

Razvoj formulacija i karakterizacija inovativnih čokolada obogaćenih kavom

Knežić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:763622>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

Luka Knežić
0058217274

Razvoj formulacija i karakterizacija inovativnih čokolada obogaćenih kavom

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Razvoj formulacija i karakterizacija inovativnih čokolada obogaćenih kavom

Luka Knežić, 0058217274

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je bioaktivna karakterizacija zelenih zrna Arabika i Robusta kava (određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama te udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC-PDA metodom) i njihov dodatak u formulacije bijelih čokolada (3,5 i 7 %), kojima su također određena bioaktivna i senzorska svojstva te profil taljenja DSC analizom. Zelena zrna Robusta kave sadržavale su veći udjel ukupnih polifenola (55,25 mg EGK g⁻¹ s.tv.) u odnosu na zrna Arabika kave (43,23 mg EGK g⁻¹ s.tv.), ali i veći udjel kafeina i klorogenskih kiselina. Udjel ukupnih polifenola u čokoladi bez dodatka zelenih zrna kave iznosio je 0,85 mg EGK g⁻¹ te je dodatak od 7 % zrna Robusta kave rezultirao najvećim povećanjem udjela ukupnih polifenola (2,81 mg EGK g⁻¹), kao i udjela klorogenskih kiselina i kafeina. Najveću ocjenu opće prihvatljivosti dobila je čokolada s dodatkom 7 % zrna Arabika kave, a najmanju čokolada bez dodatka zelenih zrna kave.

Ključne riječi: bijela čokolada, zelena zrna kave, polifenoli, funkcionalna hrana

Rad sadrži: 33 stranica, 17 slika, 5 tablica, 54 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr. sc. Danijela Šeremet

Datum obrane: 10.9.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology or Biotechnology or Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Development of formulations and characterization of innovative coffee-enriched chocolates

Luka Knežić, 0058217274

Abstract:

The aim of the present study was the bioactive characterization of green Arabica and Robusta coffee beans (determination of the total phenolic content and antioxidant capacity by spectrophotometric methods and the content of individual bioactive compounds by the HPLC-PDA methodology and their incorporation into white chocolate formulations (3,5 % and 7 %), whose bioactive composition, melting profile by DSC and analysis of sensory parameters were also determined. Green Robusta coffee beans contained higher level of total polyphenols (55.25 mg GAE g⁻¹ dmb) compared to Arabica coffee beans (43.23 mg GAE g⁻¹ dmb), but also a higher content of caffeine and chlorogenic acids. The content of total polyphenols in the chocolate prepared without the addition of green coffee beans was 0.85 mg GAE g⁻¹ dmb, while the addition of green Robusta coffee beans, in content of 7 %, resulted in the highest increase in total polyphenols to 2.81 mg GAE g⁻¹ dmb, as well as an increase in chlorogenic acids and caffeine content. The highest score for overall acceptability was given to the sample prepared with 7 % of Arabica coffee beans, and the lowest for the sample prepared without the addition of green coffee beans.

Keywords: white chocolate, green coffee beans, polyphenols, functional food

Thesis contains: 33 pages, 17 figures, 5 tables, 53 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Draženka Komes, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, PhD

Thesis defended: 10.9.2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kakaova zrna i proizvodnja čokolade	2
2.1.1. Čokolada kao funkcionalna hrana.....	5
2.2. Kava	9
2.2.1. Bioaktivni sastav zelenih zrna kave.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Uzorci	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Oprema.....	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari u zelenim zrnima kave.....	14
3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava zelenih zrna kave.....	14
3.2.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva.....	14
3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	14
3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	14
3.2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	15
3.2.2.5. Određivanje udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	15
3.2.3. Formulacija bijelih čokolada uz dodatak zelenih zrna kave.....	16
3.2.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada.....	16
3.2.3.2. Određivanje svojstva taljenja čokolada.....	16
3.2.3.3. Određivanje senzorskih svojstava čokolada.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava zelenih zrna kave	18
4.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada	21
4.3. Određivanje svojstva taljenja čokolada	23
4.4. Određivanje senzorskih svojstava čokolada	26
5. ZAKLJUČCI	28
6. POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

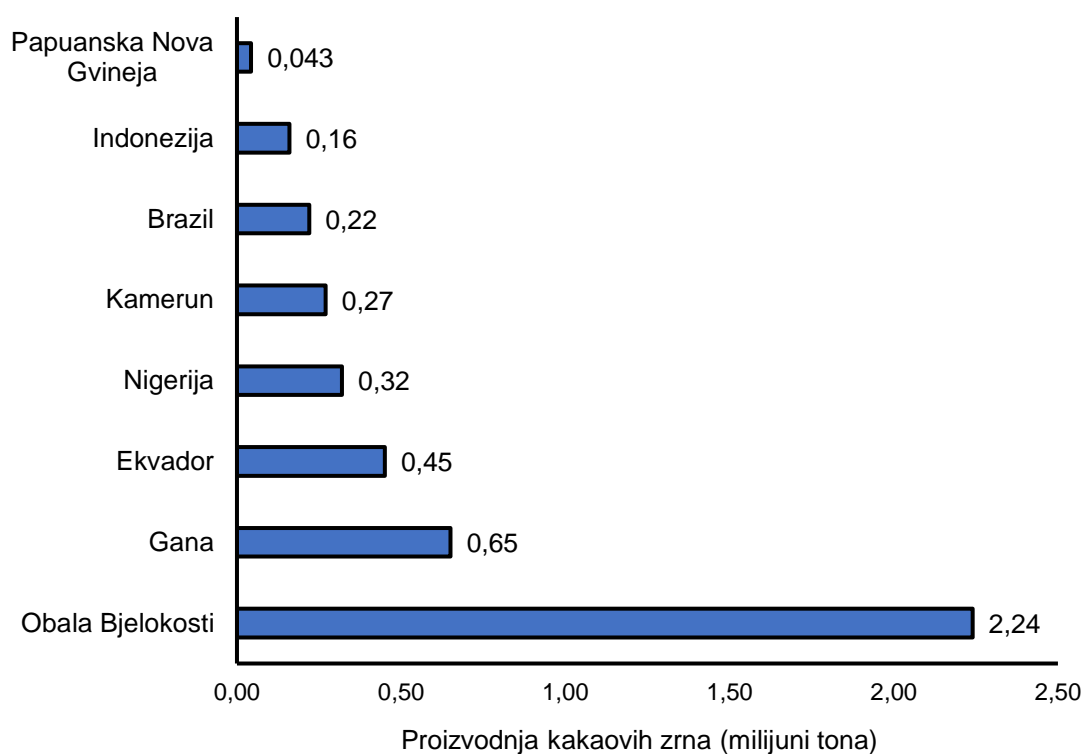
Čokolada je popularan konditorski proizvod na globalnoj razini i potražnja za njom konstantno raste. Trenutno je još uvijek najpopularnija mliječna čokolada, ali uslijed sve veće informiranosti potrošača o utjecaju prehrane na zdravlje, raste konzumacija tamne čokolade koja se, zbog visokog udjela kakaovih dijelova, smatra funkcionalnom hranom. Upravo zbog svoje popularnosti među svim generacijama potrošača, čokolada predstavlja i dobar matriks za obogaćivanje različitim bioaktivnim spojevima. U tom pogledu naročito je zanimljiva bijela čokolada koja u sastavu ne sadrži bezmasnu suhu tvar kakaovih dijelova pa ni bioaktivne spojeve podrijetlom iz kakaovih zrna. S druge strane, potencijalno bogat izvor bioaktivnih spojeva, naročito polifenola, imaju zelena zrna kave, u kojima su najviše zastupljene klorogenske kiseline poznate po snažnom antioksidacijskom djelovanju.

Budući da taj potencijal zelenih zrna kave nije dovoljno poznat i zelena zrna nemaju primjenu u prehrambenoj industriji, cilj ovoga istraživanja bio je bioaktivna karakterizacija zelenih zrna Arabika i Robusta kava i ispitivanje potencijala njihove primjene u obogaćivanju bioaktivnog sastava bijelih čokolada. Samljevena zelena zrna dodana su u formulacije bijelih čokolada u udjelima od 3,5 i 7 %. Bioaktivna karakterizacija zrna i čokolada uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i ABTS) spektrofotometrijskim metodama te određivanje udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva (klorogenske kiseline i kafein) primjenom HPLC-PDA metodologije. Također, provedena je DSC analiza čokolada kako bi se ispitaio utjecaj dodatka zelenih zrna kava na profil taljenja čokolada te senzorska analiza evaluacijom parametara izgleda (sjaj i homogenost), akustičnosti (lom), teksture (taljenje i zrnatost), okusa (slatko, gorko, biljno i kava) i opće prihvatljivosti.

2. TEORIJSKI DIO

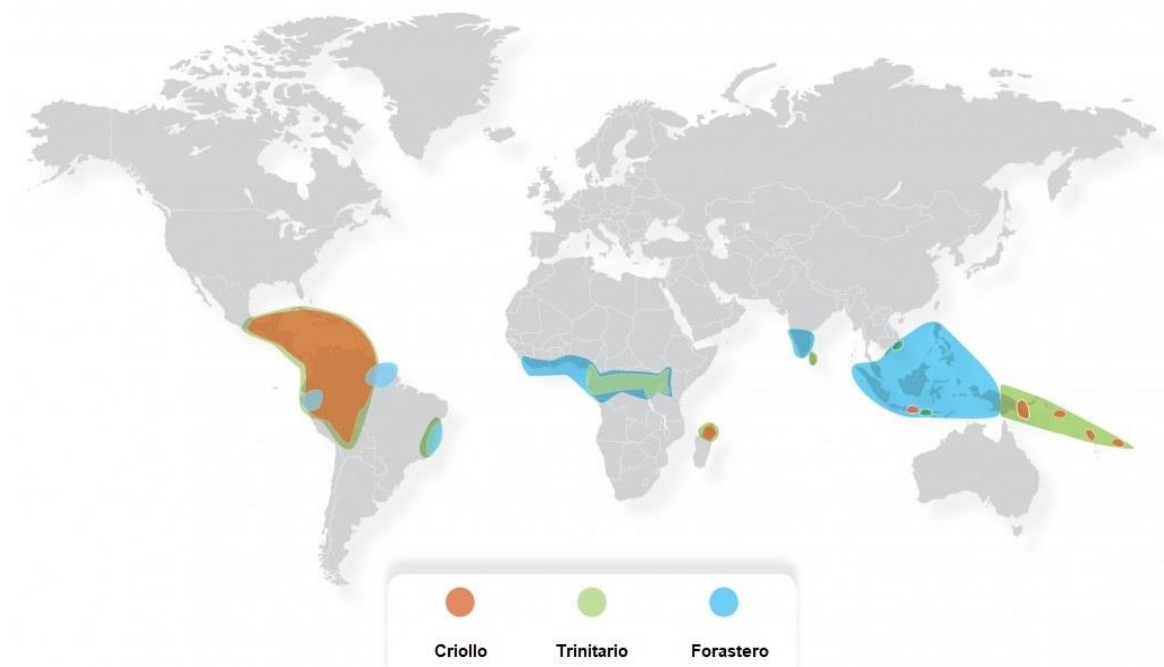
2.1. Kakaova zrna i proizvodnja čokolade

Kakaovac (*Theobroma cacao* L.) pripada porodici Malvaceae (sljezovke) i unutar njegovog ploda nalaze se kakaova zrna koja su sirovina za izradu kakaove mase i kakaovog maslaca, osnovnih sastojaka za proizvodnju čokolade (Qin i sur., 2016). Najviše kakaovih zrna, čak oko 74 % ukupne proizvodnje, proizvodi se na području Afrike, gdje su Obala Bjelokosti i Gana najveći proizvođači. Kakaova zrna također se proizvode i u Južnoj Americi (Ekvador i Brazil), uz zastupljenost u svjetskoj proizvodnji od oko 22 %, a oko 5 % se proizvodi i u Aziji i Oceaniji (Indonezija i Papuanska Nova Gvineja) (ICCO, 2024a). Proizvodnja kakaovih zrna prema pojedinim državama za razdoblje 2022./2023. prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Države s najvećom proizvodnjom kakaovih zrna u razdoblju 2022./2023. (ICCO, 2024a)

Postoje tri osnovna varijeteta kakaovih zrna, a to su Forastero, Criollo i Trinitario, pri čemu je Forastero najzastupljeniji s 95 % svjetske proizvodnje (Afoakwa, 2016). Područje njihovog uzgoja prikazano je na Slici 2, a osnovne karakteristike navedene su u Tablici 1.



