

# Fizikalna, kemijska i senzorska svojstva novorazvijenog instant kakao napitka na bazi meda

---

Fureš, Marinela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*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:159:396147>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2023.

Marinela Fureš

**FIZIKALNA, KEMIJSKA I  
SENZORSKA SVOJSTVA  
NOVORAZVIJENOG INSTANT  
KAKAO NAPITKA NA BAZI  
MEDA**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Benković.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

FIZIKALNA, KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA NOVORAZVIJENOG INSTANT KAKAO  
NAPITKA NA BAZI MEDA

*Marinela Fureš*, univ. bacc. nutr.  
0058213868

**Sažetak:** Napitci na bazi kakaa popularni su među svim generacijama te se na tržištu mogu naći različiti oblici funkcionalnih napitaka na bazi kakaovca. U većini ovih proizvoda nalazi se visok udio šećera koji se dodaje kako bi se smanjila gorčina i povećala topljivost. Smatra se da polifenoli čokolade pridonose kardiometaboličkim zdravstvenim dobrobitima. Cilj ovog rada bio je razviti instant kakao napitak na bazi meda i zobenog brašna kao nutritivno bogatije alternative postojećim napitcima koji sadrže škrob i saharozu. Uzorcima su analizirana fizikalna, kemijska i senzorska svojstva. Podaci su statistički obrađeni, napravljen je dizajn eksperimenta i optimiranje sastava smjese. Utvrđeno je da za dobivanje kakao napitka optimalnog sastava i prihvatljivosti za potrošače, sastav smjese sadrži 45 % meda, 55 % zobenog brašna i 5,625 g kakao praha na 100 g gotovog praškastog proizvoda.

**Ključne riječi:** *funkcionalni proizvodi, zob, polifenoli, instant kakao napitci, med*

**Rad sadrži:** 68 stranica, 20 slika, 5 tablica, 74 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Maja Benković

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Tamara Jurina (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)
4. prof. dr. sc. Draženka Komes (zamjenski član)

**Datum obrane:** 25. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### PHYSICAL, CHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF THE NEWLY DEVELOPED INSTANT COCOA BEVERAGE BASED ON HONEY

*Marinela Fureš, univ. bacc. nutr.*  
0058213868

**Abstract:** Cocoa-based drinks are popular among all generations and various forms of cocoa-based functional drinks can be found on the market. Most of these products contain a high proportion of sugar, which is added to reduce bitterness and increase solubility. Cocoa polyphenols are thought to contribute to cardiometabolic health benefits. The aim of this work was to develop an instant drink based on honey and oat flour as a nutritionally richer alternative to existing drinks containing starch and sucrose. The physical, chemical and sensory properties of the samples were analyzed. The data were statistically processed, the design of the experiment was made and the composition of the mixture was optimized. It was determined that in order to obtain a cocoa drink with an optimal composition and acceptability for consumers, the composition of the mixture contains 45 % honey, 55 % oat flour and 5.625 g of cocoa powder per 100 g of the finished powder product.

**Keywords:** *functional products, oat, polyphenols, instant cocoa beverages, honey*

**Thesis contains:** 68 pages, 20 figures, 5 tables, 74 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Maja Benković, PhD, Associate professor

**Reviewers:**

1. Tamara Jurina, PhD, Assistant professor (president)
2. Maja Benković, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (member)
4. Draženka Komes, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 25<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>                                    | <b>2</b>  |
| 2.1. PROIZVODNJA KAKAO PRAHA.....                               | 2         |
| 2.1.1. <i>Theobroma cacao</i> L. ....                           | 2         |
| 2.1.2. Povijest upotrebe.....                                   | 2         |
| 2.1.3. Prerada kakaovca .....                                   | 3         |
| 2.1.4. Fermentacija i sušenje.....                              | 3         |
| 2.1.5. Alkalizacija .....                                       | 4         |
| 2.1.6. Prženje.....   | 5         |
| 2.2. PROIZVODNJA FUNKCIONALNIH KAKAO NAPITAKA.....              | 5         |
| 2.3. PROIZVODNJA INSTANT KAKAO NAPITAKA.....                    | 6         |
| 2.4. ZDRAVSTVENE DOBROBITI KAKAO PRAHA .....                    | 8         |
| 2.4.1. Utjecaj kaka na kardiovaskularni sustav .....            | 9         |
| 2.4.2. Učinci kaka protiv pretilosti.....                       | 9         |
| 2.4.3. Kakao i mikrobiota.....                                  | 10        |
| 2.5. ZDRAVSTVENE DOBROBITI ZOBENOG BRAŠNA I MEDA.....           | 10        |
| 2.5.1. Zob .....  | 10        |
| 2.5.2. Med .....  | 11        |
| <b>3. EKPERIMENTALNI DIO .....</b>                              | <b>13</b> |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 13        |
| 3.1.1. Reagensi i otapala .....                                 | 13        |
| 3.1.2. Aparatura i pribor.....                                  | 14        |
| 3.2. METODE.....  | 15        |
| 3.2.1. Priprema kakao smjese za sušenje .....                   | 15        |
| 3.2.2. Analiza smjese prije sušenja .....                       | 16        |
| 3.2.3. Fizikalna svojstva prahova.....                          | 17        |
| 3.2.4. Kemijska svojstva ekstrakata prahova .....               | 20        |
| 3.2.5. Probavljivost (bioraspoloživost) .....                   | 25        |
| 3.2.6. Senzorska analiza kakao prahova i instant napitaka ..... | 26        |
| 3.2.7. Statistička obrada podataka i optimiranje sastava.....   | 26        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                            | <b>27</b> |
| 4.1. ANALIZA SMJESA PRIJE SUŠENJA .....                         | 28        |
| 4.1.1. Sadržaj vlage pjene prije sušenja .....                  | 28        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1.2. Viskoznost pjene prije sušenja.....                                     | 29        |
| 4.1.3. Ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet pjena prije sušenja..... | 30        |
| 4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA PRAHOVA.....   | 31        |
| 4.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica.....                            | 31        |
| 4.2.2. Nasipna gustoća i svojstva tečenja.....                                 | 32        |
| 4.2.3. Gravimetrijska analiza sadržaja vlage u uzorku .....                    | 34        |
| 4.2.4. Analiza aktiviteta vode.....  | 36        |
| 4.2.5. Analiza rekonstitucijskih svojstava.....                                | 37        |
| 4.2.6. Boja kakao prahova.....   | 39        |
| 4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA PRAHOVA .....                                | 41        |
| 4.3.1. Vodljivost i ukupne otopljene tvari ekstrakata .....                    | 41        |
| 4.3.2. pH vrijednost ekstrakata .....  | 43        |
| 4.3.3. Određivanje ukupnih polifenola.....                                     | 44        |
| 4.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....              | 45        |
| 4.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....              | 47        |
| 4.3.6. Određivanje šećera po Brixu.....  | 49        |
| 4.3.7. Probavljivost (bioraspoloživost) .....                                  | 50        |
| 4.4. SENZORSKA SVOJSTVA KAKAO NAPITAKA.....                                    | 54        |
| 4.5. OPTIMIRANJE SASTAVA SMJESE I VALIDACIJSKI POKUSI.....                     | 56        |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>  | <b>61</b> |



# 1. UVOD

U posljednje vrijeme, sve više ljudi počelo je obraćati pažnju na kvalitetu svoje prehrane i na količinu unesenog šećera putem raznih proizvoda. Sve veći naglasak stavlja se na proizvode koji ne sadrže dodani šećer, jer je veća svjesnost o tome da, između ostalog, prevelika količina dodanog šećera u prehrani može biti dodatni okidač raznim bolestima i stanjima. Kako se potrošnja čokolade i kakaovih proizvoda, zajedno s interesom za njih kao funkcionalnom hranom, u cijelom svijetu povećava, postoji potreba za sustavnom i kritičkom procjenom dostupnih kliničkih dokaza o njihovim učincima na zdravlje (Tan i sur., 2021).

Napitci na bazi kakaa vrlo su popularni među svim generacijama, a posebno među djecom. Danas se na tržištu mogu naći različiti oblici napitaka na bazi kakaovca, kao topli ili hladni napitak, s mlijekom ili vodom, gotovi ili instant napitci. U većini ovih proizvoda nalazi se visok udio šećera koji se dodaje kako bi se smanjila gorčina i povećala topljivost, no u posljednje vrijeme visok udio šećera povezan je i sa zdravstvenim problemima (Barišić i sur., 2023).

Kakao proizvodi, osim zbog svog slatkog, primamljivog okusa, konzumiraju se i zbog brojnih povoljnih učinaka na organizam čovjeka. Brojni zdravstveni učinci procijenjeni su na nekoliko sustava, uključujući kožne, kardiovaskularne, antropometrijske, kognitivne i kvalitetu života, a konzumacija čokolade ili kakaovca značajno je poboljšala profile lipida (Tan i sur., 2021). Kakao prah je proizvod dobiven od očišćenih, oljuštenih i prženih kakaovih zrna, koji sadrži najmanje 20 % kakaovog maslaca, računato na suhu tvar i najviše 9 % vode, a čokoladni napitak, zaslađeni kakao i zaslađeni kakao prah su proizvodi koji se sastoje od mješavine kakao praha i šećera, a sadrže najmanje 25 % kakaovog praha (Pravilnik, 2005).

U ovom radu cilj je bio razviti kakao prah za napitak vruću čokoladu, procesom sušenja u tankom sloju, bez dodanog šećera, zaslađen medom, uz zobeno brašno kao zgušnjivač, kao nutritivno poboljšanu alternativu proizvodima dostupnima na tržištu. Ekperiment se provodio prema unaprijed definiranom punom faktorskom (engl. „full factorial“) dizajnu s 2 parametra na 3 razine: a) omjer med/zob i b) udio kakao praha. Dobiveno je 9 uzoraka kojima su se određivala fizikalna, kemijska i senzorska svojstva. Nakon toga, provedeno je optimiranje sastava smjese, validacija dobivenog modela te aromatiziranje validacijskog uzorka kako bi se, uz validacijski uzorak, dobile još dvije funkcionalne smjese. Tim su se uzorcima također određivala fizikalna, kemijska i senzorska svojstva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA KAKAO PRAHA

#### 2.1.1. *Theobroma cacao* L.

*Theobroma cacao* L. (kakaovac) biljka je koja obično počinje imati bobice nakon 3 godine, a prinos doseže svoj maksimum nakon 8-9 godina. Kakao je bogat izvor vlakana (26-40 %), lipida (10-24 %), proteina (15-20 %), ugljikohidrata (15 %) i mikronutrijenata (<2 %) uključujući minerale (fosfor, kalcij, kalij, natrij, magnezij, cink, bakar) i vitamine (A, B, E) (Kim i sur., 2014). Zrele mahune mogu se naći na stablima kakaovca tijekom cijele godine, ali neke zemlje imaju dvije sezone visoke proizvodnje godišnje. Promjena uvjeta okoliša može utjecati na žetvu, produktivnost i prinos usjeva (Beg i sur., 2017). Različite podvrste mogu se klasificirati unutar četiri varijeteta: Criollo, Forastero, Trinitario i Nacional (Counet i sur., 2004). Varijetet Criollo ima visoku razinu procijanidina, prekursora okusa, reducirajućih šećera i aminokiselina koje mogu rezultirati vrlo visokom razinom pirazina. U usporedbi s Criollom, proizvedena čokolada s varijetetom Forastero i Trinitario pokazala je niže razine procijanidina i sličnu količinu pirazina. Za razliku od ostalih, poznato je da sorta Nacional ima vrlo nisku koncentraciju reducirajućih šećera nakon fermentacije i također niske razine pirazina (Counet i sur., 2004).

#### 2.1.2. Povijest upotrebe

Arheološki dokazi pokazuju da su trgovci Maja pili kakao još 400. godine prije Krista u Kostarici. Veliki naglasak na svetost kakaovca stavila je astečka kultura, dominantna u Srednjoj Americi od 14. stoljeća do osvajanja. Španjolci su bili prvi Europljani koji su pili kakao nakon što su osvojili astečko carstvo u Meksiku u 16. stoljeću. Španjolci su od njih naučili tehniku pravljenja „xocoatla“ (čokoladnog napitka). Riječ čokolada i kakao navodno potječu od riječi „xocoatl“ odnosno „cacahuatl“ od strane Španjolaca (Beg i sur., 2017). Nizozemci su prvi počeli trgovati zrnom kakaovca i dominirali svjetskom trgovinom kakaovcem sve do 18. stoljeća. Afrika, Azija i Latinska Amerika primarna su područja uzgoja kakaovca. Obala Bjelokosti u Africi najveća je zemlja po količini proizvodnje kakaa koja čini 33 % globalne ponude, a Gana je druga najveća zemlja po proizvodnji kakaa nakon Obale Bjelokosti.

### 2.1.3. Prerada kakaovca

Zrna kakaovca, sjemenke stabla kakaovca *Theobroma cacao* L., široko se konzumiraju u cijelom svijetu. Obrađuju se kako bi se dobio čokoladni liker, kakao prah i kakao maslac, koji su glavni sastojci čokolade i širokog spektra proizvoda poput kakao napitaka, sladoleda i pekarskih proizvoda te daje karakterističan i osebujan okus proizvodima. Međutim, prije nego što se zrna kakaovca mogu trgovati i preraditi u konačne industrijske proizvode, moraju proći preradu nakon žetve na farmama i plantažama koja uključuje korake nakon otvaranja mahune i uklanjanja zrna iz mahune, fermentacije zrna i sušenje. Berba se obavlja ručno sečivom ili dugim nožem kako bi se mahuna izvadila sa stabla. Jedna mahuna sastoji se od 20-50 zrna ovisno o sorti kakaovca (Beg i sur., 2017). Princip prerade kakaovca isti je zadnjih 150 godina. Prolazi kroz niz opreme da bi se pretvorio u proizvod, putem čišćenja, skidanja ljuske, prženja, alkalizacije i konačno mljevenja u tekućinu.

### 2.1.4. Fermentacija i sušenje

Fermentacija predstavlja ključni korak za razvoj atributa kvalitete okusa komercijalnih zrna kakaovca. Tijekom fermentacije zrna kakaovca, dolazi do niza spontanijih enzimskih reakcija. Fermentacija i sušenje dva su vrlo važna koraka uključena u proizvodnju zrna kakaovca. Količine i sastav aminokiselina mijenjaju se tijekom procesa fermentacije, kao i reducirajućih šećera poput glukoze i fruktoze, polifenola i pH profila (Giacometti i sur., 2015). Prisutnost kvasaca, bakterija mliječne kiseline i bakterija octene kiseline tijekom procesa fermentacije pozitivno utječe na koncentraciju polifenola i razvoj prekursora okusa, dok aerobne spore i plijesni imaju negativan učinak. Fermentirane sjemenke se prže, drobe i melju kako bi se dobila praškasta masa iz koje se izdvaja mast (Beg i sur., 2017). Za fermentaciju zrna kakaovca koriste se različite metode fermentacije ovisno o poljoprivrednicima, područjima i zemljama. Platforme, gomile, košare i kutije su najviše korištene metode. Metoda platforme ima prilično nisku stopu fermentacije, primjerenu za Criollo varijetet koji zahtijeva kratku fermentaciju, ali je neprikladna za Forastero koji zahtijeva dužu fermentaciju (Giacometti i sur., 2015). Fermentacija u kutijama pokazuje relativno nisku koncentraciju šećera, etanola i octene kiseline, kao i visok pH. S obzirom na heterogenost u veličini zrna kakaovca, kao i konstrukcijskog materijala kutija, ova metoda fermentacije značajno utječe na pH vrijednost, sadržaj tanina i šećera, te na prisutnost ljubičastih zrna kaka (Wallace i Giusti, 2011).

Neposredno nakon fermentacije, zrna kakaovca mogu se sušiti putem sušenja na suncu na otvorenom ili u pećnici s vrućim zrakom kako bi se spriječilo kvarenje uzrokovano bakterijama. Metoda kutije ili košare koristi se u Aziji i Latinskoj Americi, dok se metoda gomile primjenjuje u Africi (Beg i sur., 2017). Sušenje zrna kakaovca završni je proces uzgoja, koji koristi zagrijavanje i smanjuje sadržaj vlage u zrnu na manje od 7,5 % (Zahouli i sur., 2010). Provedena su mnoga istraživanja kako bi se pronašle optimalne metode sušenja, stoga su proučavani uvjeti sušenja, temperatura i trajanje sušenja, brzina sušenja i stupanj. Sušenje se nastavlja tijekom procesa oksidacije koji slijedi nakon procesa fermentacije i stoga igra važnu ulogu u sastavu polifenola. Neadekvatni postupci tijekom procesa fermentacije i sušenja mogu značajno smanjiti sadržaj polifenola i doprinijeti razvoju nepoželjnih i neugodnih okusa. Osušena zrna pakiraju se u vreće za skladištenje u skladištima i izvoze u različite zemlje. Nakon što zrna stignu na odredište, bit će očišćena i temeljito pregledana za daljnju obradu.

#### 2.1.5. Alkalizacija

"Nizozemski proces", postupak obrade kakaovca alkalijama, bio je proces koji je razvio van Houten. Ovaj proces alkalizacije izvorno je napravljen kako bi se poboljšala topljivost. Zrna kakaovca, kakao liker i kakao prah mogu se modificirati tretmanom s alkalijama, također poznatim kao alkalizacija. Iako se izvorno provodila kako se prah ne bi nakupljao ili potonuo na dno kada se dodavao pićima na bazi mlijeka ili vode, proces alkalizacije danas se uglavnom primjenjuje za modificiranje okusa i boje kakao praha (Andres-Lacueva i sur., 2008). Utvrđeno je da alkalizacija uzrokuje progresivno smanjenje polifenola kao i njihove antioksidacijske aktivnosti (Miller i sur., 2008). Općenito, promjene koje nastaju kao posljedica tretmana alkalizacijom mogu se pripisati oksidaciji fenolnih spojeva pod bazičnim pH uvjetima, što dovodi do smeđih pigmenata koji su polimerizirani u različitim stupnjevima. Konkretno, sekundarne reakcije koje uključuju o-kinone, prethodno nastale tijekom faze fermentacije pomoću polifenol oksidaze, vjerojatno su uključene u daljnje reakcije odgovorne za posmeđivanje koje se razvija tijekom alkalizacije (Miller i sur., 2008).

### 2.1.6. Prženje

Dvije najčešće korištene pržionice su: kontaktna pržionica (u kojoj se šarže kakaovih zrna zagrijavaju u velikom rotirajućem bubnju) i kontinuirane zračne pržionice (gdje se zrna kakaovca prže izravnim kontaktom s vrućim zrakom) (Beg i sur., 2017). S tehnološkog stajališta, funkcija prženja uključuje: sušenje pera, uklanjanje nepoželjnih spojeva okusa i razvoj konačne arome i boje te popuštanje ljuske. Temperatura prženja je od 95 do 145 °C. Temperaturni uvjeti ovise o vrsti obrađenog pera, opremi i procesu koji se koristi i vrsti krajnjeg proizvoda. Izloženost visokoj temperaturi smanjuje broj mikroorganizama kako bi se produljio rok trajanja proizvoda (Beg i sur., 2017). Neenzimsko posmeđivanje, poznato kao Maillardova reakcija, uključeno je u brojne reakcije uključujući stvaranje smeđih pigmenta i sintezu pirazina. Koncentracija pirazina brzo raste tijekom procesa prženja dok ne postigne maksimalnu vrijednost, nakon čega se ove konstantne vrijednosti održavaju. Prženje je ključan korak u proizvodnji čokoladnog likera ili kakao praha jer pomaže u uklanjanju nepoželjnih hlapivih spojeva, daje željenu aromu i okus i čini kakao zrnca lomljivijima (Giacometti i sur., 2015). Nakon prženja, zrna se melju i usitnjavaju.

## 2.2. PROIZVODNJA FUNKCIONALNIH KAKAO NAPITAKA

Funkcionalna hrana utječe na određene funkcije organizma, može pružiti, pored osnovne prehrane, dodatne zdravstvene dobrobiti, lijek za neke bolesti nakon dodavanja korisnog sastojka ili uklanjanja neučinkovitog ili štetnog sastojka (Gautam i sur., 2018). Funkcionalnu hranu čine prehrambeni proizvodi koji imaju izgled tradicionalne hrane i uključeni su u svakodnevnu prehranu. Ovi proizvodi pružaju fiziološke dobrobiti i mogu smanjiti rizik od nezaraznih bolesti. Prema EU dokumentima, ako se može dokazati da neki prehrambeni proizvod pozitivno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu, smatra se funkcionalnom hranom (Çakiroğlu i Uçar, 2018). Mnogo je pozitivnih učinaka povezanih sa zdravljem koje ova vrsta hrane nudi, uključujući potencijal za jačanje imunološkog sustava, smanjenje rizika od kardiovaskularnih problema, osteoporoze, pretilosti i nekih vrsta raka, kao i za poboljšanje pamćenja i tjelesnog stanja (Topolska i sur., 2021). Dokazano je da kakao i njegovi ekstrakti pokazuju percipiranu funkcionalnu aktivnost koja povećava antioksidativni status i u isto vrijeme modulira oksidativni i upalni stres kod ljudi (Serafini i Peluso, 2016).

Na tržištu postoje razni proizvodi instant kakao napitaka koji su dodatno obogaćeni mikronutrijentima. Neki od proizvoda su: Nestle „Hot Cocoa“ koji je obogaćen s kalcijem, vitaminima A, C, E, B6, B12 i željezom te Nesquik koji je obogaćen željezom, cinkom i vitaminima D, C i B1; Copper moon proizvod Hot cocoa, napitak koji je također obogaćen vitaminima A, E, B1, B2, B3, B6, B7, B9, B12, K1, D, željezom, cinkom, kalcijem i manganom, umjesto šećera sadrži sladilo sukralozu. Neki od proizvoda s hrvatskog tržišta uključuju Lino „čoko drink“, instant kakao napitak čokoladnog okusa obogaćen vitaminom D i kalcijem; Kraš Express, kakao napitak obogaćen vitaminima i kalcijem. Također se u novije vrijeme istražuje obogaćivanje instant kakao proizvoda raznim biljnim ekstraktima. Ekstrakt industrijske konoplje predstavlja zanimljiv dodatak kakao napitku zbog svog antioksidativnog djelovanja, sadržaja terpena i kanabinoida te se pokazao kao pogodan dodatak, a instant kakao prah kao pogodan nosač za proizvodnju funkcionalog napitka (Talan, 2019). Dodavanje ekstrakta lavande u instant kakao prah povećalo je udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (Buljat, 2018). Tvrtka za funkcionalne napitke Nutrixin lansirala je svoj najnoviji funkcionalni napitak, „cocoa essence“ za poboljšanje zdravlja srca i sprječavanje nastanka kardiovaskularnih bolesti. Tvrdi da napitak sadrži 600 % više polifenola, 400 % više katehina, 900 % više epikatehina i 2300 % više antioksidansa u usporedbi sa standardnim kakao napitcima.

