

Antioksidacijska i senzorska svojstva čokolada sa zamjenskim sladilima

Poldan, Petra

Undergraduate thesis / Završni 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:159:488442>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Poldan

7657/PT

**ANTIOKSIDACIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA ČOKOLADA
SA ZAMJENSKIM SLADILIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambenu tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Antioksidacijska i senzorska svojstva čokolada sa zamjenskim sladilima

Petra Poldan, 7657/PT

Sažetak: Zdravstveni problemi uzrokovani nepravilnom prehranom, uključujući prekomjernu konzumaciju šećera, rezultirali su povećanom potražnjom proizvoda u kojima je saharoza zamijenjena „zdravijim“ sladilima. Cilj ovog rada je određivanje udjela ukupnih polifenola i pojedinih polifenolnih skupina, antioksidacijskog kapaciteta i senzorskih svojstava 10 čokolada od kojih 5 ima 69,69% kakaovih dijelova, a preostalih 5 ima 79,69% kakaovih dijelova, proizvedenih s različitim sladilima. Navedene čokolade proizvedene su uz: saharozu, kokosov šećer, agavin sirup, rižin slad i ječmeni slad. Udio ukupnih polifenola i neflavonoida određen je kolorimetrijskom reakcijom s Folin-Ciocaltea-u reagensom, udio flavan-3-ola određen je metodama s vanilinom i *p*-DAC reagensom, dok je udio proantocijanidina određen metodom po Bate-Smith-u. Antioksidacijski kapacitet određen je ABTS i DPPH metodama, a senzorska svojstva određena su primjenom kvantitativne deskriptivne analize. Čokolade s višim udjelom kakaovih dijelova bogatije su bioaktivnim sastojcima pa tako čokoladu sa 79,69% kakaovih dijelova uz dodatak kokosovog šećera karakterizira najveći udio ukupnih polifenola (17,244 mg EGK/g uzorka), dok čokolada sa 79,69% kakaovih dijelova uz dodatak saharoze ima najveći antioksidacijski kapacitet (0,102 mmol Trolox/g uzorka). Čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova uz dodatak ječmenog slada bila je senzorski općenito najbolje prihvaćena.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, čokolada, polifenoli, senzorska analiza, sladila

Rad sadrži: 39 stranica, 13 slika, 1 tablica, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag. ing. i Ana Mandura, mag. ing.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Antioxidant and sensory properties of chocolate with substitute sweeteners

Petra Poldan, 7657/PT

Abstract: Health issues caused by improper diet, including over consumption of sugar, resulted in increased demand of products in which saccharose is replaced with "healthier" sweeteners. Goal of this research is to determine total amount of polyphenols, flavonoids and non-flavonoids, proanthocyanins, flavan-3-ol, antioxidant capacity and sensor analysis of 10 kinds of chocolate of which 5 have 69,69% cacao content, other 5 samples have 79,69 cacao content, produced with different sweeteners. Samples contained these sweeteners: saccharose, coconut sugar, agave syrup, rice malt and barley malt. Total amount of polyphenols and non-flavonoids was determined by colorimetric reaction with Folin-Cicolateu reagent, flavan-3-ols were determined with vanilin method and p-DAC method and proanthocyanidins were determined with Bate-Smith method. Antioxidant capacity was determined by ABTS and DPPH method, sensory properties were determined by applying quantitative descriptive analysis. Chocolates with greater cacao content are richer in bioactive compound, so chocolate with 79.69% cacao content with addition of coconut sugar is characterized by greatest amount of polyphenols(17,244 mg EGK/g), while chocolate with 79.69% coco content with addition of saccharose has greatest antioxidation capacity (0,102 mmol Trolox/g of 1 sample) chocolate with 69.69% of cacao content with addition of barley malt was sensory rated as generally best accepted.

Keywords: antioxidant activity, chocolate, polyphenols, sensory analysis, sweeteners

Thesis contains: 39 pages, 13 figures, 1 tables, 43 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, mag. ing. i Ana Mandura, mag. ing.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ŠEĆER I ZDRAVLJE.....	2
2.2. UTJECAJ ČOKOLADE NA ZDRAVLJE.....	3
2.2.1. Nove recepture čokolada	6
2.3. ZAMJENE ZA SAHAROZU	9
2.3.1. Rižin slad	9
2.3.2. Kokosov šećer	10
2.3.3. Agavin sirup	11
2.3.4. Ječmeni slad	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJAL.....	14
3.1.1. Uzorci.....	14
3.1.2. Kemikalije.....	15
3.1.3. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Odmašćivanje čokolade	16
3.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz čokolada.....	16
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola	17
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida	18
3.2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida	19
3.2.6. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom.....	19
3.2.7. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s p-dimetilamino-cinamaldehydom (<i>p</i> -DAC) reagensom	20
3.2.8. Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate-Smith-u	21
3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	22
3.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	23
3.2.11. Senzorska analiza čokolada	24
4. REZULTATI	26

4.1. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida.....	26
4.2. Udio ukupnih flavan-3-ola.....	26
4.3. Udio proantocijanidina	27
4.4. Antioksidacijski kapacitet čokolada	27
4.5. Rezultati senzorske analize.....	28
5. RASPRAVA	29
5.1. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida u čokoladama	29
5.2. Određivanje udjela flavan-3-ola u čokoladama.....	30
5.3. Određivanje udjela proantocijanidina u čokoladama.....	31
5.4. Antioksidacijski kapacitet čokolada	31
5.5. Senzorska analiza	32
6. ZAKLJUČCI.....	33
7. LITERATURA.....	34

1. UVOD

Kronične bolesti danas su jedan od glavnih problema zdravstvenog sustava i vrlo često su povezane s neuravnoteženom prehranom. Prevelika konzumacija masti i šećera može dovesti do nakupljanja masnog tkiva i pojave pretilosti, što uzrokuje mnoge patološke promjene. Zabrinjavajuće brojke osoba oboljelih od kroničnih bolesti rezultirale su promjenama u prehranbenim navikama usmjerenima na smanjivanje udjela šećera u prehranbenim proizvodima, što se postepeno odrazilo i na promjenu pojedinih receptura u kojima se udio rafiniranog šećera počeo smanjivati ili u potpunosti zamjenjivati alternativnim sladilima.

Zahtjevi tržišta posebno su izazovni za konditorsku industriju gdje se postepeno širi asortiman proizvoda smanjenog udjela šećera, bez šećera ili uz dodatak alternativnih sladila.

Čokolada je vrlo popularan konditorski proizvod, kako zbog svojih privlačnih senzorskih karakteristika, tako i zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, među kojima je najistaknutije antioksidacijsko djelovanje vezano uz prisustvo polifenola. Kao najpoznatiji prirodni antioksidansi, polifenoli su već dugi niz godina predmet brojnih istraživanja upravo u kontekstu različitih pozitivnih zdravstvenih učinaka, kao što je primjerice smanjenje rizika od pojave i razvoja kardiovaskularnih bolesti i određenih tipova raka. Kakaovi proizvodi i čokolade, posebice oni visokog udjela kakaovih dijelova (više od 70%), bogati su izvori polifenola te se u novije vrijeme sve češće spominju u kontekstu funkcionalne hrane, kao i voće, povrće, vino, čaj i dr. (Asgary i sur., 2018).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodataka zamjenskih sladila na antioksidacijski i senzorski potencijal čokolada. Ispitivat će se 10 čokolada koje sadrže sljedeća sladila: saharozu, kokosov šećer, agavin sirup, ječmeni slad i rižin slad. Osim utjecaja sladila, čokolade će biti uspoređene i na temelju 2 različita udjela kakaovih dijelova pa će se stoga proizvesti pet čokolada sa 69,69% i pet čokolada sa 79,69% kakaovih dijelova. Antioksidacijski kapacitet, udio ukupnih polifenola, proantocijanidina, flavan-3-ola, flavonoida i neflavonoida određivat će se primjenom spektrofotometrijskih metoda, dok će se senzorska analiza provesti primjenom kvantitativne deskriptivne analize.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŠEĆER I ZDRAVLJE

Glavna skupina makronutrijenata za dobivanje energije potrebne tijelu su ugljikohidrati, među kojima je najpoznatija saharoza (stolni šećer). Razgradnja saharoze započinje u tankom crijevu enzimom invertaza koji cijepa molekulu saharoze na glukozu i fruktozu. Metabolički proces glukoze i fruktoze nije isti, ali rezultira istom količinom energije. Glukoza je esencijalna molekula za dobivanje stanične energije u obliku ATP-a putem glikolize te ona može ući direktno u krv ili se može otpustiti iz zaliha glikogena. Metabolizam glikogena je reguliran hormonima inzulinom, glukagonom i epinefrinom. Fruktoza odlazi u jetru gdje se pomoću niza enzima prevodi u glukozu i kao takva ulazi u proces glikolize.

Razgradnjom 1 grama saharoze, glukoze ili fruktoze oslobađa se 4 kcal, 1 grama proteina 4 kcal, a 1 gram masti daje 9 kcal (Alibabić i Mujić, 2016). Iako mozak odraslog čovjeka treba oko 140 g glukoze/dan (Alibabić i Mujić, 2016), prevelik unos saharoze, kroz namirnice kao što su voćni sokovi i konditorski proizvodi može dovesti do zdravstvenih problema. Stoga je u novije vrijeme sve veća potražnja za konditorskim proizvodima u kojima je saharoza zamijenjena „zdravijim“ alternativnim sladilima.

Jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice su kronične bolesti tj. bolesti životnog stila. Prema izvještaju WHO iz 2018. godine, godišnje od kroničnih bolesti umire 41 milijun ljudi što je gotovo 71% ukupno umrlih osoba. Kardiovaskularne bolesti, karcinomi, respiratorne bolesti i dijabetes su 4 glavne grupe bolesti koje čine 80% preuranjenih smrti izazvanih kroničnim bolestima. Na godišnjoj razini od kardiovaskularnih bolesti umire najviše ljudi (17,9 milijuna), od karcinoma 9 milijuna, od respiratornih bolesti 3,9 milijuna i od dijabetesa 1,6 milijuna. Osim gore navedenih, u grupu kroničnih bolesti spadaju i osteoporoza, moždani udar, Alzheimerova bolest itd. Iako kronične bolesti ovise o dobi, spolu i genetici, na njihovu pojavu i razvoj uvelike utječu i drugi rizični faktori na koje možemo utjecati te time prevenirati njihovu pojavu. Neki od glavnih faktora su loše prehrambene navike i manjak tjelesne aktivnosti (Alibabić i Mujić, 2016).

