

Razvoj inovativnih funkcionalnih čokolada s dodatkom inkapsuliranog polifenolnog ekstrakta dobričice (Glechoma hederacea L.)

Tuzla, Barbara

Master's thesis / Diplomski 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:159:665990>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Barbara Tuzla

**RAZVOJ INOVATIVNIH FORMULACIJA
ČOKOLADA S DODATKOM
INKAPSULIRANOG POLIFENOLNOG
EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma
hederacea* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes te uz pomoć asistentice dr. sc. Danijele Šeremet.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta „*Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda*“ (IP-2019-04-5879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Prvenstveno, veliko hvala prof. dr. sc. Draženki Komes za svaki savjet, poticaj i sav trud uložen u ovaj rad.

Zahvaljujem se dr. sc. Danijeli Šeremet, za stvaranje divnog radnog okruženja, nesebično dijeljenje znanje i za svaku pruženu toplu riječ i osmijeh potpore.

Hvala doc. dr. sc. Aleksandri Vojvodić Cebin i dr. sc. Ani Mandura Jarić za sve lijepe trenutke i ugodne razgovore prilikom izrade ovog rada.

Ogromno hvala svim prijateljima i kolegama, koji su mi uljepšali ovaj studentski život, uz vas su suze manje boljele, a osmijesi su duže trajali. Ovo iskustvo ne bi bilo jednako vrijedno bez vas.

Beskrajno hvala mojoj obitelji, a posebno mami Mariji i tati Ivici za svu ljubav, potporu i podršku. Vas dvoje ste razlog što sam osoba koja sam postala i što sam postigla sve ovo!

Za kraj, neopisivo hvala mom dragom Luki, dečku, prijatelju i najvećem osloncu, koji svaku moju pobjedu slavi kao svoju, a nakon svakog mog pada pobrine se da se ustanem jača.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

RAZVOJ INOVATIVNIH FUNKCIONALNIH ČOKOLADA S DODATKOM INKAPSULIRANOG POLIFENOLNOG EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.)

Barbara Tuzla, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215194

Sažetak: Cilj ovog rada bio je razviti formulacije inovativnih funkcionalnih čokolada obogaćenih inkapsulatima polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.), dobivenih sušenjem raspršivanjem i liposomalnom inkapsulacijom. Obje vrste inkapsulata dodane su u čokoladu direktnim dodatkom u čokoladnu masu ili dodatkom kakaovog maslaca u kojem su prethodno homogenizirani biljni inkapsulati. Novoformuliranim čokoladama određena su fizikalna (udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu), bioaktivna (udjel bioaktivnih spojeva i *in vitro* digestija), teksturalna (tvrdoća), reološka (Casson-ova granica tečenja i plastična viskoznost) i senzorska svojstva te svojstva taljenja (maksimalna temperatura taljenja i specifična entalpija taljenja). Dodatak obje vrste inkapsulata rezultirao je obogaćenim polifenolnim sastavom čokolada u kojima su detektirane ružmarinska i klorogenska kiselina te rutin koji potječu iz dobričice. *In vitro* digestija čokolada rezultirala je poželjnim kontroliranim i kontinuiranim otpuštanjem ružmarinske kiseline, a dodatak inkapsulata nije se negativno odrazio na reološka i teksturalna svojstva čokolada. Senzorski je najbolje ocjenjena čokolada s dodatkom liposomalnog inkapsulata dobričice, prethodno homogeniziranog u kakaovom maslacu.

Ključne riječi: čokolada, dobričica, liposomi, sušenje raspršivanjem

Rad sadrži: 43 stranica, 15 slika, 7 tablica, 88 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr. sc. Danijela Šeremet

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjenski član)

Datum obrane: 23. rujan 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

DEVELOPMENT OF INNOVATIVE FUNCTIONAL CHOCOLATE WITH THE ADDITION OF
ENCAPSULATED POLYPHENOL EXTRACT OF GROUND IVY (*Glechoma hederacea* L.)

Barbara Tuzla, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215194

Abstract: The aim of this study was to develop formulations of innovative functional chocolates enriched with encapsulated polyphenolic extract of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.), obtained by spray drying and liposomal encapsulation. Both types of encapsulates were added to chocolates by direct addition to the chocolate mass or by the addition of cocoa butter in which plant encapsulates were previously homogenized. The physical (content of solid triglycerides in cocoa butter), bioactive (content of bioactive compounds and in vitro digestion), textural (hardness), rheological (Casson's yield point and plastic viscosity), sensory properties and melting properties (maximum melting temperature and specific melting enthalpy) were determined for the newly formulated chocolates. The addition of both types of encapsulates resulted in an enriched polyphenolic composition of chocolates in which rosmarinic and chlorogenic acids and rutin originating from ground ivy were detected. In vitro digestion of chocolates resulted in desirable controlled and continuous release of rosmarinic acid, and the addition of encapsulates did not negatively affect the rheological and textural properties of chocolates. According to the sensory analysis, the chocolate with the addition of liposomal encapsulated dobricica, previously homogenized in cocoa butter, was rated the best.

Keywords: chocolate, ground ivy, liposomes, spray drying

Thesis contains: 43 pages, 15 figures, 7 tables, 88 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Draženka, Komes, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Danijela, Šeremet, PhD

Reviewers:

1. Ksenija, Marković, PhD, Full professor (president)
2. Draženka, Komes, PhD, Full professor (mentor)
3. Aleksandra, Vojvodić Cebin, PhD Assistant professor (member)
4. Ksenija, Durgo, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23rd 2024

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. DOBRIČICA | 2 |
| 2.1.1. Biološki aktivni spojevi dobričice | 2 |
| 2.1.2. Biološki učinci dobričice | 3 |
| 2.2. INKAPSULACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA | 4 |
| 2.2.1. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem..... | 5 |
| 2.2.2. Liposomalna inkapsulacija | 7 |
| 2.3. FUNKCIONALNA HRANA | 9 |
| 2.3.1. Čokolada | 11 |
| 2.3.2. Funkcionalna čokolada..... | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. MATERIJAL | 18 |
| 3.1.1. Uzorci | 18 |
| 3.1.2. Kemikalije | 18 |
| 3.1.3. Uređaji | 19 |
| 3.2. METODE | 19 |
| 3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva dobričice | 19 |
| 3.2.2. Inkapsulacija ekstrakta dobričice sušenjem raspršivanjem..... | 20 |
| 3.2.3. Liposomalna inkapsulacija ekstrakta dobričice | 20 |
| 3.2.4. Formulacija čokolada s dodatkom inkapsulata ekstrakta dobričice..... | 20 |
| 3.2.5. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu..... | 21 |
| 3.2.6. Bioaktivna karakterizacija čokolada | 21 |
| 3.2.6.1. <i>Analiza udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC-PDA</i> <i>metodologijom</i> | 21 |
| 3.2.7. Određivanje teksturalnih karakteristika čokolada | 22 |
| 3.2.8. Određivanje reoloških karakteristika čokolada | 22 |
| 3.2.9. Određivanje karakteristika taljenja čokolada | 22 |
| 3.2.10. Simulirana probava čokolada | 23 |
| 3.2.11. Senzorska analiza čokolada | 23 |
| 3.2.12. Statistička obrada rezultata | 24 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 4.1. UDJEL ČVRSTIH TRIGLICERIDA U KAKAOVOM MASLACU | 25 |
| 4.2. BIOAKTIVNI SASTAV ČOKOLADA | 26 |
| 4.3. SIMULIRANA PROBAVA ČOKOLADA | 27 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.4. | REOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČOKOLADA | 29 |
| 4.5. | TEKSTURALNA SVOJSTVA ČOKOLADA | 31 |
| 4.6. | KARAKTERISTIKE TALJENJA ČOKOLADA..... | 32 |
| 4.7. | SENZORSKA ANALIZA ČOKOLADA..... | 34 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 36 |
| 6. | LITERATURA..... | 37 |

1. UVOD

Ubrzan način života, nutritivno siromašna prehrana te nedostatak fizičke aktivnosti u društvu rezultiraju porastom učestalosti kroničnih bolesti. Stoga se društvo postepeno okreće novim formulacijama prehrambenih proizvoda koji, uz zadovoljavanje osnovnih nutrijenata i potrebne energije, imaju i dodatne zdravstvene benefite, a što je svakako vrlo izazovno i za prehrambenu industriju koja nastoji pratiti potrebe suvremenog potrošača.

U tom pogledu različite biljne sirovine i njihovi nusproizvodi postaju sve zanimljiviji, kako znanstvenoj zajednici, tako i industriji. Među brojnim tradicionalnim biljnim vrstama koje imaju dugu primjenu u narodnoj medicini, a nedovoljno su istražene i valorizirane, je i dobričica (*Glechoma hederacea* L.). Relativno mali broj istraživanja u koja je uključena dobričica ukazuje na značajno prisustvo polifenolnih spojeva, među kojima se posebno ističu fenolne kiseline i flavonoidi. Za polifenolne spojeve je poznato da imaju brojne pozitivne utjecaje na zdravlje, uključujući protuupalni, antioksidacijski, antimikrobni i antikancerogeni učinak (Manach i sur., 2018).

Kako bi se sačuvali ti pozitivni učinci polifenola tijekom proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda, potrebno je iznaći način kako ih sačuvati od nepovoljnih vanjskih utjecaja, povećati im biodostupnost i topljivost te maskirati gorak okus (Munin i Edwards, 2021). U savladavanju navedenih izazova, dosadašnja istraživanja ukazuju na veliki potencijal primjene različitih tehnika inkapsulacije. Inkapsulacija uključuje tehnike ugrađivanja unutar ili oblaganja biološki aktivnih komponenti kontinuiranim sustavima nosača s ciljem formiranja čestica ili kapsula. Inkapsulati aktivnih spojeva imaju povećanu topljivost i biodostupnost, maskiran im je gorak okus te je smanjena osjetljivost na nepogodne vanjske utjecaje. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem pogodna je za industrijsku proizvodnju inkapsulata zbog svoje niske cijene, brzine proizvodnje i kvalitete dobivenih inkapsulata. S druge strane, liposomalna inkapsulacija je među tehnikama koje još nemaju veliku primjenu u prehrambenoj industriji, a kojom se dobivaju sferne čestice sastavljene od fosfolipidnog dvosloja. Ova tehnika pogodna je za inkapsulaciju hidrofilnih i lipofilnih aktivnih tvari zbog amfifilnog karaktera liposoma.

Cilj ovog rada bio je formulirati inovativne funkcionalne čokolade s inkorporiranim inkapsulatima polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.), dobivenih sušenjem raspršivanjem i liposomalnom inkapsulacijom. Primjenom odgovarajuće metodologije novoformuliranim čokoladama određena su fizikalna, bioaktivna, teksturalna, reološka i senzorska svojstva te svojstva taljenja čokolada

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DOBRIČICA

Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je zeljasta višegodišnja biljka, koja pripada porodici usnača (Laminacea). Smatra se ljekovitom i aromatičnom biljkom. Prvi put se spominje 1753. godine u knjizi *Species Planetarum* Carl Linné-a, Latinsko ime roda *Glechoma* potječe od grčke riječi *glechon*, što je bio naziv za mirisnu metvicu, a *hederacea* se prevodi kao bršljan (Mitich, 1994). Za rast joj najviše odgovara vlažno tlo bogato dušikom. Stabljika je četverobridna, duguljasta i raste isprepletana uz tlo te može narasti i do pola metra dužine. Dobričica je prepoznatljiva po svojim bubrežastim listovima nazubljenih zaobljenih rubova tamnozeleno boje, ali ukoliko raste na osunčanom staništu listovi joj poprimaju crvenu boju (Mitich, 1994). Cvjetovi su joj skupljeni po 3 – 4 u pršljenovima, a sam vjenčić je uglavnom ljubičaste do tamnoplave boje (slika 1). Raste u kolonijama na livadama, travnjacima i u listopadnim šumama (Anonymous 1, 2021). Cvjetanje traje od travnja do listopada, te joj je plod kalavac, koji se raspada na 4 smeđa roščića. Dobričica se razmnožava sjemenom ili zakorijenjivanjem novih stabljika, a u jednoj godini proizvede 50 – 200 plodova sa sjemenom (Anonymous 1, 2021). Rasprostranjena je u Europi i Aziji, gdje prevladava u Kini, a proširila se i na Sjevernu Ameriku i Australiju gdje prije prirodno nije obitavala. U Republici Hrvatskoj široko je rasprostranjena po kontinentalnom dijelu države, dok joj primorska područja s mediteranskom klimom ne odgovaraju za rast (Nikolić i Rešetnik, 2007).



Slika 1. Dobričica (vlastita fotografija)

2.1.1. Biološki aktivni spojevi dobričice

Polifenolni spojevi, koji su prisutni u dobričici u najvišim udjelima, su klorogenska, kafeinska, ferulinska i ružmarinska kiselina te rutin, genistin, genistein i kvercetin (Wang i sur., 2017). Visoki udjeli ružmarinske i klorogenske kiseline karakteristični su za biljne vrste porodice

Lamiaceae (Döring i Petersen, 2014). Najčešći flavonoidi pronađeni u sastavu dobričice su rutin i kvercetin (Wang i sur., 2017). Trenutno je u dobričici identificirano preko 40 polifenolnih spojeva. Zorilla i sur. (2023) izolirali su iz uzoraka dobričice, osim već navedenih polifenolnih spojeva, i cirisimaritin, apigenin i karvakrol. Luteolin prainianoid, vanilinska i hidroksibenzojeva kiselina bili su neki od detektiranih polifenola u istraživanju Masuda i sur. (2013).

Od ostalih bioaktivnih spojeva, izuzev polifenola, u dobričici su prisutni triterpenoidi ursolična i oleanolična kiselina (Kim i sur., 2011) i alkaloidi hederacin A i hederacin B (Kumarasamy i sur., 2003), pri čemu je hederacin A pokazao citotoksično djelovanje na stanice raka debelog crijeva (Kumamasary i sur., 2006). Listovi dobričice sadrže askorbinsku kiselinu, tokoferole te polinezasićene masne kiseline (Kuhn i sur., 1989).

U sastavu eteričnog ulja dobričice identificirani su brojni spojevi, među kojima su najzastupljeniji seskviterpeni i monoterpeni, poput germacrena D i B, γ - i β -elemena, 1,8-cineola, (Z)- β -ocimena, koji se zbog svojih svojstava koriste u sintezi lijekova protiv raka (Mockute i sur., 2007). Dobričica sadrži oko 20 % proteina i aminokiseline kao što su glutamin, leucin, glicin, lizin, alanin i prolin (Jo i sur., 2001). Vitamini koji su identificirani u dobričici su askorbinska kiselina, α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol i δ -tokoferol (Barros i sur., 2010).

2.1.2. Biološki učinci dobričice

Pretraživanjem objavljene literature u Scopus bazi pronađeno je 140 znanstvenih radova (3. rujna 2024.) s ključnom riječi dobričica, a radovi su većinski bili iz područja agronomije i biologije, ali isto tako iz područja medicine, biokemije, molekularne biologije te farmakologije (Scopus, 2024). U bazi podataka Web of Science (3. rujna 2024.) dostupno je samo 16 znanstvenih radova kojima su tema biološki učinci dobričice. Od bioloških učinaka dobričice u objavljenim radovima istraživani su njezini antioksidacijski, neuroprotektivni, protuupalni, hepatoprotektivni i antimikrobni učinci (WoS, 2024).