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

Tijekom proizvodnje mješavina za pripremu napitaka, glavni cilj je poboljšati topljivost kakao praha, koji je obično teško topiv u vodi zbog hidrofobne prirode staničnih stijenki i prisutnosti masti (Kowalska i sur., 2011). Izraz "instant" obično se koristi u industrijama kao što su prehrambena, farmaceutska, industrija stočne hrane, kemijska industrija, za opisivanje svojstava raspršivanja i otapanja prašaka. Neki popularni komercijalno dostupni instant prašci su mlijeko, kava, kakao, dječja hrana, juhe, umaci, bezalkoholna pića, mješavine šećera, kao i vitamini i medicinski prahovi. Iako su neki prahovi "prirodno" instant, uobičajena je praksa da se primjenjuje poseban tretman, tzv. proces instantizacije, do praškastih materijala (Barbosa-Cánovas i sur., 2005). Ovaj tretman će osigurati prehrambene prahove sa svojstvom "instant", tako da se lakše mogu otopiti ili dispergirati u tekućinama nego kada su u izvornom praškastom obliku. Varijable koje određuju svojstva aglomerata uključuju one koje se odnose na primarne čestice i aglomerate. Među parametrima koji se odnose na primarne čestice su veličina čestice,

raspodjela veličine, oblik i površina. Trenutna svojstva aglomerata su najpoželjnija svojstva procesa aglomeracije i mogu se mjeriti pomoću svojstava otapanja kada se aglomerati rašire po površini tekućine: močivost, disperzibilnost i topljivost (Barbosa-Cánovas i sur., 2005). Aglomeracija je proces nakupljanja čestica u veće nakupine, aglomerate, a provodi se u posebnim uređajima zvanim aglomeratori (Benković i sur., 2015). Ona je jedan od najvažnijih procesa u proizvodnji instant kakao napitaka. Proces aglomeracije sastoji se od miješanja kakaovog praha i šećera uz dodatak stabilizatora i vode. Voda se dodaje kako bi nastali aglomerati.

Sušenje je važan proces za očuvanje sirove hrane. Proces sušenja događa se kada se vodena para ukloni s površine u okolni prostor, što rezultira sušenim materijalom s produženim rokom trajanja i smanjenim aktivitetom vode (Sangamithra i sur., 2014). Postoji više tehnika sušenja koje se koriste kod proizvodnje kakao napitaka. Tehnika sušenja u pjenu može se koristiti za toplinski osjetljive, ljepljive, viskozne prehrambene proizvode s visokim sadržajem šećera. Tekući materijal se pretvara u stabiliziranu pjenu mućenjem nakon dodavanja jestivih sredstava za pjenjenje. Pjena se zatim raširi u lim i suši pomoću zagrijanog zraka pri atmosferskom tlaku. Mnogi sitni mjehurići u pjenastoj masi izlažu se većoj površini za isparavanje vlage. Brzo sušenje nastaje zbog kretanja vlage kapilarnim putem u tekućim filmovima koji odvajaju mjehuriće pjene. Pjenjenje čini masu za sušenje izuzetno poroznom i podložnijom sušenju do svojih unutarnjih slojeva (Rajkumar i sur., 2007). Prednosti sušenja u pjenu su brzo sušenje pri nižoj temperaturi, zadržavanje nutritivne kakvoće te je isplativo u proizvodnji prahova koji se lako rekonstituiraju. Istraživanja su pokazala da se prahovi sušeni u pjenu mogu čuvati 6 mjeseci bez ikakvih gubitaka kvalitete, a također je metoda ekonomski isplativija od ostalih (Sangamithra i sur., 2014).

Također se koristi pokretni fluidizirajući sloj praškastog materijala. Sloj se sukcesivno tretira parom, dok se plin ubrizgava odozdo da se formiraju aglomerati kroz kontaktne i sudarajuće čestice (Barbosa-Cánovas i sur., 2005).

Sušenje raspršivanjem je uklanjanje gotovo sve tekućine isparavanjem, iz otopine nehlapljive krute tvari. Općenito, toplina se primjenjuje kao zagrijana atmosfera, a isparavanje se potiče raspršivanjem tekuće hrane u tu atmosferu. Tekućine se prskaju u male kapljice, koje se brzo osuše u kontaktu s vrućim zrakom koji se upuhuje velikom brzinom pa je vrijeme zadržavanja stoga kratko (Silva i sur., 2011).

## 2.4. ZDRAVSTVENE DOBROBITI KAKAO PRAHA

Posljednjih desetljeća zdravstveni aspekti kakaovca došli su u fokus istraživanja. Dokazano je da kakao i njegovi proizvodi imaju brojne zdravstvene prednosti, prvenstveno zbog sadržaja polifenola. Smatra se da polifenoli čokolade, koji potječu iz zrna kakaovca, djelomično pridonose kardiometaboličkim zdravstvenim dobrobitima u modulaciji krvnog tlaka i profila lipida. Profil polifenola varira između različitih kultivara kakaovca, uvjeta uzgoja, zemljopisnih područja i koraka obrade. Bioraspoloživost i zdravstveni ishodi polifenola kakaovca ovise o njihovoj kemijskoj strukturi i koncentraciji, čimbenicima koji se odnose na domaćina i njihovoj interakciji s drugim nutrijentima i matricom hrane (Sorrenti i sur., 2020).

Tradicionalni iscjelitelji zvani *curanderos* konzumiraju čokoladne napitke za liječenje bronhitisa u Oaxaci u Meksiku, a čokoladni napitak također se daje djeci kako bi se zaštitili od uboda škorpiona ili pčela. U Dominikanskoj Republici čokoladni se napitci još uvijek koriste za liječenje mnogih vrsta bolesti, od upale grla, anemije do gastrointestinalnih bolesti i preopterećenog mozga. Utvrđeno je da Kuna Indijanci iz Paname piju pet ili više šalica čokolade svaki dan kako bi spriječili pojavu srčanih bolesti i raka (Beg i sur., 2017). Kakao i hrana koja sadrži kakao, kao što je čokolada, posebno su bogati flavan-3-olima, uglavnom epikatehinom i njegovim bliskim srodnicima, proantocijanidinima (Zimmermann i Ellinger, 2020). Stereoizomeri (–)-epikatehina koji nastaju tijekom prženja i alkalizacije manje su bioraspoloživi od prirodnog (–)-epikatehina (Ellinger i sur., 2020). Konjugati faze II epikatehina i metaboliti bez intaktne flavanolne jezgre poput fenolnih kiselina nalaze se u plazmi i urinu (Mayorga-Gross i Esquivel, 2019). Daljnji metaboliti kao što su valerolaktoni nastaju u crijevnom mikrobiomu razgradnjom neapsorbiranih flavanola. Utjecaj svih ovih metabolita na zdravlje još nije u potpunosti razjašnjen. Ipak, trenutni podaci ukazuju na moguće dokaze da bi ti mikrobni metaboliti također mogli biti relevantni za ljudsko zdravlje. Osim flavanola, teobromin i drugi metilksantini, peptidi i hlapljivi spojevi arome također mogu utjecati na ljudsko zdravlje (Mota-Gutierrez i sur., 2019). Mnoge studije, interventne studije ili epidemiološka opažanja, ne fokusiraju se na pojedinačne spojeve, već na kakao kao takav, u nekim slučajevima, obogaćen polifenolima.

Postoje dokazi da flavanoli kakaovca mogu modulirati neke čimbenike rizika povezane s metaboličkim sindromom, poput hipertenzije i poremećaja u metabolizmu glukoze i lipida. Kakao prah bogat flavanolom nije utjecao na nekoliko kardiometaboličkih parametara kod osoba obojelih od dijabetesa tipa 2 jer bi istovremeni tretman snažnim lijekovima poput oralnih



antidijabetika i antihipertenziva mogao iscrpiti učinak kakaa (Dicks i sur., 2018). Također, ljuska zrna kakaovca kao nusproizvod proizvodnje kakaovca sadrži vrijedne fitokemikalije i može se koristiti kao sastojak funkcionalne hrane (Rojo-Poveda i sur., 2019). Nekoliko mehanizama povezano je s blagotvornim djelovanjem kakaovca na zdravlje i bolesti. To uključuje njegova antioksidativna, antikancerogena, antidijabetička, protuupalna, antipretilna i antialergijska svojstva (Martin i Ramos, 2021).

#### 2.4.1. Utjecaj kakaa na kardiovaskularni sustav

Meta-analiza sedam opservacijskih studija (114 009 sudionika) pokazala je da je veća konzumacija čokolade povezana s 37 % nižim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (KVB) i 29 % nižim rizikom od moždanog udara (Buitrago-Lopez i sur., 2011). Potencijalni odnos između kakaa i smanjenog rizika od kardiovaskularnih bolesti također može biti povezan s poboljšanjima cirkulirajućih lipida koja se odnose na razine kolesterola, triglicerida, lipoproteina visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein, HDL*) i lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein, LDL*). Mnoge studije istraživale su učinak suplementacije kakao proizvodima na lipidni profil zdravih osoba, kao i kod osoba s povišenim krvnim tlakom, osoba s dijabetesom, osoba s hiperkolesterolemijom te osoba s prekomjernom tjelesnom masom (Martin i Ramos, 2021). Jia i sur. (2010) u osam kliničkih ispitivanja (215 sudionika) ukazali su na to da kratkotrajna konzumacija kakaa značajno smanjuje razine kolesterola i LDL-kolesterola, čak i pri niskim dozama (dnevna konzumacija polifenola <260 mg), kod pojedinaca koji predstavljaju faktore kardiovaskularnog rizika.

#### 2.4.2. Učinci kakaa protiv pretilosti

Neke interventne i opservacijske studije povezale su unos proizvoda od kakaa s prevencijom pretilosti kod ljudi. Sukladno tome, studijom presjeka provedenom s 1018 sudionika (20–85 godina) otkriveno je da su odrasli koji su više konzumirali čokoladu (proizvode na bazi kakaa) često imali niži indeks tjelesne mase (ITM) od onih koji su jeli čokoladu rjeđe (Golomb i sur., 2012). U drugoj studiji, 60 žena s prekomjernom tjelesnom masom (20–50 godina) dobivalo je napitak od kakaa (39,1 g) ili kakaa s aromom nezrele banane (54,1 g) otopljenom u 150 mL vode u dvostruko slijepom nasumičnom 6-tjednom kliničkom ispitivanju. Međutim, niti jedno od ovih pića nije promijenilo tjelesnu masu, indeks tjelesne mase ili opseg struka, ali poboljšali

su dispepsiju i gastrointestinalne simptome (Martin i Ramos, 2021). Stoga, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdili povoljni učinci.

#### 2.4.3. Kakao i mikrobiota

Nedavne studije dokazuju da nemođificirani prehrambeni polifenoli, kao i dio aglikonskih metabolita, mogu promijeniti zajednicu mikroflora pokazujući prebiotičke učinke i selektivno antimikrobno djelovanje protiv patogenih crijevnih mikroba (Kumar i sur., 2019). Od mnogih vrsta crijevnih mikroba, pokazalo se da su bakterije *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp. i *Eubacterium* sp. uglavnom odgovorne za metabolizam polifenola kakaovca. Mikroflora debelog crijeva pretvara polifenole kakaa u male bioaktivne spojeve, koji imaju sposobnost utjecati na crijevnu ekologiju i bolje se apsorbirati u sistemsku cirkulaciju umjesto aglikona koji se proizvode u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta. Dodatak polifenola pospješuje rast korisnih crijevnih bakterija, kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, dok smanjuje broj patogenih vrsta *Clostridium*, na primjer *Clostridium perfringens* (Ma i Chen, 2020). Konzumacija hrane na bazi flavanola kakaa povećava broj laktobacila i bifidobakterija kod ljudi. Pretpostavlja se da flavanoli kakaovca mogu doprinijeti kao prebiotici održavanju procesa imunomodulacije ometanjem crijevne mikrobiote (Tzounis i sur., 2011). Dodatno, promjena ukupnog broja fekalnih bifidobakterija i laktobacila povezana je sa smanjenom koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP).

## 2.5. ZDRAVSTVENE DOBROBITI ZOBENOG BRAŠNA I MEDA

### 2.5.1. Zob

Želja za hranom s nižim glikemijskim indeksom dovela je do istraživanja funkcionalnih sastojaka i novih tehnika obrade hrane. Glikemijski indeks (GI) sredstvo je za procjenu sposobnosti hrane da podigne razinu glukoze u krvi (Zhang i sur., 2021). Zob je stekla svjetski ugled kao zdrava i hranjiva namirnica te kao dragocjena stočna hrana zbog visokog sadržaja proteina. Iako se većina proizvodnje zobi koristi kao hrana za stoku, zob je pogodna za ljudsku prehranu i ima mnoge primjene, uključujući kao zobena kaša i zobeno brašno. Zob sadrži oko

60 % škroba, 14 % proteina, 7 % lipida i 4 %  $\beta$ -glukana. Za razliku od drugih žitarica, bogata je proteinima i lipidima. Posebnost zobi je bogat sadržaj dijetalnih vlakana, posebice topivih  $\beta$ -glukana. Što se tiče mikronutrijenata, zob je posebno bogata kalijem. Ostale manje komponente kao što su fenoli također su prisutne u zobi (Zhang i sur., 2021). Desetljećima su mnoge znanstvene studije utvrdile zdravstvene dobrobiti zobi u snižavanju glikemijskog odgovora, smanjenju razine kolesterola u krvi, balansiranju crijevne mikrobiote i regulaciji krvnog tlaka. Godine 1997. Agencija za hranu i lijekove u Sjedinjenim Državama odobrila je značajnu zdravstvenu tvrdnju koja pokazuje da topiva vlakna iz proizvoda od zobi mogu pomoći u smanjenju rizika od srčanih bolesti. Među tim znanstvenim istraživanjima poseban je naglasak stavljen na blagotvorno djelovanje zobi na razinu glukoze u krvi. Škrob se prema brzini probave može klasificirati kao brzo probavljivi škrob, sporo probavljivi škrob i rezistentni škrob. Udio sporo probavljivog škroba u prirodnom zobenom sirovom škrobu je 40 % (Kaur i sur., 2018). Mljevenjem zobi u zobeno brašno smanjuje se veličina čestica i proizvodi veća površina, čime se poboljšava pristup probavnim enzimima i potiče povećani glikemijski odgovor (Mandalari i sur., 2018). *In vitro* probavljivost škroba kruha sa zobnim brašnom pokazala je tipične eksponencijalne trendove povećanja. Škrob u kruhu bio je masovno potrošen u prvih 30 minuta, probavljivost škroba postupno se usporavala i bila je stabilna kada je vrijeme probave doseglo 120 minuta. Rezultati su pokazali da je probava miješanog kruha u skladu s kinetikom prvog reda, a maksimalna probavljivost škroba miješanog kruha iznosi više od 90 %. U usporedbi s kruhom od čistog pšeničnog brašna, probavljivost škroba kruha sa zobnim brašnom smanjena je za 7,28 %, što dokazuje da dodatak zobnog brašna smanjuje probavljivost škroba kruha (Cao i sur., 2022).

### 2.5.2. Med

Med je slatki, gusti sirup koji proizvodi medonosna pčela (*Apis mellifera*). To je prvi prirodni zaslađivač ikada otkriven, a trenutno se koristi kao hranjivi dodatak prehrani i ljekovito sredstvo. Med sadrži oko 180 različitih spojeva, uključujući organske kiseline, elemente u tragovima, minerale, vitamine, enzime i proteine, međutim, njegova primarna skupina spojeva su ugljikohidrati, koji se sastoje od približno 26 mono- i disaharida prisutnih kao 64,9 do 73,1 g/100 g meda i fruktoze, koja čini 35,6 do 41,8 g/100 g meda (Olas, 2020). Blagotvoran učinak meda na ljudsko zdravlje proizlazi uglavnom iz njegovog sadržaja fenolnih spojeva (Cianciosi i sur., 2018). Med ima zaštitni učinak protiv kardiovaskularnih bolesti (KVB) putem smanjenja

razine LDL-kolesterola i ispoljavanjem protuupalnog djelovanja, a to djelovanje ovisi o više čimbenika, od kojih je jedan njegov kemijski sastav, posebice njegov sastav fenolnih spojeva (Olas, 2020). Iako je utvrđeno da su antioksidativna svojstva meda u korelaciji s ukupnim sadržajem fenolnih spojeva, ona najvjerojatnije nastaju kao rezultat sinergijskog učinka različitih prisutnih fenolnih spojeva (Abdeltaif i sur., 2018). Također, otkriveni su potencijalni neurološki mehanizmi uključenosti meda u poticanje pamćenja, neuroprotektivni učinak, antistres svojstva koja su pridonijela poboljšanju zdravlja mozga. Prisutnost sadržaja fenola i flavonoida u medu djeluje kao antioksidans i protuupalno sredstvo za poboljšanje kognitivnih sposobnosti i pamćenja (Zamri i sur., 2023).

Temeljem navedenog, vidljivo je da na tržištu već postoje brojni obogaćeni funkcionalni kakao napitci, koji kao bazni sastav najčešće koriste 70 % šećera i 30 % kakaa. Uzevši u obzir gore navedena funkcionalna svojstva meda kao prirodnog zaslađivača te zobu kao sirovine bogate vlaknima i proteinima, cilj ovog rada bio je razviti novi funkcionalni kakao napitak koji bi kao alternativa postojećim napitcima na tržištu, kao zaslađivač koristio med, a kao sredstvo za zgušnjavanje zob te samim time imao i bogatiji nutritivni sastav.

## 3. EKPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći materijali:

- Kakao prah (Nutrigold, Zagreb, Hrvatska)
- Zobeno brašno (Nutrigold, Zagreb, Hrvatska)
- Med (Bagrem; Krapina, Hrvatska)
- Aroma naranče (AROMAR d.o.o., Kloštar Ivanić, Hrvatska)
- Aroma maline (AROMAR d.o.o., Kloštar Ivanić, Hrvatska)
- Svježe mlijeko, 2,8 % m.m. (Dukat, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.1. Reagensi i otapala

Od reagensa i otapala korišteni su:

- Destilirana voda
- Etanol 96 %-tni ( $C_2H_5OH$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen vodom u omjeru 1:2) (Supelco; SigmaAldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 20 %-tna otopina natrijevog karbonata ( $Na_2CO_3$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, p.a. ( $CH_3OH$ ) (CARLO ERBA Reagents, Val-de-Reuil, Francuska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- 40 mM otopina klorovodične kiseline (HCl) (Fischer Chemical, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrij acetat-trihidrat ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Koncentrirana octena kiselina ( $CH_3COOH$ ) (T.T.T. d.o.o, Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- 20 mM otopina željezo(III)-klorid-heksahidrata ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev klorid (NaCl) (SigmaAldrich, St. Louis, SAD)
- Kalcijev klorid ( $CaCl_2$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Alfa amilaza (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)

- Fosfatni pufer
- Pepsin (Fischer Chemical, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrij dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Pankreatin (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Žučne soli (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- Trolox (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- Galna kiselina 98 %-tna (AcrosOrganics, New Jersey, SAD)
- 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)

### 3.1.2. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Laboratorijska sušara Inkolab (INKOlab, Zagreb, Hrvatska)
- Analitička vaga (Sartorius AG, Goettingen, Njemačka)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Rotacijski viskozimetar (Anton Paar, Graz Austrija)
- Vibracioni volumetar (vlastita izrada)
- Instrument za mjerenje aktiviteta vode (Ro-tronic, 8303 Bassersdorf)
- Štoperica
- PCE-CSM3 kolorimetar (PCE Instruments, Njemačka)
- Vodena/uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Set za vakuum filtraciju (Rocker 300-LF30, Rocker Scientific Co., Ltd., New Taipei City, Tajvan)
- Konduktometar/ pH metar (CH-9100 Herisau, Švicarska)
- Refraktometar (ABBE, 2WAJ, Bluewave Industry Co., Ltd, Kina)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- Magnetska miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- Analizator veličine čestica (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)

Pribor:

- Limene posude za sušenje
- Menzure volumena 100 mL, 250 mL
- Stakleni štapić
- Staklene čaše volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL
- Stakleni lijevak
- Falkon kivete volumena 50 mL
- Magnetići za miješanje
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 5 mL, 10 ml
- Mikropipete volumena 0-100  $\mu$ L, 500  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Odmjerne tikvice volumena 25 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 500 mL
- Aluminijske posudice s poklopcem
- Metalna špatulica
- Filter papir od celuloze (veličina pora 5-13  $\mu$ m) (LLG Labware Meckenheim, Njemačka)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema kakao smjese za sušenje

Postupak izrade smjese uključuje vaganje svih sastojaka (kakao prah, zobeno brašno, med) u određenim omjerima, uz dodatak 100 mL vode za lakše miješanje. Smjesa se miješala sa štapnim mikserom i izlila u posude za sušenje u sloju debljine oko 5 mm. Zatim su se smjese sušile u konvekcijskoj sušari na 70 °C do postizanja vlage oko 5-8 %. Nakon što su se smjese posušile, izmlele su se u prah, skladištile te su se provodile fizikalne, kemijske i senzorske analize i ispitivala njihova probavljivost.

Istraživanja su se provodila prema unaprijed definiranom faktorskom (engl. *full factorial*) dizajnu eksperimenta sa 2 parametra na 3 razine: a) omjer med/zob (50:50; 21,605 g meda i 21,605 g zobi, 60:40; 23,7655 g meda i 19,4445 g zobi, 40:60; 19,4445 g meda i 23,7655 g

zobi) i b) udio kakao praha (5,0 g, 6,25 g, 7,5 g) (Apriyanto i sur., 2016). Dizajn eksperimenta je prikazan u tablici:

**Tablica 1.** Dizajn eksperimenta za proizvodnju kakao mješavina za sušenje

| Broj uzoraka | Omjer med/zob (udio meda) (%)           | Kakao prah (g) |
|--------------|---|----------------|
| 1            | 50:50                                   | 7,5            |
| 2            | 60:40                                   | 6,25           |
| 3            | 40:60 (19,4445 g meda i 23,7655 g zobi) | 5,0            |
| 4            | 40:60                                   | 6,25           |
| 5            | 60:40                                   | 7,5            |
| 6            | 50:50                                   | 5,0            |
| 7            | 60:40 (23,7655 g meda i 19,4445 g zobi) | 5,0            |
| 8            | 40:60                                   | 7,5            |
| 9            | 50:50 (21,605 g meda i 21,605 g zobi)   | 6,25           |

U tablici 1 prikazano je 9 uzoraka s različitim omjerima med/zob te masom kakao praha. Na temelju tih omjera rađene su analize na uzorcima kako bi se naposljetku dobio optimalan omjer (validacijski uzorak) na kojem su se kasnije također radile fizikalne, kemijske i senzorske analize te probavljivost, uz dodatak dvije arome (naranča i malina).

