

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mr Jovanka G. Laličić-Petronijević

**SENZORNA, ANTIOKSIDATIVNA I REOLOŠKA  
SVOJSTVA RAZLIČITIH VRSTA ČOKOLADA SA  
PROBIOTICIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Mr Jovanka G. Laličić-Petronijević

**SENSORY, ANTIOXIDANT AND RHEOLOGICAL  
PROPERTIES OF DIFFERENT TYPES OF  
CHOCOLATES WITH PROBIOTICS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

***Mentor:***

Dr Jovanka Popov-Raljić, redovni profesor  
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

***Članovi Komisije:***

Dr Dragojlo Obradović, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Zorica Radulović, vanredni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Draženka Komes, vanredni profesor  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Univerzitet u Zagrebu

Dr Radomir Radovanović, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Viktor Nedović, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Posvećeno Laliki – nezamenljivom, nezaboravnom, neprežaljenom.*



*Najlepše se zahvaljujem mom mentoru, dr Jovanki Popov-Raljić, redovnom profesoru, koja me je svojom neobičnom snagom i velikim iskustvom usmeravala tokom dosadašnjeg zajedničkog rada i nesebično pomagala i bodrila pri realizaciji doktorske disertacije.*

*Želim da izrazim zahvalnost članovima Komisije za ocenu doktorskog rada, koji su, pored generalne pomoći i sugestija, svako na svoj način, doprineli njegovom zaokruživanju: prof. dr Dragojlu Obradoviću, na angažovanju oko pribavljanja probiotskih kultura; prof. dr Zorici Radulović, na realizaciji mikrobiološkog dela disertacije i korisnim savetima prilikom pisanja; prof. dr Draženki Komes, na svesrdnom zalaganju pri određivanju sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta čokolada, na efikasnosti, doslednosti i prijateljstvu; prof. dr Radomiru Radovanoviću, na učešću u senzornom ocenjivanju i na pruženoj mogućnosti da se ono obavi u najadekvatnijim uslovima – u novoj Laboratoriji za senzornu analizu Poljoprivrednog fakulteta; prof. dr Viktoru Nedoviću, na uvođenju u zanimljivu oblast mikroinkapsulacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem kolegama iz kompanije "Štark" a.d., Beograd, u kojoj je obavljen praktični deo proizvodnje uzoraka čokolada, bez čije spremnosti na saradnju i logistike ne bi bilo moguće započeti i finalizovati prikazano istraživanje: Dariji Janežić, hvala na viziji i otvorenosti ka novim idejama; Kati Vučković, na izuzetnoj energiji i posvećenosti tokom celokupnog trajanja eksperimenta, Oliveri Pešić, na učešću u izvođenju reoloških merenja.*

*Izrazitu privilegiju i zadovoljstvo predstavljao je rad sa kolegama sa Instituta za opštu i fizičku hemiju, naročito sa dr Stanislavom Gorjanović, koja mi je bezrezervno stavila na raspolaganje svoju mnogostruku pomoć, stručnost i veštine, posebno u domenu primene novih, elektrohemijskih metoda za određivanje antioksidativnosti, na čemu joj se iskreno zahvaljujem. Veliko hvala prof. dr Desanki Sužnjević, dr Latu Pezu, mr Sanji Ostojić i dr Ferencu Pastoru, koji su svoje talente i mudrost utkali u ovu disertaciju. Zajedničke diskusije o nauci i životu učinile su istraživanje zanimljivijim i vrednim truda.*

*Kolegama, doc. dr Mirjani Demin i doc. dr Igoru Tomaševiću, toplo se zahvaljujem na pomoći pri senzornoj analizi, na ispoljenoj volji, korisnim komentarima i uvek osetljivim nepsima.*

*Svim kolegama, saradnicima i prijateljima koji su bili uz mene tokom istraživačkog perioda: hvala na podsticanju, lojalnosti i strpljenju, koji neće biti zaboravljeni.*

*Mojoj porodici – njihova postojana podrška i безусловna ljubav bile su veoma potrebne, duboko cenjene i dragocene.*

# SENZORNA, ANTIOKSIDATIVNA I REOLOŠKA SVOJSTVA RAZLIČITIH VRSTA ČOKOLADA SA PROBIOTICIMA

Doktorska disertacija

Mr Jovanka Laličić-Petronijević

## *SAŽETAK*

Prehrambeni proizvodi koji sadrže probiotske mikroorganizme, uglavnom bakterije mlečne kiseline, sa pozitivnim učincima po zdravlje, predstavljaju jedno od najvećih tržišta funkcionalne hrane, među kojima su proizvodi od mleka najdostupniji. Težnja da korisne, probiotske bakterije bezbednije i lakše prežive uslove gastrointestinalnog trakta, kao i potreba da budu dostupne tokom dužeg vremenskog perioda u odnosu na onaj koji je ograničen trajnošću proizvoda od mleka, nametnula je ideju da se obave opsežnija ispitivanja primene probiotika na čokoladi kao nosaču. Program istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je usmeren na ispitivanje mogućnosti primene probiotika u različite vrste čokolada, zbog njihove osetljivosti prema velikom broju procesnih faktora i uslovima okoline, a imajući u vidu da je održivost esencijalno svojstvo koje uslovljava njihovu efikasnost. Inkluzijom probiotskih kultura uvodi se dodatna disperzna faza u sastav čokolada, što može imati uticaja na njihovu mikrostrukturu i usloviti promene izgleda - boje, teksture, topivosti i reoloških svojstava. Pored navedenog, pojedina istraživanja ukazuju na mogućnost postojanja interakcija između probiotskih mikroorganizama i polifenolnih komponenata namirnice u koje su dodati, što može dovesti do promene njenog antioksidativnog kapaciteta. Kako bi se ustanovilo u kojoj meri je inkorporiranje probiotika uticalo na dominantna svojstva različitih vrsta čokolada, obavljeno je ispitivanje njihovih senzornih, antioksidativnih i reoloških karakteristika neposredno nakon proizvodnje (0-30 dana) i tokom skladištenja od 90, odnosno 180 dana. Radi utvrđivanja svih faktora koji mogu uticati na funkcionalnost čokolada sa probioticima obavljene su i analize upotrebljenih ambalažnih materijala, koje su obuhvatale ispitivanje fizičko-mehaničkih i barijernih svojstava.