Slika 2. Područje uzgoja različitih varijeteta kakaovih zrna (ICCO, 2024b)

Tablica 1. Karakteristike Criollo, Forastero i Trinitario varijeteta kakaovih zrna (Afoakwa, 2016)

Karakteristike		Criollo	Forastero	Trinitario
Plod	Tekstura	mekana i naborana	tvrdna i glatka	većinom tvrda
	Boja	crvena	zelena	promjenjiva
Sjemenke	Broj zrna u plodu	20 – 30	> 30	> 30
	Boja kotiledona	bijela, boja slonovače ili svijetlo ljubičasta	svijetlo do tamno ljubičasta	promjenjiva; rijetko bijela
Agronomski uvjeti	Otpornost stabla	niska	visoka	umjerena
	Osjetljivost na nametnike i bolesti	osjetljiv	umjereno	umjereno
Kvaliteta	Fermentacija	1 – 3 dana	5 dana	4 – 5 dana
	Udjel kakaovog maslaca	nizak	visok	srednji
	Veličina sjemenki (masa (g) 100 sjemenki)	85	94	91

Uz navedena tri varijeteta, pojedini autori navode Nacional kao četvrti, iako se radi o Forastero varijetetu koji se uzgaja u Ekvadoru i čini svega 5 % svjetske proizvodnje (Afoakwa, 2016). Postoje određene razlike u kemijskom i bioaktivnom sastavu te profilu arome i okusa između varijeteta kakaovih zrna uslijed različitog genetskog sastava zrna, botaničkog podrijetla, mjesta uzgoja, uvjeta rasta (npr. klima, količina sunčeve svjetlosti i padalina, sastav tla), vremena berbe te vremena koje prođe između berbe i fermentacije zrna (Kongor i sur., 2016). Kakaova zrna su polazna sirovina za proizvodnju čokolade, a sam postupak od berbe kakaovih plodova do oblikovanja i pakiranja čokolade prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Postupak proizvodnje čokolade (Afoakwa, 2016)

Cjelokupni postupak proizvodnje čokolade započinje berbom zrelih plodova kakaovca, nakon čega slijedi fermentacija i sušenje kakaovih zrna, pakiranje te transport u jutanim vrećama do proizvođača kakaovih proizvoda. U tvornicama, nakon prethodnog čišćenja, slijedi prženje i drobljenje kakaovih zrna, potom separacija kakaovih zrna od ljuske i mljevenje izdvojenog kakaovog loma, priprema zamjesa kakaove mase, valcanje, končiranje te na kraju temperiranje čokoladne mase (Afoakwa, 2016). Čokolada je polučvrsta suspenzija finih čvrstih čestica šećera, bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i mlijeka (ovisno o vrsti) u kontinuiranoj masnoj fazi kakaovog maslaca koja se tali na tjelesnoj temperaturi i stvara glatku suspenziju (Ostrowska-Ligęza i sur., 2019; Afoakwa, 2016). U Republici Hrvatskoj, prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (NN 73/2005), razlikuju se čokolada, mliječna čokolada, obiteljska mliječna čokolada, bijela čokolada, punjena čokolada, čokolada »a la taza«, obiteljska čokolada »a la taza« i čokoladni desert ili praliné. Prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA) čokolada se dijeli na bijelu, mliječnu, tamnu, gorko-slatku čokoladu, čokoladu s raznim mliječnim proizvodima, čokoladu s obranim mlijekom, slatku čokoladu i čokoladu od

mlačenice. Najveća konzumacija čokolade, od 11,8 kg po stanovniku godišnje, zabilježena je u Švicarskoj, slijede Sjedinjene Američke Države (9,0 kg), Njemačka (5,8 kg) te Francuska (3,6 kg) (Statista, 2023). Prema dostupnim podacima, U Hrvatskoj se konzumira (2,2 kg) čokolade po stanovniku godišnje (GAIN, 2016).

Trenutno su najveći svjetski proizvođači čokolade Mars Wrigley Confectionery, sa sjedištem u gradu Chicago (SAD), Ferrero Group, koji se nalazi u gradu Alba u Italiji, i Mondelez International, sa sjedištem u gradu Deerfield (SAD) (Kolmar, 2023). Najveći proizvođači čokolade u Republici Hrvatskoj su Kraš d.d. sa sjedištem u Zagrebu, Kandit d.o.o. sa sjedištem u Osijeku i Zvečevo d.d. sa sjedištem u Požegi (Mihaljević, 2021). Potrošači postaju sve osvješteniji što se tiče povezanosti hrane i zdravlja, što se odražava i u promjenama trendova na tržištu čokolada. Trenutni trendovi tržišta čokolada fokusirani su na veganske, organske i „raw“ čokolade, ali i čokolade bez dodanog šećera, kao i čokolade obogaćene polifenolima, vitaminima, mineralnim tvarima ili prehrambenim vlaknima (Mordor Intelligence, 2022).

2.1.1. Čokolada kao funkcionalna hrana

Pojam funkcionalne hrane prvi je puta upotrijebljen u Japanu 80-ih godina prošlog stoljeća, a najčešće se definira kao hrana za koju je dokazano da povoljno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu ili smanjuje rizik pojave bolesti (Baker i sur., 2022). Funkcionalna hrana može se podijeliti na nekoliko kategorija uključujući proizvode obogaćene spojevima s pozitivnim utjecajem na zdravlje (npr. kruh obogaćen kalcijem ili omega-3 masnim kiselinama, namaz obogaćen fitosterolima), hranu prilagođenu za neutralizaciju antinutritivnih spojeva nastalih tijekom obrade hrane (npr. toksični spojevi ili alergeni u hrani), proizvodi s povećanim udjelom specifičnih spojeva uslijed promjene ishrane životinja (npr. jaja ili meso bogato omega-3 masnim kiselinama, govedina bogata linolnom kiselinom) te inovativne proizvode s poboljšanim zdravstvenim djelovanjem, proizvedeni genetskom manipulacijom ili selekcijom novih sorti koje ranije nisu bile konzumirane (npr. riža s visokim udjelom željeza ili vitamina B, biljna ulja s promijenjenim sastavom masnih kiselina, hrana bez alergena, ulja uljane repice s visokim udjelom karotenoida, pšenica s povećanim udjelom luteina, bobičasto voće s većim udjelom antioksidansa) (Kaur i Das, 2011).

Kakaovi proizvodi vrlo su popularni zbog svojih senzorskih karakteristika, a u novije vrijeme povećanoj konzumaciji doprinose i rezultati istraživanja o potencijalno pozitivnim zdravstvenim učincima uslijed prisustva različitih bioaktivnih spojeva. Tri glavne skupine polifenola u kakaovim zrnima su flavan-3-oli, od kojih je najzastupljeniji (-)-epikatein, te antocijani i proantocijanidini. Osim polifenola, kakaova zrna sadrže vitamine B1, B2, B6, D i E, metilksantin teobromin, razne mineralne tvari poput kalcija, magnezija, kalija, željeza, cinka i bakra, te prehrambena vlakna. Uz to, sušena kakaova zrna mogu sadržavati i 10 – 25 %

proteina (Rojo-Poveda i sur., 2020). Iako su kakaova zrna osnovna sirovina za proizvodnju čokolade, bioaktivni profil čokolada drugačiji je uslijed različitih postupaka koji se primjenjuju tijekom proizvodnje (Slika 3) i uslijed dodatka drugih sastojaka u formulaciju čokolade. Neovisno o tome, čokolada s visokim udjelom kakaovih dijela, odnosno tamna čokolada, smatra se funkcionalnom hranom. Tako su primjerice različita znanstvena istraživanja pokazala da konzumacija tamne čokolade dovodi do povećanja bioaktivnog dušikovog oksida (NO) snižavajući krvni tlak, poboljšanja osjetljivosti na inzulin, smanjenja ukupnog kolesterola u plazmi, naročito LDL kolesterola (lipoproteini male gustoće), modulacije apoptoze stanica na endotelnoj razini, poboljšanja ravnoteže citokina i vaskularne upale te inhibicije agregacije trombocita i sinteze endotelina-1 (García i sur., 2021). Čokolada je također kao omiljeni proizvod svih generacija potrošača ujedno i dobar matriks za dodatno obogaćivanje bioaktivnim spojevima. Velika prednost uporabe čokolade kao matriksa za isporuku bioaktivnih sastojaka je mogućnost maskiranja neugodnih okusa, dok je najveći nedostatak visoki udjel šećera u klasičnim formulacijama (Faccinnetto-Beltrán i sur., 2021). Neki od primjera znanstvenih istraživanja čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima prikazani su u Tablici 2, a neki od primjera čokolada obogaćenih različitim funkcionalnim sastojcima i dostupnih na tržištu prikazani su na Slici 4.



Čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom s dodatkom Pharma Gaba® i Lteanina, The Functional Chocolate Company (SAD)



Čokolada s ekstraktom lavlje grive (1,6 %) i astragalusa (0,8 %), Joya (SAD)



Čokolada (min. 55 % kakaovih dijelova) s dodatkom polifenola sjemenki grožđa (0,3 %), Hedona d.o.o. (Hrvatska)



Čokolada s dodatkom vitamina A (8,75 %), C (1,88 %) i D (100 iu g-1), kalcija (2,88 %) i cinka (0,75 %), FourX Better Chocolate (Kanada)



Čokolada (66 % kakaovih dijelova) s dodatkom kamilice i lavande, Raaka Chocolate (SAD)



Čokolada (55 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta zelenog čaja (2 %), Amul (Indija)



Bijela čokolada (38 % kakaovih dijelova) s dodatkom zrna Nikaragvanske kave, Omnom (Island)



Bijela čokolada (39 % kakaovih dijelova) s dodatkom crnog ribizla, Karuna (Italija)

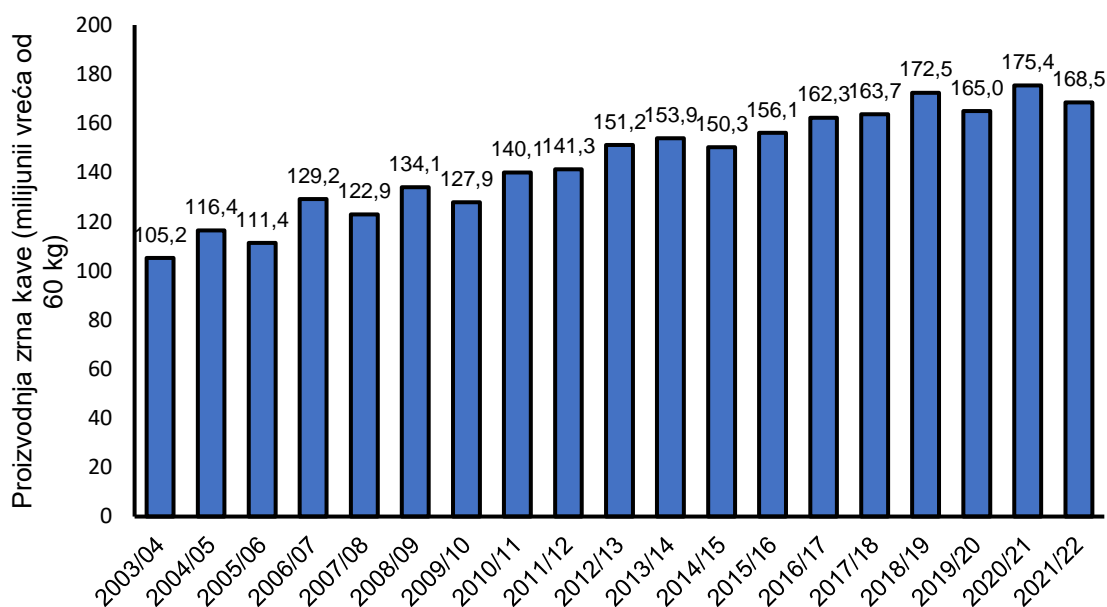
Slika 4. Primjeri funkcionalnih čokolada prisutnih na tržištu