### 3.2.2. Analiza smjesa prije sušenja

#### 3.2.2.1. Gravimetrijska analiza sadržaja vlage u uzorku

Na analitičkoj vagi (Sartorius AG, Goettingen, Njemačka) izvagano je 3 grama uzorka koji je zatim stavljen u posudicu za sušenje. Sušenje se provodilo u laboratorijskoj sušari Inkolab (INKOlab, Zagreb, Hrvatska) pri temperaturi  $105 \pm 2$  °C 3 sata. Nakon sušenja uzorci su premješteni u eksikator, ohlađeni na sobnu temperaturu te ih je bilo potrebno izvagati. Za svaki uzorak provodila su se dva paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Postotak vlage u uzorku izračunat je prema jednadžbi 1:



$$\% \text{ vlage} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad [1]$$

Gdje je:  $m_1$  = masa prazne posudice za sušenje (g)

$m_2$  = masa posudice i uzorka smjese prije sušenja (g)

$m_3$  = masa posudice i uzorka smjese nakon sušenja (g)

### 3.2.2.2. Viskoznost smjese

Viskoznost se određivala primjenom rotacijskog viskozimetra (Anton Paar, Graz Austrija) primjenom odgovarajućeg nastavka koji se odabire prema pretpostavljenoj viskoznosti smjese. Na smjesi su se provodila 3 paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.3. Fizikalna svojstva prahova

#### 3.2.3.1. Određivanje raspodjele veličine čestica

Za mjerenje raspodjele veličine čestica korištena je metoda laserske disfrakcije pomoću uređaja Mastersizer 2000 s jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Royston, Velika Britanija). Rezultati su prikazani pomoću parametara raspodjele veličine čestica:

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

### 3.2.3.2. Nasipna gustoća i svojstva tečenja (Hausnerov omjer, Carrov indeks)

Uzorak je nasipan u menzuru ukupnog volumena 250 mL te izvagan. Nakon očitavanja početne mase i volumena, menzura s uzorkom je pričvršćena na postolje vibracionog volumetra. Volumetar se pokreće uključivanjem sklopke te se promjena volumena očitavala nakon 10, 100 i 1250 udaraca. Iz dobivenih podataka izračuna se nasipna gustoća uzoraka nakon 0 udaraca i nakon 1250 udaraca koja se koristi za izračunavanje svojstava tečenja prema Hausnerovom omjeru (HR) i Carrovom indeksu ( $I_c$ ) prema jednadžbama:

$$HR = \frac{\rho_{\text{vibraciona}}(1250)}{\rho_{\text{slobodna}}(0)} \quad [2]$$

$$I_c = \frac{\rho_{\text{vibraciona}}(1250) - \rho_{\text{slobodna}}(0)}{\rho_{\text{slobodna}}(0)} \cdot 100 \quad [3]$$

Gdje je:  $\rho_{\text{vibraciona}}(1250)$  = nasipna gustoća nakon 1250 udaraca ( $\text{g/cm}^3$ );  $\rho_{\text{slobodna}}(0)$  = nasipna gustoća nakon 0 udaraca ( $\text{g/cm}^3$ )

### 3.2.3.3. Analiza aktiviteta vode

Aktivitet vode u uzorcima analiziran je Rotonic instrumentom za mjerenje aktiviteta vode. Uzorak je stavljen u plastičnu posudicu (posudicu napuniti uzorkom do otprilike jedne trećine), stavljen je u komoru za mjerenje i pokrenut je aw metar. Dobiveni rezultat prikazan je kao

prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija te se mjerenje još jednom ponovilo sa svježim prahom (2 paralelna mjerenja po uzorku).

#### 3.2.3.4. Analiza rekonstitucijskih svojstava

##### Disperzibilnost

Disperzibilnost praha definira se kao vrijeme (u sekundama) potrebno da se određena količina praha u potpunosti rasprši u određenoj količini vode pri određenoj temperaturi. Uzorak (jedna vrhom puna čajna žličica) je dispergirana u 100 mL destilirane vode sobne temperature. U trenutku kad je uzorak usipan u 100 mL vode, pokreće se štoperica i počinje ručno miješanje otopine staklenim štapićem s približno 25 kružnih pokreta kroz 15 sekundi. Štoperica se zaustavlja kada su sve nakupine praha raspršene u čaši s vodom. Disperzibilnost se izražava kao broj sekundi koje su protekle od početka miješanja do potpunog raspršenja praha u vodi. Provodila su se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost.

##### Močivost

Za potrebe mjerenja izrađen je lijevak od papira visine 100 mm, donjeg promjera 40 mm i gornjeg promjera 90 mm u koji je usipan uzorak prije mjerenja, a čija je uloga bila osigurati čim ravnomjerniju raspodjelu praha po površini tekućine. Lijevak se postavlja na čašu s 100 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi te je u lijevak stavljen tučak čija je uloga prekriti otvor lijevka da se spriječi prijevremeno istjecanje praha. Jedna vrhom puna čajna žlica praha je nasipana u lijevak, ukloni se tučak te se pokreće štoperica. Močivost se definira kao vrijeme u sekundama potrebno da prah u potpunosti probije mirnu površinu tekućine. Provodila su se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost.

#### 3.2.3.5. Boja prahova

Boja prahova određuje se primjenom PCE-CSM3 kolorimetra (PCE Instruments, Njemačka), uz prethodnu kalibraciju na bijelu ploču. Određuje se pet parametara boje (Hunterove koordinate boje):

- **$L^*$  vrijednost** - predstavlja svjetlost; svijetlo ( $L=100$ ) ili tamno ( $L=0$ )
- **$a^*$  vrijednost** - predstavlja raspon od zelene do crvene; zeleno ( $-a$ ) ili crveno ( $+a$ )

- ***b*\* vrijednost** - predstavlja raspon od plave do žute; plavo (*-b*) ili žuto (*+b*)
- **Chroma vrijednost** - predstavlja zasićenje boje
- **hue vrijednost** - predstavlja ton (kut) boje

Za svaki uzorak provodila su se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.4. Kemijska svojstva ekstrakata prahova

#### 3.2.4.1. Priprema ekstrakata

Prije pripreme ekstrakta bilo je potrebno pripremiti 70 %-tnu otopinu etanola kao ekstrakcijskog otapala. Izvagano je 3 g usitnjenog uzorka i dodano u 90 mL ekstrakcijskog otapala prethodno termostatiranog na 70 °C u vodenoj/uljnoj kupelji (IKA, Staufen, Njemačka). Ekstrakcija je provedena 30 minuta pri brzini okretaja miješalice od 500 rpm u pokrivenim staklenim čašama, kako bi se spriječilo isparavanje otapala. Dobiveni ekstrakt je profiltriran na setu za vakuum filtraciju (Rocker 300-LF30, New Taipei City, Tajvan) i spremljen u Falcon kivete od 50 mL. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču do provođenja analiza.

#### 3.2.4.2. Vodljivost i ukupne otopljene tvari ekstrakata

Vodljivost i TDS (engl. *total dissolved solids*; ukupne otopljene tvari u otopini) određivani su pomoću konduktometra (CH-9100 Herisau, Švicarska) uranjanjem sonde u tekući ekstrakt. Provodila su se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.4.3. Mjerenje pH vrijednosti ekstrakata

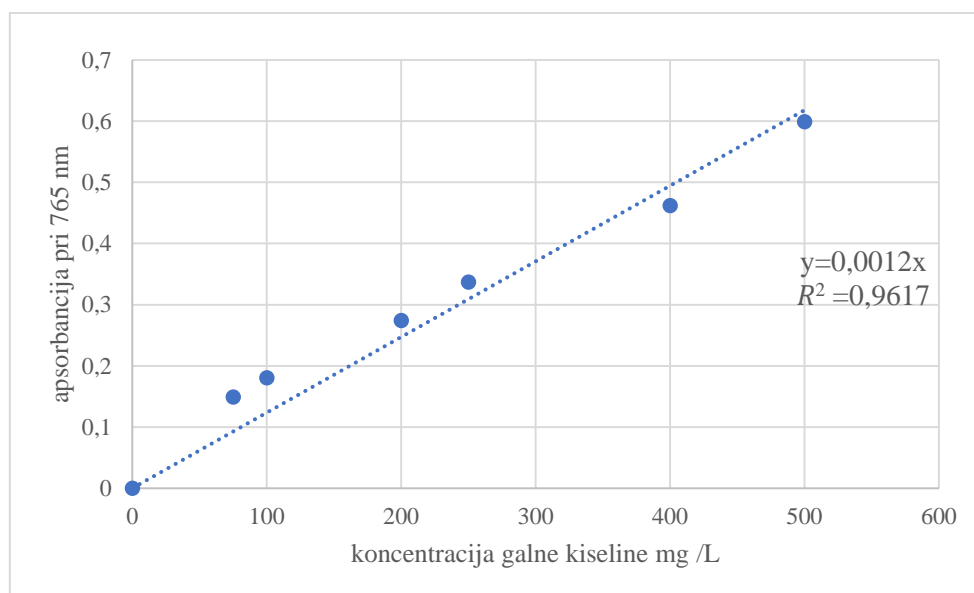
pH vrijednost ekstrakata određivana je direktnim uranjanjem pH sonde (CH-9100 Herisau, Švicarska) u svježe pripremljene ekstrakte. Prije mjerenja bilo je potrebno izbaždariti pH metar standardnim otopinama. Provodila su se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.4.4. Određivanje ukupnih polifenola

Količina ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijski korištenjem Folin-Ciocalteu metode. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima, fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina reduciraju se u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu je otpipetirano 3,95 mL destilirane vode, 50  $\mu\text{L}$  uzorka, 250  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i 750  $\mu\text{L}$  20 %-tne otopine natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Nakon dodatka 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te su uzorci stajali 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na 765 nm. Osim uzoraka pripremljena je i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke, samo što je umjesto uzorka sadržavala 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Za svaki uzorak pripremljene su dvije paralelne probe, a kao rezultat je uzeta srednja vrijednost.

Udio ukupnih polifenola izračunat je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg/L) (slika 1), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/L po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 1.** Baždarni pravac galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y=0,0012x \quad [4]$$

$$R^2=0,9617$$

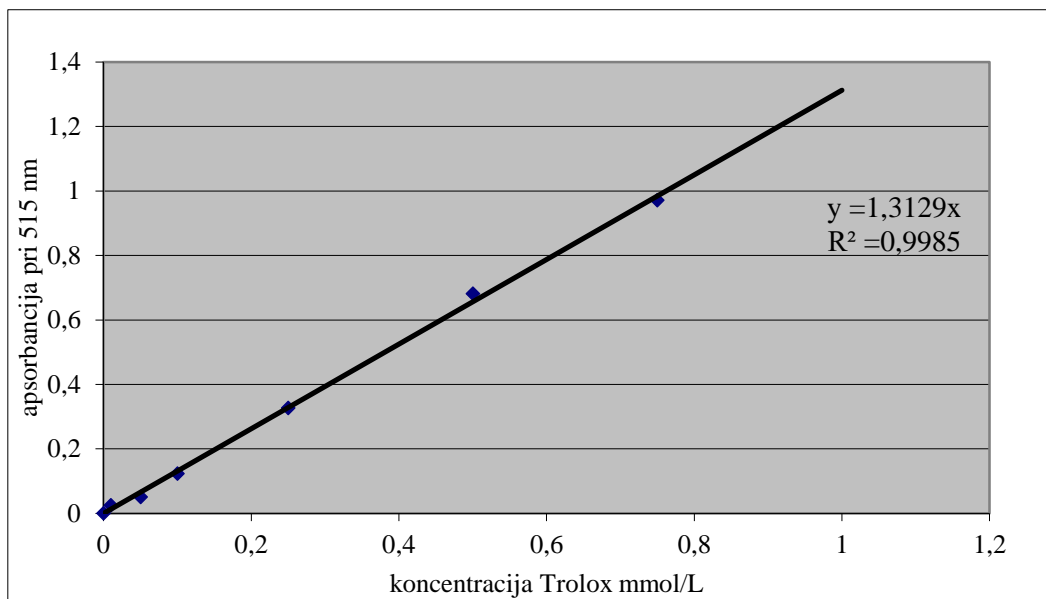
Gdje je:  $y$ =apsorbancija pri 765 nm,  $x$ = koncentracija galne kiseline mg/L,  $R^2$ = koeficijent determinacije.

#### 3.2.4.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Ova metoda određivanja antioksidativne aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljena je 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetirano je 100  $\mu$ L ispitivanog uzorka i dodano 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Reakcija se odvija 30 min u mraku nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola.

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda konstruiran je pravac ovisnosti apsorbancije  $\Delta A$  o koncentraciji mmol/L, odnosno baždarni pravac (slika 2). Promjena apsorbancije DPPH radikala ( $\Delta A$ ), nakon reakcije s uzorkom, računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mmol/g) udio ekvivalenata Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 2.** Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 1,3129x \quad [5]$$

$$R^2 = 0,9985$$

Gdje je:  $y$  = razlika asorbancije uzorka i slijepa probe pri 515 nm,  $x$  = ekvivalent Troloxa (mmol/L),  $R^2$  = koeficijent determinacije

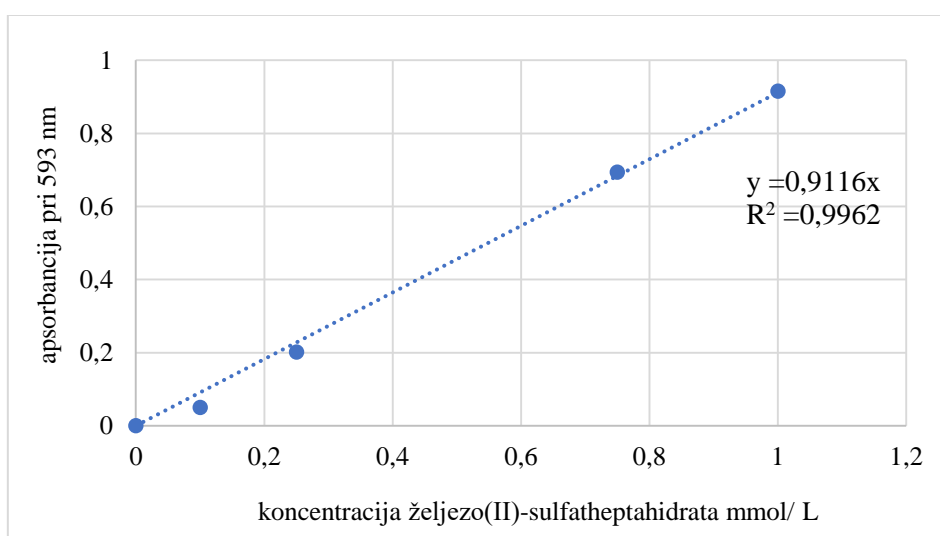
#### 3.2.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Za pripremu FRAP reagensa bilo je potrebno pripremiti acetatni pufer koncentracije 300 mM, 10 mM otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) te 20 mM vodenu otopinu željezo (III)- klorid-heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). FRAP reagens pripremljen je miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , tako da omjer dodanih otopina bude 10:1:1 (Ivanković, 2020).

Za postupak mjerenja, u kiveti je pomiješano 50  $\mu\text{L}$  uzorka i 950  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa te je nakon točno 4 minute izmjerena apsorbancija na 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se

priprema tako da se umjesto uzorka 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa (950  $\mu\text{L}$ ).

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  kao standarda konstruiran je pravac ovisnosti apsorbancije  $\Delta A$  o koncentraciji  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , izraženoj u  $\text{mmol/L}$ , odnosno baždarni pravac (slika 3). Promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) računa se oduzimanjem apsorbancije slijepe probe od apsorbancije uzorka. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije ( $\text{mmol/L}$  ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) te se izražavaju kao molarni ( $\text{mmol/g}$ ) udio po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 3.** Baždarni pravac za željezo(II)-sulfatseptahidrat

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,9116x \quad [6]$$

$$R^2 = 0,9962$$

Gdje je:  $y$  = apsorbancija pri 593 nm,  $x$  = koncentracija  $\text{mmol}$  željezo(II)-sulfatseptahidrata,  $R^2$  = koeficijent determinacije



### 3.2.4.7. Određivanje šećera po Brixu

Šećeri su određivani pomoću refraktometra (ABBE, 2WAJ, Bluewave Industry Co., Ltd, Kina) metodom po Brixu. Uzorak ekstrakta (2-3 kapi) se kapne na pločicu refraktometra i rezultat se očita na skali refraktometra u obliku refrakcijskog indeksa i % Brixu. Provodila su se tri paralelna mjerenja, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$ SD.

### 3.2.5. Probavljivost (bioraspoloživost)

*In vitro* simulacija probavnog sustava provedena je prema metodi autora Ortega i sur. (2011). Za određivanje bioraspoloživosti korišteni su uzorci prahova. *In vitro* simulacija probavnog procesa započinje korakom koji simulira uvjete u ustima. Odvagano je 40 mg alfa amilaze i otopljeno u 40 mL fosfatnog pufera zajedno s dodatkom 0,04 % NaCl-a i 0,004 % CaCl<sub>2</sub>. Tako pripremljena otopina stavljena je u uljnu kupelj i zagrijana na temperaturu od 37 °C. Kad je dostignuta potrebna temperatura, dodano je 4 grama praškastog uzorka i pokrenuta je štoperica. Inkubacija je trajala 5 minuta. Nakon završetka inkubacije, uzima se 500  $\mu$ L uzorka reakcijske mješavine, profiltrira i razrijedi u Eppendorf kiveti s 500  $\mu$ L destilirane vode te se stavlja na hlađenje. Kako bi se simulirali uvjeti probave u želucu, pH reakcijske mješavine bilo je potrebno podesiti na pH=2 pomoću koncentrirane klorovodične kiseline (HCl). Nakon što je pH podešen, dodana je suspenzija pepsina (60 mg pepsina otopljenog u 4 mL 0,01 mol/L HCl) te je reakcijska mješavina inkubirana 2 sata pri 37 °C. Nakon završetka inkubacije, uzeto je 500  $\mu$ L uzorka reakcijske mješavine, profiltrirano te se kiveta s uzorkom odmah stavlja na hlađenje. Nakon završenog drugog koraka probave (želudac), pH reakcijske mješavine podesio se na pH=6,5 dodatkom NaHCO<sub>3</sub>, što odgovara uvjetima u tankom crijevu. Nakon što je pH podešen dodana je suspenzija pankreatina (0,08 grama pankreatina otopljenog u 10 mL fosfatnog pufera i 0,5 grama žučnih soli otopljenih u 10 mL fosfatnog pufera). Mješavina je inkubirana 2 sata pri 37 °C. Nakon završetka inkubacije, uzima se 500  $\mu$ L uzorka reakcijske mješavine, profiltrira te se kiveta s uzorkom odmah stavlja na hlađenje. Nakon svakog provedenog koraka *in vitro* simulacije probavnog sustava, u dobivenim uzorcima određivan je sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet, sadržaj šećera, TDS i vodljivost prema prethodno opisanim metodama.

### 3.2.6. Senzorska analiza kakao prahova i instant napitaka

#### 3.2.6.1. Priprema uzoraka za senzorsku analizu

Za senzorsku analizu napitci su pripremljeni dodatkom 5 g praha u 100 mL zavrelog mlijeka, uz miješanje 3 minute kako bi se napitak zgusnuo.

#### 3.2.6.2. Provođenje senzorske analize

Senzorska analiza je analiza kojom se utvrđuje opis senzorskih svojstava, karakteristika i razlika između proizvoda koje mogu utjecati na prihvaćanje kod potrošača (Cempaka i sur., 2021). Senzorske analize provedene su prema hedonističkoj skali. Uzorcima se dodjeljuju ocjene 1-5, ovisno o promatranom svojstvu. Ocjena 1 značila je da uzorak nije prihvaćen („ne sviđa mi se“), a ocjena 5 značila je visoku prihvatljivost („sviđa mi se“). Ocjenjivano je 6 svojstava: izgled, boja, miris, slatkoća, okus i naknadni okus.

### 3.2.7. Statistička obrada podataka i optimiranje sastava

Statistička obrada podataka dobivenih eksperimentima provedena je upotrebom programskog paketa Statistica v. 14.0 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD), primjenom kojeg su izračunate srednje vrijednosti mjerenja i standardne devijacije. Podaci su analizirani primjenom analize varijance (ANOVA) s razinom značajnosti  $p < 0,05$ . Upotrebom istog programskog paketa napravljen je dizajn eksperimenta te su udjeli meda/zobi i dodatka kakao praha definirani koristeći potpuni faktorski (eng. *full factorial*) dizajn pokusa. Optimiranje sastava mješavina provedeno je u istom programskom paketu, definiranjem profila poželjnosti pri čemu su kao ulazni parametri korišteni udjeli meda/zobi i kakaa zadani dizajnom pokusa (tablica 1), a kao izlazni parametri korištena su fizikalna, kemijska i senzorska svojstva pripremljenih mješavina. Nakon definiranja optimalnih udjela meda/zobi i kakao praha, proizvedena je još jedna mješavina optimalnog sastava kao validacijska mješavina za modelom dobivene podatke te dvije mješavine optimalnog sastava koje su aromatizirane aromama naranče i maline kako bi se utvrdilo hoće li dodatak navedenih aroma imati pozitivan utjecaj na fizikalna, kemijska i senzorska svojstva novorazvijenog proizvoda.

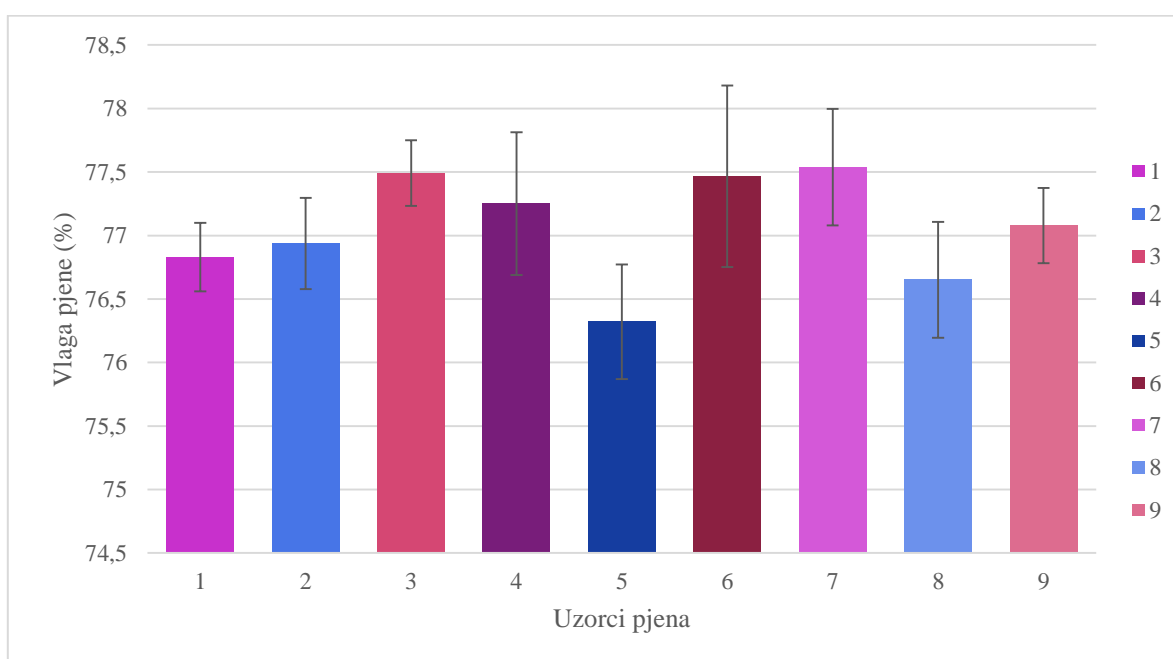
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu korišten je proces sušenja u tankom sloju kako bi se razvio novi instant kakao napitak na bazi meda. U tu je svrhu proveden faktorski (engl. *full factorial*) dizajn eksperimenta s 2 parametra na 3 razine: a) omjer med/zob i b) udio kakao praha. Proizvedeno je 9 uzoraka kojima su analizirana fizikalna, kemijska i senzorska svojstva. Rezultati su prikazani u 5 potpoglavlja: analiza smjesa prije sušenja, fizikalna svojstva prahova, kemijska svojstva ekstrakata prahova, senzorska svojstva kakao napitaka te optimiranje sastava smjese i validacijski pokusi. Od fizikalnih svojstava prahova, određivana je raspodjela veličine čestica prikazana u tablici 2, nasipna gustoća i svojstva tečenja koji su prikazani u tablici 3, analiza sadržaja vlage u uzorcima kakao prahova (slika 7), analiza aktiviteta vode prikazana na slici 8, analiza rekonstitucijskih svojstava, disperzibilnosti i močivosti, prikazana na slikama 9 i 10 te je određivana i boja prahova, što je prikazano u tablici 4. Od kemijskih svojstava ekstrakata prahova, određivana je vodljivost i ukupne otopljene tvari ekstrakata kakao prahova, prikazani na slici 11, pH vrijednost ekstrakata kakao prahova (slika 12), određivani su i ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom, što je prikazano na slikama 13, 14 i 15 te šećeri po Brixu prikazani na slici 16. Također je ispitivana probavljivost tako što je provedena *in vitro* simulacija probavnog sustava te su rezultati prikazani na slikama 17, 18 i 19. Provedena je i senzorska analiza pripremljenih napitaka pomoću panel skupine koja je ocijenjivala 7 svojstava, koji su prikazani na slici 20. Naposljetku je provedena statistička obrada podataka upotrebom programskog paketa Statistica v. 14.0 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD), primjenom kojeg su izračunate srednje vrijednosti mjerenja i standardne devijacije. Optimiranje sastava provedeno je u istom programskom paketu. Nakon definiranja optimalnih udjela meda/zobi i kakao praha, proizvedena je još jedna mješavina optimalnog sastava kao validacijska mješavina za modelom dobivene podatke te dvije mješavine optimalnog sastava koje su aromatizirane aromama naranče te su tim uzorcima također određivana navedena fizikalna, kemijska i senzorska svojstva te su rezultati prikazani u tablici 5.