Konkretno, u čokolade različitog sastava (mlečne, crne sa 44 % i crne sa 75 % kakao-delova) dodati su liofilizovani probiotski sojevi *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup> i *Bifidobacterium lactis* HN019, kao i DUOLAC MIX L3 - mikroinkapsulisana mešavina tri probiotske kulture: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium breve*. Proizvodnja čokolada sa probioticima obavljena je u pogonu fabrike “Štark”, a.d., Beograd, uz izvesne modifikacije standardnog tehnološkog postupka. Inkapsulisani sojevi L3, kao i liofilizovana kultura *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup> imali su veoma dobru vijabilnost tokom 180 dana skladištenja ( $10^9$  tj.  $10^8$  cfu/g). Kod probiotskog soja *B. lactis* HN019 došlo je do bržeg opadanja broja aktivnih ćelija u svim ispitivanim uzorcima (sa  $10^8$  na  $10^6$  cfu/g), te je funkcionalnost čokolada sa navedenim sojem ograničena na period od 90 dana od momenta proizvodnje. Na bazi podataka o vijabilnosti probiotskih bakterija čuvanih na različitim temperaturama (4°C i 20°C), utvrđeno je da se čokolade sa probioticima mogu skladištiti i na sobnoj temperaturi, bez bojazni od drastičnog pada funkcionalnosti proizvoda.

Osnovni hemijski sastav čokolada sa probioticima bio je nepromenjen u odnosu na kontrolne uzorke koji nisu sadržali probiotske bakterije. Obogaćivanje različitih vrsta čokolada probiotskim sojevima, bilo u liofilizovanom ili inkapsulisanim obliku, nije dovelo do remećenja njihovih senzornih svojstava, a svi analizirani uzorci čokolada zadržali su odličan senzorni kvalitet tokom skladištenja od 180 dana. Ispitivanja karakteristike kvaliteta boje primenom tristimulusne kolorimetrije (u CIE, CIE  $L^* a^* b^*$  i Hunter Lab sistemu), pokazala su da dodatak probiotskih bakterija nije izazvao promene boje, pogotovo u smislu pojave sivljenja, koje nije detektovano ni po vremenskoj koordinati, već su utvrđene vrednosti sjajnosti (Y), psihometrijske svetlosti ( $L^*$ ,  $L_{Hw}$ ), tona ( $a^*$ ,  $a_{Hw}$ ) i hrome ( $b^*$ ,  $b_{Hw}$ ) odgovarale tipu čokolada prema sastavu kakao-delova. Termodinamički parametri topljenja i kristalizacije, određeni primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, sugerišu da se profil topljenja čokolada sa probioticima nije značajnije razlikovao od kontrolnih uzoraka, nego je pre svega bio uslovljen sadržajem masti u sastavu mlečnih i crnih čokolada. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih grupa fenola (ukupnih flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina) bio je u skladu sa sastavom ispitivanih vrsta čokolada, pre svega, sa udelom kakao-delova. U ovom doktorskom radu nova, polarografska metoda (HPS) po prvi put je primenjena za određivanje AO kapaciteta ekstrakata čokolada. Utvrđeni su visoki koeficijenti korelacije HPS metode sa primenjenim standardnim metodama (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP i 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid - ABTS) i sadržajem

polifenolnih jedinjenja, čime je potvrđena njena validnost i mogućnost primene i na kakao-proizvode. Konstatovano je da prisustvo probiotskih kultura nije imalo uticaja na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka čokolada unutar iste vrste. Navedeno, zajedno sa odsustvom vremenske zavisnosti antioksidativne aktivnosti, predstavlja još jednu potvrdu da probiotske bakterije ne menjaju AO potencijal čokolada u koje su inkorporirane. Slično se odnosi i na parametre oksidativne stabilnosti masti ekstrahovanih iz analiziranih uzoraka čokolada, dobijenim primenom DSC, s obzirom da su podaci za indukciono vreme oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) korespondirali sa sadržajem polifenolnih jedinjenja, bez značajnijih variranja u zavisnosti od dodatka probiotika. Upotrebljene probiotske bakterije, generalno, nisu imale veći uticaj na reološke karakteristike toka različitih čokoladnih masa, pogotovo na vrednosti plastičnog i prividnog viskoziteta. Povećanje vrednosti prinosnog napona, konstatovano u pojedinim slučajevima, se, osim granulacije probiotika kod kojih je uočeno, može pripisati nedovoljnoj homogenosti proizvedenih uzoraka. U tom smislu bi dalja istraživanja trebala usmeriti na iznalaženje efikasnijih tehnika dispergovanja probiotika, što bi doprinelo otklanjanju navedenih pojava i omogućilo kontinualnu proizvodnju u industrijskim uslovima.

Analize ambalažnih materijala, pokazale su da je aluminjumska folija kao primarna ambalaža za pakovanje čokolada sa probioticima, pogodna sa aspekta svih ispitivanih svojstava, osim u pogledu hermetičnosti vara. Ovaj nedostatak je označen kao jedan od mogućih uzroka opadanja broja aktivnih ćelija pojedinih probiotika u različitim vrstama čokolada, koji je potrebno otkloniti u cilju održanja funkcionalnosti proizvoda tokom celokupnog perioda skladištenja.

Na osnovu svega navedenog, može se konstatovati da mlečne i crne čokolade različitog sastava predstavljaju dobar matriks za dostavu probiotika, a zbog dodate vrednosti istovremeno doprinose proširenju asortimana konditorskih proizvoda i tržišta funkcionalne hrane.

**Ključne reči:** Mlečne i crne čokolade, probiotici, senzorna, antioksidativna i reološka svojstva, ambalaža, funkcionalnost.