Tablica 2. Primjeri znanstvenih istraživanja čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima

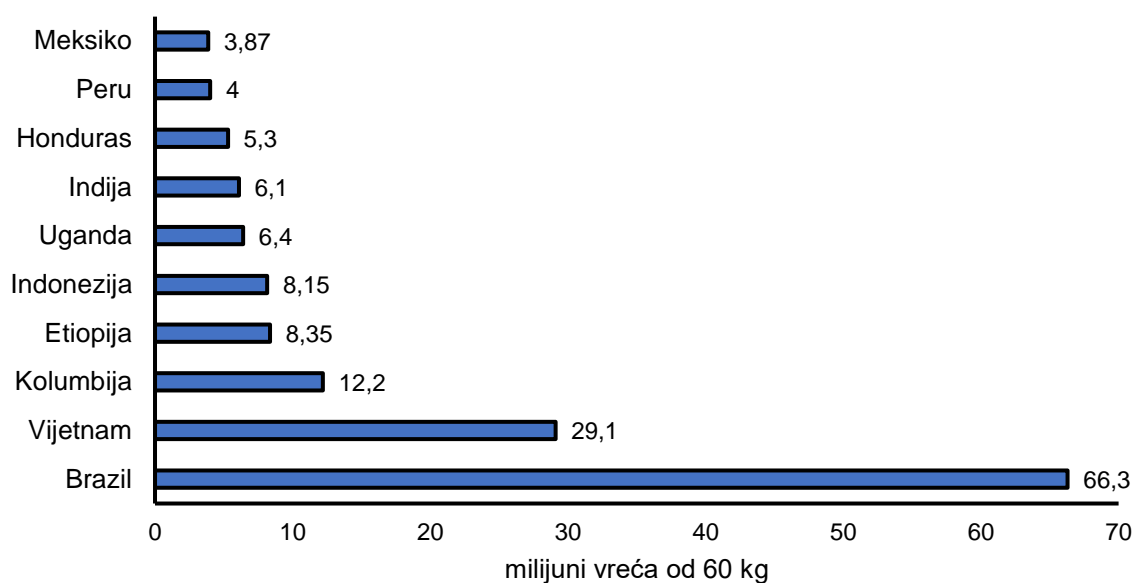
Vrsta čokolade i udjel kakaovih dijelova	Vrsta i udjel dodanog funkcionalnog sastojka	Zaključak	Referenca
Bijela čokolada	Prah Matcha čaja i konjske rotkvice (1, 2, 3 i 4 %)	Dodatak Matcha čaja i konjske rotkvice povećao je antioksidacijski kapacitet čokolada uz povećanje udjela ukupnih polifenola i karotenoida.	Poliński i sur. (2022)
Mliječna čokolada	Mikročestice s uljem chia sjemenki (5, 10 i 15 %)	Dodatak mikročestica nije rezultirao značajnim promjenama teksturalnih i reoloških svojstava čokolada.	Razavizadeh i Tabrizi (2021)
Čokolada s 53 i 98 % kakaovih dijelova i mliječna čokolada s 40 % kakaovih dijelova	Ekstrakti borovnice, maline, kupine, komine nara i cikle (1 %)	Dodatkom ispitivanih ekstrakata povećan je antioksidacijski kapacitet uz povećanje udjela ukupnih polifenola i senzorskih svojstava čokolade.	Żyżelewicz i sur. (2021)
Bijela čokolada	Ekstrakt zelenog čaja (60, 80 i 100 g na kg čokolade)	Dodatak ekstrakta zelenog čaja rezultirao je povećanjem antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih polifenola u čokoladama uz zabilježene promjene u okusu i vizualnom izgledu čokolade.	Lončarević i sur. (2019)
Bijela čokolada	Ekstrakt crvenog drijena, špinata i peluda (2 %)	Dodatkom ispitivanih ekstrakata povećan je antioksidacijski kapacitet uz povećanje udjela ukupnih polifenola čokolada, pri čemu je najizraženiji učinak ostvario ekstrakt peluda.	Cerit i sur. (2016)

2.2. Kava

Zrna kave su među najvažnijim prehrambenim sirovinama u svijetu zauzimajući drugo mjesto, odmah iza sirove nafte. Oko 60 tropskih i suptropskih zemalja proizvodi kavu, a za neke od njih kava je glavni poljoprivredni izvozni proizvod (Lashermes, 2008). Svjetska proizvodnja kave u razdoblju od 2003/2004 do 2021/202 prikazana je na Slici 5, a države s najvećim udjelom u proizvodnji u razdoblju 2023/2024 na Slici 6.



Slika 5. Svjetska proizvodnja kave u razdoblju od 2003/2004 do 2021/2022 (Statista, 2023)



Slika 6. Države s najvećom proizvodnjom kave u razdoblju 2023/2024 (USDA, 2024a)

Rod *Coffea* pripada porodici Rubiaceae (broćevke) i sadrži preko 70 vrsta od kojih se

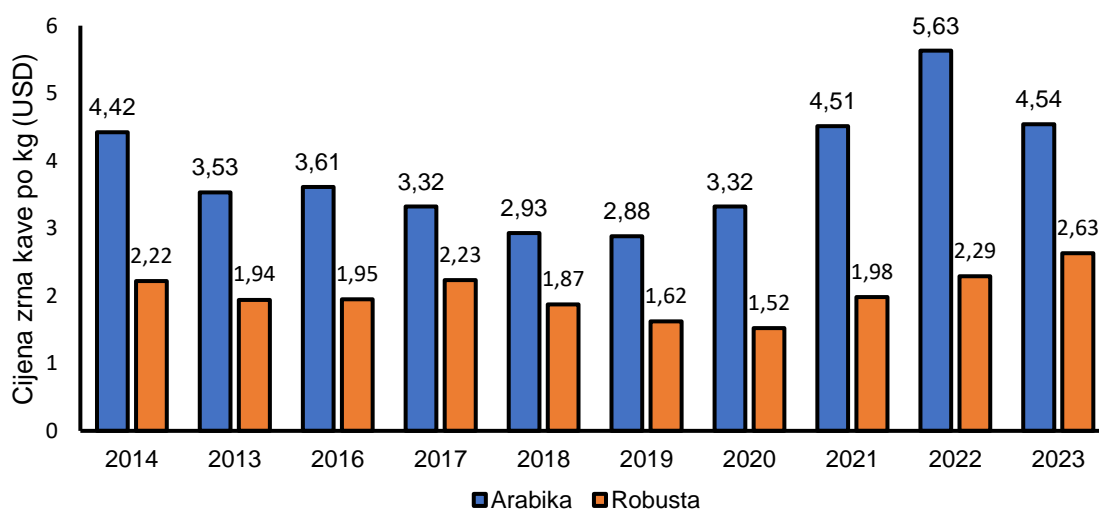
prvenstveno samo dvije koriste za proizvodnju kave, a to su *Coffea arabica* (Arabika), s udjelom od gotovo 75 % svjetske proizvodnje, i *Coffea canephora* (Robusta), s udjelom od 23 – 24 % svjetske proizvodnje kave (Arya i sur., 2022). Izgled zelenih zrna Arabika i Robusta kava prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Primjer zelenog zrna Robusta kave (lijevo) i Arabika kave (desno) (Latosińska, 2017).

Manje uzgajane su vrste *C. liberica* i *C. excelsa*, uglavnom ograničene na zapadnu Afriku i Aziju te čine samo 1 - 2 % svjetske proizvodnje (Rodrigues i sur., 2013). *C. liberica* je manje popularna među potrošačima i karakteristična je po lošijoj kvaliteti i slabijem okusu, a *C. excelsa* je po profilu okusa vrlo slična Arabiki, a po uzgoju Robusti (Davis i sur., 2022).

Zrna Arabika kave smatraju se kvalitetnijima i profinjenijeg su okusa od Robusta zrna što se odražava i na njihovu cijenu te su stoga zrna Arabika kave skuplja (Davis i sur., 2022). Kretanje cijene zrna Arabika i Robusta kava u razdoblju od 2014. do 2023. godine prikazano je na Slici 8.



Slika 8. Kretanje cijene zrna Arabika i Robusta kava u razdoblju od 2014. do 2023. godine (Statista, 2024b)

Postoje različiti načini pripreme napitaka od zrna kave te se tako razlikuju moka, filter, turska, espresso kava, itd. Kava je izuzetno popularno piće na globalnoj razini te se po učestalosti konzumacije nalazi na trećem mjestu, iza vode i čaja (Gitnux, 2024).

2.2.1. Bioaktivni sastav zelenih zrna kave

Zelena zrna kave sadrže različite bioaktivne spojeve od kojih je zasigurno najpoznatiji kafein, iz skupine metilksantina. Kava sadrži i značaj udjel polifenola, naročito klorogenskih kiselina koje posjeduju visoki antioksidacijski kapacitet. Kafeoilkininska kiselina, jedan od glavnih polifenolnih spojeva kave, ester je kafeinske i kininske kiseline i često se naziva klorogenska kiselina. Izraz klorogenske kiseline, međutim, uključuje cijeli niz hidroksicimetnih estera s kininskom kiselinom, kao što su kafeoil-, feruloil-, dikafeoil- i kumaroilkininska kiselina. Uz to, postoji nekoliko izomernih oblika klorogenskih kiselina za svaku podskupinu, a različiti ekstrakti kave obično sadrže različite klorogenske kiseline, ali najčešći izomer je 5-kafeoilkininska kiselina (Tajik i sur., 2017). Osim klorogenskih kiselina, kava sadrži i druge polifenolne spojeve, poput izoflavona, lignana, tanina i antocijanina (Jeszka-Skowron i sur., 2014). Lipidna frakcija zelenih zrna kave sastoji se uglavnom od triacilglicerola, sterola, tokoferola i diterpena, pri čemu potonji čine do 20 % ukupnih lipida (Alonso-Salces, 2009). Proces prženja kava uzrokuje niz promjena u sastavu zrna kave jer se neki spojevi razgrađuju ili modificiraju što rezultira razvojem karakteristične arome, okusa i boje. Kako bi se tijekom ovog procesa izbjegao gubitak nekih bioaktivnih spojeva s potencijalno pozitivnim učinkom na zdravlje, zelena kava može se koristiti za dobivanje tzv. „ekstrakta zelene kave“, nakon ekstrakcije vrućom vodom ili alkoholom. Ekstrakti zelenih zrna kave posjeduju izraženi antioksidacijski kapacitet, potvrđena im je antibakterijska aktivnost i pozitivan učinak na smanjenje krvnog tlaka (Alves, 2010). Osim pripreme napitaka, zelena zrna kave do sada su se ispitivala u brojnim znanstvenim istraživanjima u svrhu obogaćivanja bioaktivnog sastava različitih prehrambenih proizvoda, a neki od primjera prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Primjeri znanstvenih istraživanja prehrambenih proizvoda obogaćenih ekstraktom zelene kave

