fructans and its physicochemical characterization. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 19137-19143.

Spence, J. T. (2006) Challenges related to the composition of functional foods. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 4-6.

Srikaeo, K., Thongta, R. (2015) Effects of sugarcane, palm sugar, coconut sugar and sorbitol on starch digestibility and physicochemical properties of wheat based foods. *Int. Food. Res. J.* **22**, 112-115.

Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Havel, P. J. (2013) Adverse metabolic effects of dietary fructose: results from recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* **24**, 198.

Statista 1 (2020) World Cocoa Production by country in 2018/19. Statista <<https://www.statista.com/statistics/263855/cocoa-bean-production-worldwide-by-region/>>. Pristupljeno 10. veljače 2020.

Statista 2 (2017) *Per capita* chocolate consumption worldwide by country. Statista <<https://www.statista.com/statistics/819288/worldwide-chocolate-consumption-by-country/>>. Pristupljeno, 06. veljače 2020.

Statista 3 (2020) Market share of leading chocolate companies worldwide. Statista <<https://www.statista.com/statistics/629534/market-share-leading-chocolate-companies-worldwide/>>. Pristupljeno 06. veljače 2020.

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Kuperman, Y. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **514**, 181-186.

Szwajgier, D., Gustaw, W. (2015) The addition of malt to milk-based desserts: Influence on

- rheological properties and phenolic acid content. *Food Sci. Technol.* **62**, 400-407.
- Sylvetsky, A. C., Rother, K. I. (2016) Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol. Behav.* **164**, 446-450.
- Tappy, L., Lê, K. A., Tran, C., Paquot, N. (2010) Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* **26**, 1044-1049.
- Toblerone itd (2020) Choose quality, <<https://www.austinuts.com/toblerone-mini-swiss-milk-chocolate-with-honey-and-almond-nougat/>>; Nassau candy Nassaucandy, <<https://www.nassaucandy.com/ritter-bar-milk-cho-w-honey-sltd-almd-3-5oz.html>>; Amazon, <<https://www.amazon.in/Godiva-Chocolate-Roasted-AlmondsHoney/dp/B07NVQBJTY>>; Lenie Ciglen Distribution Inc., <<https://lenniesorganics.ca/products/spice-dark-chocolate-manuka-honey-truffle-bar-organic>>Pristupljeno 14. siječnja 2020.
- Todorovic, V., Redovnikovic, I. R., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., Sobajic, S. (2015) Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *J. Food Compos. Anal.* **41**, 137-143.
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S., Encabo, R. R. (2010) The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *Brit. J. Nutr.* **103**, 569-574.
- Uredba EZ br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani (2006), *Eur-Lex* **1924**, Bruxelles.
- Vahedi, H., Mousazadeh, M. (2016) The Effect Of Using Stevia And Agave Nectar as a Substitute For Sucrose On Physical, Chemical, Rheological, And Sensory Properties Of Dark Chocolate. *J. Scholar Res. Libr.* **8**, 194-201.
- Velarde, C., Moore, A., Adjei Boakye, E., Parkhurst, T., Brewer, D. (2018) Consumption and emotions among college students toward chocolate product. *Food Agr.* **4**, 144-164.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agr. Food. Chem.* **49**, 5315-5321.
- Vranić, K. (2015) Svojstva trehaloze i njena primjena u prehrambenoj industriji. Diplomski rad. Mostar: Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru.
- Zoumas, B. L., Kreiser, W. R., Martin, R. (1980) Theobromine and caffeine content of chocolate products. *J. Food. Sci.* **45**, 314-316.
- Wang, J. F., Schramm, D. D., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Fraga, C. G., Schmitz, H. H., Keen, C.