**Naučna oblast:** Prehrambena tehnologija

**Uža naučna oblast:** Tehnologija ratarskih proizvoda



# **SENSORY, ANTIOXIDANT AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF DIFFERENT TYPES OF CHOCOLATES WITH PROBIOTICS**

Doctoral Dissertation

Mr Jovanka Laličić-Petronijević

## **ABSTRACT**

Food products containing beneficial microorganisms, mostly lactic acid bacteria which effectively affect human health, represent one of the largest market of functional foods, with dairy products as the most accessible ones. Tendency that useful probiotic bacteria safer and easier survive the conditions of the gastrointestinal tract, and the need to make them available over a longer period of time compared to durability of dairy products, imposed the idea to conduct the extensive testing of probiotics in chocolate as a carrier.

Research program in the scope of this dissertation was aimed at investigating the possibility of application of probiotics in different types of chocolate, because of their sensitivity to a large number of process factors and environmental conditions, and bearing in mind that sustainability is an essential property that determines their effectiveness. By including of probiotic cultures in the chocolate composition, an additional dispersed phase is introduced, which can influence the microstructure and cause a change in appearance - colour, texture, melting and rheological properties of the product. In addition, some studies suggest the possibility of an interaction between probiotic microorganisms and polyphenol components in food containing them, which may lead to a change of its antioxidant capacity.

In order to establish the extent to which the incorporation of probiotics affect the dominant characteristics of different types of chocolate, an examination of their sensory, antioxidant and rheological properties was carried out immediately after production (0-30 days) and during storage of 90, ie 180 days. With the aim of determination of all factors that may affect the functionality of chocolate with probiotics, the analysis of used packaging materials, which included testing of physical-mechanical and barrier properties, were also conducted.

In particular, the freeze-dried probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup> and *Bifidobacterium lactis* HN019, as well as DUOLAC MIX L3 - microencapsulated mixture of

three probiotic cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium breve*, were added into chocolates of different composition (milk, dark with 44% and dark with 75% cocoa solids). Production of chocolates with probiotics was carried out in factory "Štark" a.d., Belgrade, with minor modifications of the standard technological procedure.

Microencapsulated strains L3, and freeze-dried culture *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup> exhibited a very good viability during 180 days of storage ( $10^9$  ie  $10^8$  cfu/g). In the case of probiotic strain *B. lactis* HN019 faster decline of the number of active cells was observed in all samples tested (from  $10^8$  to  $10^6$  cfu/g), hence the functionality of chocolates containing this strain is limited to a period of 90 days. Based on the data related to viability of probiotic bacteria stored at different temperatures (4°C and 20°C), it was found that the chocolates with probiotic can be stored at room temperature, without drastic functionality reduction.

The basic chemical composition of chocolates with probiotics was unchanged compared to control ones that did not contain probiotic bacteria. Enrichment of different types of chocolates with probiotic bacteria, either lyophilized or in microencapsulated form, did not lead to disruption of sensory properties, and all analyzed samples maintained excellent sensory quality during storage of 180 days. Examination of colour characteristics, using tristimulus colorimetry (CIE, CIE  $L^*a^*b^*$  and Hunter Lab system), showed that addition of probiotic bacteria did not cause changes of colour, especially in terms of bloom development, which is not detected even in the time coordinate, but the measured values of the luminance (Y), psychometric light ( $L^*$ ,  $L_{Hw}$ ), tone ( $a^*$ ,  $a_{Hw}$ ) and chroma ( $b^*$ ,  $b_{Hw}$ ) corresponded to the composition of chocolate type according to cocoa solids content. Thermodynamic parameters of melting and crystallization, determined by differential scanning calorimetry, suggested that the melting profile of the chocolates with probiotics did not significantly differ from the control samples, but was primarily caused by amount of fat in the composition of milk and dark chocolates. The content of total and individual phenolic compounds (total flavonoids, flavan-3-ols and proanthocyanidins) was consistent with the composition of the examined kinds of chocolate, above all, with the proportion of cocoa solids. In this PhD thesis a new polarographic method (Hydrogen Peroxide Scavenging - HPS) was applied for the first time to determine the antioxidative capacity of chocolate extracts. High correlation coefficients of HPS method compared to standard methods used (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP and 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid - ABTS) and the content of polyphenolic compounds, were established, thus confirming its validity and possibility of application in

cocoa products. It was found that the presence of probiotic cultures did not affect the antioxidant activity of chocolate samples within the same type. Together with the absence of time dependence of antioxidant activity, above-mentioned represents another confirmation that the probiotic bacteria do not change AO potential of chocolate in which they are incorporated. Likewise applies to the parameters of the oxidative stability of fats extracted from the analyzed samples of chocolate, obtained by DSC, given that the data for the oxidation induction time (OIT) and oxidation onset temperature (OOT) corresponded with the content of polyphenolic components, with no significant variation depending on the probiotic addition. Applied probiotic bacteria, in general, had no significant effect on the rheological characteristics of various chocolates, especially on the values of apparent and plastic viscosity. Increased value of the yield stress, noted in some cases, beside granulation of probiotics in which it was observed, can be attributed to the lack of homogeneity of the produced samples. In this respect, further research should focus on finding efficient techniques of probiotic dispersion into chocolate mass, which would contribute to the elimination of the above issues and enable continuous production on industrial scale.

Analysis of packaging materials, have shown that the aluminum foil as primary packaging for chocolate with probiotics, can be considered as suitable in terms of all examined properties, except for the hermetic seal. This drawback was identified as one of the possible causes of active cells number decline of certain probiotics in different types of chocolate, that should be eliminated in order to maintain the functionality of these products during the entire period of storage.

Based on the above, it can be concluded that both milk and dark chocolate with different composition represent a good matrix for probiotics delivery, and because of the added value, at the same time, also contribute to expanding of the assortment of confectionery products, as well as the market of functional food.