Proizvod	Udjel ekstrakta zelenih zrna kave u konačnom proizvodu / Udjel klorogenskih kiselina u ekstraktu zelene kave	Zaključak	Referenca
Jogurt	0,5 % / 46,5 g na 100 g	Dodatkom ekstrakta zelene kave osiguran je željen pH jogurta, kiselost i boja uz poboljšanje teksture proizvoda i senzorskih karakteristika.	Pimpley i sur. (2022)
Tekući Kashk	0,5 – 2,5 % / 39,1 g na 100 g	Dodatak inkapsuliranog ekstrakta zelene kave povećao je antioksidacijski kapacitet tekućeg Kashk-a uz očuvanje boje, pH vrijednosti i reoloških svojstava.	Rahpeyma i sur. (2020)
Kruh	1,0 – 2,0 % / 37,3 g na 100 g	Dodatkom ekstrakta zelene kave povećan je antioksidacijski kapacitet uz zadržavanje poželjne strukture tijesta.	Vasudevaiah i sur. (2017)
Instant kava	U udjelu da konačan proizvod sadrži 7 % polifenola / 14,0 g na 100 g	Dodatkom ekstrakta zelene kave povećan je antioksidacijski kapacitet, ali i smanjena senzorska prihvatljivost kave.	Corso i sur. (2016)
Krafna	0,25, 0,5 i 1 g na 100 g / 25,5 g na 100 g	Dodatak ekstrakta zelene kave povećao je antioksidacijski kapacitet te nije narušio strukturu tijesta.	Budryn i sur. (2013)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci

U ovome istraživanju korištena su zelena zrna Arabika kave, podrijetlom iz Brazila, i Robusta kave, podrijetlom iz Gvatemale. Zelena zrna kava usitnjena su u kriomlinu i u usitnjenom obliku korištena su za sve daljnje eksperimente. Zelene kave nabavljane su u QUAHWA Coffee Roastery & Coffee shop (Hrvatska). Za proizvodnju čokolade korišteni su kakaov maslac (100 %) (Barry Callebaut, Belgija), mlijeko u prahu s 1,5 % mliječne masti (Dukat, Hrvatska), ksilitol (Greenlab, Finska) i sojin lecitin (Mivolis, Austrija).

3.1.1. Kemikalije

- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Acetonitril (Fischer Scientific, SAD)
- Analitički standardi metilksantina i polifenolnih spojeva:
 - Galna kiselina (<97 %) (Sigma.Aldrich, SAD)
 - Kafein (<97 %) (Fluka, Njemačka),
 - Neoklorogenska kiselina (<98 %) (Sigma Aldrich, SAD)
 - Kriptoklorogenska kiselina (<98 %) (Sigma Aldrich.SAD)
 - Klorogenska kiselina (<97 %) (Sigma-Aldrich, SAD)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Etanol (Gram Mol, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Lach-Ner, Češka)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kvarcni pijesak (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- Metanol (Honeywell, SAD)
- Mravlja kiselina (Fischer Scientific, SAD)
- Natrijev karbonat (Lach-Ner, Češka)

3.1.2. Oprema

- Analitička vaga New Classic MF (Mettler Toledo, Švicarska)
- Centrifuga SL8/8R (ThermoFisher Scientific, SAD)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000) (Gilson, Francuska)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200 (HPLC) (Agilent Technologies, SAD)
- Kriomlin (Retsch GmbH, Njemačka)
- Kromatografska kolona Zorbax Extend-C18 (Agilent Technologies, SAD)

- Magnetska mješalica (SMHS-6) (Witeg Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Melanžer (Twin Stone, Španjolska)
- Spektrofotometar Genesys 10S (ThermoFischer Scientific, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik (Instrumentaria, Hrvatska)
- Tehnička vaga A&D Instruments (UK)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H (Elma Schmidbauer GmbH, Njemačka)
- Vortex (MX-S) (DLAB Scientific Co., Kina)
- Vodena kupelj Inko VKZ ERN (Inkolab d.o.o, Hrvatska)

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari u zelenim zrnima kave

Suha tvar uzoraka zelenih kava određena je standardnom AOAC 930.15 metodom (Padmore, 1990). Uzorci su sušeni u aluminijskim posudicama u laboratorijskom sušioniku pri 105 °C do konstante mase.

3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava zelenih zrna kave

3.2.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz uzoraka zelenih zrna kava provedena je u vodenoj kupelji, pri 80 °C kroz 15 min, i potom miješanjem na magnetskoj miješalici kroz 5 min. Korišten je omjer uzorak/otapalo 1 g : 100 mL, a kao ekstrakcijsko otapalo 80 %-tna (v/v) otopina metanola. Po završetku ekstrakcije, provedena je filtracija (Whatman® 4 filter papir), nakon čega je skupljen filtrat, a zaostali talog podvrgnut je još jednom ekstrakciji, koristeći navedene parametre. Po završetku druge ekstrakcije, filtrati dobiveni nakon prve i druge ekstrakcije spojeni su i čuvani na - 20 °C do daljnjih analiza i korišteni za analizu udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta i udjela pojedinačnih metilksantina i polifenola.

3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Udjel ukupnih polifenola u zrnima zelenih kava određen je koristeći metodu opisanu u radu Singleton i Rossi (1965). U staklene epruvete otpipetiralo se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL ekstrakta, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata te se reakcijska smjesa izmiješala na vortex-u. Apsorbancija reakcijske smjese mjerila se nakon 30 min na valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba pripremila se na isti način, samo je umjesto uzorka sadržavala demineraliziranu vodu. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine galne kiseline različite koncentracije (20 – 100 µg mL⁻¹) te su rezultati izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (EGK).

3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Re i sur., 1999) uzoraka pripremila se otopina ABTS^{•+} radikala oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Na dan analize otopina se razrijedila etanolom do konačne koncentracije ABTS^{•+} radikala od 1 % tako da je apsorbancija te otopine iznosila $0,70 \pm 0,02$ na 734 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od 4 mL otopine ABTS^{•+} radikala te 40 μ L ekstrakta, a apsorbancija se mjerila na valnoj duljini od 734 nm nakon 6 min. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine Trolox-a različite koncentracije (25 – 250 μ g mL⁻¹).

3.2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

U radu je primijenjena metodologija Brand-Williams i sur. (1995). Reakcijska smjesa sastojala se od 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH u metanolu i 100 μ L ekstrakta. Apsorbancija reakcijske smjese mjerila se na 515 nm nakon 30 min. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine Trolox-a različite koncentracije (25 – 250 μ g mL⁻¹).

3.2.2.5. Određivanje udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 s kolonom Zorbax Extend C18 (4,6 × 250 mm, 5 μ m i.d.) (Agilent Technologies, SAD) spojene s detektorom s nizom fotodioda (engl. *photodiode array detector* - PDA). Elucija je provedena gradijentno s dvokomponentnom mobilnom fazom koja se sastojala od 1 %-tne (v/v) otopine mravlje kiseline u vodi (A) i 1 %-tne (v/v) otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (B), prema režimu elucije prikazanom u Tablici 4, i pri protoku od 1 mL min⁻¹.

Tablica 4. Režim elucije za primijenjenu HPLC metodu

Vrijeme (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0	93	7
5	93	7
45	60	40
47	30	70
52	30	70

Volumen injektiranja iznosio je 5 μ L, a temperatura kolone bila je 25 °C. Analiti su detektirani PDA detektorom pri valnim duljinama od 278 i 320 nm. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 μ m

membranski filter (Nylon Membranes, SAD) prije analize, a analize svih uzoraka provedene su u duplikatu (Šeremet i sur., 2022).

Identifikacija polifenola i metilksantina provedena je usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih apsorpcijskih spektara (190 – 400 nm) s komercijalno dostupnim standardima, a kvantifikacija izradom baždarnih krivulja odgovarajućih standarda (2 – 100 µg mL⁻¹).

3.2.3. Formulacija bijelih čokolada uz dodatak zelenih zrna kave

Pripremljeno je ukupno 5 formulacija bijelih čokolada, od čega je jedna predstavljala kontrolni uzorak (uzorak Č_K) bez dodatka zelenih zrna kave i čiji je sastav uključivao dodatak kakaovog maslaca (42,4 %), mlijeka u prahu (22,6 %), ksilitola (33,8 %) i sojinog lecitina (1,2 %). U 2 formulacije čokolada dodana su zasebno usitnjena zelena zrna Arabika ili Robusta kava u udjelu od 3,5 % (uzorci Č_A_3,5 i Č_R_3,5), a u preostale 2 formulacije u udjelu od 7 % (uzorci Č_A_7 i Č_R_7). Čokoladne mase pripremljene su miješanjem svih sastojaka u melanžeru kroz 2 h, nakon čega je slijedilo ručno temperiranje (grijanje čokoladne mase na 45 °C, potom hlađenje na 26 °C i ponovno grijanje na 28 °C), lijevanje u kalupe, hlađenje te vađenje čokolada iz kalupa.

3.2.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada

Novoformulirane čokolade (oko 10 g) prebačene su u reagens boce u koje je dodano 10 mL vode zagrijane do vrenja nakon čega se provodila ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici kroz 10 min i potom ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (50 °C) kroz 10 min. Potom je u iste boce dodan metanol (10 mL) te su uzorci ponovno miješani 10 min na magnetskoj miješalici i 10 min u ultrazvučnoj kupelji (50 °C). Po završetku ekstrakcija, uzorci su ohlađeni i centrifugirani (9500 rpm, 20 min), a dobiveni ekstrakti korišteni su za određivanje udjela ukupnih polifenola (poglavlje 3.2.2.2), antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodama (poglavlja 3.2.2.3. i 3.2.2.4.) te određivanje udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC metodologijom (poglavlje 3.2.2.5.).

3.2.3.2. Određivanje svojstva taljenja čokolada

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) korištena je za karakterizaciju profila taljenja čokolada i provedena je prema metodi opisanoj u radu Dolatowska-Żebrowska i sur. (2019). Svaki uzorak čokolade (oko 4 mg) bio je zatvoren u aluminijsku posudicu za mjerenje. Tijekom analize, uzorak je prvo hlađen na 10 °C, a zatim zagrijavan brzinom od 4 °C min⁻¹ u temperaturnom rasponu od 10 °C do 50 °C, uz korištenje inertne struje dušika s protokom od 50 mL min⁻¹. Rezultati su prikazani kao DSC termogrami iz kojih su određene maksimalna temperatura taljenja (T_{ij}) i entalpija taljenja (ΔH_{ij}) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolade.

3.2.3.3. Određivanje senzorskih svojstava čokolada

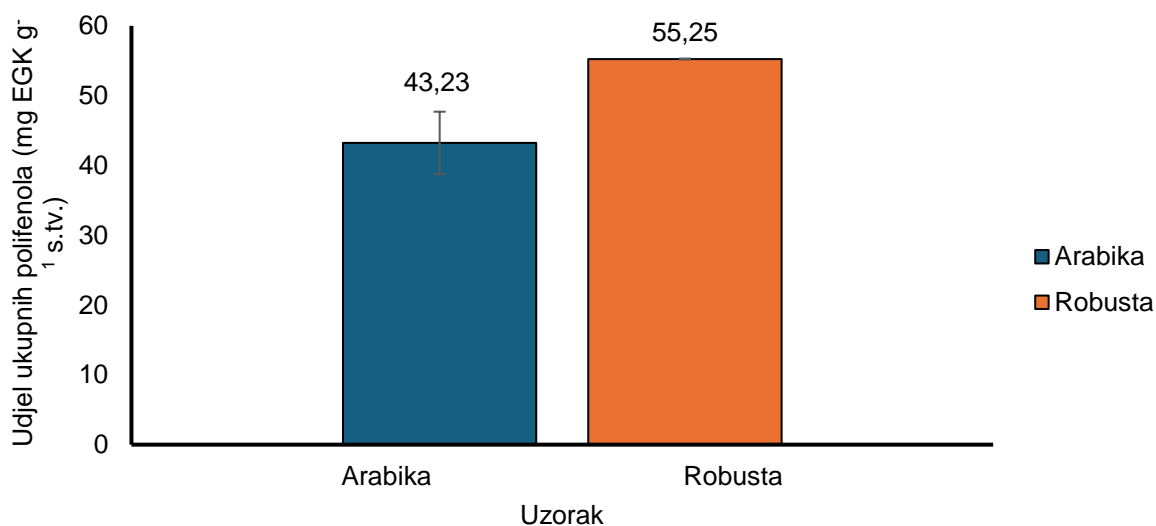
Senzorska analiza čokolada provedena je prema metodi ISO 8589:2007. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji se sastojao od 10 članova starosti između 20 i 50 godina. Članovi panela imali su prethodnog iskustva u ocjenjivanju čokoladnih proizvoda. Čokolade su servirane članovima panela na sobnoj temperaturi, a ocjenjivan je intenzitet parametara izgleda (sjaj i homogenost), akustičnosti (lom), teksture (taljenje i zrnatost) te okusa (slatko, gorko, biljno i kava) ocjenama od 1 do 9 (pri čemu 1 označava izrazito nizak intenzitet/jačinu parametra, a 9 izrazito visoki intenzitet/jačinu parametra). Opća prihvatljivost čokolada ocjenjivana je hedonističkom skalom od 1 do 9, pri čemu 1 izražava izrazito nepoželjan proizvod, a 9 izrazito poželjan proizvod.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je razviti i karakterizirati formulacije bijelih čokolada obogaćenih zelenim zrnima Arabika i Robusta kava. U tu svrhu određen je bioaktivni sastav zelenih zrna kava koji je uključivao određivanje udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta, udjela kafeina te neoklorogenske, klorogenske i kriptoklorogenske kiseline. Nakon dodatka zelenih zrna kava (3,5 i 7 %) u bijelu čokoladnu masu, čokoladama je također određen bioaktivni sastav, ali i profil taljenja te su im ispitana senzorska svojstva.