## 4.1. ANALIZA SMJESA PRIJE SUŠENJA

### 4.1.1. Sadržaj vlage pjene prije sušenja

Na slici 4 prikazan je sadržaj vlage pjene prije sušenja. U procesu sušenja pjenaste podloge, tekućina se pretvara u stabilnu pjenu dodavanjem plina i sredstava za pjenjenje. Hrana se suši primjenom vrućeg zraka, što rezultira osušenim prahom. Zbog porozne strukture pjene i velike površine, prijenos mase je povećan u odnosu na krutu hranu, što dovodi do kraćeg razdoblja dehidracije i veće kvalitete proizvoda (Lobo i sur., 2017). Postotci vlage u pjenama kreću se od 76,32 % (uzorak 5) do 77,54 % (uzorak 7).

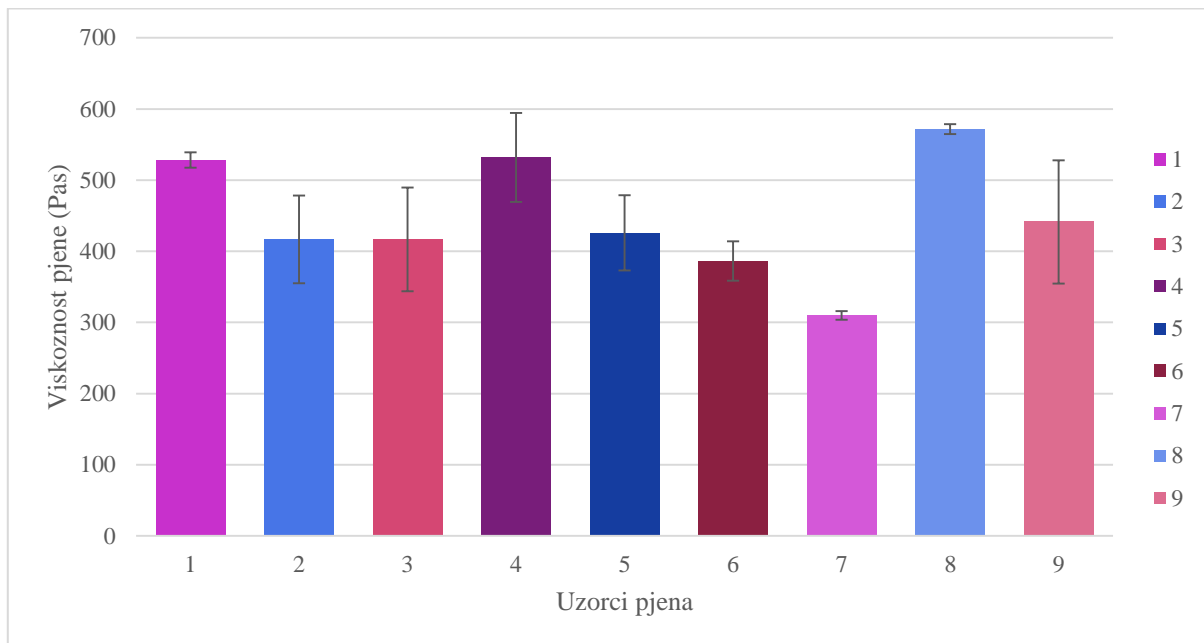


**Slika 4.** Sadržaj vlage pjene prije sušenja prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

Najniži postotak vlage izmjeren je kod uzorka broj 5 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 7,5 g kakao praha), a najviši postotak vlage izmjeren je kod uzorka broj 7 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 5 g kakao praha). Prema izmjerenim vrijednostima, postotak vlage je viši kod uzoraka koji sadrže manju količinu kakao praha (uzorci 3, 6 i 7), dok je niži kod uzoraka s većim sadržajem kakao praha (uzorci 1, 5 i 8) dok omjer med/zob u ovom slučaju nije pokazao značajan utjecaj na postotak vlage u uzorcima.

#### 4.1.2. Viskoznost pjene prije sušenja

Slika 5 prikazuje podatke za viskoznost pjene prije sušenja. Vrijednosti se kreću od 309,8 Pas (uzorak 7) do 571,65 Pas (uzorak 8). Najmanju viskoznost pokazao je uzorak broj 7 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 5 g kakao praha), dok je najveću viskoznost pokazao uzorak broj 8 (19,4445 g meda, 23,7655 g zobi i 7,5 g kakao praha).



**Slika 5.** Podaci za viskoznost pjene prije sušenja prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

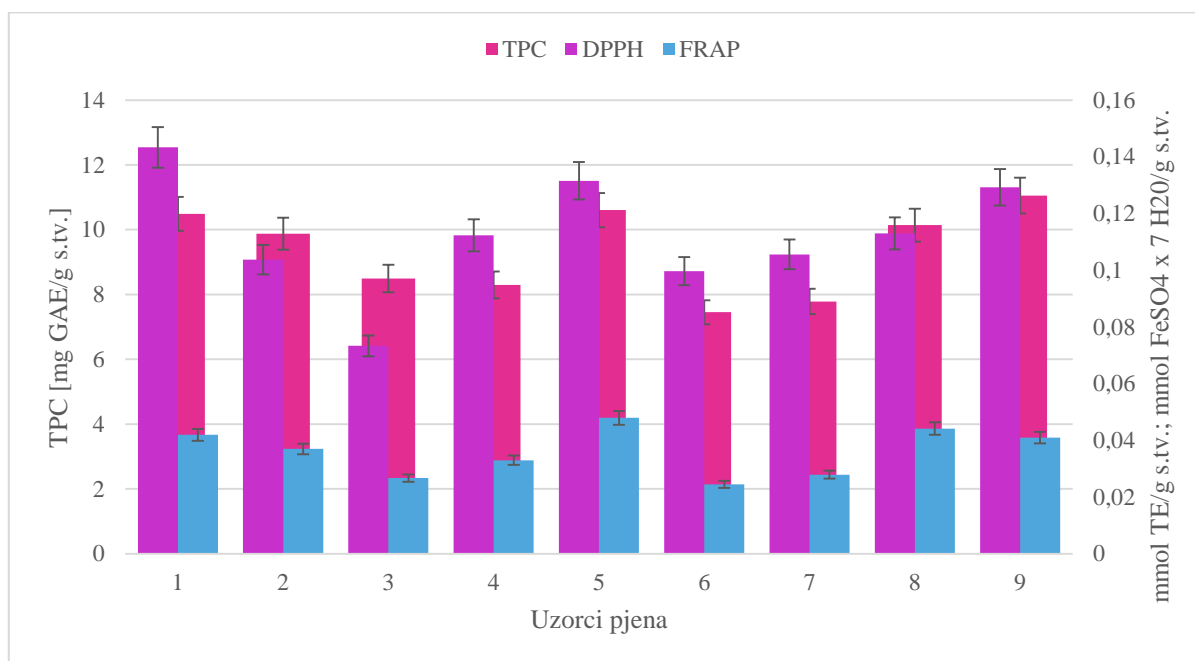
Batur i sur. (2010) ispitivali su utjecaj ultrazvuka na svojstva pjenjenja i viskoznost sladolednih smjesa. Zaključeno je da su najveću viskoznost imali uzorci koji su sadržavali najveći udio proteina i manji udio masti. Uzorci s najnižom viskoznošću sadržavali su najviše ukupnih šećera te znatno manje proteina i masti. U ovom radu, prema izmjenjenim podacima, manju viskoznost pokazali su uzorci s manjim sadržajem kakao praha (uzorci 3, 6 i 7), dok su veću viskoznost pokazali uzorci s većim sadržajem kakao praha (uzorci 1, 5 i 8). Omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj na viskoznost pjena, iako je med viskozna tvar.

Thuy i sur. (2020) u svojoj studiji ispitivali su učinkovitost dodatka emulgatora na svojstva viskoznošću kakao prahova. Korištene su 4 vrste emulgatora u rasponu od 0,25 do 0,7 %. Dobiveni rezultati pokazali su da razine emulgatora značajno utječu na viskoznost smjese koja se povećava s višim udjelom emulgatora i kakao maslaca. Viskoznost emulzija pripremljenih

koncentracijom od 0,25 i 0,4 % bila je relativno niska. Najveća viskoznost uočena je u emulzijama pripremljenim u koncentraciji od 0,55 do 0,7 % za svaku vrstu korištenog emulgatora.

#### 4.1.3. Ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet pjena prije sušenja

Na slici 6 prikazan je sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet pjena prije sušenja koji je određen DPPH i FRAP metodama. Vrijednosti ukupnih polifenola u pjenama kreću se od 7,45 mg GAE/g s.tv (suhe tvari) (uzorak 6) do 11,05 mg GAE/g s.tv (uzorak 9).



**Slika 6.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet pjena prije sušenja prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=2)

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom kreću se od 0,07 mmol TE/g s.tv. (uzorak 3) do 0,14 mmol TE/g s.tv. (uzorak 1), a vrijednosti određene FRAP metodom od 0,024 mmol FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O/g s.tv. (uzorak 6) do 0,048 mmol FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O/g s.tv. (uzorak 5). Najmanji sadržaj polifenola pokazuju uzorci broj 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) i 7 (60:40, 5 g kakao praha), dok najmanji antioksidacijski kapacitet (DPPH metoda)

pokazuju uzorci broj 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha) i 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) te FRAP metodom uzorci broj 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha ) i 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha).

S druge strane, najveći sadržaj polifenola pokazali su uzorci broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha) i 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha), a najveći antioksidacijski kapacitet DPPH metodom pokazali su uzorci broj 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha) i 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha) te FRAP metodom uzorci broj 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Na temelju svih navedenih rezultata, vidljiv je utjecaj sadržaja kakao praha u uzorcima, na način da uzorci s većim sadržajem kakao praha pokazuju i veći sadržaj ukupnih polifenola, kao i veći antioksidacijski kapacitet određen objema metodama. Omjer med/zob u ovom slučaju nije pokazao značajan utjecaj na dobivene rezultate.

Lobo i sur. (2017) proizvodili su prah od manga sušenjem u pjenu. Zaključili su da je antioksidacijski kapacitet, kao i sadržaj polifenola, bio veći nakon postupka sušenja. Taj zaključak objašnjavaju time da je postupak sušenja u pjenu metoda koja se koristi za smanjenje izloženosti visokim temperaturama i dugim vremenima toplinske obrade, što može objasniti visoki kapacitet antioksidansa u osušenim uzorcima. Toplinska obrada najvjerojatnije olakšava ekstrakciju polifenolnih spojeva koji su povezani s matricom hrane.

## **4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA PRAHOVA**

### **4.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica**

Veličina čestica jedno je od najvažnijih svojstava koja utječu na ponašanje praha tijekom rukovanja, transporta i skladištenja (Fu i sur., 2012). Rezultati mjerenja raspodjele veličine čestica prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Parametri raspodjele veličine čestica kakao prahova prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

| UZORCI   | d (0,1)            | d (0,5)             | d (0,9)             | D [3,2]              | D [4,3]             |
|----------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| <b>1</b> | 918,10 $\pm$ 61,51 | 1279,21 $\pm$ 24,30 | 1655,12 $\pm$ 34,19 | 1076,42 $\pm$ 280,20 | 1279,49 $\pm$ 33,76 |
| <b>2</b> | 79,52 $\pm$ 19,91  | 367,94 $\pm$ 121,05 | 970,03 $\pm$ 282,02 | 167,19 $\pm$ 39,13   | 458,41 $\pm$ 133,23 |
| <b>3</b> | 72,43 $\pm$ 10,07  | 372,57 $\pm$ 44,87  | 956,32 $\pm$ 142,12 | 133,25 $\pm$ 15,23   | 454,56 $\pm$ 60,41  |
| <b>4</b> | 232,61 $\pm$ 24,09 | 580,67 $\pm$ 69,31  | 1128,12 $\pm$ 97,36 | 363,24 $\pm$ 31,86   | 635,84 $\pm$ 33,27  |
| <b>5</b> | 65,38 $\pm$ 5,58   | 293,26 $\pm$ 35,33  | 818,13 $\pm$ 149,08 | 141,83 $\pm$ 12,00   | 379,95 $\pm$ 54,92  |
| <b>6</b> | 82,33 $\pm$ 1,63   | 363,56 $\pm$ 10,70  | 935,68 $\pm$ 38,06  | 169,65 $\pm$ 2,93    | 448,26 $\pm$ 13,93  |
| <b>7</b> | 88,49 $\pm$ 5,06   | 339,34 $\pm$ 20,80  | 801,01 $\pm$ 35,88  | 181,74 $\pm$ 10,16   | 399,56 $\pm$ 19,86  |
| <b>8</b> | 49,50 $\pm$ 3,07   | 275,56 $\pm$ 17,38  | 753,76 $\pm$ 95,31  | 96,01 $\pm$ 4,72     | 351,38 $\pm$ 34,47  |
| <b>9</b> | 63,04 $\pm$ 8,99   | 315,71 $\pm$ 48,05  | 857,35 $\pm$ 91,14  | 123,37 $\pm$ 14,51   | 399,95 $\pm$ 45,69  |

Raspon kretanja parametara je sljedeći: za parametar d (0,1) kreće se od 49,50  $\pm$  3,07 do 918,10  $\pm$  61,51  $\mu\text{m}$ , za parametar d (0,5) od 275,56  $\pm$  17,38 do 1279,21  $\pm$  24,30  $\mu\text{m}$ , za d (0,9) od 753,76  $\pm$  95,31 do 1655,12  $\pm$  34,19  $\mu\text{m}$ , za D [3,2] od 96,01  $\pm$  4,72 do 1076,42  $\pm$  280,20  $\mu\text{m}$  te za D [4,3] od 351,38  $\pm$  34,47 do 1279,49  $\pm$  33,76  $\mu\text{m}$ . Najmanje vrijednosti prema parametrima pokazuje uzorak broj 8 (19,4445 g meda, 23,7655 g zobi i 7,5 g kakao praha), dok najveće vrijednosti pokazuje uzorak broj 1 (21,605 g meda, 21,605 g zobi i 7,5 g kakao praha). Nadalje, vidljiva je velika razlika parametara raspodjele veličine čestica za uzorke 1 i 4 kod svih parametara, što bi se moglo povezati sa vrijednostima viskoznosti pripremljenih smjesa, gdje je veća viskoznost ujedno i dovela do slabije učinkovitosti procesa mljevenja. Prema literaturnim podacima, proces mljevenja uvelike ovisi o svojstvima i strukturi samih materijala koji se melju (Jung i sur., 2018). Također, prema istraživanjima, udio vlage također igra važnu ulogu u procesu mljevenja, pri čemu materijali s višim udjelom vlage nakon završenog procesa mljevenja imaju viši udio čestica većih promjera (Moon i Yoon, 2017). U ovom istraživanju nije utvrđena jasna povezanost između sadržaja vlage u uzorku i veličine čestica praha.

#### 4.2.2. Nasipna gustoća i svojstva tečenja

Mjerenje nasipne gustoće je od velike važnosti u industriji za prilagođavanje skladištenja, obrade, uvjeta pakiranja i distribucije. Koristi se kao dio specifikacija za određeni konačni proizvod dobiven mljevenjem ili sušenjem (Barbosa-Canovas i sur., 2005). U tablici 3



prikazane su vrijednosti nasipne gustoće uzoraka nakon 0 udaraca i nakon 1250 udaraca te su ti podaci korišteni za izračunavanje svojstava tečenja prema Hausnerovom omjeru i Carrovom indeksu koji su također prikazani u tablici.

**Tablica 3.** Vrijednosti nasipne gustoće kakao prahova pri 0 i 1250 udaraca; Hausnerov omjer (HR); Carrov indeks (Ic)

| UZORAK | $\rho_0$ (g/cm <sup>3</sup> ) | $\rho_{1250}$ (g/cm <sup>3</sup> ) | HR             | Ic              |
|--------|-------------------------------|------------------------------------|----------------|-----------------|
| 1      | 0,6319 ± 0,032                | 0,7833 ± 0,039                     | 1,2394 ± 0,062 | 23,9437 ± 1,197 |
| 2      | 0,6777 ± 0,034                | 0,7940 ± 0,040                     | 1,0779 ± 0,054 | 17,1429 ± 0,857 |
| 3      | 0,6790 ± 0,034                | 0,7954 ± 0,040                     | 1,1714 ± 0,059 | 17,1429 ± 0,857 |
| 4      | 0,6585 ± 0,033                | 0,9028 ± 0,045                     | 1,3709 ± 0,069 | 37,0968 ± 1,855 |
| 5      | 0,6691 ± 0,033                | 0,7212 ± 0,036                     | 1,1428 ± 0,057 | 7,7922 ± 0,390  |
| 6      | 0,6952 ± 0,035                | 0,7945 ± 0,040                     | 1,1369 ± 0,057 | 14,2857 ± 0,714 |
| 7      | 0,6697 ± 0,033                | 0,7614 ± 0,038                     | 1,1714 ± 0,059 | 13,6986 ± 0,685 |
| 8      | 0,7726 ± 0,039                | 0,8830 ± 0,044                     | 1,2096 ± 0,060 | 14,2857 ± 0,714 |
| 9      | 0,7473 ± 0,037                | 0,9040 ± 0,045                     | 1,1428 ± 0,057 | 20,9677 ± 1,048 |

Kod svih uzoraka u tablici 3 može se primijetiti da nasipna gustoća raste s povećanjem broja udaraca kao posljedica istiskivanja zraka iz prostora između čestica. Vrijednosti nasipne gustoće pri 0 udaraca kreću se od 0,6319 ± 0,032 g/cm<sup>3</sup> (uzorak 1) do 0,7726 ± 0,039 g/cm<sup>3</sup> (uzorak 8) dok se vrijednosti pri 1250 udaraca kreću od 0,7212 ± 0,036 g/cm<sup>3</sup> (uzorak 5) do 0,9040 ± 0,045 g/cm<sup>3</sup> (uzorak 9).

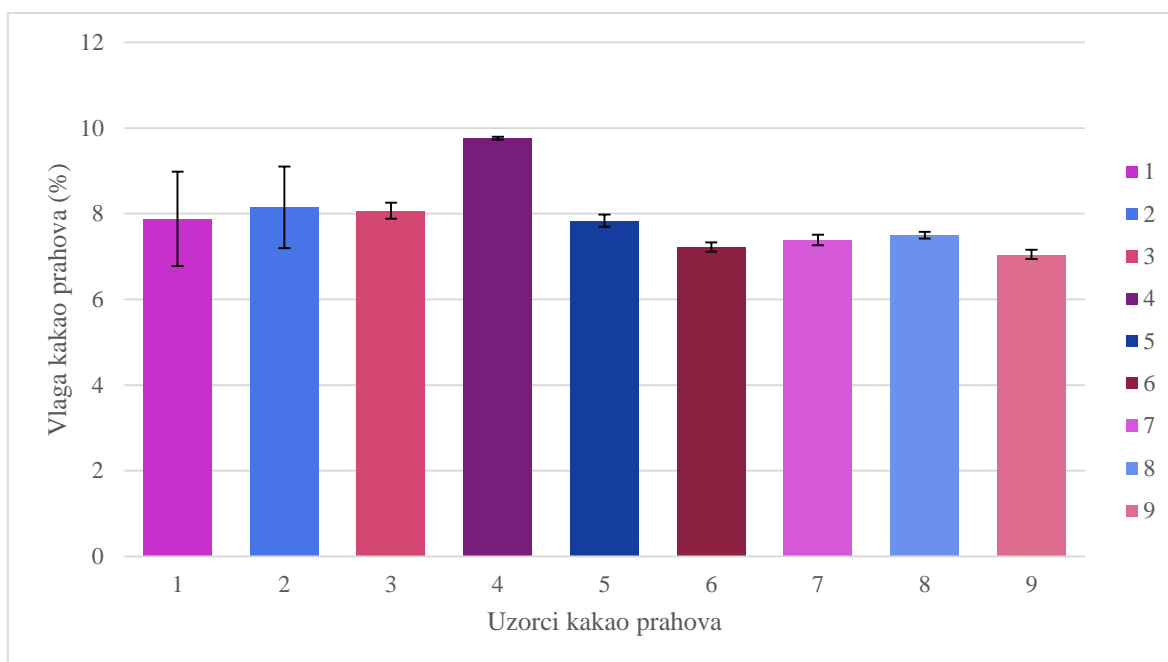
Najveću početnu gustoću (0 udaraca) imao je uzorak broj 8, dok je uzorak broj 1 imao najmanju početnu gustoću. Najveću promjenu vrijednosti nasipne gustoće, a time i najveću sklonost sabijanju, pokazuje uzorak broj 4 (19,4445 g meda, 23,7655 g zobi i 6,25 g kakao praha) s vrijednostima 0,6586 ± 0,033 g/cm<sup>3</sup> za 0 udaraca te 0,9028 ± 0,045 g/cm<sup>3</sup> za 1250 udaraca. Najmanju promjenu vrijednosti nasipne gustoće pokazuje uzorak broj 5 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 7,5 g kakao praha) s vrijednostima 0,6691 ± 0,033 g/cm<sup>3</sup> za 0 udaraca te 0,7212 ± 0,036 g/cm<sup>3</sup> za 1250 udaraca te time pokazuje i najnižu sklonost sabijanju. Prah s Hausnerovim omjerom manjim od 1,25 lako teče, dok oni s omjerom većim od 1,4 teže teku (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Prema tome, jedino uzorak broj 4 pokazuje loša svojstva

tečenja jer omjer za taj uzorak iznosi  $1,3709 \pm 0,069$ . Ovi su rezultati pokazali da se navedeni prahovi na bazi meda i zobi mogu proizvesti sa dobrim svojstvima tečenja te da ne bi trebali stvarati probleme kod industrijskog transporta i skladištenja. Carrov indeks veći od 25 smatra se pokazateljem slabog tečenja, a ispod 15 dobrog tečenja. Prema tome, jedino uzorak broj 4 pokazuje dobro tečenje. Kad se promatra utjecaj količine dodanog meda, zobi i kakao praha na vrijednosti nasipne gustoće, vidljivo je da uzorci koji sadrže najveći udio meda (2, 5 i 7) pokazuju manju promjenu u vrijednostima gustoće pri 0 i 1250 udaraca u usporedbi s onima s nižim udjelom meda, što se može objasniti činjenicom da s većim udjelom meda u uzorku postoji i veći udio viskoznih tvari i šećera koji povezuju smjesu i čine uzorak manje rastresitim i kompaktnijim. Kod udjela kakaa primijećeno je da najveću promjenu u vrijednostima nasipne gustoće pri 0 i 1250 udaraca pokazuju smjese sa 6,25 g dodanog kakao praha. Navedeno ukazuje na međuovisnost udjela zobi, meda i kakao praha u dizajnu sastava smjesa, te da navedene međuovisnosti igraju značajnu ulogu u svojstvima završnog proizvoda.