**Keywords:** Milk and dark chocolates, probiotics, sensory, antioxidant and rheological properties, packaging, functionality

**Scientific field:** Food technology

**Specific scientific field:** Technology of crop products

# SADRŽAJ

|  |     |
|--|-----|
| 1. UVOD .....  | 1   |
| 2. PREGLED LITERATURE .....  | 4   |
| 2.1. VRSTE I HEMIJSKI SASTAV ČOKOLADE .....  | 4   |
| 2.1.1. Kakao-maslac .....  | 10  |
| 2.1.1.1. Kristalizacija .....  | 11  |
| 2.1.1.2. Polimorfizam .....  | 13  |
| 2.2. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE ČOKOLADE .....  | 19  |
| 2.2.1. Mešanje .....   | 21  |
| 2.2.2. Rafinacija .....  | 22  |
| 2.2.3. Končiranje .....  | 22  |
| 2.2.4. Temperiranje .....  | 24  |
| 2.2.5. Oblikovanje, hlađenje, pakovanje .....  | 25  |
| 2.3. SIVLJENJE ČOKOLADE .....  | 26  |
| 2.4. SENZORNA SVOJSTVA KVALITETA ČOKOLADE .....  | 29  |
| 2.4.1. Značaj senzorne analize u razvoju novih proizvoda .....   | 48  |
| 2.4.2. Karakteristike kvaliteta boje čokolade .....  | 53  |
| 2.5. POLIFENOLI KAO BIOAKTIVNE KOMPONENTE ČOKOLADE ..  | 64  |
| 2.5.1. Sastav polifenolnih komponenata kaka i čokolade .....   | 65  |
| 2.5.2. Uticaj polifenolnih komponenata čokolade na zdravlje .....  | 73  |
| 2.6. REOLOŠKA SVOJSTVA ČOKOLADNE MASE .....  | 76  |
| 2.6.1. Opšte teorijske postavke.....   | 76  |
| 2.6.2. Specifičnosti proticanja čokoladne mase.....  | 78  |
| 2.6.3. Faktori koji utiču na reološka svojstva čokoladne mase .....  | 82  |
| 2.7. KARAKTERISTIKE AMBALAŽNIH MATERIJALA ZA<br>PAKOVANJE ČOKOLADA.....  | 90  |
| 2.8. PROBIOTSKE BAKTERIJE KAO FUNKCIONALNI<br>DODACI HRANI .....   | 93  |
| 2.8.1. Sastav GI trakta .....  | 93  |
| 2.8.2. Bakterije mlečne kiseline kao probiotske bakterije.....   | 95  |
| 2.8.3. Mehanizmi delovanja probiotskih bakterija.....  | 98  |
| 2.8.4. Uticaj probiotskih bakterija na zdravlje .....  | 99  |
| 2.8.5. Kriterijumi za selekciju probiotskih bakterija .....  | 104 |
| 2.8.5.1. Tehnološki aspekti selekcije probiotika i faktori koji utiču<br>na njihovu primenu u prehrambenim proizvodima ..... | 107 |
| 2.8.6. Mikroinkapsulacija kao način zaštite probiotskih bakterija .....  | 115 |
| 2.8.7. Primena probiotika u proizvodnji čokolade .....   | 118 |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....   | 123 |
| 4. MATERIJAL I METODE .....  | 125 |
| 4.1. MATERIJAL .....   | 125 |
| 4.1.1. Uzorci čokolada .....   | 125 |
| 4.1.2. Probiotske bakterije .....  | 126 |
| 4.2. METODE RADA .....   | 127 |
| 4.2.1. Proizvodnja uzoraka čokolada .....  | 128 |
| 4.2.2. Određivanje vijabilnosti probiotskih bakterija .....  | 132 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.3. Određivanje osnovnog hemijskog sastava .....   | 133 |
| 4.2.3.1. Određivanje sadržaja vode sušenjem pod normalnim pritiskom ...   | 134 |
| 4.2.3.2. Određivanje sadržaja sirovih proteina metodom po Kjeldahl-u ....   | 134 |
| 4.2.3.3. Određivanje sadržaja masti metodom po Soxhlet-u .....  | 134 |
| 4.2.3.4. Određivanje sadržaja saharoze – polarimetrijska metoda .....   | 134 |
| 4.2.3.5. Izračunavanje energetske vrednosti 100 g proizvoda .....   | 135 |
| 4.2.3.6. Određivanje aktivnosti vode ( $a_w$ ) .....  | 135 |
| 4.2.4. Senzorna analiza .....   | 135 |
| 4.2.4.1. Instrumentalno određivanje karakteristika kvaliteta boje .....   | 138 |
| 4.2.4.2. Određivanje termalnih svojstava čokolada metodom<br>diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) ..... | 140 |
| 4.2.5. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja .....   | 140 |
| 4.2.5.1. Priprema uzoraka čokolada .....  | 140 |
| 4.2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin – Ciocalteu-ovim<br>reagensom .....                            | 141 |
| 4.2.5.3. Određivanje sadržaja ukupnih neflavonoida .....  | 142 |
| 4.2.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida .....  | 142 |
| 4.2.5.5. Određivanje sadržaja flavan-3-ola .....  | 143 |
| 4.2.5.5.1. Reakcija sa vanilinom (vanilin indeks) .....   | 143 |
| 4.2.5.5.2. Reakcija sa <i>p</i> -dimetilamino-cinamaldehydom<br>( <i>p</i> -DAC).....                             | 143 |
| 4.2.5.6. Određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina<br>modifikovanom metodom po Bate-Smith-u .....            | 144 |
| 4.2.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta čokolada .....   | 145 |
| 4.2.6.1. FRAP metoda .....  | 145 |
| 4.2.6.2. ABTS metoda .....  | 145 |
| 4.2.6.3. Polarografska metoda (HPS) .....   | 146 |
| 4.2.6.4. Određivanje indukcionog vremena oksidacije (OIT)<br>primenom DSC .....                                   | 149 |
| 4.2.6.5. Određivanje temperature početka oksidacije (OOT)<br>primenom DSC .....                                   | 150 |
| 4.2.7. Određivanje reoloških karakteristika prema ICA (IOCCC) metodi  | 150 |
| 4.2.8. Analize ambalažnih materijala .....  | 151 |
| 4.2.8.1. Određivanje debljine materijala .....  | 152 |
| 4.2.8.2. Određivanje mase po jedinici površine materijala .....   | 152 |
| 4.2.8.3. Određivanje mehaničkih svojstava ambalažnih materijala .....   | 152 |
| 4.2.8.4. Određivanje propustljivosti gasova .....   | 152 |
| 4.2.8.5. Određivanje hermetičnosti vara .....   | 153 |
| 4.2.9. Statistička obrada rezultata .....   | 153 |
| 5. REZULTATI I DISKUSIJA .....  | 154 |
| 5.1. Prikaz rezultata preliminarog ogleđa .....   | 154 |
| 5.2. Rezultati određivanja vijabilnosti probiotskih bakterija u čokoladama .....                                  | 156 |
| 5.3. Rezultati ispitivanja osnovnog hemijskog sastava .....   | 170 |
| 5.4. Rezultati ocenjivanja senzornog kvaliteta .....  | 174 |
| 5.4.1. Rezultati instrumentalnog određivanja<br>karakteristika kvaliteta boje .....                               | 189 |
| 5.4.2. Rezultati određivanja termalnih svojstava primenom DSC .....   | 206 |
| 5.5. Rezultati određivanja sadržaja polifenolnih jedinjenja .....   | 218 |
| 5.6. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti .....   | 224 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.6.1. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti primenom FRAP i ABTS metoda .....                                  | 224 |
| 5.6.2. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti primenom polarografske metode (HPS) .....                          | 228 |
| 5.6.3. Rezultati određivanja indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) metodom DSC ..... | 235 |
| 5.6.4. Poređenje rezultata sadržaja polifenolnih jedinjenja i primenjenih metoda za određivanje AO aktivnosti .....        | 240 |
| 5.7. Rezultati određivanja reoloških karakteristika .....  | 241 |
| 5.8. Rezultati analiza ambalažnih materijala .....   | 254 |
| 5.8.1. Rezultati određivanja debljine ambalažnih materijala .....  | 254 |
| 5.8.2. Rezultati određivanja površinske mase ambalažnih materijala .....   | 254 |
| 5.8.3. Rezultati određivanja zatezne jačine i izduženje pri kidanju .....  | 255 |
| 5.8.4. Rezultati određivanja propustljivosti gasova ambalažnih materijala .....  | 256 |
| 5.8.5. Rezultati određivanja hermetičnosti vara .....  | 257 |
| 6. ZAKLJUČCI .....   | 258 |
| 7. LITERATURA .....  | 264 |
| PRILOG .....   | 286 |
| LISTA SKRAĆENICA .....   | 289 |
| SPISAK TABELA .....  | 292 |
| SPISAK SLIKA .....   | 294 |
| SPISAK GRAFIKA .....   | 295 |
| BIOGRAFIJA .....   | 298 |