Pretilost se pojavljuje primarno zbog prekomjernog unosa visokokalorične hrane s puno masti i rafiniranih šećera te se uz nedovoljnu tjelesnu aktivnost višak unesene energije pohranjuje kao mast. Višak masnog tkiva se može nakupiti u tolikoj mjeri da ugrozi zdravlje pojedinca te posljedično dovodi do razvoja određenih bolesti u kardiovaskularnom, respiratornom,

lokomotornom, urogenitalnom i gastrointestinalnom sustavu. Također, pretilost se povezuje s 5% karcinoma i jedan je od najvažnijih faktora za razvitak dijabetesa tipa 2 (Alibabić i Mujić, 2016). Iako su preporuke da se u slučaju pretilosti smanji udio masti i rafiniranih šećera, važno je napomenuti da konzumacija šećera ili konditorskih proizvoda nije izravni uzrok dijabetesa tipa 2 nego nepravilna prehrana koja dovodi do pretilosti.

Konzumacija šećera ima utjecaj i na mentalne bolesti. Dok neka istraživanja podržavaju hipotezu o povezanosti prevelike konzumacije šećera i depresije, druga ne nailaze na isti zaključak. Ostaje nejasno koliki je zapravo utjecaj šećera na razvitak depresije i jesu li eksperimenti postavljeni i provedeni na odgovarajući način da bi se ta hipoteza, na temelju znanstvenih činjenica, mogla potvrditi. No, postoji poveznica u konzumaciji šećera s faktorima koji utječu na razvoj depresije. To su: oksidacijski stres, inzulinska rezistencija, disfunkcija mikrobioma crijeva, poremećeno signaliziranje dopamina i nakupljanje naprednih produkata neenzimske glikozilacije (AGE). Također većina ovih procesa uzrokuje i patološku upalu koja je rizičan faktor za razvoj depresije (Reis i sur., 2019).

Bezalkoholna pića su najveći izvor dodanog šećera u našoj prehrani i kao takva predstavljaju opasnost za zdravlje. Pokazalo se da konzumacija bezalkoholnih pića zaslađenih umjetnim sladilima ima utjecaj na povećanje rizika od moždanog udara, demencije i Alzheimerove bolesti, dok konzumacija bezalkoholnih pića zaslađenih sa šećerom nije povezana s moždanim udarom ili demencijom (Pase i sur., 2017).

2.2. UTJECAJ ČOKOLADE NA ZDRAVLJE

Nutritivna vrijednost čokolade ovisi o udjelu kakaovih dijelova, udjelu i vrsti dodanog sladila, ali i drugim sastojcima kao što su različiti dodaci (orašasti plodovi, keksi, sušeno voće i dr.). Čokolada uobičajeno sadrži oko 30%-55% šećera tj. saharoze, ali sadrži i šećer laktozu u mlijeku (Wohlmuth, 2009). Jedna od zabluda je da konzumacija čokolade, zbog visokog udjela saharoze, ima utjecaj na pojavu dijabetesa. Naime, ranije navedeni čimbenici poput prekomjerne tjelesne mase, manjka fizičke aktivnosti, visoki unos trans masnih kiselina i nizak omjer nezasićenih/zasićenih masnih kiselina imaju neizbježan utjecaj na razvoj dijabetesa, ali ne i sama konzumacija saharoze (Lambert, 2009). Maskarinec i suradnici (2018) proveli su istraživanje kojim su pokazali da čak i nakon kontroliranog unosa šećera, kvalitetnom prehranom i ostalim aspektima

prehrane, konzumacija čokoladnih proizvoda smanjuje rizik od dijabetesa tip 2. Između ostalog, masti u čokoladi usporavaju apsorpciju ugljikohidrata pa čokolada ima nizak GI. Također, brojne predrasude koje se nadovezuju na relativno visok udio saharoze u čokoladi rezultirale su miskoncepcijama o tome da čokolada uzrokuje karijes, hiperaktivnost kod djece, akne, glavobolju i migrene, alergije i ovisnost, ali su rezultatima istraživanja iste opovrgnute (Lambert, 2009).

Općenito, kakaovi proizvodi, kao vina i čajevi samo su neki od izvora polifenola, koji zbog svoje antioksidacijske sposobnosti smanjuju učinak oksidacijskog stresa i time pridonose boljem općem stanju organizma i zdravlju. Tako primjerice u čokoladama možemo naći epikatehin i katehin te proantocijanidine. Također, u čokoladama, zbog prisustva kakaovih dijelova, u malim udjelima nalazimo kafein i teobromin, koji su stimulatori centralnog živčanog sustava pri čemu teobromin ima blaži učinak od kafeina. Pojedina istraživanja rezultirala su zaključcima da čokolada pozitivno utječe na kognitivne funkcije, imunološki sustav, oralno zdravlje i rad bubrega (Lambert, 2009). Novija istraživanja potvrdila su da konzumacija čokolade, zbog svog fenolnog sastava, pozitivno utječe na kognitivne funkcije (Crichton i sur., 2016), ali pomaže i pri sprječavanju pada kognitivnih funkcija kod starijih osoba (Moreira i sur., 2016). Unos flavonoida, kao podskupine polifenola, povezuje se sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti i nekih tipova raka (Lamuela-Raventós i sur., 2005). Osim toga polifenoli sprečavaju oksidaciju LDL-a (low-density lipoproteins) koji može uzrokovati oštećenje stijenki arterija i time aterosklerozu (Lambert, 2009).

Nadovezujući se na pozitivne aspekte konzumacije čokolade jedan od istaknutijih učinaka konzumacija čokolade je njezin utjecaj na raspoloženje osoba uslijed konzumiranja čokoladnih proizvoda. Istraživanje Macht i Dettmer (2006) pokazuje da konzumacija čokolade povećava aktivnost, smanjuje umor, podiže raspoloženje i pobuđuje radost. Pri tome, na pozitivne emocije, uvelike utječu senzorska svojstva čokolade za vrijeme i odmah nakon konzumacije, dok manji učinak imaju naknadni mehanizmi kao što su neurokemijske promjene. Predmetnim istraživanjem je utvrđeno da se uslijed konzumacije čokolade naknadno javlja i osjećaj krivnje kao negativna emocija. Međutim, Tsang i suradnici (2019) istražujući utjecaj konzumacije tamne čokolade koja sadrži 500 mg ukupnih flavonoida, nisu zapazili promjene raspoloženja na manjoj skupini odraslih osoba.

U suvremenom užurbanom društvu stres je postao jedan od presudnih faktora koji utječe na zdravlje osoba s obzirom da djeluje kao okidač mnogih zdravstvenih poteškoća, ali i je isto tako

jedan od faktora koji oblikuju raspoloženje osoba. Tijekom navedenog istraživanja Tsanga i suradnika (2019) utvrđeno je da konzumacija tamne čokolade ima utjecaj na smanjenje razine kortizola u slini te da flavonoidi inhibiraju 11β -hidroksisteroid dehidrogenazu (11β -HSD) tip 1, a riječ je o enzimu koji je zaslužan za pretvorbu kortizona u njegov aktivni oblik, odnosno kortizol. Istraživanje Amloosawija i suradnika (2009) koje se isto tako bavi koncentracijom kortizola, kortizona, glukoze i krvnim tlakom rezultiralo je drukčijim podacima. Samo istraživanje provedeno je sa skupinom osoba prekomjerne tjelesne mase te osoba koje se mogu smatrati pretilima, a potvrđeno je da konzumacija tamne čokolade s 500 mg i 1000 mg polifenola smanjuje razinu glukoze u krvi na tašte, kao i krvni tlak. Iako polifenoli u čokoladi neznajčajno smanjuju razinu 24-satnog kortizona i kortizola u urinu, njihova redukcija se ne povezuje sa smanjenjem razine glukoze u krvi na tašte i krvnog tlaka.

Na temelju komparacije istaknutih istraživanja evidentno je da postoje određene nekonzistentnosti u rezultatima, odnosno zaključcima, koji mogu biti uzrokovani samim metodama i ciljevima istraživanja, ali i drugim čimbenicima, poput uzoraka ispitanika koji su posebice varijabilni. Slijedom navedenoga razvidna je potreba daljnjih istraživanja učinka čokolade na ljudsko zdravlje, na što ukazuju i neka novija istraživanja koja su uspjela utvrditi do sada neotkrivene efekte konzumacije čokolade na zdravlje. Jedno od takvih recentnijih istraživanja bavilo se pozitivnim utjecajem konzumacije čokolade na sluh. Istraživanjem Lee i suradnika (2019) pokazalo se da su ispitanici koji su konzumirali čokoladu imali smanjenu stopu gubitka sluha od onih ispitanika koji nisu konzumirali čokoladu.

2.2.1. Nove recepture čokolada

Sukladno novim trendovima u prehrambenim navikama potrošača i konditorske industrije prilagodile su svoj asortiman sukladno zahtjevima tržišta za konditorskim proizvodima smanjenog udjela šećera, bez dodatnog šećera ili s alternativnim sladilima.

S obzirom da prirodna sladila nisu rafinirana, zbog čega imaju kvalitetniji nutritivni sastav, mnogi proizvođači konditorskih proizvoda odlučili su kreirati proizvode koji koriste upravo prirodna sladila. Primjerice tvrtka Stella Bernrain (Švicarska) u svom asortimanu nudi čokolade s agavinim sirupom, kokosovim šećerom, ali i one bez dodanog šećera. Čokolada s agavinim sirupom Stella Bernrain dolazi u 3 varijante: mliječna čokolada sa agavinim nektarom, mliječna čokolada sa lješnjacima i agavinim nektarom te tamna čokolada s agavinim nektarom (Slika 1). U asortimanu tvrtke Zazubean (Kanada) mogu se naći čokolade s kokosovim šećerom uz različite dodatke, kao što su: sol, ananas, smokva, lješnjaci, bademi i dr. (Slika 2). Belvas, Naturata, Dr. Goerg (Belgija, Švicarska, Njemačka) samo su neki od izdvojenih proizvođača koji nude čokolade sa kokosovim šećerom. Posebno su zanimljivi čokoladni proizvodi HEXX (SAD) čokolada čija je osnovna receptura pripremljena samo iz dva sastojka, a to su kakova zrna i organski kokosov šećer.



Slika 1. Tamna čokolada sa agavinim nektarom (Anonymous 1, 2020)



Slika 2. Čokolade s kokosovim šećerom uz različite dodatke (Anonymous 2, 2020)

Osim čokolada s prirodnim sladilima, danas postoji veliki broj proizvođača koji proizvode konditorske proizvode bez dodanog šećera ili smanjene kalorijske vrijednosti. Tvrtka Chocolette Confectionary (Švicarska) stavila je na tržište liniju RED chocolate koja je proizvedena bez rafiniranog šećera i sadrži smanjeni udio masti, a kao sladilo sadrži eritritol i steviju (Slika 3). U svom asortimanu nude čokolade sa 30%, 35%, 40% i 50% manje kalorija. RED dark čokolada, koja sadrži najmanju kalorijsku vrijednost, proizvedena je s 40% kakaovih dijelova te u 100 g sadrži 292 kcal.