Belščak-Cvitanović i sur. (2010) u svojem su istraživanju također ispitivali fizikalna svojstva mješavina kakao napitaka u prahu pripremljenih od dva kakao praha s različitim sadržajem masti i različitim sladilima. Obični kakao prah pokazao je značajno manju nasipnu gustoću ( $383,31 \pm 9,42 \text{ kg/m}^3$ ) od mješavina kakao napitaka, koje sadrže šećere koji pokazuju veće vrijednosti nasipne gustoće. Najveća nasipna gustoća utvrđena je u smjesi s 10-12 % masnoće ( $862,20 \text{ kg/m}^3$ ) koja sadrži saharozu, palatinozu i eritritol te je ujedno imala najveći raspon veličine čestica. Ti rezultati ukazali su na visoku korelaciju između veličine čestica i nasipne gustoće smjesa za kakao napitke.

#### 4.2.3. Gravimetrijska analiza sadržaja vlage u uzorku

Kod proizvodnje prahova, važno je da se sadržaj vlage prilagodi tako da se održi kvaliteta praha zbog činjenice da trošak procesa mljevenja općenito ovisi o sadržaju vlage u uzorcima. Voda čini materijale mekšima te djeluje kao plastifikator, stoga se materijali s nižim sadržajem vlage lakše lome i usitnjavaju (Jung i sur., 2018).



**Slika 7.** Sadržaj vlage u uzorcima kakao prahova prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

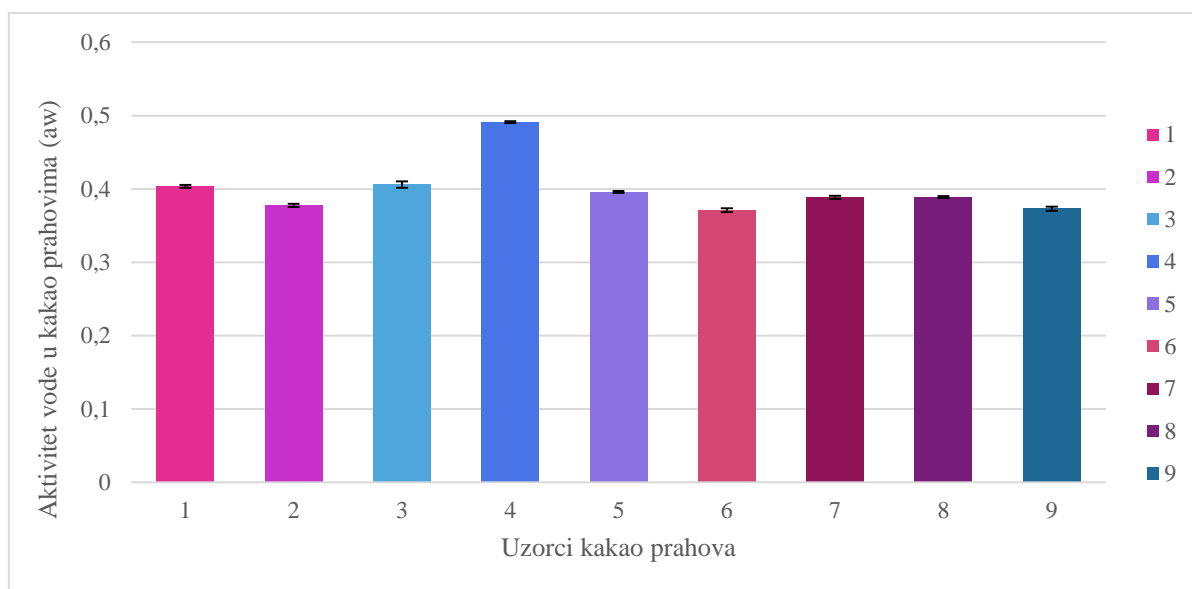
Rezultati mjerenja sadržaja vlage prikazani su na slici 7. Postotak vlage kreće se u rasponu od 7,05 % (uzorak broj 9) do 9,76 % (uzorak broj 4). Najniži postotak vlage izmjeren je kod uzorka 9, koji se sastoji od 21,605 g meda, 21,605 g zobi i 6,25 g kakao praha, a najviši postotak vlage kod uzorka broj 4, koji se sastoji od 19,4445 g meda, 23,7655 g zobi te 6,25 g kakao praha. Pošto su svi uzorci sušeni i skladišteni pod istim uvjetima, razlike u postotku vlage u uzorcima pripisuju se različitom sastavu smjesa. Najniži sadržaj vlage utvrđen je kod uzoraka 1, 6 i 9, koji sadrže med i zob u omjeru 50:50, dok je kod uzoraka s najnižim udjelom meda (3, 4 i 8) vlaga nakon sušenja bila najviša. Što se udjela kakaia tiče, nije vidljiv jasan utjecaj na sadržaj vlage proizvedenih prahova.

Hii i sur. (2009) u svojem radu ispitivali su učinak sušenja u tankom sloju uz korištenje prirodne sunčeve svjetlosti i vrućeg zraka unutar pećnice s ventilacijom, pri temperaturama zraka od 60 °C, 70 °C i 80 °C. Sušenje se obično prekida kada sadržaj vlage u suhom zrnu doseže 7,5 %. Sušenje se provodilo 8 sati dnevno, a zrna kakaovca ostavljena su da se temperiraju na sobnoj temperaturi preko noći. Temperiranje je uobičajena rutina u sušenju kakaovca i svrha je redistribucija unutarnje vlage prema vanjskom sloju zrna nakon svakog ciklusa sušenja. Određen je sadržaj vlage tako što su zrna vagana prije i nakon sušenja. Utvrđeno je 7,26 %, 6,72 %, 6,09 % i 3,74 % vlage za sušenje na suncu i u pećnici na 60 °C, 70 °C i 80 °C.

Hardiyanto i sur. (2021) proučavali su učinak kakaa u prahu i vremena kuhanja na pari na karakteristike praha kakao napitka. Korištene su dvije vrste kakao praha, kakao prah s udjelom masnoće 11 % i onaj s udjelom 27 %. Upotreba pare i procesa sušenja mijenja početni sadržaj vlage u kakao prahu. Rezultati su pokazali da bez obzira na vrstu kakaovog praha, sadržaj vlage se povećavao s vremenom kuhanja na pari. U usporedbi sa sadržajem vlage sirovih materijala, sadržaj vlage instantiziranog kakao praha bio je niži. Do toga je došlo zbog korištenja procesa sušenja nakon kuhanja na pari što je dovelo do isparavanja vode.

#### 4.2.4. Analiza aktiviteta vode

Aktivitet vode ( $a_w$ ) pouzdan je pokazatelj mikrobnog rasta, enzimske aktivnosti, očuvanja i kvalitete hrane (Nakagawa i Oyama, 2019). Način skladištenja i uvjeti prerade koji vladaju u proizvodnim područjima kakaa često uzrokuju onečišćenje plijesnima koje proizvode mikotoksine, stoga je poželjno da je aktivitet vode u kakao prahu što niži (Copetti i sur., 2014).



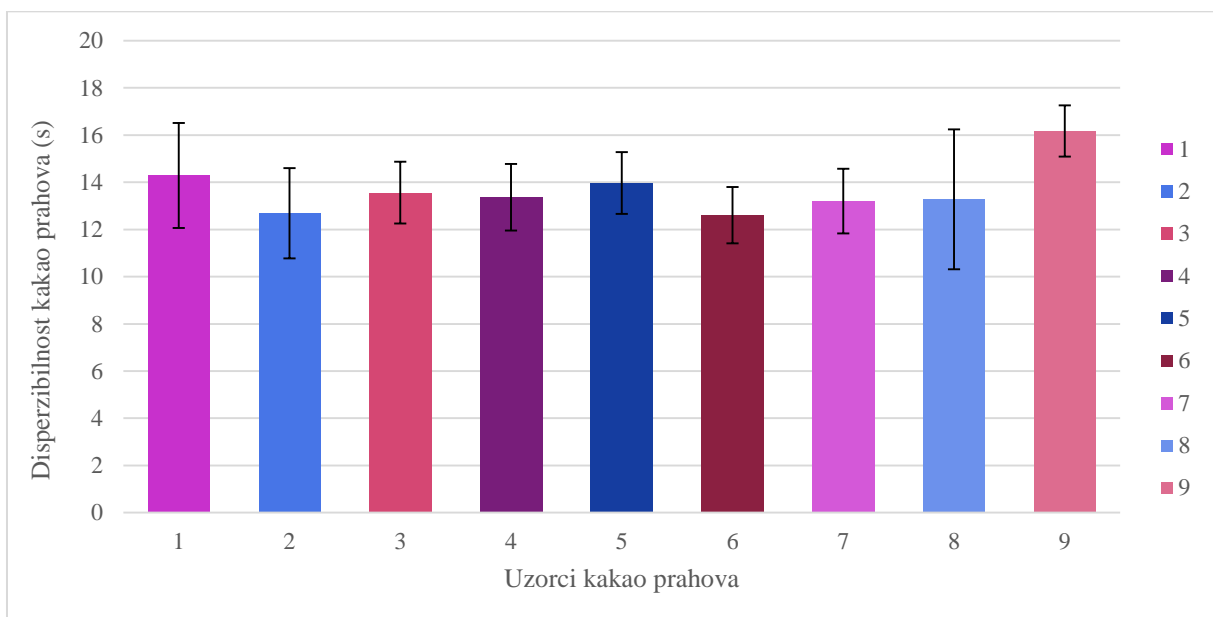
**Slika 8.** Aktivitet vode u uzorcima prahova prikazan kao srednja vrijednosti  $\pm$  SD ( $n=2$ )

U ovom radu, na slici 8 prikazani su aktiviteti vode u uzorcima koji se kreću u rasponu od 0,371 do 0,491. Uzorak broj 6 ima najmanji aktivitet vode (0,371) te sadrži 5 g kakao praha, zatim

slijede uzorak 9 (0,373), uzorak 2 (0,377), uzorak 7 (0,388), uzorak 8 (0,389), uzorak 5 (0,396), uzorak 1 (0,403), uzorak 3 (0,406) te najveći aktivitet vode ima uzorak 4 (0,491) koji sadrži 6,25 g kakao praha. Manji aktivitet vode imali su uzorci s manjim sadržajem kakao praha, dok za utjecaj udjela meda nije uočen pravilan trend.

#### 4.2.5. Analiza rekonstitucijskih svojstava

Otapanje prehrambenog praha, u ovom slučaju kakao praha, ima izravan utjecaj na percepciju potrošača o ukupnoj kvaliteti proizvoda. Disperzibilnost je definirana kao vrijeme koje je potrebno da se čestice praha u potpunosti otope ili rasprše u određenoj količini vode (Fang i sur., 2007).



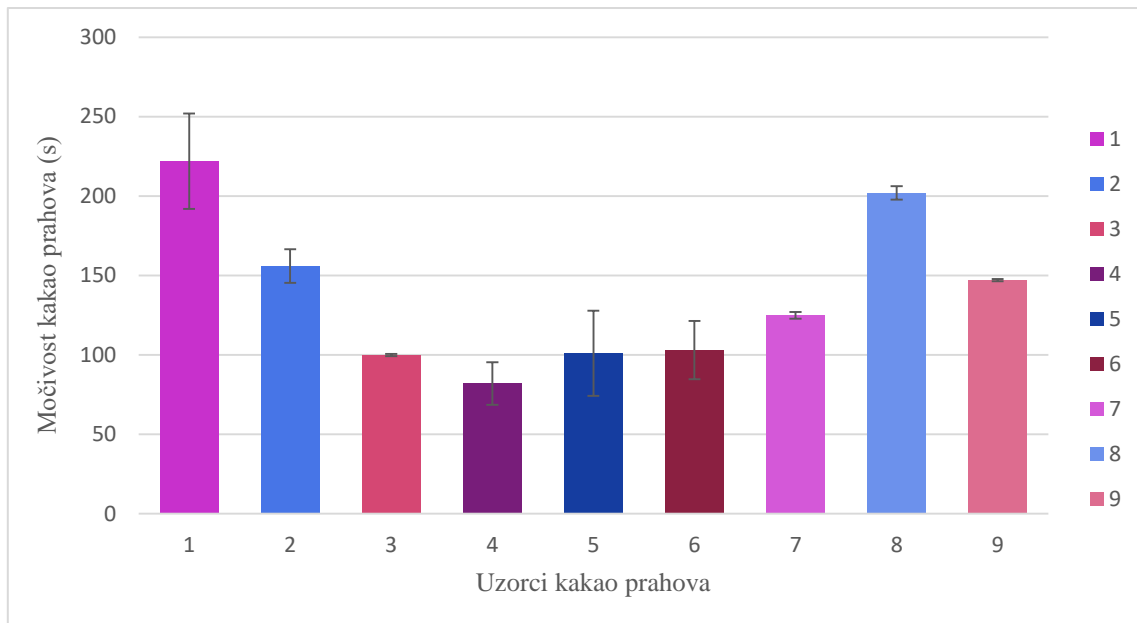
**Slika 9.** Disperzibilnost kakao prahova prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (n=3)

Najbolju disperzibilnost imao je uzorak broj 6 (12,61 s) koji sadrži 21,605 g meda, 21,605 g zobi te 5 g kakao praha, dok je najlošiju disperzibilnost pokazao uzorak broj 9 (16,17 s) koji sadrži 21,605 g meda, 21,605 g zobi te 6,25 g kakao praha (slika 9). Dobru disperzibilnost također su pokazali uzorci broj 2 (12,69 s) sa 6,25 g kakao praha i 7 (13,2 s) s 5 g kakao praha. Uzorci broj 3 (13,56 s), 4 (13,36 s) i 8 (13,28 s) pokazuju srednje dobru disperzibilnost dok

uzorci 1 (14,29 s) i 5 (13,97 s) sa sadržajem kakao praha 7,5 g pokazuju lošiju disperzibilnost. Iz navedenih rezultata vidljivo je da su uzorci s manjim sadržajem kakao praha imali bolju disperzibilnost, što se može objasniti činjenicom da sam kakao sadrži 12 % masti, koja je uglavnom orijentirana prema površini čestica, te čestice malih promjera, što uvelike degradira njegova rekonstitucijska svojstva (Benković i sur., 2015).

Proces aglomeracije s vodenom parom jedna je od metoda proizvodnje kakao praha koji se lako otapa u vodi. Istraživanje koje su proveli Hardiyanto i sur. (2021) imalo je za cilj ispitati učinak kakaa u prahu te vremena kuhanja na pari na karakteristike praha kakao napitka. Što je veća vrijednost disperzibilnosti, više će biti netopljivih krutih tvari. Rezultati istraživanja pokazali su da se disperzibilnost kakao praha s 27 % masnoće nije značajno promijenila pri  $p < 0,05$ , dok je kakao prah s 11 % masnoće imao tendenciju smanjenja disperzibilnosti. Trajanje kuhanja na pari nije značajno utjecalo ( $p < 0,05$ ) na vrijednost disperzibilnosti kakao praha s 27 % masnoće, međutim, trajanje kuhanja na pari utjecalo je na vrijednost disperzibilnosti kakao praha s 11 % masnoće. Vrijednost disperzibilnosti imala je sklonost smanjenju s povećanjem trajanja kuhanja na pari.

Močivost je sposobnost čestica praha da prevladaju površinsku napetost između praha i vode. Čestica koja se ne navlaži dovoljno dovest će do postupnog sljepljivanja čestica, stoga je močivost važno rekonstitucijsko svojstvo (Fang i sur., 2007).



**Slika 10.** Močivost kakao prahova prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (n=3)

Najbolju močivost imao je uzorak broj 4 (82 s) koji sadrži 19,4445 g meda, 23,7655 g zobi te 6,25 g kakao praha, dok je najlošiju močivost pokazao uzorak broj 1 (222 s) koji sadrži 21,605 g meda, 21,605 g zobi te 7,5 g kakao praha. Uzorci broj 3 (100 s), 5 (101 s) i 6 (103 s) imali su približno iste vrijednosti močivosti, dok su uzorci broj 2 (156 s), 7 (125 s), 8 (202 s) i 9 (147 s) imali više vrijednosti. Kao i kod rezultata disperzibilnosti, u slučaju močivosti također se može uočiti da su uzorci s manjim sadržajem kakao praha imali bolju močivost (slika 10), dok značajnije promjene u močivosti s različitim udjelima meda i zobi nisu utvrđene.

#### 4.2.6. Boja kakao prahova

Tablica 4 prikazuje srednje vrijednosti 5 parametara boje kakao prahova, od kojih svaki parametar predstavlja određenu vrijednost.

**Tablica 4.** Parametri boje kakao prahova prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

| UZORAK | $L^*$            | $a^*$            | $b^*$            | Chroma           | Hue              |
|--------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1      | 45,41 $\pm$ 0,01 | 10,70 $\pm$ 0,01 | 7,1 $\pm$ 0,02   | 12,85 $\pm$ 0,01 | 33,60 $\pm$ 0,04 |
| 2      | 43,02 $\pm$ 0,01 | 12,31 $\pm$ 0,01 | 8,81 $\pm$ 0,01  | 15,14 $\pm$ 0,01 | 35,59 $\pm$ 0,02 |
| 3      | 41,73 $\pm$ 0,02 | 11,96 $\pm$ 0,02 | 7,87 $\pm$ 0,04  | 14,32 $\pm$ 0,03 | 33,36 $\pm$ 0,08 |
| 4      | 43,36 $\pm$ 0,02 | 11,08 $\pm$ 0,02 | 8,06 $\pm$ 0,01  | 13,71 $\pm$ 0,01 | 36,04 $\pm$ 0,06 |
| 5      | 44,47 $\pm$ 0,01 | 12,05 $\pm$ 0,01 | 8,59 $\pm$ 0,01  | 14,80 $\pm$ 0,01 | 35,47 $\pm$ 0,02 |
| 6      | 41,53 $\pm$ 0,00 | 12,39 $\pm$ 0,02 | 9,30 $\pm$ 0,01  | 15,50 $\pm$ 0,01 | 36,91 $\pm$ 0,05 |
| 7      | 48,33 $\pm$ 0,30 | 12,94 $\pm$ 1,68 | 9,56 $\pm$ 0,22  | 14,63 $\pm$ 0,04 | 41,14 $\pm$ 0,43 |
| 8      | 44,78 $\pm$ 0,03 | 12,32 $\pm$ 0,01 | 9,89 $\pm$ 0,01  | 15,79 $\pm$ 0,01 | 38,41 $\pm$ 0,57 |
| 9      | 47,97 $\pm$ 0,04 | 12,22 $\pm$ 0,02 | 11,01 $\pm$ 0,05 | 16,45 $\pm$ 0,05 | 42,03 $\pm$ 0,11 |

$L^*$  vrijednost predstavlja svjetlinu uzorka te je iz podataka vidljivo da uzorak broj 6, koji sadrži omjer med/zob 50:50 (21,605 g meda i 21,605 g zobi) i 5 g kakao praha, ima najmanju vrijednost (41,53  $\pm$  0) što bi značilo da je taj uzorak najsvjetliji, dok uzorak broj 7, koji sadrži omjer med/zob 60:40 (23,7655 g meda i 19,4445 g zobi) i 5 g kakao praha, ima najveću vrijednost (48,33  $\pm$  0,30) te je taj uzorak najtamniji. Svi uzorci imaju  $a^*$  vrijednosti, koje predstavljaju raspon od zelene ( $-a$ ) do crvene ( $+a$ ) pozitivne i kreću se od 10,70  $\pm$  0,01 (uzorak 1) do 12,94  $\pm$  1,68 (uzorak 7), što znači da je boja uzorka u crvenoj domeni. Pozitivne su također i  $b^*$  vrijednosti uzorka, koje predstavljaju raspon od plave ( $-b$ ) do žute ( $+b$ ), što znači da je boja uzorka u žutoj domeni, a vrijednosti se kreću od 7,1  $\pm$  0,02 (uzorak 1) do 11,01  $\pm$  0,05 (uzorak 9). Chroma vrijednost predstavlja zasićenje boje, a vrijednosti kod ispitivanih uzorka kreću se od 12,85  $\pm$  0,01 (uzorak 1) do 16,45  $\pm$  0,05 (uzorak 9). Hue vrijednosti (ton, kut boje) kreću se od 33,36  $\pm$  0,08 (uzorak 3) do 42,03  $\pm$  0,11 (uzorak 9).

Postoji nekoliko čimbenika koji utječu na  $L^*$  vrijednost kakao praha, uključujući proces aglomeracije, sastav sastojaka i udio sastojaka. Hardiyanto i sur. (2021) ispitivali su učinak dvije vrste kakao praha (11 % masnoće i 27 % masnoće) na karakteristike boje prahova s procesom kuhanja na pari. Rezultati su pokazali da je bez obzira na vrijeme kuhanja na pari,



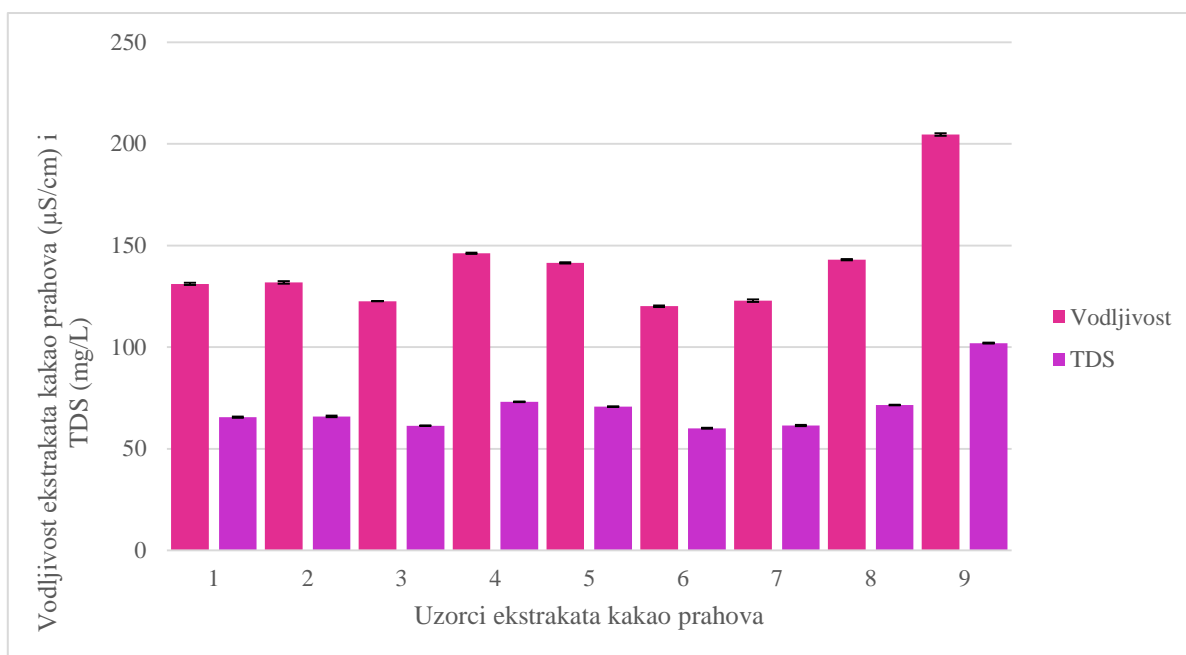
kakao napitak u prahu napravljen od kakao praha s 27 % masnoće imao veće  $L^*$  vrijednosti nego kakao napitak u prahu s 11 % masnoće, što je dovelo do zaključka da sadržaj masti utječe na  $L^*$  vrijednost. Što je veći sadržaj masti, to je veća  $L^*$  vrijednost. Što se tiče  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti, rezultati su pokazali iste zaključke. Ovo je pokazalo da je utjecaj sadržaja masti bio izraženiji od utjecaja vremena kuhanja na pari.