## 1. UVOD

Čokolada – *kompleksana suspenzija* – je luksuzna namirnica koja prilikom konzumiranja podučuje čitav niz stimulanasa koji aktiviraju centre za zadovoljstvo u ljudskom mozgu, što je čini jednom od najomiljenijih prehrambenih proizvoda u svetu.

Mada se osnovne energetske potrebe organizma čokoladom mogu zadovoljiti relativno brzo, savremeni koncept ishrane nalaže upotrebu namirnica sa dodatom vrednošću, koje imaju terapijski ili preventivni značaj. Razvoj novih tehnologija omogućava izmenu sastava hrane na takav način da se njome ostvaruju dodatni benefiti po zdravlje ljudi. Takva *funkcionalna hrana* omogućava poboljšanje rada ciljanih fizioloških funkcija u organizmu čoveka.

Uloga probiotskog koncepta u promovisanju zdravlja, mada poznata još od davnina, tek u poslednje dve decenije doživljava svoju punu ekspanziju. Prema definiciji *FAO/WHO (2001)* probiotici su živi mikroorganizmi koji, primenjeni u adekvatnim količinama, ispoljavaju pozitivne efekte po zdravlje domaćina. Najčešće su to bakterije mlečne kiseline iz roda *Lactobacillus* spp., kao i neki sojevi *Bifidobacterium* spp. Dobrobiti koje donosi upotreba probiotika danas su valjano dokumentovane naučnim i kliničkim dokazima, među kojima se ističe poboljšanje zdravlja gastrointestinalnog sistema putem modulacije mikroflore, što može obezbediti zaštitu od čitavog niza poremećaja i bolesti probavnog trakta, uključujući različite vrste infekcija, upalnih procesa, pa čak i pojave kancera. Dodatni povoljni uticaji na zdravlje probiotika obuhvataju jačanje imunog sistema organizma, povećanje dostupnosti nutrijenata, antibakterijsku aktivnost, smanjenje nivoa holesterola u krvi, ublažavanje simptoma intolerancije na laktozu i reakcija izazvanih alergijama na pojedine vrste hrane.

Zahvaljujući navedenom područje primene probiotika se proširuje. Da bi ostvarile svoju terapijsku ulogu probiotske bakterije u proizvodu moraju biti zastupljene u odgovarajućem broju, odnosno održati neophodnu vijabilnost u okviru proizvodnje i roka održivosti, uključujući i period konzumiranja. U tom smislu, za postizanje potrebne vijabilnosti probiotika veoma je važan odabir odgovarajućih sojeva kao i njihova kompatibilnost sa sastavom i uslovima tokom proizvodnje određenog prehrambenog proizvoda.

Tradicionalni nosači bakterija mlečne kiseline su proizvodi od mleka. Međutim, za određeni, ne tako zanemarljivi deo populacije, upotreba proizvoda od mleka je limitirana, bilo zbog načina ishrane, tradicionalnih ili ekonomskih razloga, ili zbog intolerancije na laktozu, podizanja nivoa holesterola ili, pak, pojave alergije na mlečne proteine. Nadalje, ovi proizvodi se moraju čuvati na temperaturi hlađenja i odlikuju se relativno kratkim rokom održivosti. U tom kontekstu, razvoj novih ne-mlečnih namirnica koje bi sadržale probiotike, sve više dobija na važnosti. Alternativna strategija za povećanje efikasnosti dejstva probiotika bi bila upotreba prehrambenih matriksa koji prirodno sadrže visok nivo komponenata sa protektivnim svojstvima. Čokolada je jedna od namirnica koja ispunjava mnoge od ovih zahteva, za koju se pretpostavlja da bi mogla da bude znatno superiorniji sistem za intestinalnu dostavu probiotika. Nedavna istraživanja su pokazala da 80 % probiotika u čokoladi kao nosaču bezbedno prođe kroz želudac u poređenju sa samo 20 % kada su nosači fermentisani proizvodi od mleka (jogurt/kiselo mleko). To, takođe, znači da je za postizanje terapijskih efekata potrebna manja količina namirnice. Kakao-maslac iz čokolade obezbeđuje zaštitu probiotskim bakterijama, pa nije potrebno čuvanje u frižideru, a rok održivosti samog proizvoda daleko premašuje onaj kod proizvoda od mleka.