Dobričica je dugi niz godina upotrebljavana u tradicionalnoj medicini u Aziji i Europi zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, kao što su antihipertenzivno, hipoglikemijsko i citotoksično djelovanje (Kumamasary i sur., 2006). Alkoholni ekstrakti korišteni su u tradicionalnoj medicini u kremama protiv svrbeža, a vodene otopine tih ekstrakata za liječenje probavnih smetnji, kao spazmolitički tonik, blagi sedativ i protiv raznih bolesti mokraćnog sustava (Milovanović i sur., 2010). Prema Chou i sur. (2012) vodeni ekstrakt dobričice ima izražena antioksidacijska svojstva uslijed uklanjanja slobodnih radikala i keliranja metalnih iona te stoga biološki aktivni spojevi dobričice sprječavaju oštećenje DNK izazvano mutagenom. Osim toga, dokazano je i kako vodeni ekstrakt dobričice pridonosi protuupalnom djelovanju stanice kada je upala izazvana aktiviranim lipopolisaharidom (LPS) kroz smanjenje reaktivnih metabolita kisika i smanjenje ekspresije protuupalnih gena (Chou i sur., 2019). Zapažen je i

učinak dobričice na razinu ekstracelularnog kalcija te antioksidacijsko djelovanje, što ju čini potencijalnim koanalgetikom (Hwang i sur., 2014; Milovanović i sur., 2010). U istraživanju koje su proveli Qiao i sur. (2012), ispitivan je potencijal ekstrakta dobričice u suzbijanju melanoma te su rezultati pokazali da ekstrakt značajno smanjuje sintezu melanina u B16 stanicama melanoma, inhibirajući ekspresiju gena za tirozinazu. S obzirom na to da nije zabilježena citotoksičnost prema stanicama melanoma, već samo depigmentacija, ekstrakt dobričice pokazao je potencijal za prevenciju hiperpigmentacije. Chao i sur. (2021) proučavali su citotoksične efekte polarne etil-acetatne frakcije ekstrakta dobričice na HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma. Među glavnim polifenolnim spojevima u polarnoj frakciji bile su ružmarinska, kafeinska i ferulinska kiselina. Tretman ekstraktom rezultirao je zaustavljanjem staničnog ciklusa u S-fazi i pokretanjem apoptoze HepG2 stanica. Iz ovakvog djelovanja zaključeno je da antitumorski efekti ekstrakta dobričice nastaju posredovanjem mitohondrija, izazivanjem staničnog stresa i stvaranjem reaktivnih kisikovih metabolita. Vidljivo je da dosadašnja istraživanja ukazuju na nekoliko farmakoloških učinaka dobričice, ponajprije na izraženo antioksidacijsko djelovanje što se može smatrati rezultatom bogatog bioaktivnog sastava u kojem dominiraju polifenolni spojevi.

2.2. INKAPSULACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

Inkapsulacija je postupak u kojem se aktivne tvari ugrađuju ili oblažu kontinuiranim sustavom nosača kako bi se formirale čestice ili kapsule (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020; Gibbs i sur., 1999). Nosači su materijali koji služe kao zaštitni sloj za aktivne tvari, a uloga im je osiguravanje stabilnosti inkapsulata te regulacija otpuštanja aktivne tvari. Materijali za izradu nosača mogu biti razni te najčešći su polisaharidi, proteini i lipidi (Piñón-Balderrama i sur., 2020).

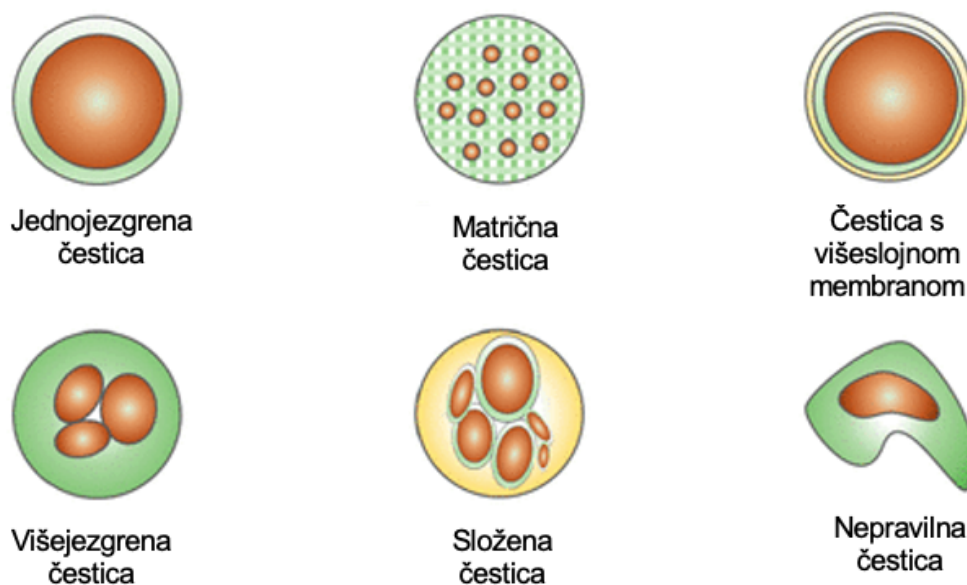
Svrha primjene inkapsulacije u prehrambenoj industriji je zaštita osjetljivih sastojaka, poput vitamina, minerala, polifenola i probiotika, od vanjskih utjecaja kao što su temperatura, vlaga i oksidacija. Inkapsulacija također omogućava kontrolirano otpuštanje ovih sastojaka tijekom probave, poboljšava stabilnost i produžava rok trajanja proizvoda, te može poboljšati teksturu i okus hrane (Risch, 1995). Polifenolni spojevi kao najčešća skupina biološki aktivnih komponenti generalno se inkapsuliraju u obliku mikročestica, tako se održava struktura spoja do njegove konzumacije ili administracije, maskira se okus (koji je inače izrazito gorak), povećava se topljivost u vodenom mediju i sama bioraspoloživost (Munin i Edwards-Levy, 2011).

Metode inkapsulacije dijele se na 4 skupine, odnosno na:

- fizikalne metode: sušenje rapršivanjem, ekstruzija, liofilizacija i inkapsulacija primjenom superkritičnih fluida,

- fizikalno-kemijske metode: ionsko geliranje, emulzifikacija, metoda uklanjanja otapala i liposomalna inkapsulacija,
- kemijske metode: *in situ* polimerizacija, međufazna polimerizacija, međufazno umrežavanje i međufazna polikondenzacija,
- elektrodinamičke metode: elektroispredanje i elektroraspršivanje.

Inkapsulati se po veličini dijele na mikročestice, raspona veličine od 1 do 1000 μm , i nanočestice, raspona veličine od 10 do 1000 nm. Morfologija inkapsulata može varirati te se tako razlikuju jednojezgrene, višejezgrene, matične, složene i nepravilne čestice i čestice s višeslojnom membranom (slika 2). Jednojezgrene čestice sadrže jednu jezgru omotanu membranom, matične imaju jezgru jednako raspršenu unutar membrane, dok višejezgrene imaju više jezgri unutar membrane. Složene čestice imaju više jezgri omotanih membranom unutar vanjske membrane, nepravilne čestice nisu sfernog oblika, a čestice s višeslojnom membranom imaju više od jedne membrane oko jedne jezgre.

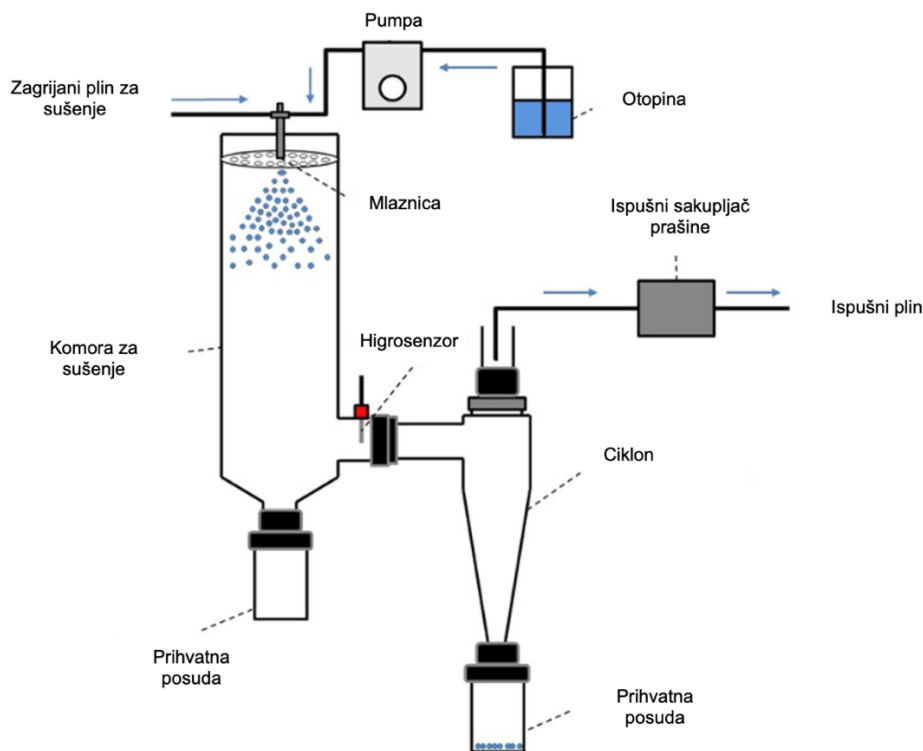


Slika 2. Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom (Yan i sur., 2022)

2.2.1. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem

Tijekom sušenja raspršivanjem dolazi do transformacije tekućeg uzorka (emulzija, disperzija, otopina) u prah raspršivanjem uzorka unutar komore s vrućim plinom za sušenje (Piñón-Balderrama i sur., 2020). Iako je ova metoda prvotno osmišljena za dehidraciju, sve češće se koristi i kao inkapsulacijska tehnika te je ujedno i jedna od najstarijih, a i najčešće korištenih na

industrijskoj razini (Jafari i sur., 2008). Shematski prikaz sušionika s raspršivanjem prikazan je na slici 3. Samom postupku inkapsulacije sušenjem raspršivanjem prethodi priprema tekućeg uzorka, odnosno homogenizacija aktivne tvari i otopine nosača, koja može biti u obliku emulzije, suspenzije ili otopine. Uzorak se potom pumpom uvodi u sustav i raspršuje pri ulazu u komoru za sušenje. U toj komori, tekućina se raspršuje u sitne kapljice, a raspršivači mogu biti rotacijski



Slika 3. Shematski prikaz sušionika s raspršivanjem (Peng i sur., 2017)

raspršivači, tlačne mlaznice, pneumatske mlaznice i zvučne mlaznice (Piñón-Balderrama i sur., 2020; Mohammed i sur., 2020). Zbog stvaranja velikog broja sitnih kapljica povećava se površina čestica što omogućuje optimalan prijenos mase i topline između zagrijanog plina za sušenje i kapljica. Ovaj proces poboljšava učinkovitost sušenja i osigurava ravnomjerno sušenje kapljica što je ključno za postizanje željenih karakteristika konačnog proizvoda (Santos i sur., 2018). Nakon što su kapljice raspršene, dolaze u kontakt s vrućim zrakom (najčešće zagrijani i filtrirani atmosferski zrak) i suše se uslijed isparavanja otapala iz kapljica. Isparavanje otapala počinje na površini kapljice te kasnije dolazi do migracije otapala iz središta prema površini čestica. Posljednja faza sušenja je odvajanje i prikupljanje uzorka što se odvija u ciklonu, a sam proces završava padanjem uzorka na dno komore djelovanjem gravitacijske sile (Mohammed i sur., 2020).

Prema Assadpour i Jafari (2019), na inkapsulacijsku učinkovitost sušenja raspršivanjem utječu

fizikalno-kemijska svojstva nosača i aktivne tvari, kao i karakteristike njihove otopine (poput viskoznosti i udjela suhe tvari). Također, utjecaj imaju i procesni uvjeti, odnosno ulazna i izlazna temperatura zraka, vlažnost zraka, protok zraka, vrsta raspršivanja, promjer mlaznice te dimenzije komore za sušenje (Assadpour i Jafari, 2019). Izbor nosača od velike je važnosti za učinkovito provođenje inkapsulacije te mora biti netoksičan i nealergen. Uz to, poželjna je njegova visoka topljivost u vodi, izvrsno stvaranje zaštitne barijere te izražena sposobnost maskiranja okusa. Optimalno postavljeni parametri ulaznog zraka za sušenje osiguravaju uspješno provođenje postupka te tako dovoljno visoka temperatura ulaznog zraka sprječava stvaranje aglomerata i povećava udjel suhe tvari, ali treba obratiti pozornost i na termostabilnost aktivnih spojeva koji se inkapsuliraju. Prema Piñón-Balderrama i sur. (2020), povećanjem ulazne temperature zraka povećava se prinos zbog povećanja veličine čestica. Temperatura ulaznog zraka kod sušenja raspršivanjem iznosi 150 – 220 °C, a temperature izlaznog zraka 50 – 80 °C (Shishir i Chen, 2017). U tablici 1 prikazani su neki od primjera inkapsulacije sušenjem raspršivanjem.

Tablica 1. Primjeri inkapsulacije dobivenih sušenjem raspršivanjem

| Nosač | Inkapsulirani sastojak | Procesni uvjeti | Inkapsulacijska učinkovitost | Referenca |
|---|----------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------|
| Guar guma (3%) i mucin (1%) | Ekstrakt dobričice | $P_z=600 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=150 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=2\text{mL min}^{-1}$ | Ukupni polifenoli: 83,86 % | Šeremet i sur. (2024) |
| Maltodekstin (20%) | Ekstrakt cvijeta srebrne lipe | $P_z=600 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=170 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=10,5 \text{ mL min}^{-1}$ | Ukupni polifenoli: 95,9 i 93,4 % | Mainente i sur. (2022) |
| Hidroksipropil beta-ciklodekstrin (2,2 %) | Ekstrakt trske od grožđa | $P_z=473 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=130 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=71 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=6-7 \text{ mL min}^{-1}$ | Restritizol: 97,0 % | Escobar-Avello i sur. (2021) |
| Želatina (5%) | Ekstrakt majčine dušice | $T_u=140 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=72-75 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=30 \text{ %}$ | Ukupni polifenoli: 23,7 – 48,7 % | Jovanović i sur. (2021) |
| APSUL® modificirani škrob (15 %) | Ekstrakt crvenog kupusa i radiča | $P_z=40 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, $T_u=140 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=70 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=5 \text{ mL min}^{-1}$ | Ukupni polifenoli: 79 i 88 % | Zanoni i sur. (2019) |

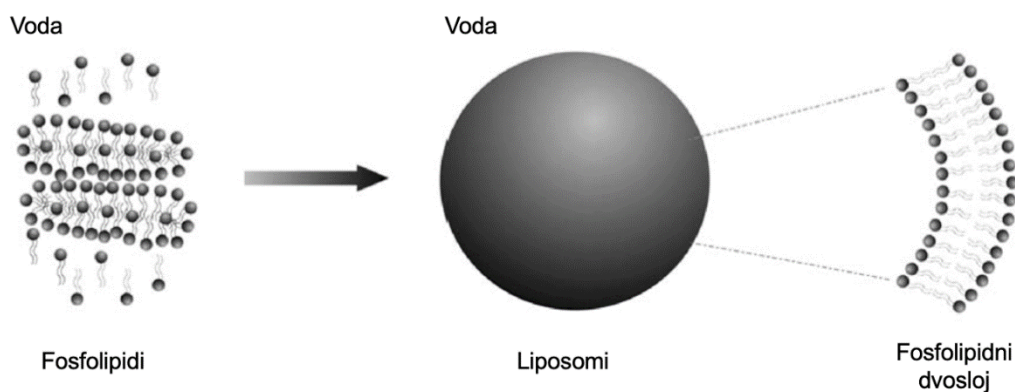
* P_z -protok zraka; T_u -ulazna temperatura; T_i -izlazna temperatura; P_o -protok otopine

2.2.2. Liposomalna inkapsulacija

Liposomi su sferične vezikularne čestice sastavljene od lipidnog dvosloja, najčešće od fosfolipida koji se samoorganiziraju u vodi na način da vodenu jezgru okruže lipidnim dvoslojem (Figueroa-Robles i sur., 2020). Zbog svojih jedinstvenih svojstava dvoslojne strukture, liposomi

se koriste kao nosači i za lipofilne i za hidrofilne molekule. Hidrofilne tvari su inkapsulirane u unutarnjim vodenim odjeljcima, a lipofilne molekule uglavnom su zarobljene unutar lipidnog dvosloja (Laouini i sur., 2012). Prvotno je njihova primjena bila namijenjena proizvodnji lijekova i cijepliva, no u zadnje vrijeme njihova primjena proširila se i na prehrambenu i kozmetičku industriju. Prehrambena industrija spoznala je mogućnost proširenja asortimana funkcionalnih proizvoda inkorporacijom liposoma u proizvode, a velika prednost je njihova netoksičnost i biorazgradivost, a njihova proizvodnja se može organizirati na industrijskim razmjerima. Liposomalni inkapsulati omogućuju ciljano otpuštanje spojeva, povećavajući njihovu učinkovitost i isplativost proizvoda (Reza Mozafari i sur., 2008).