Kakao prah vrlo je vrijedan globalni proizvod koji se može pomiješati s jeftinim sirovinama poput brašna od rogača jer male količine tog brašna ne bi promijenile boju, miris i okusne karakteristike konačnog proizvoda. Upravo iz tog razloga, Quelal-Vásconez i sur. (2018) istraživali su utjecaj različitog stupnja alkalizacije i pH na parametre boje kakao praha i brašna od rogača radi krivotvorenja. Rezultati su pokazali da su uzorci s niskom svjetlinom ( $L^*$  vrijednosti) i visokim pH bili alkalni uzorci kakaovca, dok su uzorci s niskom svjetlinom ( $L^*$  vrijednosti) i niskim pH bili pečeno brašno rogača.

### **4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA PRAHOVA**

#### **4.3.1. Vodljivost i ukupne otopljene tvari ekstrakata**

Električna vodljivost definira se kao sposobnost medija, najčešće vodenih otopina, da provodi električnu struju i recipročna je mjera električnom otporu (Rhoades, 1996). Uz električnu vodljivost često se veže i pojam TDS, koncentracija ukupnih otopljenih čvrstih tvari. Na slici 11 prikazane su izmjerene vrijednosti vodljivosti i TDS ekstrakata.



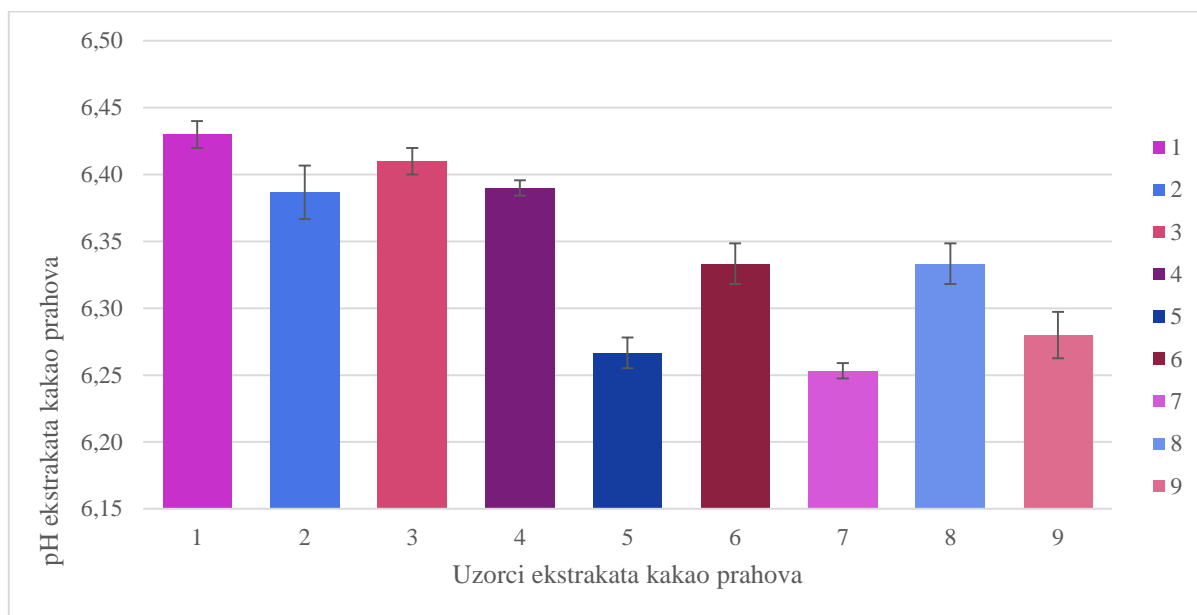
**Slika 11.** Vodljivost i TDS ekstrakata kakao prahova prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

Vrijednosti za vodljivost uzoraka kretale su se od 120,17  $\mu$ S/cm (uzorak 6) do 204,67  $\mu$ S/cm (uzorak 9). Najmanju vodljivost pokazali su uzorci broj 6 (50:50, 5 g kakao praha), 3 (40:60, 5 g kakao praha) i 7 (60:40, 5 g kakao praha), dok su najveću vodljivost pokazali uzorci broj 9 (50:50, 6,25 g kakao praha), 4 (40:60, 6,25 g kakao praha) i 8 (40:60, 7,5 g kakao praha). Iz navedenih vrijednosti može se zaključiti da nije vidljiv jasan utjecaj omjera med/zob na vodljivost ekstrakata, dok je vidljivo da su uzorci s većim sadržajem kakao praha pokazali veću vodljivost.

Što se tiče vrijednosti za TDS, one prate vrijednosti vodljivosti, što znači da su najmanji TDS pokazali uzorci broj 6 (50:50, 5 g kakao praha), 3 (40:60, 5 g kakao praha) i 7 (60:40, 5 g kakao praha), dok su najveće vrijednosti za TDS pokazali uzorci broj 9 (50:50, 6,25 g kakao praha), 4 (40:60, 6,25 g kakao praha) i 8 (40:60, 7,5 g kakao praha). Vrijednosti se kreću od 60,1 mg/L (uzorak 6) do 102 mg/L (uzorak 9).

### 4.3.2. pH vrijednost ekstrakata

pH-vrijednost je broj koji služi kao mjera kiselosti, odnosno lužnatosti vodenih otopina, a izražava se kao negativan dekadski logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini. Više pH vrijednosti dovode do niže koncentracije arome i veće prisutnosti smeđih spojeva (Serra Bonvehi i Ventura Coll, 2002).

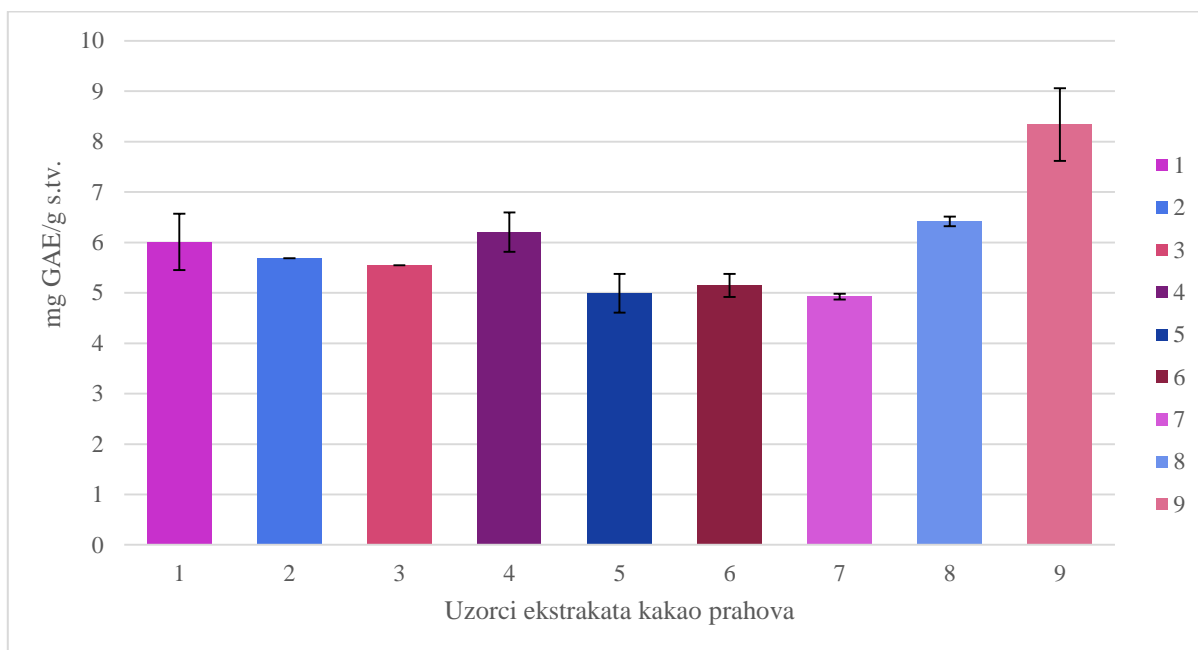


**Slika 12.** pH vrijednosti ekstrakata prahova prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3)

Na slici 12 prikazane su izmjerene pH vrijednosti ekstrakata. Vrijednosti se kreću od 6,25 (uzorak 7) do 6,43 (uzorak 1). Sve izmjerene vrijednosti nalaze se u kiselom području pH. Najniža pH vrijednost izmjerena je kod uzorka broj 7 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 5 g kakao praha), dok je najviša pH vrijednost izmjerena kod uzorka broj 1 (21,605 g meda, 21,605 g zobi i 7,5 g kakao praha). Omjer med/zob nije pokazao utjecaj na pH vrijednosti ekstrakata, dok je manji sadržaj kakao praha pokazao niže vrijednosti pH, a veći sadržaj kakao praha više vrijednosti pH.

### 4.3.3. Određivanje ukupnih polifenola

Postoje brojne studije koje su istraživale utjecaj polifenola iz kakaa na ljudsko zdravlje i funkcije organizma. Kakao i njegovi proizvodi bogati su izvori polifenola poput flavanola. Ovi spojevi djeluju antioksidativno i protuupalno, što je odgovorno za učinke kakaa na zdravlje (Sorrenti i sur., 2020).



**Slika 13.** Sadržaj ukupnih polifenola pripremljenih ekstrakata kakao prahova prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

Sadržaj ukupnih polifenola u ovom radu izražen je kao mg GAE/g s.tv. i prikazan je na slici 13. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima kreće se od 4,93 mg GAE/g s.tv. (uzorak 7) do 8,34 mg GAE/g s.tv. (uzorak 9). Najniži sadržaj ukupnih polifenola imao je uzorak broj 7 (23,7655 g meda, 19,4445 g zobi i 5 g kakao praha), dok je najviši sadržaj ukupnih polifenola imao uzorak broj 9 (21,605 g meda, 21,605 g zobi i 6,25 g kakao praha). Najviši sadržaj polifenola pokazali su uzorci s omjerima med/zob 50:50 (uzorak 9), 40:60 (uzorak 8) i 40:60 (uzorak 4) te ujedno imaju najveći sadržaj kakao praha, dok su najniži sadržaj polifenola pokazali uzorci s omjerima med/zob 60:40 (uzorak 7), 60:40 (uzorak 5) i 50:50 (uzorak 6) te su ti uzorci ujedno imali najmanji sadržaj kakao praha. Kakao prah je namirnica bogata polifenolima, stoga su uzorci s većim sadržajem kakao praha imali i veći sadržaj ukupnih polifenola sukladno pretpostavkama prije mjerenja.

Lee i sur. (2003) u svom istraživanju određivali su sadržaj polifenola u kakao prahu te ostalim namirnicama koje sadrže veće količine polifenola. Rezultati su pokazali da kakao prah sadrži 611 mg ekvivalenta galne kiseline po serviranju (7,3 grama kakao praha) te 564 mg ekvivalenta epikatehina po serviranju. Također je određeno da su takve vrijednosti ekvivalenta galne kiseline za oko 1,8; 3,7 i 4,9 puta veće nego vrijednosti dobivene kod crnoga vina, zelenoga čaja i crnoga čaja.

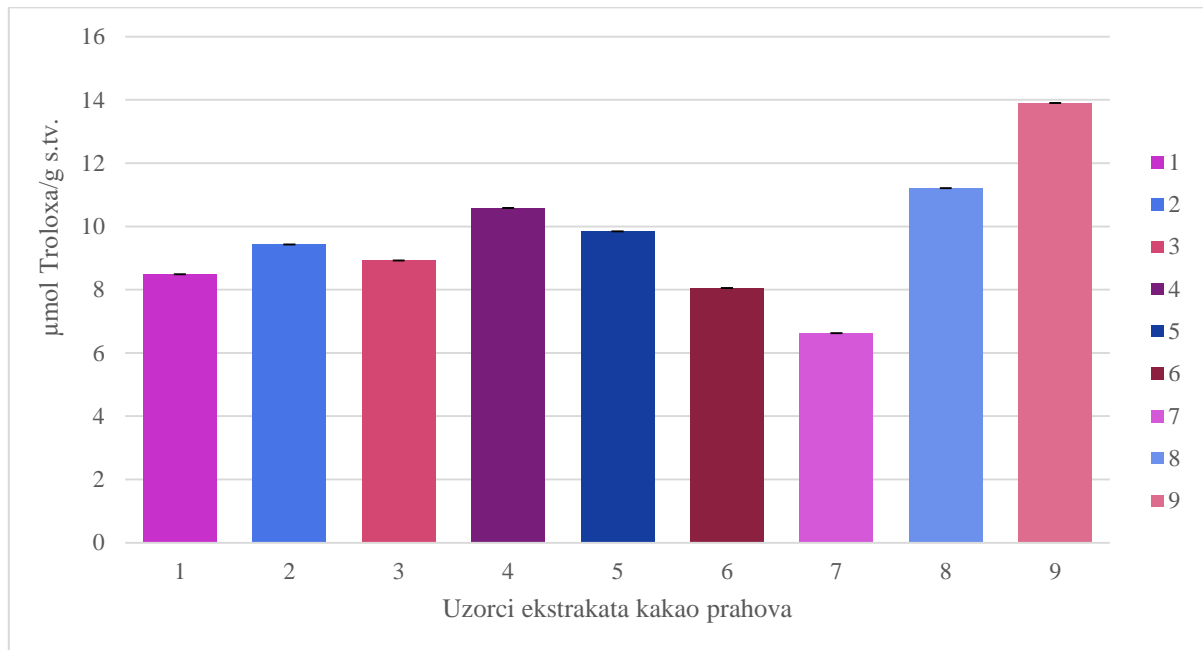
Tri glavne skupine polifenola u nefermentiranom zrnu kakaovca su flavan-3-oli ili katehini, antocijanini i proantocijanidini, s prosječnim sadržajem od 120-180 g/kg. Glavni polifenolni spoj u svježem zrnu kakaovca je (-)-epikatehin s prosječnim sadržajem od 21-43 mg/g odmašćenog uzorka, a zatim (+)-katehin te dimeri i trimeri ovih spojeva. Složeni produkti izmjene katehina i tanina daju smeđu i ljubičastu boju zrnu kakaovca, a leukoantocijanini su prisutni kao glikozidi (Ackar i sur., 2013). Sadržaj polifenola može uvelike varirati ovisno o izvoru zrna, uvjetima primarne i sekundarne obrade te procesu izrade čokolade. Zbog ovih čimbenika malo je vjerojatno da će omjer i vrste polifenola pronađenih u zrnu kakaovca biti isti kao oni koji se nalaze u gotovim proizvodima. Alkalizacija kakao praha će smanjiti sadržaj polifenola i antioksidativno djelovanje (Jalil i Ismail, 2008).

U studiji koju su proveli Lobo i sur. (2017) primijenjeno je sušenje u pjenu na Tommy Atkins mango korištenjem višefaktorskog dizajna, uz učinak sojinog lecitina i karboksimetilceluloze koji se koriste kao stabilizatori pjene (0–1,50 g/100 g), kao i temperatura (53–87 °C), na sadržaj fenola te je procijenjen antioksidativni kapacitet manga. Rezultati su pokazali da sojin lecitin i temperatura imaju negativan učinak ( $p < 0,05$ ) na sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet, dok karboksimetil celuloza ima pozitivan učinak ( $p < 0,05$ ). Povećanje ukupne količine fenolnih spojeva prisutnih u sušenom mangu pridonijelo je većem antioksidativnom kapacitetu nakon procesa sušenja. Ovo je istraživanje zaključilo da su temperatura sušenja od 80 °C i koncentracija od 0,30 g/100 g karboksimetil celuloze i sojinog lecitina optimalni za povećano zadržavanje fenolnih spojeva i antioksidativni kapacitet.

#### 4.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Na slici 14 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata koja je određena DPPH metodom. Navedena metoda omogućuje mjerenje antioksidacijske aktivnosti praćenjem

reakcije između antioksidansa i stabilnog radikala, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (Brand-Williams i sur., 1995). Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$



**Slika 14.** Antioksidacijska aktivnost ekstrakata kakao prahova određena DPPH metodom i izražena kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n=2$ )

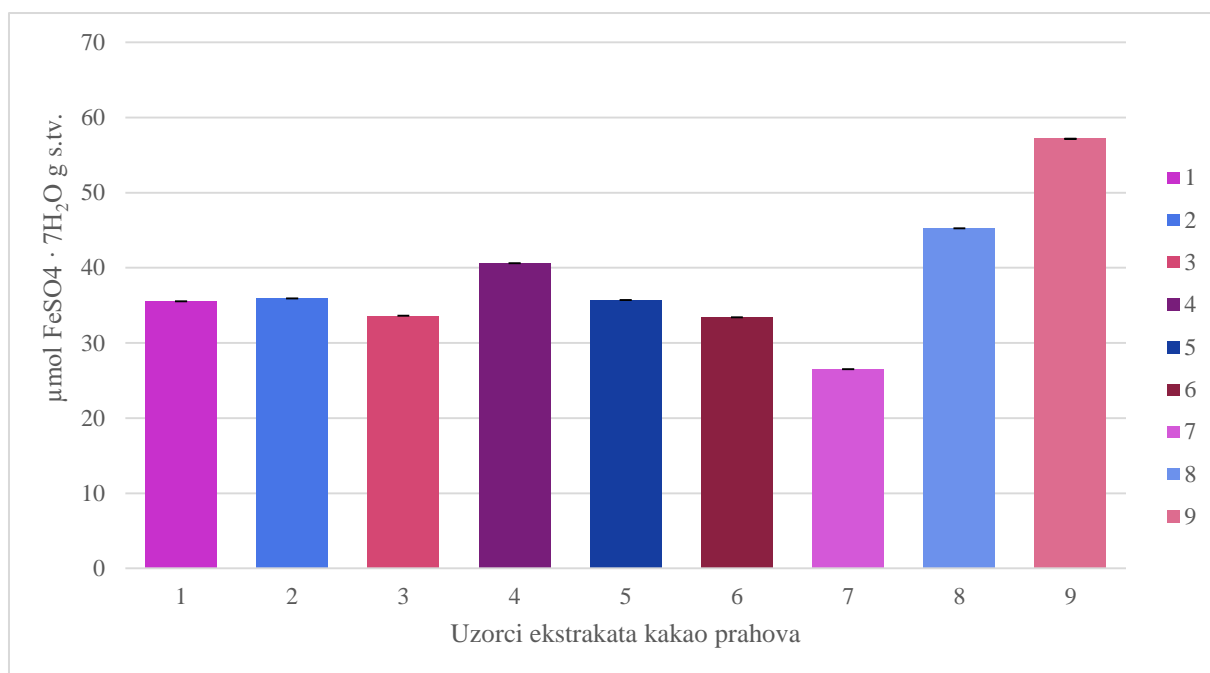
Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata kreću se od 6,63  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 7) do 13,90  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 9). Najmanja antioksidacijska aktivnost izmjerena je kod uzoraka broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha), 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) i 1 (50:50, 7,5 g kakao praha), dok su najveće vrijednosti izmjerene kod uzoraka broj 9 (50:50, 6,25 g kakao praha), 8 (40:60, 7,5 g kakao praha) i 4 (40:60, 6,25 g kakao praha). Usporedimo li rezultate antioksidacijske aktivnosti ekstrakata s rezultatima ukupnog sadržaja polifenola, možemo vidjeti da se rezultati podudaraju, kao što se i očekivalo, odnosno, uzorci s manjim sadržajem kakao praha imali su i manju antioksidacijsku aktivnost (kao i manji sadržaj polifenola), dok su uzorci s većim sadržajem kakao praha imali i veću antioksidacijsku aktivnost (kao i veći sadržaj polifenola), zbog činjenice da je kakao prah bogat polifenolima, a tako i antioksidansima. Što se tiče utjecaja omjera med/zob na antioksidacijsku aktivnost, iz rezultata je vidljivo da su manju antioksidacijsku aktivnost pokazali uzorci s omjerom med/zob 60:40, dok su veću antioksidacijsku aktivnost pokazali uzorci s omjerom med/zob 40:60.

U istraživanju koje su proveli Lee i sur. (2003), vrijednost antioksidacijske aktivnosti kakao praha mjerena je DPPH metodom te je iznosila 836 mg ekvivalenta askorbinske kiseline po serviranju (7,3 grama) te je zaključeno da kakao prah ima značajan antioksidativni kapacitet, 4-5 puta jači od crnog čaja, 2-3 puta jači od zelenog čaja i 2 puta jači od crnog vina.

Jean-Marie i sur. (2021) u svojem su istraživanju usporedili rezultate antioksidacijske aktivnosti dva varijeteta kakaovca (divlji kakaovac Francuske Gvajane „Guiana“ i „Forastero“) te su rezultati pokazali da je varijetet „Forastero“ imao veću antioksidacijsku vrijednost i prije i nakon fermentacije.

#### 4.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata određivana je i drugom metodom, FRAP metodom te su vrijednosti prikazane na slici 15. Navedena metoda temelji se na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) te dolazi do promjene boje otopine u modru prijelazom iz  $Fe^{3+}$  oblika kompleksa u  $Fe^{2+}$  uslijed redukcije od strane antioksidanasa (Antolovich i sur., 2002). Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol } FeSO_4 \cdot H_2O/g \text{ s.tv.}$



**Slika 15.** Antioksidacijska aktivnost ekstrakata kakao prahova određena FRAP metodom i izražena kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2)

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata kreću se u rasponu od 26,51  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  (uzorak 7) do 57,17  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  (uzorak 9). Najmanju antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom pokazali su uzorci broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha), 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) i 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha), dok su najveće vrijednosti pokazali uzorci broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha), 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha) i 4 (omjer med/zob 40:60, 6,25 g kakao praha). Kao i kod DPPH metode, uzorci s većim sadržajem kakao praha ujedno su i pokazali veću antioksidacijsku aktivnost, dok omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj.

Carlsen i sur. (2010) u svojem su radu određivali antioksidacijsku aktivnost raznih proizvoda pa tako i čokolade pomoću FRAP metode. Ono što su zaključili bilo je da srednji udio antioksidansa raste s povećanjem udjela kakaovca u čokoladnom proizvodu te njihovi podaci pokazuju da su čokoladni proizvodi s udjelom kaka a od 24-30 %, 40-65 % i 70-99 % imali srednji sadržaj antioksidansa od 1,8; 7,2 odnosno 10,9 mmol/100 g.