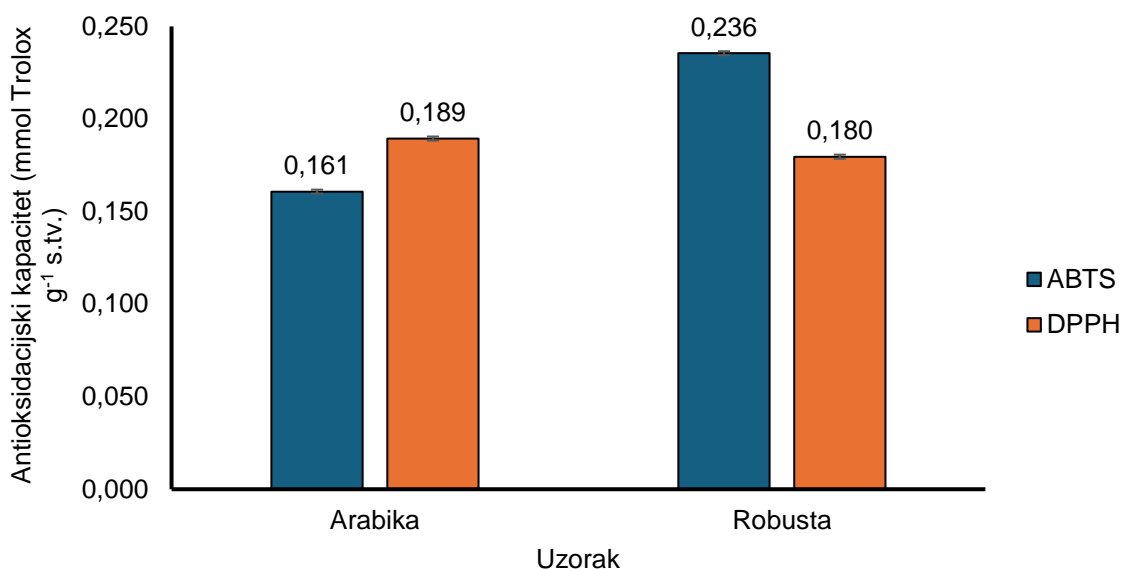
4.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava zelenih zrna kave

Bioaktivna karakterizacija zelenih zrna kava uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama i rezultati su prikazani na Slikama 9 i 10. Također, određen je udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina HPLC-PDA metodom i rezultati su prikazani na Slici 11. Rezultati određivanja bioaktivnog sastava izraženi su na suhu tvar uzoraka, koja je za uzorak zrna Arabika kave iznosila $95,9 \pm 0,04$ %, a za uzorak zrna Robusta kave $96,16 \pm 0,20$ %.



EGK-ekvivalent galne kiseline; s.tv.-suha tvar uzorka

Slika 9. Udjel ukupnih polifenola u zelenim zrnima kave



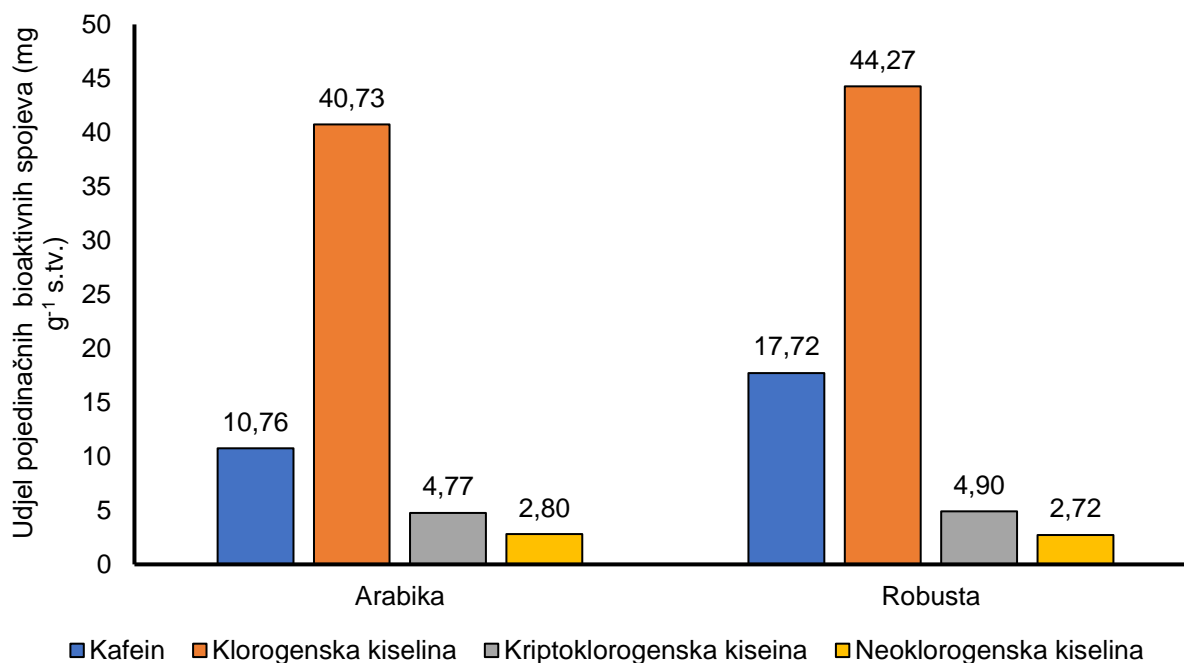
s.tv.-suha tvar uzorka

Slika 10. Antioksidacijski kapacitet zelenih zrna kave određen ABTS i DPPH metodama

Udjel ukupnih polifenola u zelenim zrnima Arabika kave iznosio je 43,23 mg EGK g⁻¹ s. tv., dok je u zelenim zrnima Robusta kave određen veći udjel od 55,25 mg EGK g⁻¹ s. tv. Zelena zrna Robusta kave također su pokazala viši antioksidacijski kapacitet od 0,236 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. (ABTS) i 0,180 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. (DPPH), u odnosu na zelena zrna Arabika kave čiji je antioksidacijski kapacitet iznosio 0,161 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. (ABTS) i 0,189 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. (DPPH).

Alnsour i sur. (2022) određivali su udjel ukupnih polifenola u zrnima zelene kave podrijetlom iz Kenije, Etiopije, Brazila i Kolumbije. Najviši udjel ukupnih polifenola od 17,25 mg g⁻¹ EGK odredili su u zrnima podrijetlom iz Kenije, a najniži udjel od 13,82 mg g⁻¹ EGK u zrnima podrijetlom iz Brazila. U istraživanju Jeszka-Skowron i sur. (2016), antioksidacijski kapacitet ekstrakta zelenih zrna Arabika kave iznosio je 37,9 mmol Trolox L⁻¹, a Robusta zrna 57,1 mmol Trolox L⁻¹. U istome istraživanju ekstrakt zelenih zrna Robusta kave pokazao je veći postotak inhibicije DPPH radikala, od 72,6 %, u odnosu na ekstrakt zrna Arabika kave, za koji je zabilježen postotak inhibicije od 47,5 %.

Nadalje, u ovome istraživanju, bioaktivna karakterizacija zelenih zrna kava uključivala je i određivanje udjela pojedinačnih metilksantina i polifenolnih spojeva. Rezultati su prikazani na Slici 11.



s.tv.-suha tvar uzorka

Slika 11. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina u uzorcima zelenih zrna kave

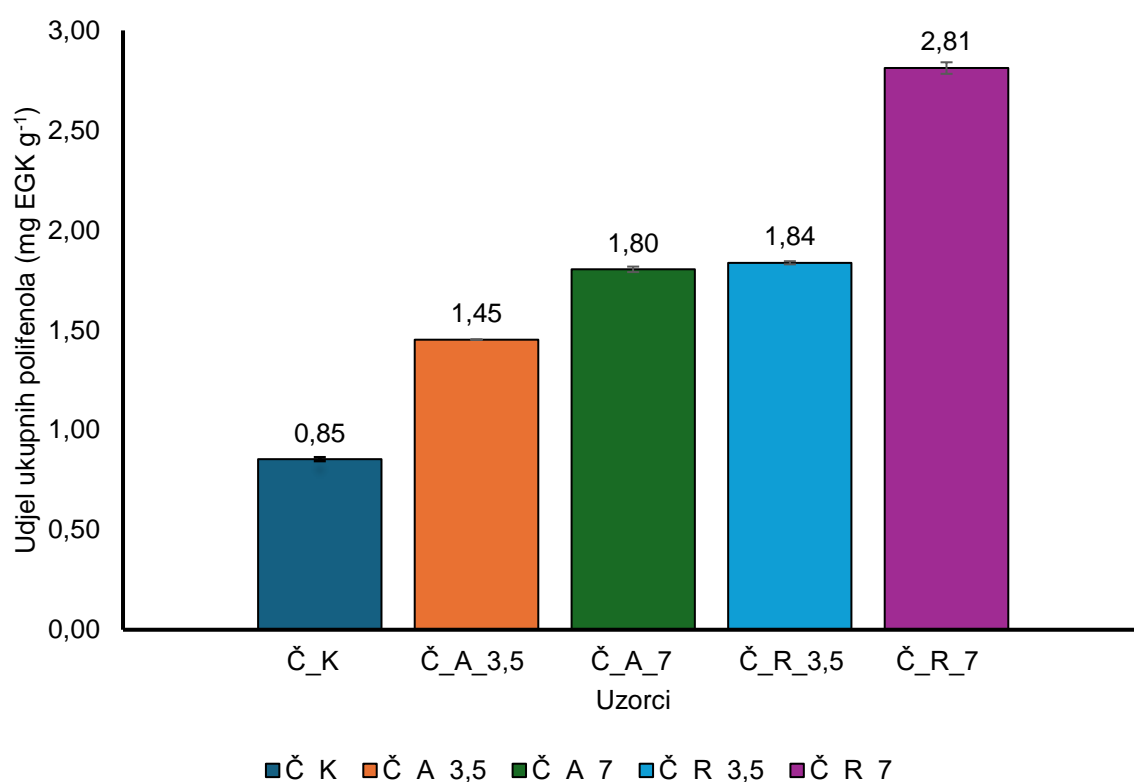
Primjenom HPLC-PDA metodologije, od polifenolnih spojeva identificirane su klorogenska, neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina, a od metilksantina kafein. Klorogenska kiselina bila je najzastupljeniji polifenolni spoj kod oba uzorka kava te je njezin udjel u zelenim zrnima Arabika kave iznosio 40,73 mg g⁻¹ s. tv., a kod zrna Robusta kave 44,27 mg g⁻¹ s. tv. Kriptoklorogenska kiselina bila je zastupljena u udjelu od 4,77 mg g⁻¹ s. tv. u zrnima Arabika kave te u udjelu od 4,90 mg g⁻¹ s. tv. u zrnima Robusta kave, dok je neoklorogenska kiselina detektirana u najmanjem udjelu u obje vrste kave, 2,80 mg g⁻¹ s. tv. u zrnima Arabika kave i 2,72 mg g⁻¹ s. tv. u zrnima Robusta kave. Udjel kafeina iznosio je 10,76 mg g⁻¹ s. tv. u zrnima Arabika kave te 17,72 mg g⁻¹ s.tv. u zrnima Robusta kave.