Slika 3. Čokolade smanjene kalorijske vrijednosti (Anonymous 3, 2020)

Hrvatski proizvođači konditorskih proizvoda, vodeći se svjetskim trendovima, prilagodili su proizvodnju kreirajući linije konditorskih proizvoda bez šećera, no, trenutno još uvijek nisu dostupni proizvodi s prirodnim sladilima. Kandid je razvio liniju čokolada pod nazivom „NO GUILT“, čiji sastav ne sadrži dodatni šećer, a ulogu sladila imaju maltitol ili stevija. Na tržištu su trenutno

dostupne 4 vrste čokolada iz linije „NO GUILT“, od čega su dvije proizvedene sa stevijom, a druge dvije sa maltitolom. Dok maltitol ima nižu kalorijsku vrijednost od saharoze, stevija nema kalorijsku vrijednost, a ovo su ujedno i prve hrvatske čokolade s oznakom UTZ cocoa. UTZ je oznaka koju nose proizvodi čije kompanije podržavaju pravila održivog razvoja, u cilju odgovornije proizvodnje, gledano sa društvenog i ekološkog stajališta, koja zadovoljava potrebe i proizvođača i tržišta. Oznaka se odnosi na kavu, kakaova zrna, čaj ili lješnjake u proizvodu, ali ne i na sastojke poput mlijeka ili šećera.

Hrvatski savez dijabetičkih udruga preporučuje dijabetičarima upravo čokolade iz ove linije koje sadrže stevijju. Uz Kandit, i Kraš je razvio liniju proizvoda bez dodanih šećera, u kojoj se mogu pronaći mliječna i tamna Dorina, napolitanke, mentol bomboni i 505 bomboni. Kao sladila u ovim proizvodima koriste se maltitol, stevija, izomalt i saharin.



Slika 4. „NO GUILT“ čokolade (Anonymous 4, 2020)

2.3. ZAMJENE ZA SAHAROZU

2.3.1. Rižin slad

Rižin slad je sladilo blažeg okusa i manje slatkoće u usporedbi sa saharozom, a koristi se u konditorskim proizvodima i sladoledu.

Prvi korak u enzimskoj proizvodnji rižinog slada je mljevenje riže koja se miješa s vodom kako bi se dobila suspenzija. Suspenzija se tretira u autoklavu, termostabilnim α -amilazama kako bi se škrob razgradio na topljive oligosaharide. Tako dobivena otopina se centrifugira te se supernatant tretira β -amilazama i pululanazom kako bi se dobio rižin sirup (Shaw i sur., 1992). Također, proces na kraju može uključivati evaporaciju, a umjesto centrifugiranja suspenzija se može filtrirati (Chigozie i sur., 2018).

Rižin slad može sadržavati 76,4-84,3 % maltoze, 10,5-15,5 % maltotrioze, 1,5-3,0% glukoze i 3,7-9,5% ostalih tvari ovisno o parametrima proizvodnje (Shaw i sur., 1992). Analizirajući uzorke rižinog slada pokazalo se da imaju antioksidacijsku aktivnost od 1-1,5 mmol na 100 g, što je više od rafiniranog šećera, ali i manje od melase. Također, pokazali su i veliku razliku u rezultatima ovisno o proizvođaču, što može biti uzrokovano različitim proizvodnim procesom i vrstom sirovine (Phillips i sur., 2009). Uzorci rižinog slada na poljskom tržištu pokazuju rezultat od 5,19 mmol Fe(II) kg⁻¹ za FRAP metodu, dok prema ABTS metodi isti iznosi 0,66 mmol Trolox kg⁻¹. Također rižin slad sadrži određeni udio (895,26 mg EGK kg⁻¹) polifenola (Grabek-Lejko i Tomczyk-Ulanowska, 2013).

Organski proizveden rižin slad služi kao sladilo u dječjoj hrani. Međutim, pokazalo se da formule na mliječnoj bazi s OBRS (Organic brown rice syrup) sadrže anorganski arsen u koncentracijama dopuštenima od EPA (Environmental Protection Agency), dok one na sojinoj bazi sadrže od 1,5-2,5 puta više anorganskog arsena od EPA standarda (Holtcamp, 2012).

2.3.2. Kokosov šećer

Proizvodnja i konzumacija kokosovog šećera većinom se odvija u tropskim regijama, kao što su Južna Azija tj. Indonezija, Filipini, Indija. Sve do nedavno konzumacija kokosovog šećera u Europi bila je nepoznanica.

Prvi korak u proizvodnji kokosovog šećera je sakupljanje palminog soka iz kokosove palme. Cvjetni pupovi palme se zarežu (Slika 5) te se ispod tih mjesta stavljaju posude od bambusa u koje se cijedi palmin sok tijekom 8-12 h (Wrage i sur., 2019). Kako bi se sačuvali nutrijenti, sakupljeni palmin sok se treba čuvati na temperaturi od -2 ± 1 C ili se treba odmah preraditi u proizvode kao što su kokosov šećer, kokosov ocat, alkoholna pića itd. (Asghar i sur., 2019). Svježi sok koji sadrži otprilike 15 g šećera u 100 g soka najprije se kuha, uz konstantno miješanje, dok se ne zgusne i kristalizira. Nadalje, šećer se prosijava te se ručno probire kako bi se dobio proizvod fine granulacije (Wrage i sur., 2019).



Slika 5. Sakupljanje soka kokosove palme (Anonymous 5, 2020)

Sok kokosove palme, kao osnovna sirovina za proizvodnju kokosovog šećera, ima više prednosti nad sirovinama koje se koriste za proizvodnju rafiniranog šećera. Asghar i suradnici (2019) proveli su istraživanje prema kojemu sok kokosove palme ima više pepela (0,27%) i manje TSS (12, 14°Brix) u odnosu na šećer dobiven iz soka šećerne palme i šećerne trske. Također, pokazalo se da sok kokosove palme ima manji udio ukupnih šećera (12,92%) nego sok šećerne trske (15,73%) i sok šećerne palme (13,42%), a zbog većeg udjela fruktoze i glukoze, a manjeg udjela saharoze, ima i niži GI. GI kokosovog šećera iznosi 35, što je povoljno za osobe oboljele od dijabetesa, ali i u prevenciji prekomjerne mase i pretilosti (BAFPS, 2010). Nadalje, sok kokosove

palme bogat je antioksidansima i sadrži veći udio C, B2, B3, B4 i B10 vitamina, dok je u soku šećerne palme određen veći udio vitamina B1 (Asghar i sur., 2019).

Kokosov šećer je sladilo u krutom stanju, svjetlo žute do tamno smeđe boje, a sadrži 78–89 g na 100 g saharoze, 1–4 g na 100 g fruktoze, 2–3 g na 100 g glukoze, 0,5–0,8 g na 100 g vode i ≤ 2,4 g na 100 g pepela (BAFPS, 2010). Proizvodni proces značajno utječe na sastav konačnog proizvoda pa tako kokosov šećer može sadržavati gluten, škrob, dodatne šećere porijeklom iz C4 biljaka, kokosovo ili palmino ulje i sl. (Wrage i sur., 2019).

2.3.3. Agavin sirup

Meksiko, kao najveći proizvođač, ima zasađeno više od 100 000 ha agave, koja se većinom koristi u proizvodnji alkoholnih pića, npr. tekile. No, zbog zahtjeva potrošača za alternativnom sladilima popularnost agavinog sirupa kao sladila raste. Za proizvodnju agavinog sirupa koriste se: *Agave tequilana* Weber, var. azul, *Agave americana*, *mapisaga*, *atrovires*, *salmiana* i dr. Agavni sirup dolazi još pod nazivima: agavin nektar, agavin koncentrat, agavin med ili aguamiel koncentrat, „agave sap“ i „aguamiel concentrate“ (González-Montemayor i sur., 2019).

Biljke agave svoju zrelost postižu nakon 6 godina, što odgovara maksimalnom udjelu ugljikohidrata i kao takve su prikladne za proizvodnju agavinog sirupa (Velázquez Ríos i sur., 2018). Postoje dva načina proizvodnje agavinog sirupa. Jedan način je kuhanjem soka, koji se sakuplja iz srca biljke (Slika 6) i naziva se „aguamiel“, do željene vrijednosti °Brix, dok je drugi način kuhanjem listova agave u ciglenim pećima 36–48 h ili u autoklavima 12 sati. Tradicionalni proizvođači hidroliziraju fruktane termički ili kiselinski, no, zbog neujednačenog prijenosa topline, i time neujednačene hidrolize, dolazi do nastanka nepoželjnih produkata koji utječu na okus i boju sirupa. Iz tog razloga se počela koristiti enzimaska hidroliza, pomoću inulinaza, kao noviji postupak u proizvodnji agavinog sirupa (González-Montemayor i sur., 2019). Iako se agavin sirup naziva „zdravijom“ varijantom i prirodnim šećerom, on ipak prolazi industrijski proces prerade.



Slika 6. Berba agave (Anonymous 6, 2017.)

Agavin nektar, skupa s rafiniranim šećerom i kukuruznim sirupom, sadrži antioksidacijski kapacitet od 0,001 mmol Fe(II) na 100 g dobiven FRAP metodom (Phillips i sur., 2009). Fruktaza je šećer koji se nalazi u najvećem udjelu u agavinom sirupu od 650-715 mg g⁻¹, udio glukoze je niski (66-74 mg g⁻¹), dok saharoze ima u tragovima (< 6 mg g⁻¹). Također, pronađeni su i fruktooligosaharidi (Mellado-Mojica i López, 2015; Mellado-Mojica i López, 2016).