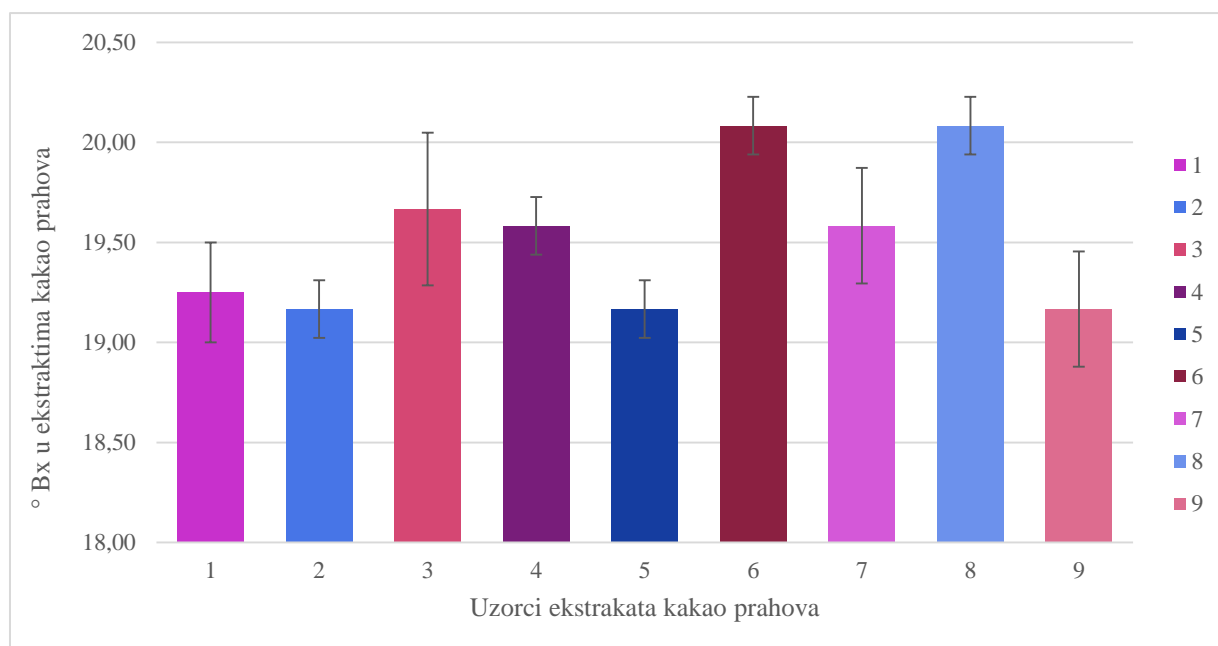
Kapacitet redukcije čistog kakaovog praha određen pomoću FRAP testa bio je 9,38 mM Fe(II) za kakao prah s 10-12 % masti i 9,01 mM za kakao prah sa 16-18 % masti u istraživanju koje su proveli Belščak-Cvitanović i sur. (2010), jer su FRAP vrijednosti eksperimentalnih smjesa



bile u rasponu od 2,23 mM Fe(II) u smjesi 10-12 % masti do 3,79 mM Fe(II) u smjesi 16-18 % masti. Prema utvrđenim rezultatima, sadržaj masti u kakaovom prahu ne utječe značajno ( $p > 0,05$ ) na antioksidativni kapacitet mješavina napitaka s kakaom prahom. Prema eksperimentalnim podacima, fenolni sadržaj i antioksidativni kapacitet smjesa za napitke od kakaovog praha trebaju pokazivati otprilike jednu trećinu antioksidativnog kapaciteta čistog kakaovca, jer sadrže 30 % kakaovog praha.

#### 4.3.6. Određivanje šećera po Brixu

Slika 16 prikazuje vrijednosti izmjerenih šećera po Brixu koje se kreću od 19,17 ° Bx (uzorci 2, 5 i 9) do 20,08 ° Bx (uzorci 6 i 8). "Stupanj" opisuje maseni udio saharoze u otopini, pri čemu 1 stupanj Brix (napisano ° Bx) znači 1 g saharoze na 100 g vodene otopine.



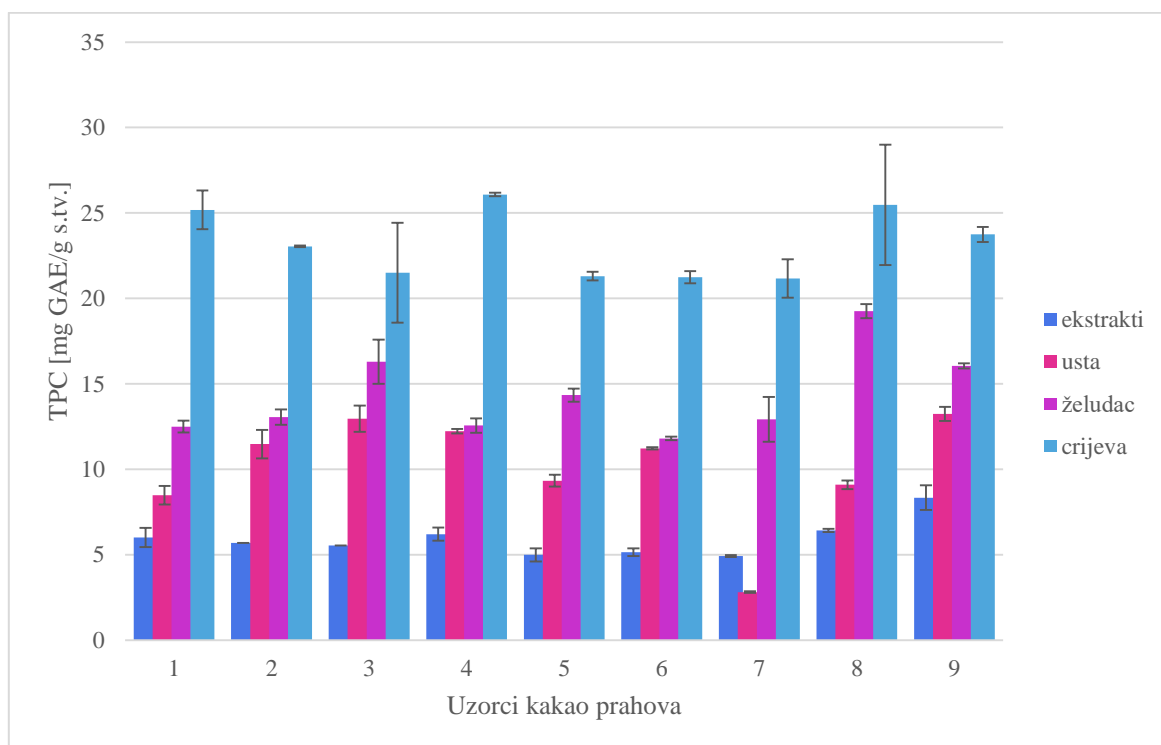
**Slika 16.** Vrijednosti izmjerenih šećera po Brixu u ekstraktima prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (n=3)

Najveći udio šećera izmjerenih po Brixu imali su uzorci 2 (60:40, 6,25 g kakaovog praha), 5 (60:40, 6,25 g kakaovog praha) i 9 (50:50, 6,25 g kakaovog praha), dok su najmanji udio šećera imali uzorci 6

(50:50, 5 g kakao praha) i 8 (40:60, 7,5 g kakao praha). Sukladno tome, uzorci s manjim sadržajem meda (omjeri 40:60 i 50:50) pokazali su manje vrijednosti ° Bx, odnosno manje izmjerenih šećera, dok su uzorci s većim sadržajem meda (omjeri 60:40) pokazali veće vrijednosti ° Bx. Kakao prah općenito ne sadrži šećer, stoga sadržaj kakao praha u uzorcima nije pokazao značajan utjecaj na vrijednosti ° Bx.

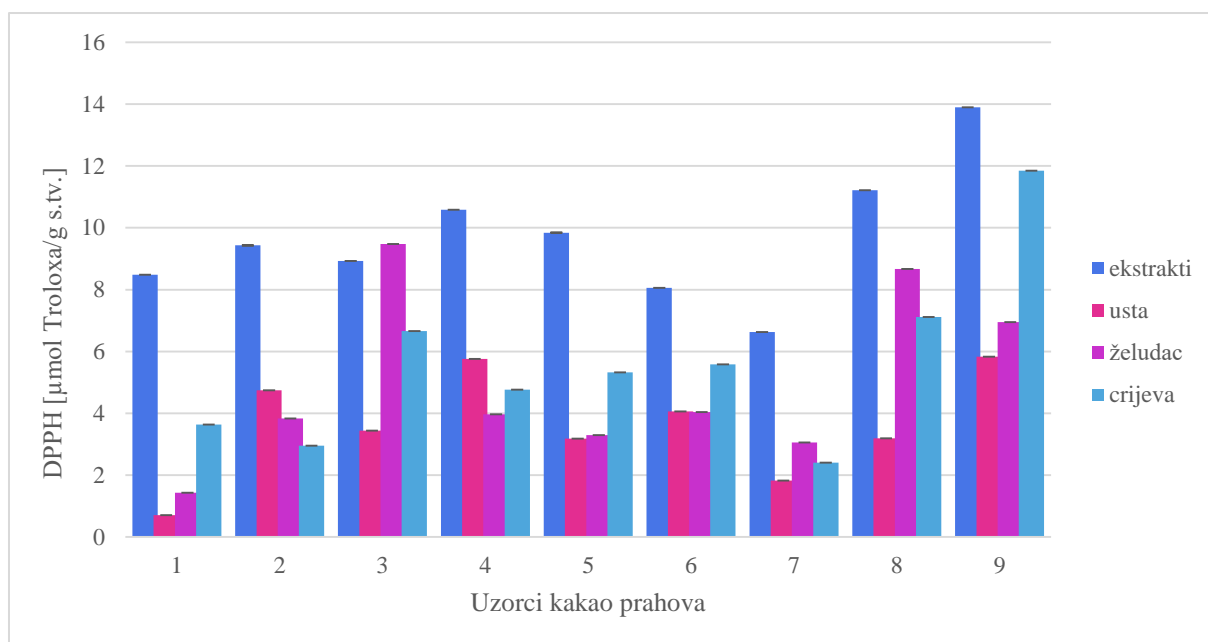
#### 4.3.7. Probavljivost (bioraspoloživost)

Pretpostavlja se da različiti čimbenici utječu na bioraspoloživost polifenola, među kojima su najčešće razmatrana uloga crijevne mikrobiote, struktura ovih spojeva, matrica hrane i pojava drugih tvari. Prethodno navedeni čimbenici određuju mjesto gdje se ovi bioaktivni spojevi probavljaju i apsorbiraju iz probavnog trakta, kao i put kojim se metaboliziraju (Oracz i sur., 2019).



**Slika 17.** Sadržaj ukupnih polifenola nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa

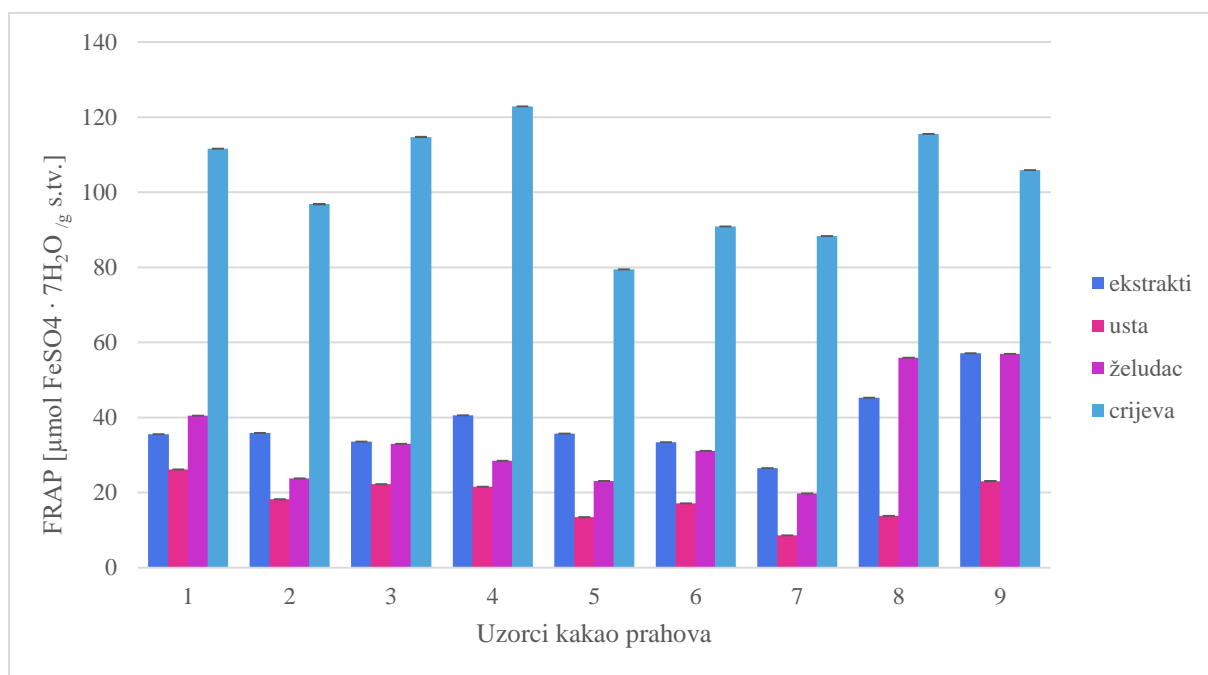
U ovom radu, za određivanje bioraspoloživosti, koristili su se uzorci prahova, a rezultati su prikazani na slici 17. Vrijednosti ukupnih polifenola u ekstraktima kreću se od 4,93 mg GAE/g s.tv. (uzorak 7) do 8,34 mg GAE/g s.tv. (uzorak 9). *In vitro* simulacija probavnog procesa započela je korakom koji simulira uvjete u ustima, zatim u želucu i naposljetku u tankom crijevu te je nakon tog koraka uzorcima izmjeren ukupan sadržaj polifenola. Sadržaj polifenola prikazan je kao mg GAE/g s.tv., a nakon simulacije uvjeta u ustima raspon se kreće od 2,82 mg GAE/g s.tv. (uzorak 7) do 13,24 mg GAE/g s.tv. (uzorak 9). Uzorak 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha) je pokazao znatno niži sadržaj polifenola u usporedbi s ostalim uzorcima. Najveći sadržaj izmjeren je kod uzoraka broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha) i 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha). Nakon simulacije uvjeta u želucu, sadržaj polifenola kreće se od 11,80 mg GAE/g s.tv. (uzorak 6) do 19,26 mg GAE/g s.tv. (uzorak 8). Najmanji sadržaj polifenola izmjeren je kod uzoraka broj 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) i 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha), dok je najveći sadržaj polifenola izmjeren kod uzoraka broj 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha) i 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha). Nakon simulacije uvjeta u tankom crijevu, raspon se kreće od 21,16 mg GAE/g s.tv. (uzorak 7) do 26,08 mg GAE/g s.tv. (uzorak 4). Najniži sadržaj polifenola izmjeren je kod uzoraka broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha) i 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha), dok je najveći sadržaj izmjeren kod uzoraka broj 4 (omjer med/zob 40:60, 6,25 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Kao što se i očekivalo, uzorcima s najvećim sadržajem kakao praha izmjeren je i najveći sadržaj polifenola, dok omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj. Kod svih je uzoraka primijećeno da je koncentracija polifenola veća u svakom sljedećem koraku probave. Do navedenog dolazi zbog varijacije u pH vrijednosti sa izrazito kisele (pH u želucu je podešen na 2) do približno neutralne (pH vrijednost u crijevima iznosila je 6,5), što dovodi do otpuštanja polifenola i flavonoida iz prirodnog matriksa (Sollano-Mendieta i sur., 2021). Interakcije između bioaktivnih spojeva kakaia i crijevnog bioma mogu povećati bioraspoloživost polifenola i stoga utjecati na njihove učinke na zdravlje (Oracz i sur., 2019).



**Slika 18.** Antioksidacijska aktivnost (DPPH) nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa

Na slici 18 prikazana je antioksidacijska aktivnost (DPPH metoda) uzoraka nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u ustima, želucu i crijevima. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima kreću se od 6,63  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 7) do 13,90  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 9). Najmanje vrijednosti pokazali su uzorci 7, 6 i 1, dok su najveće vrijednosti uočene kod uzoraka 9, 8 i 4. Raspon antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u ustima kreće se od 0,70  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 1) do 5,83  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 9). Najmanju antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom pokazali su uzorci broj 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha) i 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha), dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha) i 4 (omjer med/zob 40:60, 6,25 g kakao praha). Raspon antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u želucu kreće se od 1,43  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 1) do 9,48  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 3). Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci broj 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha) i 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha), dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 3 (omjer med/zob 40:60, 5 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Raspon antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u crijevima kreće se od 2,40  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 7) do 11,85  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  (uzorak 9). Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha) i 2 (omjer med/zob 60:40, 6,25 g kakao praha), dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 9

(omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Iz rezultata je vidljivo da su uzorci s većim sadržajem kakao praha uglavnom imali i veću antioksidacijsku aktivnost nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa. U crijevima je antioksidacijska aktivnost najviše izražena, do čega dolazi zbog varijacije u pH vrijednosti sa izrazito kisele (pH u želucu je podešen na 2) do približno neutralne (pH vrijednost u crijevima iznosila je 6,5), što dovodi do otpuštanja polifenola i flavonoida iz prirodnog matriksa, a posljedično tome i do porasta u vrijednostima DPPH (Sollano-Mendieta i sur., 2021). Acosta-Otálvaro i sur. (2022) istraživali su bioraspoloživost fenolnih spojeva u ekstraktima kakaia i kave koristeći DPPH antioksidativnu metodu pomoću *in vitro* modela. Dobiveni rezultati ukazali su da se fenolni spojevi prisutni u kavi i kakau odlikuju visokom bioraspoloživošću i vrijednim antioksidativnim kapacitetom.



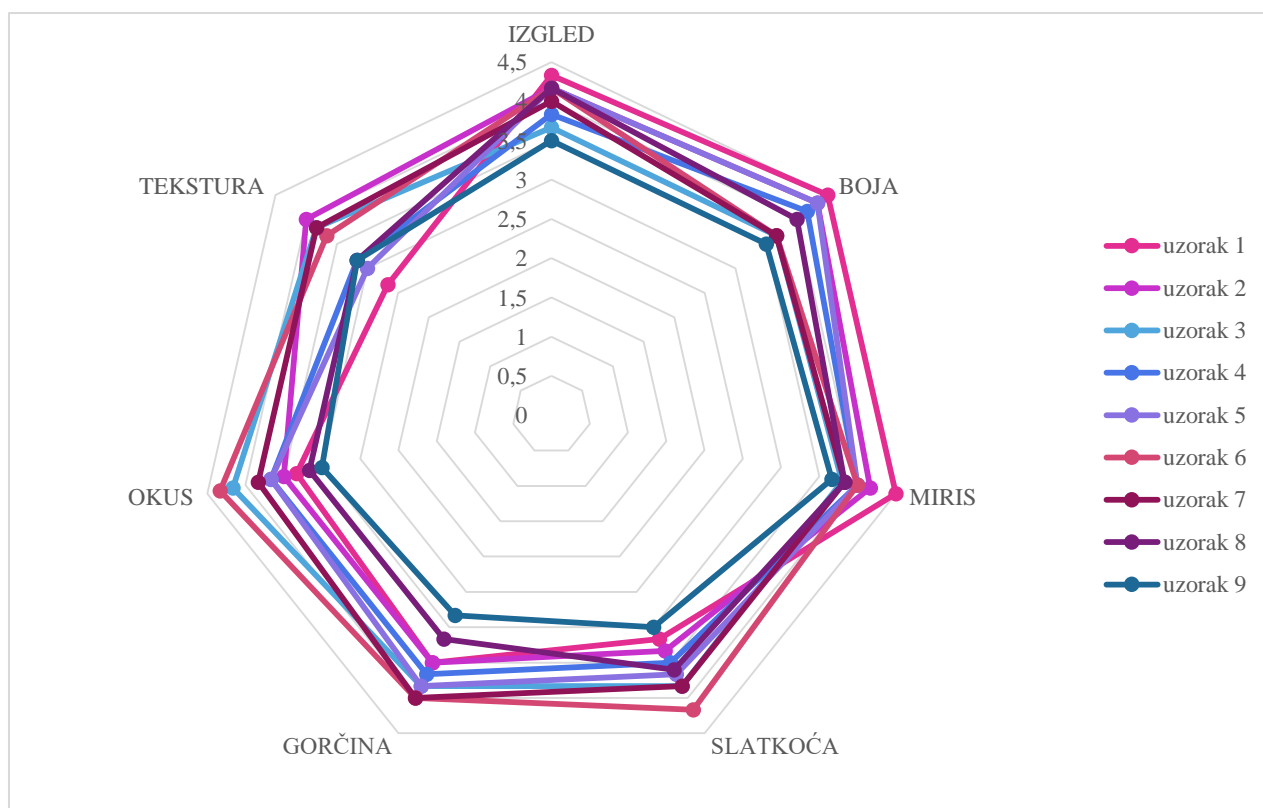
**Slika 19.** Antioksidacijska aktivnost (FRAP) nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa

Antioksidacijska aktivnost nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa određena je i FRAP metodom, a rezultati su prikazani na slici 19. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima kreću se od 26,52  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  (uzorak 7) do 57,17  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  (uzorak 9), a ujedno te vrijednosti nešto odskakuju od ostalih koje su u rasponu od 33,41  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  do 45,26  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  Raspon antioksidacijske

aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u ustima kreće se od 8,57  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 7) do 26,17  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 1). Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha) i 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha), dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha) i 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha). Raspon antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u želucu kreće se od 19,80  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 7) do 56,96  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 9). Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci broj 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha) i 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha), dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Raspon antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probavnog procesa u crijevima kreće se od 79,51  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 5) do 122,87  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  s.tv. (uzorak 4). Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci broj 5 i 7, dok su najveću aktivnost pokazali uzorci broj 4 (omjer med/zob 40:60, 6,25 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha). Kao i kod DPPH, uzorci s većim sadržajem kakao praha pokazali su veće antioksidacijske kapacitete.

#### **4.4. SENZORSKA SVOJSTVA KAKAO NAPITAKA**

Ocjene senzorske analize prikazane su na slici 20. Senzorsku analizu provodila je panel skupina koja je ocjenjivala 7 svojstava: izgled, boja, miris, slatkoća, gorčina, okus i tekstura pomoću svojih osjetila (vid, okus, njuh).



**Slika 20.** Ocjene senzorske analize pripremljenih kakao napitaka

Najbolje ukupne ocjene dobio je uzorak broj 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha), dok je najlošije ocjene dobio uzorak broj 9 (omjer med/zob 50:50, 6,25 g kakao praha). Za svojstvo izgleda, najbolju prosječnu ocjenu od 4,17 dobili su uzorci broj 2 (omjer med/zob 60:40, 6,25 g kakao praha), 5 (omjer med/zob 60:40, 7,5 g kakao praha), 6 (omjer med/zob 50:50, 5 g kakao praha) i 8 (omjer med/zob 40:60, 7,5 g kakao praha), dok je najnižu prosječnu ocjenu od 3,5 dobio uzorak broj 9. Za svojstvo boje, najbolju prosječnu ocjenu od 4,5 dobio je uzorak broj 1 (omjer med/zob 50:50, 7,5 g kakao praha), dok je najlošiju procjenu ocjenu od 3,5 dobio uzorak broj 9. Za svojstvo mirisa, najbolju prosječnu ocjenu od 4,5 dobio je uzorak broj 1, dok je najlošiju prosječnu ocjenu od 3,67 dobio uzorak broj 9. Za svojstvo slatkoće, najbolju prosječnu ocjenu od 4,17 dobio je uzorak broj 6, a najlošiju prosječnu ocjenu od 3,0 dobio je uzorak broj 9. Za svojstvo gorčine, najbolju prosječnu ocjenu od 4,0 dobili su uzorci broj 6 i 7 (omjer med/zob 60:40, 5 g kakao praha), dok je najlošiju ocjenu od 2,83 dobio uzorak broj 9. Za svojstvo okusa, najbolju prosječnu ocjenu 4,33 dobio je uzorak broj 6, dok je najlošiju ocjenu od 3,0 dobio uzorak broj 9. Naposljetku, za svojstvo teksture, najbolju prosječnu ocjenu od 4,0 dobio je uzorak broj 2, dok je najlošiju prosječnu ocjenu od 3,24 dobio uzorak broj 9. Prema navedenim rezultatima senzorske analize, može se zaključiti da je uzorak broj 9 (omjer med/zob

50:50, 6,25 g kakao praha) bio najlošije ocijenjen po svim svojstvima. Uzorci s većim sadržajem kakao praha panel grupa ocijenila je s nižom ukupnom ocjenom, prvenstveno zbog gorčine napitka. Gledajući najbolje i najlošije ocijenjeni uzorak, omjer med/zob nije imao značajan utjecaj na rezultate senzorske analize.