Jeszka-Skowron i sur. (2016) istraživali su bioaktivni sastav zelenih zrna Robusta i Arabike kave podrijetlom iz Brazila i Vijetnama te su u ekstraktu zrna Arabika kave odredili udjel klorogenske kiseline od 117 mg L⁻¹, udjel kriptoklorogenske kiseline od 19,7 mg L⁻¹ te udjel neoklorogenske kiseline od 14,9 mg L⁻¹. U ekstraktu zelenih zrna Robusta kave njihovi udjeli bili su redom 110,0, 27,3 i 21,8 mg L⁻¹. Šeremet i sur. (2022) određivali su udjel klorogenskih kiselina i kafeina u zelenim zrnima Arabika i Robusta kave podrijetlom iz Brazila i Gvatemale te je udjel kafeina u zrnima Arabika kave iznosio 10,75 mg g⁻¹, a u zrnima Robusta kave 17,85 mg g⁻¹. Udjel klorogenskih kiselina u zrnima Arabika kave iznosio je redom: 38,49 mg g⁻¹

klorogenske kiseline, 5,02 mg g⁻¹ kriptoklorogenske kiseline i 2,63 mg g⁻¹ neoklorogenske kiseline, a njihovi udjeli u zrnima Robusta kave iznosili su 44,22, 7,39 i 4,00 mg g⁻¹.

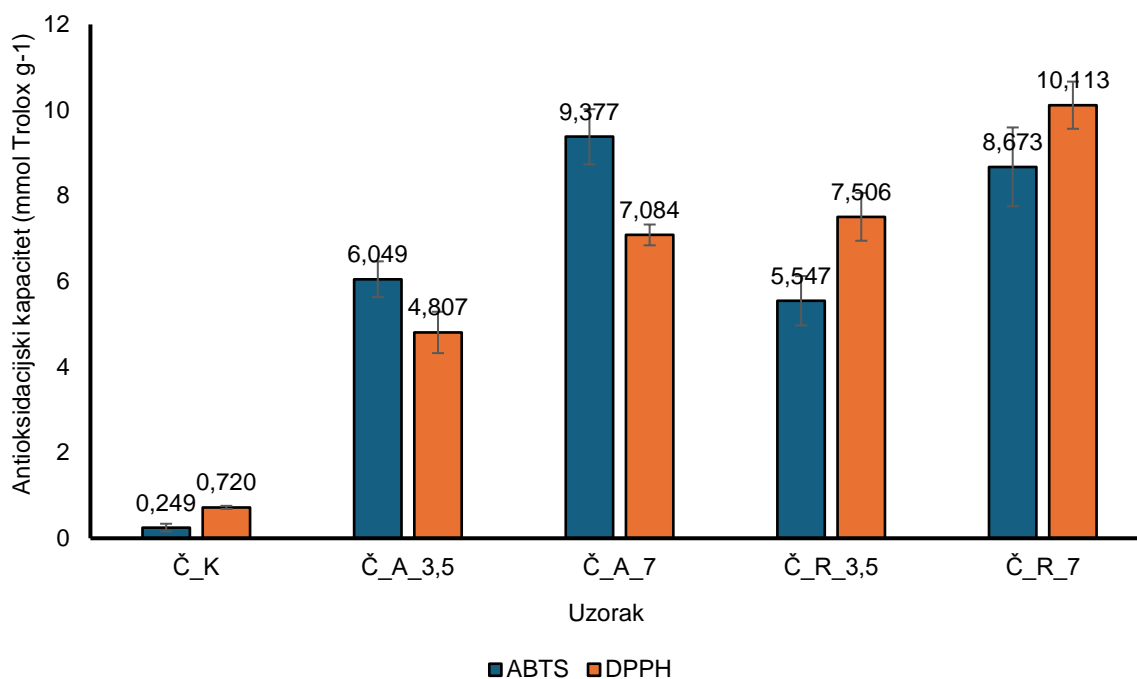
4.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada

U svrhu obogaćivanja bioaktivnog sastava bijelih čokolada, razvijene su formulacije istih s dodatkom usitnjenih zelenih zrna kava u udjelima od 3,5 i 7 %. Bioaktivna karakterizacija novoformuliranih čokolada uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama i rezultati su prikazani na Slikama 12 i 13. Također, u čokoladama su primjenom HPLC-PDA metode identificirani isti polifenolni spojevi (klorogenska, neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina) i metilksantini (kafein) kao i u uzorcima zelenih zrna kava (poglavlje 4.1.). Rezultati su prikazani na Slici 14.



EGK-ekvivalent galne kiseline

Slika 12. Udjel ukupnih polifenola u novoformuliranim čokoladama



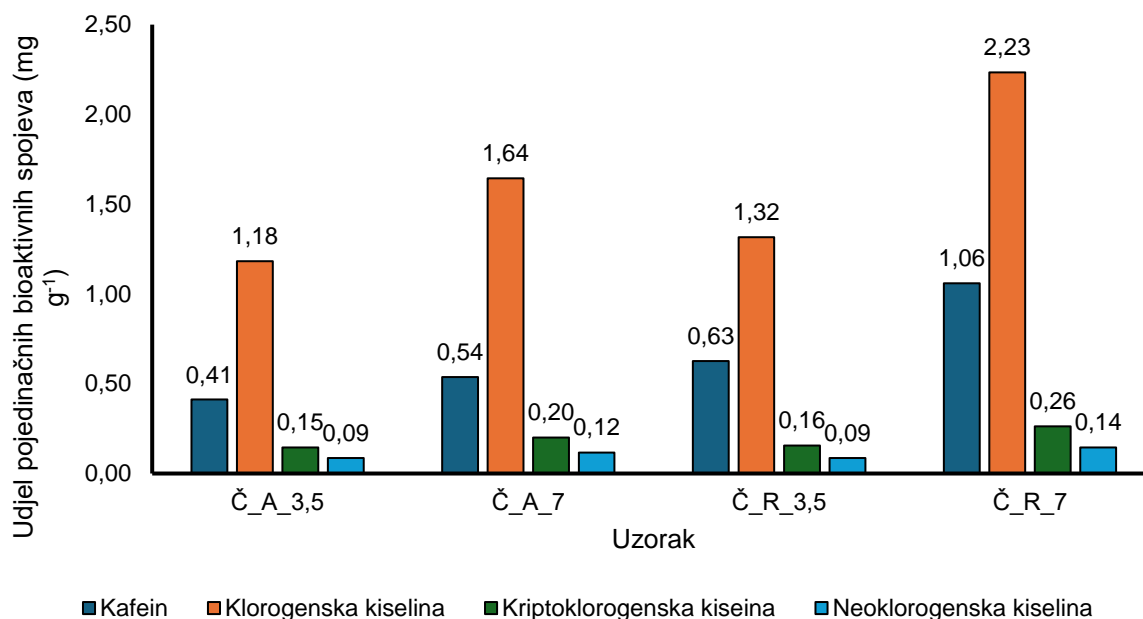
Slika 13. Antioksidacijski kapacitet novoformuliranih čokolada određen ABTS i DPPH metodama

U kontrolnom uzorku čokolade (Č_K) određen je udjel ukupnih polifenola od 0,85 mg EGK g⁻¹. Dodatkom zelenih zrna Arabika kave u udjelu od 3,5 % (Č_A_3,5) povećao se udjel ukupnih polifenola na 1,45 mg EGK g⁻¹, dok se dodatkom zelenih zrna Robusta kave u udjelu od 3,5 % (Č_R_3,5) udjel ukupnih polifenola povećao na 1,84 mg EGK g⁻¹. Dodatkom zelenih zrna Arabika kave u udjelu od 7 % (Č_A_7), udjel ukupnih polifenola povećao se na 1,80 mg EGK g⁻¹, a dodatkom zrna Robusta kave u istom udjelu (Č_R_7) na 2,81 mg g⁻¹ EGK.

Antioksidacijski kapacitet kontrolnog uzorka čokolade (Č_K) iznosio je 0,249 mmol Trolox g⁻¹ (ABTS) i 0,720 mmol Trolox g⁻¹ (DPPH). Dodatak zelenih zrna Arabika i Robusta kava u čokolade, i u udjelu od 3,5 i 7 %, rezultirao je porastom antioksidacijskog kapaciteta. Najveće povećanje antioksidacijskog kapaciteta, određeno ABTS metodom, uočeno je dodatkom zrna Arabika kave u udjelu od 7 % te je određeno 9,38 mmol Trolox g⁻¹, dok je najveći antioksidacijski kapacitet, određen DPPH metodom, detektiran u čokoladi s dodatkom 7 % zrna Robusta kavete je iznosio 10,11 mmol Trolox g⁻¹.

U istraživanju Cheng i sur. (2009), udjel ukupnih polifenola bijele čokolade iznosio je 126,39 mg ekvivalenata katehina EK/100 g, a u tamnoj čokoladi 576,54 mg EK/100 g. Bijela čokolada, za razliku od mliječne i tamne čokolade, ne sadrži bezmasnu suhu tvar kakaovih dijelova, već samo kakaov maslac pa stoga ne sadrži nopolifenolne spojeve podrijetlom iz kakaovih zrna (Afoakwa, 2016).

Nadalje, u ovome istraživanju provedena je kvantifikacija pojedinačnih bioaktivnih spojeva u novoformuliranim čokoladama i rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina u novoformuliranim čokoladama