Sve je veća popularnost agavinog i kukuruznog sirupa zbog visokog udjela fruktoze u njihovom sastavu. Fruktaza je voćni šećer, slađa je od saharoze i ima nisku GI vrijednosti i time je odlična zamjena za saharozu kod osoba oboljelih od dijabetesa. Fruktaza se apsorbira u tankom crijevu te se preko portalne vene prenosi u jetru gdje se dalje razgrađuje. U jetri može biti prevedena u jetreni glikogen ili iskorištena za sintezu triglicerida (Qi i Tester, 2019). No, prevelik unos fruktoze može uzrokovati metaboličke promjene koje su potencijalno štetne, npr. hiperlipidemiju, hiperuricemiju, ne-enzimsku fruktozilaciju proteina, laktacidemiju i poremećaje u metabolizmu bakra. Većina metaboličkih promjena rezultat su toga što se fruktoza brzo iskorištava u jetri i ne ulazi u reakciju fosfofruktokinaze što utječe na metabolizam ugljikohidrata i lipida. Dolazi do povećanja koncentracije piruvata i laktata, aktivacije piruvat dehidrogenaze i povećane sekrecije VLDL (lipoproteini vrlo male gustoće). Dugotrajna konzumacija fruktoze uzrokuje adaptaciju enzima koji ubrzava lipogenezu i povećava izlučivanje VLDL, što dovodi do trigliceridemije, smanjene tolerancije na glukozu i hiperinzulijemije (Mayes, 1993). Također konzumacija više od 100 g fruktoze na dan može smanjiti osjetljivost na inzulin (Qi i Tester, 2019).

2.3.4. Ječmeni slad

Ječmeni slad jedna je od glavnih sirovina za proizvodnju piva, no, može se koristiti i kao zamjensko sladilo za saharozu.

Proizvodnja ječmenog slada započinje močenjem ječma u vodi do određenog udjela vode (45%), a nakon toga ječam ide na klijanje. Za vrijeme klijanja odvijaju se biokemijske reakcije pa se povećava koncentracija CO₂. Zbog toga se uvodi zrak koji uklanja CO₂, opskrbljuje zrna kisikom i održava temperaturu i vlažnost. Također, povećava se aktivnost α- i β- amilaza koje razgrađuju škrob, a klijanje se zaustavlja sušenjem. Ječmeni slad nakon mljevenja namače se vodom, sve dok se škrob ne hidrolizira, pomoću α- i β- amilaza u maltozu i druge šećere. Zatim se filtrira i tako dobiveni ekstrakt se evaporira da se dobije smeđi sirup.

U istraživanju Phillips i suradnika (2009) pokazalo se da, u usporedbi s rafiniranim šećerom, ječmeni slad ima veći antioksidacijski kapacitet. Rafinirani šećer, kukuruzni sirup i agavin sirup zajedno imaju antioksidacijski kapacitet od < 0,01 mmol Fe(II) na 100 g, dok ječmeni slad ima antioksidacijski kapacitet oko 1-1,5 mmol Fe(II) na 100 g. Važno je naglasiti da je crna melasa imala najveći antioksidacijski kapacitet (4,89 mmol Fe(II) na 100 g). Analizirajući uzorke različitih sladila na poljskom tržištu pokazalo se da ječmeni slad ima vrlo visoki antioksidacijski kapacitet (37,87 mmol Fe(II) kg⁻¹ FRAP metodom i 2,95 mmol Trolox kg⁻¹ ABTS metodom) u odnosu na druga sladila. Također ječmeni slad sadrži i određeni udio polifenola (2381,42 mg EGK kg⁻¹) u usporedni s rafiniranim šećerom (0,0 mg EGK kg⁻¹) (Grabek-Lejko i Tomczyk-Ulanowska, 2013). Ječmeni slad sadrži u najvećem postotku maltozu, zatim maltotrizu i glukozu, a upola je manje sladak od saharoze (Barclay, 2014.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U radu je ispitivano 10 čokolada sa sljedećim sladilima: saharoza, kokosov šećer, agava u prahu, ječmeni slad, rižin slad. Od toga je 5 čokolada imalo 69,69% kakaovih dijelova, a drugih 5 je imalo 79,69% kakaovih dijelova.

U tablici 1. navedeni su uzorci i oznake korištene u poglavlju Rezultati.

Tablica 1. Popis oznaka i sastava uzoraka čokolade.

OZNAKA	UDIO KAKAOVIH DIJELOVA	VRSTA ŠEĆERA
Č1	69,69%	Saharoza
Č2		Kokosov šećer
Č3		Agava u prahu
Č4		Ječmeni slad
Č5		Rižin slad
Č6	79,69%	Saharoza
Č7		Kokosov šećer
Č8		Agava u prahu
Č9		Ječmeni slad
Č10		Rižin slad

3.1.2. Kemikalije

Korištene kemikalije su:

- n-heksan, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, (Deventer, Njemačka)
- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 140 mM otopina kalijevog perosulfata, Sigma- Aldrich (Fluka, Njemačka)
- 7 mM otopina 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonska kiselina) dijamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- *p*-dimetilamino-cinamaldehyd (*p*-DAC), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- Vanilin, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- n-butanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2%-tna otopina amonijželjezo(II)sulfatdodekahidrata u 2M klorovodičnoj kiselini, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehyd, 35%-tni, Alkaloid AD (Skopje, Makedonija)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na₂CO₃), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Otopina galne kiseline (za konstruiranje baždarne krivulje)

3.1.3. Aparatura i pribor

- analitička vaga (Mettler Toledo AG, Švicarska)
- laboratorijska centrifuga (Thermo Scientific, SAD)
- laboratorijsko posuđe (plastične kivete, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice od volumena 10 ml, 100 ml i 200ml, staklene epruvete, mikropipeta, kivete za spektrofotometrijsko mjerenje, staklene vialice, Eppendorf epruvete, menzure)
- spektrofotometar (Helios, ThermoSpectronic, Velika Britanija)

- mikrofilteri PTFE 0,2 μm
- ultrazvučna kupelj (Elma, Njemačka)
- vodena kupelj, Tehnica Železniki (Ljubljana, Slovenija)
- magnetna miješalica (Witeg, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Odmašćivanje čokolade

Postupak rada

U plastične kivete je odvagano 2 g prethodno naribanih čokolada, koje su zatim odmašćene dodatkom 10 mL n-heksana. Kivete su začepljene, a sadržaj je miješan 5 minuta na magnetnoj miješalici te je centrifugiran 10 minuta pri 9500 RPM-a, na temperaturi 4 °C. Supernatant je oddekantiran, a talog je još dva puta ekstrahiran dodatkom 10 mL n-heksana i centrifugiranjem. Odmašćeni uzorci ostavljeni su preko noći na sobnoj temperaturi da ispari otapalo i zaostane čvrsti talog (Adamson i sur., 1999).

3.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz čokolada

Postupak rada

U epruvete s talogom dodano je 5 mL otapala za ekstrakciju tj. 70%-tnog metanola. Sadržaj epruvete je dobro homogeniziran i zatim ekstrahiran u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta (epruvete pri tome moraju biti odčepljene). Sadržaj epruveta se zatim centrifugira 10 minuta na 9500 RPM-a, pri temperaturi od 5 °C. Supernatant se oddekantira u odmjernu tikvicu od 10 mL, a talog ponovno ekstrahira s 5 mL otapala za ekstrakciju, na isti način kao i u prvoj ekstrakciji. Nakon centrifugiranja supernatanti se spoje u odmjernoj tikvici i po potrebi nadopune do oznake otapalom koje je korišteno za ekstrakciju tj. 70%-tnim metanolom, kako bi se dobila poznata masena koncentracija. Dobiveni ekstrakti čuvani su u zamrzivaču do daljnjih analiza (Guyot i sur., 1998; Hammerstone i sur., 1999.).

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode

Udio ukupnih polifenola u ekstraktima čokolade određeni su metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji reducirajućeg reagensa tj. fenola s Folin-Ciocalteau reagensom. Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline te reagira s fenoksidnim ionom iz uzorka, pri čemu se fenoksidni-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur.,1999b). Reakcija traje dva sata nakon čega se spektrofotometrijski, pri 765 nm, odredi intenzitet nastalog plavog obojenja (Ough i Amerine, 1988). Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada

Napravi se razrjeđenje Folin-Ciocalteau reagensa s vodom u omjeru 1:2, te se uzorak razrijedi 10 puta sa 70%-tnim metanolom. U staklene epruvete se zatim otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L razrijeđenog uzorka, 500 μ L pripremljenog Folin-Ciocalteau reagensa i 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata te se s uzorcima vorteksiraju. Reakcija se provodi 2 sata u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja pri 765 nm. Od apsorbancije uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe, koja se priprema na isti način kao i uzorci, ali sadrži 100 μ L destilirane vode umjesto 100 μ L uzorka.

Izračun

Pomoću jednadžbe baždarne krivulje izračunava se udio ukupnih polifenola u ekstraktima čokolade. Jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [1]$$

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Baždarna krivulja pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda galne kiseline (mg L^{-1}). Mjerenje se provodi u tri paralelne probe, a rezultat je prikazan kao njihova srednja vrijednost i pripadajuća standardna devijacija, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po g uzorka. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak, dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

3.2.4. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida

Princip metode

Za taloženje flavonoidnih spojeva primjenjuje se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojem također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih fenola određuje se prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada

Pripremi se razrijeđena otopina klorovodične kiseline s vodom u omjeru 1:4. U Eppendorf epruvete se otpipetira se 0,5 mL nerazrijeđenog uzorka, 250 μL pripremljene otopine klorovodične kiseline i 250 μL formaldehida. Tako pripremljeni uzorci se vorteksiraju i ostave stajati 24 sata u frižideru. Udio ukupnih neflavonoida se odredi prema prethodno opisanom postupku za određivanje ukupnih polifenola.

Izračun

Za izračun se koristi baždarna krivulja koje je korištena i za izračun ukupnih polifenola, a rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost triju mjerenja uz pripadajuće standardne devijacije, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po g uzorka. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

3.2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

Udjel ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udjela ukupnih polifenola i neflavonoida prema sljedećoj formuli:

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni polifenoli} - \text{ukupni neflavonoidi} [\text{mg EGK g}^{-1}] \quad [2]$$

3.2.6. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom

Princip metode

Metoda se temelji na reakciji vanilina (*p*-hidroksibenzaldehida) s hidroksilnim skupinama na položajima C-6 i C-8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 500 nm. Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (Price i sur., 1978).

Postupak rada

Za ovu metodu potrebno je pripremiti 4%-tnu otopinu vanilina u metanolu, a uzorak razrijediti 10 puta sa 70%-tnim metanolom. U epruvetu se otpipetira 3 mL pripremljene otopine vanilina i 0,5 mL razrijeđenog uzorka te se stavi u hladnu vodenu kupelj na 5 minuta. Nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline te se smjesa vorteksira. Nakon 15 minuta očita se apsorbancija na 500 nm (Di Stefano i sur., 1989). Slijepa proba se priprema za svaki uzorak, a umjesto 4%-tne otopine vanilina, ista sadrži čisti metanol.

Izračun

Izmjerena apsorbancija slijepa probe oduzme se od apsorbancije uzorka kako bi se dobila vrijednost ΔA koja je potrebna u daljnjem izračunu.