Liposomi se formiraju interakcijama između amfifilnih molekula (fosfolipida), gdje dolazi do interakcija hidrofilnih glava i lipofilnih ugljikovodičnih repova lipida. Ovim interakcijama uspostavlja se lipidni dvosloj koji prelazi u sferični oblik kad se nalaze u vodenom mediju (slika 4) (Fathi i sur., 2012). Fosfolipidni dvosloj može biti sastavljen od fosfatidilkolina, fosfatidilglicerola, dipalmitoilfosfatidilkolina, distearoilfosfatidilkolina, kolesterola, stearylamina, diacetilfosfata ili njihove smjese. Fizikalno-kemijska svojstva lipidne komponente liposoma, uključuju gustoću naboja, fluidnost membrane, permeabilnost i steričku prepreku, a s tim određuju interakciju liposoma sa sastojcima krvi i drugim mekim tkivima nakon primjene (Tatipamula i Kukavica, 2021).



Slika 4. Pojednostavljeni mehanizam formiranja liposoma (*prema* Reza Mozafari i sur., 2008)

Za pripremu liposoma danas postoje različite tehnike, a najčešće korištene su hidratacija tankog filma, evaporacija reverzne faze, metoda injektiranja otapala i metoda zagrijavanjem. Nedostatak ovih konvencionalnih metoda je upotreba organskih otapala i toksičnih materijala, te velike čestice liposoma. Za dobivanje liposoma odgovarajuće veličine mogu se nakon formiranja primijeniti još različiti procesi poput ekstruzije, sonifikacije, homogenizacije visokim tlakom, mikrofluidizacije, itd. (Bozzuto i Molinari, 2015).

Jedan od nedostataka liposomalne inkapsulacije je nestabilnost, odnosno, curenje inkapsuliranog sadržaja tijekom vremena (Mady i sur., 2009). Također, fizikalna i kemijska nestabilnost uz lipidnu oksidaciju čine još jednu od učestalijih prepreka u samoj proizvodnji, ali i inkorporiranju liposoma u prehrambene proizvode (Tan i Misran, 2013). Primjeri inkorporacije liposoma u prehrambene proizvode prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz bioaktivnih tvari inkapsuliranih liposomima i proizvoda u koje su isti implementirani

| Inkapsulirana bioaktivna tvar | Proizvod u koji je implementirana bioaktivna tvar | Nosač | Referenca |
|-------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------|
| Ekstrakt trave ive | Kava | Phospholipon® 90 G | Šeremet i sur., (2022) |
| Reservatrol i epigalokatehin | Sok od naranče | Niskometilirani pektin | Feng i sur., (2020) |
| Rutin | Jestivi filmovi na bademima i čokoladi | Hidroksipropil metilceluloza | Lopez-Polo i sur., (2020) |
| Ulje škampa | Obrano mlijeko | Lecitin | Gulzar i sur., (2020) |
| Eterično ulje lovora | Svinjsko meso | Kitozan | Wu i sur., (2019) |
| Ekstrakt češnjaka | Kruh | Fosfatidilkolin oleinska kiselina | Pinilla i sur., (2019) |

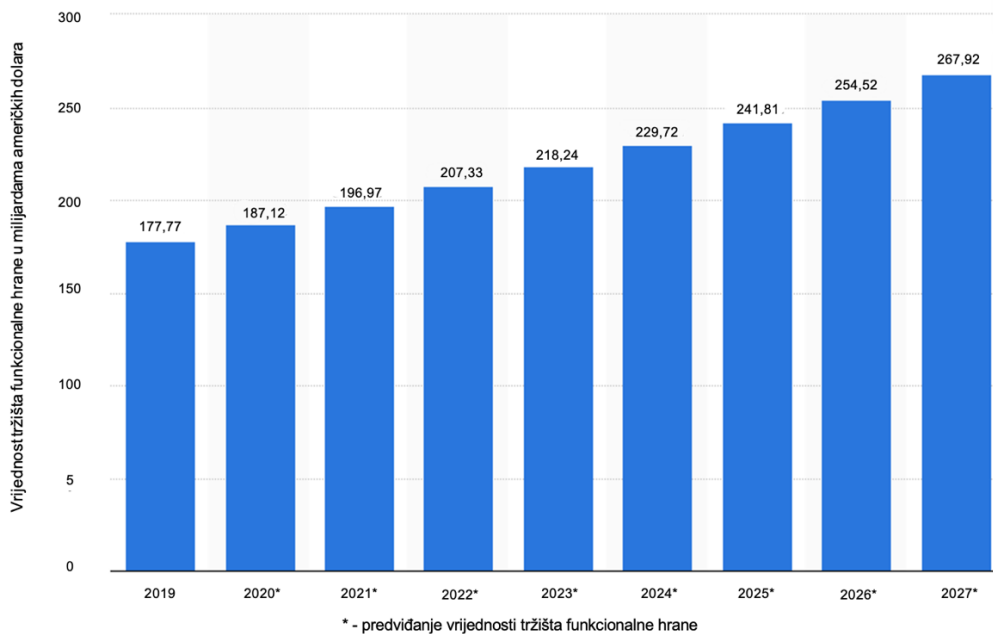
2.3. FUNKCIONALNA HRANA

Funkcionalna hrana osim odgovarajuće prehrambene vrijednosti pozitivno utječe na jednu ili više funkcija u organizmu, i to na način koji ili unapređuje zdravlje i dobrobit organizma ili smanjuje rizik od nastanka bolesti. Izraz funkcionalna hrana, prvi put predložen je u Japanu 1980-ih i zakonski odobren pod kategorijom hrane naziva FOSHU (engl. *Foods for Specific Health Uses*) (Stanton i sur., 2005). Kako bi se proizvod klasificirao kao funkcionalna hrana prema FOSHU treba ispuniti tri zahtjeva: dokazana učinkovitost u kliničkim studijama, sigurnost potvrđena kroz kliničke i nekliničke studije i identifikacija aktivnih/djelotvornih spojeva (Martirosyan i Singh, 2015). Za funkcionalnu hranu postoji niz različitih definicija međutim

najopsežnija i najprihvaćenija je definicija Europske unije prema kojoj hrana se može „funkcionalnom“ kada zadovoljava uvjete da dokazano unaprjeđuje jednu ili više ciljnih funkcija u tijelu, prema odgovarajućim prehrambenim učincima koji su relevantni za poboljšanje zdravstvenog stanja i dobrobiti te smanjenje rizika od bolesti (Diplock i sur., 1999). Unutar Europske unije, proizvođačima hrane dopušteno je navođenje dvije vrste tvrdnji: nutritivne i/ili zdravstvene. Nutritivna tvrdnja odnosi se na osnovne hranjive i energetske vrijednosti namirnice, dok se zdravstvene tvrdnje odnose na doprinos hrane prevenciji, kontroli ili liječenju pojedinih bolesti. Navođenje zdravstvene tvrdnje mora biti potkrijepljeno znanstvenim dokazima i mora zadovoljiti stroge kriterije. Funkcionalna hrana, koja se nalazi na tržištu, sadrži posebno razvijene formulacije sa sastojcima koji specifično pozitivno utječu na zdravlje organizma. Iako se naizgled ne razlikuje od „konvencionalne hrane“, zahvaljujući bogatom bioaktivnom sastavu potražnja za funkcionalnom hranom u stalnom je porastu zbog dodatne vrijednosti koju pruža.

Objašnjenje tih društvenih i gospodarskih promjena nalazi se u sve višim troškovima zdravstvene skrbi, produženju životnog vijeka i želje pojedinih dobnih skupina potrošača za kvalitetnijim stilom života (Roberfroid, 2000). Među funkcionalnim proizvodima, najčešće se prodaju oni iz skupine mliječnih i konditorskih proizvoda, sokova, pekarskih proizvoda i dječje hrane (Menrad, 2003). Prema podacima Statista (2021) vrijednost globalnog tržišta funkcionalne hrane 2019. godine iznosila je 177,77 milijardi USD, a procjena je da će 2027. godine iznositi 267,92 milijarde USD, što je povećanje od okvirno 50 %. Rast vrijednosti svjetskog tržišta funkcionalne hrane između 2019. i 2027. godine prikazana je na slici 5.

Funkcionalna hrana obogaćena polifenolnim spojevima ima sve veći rast na tržištu zbog svojih zdravstvenih benefita, no glavna prepreka u razvoju takvih proizvoda su loša topljivost i biodostupnost polifenolnih spojeva. U cilju otklanjanja tih prepreka razvijene su nove strategije u obliku nano- i mikrotehnologija koje koriste materijale za prevlake ili membrane kapsula za zaštitu bioaktivnih spojeva, poboljšanje stabilnosti i/ili osiguranje njihovog postupnog otpuštanja tijekom vremena, osiguravajući njihovu postepenu isporuku na ciljane stranice (Santos-Buelga i sur., 2019).



Slika 5. Vrijednost svjetskog tržišta funkcionalne hrane od 2019. do 2027. godine (prema Statista 2021)

2.3.1. Čokolada

Prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (Pravilnik, 2005) čokolada je proizvod dobiven od kakaovih proizvoda i šećera koji sadrži najmanje 35 % ukupne suhe tvari kakaovih dijelova, uključujući najmanje 18 % kakaovog maslaca i najmanje 14 % bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova. Čokolada je složen reološki sustav koji se može opisati kao suspenzija bezmasnih čestica, poput šećera i kakaovih dijelova, raspršenih u kakaovom maslacu koji djeluje kao kontinuirana masna faza (Beckett, 2009). Proizvodnja čokolade temelji se na nekoliko tehnoloških postupaka, koje se provode s ciljem dobivanja homogenog proizvoda. Proces započinje miješanjem kakaove mase i šećera te dodatka ostalih sirovina kako bi se dobio zamjes koji se potom valca, končira, temperira te izljevava u kalupe i hladi.

Na globalnom tržištu čokolade se kategoriziraju u tri skupine: tamna, mliječna i bijela čokolada. One se međusobno razlikuju po udjelu kakaovih dijelova, kakaovog maslaca i mliječne masti, s time da tamna čokolada sadrži najviše kakaovih dijelova, dok bijela čokolada, od kakaovih dijelova sadrži samo kakaov maslac. Kakaov maslac sadrži značajne količine masnih kiselina, dok nemasna, suha tvar kakaovog zrna (kakaovi dijelovi) sadrži vitamine, mineralne tvari, vlakna i polifenole (Katz i sur., 2011). Kakaovi dijelovi su nutritivno najbogatiji dio čokolade te se povećanjem njihovog udjela u gotovom proizvodu povećava i unos biološki aktivnih spojeva.

2.3.2. Funkcionalna čokolada

Potrošnja čokolade u svijetu u 21. stoljeću izrazito je porasla. Privlačnost ove namirnice uglavnom je posljedica njezine sposobnosti da izazove ugodne i okrepljujuće osjećaje. S nutricionističkog i farmakološkog stajališta, čokolada i kakaovi proizvodi povezuju se s prevencijom i liječenjem raznih bolesti, posebice pretilosti, zbog antioksidacijskog, protuupalnog, kardiovaskularnog i metaboličkog djelovanja (Saritaş i sur., 2024). Rastom potrošnje čokolade u svijetu, raste i potreba za novim okusima i funkcionalnim čokoladama. Čokolada već sama po sebi može predstavljati funkcionalan proizvod ukoliko sadrži povećan udio kakaovih dijelova zbog bogatog polifenolnog sastava. Prema Uredbi Europske komisije 2015/539, odobrena je zdravstvena tvrdnja vezana za flavanole iz kaka. Uredba navodi da dnevni unos od 200 mg flavanola pomaže u očuvanju elastičnosti krvnih žila, što doprinosi normalnom protoku krvi. Na tržištu je sve veći broj čokoladnih proizvoda obogaćenih polifenolnim ekstraktima, probioticima, prebioticima, mineralnim tvarima, alkaloidima, prehrambenim vlaknima te čokolada bez ili smanjenog udjela šećera (Shahbazi i sur., 2022). Najviše pažnje privlače dodaci polifenolnih ekstrakata u čokoladne proizvode budući da bioaktivnost polifenola uvelike ovisi o očuvanju njihove stabilnosti i bioraspoloživosti jer vrlo lako degradiraju pod utjecajem topline, svjetlosti, pH i kisika, a sama uporaba u prehrambenoj industriji ograničena im je i zbog neugodnog okusa i boje (Lončarević i sur., 2019). Svi ovi razlozi utječu na okretanje prehrambene industrije prema proizvodnji čokolada s inkapsulatima polifenolnih spojeva. U inkapsuliranim sustavima polifenolni spojevi zaštićeni su od svih negativnih promjena, a njihov okus i boja su maskirani. Shahbazi i sur. (2022) proizveli su tamne čokolade obogaćene ekstraktom bijelog čaja i žižule u udjelima od 1, 3, 5 i 7 % dodavajući ekstrakt u slobodnom i inkapsuliranom obliku. Kod proizvedenih uzoraka čokolada analizirani su ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost. Čokolade obogaćene liposomalnim inkapsulatima bijelog čaja i žižule sadržavale su više polifenolnih spojeva od kontrolnog uzorka (tamna čokolada bez dodataka slobodnog ekstrakta ili liposomalnih inkapsulata). Također je primijećeno da se kod uzoraka tamne čokolade s inkapsulatima udjel polifenolnih spojeva bio veći nego kod uzoraka tamne čokolade sa slobodnim ekstraktom. Za razliku od kontrolnog uzorka koji se sadržavao $32,2 \text{ mg g}^{-1}$ polifenola, obogaćena čokolada inkapsulatima bijelog čaja imala je $112,32 \text{ mg g}^{-1}$ polifenola, a ona obogaćena inkapsulatima ekstrakta žižule $88,23 \text{ mg g}^{-1}$. Kod rezultata antioksidacijske aktivnosti isto je zapaženo povećanje s povećanjem udjela dodanog ekstrakta u slobodnom ili inkapsuliranom obliku. Dean i sur. (2016.) upotrijebili su polifenole iz pokožice kikirikija mikroinkapsulirane maltodekstrinom kako bi smanjili njihovu gorčinu za obogaćivanje mliječne čokolade. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da je dodatak 9 % inkapsuliranih polifenola u čokoladu rezultirao proizvodom s antioksidacijskim kapacitetom sličnom kapacitetu tamne čokolade, dok je okus bio sličan mliječnoj čokoladi. Bijele







čokolade obogaćene prahom Matcha čaja i konjske rotkvice u udjelima 1, 2, 3 i 4 % proizveli su Poliński i sur. (2022). Dobivene funkcionalne čokolade imale su veći antioksidacijski kapacitet, više udjele polifenolnih spojeva i poželjne senzorske karakteristike. U sličnom istraživanju, Lončarević i sur. (2019) ispitali su utjecaj mikrokapsulacije ekstrakta zelenog čaja na fizikalna, senzorska i funkcionalna svojstva bijele čokolade. Potvrdili su da se ukupni udio polifenola povećao s 0,14 GAE/kg u bijeloj čokoladi na 2,73 GAE/kg u čokoladi obogaćenoj sa 100 g/kg inkapsuliranog ekstrakta zelenog čaja. Sim i sur. (2016) proučavali su utjecaj polifenola iz biljke *Garcinia mangostana* Linn na bioaktivni sastav čokolade i zaključili da ti polifenoli poboljšavaju funkcionalna svojstva čokolade bez promjene njezinih senzorskih svojstava. Također su odredili da je dodatak 3 % praha perikarpa povećao udio polifenola za 13 % u tamnoj čokoladi i za 50 % u mliječnoj čokoladi.