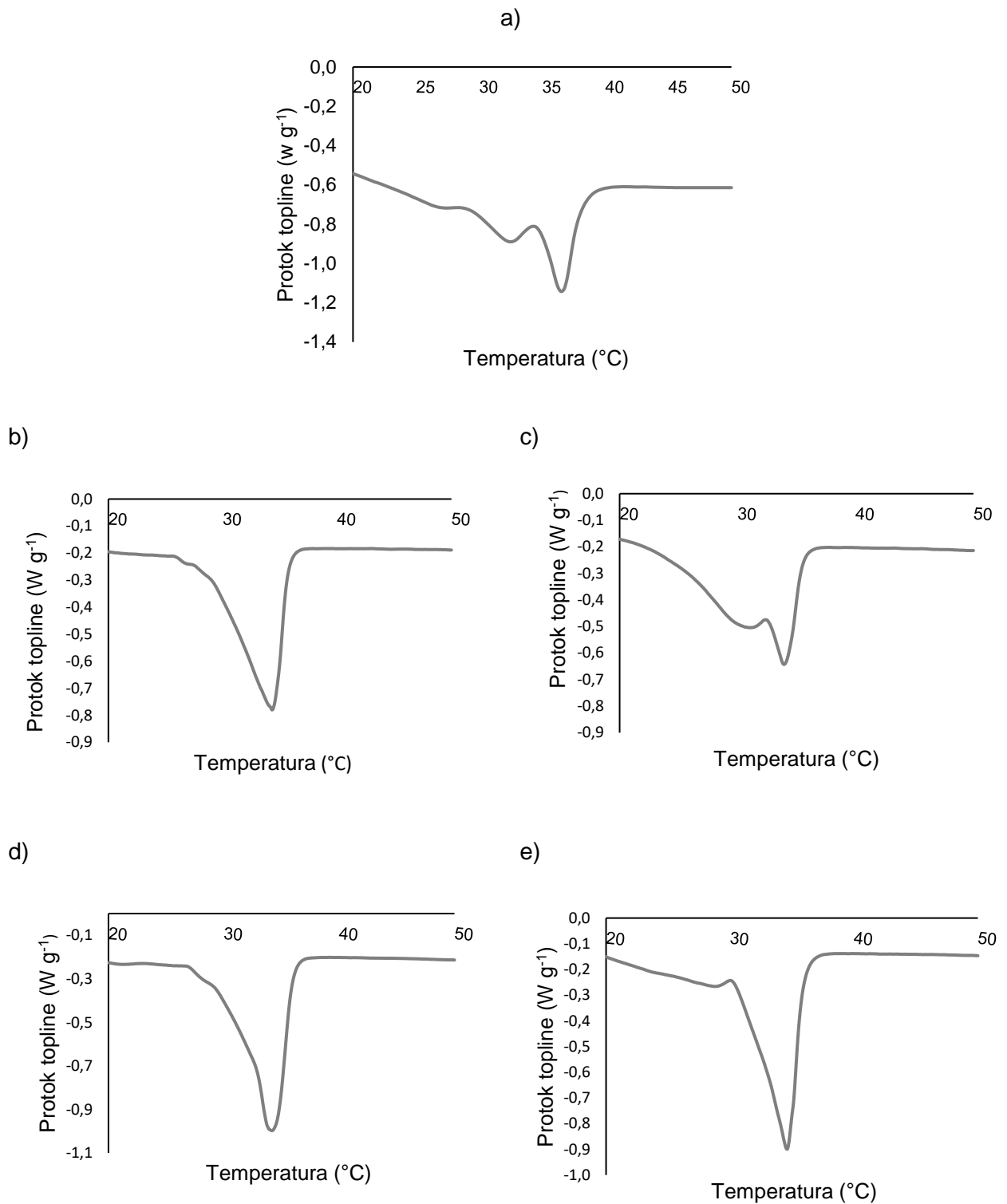
Udjel kafeina u uzorcima čokolada iznosio je redom 0,41 mg g⁻¹ u uzorku Č_A_3,5, 0,54 mg g⁻¹ u uzorku Č_A_7, 0,63 mg g⁻¹ u uzorku Č_R_3,5 i 1,06 mg g⁻¹ u uzorku Č_R_7. Od polifenolnih spojeva, najzastupljenija je bila klorogenska kiselina u rasponu udjela od 1,18 mg g⁻¹ (Č_A_3,5) do 2,23 mg g⁻¹ (Č_R_7). Najviši udjel svih polifenolnih spojeva određen je u uzorku čokolade pripremljenom s dodatkom zelenih zrna Robusta kave u udjelu od 7 %, pri čemu je u svim čokoladama, kao i u zelenim zrnima kava, dominantno bila određena klorogenska kiselina, dok su kriptoklorogenska i neoklorogenska bile određene u puno manjem udjelu.

Poliński i sur. (2022) istraživali su utjecaj dodatka praha Matcha čaja i konjske rotkvice, u udjelima od 1, 2, 3 i 4 %, na antioksidacijska svojstva i bioaktivni sastav bijele čokolade. Kod uzorka bijele čokolade pripremljenog s dodatkom Matcha čaja u udjelu od 4 % zabilježen je porast udjela klorogenske i kafeinske kiseline od 7,00 i 4,05 µg/100 g (kontrolni uzorak), na 1693,0 µg/100 g i 59,0 µg/100 g (obogaćena čokolada).

4.3. Određivanje svojstva taljenja čokolada

Određivanje svojstva taljenja čokolada provedeno je DSC metodom i dobiveni termogrami prikazani su na Slici 15. Iz dobivenih DSC termograma očitane su vrijednosti za maksimalnu

temperaturu taljenju i specifičnu entalpiju taljenja. Rezultati su prikazani u Tablici 5.



Slika 15. DSC termogramni uzoraka čokolade – Č_K (a), Č_R_3,5 (b), Č_R_7 (c), Č_A_3,5 (d), Č_A_7 (e)

Tablica 5. Rezultati DSC analize – maksimalna temperatura taljenja (T_t) i specifična entalpija taljenja (ΔH_t) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolada

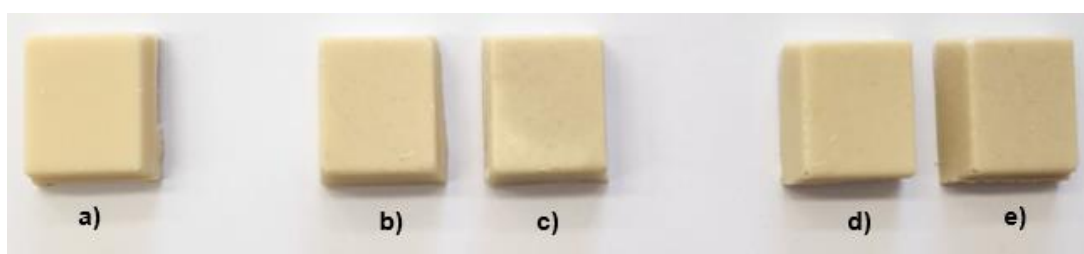
Uzorak	Maksimalna temperatura taljenja - T_t (°C)	Specifična entalpija taljenja - ΔH_t (J g ⁻¹)
Č_K	36,6	27,09
Č_A_3,5	34,6	29,28
Č_A_7	34,2	44,44
Č_R_3,5	34,3	36,16
Č_R_7	33,9	28,44

Na krivuljama taljenja svih uzoraka čokolada (DSC termogrami) primijećen je oštar endotermni pik u rasponu temperatura maksimuma od 33,9 °C (Č_R_7) do 36,6 °C (Č_K) i predstavlja taljenje najpoželjnijeg polimornog oblika kakaovog maslaca - oblik V (β_2). Maksimalna temperatura taljenja oblika V kakaovog maslaca u kontrolnom uzorku (Č_K) iznosila je 36,6 °C, dok je u uzorcima s dodatkom zelenih zrna kave ona bila niža – redom, 34,6, 34,2, 34,3 i 33,9 u uzorcima Č_A_3,5, Č_A_7, Č_R_3,5 i Č_R_7. Također, određena je specifična entalpija taljenja te je ona iznosila redom 27,09, 29,28, 44,44, 36,16 i 28,44 J g⁻¹ za uzorke Č_K, Č_A_3,5, Č_A_7, Č_R_3,5 i Č_R_7.

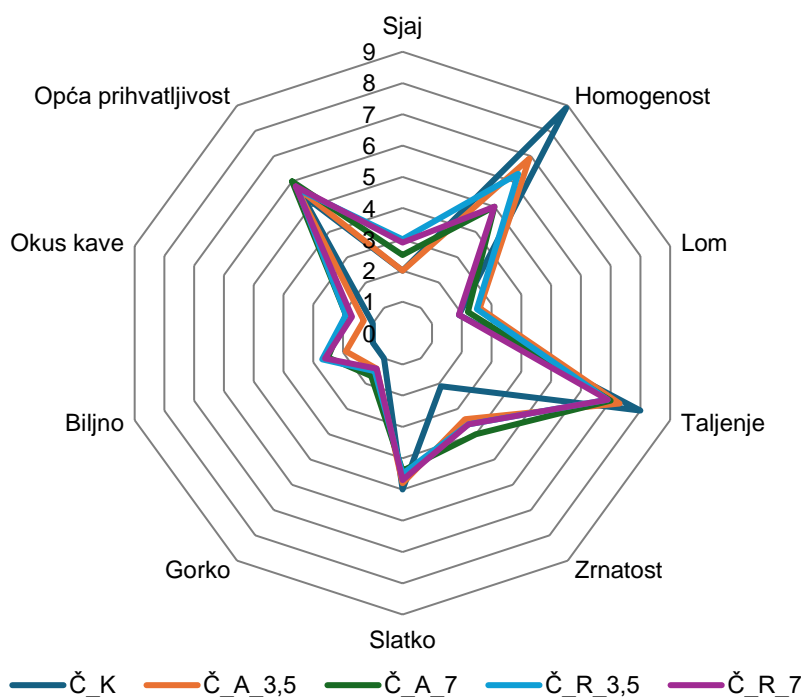
Ostrowska-Ligeza i sur. (2018) proučavali su svojstva taljenja tamne, mliječne i bijele čokolade te su utvrdili da raspon temperatura taljenja od 33,7 do 34,9 °C ukazuje na prisutnost oblika V kakaovog maslaca, koji je ujedno i najpoželjniji i najstabilniji polimorni oblik kakaovog maslaca u čokoladama. Također, u mliječnoj i bijeloj čokoladi primijetili su endotermni pik na DSC kromatogramima koji odgovara taljenju mliječne masti i koji se pojavljuje prije endoternog pika taljenja oblika V kakaovog maslaca pri temperaturi od 26,05 °C. U ovome istraživanju, endotermni pik povezan s taljenjem mliječne masti nije uočen, što se može povezati s korištenim mlijekom u prahu koje je sadržavalo niski udjel mliječne masti (1,5 %).

4.4. Određivanje senzorskih svojstava čokolada

Novoformulirane čokolade prikazane su na Slici 16. te se mogu uočiti male razlike u boji između uzoraka, ovisno o udjelu dodanih usitnjenih zrna zelene kave. Senzorska analiza novoformuliranih čokolada uključivala je evaluaciju parametara izgleda (sjaj i homogenost), akustičnosti (lom), teksture (taljenje i zrnatost) te okusa (slatko, gorko, biljno i kava). Rezultati su prikazani na Slici 17.



Slika 16. Novoformulirane čokolade - Č_K (a), Č_A_3,5 (b), Č_A_7,5 (c), Č_R_3,5 (d) i Č_R_7 (e)



Slika 17. Rezultati senzorske analize novoformuliranih čokolada

Sve čokolade ocijenjene su niskim ocjenama za sjaj u rasponu od 2,0 (Č_K i Č_A_3,5) do 3,0 (Č_R_3,5). Čokolade s većim udjelom zelenih zrna kava bile su evaluirane s nižim ocjenama za homogenost. Tako je kontrolni uzorak (Č_K) dobio najvišu ocjenu za homogenost od 8,9, a najnižu ocjenu 5,0 dobili su uzorci (Č_A_7 i Č_R_7). Intenzitet loma je u svim uzorcima

ocijenjen niskim ocjenama u rasponu od 1,9 (Č_K i Č_R_7) do 2,6 (Č_A_3,5), dok je intenzitet taljenja bio ocijenjen izrazito visoko u rasponu ocjena od 6,9 (Č_R_3,5 i Č_R_7) do 8,0 (Č_K).

Zrnatost je bila izraženija kod uzoraka čokolada s dodatkom zelenih zrna kave, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, te je najizraženija bila u uzorku (Č_A_7) 4,0, dok je kod kontrolnog uzorka (Č_K) iznosila 2,1. Intenzitet slatkoće je za svih 5 uzoraka čokolada bio u relativno uskom rasponu ocjena od 4,4 (Č_A_7) do 5,0 (Č_K). Također, prema dobivenim rezultatima, gorki okus čokolada nije bio izražen pošto je ocijenjen vrijednostima od 1,0 (Č_K) do 1,7 (Č_A_7). Biljni okus bio je najmanje izražen u kontrolnom uzorku (Č_K) s ocjenom 1,0, a najizraženiji je bio u uzorku (Č_R_3,5) s ocjenom 2,7. Okus kave nije bio izražen i ocijenjen je vrijednostima u uskom rasponu od 1,0 (Č_K) do 1,9 (Č_A_7 i Č_R_3,5). U konačnici, svi su uzorci čokolada bilo dobro prihvaćeni od strane panelista prema dobivenim ocjenama za opću prihvatljivost. Tako je najveću ocjenu za opću prihvatljivost od 6,0 dobio uzorak (Č_A_7), a najmanju ocjenu od 5,5 uzorak kontrolni uzorak (Č_K).