Udjel (+)-katehina računa se prema jednadžbi:

$$\text{mg (+)-katehina L}^{-1} = 290,8 \times \Delta A \times \text{razrjeđenje} \quad [3]$$

gdje je: ΔA = razlika apsorbancije između uzorka i slijepa probe.

Mjerenje je provedeno u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg (+)-katehin po g uzorka. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrijeđenja originalnog uzorka.

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

Princip metode

Ova metoda temelji se na istom principu kao i metoda s vanilinom. Razlikuje se po tome što p-dimetilamino-cinamaldehyd (p-DAC) reagira samo s hidroksilnom skupinom na položaju C-8 u molekuli flavan-3-ola pri čemu nastaje zeleno obojenje koje se određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 640 nm.

Postupak rada

Uzorak se razrijedi sa 70%-tnim metanolom u omjeru 1:40 te se reagens priprema otapanjem 100 mg p-dimetilamino-cinamaldehyda (p-DAC) u 70 mL metanola i 25 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Smjesa se prebaci u tikvicu od 100 mL te se nadopuni do oznake metanolom. U epruvetu se otpipetira 0,5 mL razrijeđenog uzorka i 2,5 mL pripremljenog reagensa te se vorteksira. Nakon 10 minuta mjeri se apsorbancija na 640 nm. Za ovu metodu se pripreme dvije slijepa probe, jedna sadrži 2,5 mL reagensa p-DAC i 0,5 mL vode, dok druga sadrži 2,5 mL vode i 0,5 mL uzorka (Di Stefano i sur., 1989).

Izračun

Udjel (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema jednadžbi:

$$\text{mg (+)-katehina L}^{-1} = 32,1 \times \Delta A \times \text{razrijeđenje} \quad [4]$$

gdje je: ΔA = razlika apsorbancije između:

a) uzorka i reagensa

b) vode i reagensa

c) uzorka i vode

Odnosno:

$$\Delta A = a - b - c \quad [5]$$

Mjerenje je provedeno u dvije paralelne probe i dvije slijepa probe. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg (+)-katehin po g uzorka. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

3.2.8. Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate-Smith-u

Princip metode

Ova metoda temelji se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula procijanidina s klorovodičnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Intenzitet nastalog crvenog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Porter i sur., 1986).

Postupak rada

Pripreme se otopine n-butanol/HCl (95:5) , 2 % $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ u 2 M HCl i uzorak se razrijedi sa 70%-tnim metanolom u omjeru 1:20. U staklenu vialu otpipetira se 1 mL razrijeđenog uzorka, 2 mL otopine butanol/HCl i 100 μL 2 % $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ u 2 M HCl. Suspenzija se vorteksira te se zagrijava 45 minuta na 95°C. Nakon što se smjesa ohladi očita se apsorbancija na valnoj duljini od 550 nm. Slijepa proba sadrži umjesto uzorka sadrži 70 %-tni metanol.

Izračun

Spektrofotometar automatski oduzima vrijednost slijepa probe od vrijednosti apsorbancije uzorka te se udjel proantocijanidina izračunava iz jednadžbe baždarne krivulje. Jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 0,00037x + 0,00292 \quad [6]$$

gdje su:

x – udjel (+)-katehina (mg L^{-1}),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 550 nm.

Jednadžba baždarne prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (+)-katehina (mg L^{-1}). Određivanje udjela proantocijanidina provedeno je u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mg (+)-katehin po g uzorka}$. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrijeđenja originalnog uzorka.

3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom temelji se na reakciji DPPH radikala, koji zbog svog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorbanciju u vidljivom dijelu spektra, s elektron donorom- AH (antioksidans koji gasi slobodna radikale) pri čemu dolazi do redukcije DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini i do promjene ljubičaste otopine u žutu. Apsorbancija se mjeri pri 515 nm (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada

Za 100 mL 0,094 mM otopine 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) odvaži se 0,0037 g DPPH te se otopi u čistom metanolu. Otopina se čuva na $+4^{\circ}\text{C}$ u frižideru te se mora omotati aluminijskom folijom zbog izrazite nestabilnosti DPPH radikala. U epruvetu se otpipetira 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH i 100 μL razrijeđenog uzorka (1:10), zatim se vorteksira te se ostavi u mraku. Nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija uzorka pri 515 nm. U slijepu probu se umjesto uzorka dodaje 100 μL 70%-tnog metanola.

Izračun

Od apsorbancije slijepa probe oduzima se apsorbancija uzorka te se dobiva vrijednost ΔA , koje se uvrštava u jednadžbu baždarne krivulje te se dobiva koncentracija mmol Trolox-a . Jednadžba baždarne krivulje pripremljene za standarde Trolox-a glasi:

$$y = 0,603x - 0,006$$

[7]

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Jednadžba baždarne krivulje prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji Trolox-a (mmol L^{-1}). Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pripremljenih uzoraka DPPH metodom mjeri se u tri paralele, a rezultat se iskazuje kao srednja vrijednost s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Trolox po g uzorka}$. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrijeđenja originalnog uzorka.

3.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode

ABTS metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kation), koji se može formirati kemijskom ili enzimskom oksidacijom par sati prije analize. Otopina ABTS-a se oksidira s otopinom kalijevog perosulfata, a maksimum apsorbancije se postiže na 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodani antioksidans reagira s ABTS radikalom pri čemu dolazi do redukcije ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu i mjeri se smanjenjem apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999.).

Postupak rada

Prvo se pripremi otopina ABTS^+ radikala, tako što se pomiješa 88 μL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) i nadopuniti ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Tako pripremljena otopina se omota folijom te se ostavi stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi s 96%-tnim etanolom do konačne koncentracije ABTS^+ radikala od 1%, tako da apsorbancije iznosi $0,7 \pm 0,02$. U epruvetu se otpipetira 40 μL

uzorka, koji je razrijeđen sa 70%-tnim metanolom u omjeru 1:10, s 2 mL otopine ABTS⁺ radikala te se vorteksira. Nakon točno 6 minuta se mjeri apsorbancija pri 734 nm, pri čemu se prije uzoraka mora izmjeriti apsorbancije slijepe probe koja umjesto uzorka sadrži 40 µL vode.

Izračun

Od apsorbancije slijepe probe se oduzme apsorbancije uzorka kako bi se dobila vrijednost ΔA koje je potrebna za izračunavanje konačnog rezultata. Antioksidacijski kapacitet uzorka se određuje preko jednadžbe baždarne krivulje koje prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda Trolox-a (mmol L^{-1}).

Jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y=0,303x + 0,0006 \quad [8]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka ($\text{mmol Trolox-a L}^{-1}$)

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Mjerenje se provodi u 3 paralelne probe, rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost uz pripadajuće standardne devijacije u mmol Trolox po g uzorka. Ako se u analizi koristi razrijeđeni uzorak dobivene koncentracije se moraju pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

3.2.11. Senzorska analiza čokolada

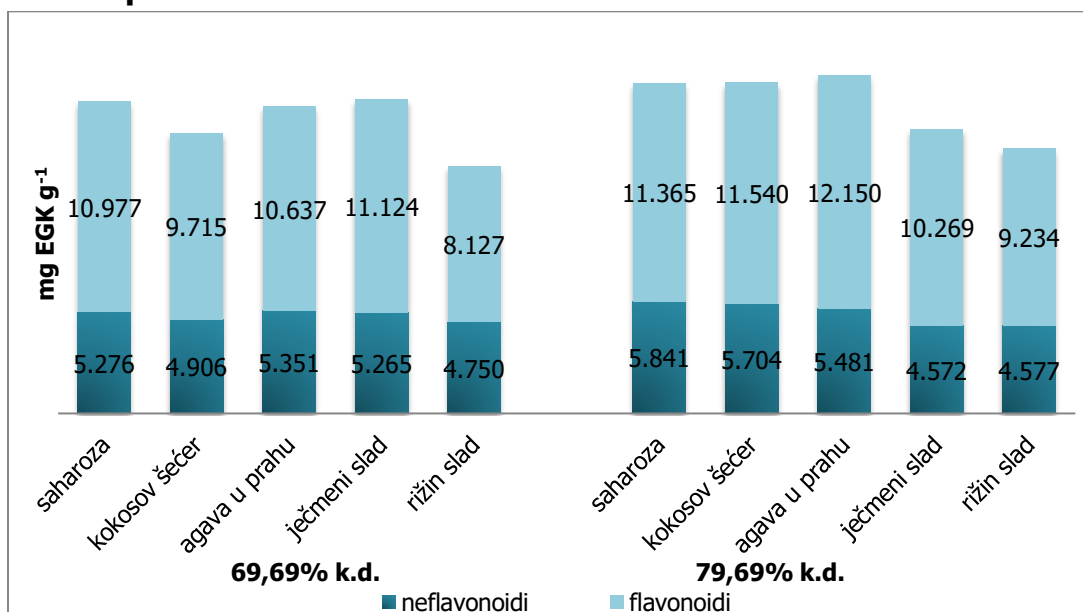
Senzorsko ocjenjivanje čokolada provedeno je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Senzorska analiza provedena je u jednom terminu uz pomoć panela od 5 osoba, od kojeg su 4 ženskog i 1 muškog roda, starosti između 20 i 50 godina. Šifrirani uzorci su servirani na tanjurima te su uspoređivani s kontrolnim uzorkom (čokolada 1). Također je za vrijeme analize poslužena voda za ispiranje usta.

Senzorska analiza provedena je pomoću kvantitativne deskriptivne analize, a ocjenjivala su se sljedeća senzorska svojstva: miris, naknadni okus, slatkoća, gorčina, trpkost, boja, sjaj, topljivost, struktura i općenita prihvatljivost. Koristila se 5-bodovna skala, gdje 5 označava maksimalni intenzitet, a 1 minimalni intenzitet.

Izračunata je srednja vrijednost ocjena koja je pomnožena s faktorom značajnosti. Faktor značajnosti za boju i sjaj iznosi $F=0,6$, a za strukturu i miris $F=0,8$, dok za topljivost, naknadni okus, slatkoću, trpkost, gorčinu i općenitu prihvatljivost, kao senzorski značajnija svojstva, iznosi $F=2$.