Funkcionalne čokolade s inkapsulatima probiotičkih kultura također postaju sve popularnije na tržištu. Kako bi inkapsulacija probiotika bila uspješna oni moraju preživjeti prepreke kao što su skladištenje, procesni uvjeti proizvodnje i nepovoljni uvjeti u probavnom traktu. Probiotici su živi organizmi te njihova koncentracija mora biti dostatna za pozitivne zdravstvene učinke. U istraživanju provedenom od strane Zarić i sur. (2016) proizvene su mliječne čokolade inokulirane probiotičkim bakterijama *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 i *Bifidobacterium lactis* HN019. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju kako je preživljavanje sojeva bilo iznad 90 % s brojem živih stanica oko 8,1 log (CFU/g) nakon 6 mjeseci. Čokolade su senzorski visoko ocjenjene i ovo istraživanje potvrđuje da se je čokolada dobar medij za očuvanje probiotika. Faccinnetto-Beltrán i sur. (2021) provodili su istraživanje u kojem su obogaćivali mliječnu čokoladu s ribljim uljem (izvor omega-3 masnih kiselina) i probiotičkim bakterijama *Lactobacillus plantarum* 299v i *Lactobacillus rhamnosus* GG koje su inkapsulirane sušenjem raspršivanjem. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da su uspješno proizveli čokoladu obogaćenu ribljim uljem i inkapsulatima probiotičkih bakterija koja sadrži visokui udio omega-3 masnih kiselina i živih probiotičkih bakterija, dok se teksturalna, reološka i senzorska svojstva značajno ne razlikuju od kontrolnog uzorka.






Osim polifenola i probiotika čokolada može biti obogaćena vitaminima i mineralnim tvarima. Didar (2020) je istraživao utjecaj vitamina D₃ (5 μg 10 g⁻¹ čokolade) kao liposomalnog inkapsulata i u slobodnom obliku na svojstva čokolade. Dodatak slobodnog i liposomalno inkapsuliranog vitamina D₃ nije uzrokovao značajne promjene u boji, senzorskim svojstvima, reološkim karakteristikama niti svojstvima taljenja čokolade, a tijekom skladištenja na 25 °C kroz 15, 30, 45 i 60 dana, detektirani su viši udjeli vitamina u uzorcima s liposomalnim inkapsulatima u odnosu na uzorke s dodatkom slobodnog oblika vitamina. Obogaćivanje čokolade mineralnim tvarima proveli su i Méndez i Pérez (2011) formuliranjem čokolada s osušenim goveđim hemoglobinom kako bi povećali udio željeza u čokoladama. Čokolade

obogaćene željezom u udjelima od 4,7 % i 5,7 % nisu značajno odstupale općom prihvatljivošću od kontrolne skupine. Rezultati pokazuju da je moguće dodati 5,7 % osušenog goveđeg hemoglobina čime se postiže 2,2 mg željeza po obroku, što čini 12 % preporučenog dnevnog unosa željeza kod djece. U tablici 3 prikazane su funkcionalne čokolade koje se mogu pronaći na hrvatskom tržištu, dok slike 6 i 7 sadrže pregled funkcionalnih čokolada obogaćenih različitim dodacima na globalnom tržištu.

Tablica 3. Pregled funkcionalnih čokolada na hrvatskom tržištu

| Proizvođač | Funkcionalni dodatak | Proizvod |
|--------------|--|---|
| Kraš d.d. | Steviol glikozidi 0,6 % (min. 48 % kakaovih dijelova) |  |
| | Sirutka 18 %, maltitol 0,7 % (min. 55 % kakaovih dijelova) |  |
| | Kora naranče 15 % (min. 60% kakaovih dijelova) |  |
| Zvečevo d.d. | Kandirana brusnica 14 % (min. 72 % kakaovih dijelova) |  |
| | Ekspandirana integralna riža 4,1 % (min. 55 % kakaovih dijelova) |  |
| | Maltitol 0,14 % (min. 60 % kakaovih dijelova) |  |

Tablica 3. Pregled funkcionalnih čokolada na hrvatskom tržištu (nastavak)

| | | |
|-------------------|---|---|
| Hedona d.o.o. | Polifenoli sjemenki grožđa 0,3 % (min. 55 % kakaovih dijelova) |  |
| Karika Vis d.o.o. | CBD ulje (min. 70 % kakaovih dijelova) |  |
| Reizl d.o.o. | Ulje limuske trave 0,1 % (min. 70 % kakaovih dijelova) |  |
| | Ulje crvene mandarine 0,1 % (min. 70 % kakaovih dijelova) |  |
| Nadalina | Lavanda (min. 72 % kakaovih dijelova) |  |



Mliječna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom cimeta i klinčića
DAR Artisan Chocolate (SAD)



Tamna čokolada (47 % kakaovih dijelova) s ekstraktom čili papričice
Lindt (Švicarska)



Tamna čokolada (47 % kakaovih dijelova) s uljem paprene metvice
Lindt (Švicarska)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s ekstraktom ruže
Paccari (Ekvador)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s ekstraktom gorke naranče
Paccari (Ekvador)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom đumbira i chia sjemenki
Paccari (Ekvador)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s ekstraktom limunske trave
Paccari (Ekvador)



Mliječna čokolada (45 % kakaovih dijelova) s uljem limuna
Theo Chocolate (SAD)



Mliječna čokolada (45 % kakaovih dijelova) s dodatkom đumbira, kurkume, crnog papra i kardamoma
Vosges Haut Chocolate (SAD)

Slika 6. Zanimljivi primjeri čokolada obogaćenih biljnim dodacima na globalnom tržištu



Mliječna čokolada (32 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta korijena valerijane i uljem naranče
Astor Chocolate (SAD)



Tamna čokolada (83,5 % kakaovih dijelova) s dodatkom kolagena
Live Yourself (Turska)



Tamna čokolada (83,5 % kakaovih dijelova) s dodatkom resveratrola
Live Yourself (Turska)



Tamna čokolada (73 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta snježne gljive i Shishandra bobica
Joya (SAD)



Tamna čokolada (70 % kakaovih dijelova) s dodatkom lalenih sjemenki i ekstrakta ashwagande
Herbo Superfood (SAD)



Tamna čokolada (75 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta pet gljiva
Real Mushrooms (Kanada)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom L-Teanina, ekstraktom cvijeta pasiflore, kamilice i melise te uljem pepperminta
The Functional Chocolate Company (SAD)



Tamna čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta kamilice, korijena valerijane, melise i cvijeta pasiflore, uljem lavande i magnezijem
The Functional Chocolate Company (SAD)

Slika 7. Zanimljivi primjeri čokolada obogaćenih ekstraktom gljiva, biološki aktivnim spojevima i biljnim dodacima na globalnom tržištu

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U ovome istraživanju korišteni su osušeni nadzemni dijelovi biljke dobričice proizvođača Travar MB d.o.o. (Hrvatska). Nadzemni dijelovi biljke usitnjeni su u električnom mlincu te se za pripremu ekstrakta koristila frakcija veličine čestica $< 450 \mu\text{m}$.

Za proizvodnju čokolada korišteni su kakaov maslac i kakaova masa proizvođača Berry Callebaut (Švicarska), šećer u prahu proizvođača Franck d.d. (Hrvatska) i suncokretov lecitin dobavljača Nutrimedica d.o.o. (Hrvatska).

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene pri izradi ovog rada bile su visoke analitičke čistoće ili HPLC čistoće:

- Acetonitril, Fischer Scientific, SAD
- Amonijev karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Analitički standardi bioaktivnih spojeva:
 - * Kafein (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, SAD
 - * Klorogenska kiselina (95 %), Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, SAD
 - * Rutin trihidrat ($> 97 \%$), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific, SAD
 - * Ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, SAD
 - * Teobromin (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, SAD
- Djelomično hidrolizirana guar guma, Palco d.o.o., Hrvatska
- Etanol, Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev dihidrogen fosfat, Riedel-de Haën AG Seelze, Njemačka
- Kalijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kloroform, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Metanol, J.T. Baker, SAD
- Mravlja kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- Mucin (75-95 %), Carl Roth, Njemačka
- Natrijev hidrogen karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Natrijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Pankreatin, Sigma-Aldrich, Njemačka

- Pepsin, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Phospholipon® 90 G (≥ 94,0 % fosfatidilkolin), Lipoid GmbH, Njemačka
- Salivarna α-amilaza, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Žuč goveda, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.3. Uređaji

- Analitička vaga, New Classic MF, Mettler Toledo AG, Švicarska
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific, Kina
- Diferencijalni pretražni kalorimetar, Mettler Toledo DSC 823^e, Švicarska
- Magnetska mješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH, Njemačka
- Melanžer, Twin Stone, SAD
- Mikropipete Gilson, Francuska
- Modularno kompaktni reometar MCR 102e, Anton Paar, Austrija
- NMR uređaj, Minispec mq-one SFC Analyzer, Bruker, SAD
- Spektrofotometar (GenesysTM 10S UV-VIS), Thermo Fischer Scientific, SAD
- Sušionik raspršivanjem Büchi B-290, Büchi Labortechnik, Švicarska
- Tehnička vaga, A&D Instruments, UK
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies, SAD - sastoji se od degazera, kvarterne pumpe, automatskog injektora, termostata i PDA (engl. *photodiode array detector*) detektora
- Ultrazvučna kupelj (S60H) Elmasonic Elma, Njemačka
- Uređaj za ispitivanje teksture TA.HD.plus, Stable Micro Systems, UK
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co., Kina

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva dobričice

Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji pri temperaturi od 100 °C kroz 10 min koristeći omjer uzorak/otapalo 1 g:100 mL. Kao otapalo korištena je demineralizirana voda. Nakon provedene ekstrakcije slijedilo je centrifugiranje (9500 rpm, 20 min, 4 °C) i filtriranje. Dobiveni ekstrakt se pomoću rotacijskog uparivača koncentrirao na 10 puta manji volumen i kao takav koristio se za pripremu otopine nosača za sušenje raspršivanjem. U slučaju liposomalne inkapsulacije, koncentrirani ekstrakt podvrgnuo se dodatno liofilizaciji kroz 24 h kao bi se dobio ekstrakt u praškastom obliku.

3.2.2. Inkapsulacija ekstrakta dobričice sušenjem raspršivanjem

Kao nosači u sušenju raspršivanjem korišteni su djelomično hidrolizirana guar guma i mucin. Otopina nosača za sušenje raspršivanjem sadržavala je 4 % (w/w) navedenih polimera od čega je 75 % udjela činila djelomično hidrolizirana guar guma, a 25 % mucin. Otopina je pripravljena u koncentriranom ekstraktu dobričice. Proces samog sušenja raspršivanjem proveden je na uređaju Büchi B-290 s mlaznicom promjera 0,7 mm. Korišteni radni parametri pri procesu postavljeni su na sljedeći način: ulazna temperatura zraka 150 ± 2 °C, volumni protok medija za sušenje $35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (100 %), volumni protok otopine 2 mL min^{-1} (8 %), volumni protok zraka za raspršivanje $600 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ i pad tlaka mlaznice 55 kPa. Inkapsulat dobiven sušenjem raspršivanjem prikupljen je u staklenu posude te je čuvan na 4 °C do daljnje upotrebe. Za ovaj je uzorak utvrđen je srednji promjer mikročestica od $8,59 \pm 2,62 \text{ }\mu\text{m}$.

3.2.3. Liposomalna inkapsulacija ekstrakta dobričice

Priprema liposomalnih inkapsulata provedena je prema metodi opisanoj u radu Perrett i sur. (1991) i započela je otapanjem jednake mase Phospholipona 90 G (P90G) i etanola u Erlenmayerovoj tikvici uz miješanje na magnetskoj miješalici. Kako bi se spriječila evaporacija etanola, vrh tikvice zatvorio se aluminijskom folijom. Za učinkovitije otapanje P90G u etanolu koristila se vodena kupelj zagrijana na 60 °C te se tikvica ostavila u njoj 1 min. Potom se u tikvicu direktno dodala već pripravljena vodena otopina liofiliziranog ekstrakta dobričice (50 mg liofilizata u 2 mL demineralizirane vode). Tikvica sa smjesom se potom ponovno stavila u vodenu kupelj (60 °C) na 2 min, a zatim se ohladila na sobnu temperaturu. Peristaltičkom pumpom se u Erlenmayerovu tikvicu dodala demineralizirana voda pri protoku od 15 mL h^{-1} . Bitno je da je tikvica obložena aluminijskom folijom kako bi se izbjegla degradacija bioaktivnih spojeva uslijed utjecaja svjetla. Prosječan promjer inkapsulata bio je $106,7 \pm 0,9 \text{ nm}$.

3.2.4. Formulacija čokolada s dodatkom inkapsulata ekstrakta dobričice

Priprema čokoladnog zamjesa provedena je dodavanjem svih sastojaka u melanžer i miješanjem kroz 2 h. Kakaov maslac i kakaova masa zagrijani su na 50 °C prije dodavanja u zamjes za čokoladnu masu, te su u tekućem obliku dodani u melanžer. Nakon što je čokoladna masa miješana 2 h u melanžeru, provedeno je ručno temperiranje pri čemu je čokoladna masa zagrijana na temperaturu od 45 – 50 °C, potom hlađena na 28 °C te opet zagrijana na 32 °C. Tijekom cijelog temperiranja provodilo se miješanje čokoladne mase. Nakon postizanja željene temperature, masa se prelila u kalupe. Za obogaćivanje čokolada i dobivanje funkcionalnih proizvoda dodavani su inkapsulati ekstrakta dobričice sušeni raspršivanjem i liposomalni inkapsulati dobričice. Pripremljeno je 5 uzoraka čokolada različitih formulacija. Kontrolni uzorak (uzorak Č_K) formuliran je bez dodatka inkapsulata, te se sastojao od kakaove mase (40,5 %),

kakaovog maslaca (25 %), šećera u prahu (33 %) i suncokretovog lecitina (1,5 %). Dvije su formulacije čokolada pripremljena s dodatkom inkapsulata dobričice dobivenim sušenjem raspršivanjem - prva formulacija (uzorak Č_SR1) pripremljena je dodavanjem i homogenizacijom inkapsulata u kakaov maslac (u udjelu od 10 % na masu kakaovog maslaca) te zatim dodatak obogaćenog kakaovog maslaca u zamjes za čokoladnu masu, a kod druge formulacije (uzorak Č_SR2) inkapsulat je dodan u čokoladnu masu zadnjih pola sata miješanja u melanžeru u udjelu od 2 % u odnosu na čokoladnu masu. Pripremljena su i dva uzorka čokolada s liposomalnim inkapsulatom dobričice. Prva formulacija čokolade s liposomalnim inkapsulatom (uzorak Č_L1) pripremljena je dodavanjem i homogenizacijom liposoma u kakaov maslac (u udjelu od 20 % na masu kakaovog maslaca) te potom dodatak tako obogaćenog kakaovog maslaca u melanžer s ostalim sastojcima, dok su kod druge formulacije (uzorak Č_L2) liposomi dodani u melanžer zadnjih pola sata miješanja i to u udjelu od 4 % u odnosu na čokoladnu masu.

3.2.5. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu

NMR (nuklearna magnetska rezonancija) metoda korištena je kako bi se odredio udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu (uzorak KM), kakaovom maslacu s dodatkom liposomalnog inkapsulata dobričice (uzorak KM_L) i kakaovom maslacu s dodatkom inkapsulata dobričice dobivenog sušenjem raspršivanjem (uzorak KM_SR). Priprema uzoraka za analizu odrađena je prema metodi ISO 8292-1 (2008) tako što se čokolada temperirala na temperaturu od 60 °C kroz 15 min, potom na 0 °C kroz 90 min, zatim na 26 °C kroz 40 h, ponovo na 0 °C kroz 90 min i na kraju je 30 min bila na temperaturi od 60 °C. Nakon završetka ovog niza temperiranja uzorci su podvrgnuti analizi na NMR uređaju.