Belščak-Cvitanović i sur. (2010) također su ispitivali senzorska svojstva napitaka od kakao praha različitih karakteristika. Uočeno je da sadžaj masnoće kakao praha nije utjecao na osjetilnu percepciju potrošača. S obzirom na okus u ustima i slatkoću te uravnoteženost, prednost su pokazale mješavine sa šećerima (saharoza, glukoza, trehaloza). Najvišom ocjenom ocijenjena je smjesa koja je sadržavala zaslađivač aspartam/acesulfam K, no mješavine koju su sadržavale ekstrakt stevije pokazale su najuravnotežnije osobine s prosječnom ocjenom 6,14 koju je odredio panel. Takvi napitci bili su umjereno slatki, dobrog okusa te su osigurali dobro izbalansiran okus, što ukazuje na veliki potencijal korištenja ovog zaslađivača.

#### **4.5. OPTIMIRANJE SASTAVA SMJESE I VALIDACIJSKI POKUSI**

Nakon provedenih eksperimenata predviđenim dizajnom pokusa, provedeno je optimiranje sastava smjese primjenom profila poželjnosti. Optimalne vrijednosti dobivene modelom prikazane su u tablici 5. Zatim je proveden validacijski pokus sa smjesom optimalnog sastava te još dodatna dva, s aromatiziranim prahovima. Rezultati za validacijske uzorke (bez arome, aromatiziran malinom i aromatiziran narančom) također su prikazani u tablici 5.



**Tablica 5.** Optimalne vrijednosti dobivene modelom i rezultati za validacijske uzorke

| Uzorak  | Udio meda (%) | Masa kakaa (g/100 g) | Vlaga (%) | Nasipna gustoća (g/mL) | HR (°) | Aw (°) | Disperzibilnost (s) | Močivost (s) | L     | a     | b     | Chroma | Hue    | Vodljivost (µS/cm) | TDS (mg/L) | pH   | Brix (°) | TPC (mg GAE/g s.tv) | DPPH (µmol Trolox/g s.tv.) | FRAP µmol FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/g s.IV.) | Prosječna senzorska ocjena |
|---|---------------|----------------------|-----------|------------------------|--------|--------|---------------------|--------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------------------|------------|------|----------|---------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| <b>Modelom predviđeni optimum</b>                 | 45            | 5,625                | 7,965     | 0,728                  | 1,206  | 0,406  | 14,196              | 127,90       | 47,64 | -0,59 | -0,96 | 1,15   | 238,52 | 157,61             | 78,67      | 6,37 | 19,56    | 6,86                | 10,90                      | 44,44  | 3,79                       |
| <b>Validacijski uzorak (VAL)</b>                  | 45            | 5,625                | 8,595     | 0,769                  | 1,250  | 0,430  | 10,440              | 79,38        | 45,92 | -0,35 | -1,36 | 1,41   | 255,62 | 152,55             | 76,30      | 6,31 | 20,13    | 4,87                | 7,82                       | 25,13  | 4,11                       |
| <b>Validacijski aromatizirani malina (VAL M)</b>  | 45            | 5,625                | 8,896     | 0,813                  | 1,147  | 0,433  | 11,750              | 84,06        | 45,94 | 0,21  | -1,60 | 1,61   | 277,37 | 147,55             | 73,35      | 6,35 | 21,50    | 4,86                | 8,06                       | 28,95  | 3,91                       |
| <b>Validacijski aromatizirani naranča (VAL N)</b> | 45            | 5,625                | 9,042     | 0,799                  | 1,257  | 0,443  | 9,880               | 73,13        | 45,73 | -0,07 | -1,19 | 1,19   | 266,69 | 140,50             | 70,30      | 6,36 | 19,88    | 18,76               | 7,21                       | 24,92  | 3,40                       |

Rezultati za validacijske uzorke i optimalne vrijednosti dobivene modelom prikazani su u tablici 5. Modelom predviđeni udio meda iznosio je 45 %, a toliko je iznosio i za validacijske uzorke, također je predviđeno 5,625 g/100 g kakao praha. Modelom predviđeni sadržaj vlage iznosio je 7,965 %, dok su dobivene vrijednosti validacijskih uzoraka nešto više i kreću se u rasponu od 8,595 % (VAL) do 9,042 % (VAL N). Predviđeni optimum za vrijednosti nasipne gustoće iznosio je 0,728 g/mL, dok su vrijednosti za validacijske uzorke nešto više (0,769 g/mL za VAL, 0,813 g/mL za VAL M i 0,799 g/mL za VAL N). Predviđeni optimum za Hausnerov omjer (HR) iznosio je 1,206, dok su dobivene vrijednosti za validacijske uzorke više za validacijski uzorak (1,250) i za validacijski uzorak naranča (1,257), a niža vrijednost za validacijski uzorak malina (1,147). Modelom predviđeni optimum za aktivitet vode ( $a_w$ ) iznosio je 0,406, a dobiveni rezultati validacijskih uzoraka pokazali su malo više vrijednosti (0,430 za VAL, 0,433 za VAL M i 0,443 za VAL N). Što se tiče rekonstitucijskih svojstava, modelom predviđeni optimum za disperzibilnost iznosio je 14,196 s, a za močivost 127,90 s. Dobiveni rezultati validacijskih uzoraka pokazali su znatno niže vrijednosti. Za disperzibilnost, rezultati su iznosili: 10,440 s za VAL, 11,750 s za VAL M i 9,880 s za VAL N), dok su za močivost iznosili: 79,38 s za VAL, 84,06 s za VAL M i 73,13 s za VAL N. Modelom predviđeni parametri boje iznosili su: za  $L^*$  = 47,64, za  $a$  = -0,59, za  $b$  = -0,96, za Chroma 1,15 i za hue 238,52. Dobiveni rezultati validacijskih uzoraka nešto se razlikuju, neke dobivene vrijednosti su niže, a neke više od predviđenih. Optimum za vodljivost, prema modelu, iznosio je 157,61  $\mu\text{S/cm}$ , dok su dobivene vrijednosti za validacijske uzorke niže (152,55  $\mu\text{S/cm}$  za VAL, 147,55  $\mu\text{S/cm}$  za VAL M i 140,50  $\mu\text{S/cm}$  za VAL N). Predviđena vrijednost za TDS iznosila je 78,67 mg/L, a dobivene vrijednosti nešto su niže. Modelom predviđena optimalna pH vrijednost iznosila je 6,37, a dobiveni rezultati približni su optimumu (6,31 za VAL, 6,35 za VAL M, 6,36 za VAL N). Modelom predviđeni optimum za određivanje šećera iznosio je 19,56 °Bx, a izmjerene vrijednosti validacijskih uzoraka su više (20,13 °Bx za VAL, 21,50 °Bx za VAL M i 19,88 °Bx za VAL N). Modelom predviđen optimum sadržaja polifenola iznosio je 6,86 mg GAE/g s.tv., dok se dobivene vrijednosti validacijskih uzoraka razlikuju, odnosno za validacijski uzorak rezultat iznosi 4,87 mg GAE/g s.tv., za validacijski aromatizirani uzorak malina iznosi 4,86 mg GAE/g s.tv., te za validacijski aromatizirani uzorak naranča 18,76 mg GAE/g s.tv. Modelom predviđeni optimum antioksidacijskog kapaciteta (DPPH metoda) iznosio je 10,90  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$ , a dobivene vrijednosti validacijskih uzoraka nešto su niže (za VAL 7,82  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$ , za VAL M 8,06  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$  i za VAL N 7,21  $\mu\text{mol Troloxa/g s.tv.}$ ). Što se tiče FRAP metode, optimum je iznosio 44,44  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$ , dok su dobivene vrijednosti niže (za VAL 25,13  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$ , za

VAL M 28,95  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$  te za VAL N 24,92  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g s.tv.}$ ).  
Prosječna senzorska ocjena prema modelu bila je 3,79 dok se dobivene vrijednosti nešto razlikuju (za validacijski uzorak iznosi 4,11, za VAL M iznosi 3,91, a za VAL N iznosi 3,40).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Međuovisnost udjela zobi, meda i kakao praha u dizajnu sastava smjesa igra značajnu ulogu u svojstvima završnog proizvoda.
2. Manju viskoznost pjena prije sušenja pokazali su uzorci s manjim sadržajem kakao praha, dok su veću viskoznost pokazali uzorci s većim sadržajem kakao praha. Omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj na viskoznost pjena.
3. Uzorci koji sadrže najveći udio meda pokazuju manju promjenu u vrijednostima nasipne gustoće pri 0 i 1250 udaraca u usporedbi s onima s nižim udjelom meda.
4. Bolja fizikalna svojstva disperzibilnosti i močivosti pokazali su uzorci s manjim sadržajem kakao praha.
5. Najviši sadržaj ukupnih polifenola pokazali su uzorci s većim sadržajem kakao praha, dok omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj.
6. Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena je kod uzoraka s većim sadržajem kakao praha, dok omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj.
7. Na prihvatljivost proizvoda od strane panelista utjecao je sadržaj kakao praha, bolje su ocijenjeni uzorci s manjim sadržajem kakao praha, dok omjer med/zob nije pokazao značajan utjecaj na ocjenu.
8. Modelom dobiveni optimalan sastav praha za dobivanje instant kakao napitka je sljedeći: 45 % meda, 55 % zobenog brašna i 5,625 g kakao praha/100 g praškastog proizvoda.

## 6. LITERATURA

Abdeltaif SA, SirElkhatim KA, Hassan AB (2018) Estimation of phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activity of spent coffee and black tea (processing) waste for potential recovery and reuse in Sudan. *Recycling* **3**, 27. <https://doi.org/10.3390/recycling3020027>

Acosta-Otálvaro E, Domínguez-Perles R, Mazo-Rivas JC, García-Viguera C (2022) Bioavailability and radical scavenging power of phenolic compounds of cocoa and coffee mixtures. *Food Sci Technol Int* **28**, 514-523. <https://doi.org/10.1177/10820132211023258>

Ackar D, Lendić K, Valek M, Šubarić D, Miličević B, Babic J, Nedić I (2013) Cocoa polyphenols: can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *J Chem* **2013** <https://doi.org/10.1155/2013/289392>

Andres-Lacueva C, Monagas M, Khan N, Izquierdo-Pulido M, Urpi-Sarda M, Permanyer J, Lamuela-Raventós RM (2008) Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *J Agric Food Chem* **56**, 3111-3117. <https://doi.org/10.1021/jf0728754>

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**, 183-198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>

Apriyanto M, Sutardi, Supriyanto, Harmayani E (2016) Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia. *Asian J Dairy Food Res* **35**. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.v35i2.10724>

Barbosa-Canovas GV, Ortega-Rivas E, Juliano P, Yan H (2005) Food powders, physical properties, processing and functionality, 1. izd., Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York

Barišić V, Icyer NC, Akyil S, Toker OS, Flanjak I, Ačkar Đ (2023) Cocoa based beverages – composition, nutritional value, processing, quality problems and new perspectives, *Trends Food Sci Technol* **132**, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.12.011>

Batur V, Lelas V, Režek Jambrak A, Herceg Z, Badanjak M (2010) Utjecaj ultrazvuka visoke snage na reološka svojstva i svojstva pjenjenja modelnih sladolednih smjesa. *Mljekarstvo* **60**, 10-18.

- Beg MS, Ahmad S, Jan K, Bashir K (2017) Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends Food Sci Technol* **66**, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- Belščak-Cvitanović A, Benković M, Komes D, Bauman I, Horžić D, Dujmić F, Matijašec M (2010) Physical properties and bioactive constituents of powdered mixtures and drinks prepared with cocoa and various sweeteners. *J Agric Food Chem*, **58**, 7187–7195. <https://doi.org/10.1021/jf1005484>
- Benković M, Jurinjak Tušek A, Belščak-Cvitanović A, Lenart A, Domian E, Komes D, Bauman I (2015) Artificial neural network modelling of changes in physical and chemical properties of cocoa powder mixtures during agglomeration. *J Food Sci Technol* **64**, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.028>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* **28**, 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, Warnakula S, Wood A, Di Angelantonio E, Franco OH (2011) Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Brit Med J* **343** <https://doi.org/10.1136/bmj.d4488>
- Buljat AM (2018) Razvoj funkcionalnih kakao praškastih proizvoda obogaćenih ekstraktima lavande (*Lavandula x hybrida* L.). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Cao H, Wang C, Li R, Guan X, Huang K, Zhang Y (2022) Influence of sprouted oat flour substitution on the texture and *in vitro* starch digestibility of wheat bread. *Food Chem X* **15** <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100428>
- Çakiroğlu FP, Uçar A (2018) Consumer attitudes towards purchasing functional products. *Prog Nutr* **20**, 257–262. <https://doi.org/10.23751/pn.v20i2.5859>
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, i sur. (2010) The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* **9**, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Cempaka L, Rahmawati EA, Ardiansyah A, David W (2021) Sensory profiles of chocolate drinks made from commercial fermented cocoa powder and unfermented cocoa beans. *Curr Res Nutr Food Sci* **9** <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.3.26>

CiANCIOSI D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, GasparriNI M, Reboredo-Rodríguez P, Manna PP, i sur. (2018) Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A Review. *Molecules* **23**, 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>

Copetti MV, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH (2014) Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *Int J Food Microbiol* **178**, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>

Counet C, Ouwerx C, Rosoux D, Collin S (2004) Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *J Agric Food Chem* **52**, 6243-6249. <https://doi.org/10.1021/jf040105b>

Dicks L, Kirch N, Gronwald D, Wernken K, Zimmermann B, Helfrich HP, Ellinger S (2018) Regular intake of a usual serving size of flavanol-rich cocoa powder does not affect cardiometabolic parameters in stably treated patients with type 2 diabetes and hypertension-A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Nutrients* **10**, 1435. <https://doi.org/10.3390/nu10101435>

Ellinger S, Reusch A, Henckes L, Ritter C, Zimmermann BF, Ellinger J, i sur. (2020) Low plasma appearance of (+)-catechin and (–)-catechin compared with epicatechin after consumption of beverages prepared from nonalkalized or alkalized cocoa- A randomized, double-blind trial. *Nutrients* **12**, 231. <https://doi.org/10.3390/nu12010231>

Fang Y, Selomulya C, Chen XD (2007) On measurement of food powder reconstitution properties. *Dry Technol* **26**, 3-14. <https://doi.org/10.1080/07373930701780928>

Fu X, Huck D, Makein L, Armstrong B, Willen U, Freeman T (2012) Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. *Particuology*, **10**, 203–208.

Gautam SRB, Maurya KK, Rai M, Singh RJ, Maurya RM, Mehta RK, i sur. (2018) Consumer behavior towards functional food in Eastern UP-A study of market drivers & challenges. *Int J Artif Intell Robot* **7**, 15–30.

Giacometti J, Jolić SM, Josić D (2015) Cocoa processing and impact on composition. Processing and impact on active components in food, 1. izd., Victor Preedy, London, str. 605–612. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00073-1>

- Golomb BA, Koperski S, White HL (2012) Association between more frequent chocolate consumption and lower body mass index. *Arch Intern Med* **172**, 519–521. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.2100>
- Hardiyanto YF, Saputro AD, Nurkholisa Z, Setiyadi PA, Bintoro N, Kusuma RA (2021) The effect of steaming time and types of cocoa powder on the characteristics of instantized cocoa powder made using batch-type steam jet agglomerator. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, **653**, 012089. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/653/1/012089>
- Hii CL, Law CL, Cloke M, Suzannah S (2009) Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosyst Eng* **102**, 153–161. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biosystemseng.2008>
- Hughes J, Grafenauer S (2021) Oat and barley in the food supply and use of beta glucan health claims. *Nutrients* **13**, 2556. <https://doi.org/10.3390/nu13082556>
- Ivanković M (2020) Optimiranje uvjeta emulgiranja biološki aktivnih spojeva iz biljnih 65 ekstrakata porijekom iz porodice Lamiaceae (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Jalil AMM, Ismail A (2008) Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules* **13**, 2190-2219. <https://doi.org/10.3390/molecules13092190>
- Jean-Marie E, Bereau D, Poucheret P, Guzman C, Boudard F, Robinson J-C (2021) Antioxidative and immunomodulatory potential of the endemic French Guiana wild cocoa “Guiana”. *Foods* **10**, 522. <https://doi.org/10.3390/foods10030522>
- Jia L, Liu X, Bai YY, Li SH, Sun K, He C, Hui R (2010) Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **92**, 218-25. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28202>
- Jung H, Lee YJ, Yoon WB (2018) Effect of moisture content on the grinding process and powder properties in food: a review. *Processes* **6**, 69. <https://doi.org/10.3390/pr6060069>
- Kaur H, Gill BS, Karwasra BL (2018) In vitro digestibility, pasting, and structural properties of starches from different cereals. *Int J Food Prop* **21**, 70–85. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1439955>



- Kim J, Kim J, Shim J, Lee CY, Lee KW, Lee HJ (2014) Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 1458-72. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.641041>
- Kowalska J, Majewska E, Lenart A (2011) Sorption properties of a modified powdered cocoa beverage. *Chem Eng Process* **32** <https://doi.org/10.2478/v10176-011-0002-x>.
- Kumar Singh A, Cabral C, Kumar R, Ganguly R, Kumar Rana H, Gupta A, i sur. (2019) Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. *Nutrients* **11**, 2216. <https://doi.org/10.3390/nu11092216>
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* **51**, 7292-7295. <https://doi.org/10.1021/jf0344385>
- Lobo FA, Nascimento MA, Domingues JR, Falcão DQ, Hernanz D, Heredia FJ, de Lima Araujo KG (2017) Foam mat drying of Tommy Atkins mango: effects of air temperature and concentrations of soy lecithin and carboxymethylcellulose on phenolic composition, mangiferin, and antioxidant capacity. *Food Chem* **221**, 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.080>
- Ma G, Chen Y (2020) Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: a systematic review via meta-analysis. *J Funct Foods* **66**, 103829. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103829>.
- Mandalari G, Merali Z, Ryden P, Chessa S, Bisignano C, Barreca D, i sur. (2018) Durum wheat particle size affects starch and protein digestion in vitro. *Eur J Nutr* **57**, 319–325. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1321-y>
- Martin MÁ, Ramos S (2021) Impact of cocoa flavanols on human health. *Food Chem Toxicol* **151**, 112121. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112121>
- Mayorga-Gross AL, Esquivel P (2019) Impact of cocoa products intake on plasma and urine metabolites: a review of targeted and non-targeted studies in humans. *Nutrients* **11**, 1163. <https://doi.org/10.3390/nu11051163>
- Miller KB, Hurst WJ, Payne MJ, Stuart DA, Apgar J, Sweigart DS, Ou B (2008) Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *J Agric Food Chem* **56**, 8527-8533. <https://doi.org/10.1021/jf801670p>

- Moon JH, Yoon WB (2017) Effect of moisture content and particle size on grinding kinetics and flowability of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*). *Food Sci Biotechnol* **27**, 641-650. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0291-z>
- Mota-Gutierrez J, Barbosa-Pereira L, Ferrocino I, Cocolin L (2019) Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients* **11**, 884. <https://doi.org/10.3390/nu11040884>
- Nakagawa H, Oyama T (2019) Molecular basis of water activity in glycerol-water mixtures. *Front Chem* **7**, 731. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00731>
- Olas B (2020) Honey and its phenolic compounds as an effective natural medicine for cardiovascular diseases in humans? *Nutrients* **12**, 283. <https://doi.org/10.3390/nu12020283>
- Oracz J, Nebesny E, Zyzelewicz D, Budryn G, Luzak B (2020) Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**, 1947-1985. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1619160>
- Ortega N, Macià A, Romero M, Reguant J, Motilva M (2011) Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in vitro* digestion model. *Food Chem* **124**, 65-71.
- Pravilnik (2005) Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima. Narodne novine 73, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_06\\_73\\_1440.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1440.html) Pristupljeno 14. srpnja 2023.
- Quelal-Vásconez MA, Pérez-Esteve É, Arnau-Bonachera A, Barat JM, Talens P (2018) Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. *Food Control* **92**, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.001>
- Rajkumar P, Kailappan R, Viswanathan R, Raghavan GSV (2007) Drying characteristics of foamed alphonso mango pulp in a continuous type foam mat dryer. *J Food Eng* **79**, 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.02>
- Rhoades JD (1996) Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. U: Methods of soil analysis, 2. izd., D.L. Sparks, ur., Madison, WI, str. 417-435.
- Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Mateus-Reguengo L, Bertolino M, Stévigny C, Zeppa G (2019) Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients* **11**, 867. <https://doi.org/10.3390/nu11040867>

- Sangamithra A, Sivakumar V, Swamy GJ, Kannan K (2015) Foam mat drying of food materials: a review. *J Food Process Pres* **39**, 3165-3174. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12421>
- Serra Bonvehí J, Ventura Coll F (2002) Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder. *J Agric Food Chem* **50**, 3743–3750. <https://doi.org/10.1021/jf011597k>
- Serafini M, Peluso I (2016) Functional foods for health: the interrelated antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, spices and cocoa in humans. *Curr Pharm Des* **22**, 6701-6715. <https://doi.org/10.2174/1381612823666161123094235>
- Silva J, Freixo R, Gibbs P, Teixeira P (2011) Spray-drying for the production of dried cultures. *Int J Dairy Technol* **64**, 321–335. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00677.x>
- Sollano-Mendieta XC, Meza-Márquez OG, Osorio-Revilla G, Téllez-Medina DI (2021) Effect of in vitro digestion on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of 12 plum (*Spondias purpurea* L.) ecotypes. *Foods* **10**, 1995. <https://doi.org/10.3390/foods10091995>
- Sorrenti V, Ali S, Mancin L, Davinelli S, Paoli A, Scapagnini G (2020) Cocoa polyphenols and gut microbiota interplay: bioavailability, prebiotic effect, and impact on human health. *Nutrients* **12**, 1908. <https://doi.org/10.3390/nu12071908>
- Talan, N (2019) Fizikalna, kemijska i senzorska svojstva instant kakao praha obogaćenog ekstraktom industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Tan TYC, Lim XY, Yeo JHH, Lee SWH, Lai NM (2021) The health effects of chocolate and cocoa: a systematic review. *Nutrients* **13**, 2909. <https://doi.org/10.3390/nu13092909>
- Topolska K, Florkiewicz A, Filipiak-Florkiewicz A (2021) Functional food-consumer motivations and expectations. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 5327. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
- Thuy NM, Ha HTN, Tai NV (2020) Effect of emulsifiers on viscosity and emulsion stability of the cocoa powder mixture. *Food Res* **4**, 2306–2312. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(6\).377](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(6).377)
- Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JPE (2011) Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr* **93**, 62–72. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000075>

Wallace TC, Giusti MM (2011) Selective removal of the violet color produced by anthocyanins in procyanidin-rich unfermented cocoa extracts. *J Food Sci* **76**, C1010-C1017. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02322.x>

Zahouli GI, Guehi ST, Fae A, Louis BK, Nemlin JG (2010) Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Int J Food Sci Technol* **2**, 184-190.

Zamri NA, Ghani N, Ismail CAN, Zakaria R, Shafin N (2023) Honey on brain health: a promising brain booster. *Front Aging Neurosci* **14**, 1092596. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1092596>

Zhang K, Dong R, Hu X, Ren C, Li Y (2021) Oat-based foods: chemical constituents, glycemic index, and the effect of processing. *Foods* **10**, 1304. <https://doi.org/10.3390/foods10061304>

Zimmermann BF, Ellinger S (2020) Cocoa, chocolate, and human health. *Nutrients* **12**, 698. <https://doi.org/10.3390/nu12030698>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, MARINELA FUREŠ, 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.

---

Vlastoručni potpis