Međutim, inkorporiranje probiotika u hranu vezano je, pre svega, za ozbiljnu prepreku koja proističe iz same definicije probiotika: do probavnog trakta, mesta njihovog delovanja, probiotske bakterije moraju dospeti – žive i u dovoljnom broju. Njihovo preživljavanje povezano je sa brojnim faktorima: svojstvima izabranog probiotskog soja, okruženjem u koje se dodaju (karakteristikama ostalih sastojaka hrane, sadržajem vlage, temperaturom, kiseonikom, ...), digestivnim procesom (želudačnom kiselinom, žučnim solima), kao i sa mehaničkim stersom i nizom činilaca kojima su izloženi tokom proizvodnje hrane. Prevazilaženje ovih ograničenja zahteva implementaciju novog ili, pak, prilagođavanje postojećeg tehnološkog postupka, kako bi se omogućilo, ne samo preživljavanje uslova tokom proizvodnje, već i dovoljna održivost probiotskih bakterija tokom dugotrajnog skladištenja, što svakako predstavlja svojevrsan izazov.

Obogaćivanje različitih vrsta čokolada bakterijama mlečne kiseline sa probiotskim svojstvima doprinelo bi povoljnijem uticaju ovih proizvoda na zdravlje ljudi. Ovakav pristup je od izuzetne važnosti, posebno ukoliko se ima u vidu da se čokolada često konzumira među decom.



Potrebno je naglasiti da zbog jedinstvenog ukusa i specifične teksture, senzorna svojstva čokolada ne smeju biti promenjena niti na bilo koji način poremećena, uprkos dodatku probiotskih bakterija. Ovo s toga što senzorna svojstva čokolada predstavljaju jedan od najvažnijih parametara u definisanju njihovog ukupnog kvaliteta. Opšta, senzorna prihvatljivost od strane potrošača, predstavlja ključni faktor pri plasiranju novog proizvoda na tržište, pa tako, pored obogaćivanja probioticima, čokolade moraju zadržati privlačan izgled (boja, sjaj, oblik, površina), pravilan prelom, homogenu teksturu, postepenu topivost, svojstven miris i ukus i dobru održivost tokom skladištenja. Procesi rafinacije različitih vrsta čokolada se izvode tako da krajnja veličina čestica bude  $< 30 \mu\text{m}$ , jer prisustvo krupnijih čestica dovodi do pojave osećaja peskovitosti ili zrnivosti pri konzumiranju. Sa druge strane, ukoliko čokolade imaju povećani viskozitet javlja se pastoan osećaj u ustima koji se dugo zadržava. S tim u vezi, važno je očuvanje i reoloških karakteristika toka čokoladnih masa, jer pružaju informacije vezane za njihova senzorna svojstva.

U XXI veku čokolada se ne smatra samo “poslasticom za povlađivanje”, već je sve više priznata zbog visokog sadržaja polifenolnih komponanata sa antioksidativnim, antiradikalnim i antikancerogenim dejstvom, za koje se veruje da ispoljavaju važan doprinos u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, ublažavanju inflamatornih procesa i u funkcionisanju imunog sistema. Navedeno se posebno odnosi na crne čokolade, koje zbog većeg udela kakao-delova, poseduju više fenolnih komponenata u poređenju sa mlečnim, ali isto tako i u odnosu na druge namirnice poznate po sadržaju bioaktivnih materija, kao što su neke vrste voća, zeleni čaj ili crveno vino. Postizanje izraženih funkcionalnih svojstava čokolada koja ne potiču samo od probiotskih mikroorganizama, predstavlja dopunsku vrednost u kreiranju kategorije ovakvih proizvoda koji bi bio prihvatljiv širokom krugu potrošača. U tom svetlu od posebnog značaja je antioksidativni kapacitet čokolada, koji se može odrediti pomoću nekoliko metoda.

Opravdanost razvoja ovakve vrste proizvoda nalazi se u činjenici da na našem tržištu ne postoje čokolade sa probioticima i da nisu razvijene tehnološke linije za njihovu proizvodnju, koje bi se, uz odgovarajuće modifikacije sadašnjih tehnoloških postupaka, mogle osvojiti. Pored navedenog ne treba zanemariti ni podatke o potrošnji čokolada, koje prednjače u odnosu na ostale grupe konditorskih proizvoda, te se može očekivati da bi nova vrsta čokolada i te kako bila privlačna savremenom potrošaču koji vodi računa o svojoj ishrani.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. VRSTE I HEMIJSKI SASTAV ČOKOLADE

Čokolada predstavlja jedinstvenu namirnicu, koja se odlikuje time da je čvrsta na sobnoj temperaturi, ali se lako topi u ustima. To je zbog toga što je mast u čokoladi - kakao-maslac, uglavnom čvrst na temperaturama ispod 25°C, kada objedinjuje čvrste čestice šećera i kakaa, međutim, skoro potpuno tečan na telesnoj temperaturi čoveka, omogućavajući time česticama da protiču jedne mimo drugih, tako da čokolada postaje glatki fluid kada se zagreje u usnoj duplji. Osim toga, čokolada je slatkog ukusa, što je privlačno za većinu ljudi. U stvari, u samim začecima njene upotrebe, u doba dominacije civilizacija Maya i Asteka, čokolada je korišćena kao prilično oporo, masno piće, ne naročito prijatnog ukusa, a činjenica da je uopšte i razvijena do oblika u kojem je danas poznajemo, predstavlja jednu od misterija istorije.