3.2.6. Bioaktivna karakterizacija čokolada

Formulirane čokolade (3 g) stavljene su u reagens boce i grijane na 70 °C tijekom 10 min u vodenoj kupelji. U boce je dodano 10 mL vruće vode, zagrijane do vrenja, nakon čega su se miješale na magnetskoj miješalici 15 min. Zatim u iste boce je dodano 10 mL metanola, te su uzorci ponovno miješani 15 min na magnetskoj miješalici. Potom su prebačeni u ultrazvučnu kupelj zagrijanu na 50 °C kroz 15 min. Po završetku ekstrakcije, uzorci su ohlađeni i centrifugirani pri 9500 rpm tijekom 20 min. Supernatanti su korišteni za analizu udjela pojedinačnih metilksantina i polifenolnih spojeva korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*).

3.2.6.1. Analiza udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC-PDA metodologijom

HPLC je proveden na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 pomoću Zorbax Extend C18 (4,6×250 mm, 5 µm i.d.) kolone (Agilent Technologies, SAD) spojene s detektorom

s nizom fotodioda (engl. *photodiode array detector* - PDA). Elucija je provedena gradijentnom metodom koristeći dvokomponentnu mobilnu fazu sastavljenu od (A) 1 % (v/v) otopine mravlje kiseline u vodi i (B) 1 % (v/v) otopine mravlje kiseline u acetonitrilu, prema režimu elucije prikazanom u tablici 4. Protok je bio 1 mL min⁻¹, volumen injektiranja 5 µL, a temperatura kolone 25 °C. Analiti su detektirani PDA detektorom pri valnim duljinama od 320 i 350 nm. Analiza je provedena u duplikatu za sve uzorke. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm membranski filter (Nylon Membranes, SAD) prije analize.

Tablica 4. Režim elucije za primijenjenu HPLC metodu

| Vrijeme (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) | Protok (mL min ⁻¹) |
|---------------|---------------|---------------|--------------------------------|
| 0 | 93 | 7 | 1,00 |
| 5 | 93 | 7 | 1,00 |
| 45 | 60 | 40 | 1,00 |
| 47 | 30 | 70 | 1,00 |
| 52 | 30 | 70 | 1,00 |

3.2.7. Određivanje teksturalnih karakteristika čokolada

Za određivanje teksturalnih karakteristika čokolada, tj. tvrdoće, korištena je metoda opisana u radu Nightingale i sur. (2011). Dimenzije korištenih uzoraka su bile 3 cm x 2,5 cm x 1 cm (dužina x širina x visina). Uzorci čokolada prije provođenja mjerenja bili su temperirani na sobnu temperaturu, a mjerenje je provedeno pomoću uređaja za ispitivanje tvrdoće TA.HD.plus.

3.2.8. Određivanje reoloških karakteristika čokolada

Reološke karakteristike čokolade određivane su oprema metodi IOCCC (2000) i korišten je Casson-ov model. Prilikom provođenja mjerenja čokolada je bila zagrijana na temperaturu od 40 °C. Na uzorke čokolade prije početka samog mjerenja primijenjena je brzina smicanja od 5 s⁻¹ tijekom 5 min. Mjerenje je provedeno na način da se brzina smicanja povećavala od početnih 2 s⁻¹ do krajnjih 50 s⁻¹ kroz vremenski period od 3 min. Kad se postigla brzina smicanja od 50 s⁻¹ ta brzina održavana je kroz 1 min, te se zatim brzina počela spuštati do početne brzine od 2 s⁻¹ kroz 3 min. Za obradu dobivenih rezultata mjerenja korišten je program RheoCompass (Anton Paar, Austrija).

3.2.9. Određivanje karakteristika taljenja čokolada

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je izvedena prema metodi opisanoj u radu Dolatowska-Żebrowska i sur. (2019). Uzorak čokolade mase približno 4 mg postavljen je u probušeni aluminijski lončić, ohlađen na 10 °C, a zatim zagrijavan brzinom od 4 °C min⁻¹ unutar

temperaturnog raspona od 10 °C do 50 °C. Cijeli proces je proveden u inertoj atmosferi s protokom dušika od 50 mL min⁻¹. Rezultati su prikazani u obliku DSC termograma iz kojih su iščitane vrijednosti za maksimalnu temperaturu taljenja (T_t) i entalpiju taljenja (ΔH_t) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolada.

3.2.10. Simulirana probava čokolada

Simulirana probava čokolada provedena je prateći otpuštanje ružmarinske kiseline HPLC-PDA metodologijom (poglavlje 3.2.6.2.) u simuliranim otopinama oralne faze (SSF – *simulated salivary fluid*), želučane faze (SGF – *simulated gastric fluid*) i intestinalne faze (SIF – *simulated intestinal fluid*). Oralna faza sastojala se od salivarne α -amilaze, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata. Želučana faza (pH=3) sastojala se od pepsina, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, natrijevog klorida, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata, a intestinalna faza (pH=7) sastojala se od pankreatina, žučnih soli, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogenkarbonata, natrijevog klorida te magnezijevog klorida heksahidrata, u koncentracijama navedenima u radu Minekus i sur. (2014). Uzorci čokolada (20 g) prebacili su se u otopinu SSF-a volumena 10 mL, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (100 rpm) pri 37 °C. Uzorak je u otopini SSF-a proveo 1 min te je prebačen u 40 mL otopine SGF-a uz iste uvjete. Uzorci su proveli 120 min u otopini SGF-a nakon čega su se prebacili u 40 mL otopine SIF-a pod istim uvjetima. U odgovarajućim vremenskim intervalima kroz cijeli proces simulirane probave uzimani su uzorci alikvota od 1 mL, kako bi se mogla provesti analiza određivanja udjela ružmarinske kiseline.

3.2.11. Senzorska analiza čokolada

Za provođenje senzorske analize čokolada korištena je metoda ISO 8589:2007. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska). Panel se sastojao od 20 članova starosti između 20 i 50 godina. Uzorci čokolada servirani su članovima panela sobnoj temperaturi. Članovi panela su senzorski evaluirali čokolade prema parametrima izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje) te okusa (slatko, gorko i biljno). Za ocjenjivanje ovih parametara korištena je ljestvica procjene intenziteta parametra davanjem ocjena od 1 do 9 (ocjena 1 označava izrazito nizak intenzitet parametra, a 9 izričito visoki intenzitet). Opća prihvatljivost čokolada ocjenjivana je hedonističkom skalom od 1 do 9 pri čemu 1 izražava izrazito nepoželjan proizvod, a 9 izrazito poželjan proizvod.

3.2.12. Statistička obrada rezultata

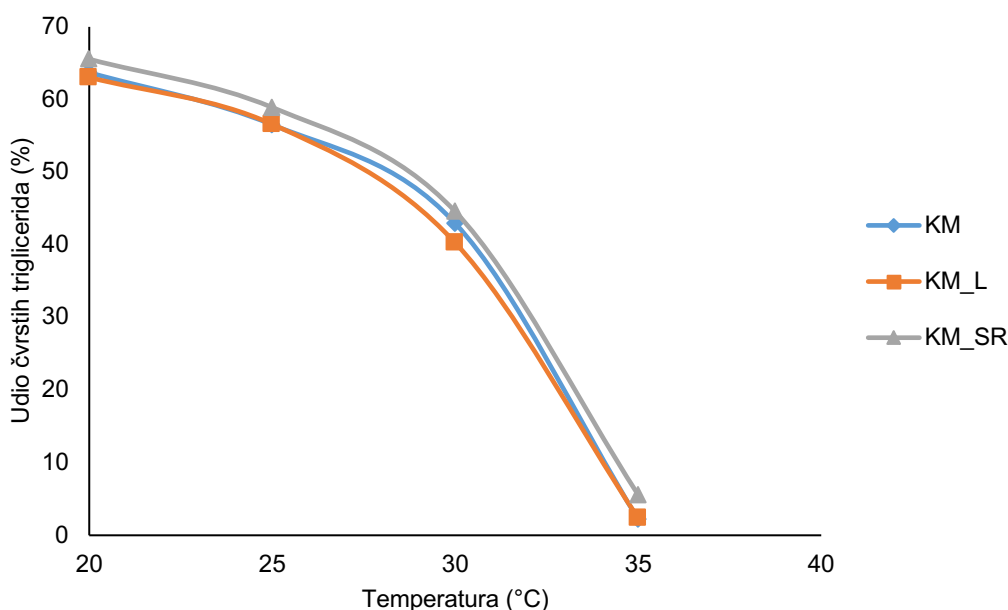
Statistička obrada rezultata provedena je u programu Statistica (v.14, TIBCO Software Inc.). Korišten je jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je formulacija inovativnih funkcionalnih čokolada s inkorporiranim inkapsulatima polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.), dobivenih sušenjem raspršivanjem i liposomalnom inkapsulacijom. Formuliranim čokoladama određena su fizikalna (udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu), bioaktivna (udjel bioaktivnih spojeva i *in vitro* digestija), teksturalna (tvrdoća), reološka (Casson-ova granica tečenja i plastična viskoznost) svojstva, svojstva taljenja čokolada (maksimalna temperatura taljenja i specifična entalpija taljenja) i senzorska svojstva (parametri izgleda, akustičnosti, teksture i okusa te opća prihvatljivost).

4.1. UDJEL ČVRSTIH TRIGLICERIDA U KAKAOVOM MASLACU

Udjel čvrstih triglicerida određivan je u kakaovom maslacu koji je korišten za izradu kontrolnog uzorka čokolade (uzorak KM) i obogaćenog kakaovog maslaca s dodatkom inkapsulata dobričice sušenog raspršivanjem (uzorak KM_SR) i inkapsuliranog u liposome (uzorak KM_L). Podaci o udjelu čvrstih triglicerida u uzorcima kakaovog maslaca dobiveni NMR metodom prikazani su na slici 8.



Slika 8. Udjel čvrstih triglicerida u uzorcima kakaovog maslaca kod različitih temperatura

U kontrolnom uzorku čokolade (KM) udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu pri temperaturama 20, 25, 30, i 35 °C iznosio je redom 63,71 %, 56,53 %, 42,95 % i 2,19 %. Uzorci kakaovog maslaca obogaćeni inkapsulatima – KM_SR i KM_L pri temperaturi od 20 °C sadržavali su 63,05 % i 65,55 % čvrstih triglicerida, a povećanjem temperature na 25 °C udjeli

čvrstih triglicerida smanjili su se na 56,59 % i 58,90 %. Daljnjim rastom temperature na 30 °C smanjenje čvrstih triglicerida bilo je izraženije te su vrijednosti udjela pri toj temperaturi iznosile 40,27 % i 44,57 %, dok su na 35 °C određeni najniži udjeli čvrstih triglicerida u udjelu od 2,37 % i 5,56 %.

Udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu pri određenim temperaturama odgovoran je za njegova svojstva te je tako udjel čvrstih triglicerida na temperaturi ispod 25 °C u direktnoj korelaciji s tvrdoćom samog kakaovog maslaca. Udjel čvrstih triglicerida u rasponu temperatura od 25 do 30 °C odgovoran je i za otpornost kakaovog maslaca na zagrijavanje. Pri temperaturama od 27 do 33 °C dolazi do izraženog taljenja kakaovog maslaca što se pri konzumaciji doživljava kroz osjećaj hlađenja u ustima i oslobađanja okusa i aroma (Tannenbaum, 2004). Na osnovu dobivenih rezultata (slika 8) može se zaključiti da dodatak inkapsulata u kakaov maslac nije negativno utjecao na njegov profil taljenja. Zadržana je karakteristična otpornost prema zagrijavanju u temperaturnom rasponu od 25 do 30 °C, intenzivno taljenje između 30 i 35 °C te na kraju izrazito nizak udio čvrstih triglicerida pri 35 °C.

4.2. BIOAKTIVNI SASTAV ČOKOLADA

Bioaktivna karakterizacija čokolada provedena je određivanjem pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC-PDA metodologijom. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Bioaktivni sastav čokolada

| Uzorak | Metilksantini i polifenolni spojevi podrijetlom iz kakaove mase (mg g ⁻¹ uzorka) | | | Polifenolni spojevi podrijetlom iz ekstrakta dobričice (µg g ⁻¹ uzorka) | | |
|--------|---|-------------------------|--------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | Teobromin | Kafein | (-)- Epikatehin | Klorogenska kiselina | Ružmarinska kiselina | Rutin |
| Č_K | 16,49±0,24 ^a | 2,22±0,03 | 3,60±0,11 | nd | nd | nd |
| Č_SR1 | 17,30±0,03 ^{bc} | 2,56±0,04 ^{ab} | 4,23±0,12 ^{abc} | 50,97±0,31 | 36,89±0,22 ^a | 49,98±0,53 |
| Č_SR2 | 18,19±0,47 | 2,68±0,06 ^{ac} | 4,46±0,01 ^a | 48,22±0,07 | 36,27±0,09 ^a | 55,61±1,43 |
| Č_L1 | 17,37±0,10 ^{bd} | 2,56±0,05 ^{bc} | 4,16±0,07 ^{bd} | 16,26±0,37 | 9,21±0,42 | 21,55±0,47 ^a |
| Č_L2 | 17,13±0,22 ^{acd} | 2,42±0,04 | 4,04±0,12 ^{cd} | 17,31±0,07 | 8,40±0,06 | 21,25±0,13 ^a |

nd-nije detektirano; Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći metodu analize varijance (engl. *one-way ANOVA*) i Tukey *post-hoc* test.

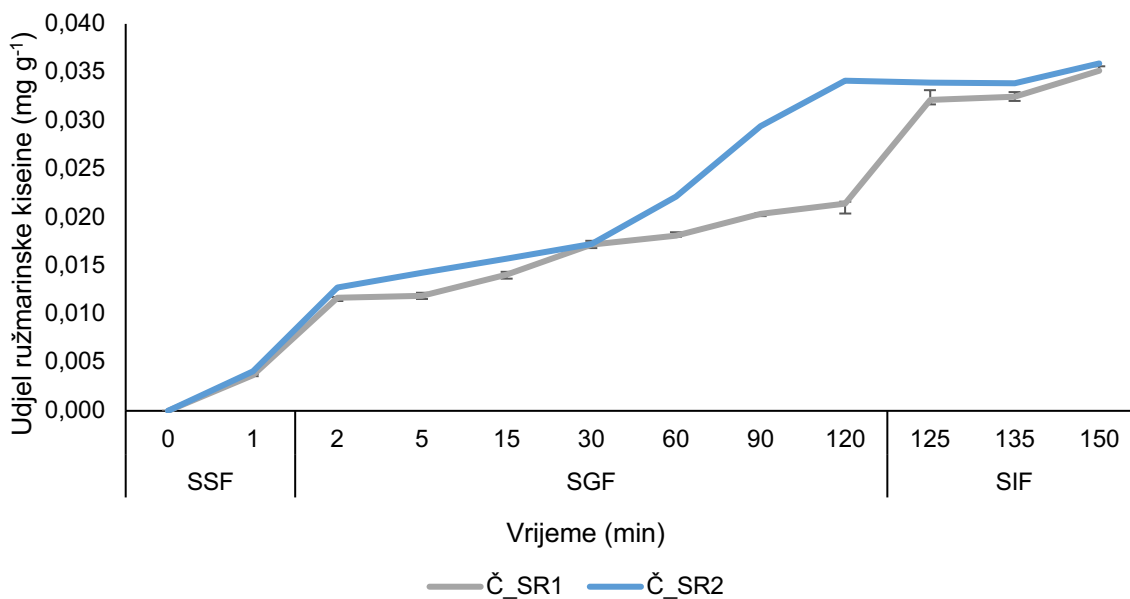
Teobromin i kafein spadaju u prirodno prisutne metilksantine u kakaovim zrnima, dok je (-)-epikatehin, iz skupine flavan-3-ola, najzastupljeniji polifenolni spoj (Ramos-Escuardos i sur., 2021).