- L. (2000). A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *The J. Nutr.* **130**, 2115-2119.
- Waterhouse, A. L., Shirley, J. R., Donovan, J. L. (1996) Antioxidants in chocolate. *The Lancet* **348**, 834.
- WHO (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: a report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO - World Health Organisation <<https://www.who.int/new/obesity-and-overweight>>. Pristupljeno 02. kolovoza 2019.
- WHO (2016) Obesity and Overweight. WHO - World Health Organization <<https://www.who.int/news/room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Pristupljeno 08. kolovoza 2019.
- Willems, J. L., Low, N. H. (2012) Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *J. Agr. Food. Chem.* **60**, 8745-8754.
- Wollgast, J., 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.
- Yang, Q. (2010) Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. *Yale J. Biol. Med.* **83**, 101.
- Yuker, H. E. (1997) Perceived attributes of chocolate. *Chocolate: Food of the Gods* (Szogyi, A, ured.), Greenwood Press, London, str. 35-43.

## 7. PRILOZI

### 7.1. ANKETA O KONZUMACIJI ČOKOLADE

#### 1. Sekcija demografski parametri

1. Spol:

- a) M
- b) Ž

2. Dob:

- a) <18
- b) 19-35
- c) 36-50
- d) 51-75
- e) >76

3. Razina obrazovanja

- a) Osnovno obrazovanje (Osnovna škola)
- b) Srednje obrazovanje (Srednja škola)
- c) Obrazovanje nakon srednje koje nije ni više ni visoko (usavršavanja, tečajevi)
- d) Više i visoko obrazovanje (Fakultetsko obrazovanje)

4. Prihodi po kućanstvu (u kn)

- a) < 5000
- b) 5 000 – 10 000
- c) 11 000 – 15 000
- d) > 15 000
- e) Ne želim odgovoriti

5. Mjesto stanovanja

- a) Središnja Hrvatska
- b) Sjeverozapadna Hrvatska
- c) Istočna Hrvatska
- d) Sjeverni Jadran i Lika
- e) Srednji i Južni Jadran
- f) Izvan Hrvatske

6. Koliko često konzumirate čokoladu?

- a) Svaki dan
- b) 3-4 puta tjedno
- c) 1 tjedno
- d) 3-4 puta mjesečno
- e) 1 mjesečno
- f) <1 mjesečno

7. Čokoladu najčešće konzumiram:

- a) Nakon doručka
- b) Između doručka i ručka
- c) Nakon ručka
- d) Nakon večere

8. Većinu konzumirane čokolade pojedete u formi?

- a) Table čokolade (npr. Dorina)
- b) Manja čokoladice s dodacima (npr. Snickers, Mars)
- c) Čokoladne torte ili kolača
- d) Pralina
- e) Drugo

9. Koju vrstu čokolade najčešće jedete?

- a) Mliječnu čokoladu
- b) Čokolada za kuhanje
- c) Čokoladu s lješnjacima
- d) Čokoladu s bademima, kikirikijem
- e) Čokoladu s keksom i grožđicama
- f) Čokoladu s rižom
- g) Čokoladu s punjenjem (karamel, nugat, voćna kremasta punjenja)
- h) Bijelu čokoladu
- i) Čokoladu s više od 50% kakaovih dijelova

10. Čitate li deklaraciju na čokoladi?

- a) Da
- b) Ne

11. Gledate li postotak kakaovih dijelova prilikom kupnje čokolade?

- a) Da
- b) Ne

12. Koliko Vam je bitno da čokolada koju jedete ima smanjen udio šećera?

Nebitno (1) – Jako bitno (5)

13. Od ponuđenih opcija koju biste izabrali?

- a) Čokoladu s normalnim udjelom šećera
- b) Čokoladu sa smanjenim udjelom šećera
- c) Čokoladu sa smanjenim udjelom šećera s dodatkom stevije
- d) Čokoladu s većim postotkom kakaovih dijelova i zaslađenu umjetnim zaslađivačem
- e) Čokoladu s većim postotkom kakaovih dijelova i zaslađenu stevijom

14. Gdje kupujete čokoladu?

- a) U prodavaonicama široke potrošnje (npr. Konzum, Spar, Lidl...)
- b) U specijaliziranim prodavaonicama
- c) U prodavaonicama zdrave hrane

15. Prilikom izbora čokolade od velike važnosti mi je:

- a) Proizvođač
- b) Cijena
- c) Udio kakaovih dijelova
- d) Udio šećera
- e) Dodatne oznake (*Fair Trade, Organic, Vegan, i sl.*)

### 3. Sekcija preferencije

16. Volite li čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova?

- a) Da
- b) Ne

16\*. Zašto ne volite čokoladu s povećanim udjelom kakaovih dijelova?