Čokolada je složena, gusta suspenzija čvrstih čestica sa prosečnim udelom čvrste faze oko 60-70 % koju čine šećer, nemasne kakao-čestice i mleko (zavisno od vrste), a koje su dispergovane u kontinualnoj masnoj fazi sastavljenoj uglavnom od kakao-maslaca. Dve prisutne faze su uzajamno tako povezane da formiraju prostornu rešetku koja masu drži čvrsto na okupu.

Vrsta čokolade (mlečna čokolada, čokolada sa visokim sadržajem mleka, čokolada za jelo i kuvanje, i druge), određuje se na osnovu sirovinskog sastava i tehnološkog postupka proizvodnje (Gavrilović, 2003). Iako je Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za kakao-proizvode, čokoladne proizvode, proizvode slične čokoladnim i krem-proizvode ("Službeni list SCG", br.1/2005) definisan veliki broj vrsta čokolade, u prometu se najčešće izdvajaju tri najprisutnije vrste, a to su: crna, mlečna i bela čokolada, koje se razlikuju po sadržaju čvrstih nemasnih kakao-čestica, kakao-maslaca i mleka.

Uprkos različitom hemijskom sastavu, konzumiranje čokolade doprinosi zdravlju putem obezbeđivanja makronutrientata: ugljenih hidrata, masti i proteina, potrebnih za energetske i druge metaboličke funkcije organizma. U crnoj, mlečnoj i beloj čokoladi

osnovne grupe jedinjenja zastupljene su u različitim udelima čiji sastav navodi *Afoakwa (2008)*: crna čokolada (ugljeni hidrati: 63.5 %; masti: 28 %; proteini: 5 %); mlečna čokolada (ugljeni hidrati: 56.9 %; masti: 30.7 %; proteini: 7.7 %); bela čokolada (ugljeni hidrati: 58.3 %; masti: 30.9 %; proteini: 8 %).

Od *ugljenih hidrata* čokolade najvažnija je, pre svega, saharoza, ali i drugi ugljeni hidrati, kao i šećeri kakao-čestica: monosaharidi, disaharidi, skrob i sirova vlakna.

Saharoza je disaharid i sastoji se od  $\alpha$ -D-glukopiranoze i  $\beta$ -D-fruktofuranoze, povezanih glukozidnim vezama. Sadrži najmanje 99.7 % čiste saharoze i prateće sastojke: vodu, redukujuće šećere i mineralne materije (*Šušić i sar., 1995; Popov-Raljić, 2011*). Od posebnog značaja za primenu u tehnologiji konditorskih proizvoda je čistoća saharoze, kao i njena fizičko-hemijska svojstva. U pripremi za proizvodnju čokoladne mase konzumni rafinisani šećer se melje u prah (*Gavrilović, 2003*) zbog uticaja na svojstva proticanja (*Beckett, 2002*). Tokom procesa prerade, saharoza može preći u amorfno stanje, što se odražava, kako na svojstva toka čokoladne mase i ukus čokolade, tako i na sprečavanje pojave sivljenja zbog formiranja kompaktnije mikrostrukture od strane sitnih sfernih čestica amornog šećera (*Bricknell i Hartel, 1998; Svanberg i sar., 2011*).

Slično saharozi, i laktoza je disaharid, sastavljen od monosaharida glukoze i galaktoze. Laktoze ima u kravljem mleku pa je, prema tome, ima i u mlečnoj čokoladi. Ponekad se koristi u kristalnom obliku kao zamena dela saharoze, a u mleku u prahu dobijenom raspršivanjem nalazi se u amornom stanju. Pošto je mnogo manje slatka u odnosu na saharozu, smanjuje ukupnu slatkoću čokolade. Kao redukujući šećer, laktoza učestvuje u Maillard-ovim reakcijama kao i u procesima karamelizacije, koji doprinose formiranju bogatog, karamelizovanog, mlečnog ukusa tipičnog za mlečne čokolade (*Beckett, 2009*).

Od dijetalnih vlakana koja potiču iz kakao-zrna, u poslednje vreme aktuelno je ispitivanje sadržaja lignina kome se pripisuje pozitivan uticaj na smanjenje krvnog pritiska i holesterola u krvi (*Ashitani i Kamivaki, 2005*). Smatra se da kakao-ljuska može biti dobar izbor dijetalnih vlakana (38-44 %), uključujući i lignin. Osim toga, u njoj je detektovano i prisustvo supstanci sa kariostatskim svojstvima koje sprečavaju nastanak naslaga na zubima i pojavu kariesa (*Osawa i sar., 2001; Ferrazzano i sar., 2009*). Imajući u vidu benefite po zdravlje koji su povezani sa konzumiranjem dijetalnih vlakana i polifenola, prisustvo obe

bioaktivne komponente u kakao-zrnu sa ljuskom moglo bi privući interes za ovaj integralni proizvod kao potencijalni sastojak industrije funkcionalne hrane (*Lecumberri i sar., 2007*).

Kakao-maslac je karakteristična *mast* kakao-zrna, i čini osnovnu mast u čokoladi. Dobija se mehaničkim postupcima iz kakao-zrna ili delova kakao-zrna u hidrauličkim ili ekspeler presama, nakon čega se izlaže neutralizaciji i delimičnom ili potpunom uklanjanju boje. Iz kakao-zrna neodgovarajućeg kvaliteta, od slabih konzumnih sorti, kakao-maslac se dobija ekstrakcijom pomoću organskog rastvarača i, nakon rafinacije, koristi u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Mogućnost ekstrahovanja masti iz kakao-zrna razvijena je 1828. godine kada je holandski hemičar Coenraad Van Houten svojim izumom po prvi put omogućio odmašćivanje kakao-mase.

Kakao-maslac za proizvodnju čokolade je svetle, do tamno žute boje, specifičnog – svojstvenog mirisa i ukusa, sjajne površine, krtog preloma. Tačka topljenja kakao-maslaca je niža od telesne temperature čoveka i zato prilikom otapanja u ustima ne daje ukus loja, već se otapa uz vezivanje male količine toplote, ostavljajući utisak slabog hlađenja.