U ovome istraživanju, najzastupljeniji bioaktivni spoj u svim čokoladama bio je teobromin u rasponu udjela od 16,49 mg g⁻¹ (uzorak Č_K) do 18,19 mg g⁻¹ (uzorak Č_SR2). Kod kontrolnog uzorka (Č_K) određen je najmanji udjel teobromina koji se nije statistički značajno ($p>0,05$) razlikovao u odnosu na udjel istog u uzorku Č_L2. Udjel kafeina u čokoladama bio je u rasponu od 2,22 mg g⁻¹ (uzorak Č_K) do 2,68 mg g⁻¹ (uzorak Č_SR2) te je, uspoređujući s kontrolnim uzorkom, detektirana statistički značajna ($p<0,05$) razlika u odnosu na sve preostale uzorke. Epikatehin se u čokoladama nalazio u rasponu udjela od 3,60 mg g⁻¹ (uzorak Č_K) do 4,46 mg g⁻¹ (uzorak Č_SR2). Čokolade obogaćene inkapsulatima nisu se statistički značajno ($p>0,05$) razlikovale po udjelu epikatehina, no bile su statistički značajno različite ($p<0,05$) od kontrolnog uzorka (uzorak Č_K). Kontrolni uzorak čokolade (uzorak Č_K) sadržavao je najniže udjele teobromina, kafeina i epikatehina, a uzorak Č_SR2 najviše.

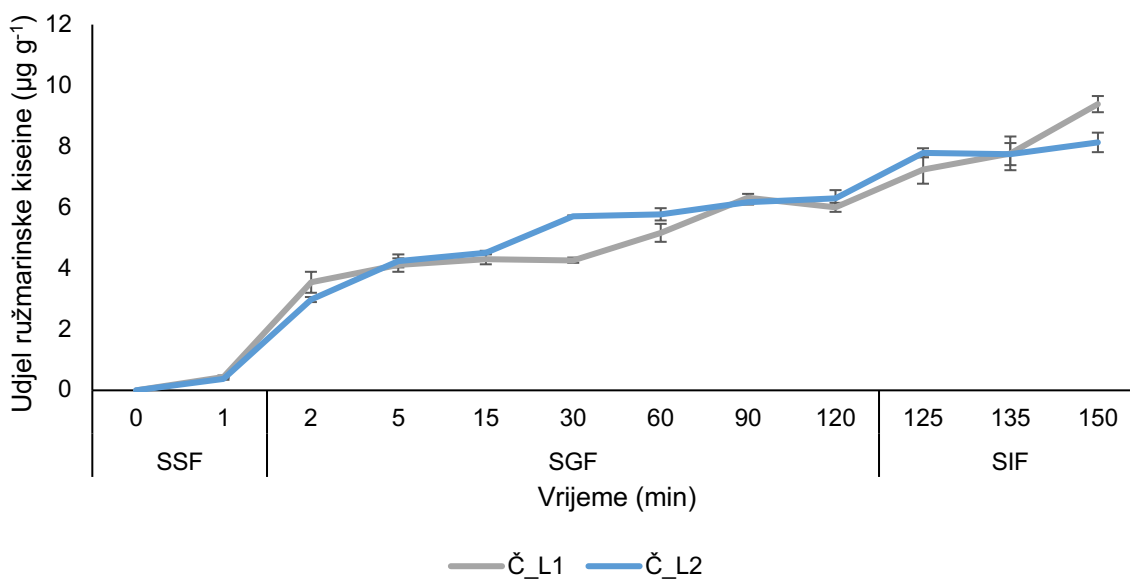
Kontrolni uzorak čokolade (uzorak Č_K) nije sadržavao klorogensku kiselinu, ružmarinsku kiselinu i rutin jer su to polifenolni spojevi podrijetlom iz ekstrakta dobričice. Sva tri polifenolna spoja određena su u višim udjelima u uzorcima čokolada obogaćenima inkapsulatima dobivenima sušenjem raspršivanjem, što se može objasniti njihovim različitim udjelom u samim inkapsulatima. Liposomalni inkapsulati sadrže niži udjel ekstrakta dobričice, od oko 5 %, te stoga sadrže i niže udjele polifenolnih spojeva u odnosu na inkapsulat sušen raspršivanjem, koji sadrži oko 20 % ekstrakta dobričice. Kod uzoraka s dodatkom inkapsulata dobričice sušenim raspršivanjem, udjeli klorogenske i ružmarinske kiseline te rutina bili su redom 50,97, 36,89 i 49,98 mg g⁻¹ u uzorku Č_SR1, a u uzorku Č_SR2 48,22, 36,27 i 55,61 mg g⁻¹. Kod uzoraka pripremljenih s liposomalnim inkapsulatima vrijednosti navedenih polifenolnih spojeva bile su 16,26, 9,21 i 21,55 mg g⁻¹ za uzorak Č_L1 i 17,31, 8,40 i 21,25 mg g⁻¹ za uzorak Č_L2. U radu Šeremet i sur. (2023), čokoladne praline uspješno su obogaćene polifenolnim spojevima dobričice, točnije klorogenskom i ružmarinskom kiselinom te rutinom, uslijed inkorporacije vodenog ekstrakta dobričice kao sastojka u punilo pralina.

4.3. SIMULIRANA PROBAVA ČOKOLADA

Simulirana probava uzoraka čokolada u ustima (SSF), želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF) evaluirana je određivanjem udjela otpuštene ružmarinske kiseline. Rezultati su prikazani na slikama 9 i 10.



Slika 9. Simulirana probava čokolada pripremljenih s inkapsulatom dobivenim sušenjem raspršivanjem (uzorci Č_SR1 i Č_SR2) u ustima (SSF), želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF) evaluirana otpuštanjem ružmarinske kiseline



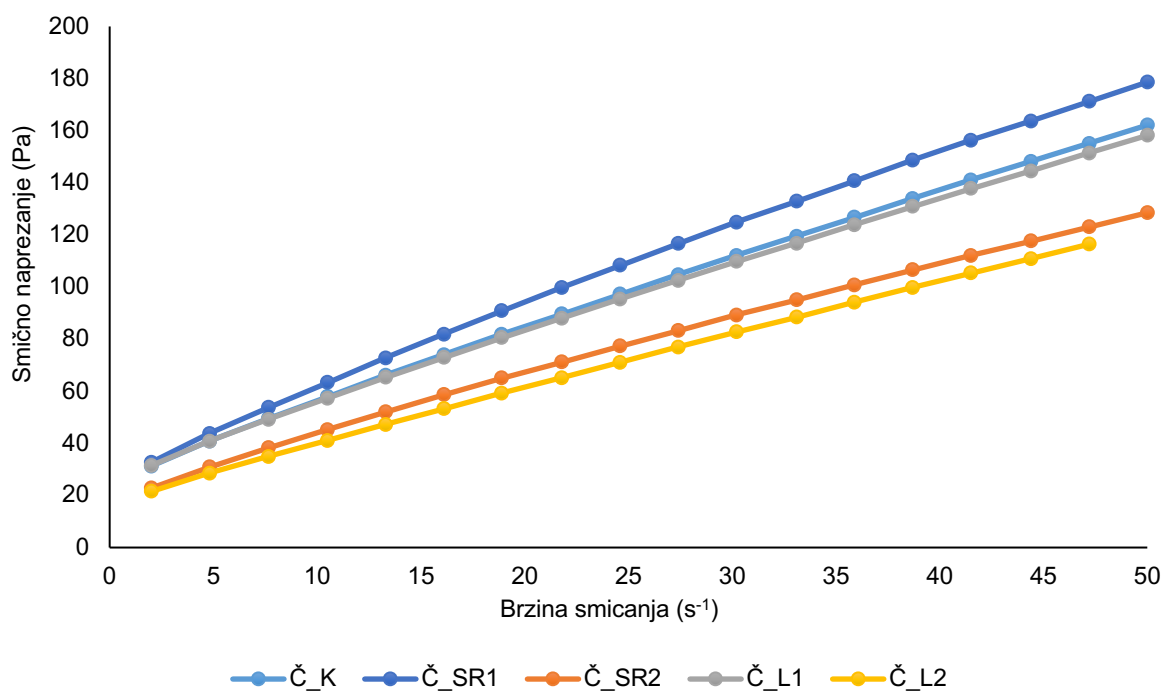
Slika 10. Simulirana probava čokolada pripremljenih s liposomalnim inkapsulatom (uzorci Č_L1 i Č_L2) u ustima (SSF), želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF) evaluirana otpuštanjem ružmarinske kiseline

Kod svih uzoraka, i onih pripremljenih s dodatkom inkapsulata sušenih raspršivanjem i liposomalnim inkapsulatima, primijećeno je kontrolirano i kontinuirano otpuštanje ružmarinske kiseline tijekom simulirane probave u želucu i tankom crijevu

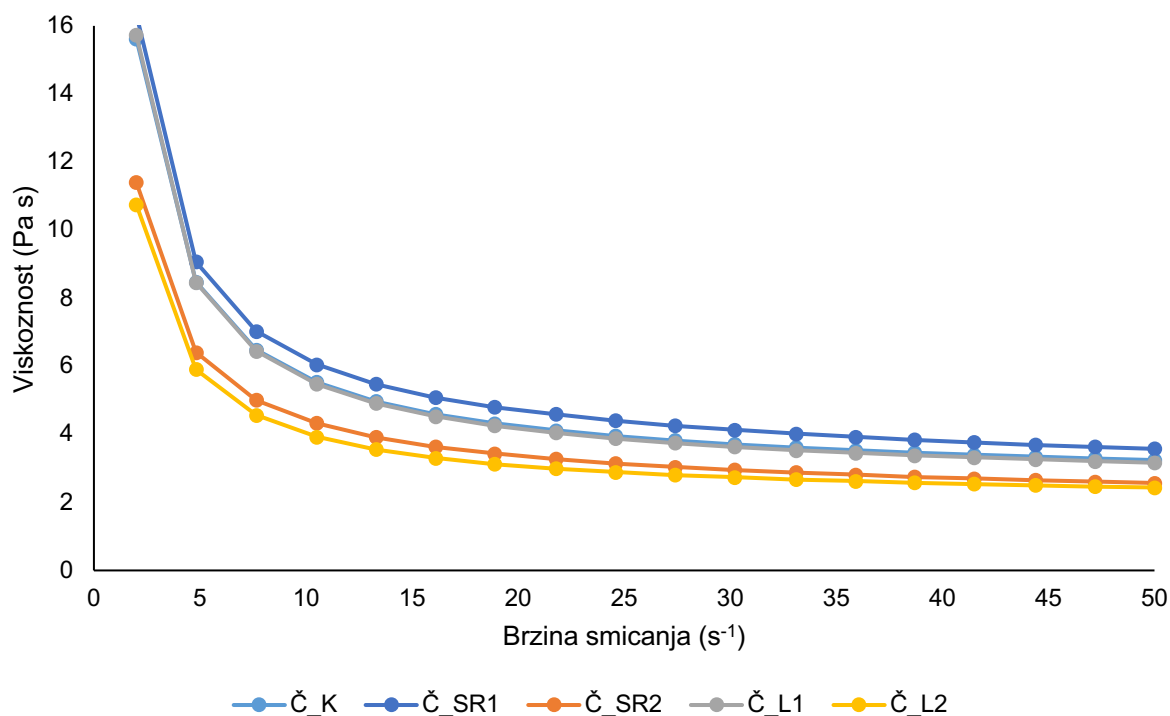
Valja istaknuti da je otpuštanje ružmarinske kiseline iz uzoraka čokolada s liposomalnim inkapsulatima u želučanoj fazi bilo sporije u usporedbi s uzorcima pripremljenima s dodatkom inkapsulata sušenim raspršivanjem. Navedeno se može objasniti ponašanjem liposoma u želucu jer njihova fosfolipidna membrana pruža određenu zaštitu u kiselom okruženju želuca te će otpuštanje inkapsuliranih tvari biti sporije zbog otpornosti prema kiselom okruženju. Struktura liposoma narušit će se tek u tankom crijevu zbog višeg pH i djelovanja pankreatina i žučnih soli (He i sur. 2018).

4.4. REOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČOKOLADA

Krivulje tečenja i viskoznosti čokolada prikazane su na slikama 11 i 12, dok su reološki parametri čokolada, uključujući Casson-ovu granicu tečenja i Casson-ovu plastičnu viskoznost, prikazani u tablici 6.



Slika 11. Krivulje tečenja za uzorke čokolada



Slika 12. Krivulje viskoznosti za uzorke čokolada

Tablica 6. Reološka svojstva čokolada

| Uzorak | Casson-ova granica tečenja (Pa) – τ_0 | Casson-ova plastična viskoznost (Pa s) – η_c |
|--------|--|---|
| Č_K | 13,1 ± 0,81 ^{ab} | 1,61 ± 0,04 ^a |
| Č_SR1 | 13,23 ± 0,63 ^{ac} | 1,86 ± 0,09 |
| Č_SR2 | 9,13 ± 0,42 ^d | 1,36 ± 0,05 ^{bc} |
| Č_L1 | 13,56 ± 0,11 ^{bc} | 1,53 ± 0,07 ^{ab} |
| Č_L2 | 8,15 ± 0,14 ^d | 1,29 ± 0,07 ^c |

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći metodu analize varijance (engl. *one-way ANOVA*) i Tukey *post-hoc* test.

Dobivene krivulje tečenja (slika 11) i krivulje viskoznosti (slika 12) ukazuju da je ponašanje uzoraka čokolade tipično za ne-newtonske fluide i to dolazi od toga da je čokolada suspenzija suhe tvari u kontinuiranoj masnoj fazi (Beckett, 2009). Casson-ov model (tablica 6) korišten je za određivanje svojstva tečenja uzoraka čokolada. Granica tečenja označava minimalno

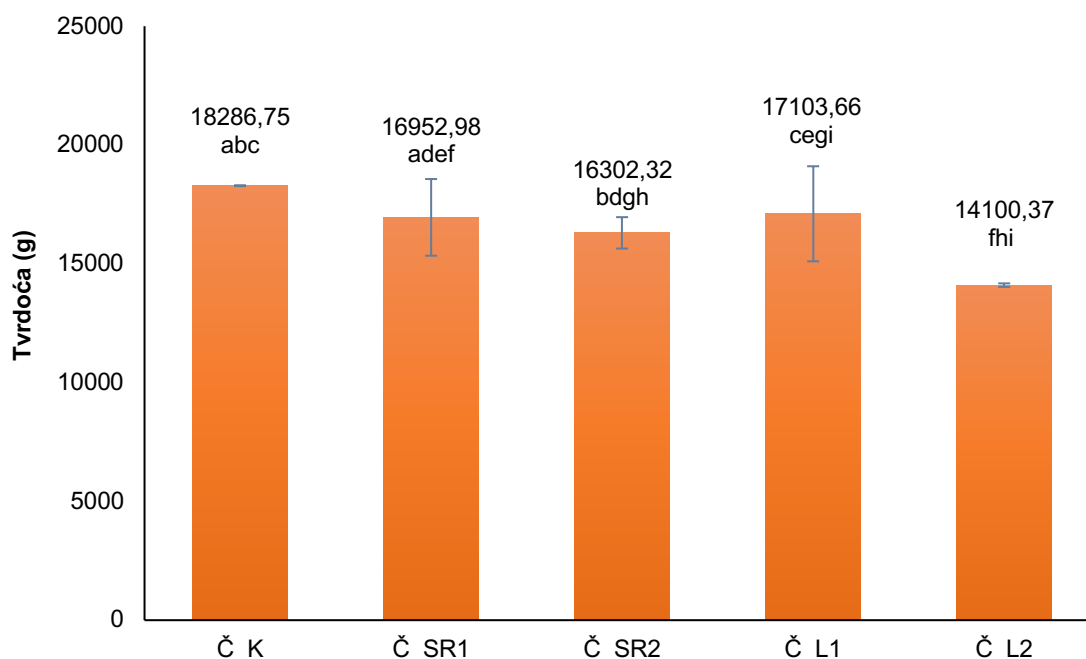
smično naprezanje potrebno kako bi čokolada počela teći, a plastična viskoznost predstavlja silu potrebnu za održavanje konstantnog protoka u čokoladi (Gonçalves i Lannes, 2010). Iz dobivenih krivulja tečenja i viskoznosti može se vidjeti kako pri niskim brzinama smicanja čestice suhe tvari zarobljene u kontinuiranoj masnoj fazi se međusobno sudaraju i tako odupiru sili. To u početku analize rezultira smanjenim kretanjem fluida, što povećava viskoznost fluida. Povećavanjem brzine smicanja, čestice se počinju kretati zajedno s protokom te mu se više ne opiru i viskoznost se smanjuje (Beckett, 2009).