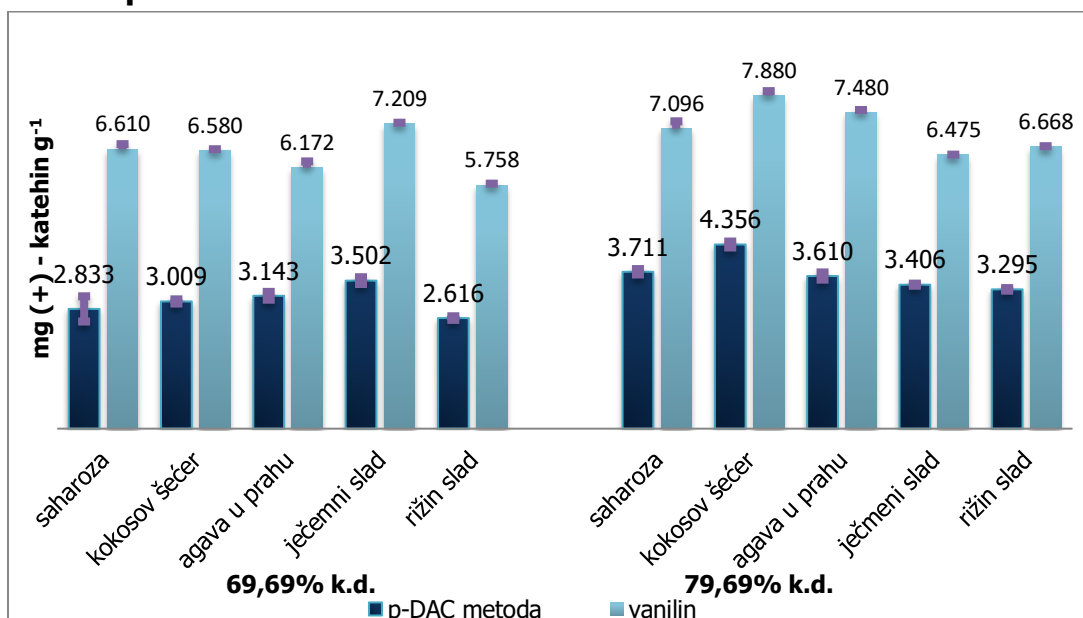
4. REZULTATI

4.1. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida



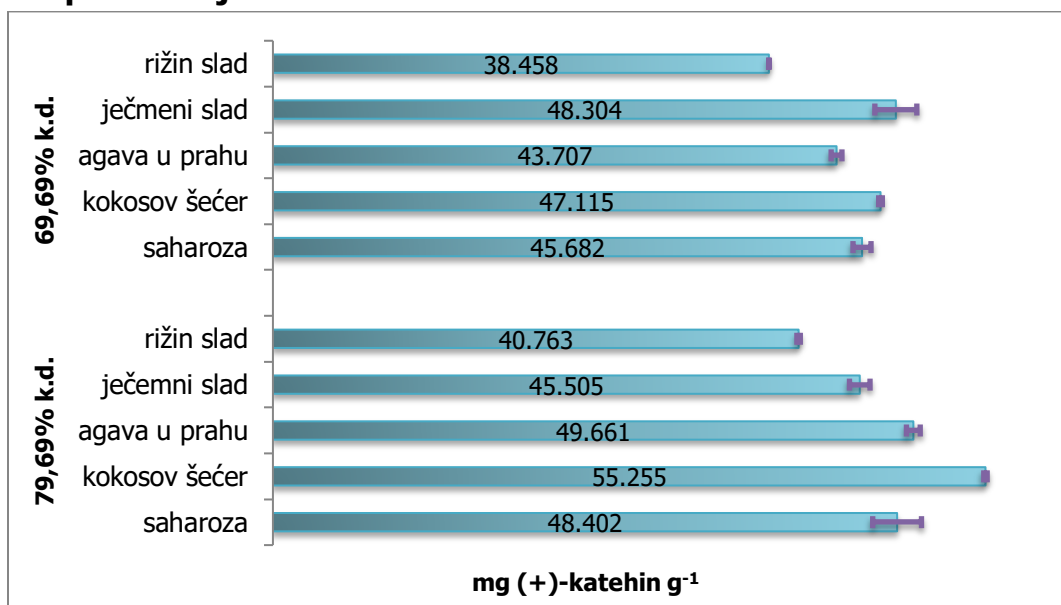
Slika 7. Udio ukupnih flavonoida i neflavonoida u čokoladama sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima

4.2. Udio ukupnih flavan-3-ola



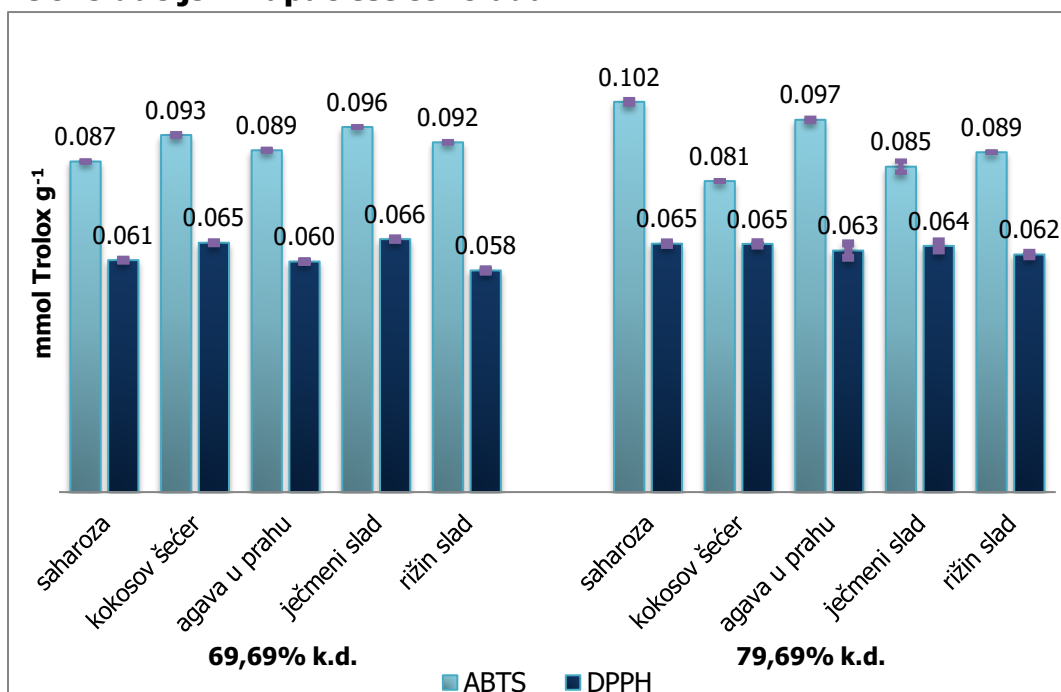
Slika 8. Udio ukupnih flavan-3-ola u čokoladama sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima

4.3. Udio proantocijanidina



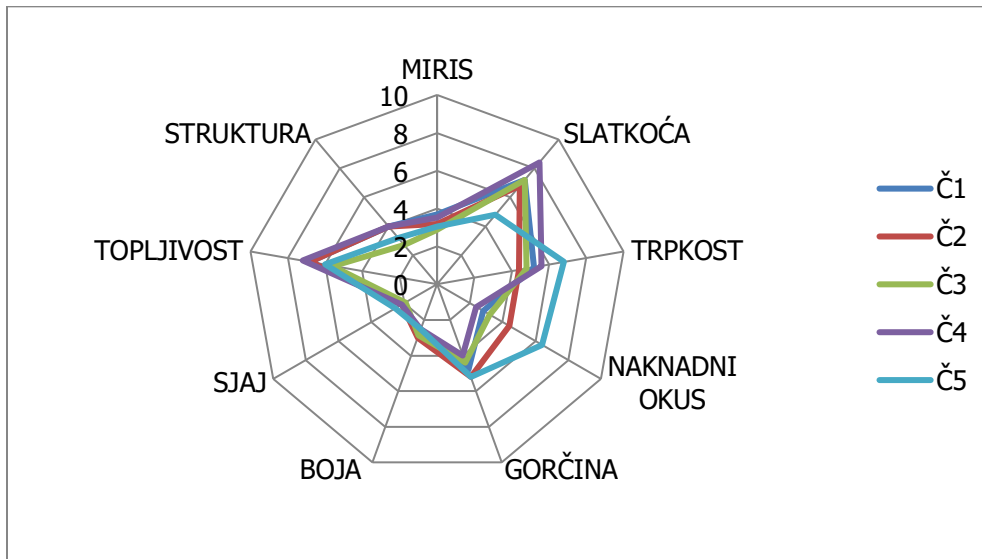
Slika 9. Udio proantocijanidina u čokoladama sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima

4.4. Antioksidacijski kapacitet čokolada

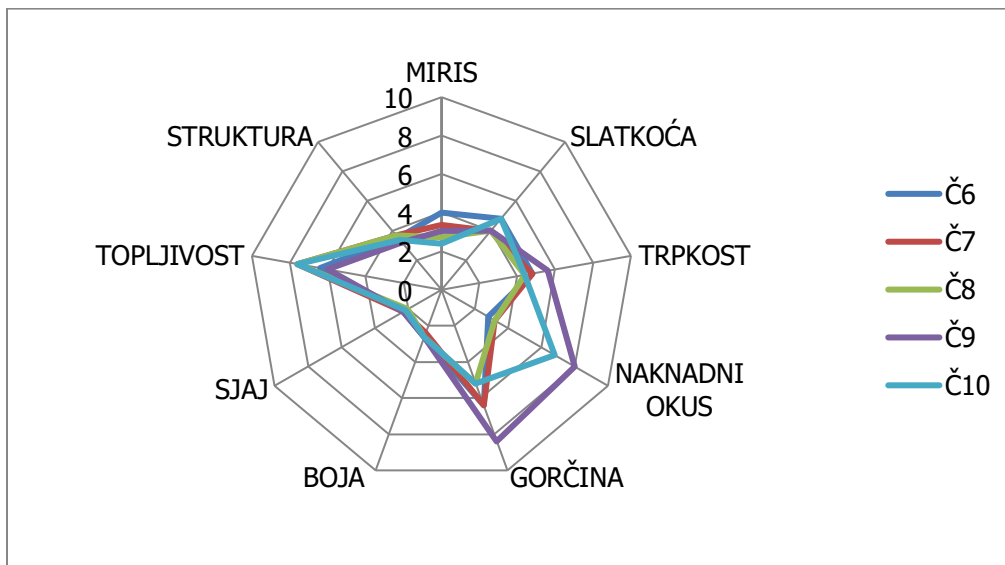


Slika 10. Antioksidacijski kapacitet čokolada sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima

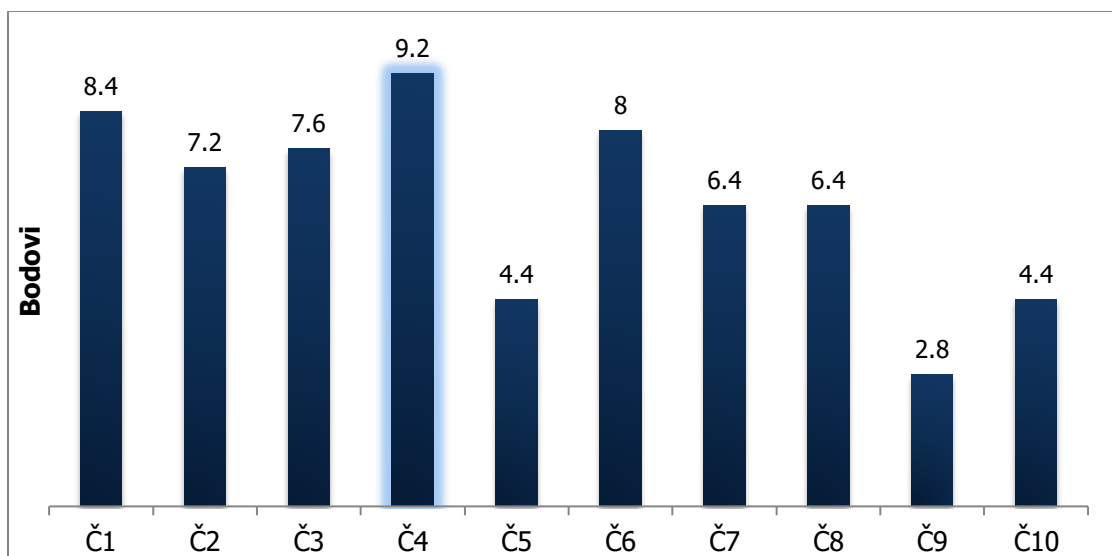
4.5. Rezultati senzorske analize



Slika 11. Rezultati senzorske analize čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima



Slika 12. Rezultati senzorske analize čokolada sa 79,69% kakaovih dijelova proizvedenih s različitim sladilima



Slika 13. Rezultati testa preferencije čokolada u ovisnosti o vrsti šećera i udjelu kakaovih dijelova

5. RASPRAVA

U ovom radu se ispitivao utjecaj dodatka prirodnih sladila na bioaktivni sastav (udio ukupnih polifenola, flavan-3-ola, proantocijanidina), antioksidacijski kapacitet i senzorska svojstva čokolada sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova u sastavu.

5.1. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida u čokoladama

Udio ukupnih polifenola određivan je metodom s Folin-Ciocalteu reagensom, a dobivene vrijednosti prikazane su na slici 7. U čokoladi sa 69,69% kakaovih dijelova s dodatkom saharoze određen je udio ukupnih polifenola od 16,253 mg EGK po g uzorka, što se slaže s rezultatima istraživanja Muller i suradnika (2009), gdje je udio ukupnih polifenola, za čokoladu sa 70% kakaovih dijelova iznosio 14,9 mg EGK g⁻¹. Iako je istraživanjima Belščak i suradnika (2009.) i Muller i suradnika (2006) određeno da čokolade koje sadrže više kakaovih dijelova imaju i veći udio polifenola, u čokoladi sa 69,69% kakaovih dijelova uz dodatak ječmenog slada određen je veći udio polifenola (16,389 mg EGK g⁻¹), nego što je u čokoladi sa 79,69% kakaovih dijelova uz

dodatak rižinog slada (13,811 mg EGK g⁻¹). Uzrok razlika između istraživanja može biti u tome što udio ukupnih polifenola ovisi o sorti korištenog kakaovog zrna, geografskom podrijetlu, sezoni berbe i uvjetima nakon berbe (Belščak i sur., 2009), a u ovom istraživanju i o vrsti korištenog sladila. U čokoladi sa 79,69 % kakaovih dijelova s agavinim sirupom određen je najveći udio ukupnih polifenola (17,631 mg EGK g⁻¹), dok je najmanji udio polifenola (12,877 mg EGK g⁻¹) određen u čokoladi sa 69,69% kakaovih dijelova uz dodatak rižinog slada.

5.2. Određivanje udjela flavan-3-ola u čokoladama

Udio flavan-3-ola u čokoladama određivao se pomoću *p*-DAC metode i metode s vanilinom, a budući da vanilin reagira s hidroksilnim skupinama na C-6 i C-8 položaju u flavan-3-olu dok *p*-DAC reagira samo s hidroksilnom skupinom na C-8 položaju, za očekivati je da će vrijednosti dobivene metodom s vanilinom biti veće od onih s *p*-DAC metodom. Dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 8.

Kod čokolada s većim udjelom kakaovih dijelova raspon udjela flavan-3-ola je od 6,475 do 7,880 mg katehin po g uzorka (metoda s vanilinom) i od 3,295 do 4,356 mg katehina po g uzorka (*p*-DAC metoda), a najveći udio flavan-3-ola među čokoladama sa 79,69% kakaovih dijelova, određen je u čokoladi s kokosovim šećerom i to primjenom obje metode. Manji udio flavan-3-ola određen je *p*-DAC metodom u čokoladama sa 69,69% kakaovih dijelova, s najnižom vrijednošću od 2,616 mg katehin g⁻¹ u čokoladi s rižinim sladom. Također, u toj čokoladi određeno je najmanje flavan-3-ola i metodom s vanilinom (5,758 katehin g⁻¹). U čokoladi sa 69,69% kakaovih dijelova s ječmenim sladom određen je nešto viši udio flavan-3-ola (3,502 mg katehin g⁻¹ *p*-DAC metodom i 7,209 mg katehina g⁻¹ metoda s vanilinom), u odnosu na druge čokolade sa 69,69% kakaovih dijelova. Rezultati se slažu s istraživanjem Belščak i suradnika (2009) u kojem se određivao bioaktivni sastav komercijalno dostupnih kakaovih proizvoda, među kojima su i čokolade sa 60%, 72% i 88% kakaovih dijelova.

5.3. Određivanje udjela proantocijanidina u čokoladama

Udio proantocijanidina (Slika 9.) u čokoladama sa 69,69% k.d. kretao se u rasponu od 38,458 do 45,682 mg katehin po g uzorka, a u onima sa 79,69% k.d. od 40,763 do 48,402 mg katehin po g uzorka. Najvišu vrijednost imala je čokolada sa 79,69 % kakaovih dijelova s kokosovim šećerom (55,255 mg katehin g⁻¹), dok su one s rižinim slalom imale najniže vrijednosti u obje skupine (38,458 mg katehin g⁻¹ za 69,69% k.d. i 40,763 mg katehin g⁻¹ za 79,69% k.d.). Između uzoraka sa 69,69% kakaovih dijelova i 79,69% kakaovih dijelova nema velikih razlika. Prema istraživanju Laličić-Petronijević i suradnika (2016) udio proantocijanidina raste s udjelom kakaovih dijelova (27%, 44% i 75%) u čokoladama, dok se prema istraživanju Belščak i suradnika (2009) udio proantocijanidina, u čokoladama sa 60%, 72% i 88% kakaovih dijelova, nije značajno razlikovao.

5.4. Antioksidacijski kapacitet čokolada

Antioksidacijski kapacitet čokolada određivao se pomoću ABTS i DPPH metoda. Objе metode temelje se na reakciji antioksidansa i ABTS ili DPPH radikala pri čemu dolazi do promjene boje, koja se mjeri spektrofotometrijski. Dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 10.

Vrijednosti dobivene DPPH metodom kreću se od 0,058 do 0,066 mmol Trolox po g uzorka te nema velike razlike između čokolada sa 79,69% kakaovih dijelova od onih sa 69,69% kakaovih dijelova. Najmanji antioksidacijski kapacitet određen je u čokoladi sa 69,69% kakaovih dijelova s rižinim slalom.

ABTS metoda pokazuje nešto veće vrijednosti u rangu od 0,081 do 0,102 mmol Trolox po g uzorka. Najveći antioksidacijski kapacitet (0,102 mmol Trolox g⁻¹) određen je u čokoladi sa 79,69% kakaovih dijelova sa saharozom, a najmanji (0,081 mmol Trolox g⁻¹) u čokoladi istog udjela kakaovih dijelova, ali s kokosovim šećerom kao sladilom. Isto kao i kod DPPH metode, nema velikih razlika u vrijednostima između čokolada sa 69,69% i 79,69% kakaovih dijelova. Belščak i suradnici (2009) proveli su istraživanje u kojemu su određivali antioksidacijski kapacitet čokolada sa 60%, 72% i 88% kakaovih dijelova, primjenom ABTS i DPPH metodama, ali su rezultate izražavali na drugačiji način. Tako za DPPH metodu vrijednosti redom iznose 11,47 mmol Trolox L⁻¹, 11,62 mmol Trolox L⁻¹ i 11,75 mmol Trolox L⁻¹; dok za ABTS metodu redom iznose

18,01 mmol Trolox L⁻¹, 17,73 mmol Trolox L⁻¹ i 20,40 mmol Trolox L⁻¹. Također, rezultati su u skladu s istraživanjem Muller i suradnika (2006), gdje se antioksidacijski kapacitet određivao ORAC metodom u različitim čokoladnim proizvodima, među kojima su bile mliječne i tamne čokolade. Rezultatima je dobiveno da proizvodi s većim udjelom kakaovih dijelova imaju veći antioksidacijski kapacitet, a kod tamnih čokolada nije bilo velikih razlika među dobivenim vrijednostima.

5.5. Senzorska analiza

U čokoladi ima oko 600 komponenata arome koje se stvaraju fermentacijom, sušenjem i prženjem kakaovog zrna te končiranjem. Do sada nije pronađena niti jedna komponenta koju sadrži samo čokolada, nego se većina tih komponenata nalazi i u drugim namirnicama, no, specifičan okus i aroma čokolade prolaze iz njihovih interakcija (Aprotosoai i sur., 2015).