U istraživanju Lončarević i sur. (2019) određivane su senzorske karakteristike bijele čokolade obogaćene inkapsulatom ekstrakta zelenog čaja, sušenog raspršivanjem, u udjelu od 100 g kg⁻¹. Uzorak s dodatkom inkapsulata bio je ocijenjen višom ocjenom za boju, od 9,33, s obzirom na kontrolni uzorak, koji je za isti parametar dobio ocjenu 1,0. Također, dodatak inkapsulata znatno je utjecao na sjaj, te je tako uzorak obogaćen inkapsulatom dobio ocjenu 6,32, dok je kontrolni uzorak dobio ocjenu 8,03. Intenzitet taljenja i zrnatost čokolada nisu bili znatno promijenjeni uslijed dodatka inkapsulata. Nadalje, dodatak inkapsulata uzrokovao je smanjenje slatkoće s 7,87, određeno za kontrolni uzorak, na 3,24, u uzorku s dodatkom inkapsulata.

5. ZAKLJUČCI

1. Zelena zrna Arabika i Robusta kava pokazala su se značajnim izvorom polifenolnih spojeva, naročito klorogenske, kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline, uz izrazito visoki antioksidacijski kapacitet, pri čemu je viši udjel ovih bioaktivnih spojeva određen u zelenim zrnima Robusta kave.
2. Dodatak zelenih zrna kave u formulacije bijelih čokolada rezultirao je bogatijim i raznovrsnijim bioaktivnim sastavom čokolada, u odnosu na čokoladu bez dodatka zrna kave, pri čemu je dodatak od 7 % zelenih zrna Robusta kave rezultirao najvećim povećanjem udjela ukupnih polifenola i svih ispitivanih pojedinačnih bioaktivnih spojeva.
3. Dodatkom zelenih zrna kava u formulacije bijelih čokolada zadržan je poželjan profil taljenja čokolada određen DSC analizom.
4. Bijele čokolade s dodatkom zelenih zrna kava pokazale su se senzorski prihvatljivijima u odnosu na čokoladu bez dodatka zrna kave.

6. POPIS LITERATURE

- Afoakwa EO (2016) *Chocolate Science and Technology*, 2. izd., Wiley Blackwell, Oxford, str. 2-58.
- Alnsour L, Issa R, Awwad S, Albals D, Al-Momani I (2022) Quantification of total phenols and antioxidants in coffee samples of different origins and evaluation of the effect of degree of roasting on their levels. *Molecules* **27**, 1591. <https://doi.org/10.3390/molecules27051591>
- Alonso-Salces R M, Serra F, Reniero F, Héberger K (2009) Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *J Agr Food Chem* **57**, 4224–4235. <https://doi.org/10.1021/jf8037117>
- Alves R C, Casal S, Oliveira MBPP (2010) Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *J Food Compos Anal* **23**, 802–808. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.02.009>.
- Arya SS, Venkatram R, More PR (2022) The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review. *J Food Sci Technol* **59**, 429–444. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05032-5>
- Baker MT, Peng Lu J, A Parrella, Leggette HR (2022) Consumer acceptance toward functional foods: A scoping review. *Int J Environ Res Pub Heal* **19**, 1217. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031217>
- Brand-Williamns W, Cuveller ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-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)
- Budryn G, Zyzelewicz D, Nebesny E, Oracz J, Krysiak W (2013) Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. *Food Res Int* **50**, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.006>
- Cavaco Bicho N, Cebola Lidon F, Cochicho Ramalho J Leitão EA (2013) Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffee, *J Food Agric* **25**, 945-950. doi: 10.9755/ejfa.v25i12.17290
- Cerit I, Şenkaya S, Tulukoğlu B, Kurtuluş M, Seçilmişoğlu UR, Demirkol O (2016) Enrichment of functional properties of white chocolates with cornelian cherry, spinach and pollen powers. *GIDA* **41**, 311-316. doi: 10.15237/gida.GD16029
- Cheng Chia M, Maleyki Mhd Jalil A, Ismail A (2009) Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malasyian market *Molecules* **14**, 200-209 <https://doi.org/10.3390/molecules14010200>

- Corso MP, Vignoli J, Benassi A (2016) Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. *J Food Sci Technol* **53**, 1380–1388. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2163-y>
- Davis AP, Kiwuka C, Faruk A (2022) The re-emergence of Liberica coffee as a major crop plant. *Nat Plants* **8**, 1322–1328. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01309-5>
- Dolatowska-Żebrowska K, Ostrowska-Ligęza E, Wirkowska-Wojdyła M, Bryś J, Górská A (2019) Characterization of thermal properties of goat milk fat and goat milk chocolate by using DSC, PDSC and TGA methods. *J Therm Anal Calor* **138**, 2769–2779. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08181-0>
- Faccinetto-Beltrán P, Gómez-Fernández AR, Santacruz A, Jacobo-Velázquez DA (2021) Chocolate as carrier to deliver bioactive ingredients: Current advances and future perspectives. *Foods* **10**, 2065. <https://doi.org/10.3390/foods10092065>
- FDA (2024) U.S. Food and Drug Administration (CFR) Code of Federal Regulations Title 21 (2024) United States of America. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/cfrsearch.cfm>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- GAIN (2016) Consumer food-patterns of food expenditures and imports in Croatia, USDA Foreign Agricultural Service, GAIN Report Number: HR1602.
- García LC, Hernández ANM (2020) Beneficial effects of cocoa and dark chocolate polyphenols on health. *FASEB J* **34**, 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.07187>
- ICCO (2024a) Growing Cocoa - Cocoa Tree Varieties. <https://www.icco.org/growing-cocoa/> Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- ICCO (2024b) Statistics - Data on production and grindings of cocoa beans, https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-2.pdf. Pristupljeno 1. kolovoza 2024.
- ISO 8589:2007, Sensory analysis-General guidelines for the design of test rooms.
- Jeszka-Skowron M, Stanisz E De Peña MP (2016) Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. *LWT* **73**, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.018>
- Jeszka-Skowron M, Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T (2015) Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *Eur Food Res Technol* **240**, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2356-z>
- Kaur S, Das M (2011) Functional foods: an overview. *Food Sci Biotechnol* **20(4)**, 861–875. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>

- Kolmar C (2023) The 15 largest chocolate companies in the world, <https://www.zippia.com/advice/largest-chocolate-companies/>, Pristupljeno 29. srpnja 2024.
- Kongor JE, Hinneh M, de Walle DV, Afoakwa EO, Boeckx P Dewettinck K (2016) Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Res Int* 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Lashermes P, Andrade AC, Etienne H (2008) Genomics of coffee one of the world's largest traded commodities. U: Moore P H , Ming R (ured.) *Genomics of tropical crop plants. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, 2. izd., Springer, New York, str. 203-225.
- Latosińska JN, Latosińska M (2017) The question of caffeine, 1. izd., InTech, Rijeka, str. 51.
- Lindner J (2024) Gitnux Report 2024 Global Beverage Consumption Breakdown: Most Popular Drinks in The World. <https://gitnux.org/most-popular-drinks-in-the-world/>. Pristupljeno 26. kolovoza 2024.
- Lončarević I, Pajin B, Tumbas Šaponjac V, Petrović J, Vulić J, Fišteš A Jovanović P (2019) Physical, sensorial and bioactive characteristics of white chocolate with encapsulated green tea extract. *J Sci Food Agr* **99**, 5834-5841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9855>
- Madhava Naidu M, Sulochanamma G, Sampathu SR, Srinivas P (2008) Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chem* **107(1)**, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.056>.
- Mihaljević R (2021) Najslađa tvrtka na sjeveru probila se među 5 najvećih branši u Hrvatskoj, Danica.hr, <https://danica.hr/najslada-tvrtka-na-sjeveru-probila-se-medu-5-najvecih-u-bransi-u-hrvatskoj/>, Pristupljeno 29. srpnja 2024.
- Mordor Intelligence (2022) Chocolate market – Growth, trends, and forecasts (2023-2028) <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/chocolate-market>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- Ostrowska-Ligęza E, Marzec A, Górská A, Wirkowska-Wojdyła M, Bryś J, Rejch A, Czarkowska K (2018) A comparative study of thermal and textural properties of milk, white and dark chocolates. *Thermochim Acta* **671**, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.11.005>
- Padmore J M (1990) Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.

- Pimpley VA, Maity S, Murthy PS (2022) Green coffee polyphenols in formulations of functional yoghurt and their quality attributes. *Int J Dairy Technol* **75**, 159–170. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12813>
- Poliński S, Topka P, Tańska M, Kowalska S, Czaplicki S, Szydłowska-Czerniak A (2022) Impact of bioactive compounds of plant leaf powders in white chocolate production: Changes in antioxidant properties during the technological processes. *Antiox* **11**, 752. <https://doi.org/10.3390/antiox11040752>
- Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) Narodne novine 73, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1440.html. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- Qin XW, Lai JX, Tan LH, Hao CY, Li FP, He SZ, Song YH (2016) Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao*) in China. *Int J Food Prop* **20**, 2261-2275. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1236270>
- Rahpeyma E, Sekhavatizadeh SS (2020) Effects of encapsulated green coffee extract and canola oil on liquid Kashk quality. *Foods Raw Mater* **8**, 40–51. DOI: <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-40-51>.
- Razavizadeh BM, Tabrizi P (2021) Characterization of fortified compound milk chocolate with microcapsulated chia seed oil. *LWT* **150**, 111993. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111993>
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodrigues C, Maia R, Ribeirinho M, Hildebrandt P, Gautz L, Prohaska T, Máguas C (2013) Comprehensive analytical chemistry, Portugal, str. 573-598.
- Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stévigny G (2020) Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients* **12**, 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* **16**, 144-158. doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144
- Statista (2023) (Not) Everybody Loves Chocolate, Chocolate industry in the United States. <https://www.statista.com/chart/3668/the-worlds-biggest-chocolate-consumers/>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.

- Statista (2024a) Coffee production worldwide from 2003/04 to 2021/22 (in million 60 kilogram bags). <https://www.statista.com/statistics/263311/worldwide-production-of-coffee/>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- Statista (2024b) Average prices for Arabica and Robusta coffee worldwide from 2014 to 2025. <https://www.statista.com/statistics/675807/average-prices-arabica-and-robusta-coffee-worldwide/>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- Šeremet D, Fabečić P, Vojvodić Cebin A, Mandura Jarić A, Pudić R, Komes D (2022) Antioxidant and sensory assessment of innovative coffee blends of reduced caffeine content. *Molecules* 27, 448. <https://doi.org/10.3390/molecules27020448>
- Šeremet D, Jokić S, Aladić K, Butorac A, Lovrić M, Jurinjak Tušek A, Obranović M, Mandura Jarić A, Vojvodić Cebin A, Carović-Stanko K, Komes D (2022) Comprehensive study of traditional plant ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) grown in Croatia in terms of nutritional and bioactive composition. *Foods* 11, 658. <https://doi.org/10.3390/foods11050658>
- Tajik N, Tajik M, Mack I (2017) The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr* 56, 2215–2244. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1379-1>
- USDA (2024) Foreign Agricultural Service U.S. Department of Agriculture. Production-Coffee. <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0711100>. Pristupljeno 24. kolovoza 2024.
- Vasudevaiah M, Chaturvedi A, Kulathooran A, Dasappa R (2017) Effect of green coffee extract on rheological, physico-sensory and antioxidant properties of bread. *J Food Sci Technol* 54, 1827–1836. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2613-9>
- Żyżelewicz D, Oracz J, Bilicka M, Kulbat-Warycha K, Klewicka E (2021) Influence of freeze-dried phenolic-rich plant powders on the bioactive compounds profile, antioxidant activity and aroma of different types of chocolates. *Molecules* 26, 7058. <https://doi.org/10.3390/molecules26227058>

Izjava o izvornosti

Ja, Luka Knežić, izjavljujem da je ovaj završni 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