Raspon Casson-ove granice tečenja uzoraka bio je od 8,15 Pa, kod uzorka Č_SR2, do 13,56 Pa, kod uzorka Č_L2. Kod kontrolnog uzorka čokolade (uzorak Č_K) granica tečenja iznosila je 13,1 Pa. Uzorci čokolada obogaćeni inkapsulatima direktno dodanim u čokoladnu masu (uzorci Č_SR1 i Č_L1) nisu pokazali statistički značajnu ($p > 0,05$) razliku u granici tečenja čokolada s obzirom na kontrolni uzorak (Č_K), te one iznose 13,23 i 13,56 Pa. Za razliku od njih statistički značajno ($p < 0,05$) manje granice tečenja, s obzirom na kontrolni uzorak (Č_K), imali su uzorci čokolada kod kojih su se inkapsulati homogenizirali u kakaovom maslacu prije dodatka u čokoladnu masu (uzorci Č_SR2 i Č_L2), te su kod njih vrijednosti granice tečenja iznosile 9,13 i 8,15 Pa. Dobivene vrijednosti granice tečenja uzoraka čokolada su u skladu s očekivanim vrijednostima (4 – 32 Pa) za tamne čokolade (Aeschlimann i Beckett, 2000). Casson-ova viskoznost uzoraka bila je u rasponu od 1,29 Pa s (uzorak Č_L2) do 1,86 Pa s (uzorak Č_SR1). Kontrolni uzorak (Č_K) imao je vrijednost Casson-ove viskoznosti od 1,61 Pa s. Casson-ova viskoznost za uzorak Č_L1 iznosila je 1,53 Pa s te za tu vrijednost nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika s kontrolnim uzorkom čokolade (Č_K). Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje viskoznosti uočeno je kod uzorka Č_SR1 gdje je vrijednost Casson-ove viskoznosti iznosila 1,86 Pa s. Čokolade pripremljene direktnim dodavanjem inkapsulata u čokoladnu masu (uzorci Č_SR1 i Č_L1) pokazale su statistički značajno ($p < 0,05$) veće vrijednosti viskoznosti u usporedbi s onima kod kojih su inkapsulati prethodno homogenizirani u kakaovom maslacu (uzorci Č_SR2 i Č_L2). U istraživanju Didar (2020a), dodatak liposomalnog inkapsulata nara u udjelu od 1 % u bijelu čokoladu uzrokovao je smanjenje Casson-ove granice tečenja s 6,31 Pa na 5,41 Pa te povećanje Casson-ove viskoznosti s 0,45 Pa s na 0,48 Pa s. U drugom istraživanju istog autora Didar (2020b) obogaćivana je tamna čokolada s inkapsulatima klorogenske kiseline. Casson-ova granica tečenja statistički se značajno ($p < 0,05$) povećala u obogaćenim uzorcima tamne čokolade, s 21,29 Pa na 21,89 Pa (uz dodatak 50,54 mg/g inkapsulata klorogenske kiseline). Viskoznost se također povećala s 1,26 Pa s na 1,38 Pa s.

4.5. TEKSTURALNA SVOJSTVA ČOKOLADA

Od teksturalnih svojstava, novoformuliranim čokoladama određena je tvrdoća. Rezultati

su prikazani na slici 13.



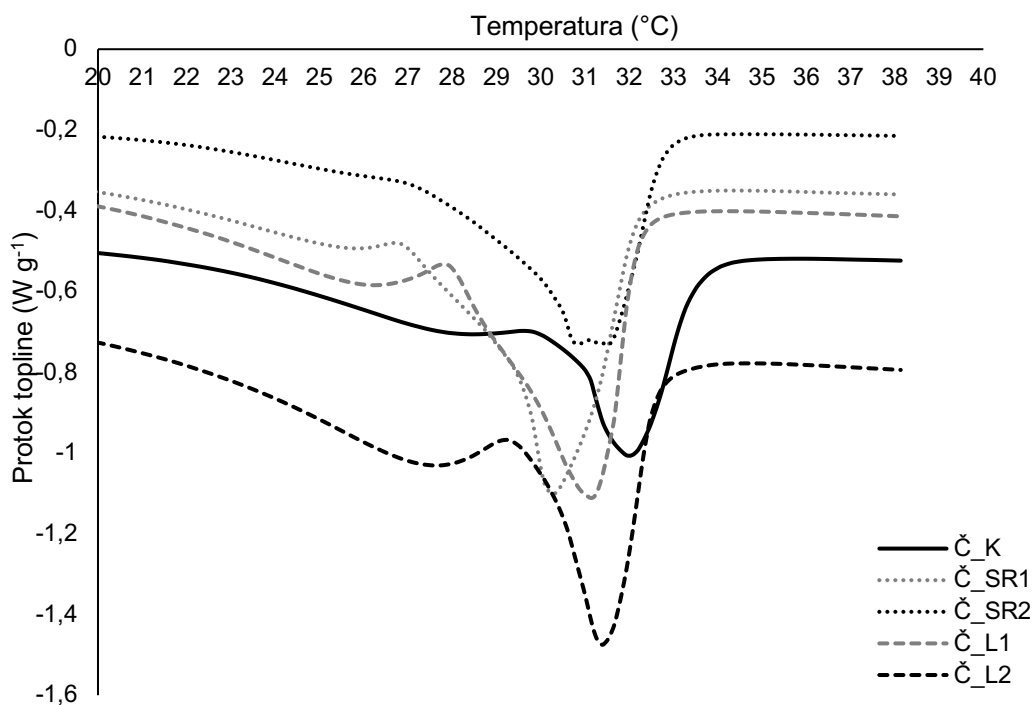
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći metodu analize varijance (engl. *one-way ANOVA*) i Tukey *post-hoc* test.

Slika 13. Tvrdoća uzoraka čokolada

Najtvrdi uzorak (18286,75 g) je bio Č_K, što označava i najveću otpornost na lom, dok je uzorak Č_L2 bio najmekši (14100,37 g) i najosjetljiviji na lom. Uzorak Č_L2 također je pokazao najniže vrijednosti Casson-ove granice tečenja i plastične viskoznosti (poglavlje 3.4.). Tvrdoća čokolade je u korelaciji s kristalnom mikrostrukturom i raspodjelom veličine čestica te manja veličina čestica dovodi do povećanja tvrdoće (Afoakwa i sur., 2008). Shodno tome moguće je zaključiti kako dodatak inkapsulata utječe na kristalnu mikrostrukturu i raspodjelu veličine čestica te smanjuje tvrdoću čokolade. Lončarević i sur. (2023) zabilježili su smanjenje tvrdoće čokolada uslijed dodatka soka od borovnice, sušenog raspršivanjem s maltodekstrinom, s 4,04 kg na 3,46 kg (uzorak s 80 g kg⁻¹ inkapsulata) i 3,35 kg (uzorak s 100 g kg⁻¹ inkapsulata). Promjenu tvrdoće objasnili su smanjenjem udjela masne faze, tj. povećanjem koncentracije nemasnih krutih čestica u obogaćenim uzorcima čokolada.

4.6. KARAKTERISTIKE TALJENJA ČOKOLADA

DSC termogrami ispitivanih čokolada prikazani su na slici 14, a vrijednosti iščitane iz njih u tablici 7.



Slika 14. DSC termogrammi uzoraka čokolada

Tablica 7. Rezultati DSC analize – maksimalna temperatura taljenja (T_t) i specifična entalpija taljenja (ΔH_t) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolada

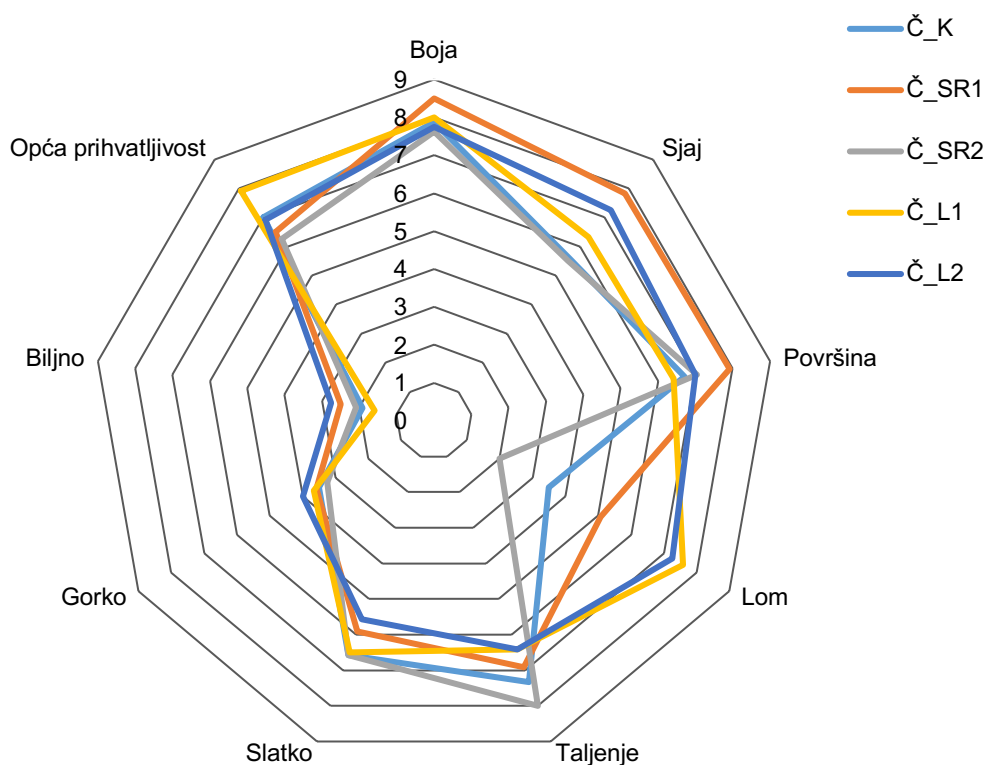
| Uzorak | T_t (°C) | ΔH_t (J g ⁻¹) |
|--------|---------------|--------------------------------------|
| Č_K | 32,12 | 17,27 |
| Č_SR1 | 30,39 | 26,12 |
| Č_SR2 | 31,59 | 21,24 |
| Č_L1 | 31,56 | 18,86 |
| Č_L2 | 31,20 | 22,65 |

Iz DSC termograma svih uzoraka vidljiva je prisutnost dva endotermna pika. Prvi pik koji se pojavljuje pri temperaturama od 26 do 30 °C predstavlja taljenje polimornog oblika IV (β_1') kakaovog maslaca (Ostrowska-Ligęza i sur., 2023). Sam izgled ovih pikova je blag i širok kod svih analiziranih uzoraka. Drugi pik, također prisutan kod svih uzoraka, je oštiji nego prvi te se nalazi u rasponu temperatura od 30,39 °C (uzorak Č_SR1) do 32,12 °C (uzorak Č_K). Ovaj pik predstavlja taljenje najpoželjnijeg polimornog oblika kakaovog maslaca - oblika V (β_2). Očekivani raspon taljenja polimornog oblika V kakaovog maslaca je pri temperaturama od 29,0

do 33,5 °C (Beckett, 2009). Kontrolni uzorak (Č_K) imao je najveću maksimalnu temperaturu taljenja (32,12 °C), dok je najnižu vrijednost imao uzorak Č_SR1 (30,39 °C). Specifična entalpija taljenja za oblik V kakaovog maslaca odnosi se na količinu energije potrebne za prelazak kakaovog maslaca iz čvrstog u tekuće stanje, bez promjene temperature. Entalpije taljenja bile su u rasponu od 17,27 J g⁻¹ (uzorak Č_K) do 26,12 J g⁻¹ (uzorak Č_SR1). Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti kako se dodatkom inkapsulata u čokoladni zamjes uslijed povećanja udjela krutih tvari, povećava i specifična entalpija taljenja.

4.7. SENZORSKA ANALIZA ČOKOLADA

Rezultati senzorske analize čokolada, uključujući evaluaciju parametara izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje), okusa (slatko, gorko i biljno) te opće prihvatljivosti, prikazani su na slici 15.



Slika 15. Rezultati senzorske analize čokolada

Intenzitet boje ocijenjen je u rasponu od 7,6 za uzorak Č_SR2 do 8,5 za uzorak Č_SR1. Najveću ocjenu za intenzitet sjaja dobio je uzorak Č_SR1 (7,8), a najnižu uzorak Č_SR2 (5,5). Ocjene za površinu iznosile su 6,7 za uzorak Č_K, 7,9 za uzorak Č_SR1, 7,0 za uzorak Č_SR2,

6,4 za uzorak Č_L1 i 7,0 za uzorak Č_L2. Intenzitet loma kao auditivno ocjenjivani parametar bio je u rasponu ocjena od 2,0 (uzorak Č_SR2) do 7,6 (uzorak Č_L1), dok je kontrolni uzorak (uzorak Č_K) dobio ocjenu 3,5. Intenzitet taljenja uzoraka čokolada ocijenjen je sljedećim ocjenama: 7,3 za uzorak Č_K, 6,9 za uzorak Č_SR1, 8,0 za uzorak Č_SR2, 6,4 za uzorak Č_L1 i 6,4 za uzorak Č_L2. Slatkoća, gorčina i biljni okus kod uzoraka čokolada nalazili su se u uskim rasponima te je tako za slatkoću raspon ocjena bio od 5,6 (uzorak Č_L2) do 6,6 (uzorci Č_K i Č_SR2), za gorčinu od 3,3 (uzorak Č_SR2) do 4,0 (uzorak Č_L2), a za biljni okus od 1,6 (uzorak Č_L1) do 2,8 (uzorak Č_L2). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da dodatak inkapsulata ekstrakta dobričice nije utjecao na promjenu gorčine, slatkoće i biljnog okusa čokolada. Opća prihvatljivost svih uzoraka čokolada ocijenjena je s visokim ocjenama. Najnižu ocjenu dobio je uzorak Č_SR2 (6,3), zatim uzorak Č_SR1 (6,5), uzorak Č_L1 (7,9), kontrolni uzorak Č_K (7) te je najvišu ocjenu dobio uzorak Č_L1 (7,9).

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak obje vrste inkapsulata u kakaov maslac nije negativno utjecao na njegov profil taljenja.
2. Dodatak obje vrste inkapsulata rezultirao je bogatijim bioaktivnim sastavom čokolada, u kojima su detektirane ružmarinska i klorogenska kiselina te flavanoid rutin, podrijetlom iz dobričice.
3. *In vitro* digestija čokolada obogaćenih inkapsulatima rezultirala je poželjnim kontroliranim i kontinuiranim otpuštanjem ružmarinske kiseline.
4. Dodatak inkapsulata u čokolade, neovisno o načinu dodatka u čokoladnu masu, nije se negativno odrazio na reološka i teksturalna svojstva čokolada.
5. Dodatkom inkapsulata povećala se entalpija taljenja obogaćenih čokolada zbog povećanja udjela krutih tvari.
6. Senzorski je najbolje ocjenjena čokolada s dodatkom liposomalnog inkapsulata dobričice, prethodno homogeniziranog u kakaovom maslacu.