Najnižu ocjenu za boju dobila je čokolada sa 79,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom (2,4) dok su ostale čokolade sa 79,69% kakaovih dijelova ocijenjene s 2,64. No, kod čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova čokolada s kokosovim šećerom imala je najvišu ocjenu za boju (2,88). Rezultati Saputra i suradnika (2016) pokazali su da je tamna čokolada proizvedena s kokosovim šećerom svjetlije boje te da ima karakterističnu aromu u usporedbi s čokoladom koja sadrži saharozu. U grupi čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova, čokoladi s kokosovim šećerom naknadni okus je ocijenjen s 4,4, što je više od čokolada sa saharozom (2,8), agavinim sirupom (3,2) i ječmenim sladom (2,4), ali niže od čokolade sa 69,69% kakaovih dijelova s rižinim sladom (6,4). Unatoč višoj ocjeni za naknadni okus, čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova s kokosovim šećerom, imala je visoku ocjenu opće prihvatljivosti u obje grupe. Čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova s ječmenim sladom ima najvišu ocjenu (9,2) za opću prihvatljivost i najvišu ocjenu za slatkoću, dok je među čokoladama sa 79,69% kakaovih dijelova dobila najvišu ocjenu za naknadni okus (8), gorčinu (8,4) i trpkost (5,6), čime je i najlošije prihvaćena (2,8). Najjači naknadni okus imaju čokolade s rižinim sladom i vrlo niske ocjene opće prihvatljivosti (4,4 u obje grupe čokolada). Čokolade s višim udjelom kakaovih dijelova imaju izraženiju gorčinu, što je i očekivano s obzirom na udio kakaovih dijelova te lošiju ocjenu testa preferencije. Rezultati testa preferencije prikazani su na slici 13. Najbolju topljivost imaju čokolade sa 79,69% kakaovih dijelova s dodatkom kokosovog šećera, agavinog sirupa i rižinog slada (7,6). Najnižu ocjenu za topljivost

imala je čokolada sa 69,69% kakaovih dijelova uz dodatak agavinog sirupa (5,6), što je u skladu s istraživanjem Vahedi i suradnika (2016) gdje je čokolada proizvedena s agavinim sirupom imala lošiju topljivost u ustima od čokolade sa saharozom.

6. ZAKLJUČCI

1. Udio polifenola i antioksidacijski kapacitet čokolada povećava se povećanjem udjela kakaovih dijelova u njihovom sastavu.
2. Zamjena saharoze drugim sladilima nema značajan utjecaj na polifenoli sastav čokolada i njihov antioksidacijski kapacitet.
3. Čokolade s rižinim sladom najslabije su senzorski prihvaćene te imaju najniže vrijednosti ukupnih flavonoida i neflavonoida, flavan-3-ola, proantocijanidina, kao i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene DPPH metodom.
4. Čokolade sa 69,69% kakaovih dijelova senzorski su bolje prihvaćene od čokolada sa 79,79% kakaovih dijelova.
5. Čokolade sa zamjenskim sladilima pridonose smanjenju unosa saharoze.

7. LITERATURA

Alibabić, V., Mujić, I. (2016) *Pravilna prehrana i zdravlje*; 1. izd., Veleučilište u Rijeci, str. 29., 105-143.

Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., Al-Dujaili, E. (2009) 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. *British Journal of Nutrition* **103**: 842.

Anonymous, Cereal and Malt Extract <<https://cerealandmalt.com/the-processing-and-uses-of-barley-malt-extract/>> Pristupljeno 27.03.2020.

Anonymous, ManilaTrade <<https://www.manilatrade.com/coconut-sugar-production-organic-through-and-through/>> Pristupljeno 18.06.2020.

Aprotosoai, A. C., Luca, S. V., Miron, A. (2015) Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products- An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**: 73–91.

Asgary, S., Rastqar, A., Keshvari, M. (2018) Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* **37**: 429–455.

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 Science & Nutrition* **8**: 1777-1787.

BAFPS (2010) PHILIPPINE NATIONAL STANDARDS FOR COCONUT SAP SUGAR. Bureau of Agriculture & Fisheries Product Standards.

Barclay A, Sandall P, Shvide-Slavin C. (2014) *The Ultimate Guide to Sugars & Sweeteners, The experiment*, New York, str. 31.

Beckett T. (2009) *Industrial chocolate manufacture and use*, 4. izd, Blackwell Publishing, Oxford, UK. str. 623-634.

Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., Karlović, D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* **42**: 707–716.

Chen, Y., Huang, J., Hu, J., Yan, R., Ma, X. (2019) Comparative study on the phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of phenolics extracted from barley malts processed under different roasting temperatures. *Food & Function* **10**: 2176-2185.

Chigozie E. Ofoedu, Chijioke M. Osuji, Moses Ojukwu (2018) Sugar Profile of Syrups from Malted and Unmalted Rice of Different Varieties. *Journal of Food Research* **8**:1.

Crichton, G. E., Elias, M. F., Alkerwi, A. (2016) Chocolate intake is associated with better cognitive function: The Maine-Syracuse Longitudinal Study. *Appetite* **100**: 126–132.

Edwards, C. H., Rossi, M., Corpe, C. P., Butterworth, P. J., Ellis, P. R. (2016) The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science & Technology* **56**: 158–166.

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., Tomás-Barberán, F. A. (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function* **10**: 514-528.

González-Montemayor, Á.-M., Flores-Gallegos, A. C., Serrato-Villegas, L. E., López-Pérez, M. G., Montañez-Sáenz, J. C., Rodríguez-Herrera, R. (2019) Honey and Syrups: Healthy and Natural Sweeteners with Functional Properties. *Natural Beverages* **13**: 143–177.

Grabek-Lejko, D., Tomczyk-Ulanowska, K. (2013) Phenolic content, antioxidant and antibacterial activity of selected natural sweeteners available on the Polish market. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **48**: 1089–1096.

HEXX chocolate, <<https://www.hexxchocolate.com/>> Pristupljeno 20.06.2020.

Holtcamp, W. (2012) Suspect Sweetener: Arsenic Detected in Organic Brown Rice Syrup. *Environmental Health Perspectives* **120**: A204.

Kandit „NO GUILT“ <<https://www.kandit.hr/no-guilt>>. Pristupljeno 25.03.2020.

Kraš, <<https://www.kras.hr/hr/proizvodi#asortiman-bez-secera>> Pristupljeno 20.06.2020.

Laličić-Petronijević, J., Komes, D., Gorjanović, S., Belščak-Cvitanović, A., Ferenc, P., Ostojić, S., Popov-Raljić, J., Sužnjević, D., Pezo, L. (2016) Effect of Chocolate Storage on Total Phenolics, Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity. *Food Technology and Biotechnology* **54**: 13-20.

Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C., & Tornero, A. (2005) Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International* **11**: 159–176.

Lee, S.-Y., Jung, G., Jang, M., Suh, M.-W., Lee, J., Oh, S.-H., Park, M. (2019) Association of Chocolate Consumption with Hearing Loss and Tinnitus in Middle-Aged People Based on the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2012–2013. *Nutrients* **11**: 746.

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

Maskarinec, G., Jacobs, S., Shvetsov, Y., Boushey, C. J., Setiawan, V. W., Kolonel, L. N., Haiman, C. A., Le Marchand, L. (2018) Intake of cocoa products and risk of type-2 diabetes: the multiethnic cohort. *European Journal of Clinical Nutrition* **73**: 671-678.

Mayes, P. A. (1993) Intermediary metabolism of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* **58**: 754S–765S.

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

Mellado-Mojica, E., Seeram, N. P., López, M. G. (2016) Comparative analysis of maple syrups and natural sweeteners: Carbohydrates composition and classification (differentiation) by HPAEC-PAD and FTIR spectroscopy-chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis* **52**: 1–8.

Miller, K. B., Hurst, W. J., Flannigan, N., Ou, B., Lee, C. Y., Smith, N., Stuart, D. A. (2009) Survey of Commercially Available Chocolate- and Cocoa-Containing Products in the United States. 2. Comparison of Flavan-3-ol Content with Nonfat Cocoa Solids, Total Polyphenols, and Percent Cacao. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9169–9180.

Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A., Ou, B., Hurst, W. J. (2006) Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyandin Contents of Selected

Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4062–4068.

Mitchell, H. (2006) Sweeteners and sugar alternatives in food technology, Blackwell Publishing, Oxford, UK. str. 77-78.

Moreira, A., Diógenes, M. J., de Mendonça, A., Lunet, N., Barros, H. (2016) Chocolate Consumption is Associated with a Lower Risk of Cognitive Decline. *Journal of Alzheimer's Disease* **53**: 85–93.

Naturata <<https://www.naturata.de/en/products/schokolade/>>. Pristupljeno 25.03.2020.

Pase, M. P., Himali, J. J., Beiser, A. S., Aparicio, H. J., Satizabal, C. L., Vasan, R. S., Seshadri, S., Jacques, P. F. (2017) Sugar- and Artificially Sweetened Beverages and the Risks of Incident Stroke and Dementia. *Stroke* **48**: 1139–1146.

Phillips, K. M., Carlsen, M. H., Blomhoff, R. (2009) Total Antioxidant Content of Alternatives to Refined Sugar. *Journal of the American Dietetic Association* **109**: 64–71.

Qi, X., Tester, R. F. (2019) Fructose, galactose and glucose – In health and disease. *Clinical Nutrition ESPEN* **33**: 18-28.

RED, <<https://www.chocolette.com/>> Pristupljeno 20.06.2020.

Reis, D. J., Ilardi, S. S., Namekata, M. S., Wing, E. K., Fowler, C. H. (2019) The Depressogenic Potential of Added Dietary Sugars. *Medical Hypotheses* **134**: 109421.

Reuters <<https://www.reuters.com/article/us-mexico-tequila/soaring-agave-prices-give-mexican-tequila-makers-a-headache-idUSKBN1FJ2Y9>>. Pristupljeno 18.06.2020.

Saputro, A. D., Van de Walle, D., Aidoo, R. P., Mensah, M. A., Delbaere, C., De Clercq, N., Durme, J. V., Dewettinck, K. (2016) Quality attributes of dark chocolates formulated with palm sap-based sugar as nutritious and natural alternative sweetener. *European Food Research and Technology* **243**: 177–191.

Shaw, J.-F., Sheu, J.-R. (1992) Production of High-maltose Syrup and High-protein Flour from Rice by an Enzymatic Method. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**: 1071–1073.

Stella Berrain <<https://www.swisschocolate.ch/en/welcome-to-the-e-shop/products/chocolates/vegan-chocolate.html>>. Pristupljeno 25.03.2020.

Tsang, C., Hodgson, L., Bussu, A., Farhat, G., Al-Dujaili, E. (2019) Effect of Polyphenol-Rich Dark Chocolate on Salivary Cortisol and Mood in Adults. *Antioxidants* **8**: 149.

UTZ Certified, <<https://utz.org/what-we-offer/certification/products-we-certify/cocoa/>>Pristupljeno 23.07.2020.

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. *Scholars Research Library* **8**: 194-201.

Van der Poel, P. W., Schiwartz, H. (1998) Sugar Technology, Beet and Cane Sugar Manufacture, Verlag, Dr. Albert Bartens KG, Berlin, Germany. str. 49., 53-56.

WHO- World Health Organization, <<https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/noncommunicable-diseases>> Pristupljeno 24. ožujka 2020.

Wrage, J., Burmester, S., Kuballa, J., Rohn, S. (2019) Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. *LWT - Food Science and Technology* **112**: 108227.

Zazubean, <<https://www.zazubean.com/coconut-sugar-chocolate>> Pristupljeno 20.06.2020.

Izjava o izvornosti

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

Petra Poldan

Petra Poldan