- a) Cijena je visa nego kod ostalih čokolada
- b) Gorkog je okusa
- c) Ne sviđa mi se topljivost takve čokolade u ustima
- d) Drugi razlozi

### 4. Sekcija osnovno znanje o čokoladi

17. Osnovne sirovine za proizvodnju čokolade su:

- a) Kakaov maslac, kakaova masa i šećer
- b) Margarin, kakaova masa i šećer
- c) Kakaov maslac, kakaova masa, voda i šećer

18. Čokolada za kuhanje sadrži manje šećera i veći udio kakaovih dijelova od mliječne čokolade.

- a) Točno
- b) Netočno

19. Mliječna čokolada sadrži više antioksidanasa ("zdravih sastojaka") od čokolade s povećanim udjelom kakaovih dijelova.

- a) Točno
- b) Netočno

20. Kofein prisutan u čokoladi u najvećoj mjeri potječe od?

- a) Kakaove mase
- b) Kakaovog maslaca
- c) Šećera
- d) Emulgatora
- e) Aroma

### 5. Sekcija emocionalni aspekt konzumacije čokolade

21. Može li čokolada biti dio pravilne i uravnotežene prehrane?

- a) Da
- b) Ne

22. Čokolada s većim udjelom kakaovih dijelova je bogatija antioksidansima pa time i "zdravija" za konzumaciju

- a) Slažem se
- b) Ne slažem se

23. Čokolada predstavlja izvor praznih kalorija, trebalo bi je izbjeavati.

- a) Slažem se
- b) Ne slažem se

24. Jedem čokoladu:

- a) Kada mi je dosadno
- b) Kada sam loše volje
- c) kada sam dobre volje
- d) Neovisno o raspoloženju
- e) Kao nagradu
- f) Iz navike
- g) Drugi razlozi

25. Osjećam krivnju kada pojedem čokoladu jer mislim da će me udebljati.

Ne slažem se (1) – Potpuno se slažem (5)

26. Ukoliko ne pojedem čokoladu kada mi se jede, osjećam snažnu žudnju za njom.

- a) Da, moram pojesti čokoladu pod svaku cijenu.
- b) Ne, vrlo brzo zaboravim na to i nastavim svakodnevne aktivnosti.
- c) Ne, u tom slučaju pojedem bilo koju drugu slasticu i utažim želju za slatkim.
- d) Ne, ne osjećam žudnju za čokoladom.

27. Najčešće pojedem više čokolade nego što mislim da bih trebao/la.

- a) Slažem se
- b) Ne slažem se

28. Kada pomislim na čokoladu i poželim je pojesti ne mogu misliti ni na što drugo.

Ne slažem se (1) – Potpuno se slažem (5)

### 6. Sekcija otvorenost prema konzumaciji novih okusa

29. Jeste li ikada konzumirali čokoladu s netipičnim začinima ili dodacima (papar, kadulja, curry, bundeva, tropsko voće, vino...)

- a) Da
- b) Ne

29.\* Biste li ikada probali čokolade s netipičnim začinima ili dodacima?

- a) Da
- b) Ne

29\*. Što mislite o okusu takve čokolade?

- a) U redu je, no više volim klasične dodatke čokoladi
- b) Jako mi se svidio okus
- c) Nije mi se svidio okus
- d) Nije mi se svidio okus, ali nije mi ni odbojna takva čokolada

30. Jeste li ikada probali čokoladu kojoj je dodano netipično sladilo (npr. Kokosov šećer, agava u prahu).

- a) Da
- b) Ne

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Miroslava Bernat