6. LITERATURA

Abd El-Kader AE, Abu Hashish H (2020). Encapsulation techniques of food bioproduct. *Egypt J Chem* **63**, 1881-1909. doi: 10.21608/EJCHEM.2019.16269.1993

Aeschlimann JM, Beckett ST (2000) International inter-laboratory trials to determine the factors affecting the measurement of chocolate viscosity. *J Texture Stud*, 31, 541–576. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2000.tb01019.x>

Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A (2008) Flavor formation and character in cocoa and chocolate: critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **4**, 840–857 <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>

Anonymus 1 < <https://www.plantea.com.hr/dobricica/>> Pristupljeno 25. kolovoza 2024.

Assadpour E, Jafari SM (2019) Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annu Rev Food Sci Technol* **10**, 103–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>

Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira CFR (2010) Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT – Food Sci Technol* **43**, 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.024>

Beckett ST (2009) *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 4. izdanje, John Wiley & Sons Inc, West Sussex

Bozzuto G, Molinari A (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* **10**, 975-999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>

Chao WW, Liou YJ, Ma HT, Chen YH, Chou S (2021) Phytochemical composition and bioactive effects of ethyl acetate fraction extract (EAFE) of *Glechoma hederacea* L. *J Food Biochem* **45**, e13815. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13815>

Chou ST., Lin TH, Peng H, Chao WW (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.075>

Chou, S.-T.; Chan, Y.-R.; and Chung, Y.-C. (2012) Studies on the antimutagenicity and antioxidant activity of the hot water extract of *Glechoma hederacea*, *J Food Drug Anal*: **20**, <https://doi.org/10.6227/jfda.2012200310>

Dean LL, Klevorn CM, Hess B.J. (2016) Minimizing the negative flavor attributes and evaluating consumer acceptance of chocolate fortified with peanut skin extracts. *J Food Sci* **8**, 2824–2830. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13533>

Didar Z (2020a) Characterization of white chocolate enriched with free or encapsulated pomegranate extract. *J Nutr Fasti Health* **8**, 302-309. doi: 10.22038/JNFH.2020.50603.1281

Didar Z (2021) Enrichment of dark chocolate with vitamin D3 (free or liposome) and assessment quality parameters. *J Food Sci Technol* **58**, 3065-3072. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04810-x>

- Didar Z. (2020b) Properties of dark chocolate enriched with free and encapsulated chlorogenic acids extracted from green coffee. *Braz J Food Technol* **23**, <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11819>
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *Br J Nutr* **81**, 1–27. <https://doi.org/10.1079/BJN19990002>
- Döring AS, Petersen M (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochem Lett* **10**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.012>
- Escobar-Avello D, Avendaño-Godoy J, Santos J, Lozano-Casatellón J, Mardones C, von Baer D i sur. (2021) Encapsulation of phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract in hydroxypropyl beta-cyclodextrin and maltodextrin by spray drying. *Antioxidants* **10**, 1130. <https://doi.org/10.3390/antiox10071130>
- Faccinnetto-Beltrán P, Gómez-Fernández AR, Orozco-Sánchez NE, Pérez-Carrillo E, Marín-Obispo LM, Hernández-Brenes C i sur. (2021) Physicochemical Properties and Sensory Acceptability of a Next-Generation Functional Chocolate Added with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Probiotics. *Foods*; **10**, 333. <https://doi.org/10.3390/foods10020333>
- Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M (2012) Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Technol* **23**, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>
- Feng S, Sun Y, Wang P, Sun P, Ritzoulis C, Shao P (2020) Co-encapsulation of resveratrol and epigallocatechin gallate in low methoxyl pectin-coated liposomes with great stability in orange juice. *Int J Food Sci Technol* **55**, 1872–1880. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14323>
- Figuroa-Robles A, Antunes-Ricardo M, Guajardo-Flores D (2020) Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *Int J Pharm*, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120125>
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN (1999) Encapsulation in the food industry : a review. *Int J Food Sci Nutr* **50**, 213–224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>
- Gonçalves EV, Lannes SC da S (2010). Chocolate rheology. *Ciência Tecnol Alime* **30**, 845–851. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400002>
- Gulzar S, Benjakul S, Hozzein WN (2020) Impact of β -glucan on debittering, bioaccessibility and storage stability of skim milk fortified with shrimp oil nanoliposomes. *Int J Food Sci Technol* **55**, 2092–2103. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.14452>
- He H, Lu Y, Qi J, Zhu Q, Chen Z, Wu W (2018) Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharm Sin B* **9**, 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>
- Hwang JK, Erkhembaatar M, Gu DR, Lee CH, Shin DM, Lee YR, i sur. (2014) *Glechoma hederacea* suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis. *J Dental Res* **93**, 685–690. <https://doi.org/10.1177/0022034514536579>

- IOCCC (2000) Viscosity of cocoa and chocolate products (Analytical method: 46).
- ISO 8589:2007, Sensory analysis – General guidelines for the design of test rooms.
- Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B (2008) Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Dry Technol*, **26**, 816–835. <https://doi.org/10.1080/07373930802135972>
- Jo D, Lee J, Noh J, Kim OK, Kwon JH (2001) Chemical composition and electron donating and nitrite scavenging activities of *Glechoma hederacea* var. longituba NAKAI. *Prev Nutr Food Sci* **6**, 142-146.
- Jovanović AA, Lević SM, Pavlović VB, Marković SB, Pjanović RV, Đorđević VB i sur. (2021) Freeze vs. spray drying for dry wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extract formulations: The impact of gelation as a coating material. *Molecules* **26**, 3933. <https://doi.org/10.3390/molecules26133933>
- Katz DL, Doughty K, Ali A (2011) Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. **15**, 2779-811. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>
- Kim J, Song S, Lee I, Kim Y, Yoo I, Ryoo I i sur. (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. Longituba. *Bioorganic Med Chem Lett* **21**, 3483 – 3487. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.002>
- Kuhn H, Wiesner R, Alder L, Schewe T (1989) Occurrence of free and esterified lipoxygenase products in leaves of *Glechoma hederacea* L. and other Labiatae. *Eur J Biochem* **186**, 155 – 62. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15190.x>
- Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD (2003) Isolation, structure elucidation and biological activity of hederacine A and B, two unique alkaloids from *Glechoma hederacea*. *Tetrahedron* **59**, 6403-6407. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01093-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01093-7)
- Kumarasamy Y, Nahar L, Kong-Thu-lin P, Jaspars M, Sarker SD (2006) Hederacine A and Hederacine B from *Glechoma hederacea* Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells *in vitro*. *Nat Prod Commun* **1**, 33-35. doi:10.1177/1934578x0600100106.
- Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H (2012b) Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci*, **1**, 147–168. doi:10.1166/jcsb.2012.102
- Lončarević I, Pajina B, Šaponjaca VT, Petrovi J, Vulić J., Fišteša A i sur. (2019) Physical, sensorial and bioactive characteristics of white chocolate with encapsulated greentea extract. *J Sc Food Agr* **99**, 5834–5841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9855>
- Lončarević I, Stožinić M, Pajin B, Nikolić I, Petrović J, Šojić B i sur. (2023) Blueberry juice encapsulated on maltodextrin: The impact on the properties of white chocolate. *Food Feed Res* **50**, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.002>
- Lopez-Polo J, Silva-Weiss A, Zamorano M, Osorio FA (2020) Humectability and physical properties of hydroxypropyl methyl- cellulose coatings with liposome-cellulose nanofibers: Food application. *Carbohydr Polym* **231**, 115702. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115702>

- Mady MM, Darwish MM, Khalil S, Khalil WM (2009) Biophysical studies on chitosan coated liposomes. *Eur Biophys J* **38**, 1127–1133. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0524-z>
- Mainente F, Piovan A, Zanoni F, Chignola R, Cerantola S, Faggini S i sur. (2022) Spray-drying microencapsulation of an extract from *Tilia tomentosa* Moench flowers: Physicochemical characterization and *in vitro* intestinal activity. *Plant Food Hum Nutr* **77**, 467-473. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00995-y>
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime L (2018) Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. *Am J Clin Nutr* **727–747**. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Martirosyan DM, Singh J. (2015) A new definition of functional food by FFC : what makes a new definition unique?. *Funct Foods Heal Dis* **5**, 209–223. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v5i6.183>
- Masuda A, Takahashi C, Inai M, Miura Y, Masuda T (2013) Chemical evidence for potent xanthine oxidase inhibitory activity of *Glechoma hederacea* var. *grandis* leaves (Kakidoushi-Cha). *J Nutr Sci Vitaminol* **59**, 570-575. <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.570>
- Méndez AS, Pérez LAC (2011) Adición de hierro hemo, proveniente de hemoglobina bovina a un chocolate de consumo directo. *Bistua Rev. Fac. Cienc. Básicas* , **9**, 21–31.
- Menrad K. (2003) Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.* **56**: 181-188. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00247-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00247-9)
- Milovanović M, Živković D, Vučelić-Radović B (2010) Antioxidant Effects of *Glechoma hederacea* as a Food Additive, *Nat Prod Commun* **5** <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500116>
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlilieu C i sur. (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function* **5**, 1113-1124. <http://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mitich LW (1994) The Intriguing World of Weeds. *Weed Technol* **8**, 413–415. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00032103>
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A (2007) The Essential Oil of Ground Ivy (*Glechoma hederacea* L) Growing Wild In Eastern Lithuania. *J Essent Oil Res* **19**, 449–451. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.96999>
- Mohammed NK, Tan CP, Manap YA, Muhiaddin BJ, Hussin ASM (2020) Spray drying for the encapsulation of oils – A review. *Molecules* **25**, 3873. <https://doi.org/10.3390/molecules25173873>
- Munin A, Edwards-Lévy F (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 793-829. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Narodne Novine (2005) Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1440.html . Pristupljeno 25. kolovoza 2024
- Nightingale LM, Lee SY, Engeseth NJ (2011) Impact of storage on dark chocolate: Texture and polymorphic changes. *J Food Sci* **76**, 142-153. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01970>

- Nikolić T, Rešetnik I (2007) Plant uses in Croatia. *Phytol Balcanica* **13**, 229–238.
- Ostrowska-Ligęza E, Marzec A, Góska A, Wirkowska-Wojdyla M, Bryś Rejch A, Czarkowska K (2019) 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>
- Peng T, Zhang X, Huang Y, Zhao Z, Liao Q, Xu J i sur. (2017). Nanoporous mannitol carrier prepared by non-organic solvent spray drying technique to enhance the aerosolization performance for dry powder inhalation. *Scic rep*, **7**, 46517. <https://doi.org/10.1038/srep46517>
- Perrett S, Golding M, Williams P (1991) A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *J Pharm Pharmacol* **43**, 154-161. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb06657.x>
- Pinilla CMB, Thys RCS, Brandelli A (2019). Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. *Int J Food Microbiol*, **293**, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.006>
- Piñón-Balderrama CI, Leyva-Porras C, Terán-Figueroa Y, Espinosa-Solís V, Álvarez-Salas C, Saavedra-Leos MZ (2020) Encapsulation of Active Ingredients in Food Industry by Spray-Drying and Nano Spray-Drying Technologies. *Processes* **8**, 889. <https://doi.org/10.3390/pr8080889>
- 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. *Antioxidants* **11**, 752. <https://doi.org/10.3390/antiox11040752>
- Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores MJ, Gao L i sur. (2012). Anti-Melanogenesis Effect of *Glechoma hederacea* L. Extract on B16 Murine Melanoma Cells. *Biosci, Biotechnol Biochem* **76**, 1877–1883. <https://doi.org/10.1271/bbb.120341>
- Ramos-Escudero F, Casimiro-Gonzales S, Fernández-Prior Á, Chávez KC, Gómez-Mendoza J i sur. (2021) Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT***147**, 111629. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>
- Reza Mozafari M, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C (2008) Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res* **18**, 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>
- Risch SJ (1995) Encapsulation : Overview of Uses and Techniques. American Chemical Society, Washington DC.
- Roberfroid M B (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* **71**, 1660–1664. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1660S>
- Santos D, Maurício AC, Sencadas V, Santos JD, Fernandes MH, Gomes PS (2018) Spray drying: An overview. U: *Biomaterials - Physics and Chemistry*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72247>

Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Oludemi T, Ayuda-Durán B, González-Manzano S (2019) Plant phenolics as functional food ingredients. *Adv Food Nutr Res* **90**, 183-257 <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.012>

Sarıtaş S, Duman H, Pekdemir B, Rocha JM, Oz F, Karav S (2024) Functional chocolate: exploring advances in production and health benefits. *Int J Food Sci Technol* **59**, 5303-5325. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17312>

Shahbazi S, Didar Z, Vazifedoost M, Naji-Tabasi S (2022) Enrichment of dark chocolate with free and microencapsulated white tea and jujube extracts: Impacts on antioxidant, physicochemical, and textural properties. *Qual Assur Saf Crops* **14**, 188-201 <https://doi.org/10.15586/qas.v14i4.1099>

Shishir MRI, Chen W (2017) Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetables juices. *Trends Food Sci Technol* **65**, 49-67 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>

Sim SY, Ng JW, Ng WK, Forde CG, Henry CJ 2016. Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. *Food Chem* **200**, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.092>

Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Sinderen DV (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin in Biotechnol* **16**, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008>

Šeremet D, Subotić P, Marković K, Mandura Jarić A, Vojvodić Cebin A, Vahčić N i sur. (2023) Development, bioactive and sensory analysis of the honey-filled chocolate pralines infused with ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr* **18**, 49-54. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.18.1-2.6>

Šeremet D, Vugrinec K, Petrović P, Butorac A, Kuzmić S, Vojvodić Cebin A, i sur. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chem* **370**, 131257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131257>

Šeremet D, Žižek K, Žepić I, Kovačević M, Nižić Nodilo L, Vrsaljko D i sur. (2024) Effect of guar gum-based carriers on the physical and bioactive properties of spray-dried delivery systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Food Hydrocolloid* **150**. 109658. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109658>

Tan HW, Misran M (2013) Polysaccharide-anchored fatty acid liposome. *Int J Pharm* **441**, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.013>

Tannenbaum G (2004) Chocolate: A Marvelous Natural Product of Chemistry. *J Chem Educ* **81**, 1131. doi:10.1021/ed081p1131

Tatipamula VB, Kukavica B (2021) Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochem Funct* **39**, 926-944 . <https://doi.org/10.1002/cbf.3667>

Wang YY, Lin SY, Chen WY, Liao SL, Wu CC, Pan PH, i sru. (2017) *Glechoma hederacea* extracts attenuate cholestatic liver injury in a bile duct-ligated rat model. *J Ethnopharmacol* **204**.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.011>

Wu Z, Zhou W, Pang C, Deng W, Xu C, Wang X (2019) Multi-functional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. *Food Chem* **295**, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.114>

Wunsch NG (2021) Size of the functional food market worldwide from 2019 to 2027 – Statista <https://www.statista.com/statistics/1264165/global-functional-food-market-size/>. Pristupljeno 4. rujna. 2024.

Yan C, Kim SR, Ruiz DR, Farmer JR (2022) Microencapsulation for food applications: A review. *ACS Appl Bio Mater* **5**, 5497-5512.

Zanoni F, Primiterra M, Angeli N, Zoccatelli G (2019) Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. *Food Chem* **307**, 125535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125535>

Zarić DB, Bulatović ML, Rakin MB, Krunić TŽ, Lončarević IS, Pajin BS (2016) Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill. *RSC advances*, **6**, 13934-13941. <https://doi.org/10.1039/C5RA21363K>

Zorilla JG, Giovannini O, Nadalini S, Zanini A, Russo MT, Masi M i sur. (2023) Suppressive activity of *Glechoma hederacea* extracts against the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola*, and first screening of the active metabolites. *Agriculture* **14**, 58. <https://doi.org/10.3390/agriculture14010058>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Barbara Tuzla, 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