U kakao-maslacu dominiraju tri masne kiseline, koje čine preko 95 % od svih prisutnih kiselina. Skoro 35 % čini oleinska kiselina (C19:1), oko 34 % stearinska kiselina (C18:0), a oko 26 % je palmitinska kiselina (C16:0) (*Beckett, 2002*). Iako spada u zasićene masti, u seriji istraživanja o ljudskoj ishrani, pokazano je da visok sadržaj stearinske kiseline u kakao-maslacu iz čokolade ne utiče štetno na lipide krvne plazme (*Kris-Etherton i Mustad, 1994*). Stearinska kiselina se lošije apsorbuje od drugih masti i teži da bude izbačena iz organizma, a masti kakao-zrna imaju manju biodostupnost, te ispoljavaju neutralan uticaj na nivo lipida u krvi, odnosno ne dovode do povećanja sadržaja holesterola (*Cooper i sar., 2008a*).

Važna osobina kakao-masti je održivost, što je, isto tako, posledica sastava masnih kiselina, strukture triglicerida, ali i prisustva prirodnih antioksidanasa. Smatra se da je velika otpornost kakao-masti ka oksidaciji uzrokovana strukturom njegovih triglicerida, jer oko 80 % ukupnih triglicerida sadrži oleinsku kiselinu estarski vezanu u položaju 2. Od značaja je i podatak da trigliceridi kakao-masti sadrže esencijalnu linolnu masnu kiselinu. Lipidi kakao-masti sastoje se od fosfolipida i glikolipida. Od neosapunjivih materija prisutni su steroli, vitamini A i D,  $\beta$  i  $\gamma$  tokoferoli i fosfatidi. Bitni su i biljni pigmenti karotinoide od kojih

potiče boja masti, kao i aromatična jedinjenja: pirazini, tiazoli, oksazoli, piridini i masne kiseline kratkih lanaca koje daju ukus.

Kakao-maslac, osim energetske vrednosti, ima i visok stepen iskorišćenja u organizmu, lako je svarljiv i, u odnosu na druge masti, manje opterećuje organe za varenje (Gavrilović, 2003).

*Proteini* čokolade potiču od sastojaka kakao-čestica, a čine ih albumini, globulini, prolamini i glutenini. Oni mogu biti u makromolekularnim jedinjenjima sa polihidroksifenolima. Iako je prisustvo produkata hidrolize proteina nepoželjno, izvesna količina peptida i aminokiselina je potrebna zbog postizanja odgovarajućih senzornih svojstava čokolade, tj. arome (Goldoni, 2004).

Pored prethodno navedenih osnovnih sastojaka čokolade, važni su i ostali sastojci kakao-čestica kao što su: taninske i mineralne materije i karbonske kiseline.

Čokolada je značajan izvor antioksidanasa, prvenstveno polifenola, uključujući i flavaonoide kao što su epikatehin i katehin, a posebno procijanidina, za koje se smatra da obezbeđuju dodatne zdravstvene benefite. U mnogim istraživanjima polifenoli kakaa su označeni kao bioaktivne komponente sa antioksidativnim, antiradikalnim i antikancerogenim svojstvima (Ren i sar., 2003; Abbe Maleyki i Amin, 2008). Pokazalo se da oligomerni procijanidini izolovani iz kakaa poseduju biološka svojstva potencijalno važna za odbranu od oksidanasa i za imunitet (Kelishadi, 2005). Količina navedenih komponenata varira od sastava kakao-zrna, načina obrade, tehnološkog postupka i vrste čokolade. Tako većina crnih čokolada ima viši sadržaj polifenola u odnosu na mlečne (Steinberg i sar., 2003), dok u beloj čokoladi nema polifenola budući da ona ne sadrži kakao-čestice. Referentna količina čokolade koja se najčešće konzumira iznosi 40 g, čime se unosi 394 mg polifenolnih antioksidanasa sa mlečnom, odnosno 951 mg sa crnom čokoladom. Poređenja radi, crni čaj u prosečnoj količini konzumiranja od 240 ml sadrži 943 mg, a crveno vino 431 mg polifenolnih jedinjenja (Vinson i sar., 1999; Afoakwa, 2010).

Čokolada i slični proizvodi bogati su sadržajem još jedne grupe bioaktivnih komponenata sa fiziološkim delovanjem – metilksantinima, od kojih su najviše zastupljeni teobromin i kofein. Teobromin stimulatивно deluje na rad srca, te se široko koristi u izradi lekova za srčana obolenja. Teobromin je slabije topiv od kofeina tako da je njegovo delovanje na

rad srčanog mišića blaže (Gobec, 1965) i manje je stimulativan od kofeina, pa je potrebno duže vreme da dostigne maksimalni farmakološki efekt (Tarka, 1982). Količine navedenih alkaloida variraju u zavisnosti od vrste čokolade. Sadržaj teobromina u čokoladi sa 60 % kakao-mase iznosi oko 0.9 %, dok mlečna čokolada sadrži između 0.15 i 0.20 % teobromina (Gavrilović, 2003). Belščak i sar. (2009a) su u svojim istraživanjima utvrdili da su proizvodi sa višim sadržajem kakao-delova imali i veći udeo metilksantina. Tako je kod crnih čokolada sa 72 % kakao-delova nađeni sadržaj teobromina bio 9.5 mg/g, a kofeina 0.7 mg/g, dok je kod mlečnih čokolada pronađeno 1.86 mg/g teobromina i 0.15 mg/g kofeina, računato na masu obezmašćenog uzorka. Pozitivan sinergistički efekat i interakcija između flavonoida i metilksantina nisu još uvek dovoljno razjašnjeni i zahtevaju dalja proučavanja.

Mineralne materije prisutne u čokoladi u znatnim količinama su kalijum, fosfor, magnezijum i kalcijum, mada ima i cinka, natrijuma, bakra i gvožđa (tabela 1). Mnogi od ovih minerala su od vitalne važnosti za organizam, jer doprinose prevenciji hipertenzije i smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti (Appel i sar., 1997).

Karbonske kiseline određuju pH vrednost čokolade. Prisutne su limunska, mlečna, vinska i oksalna. Limunska kiselina utiče na svežinu čokolade (Gavrilović, 2003), a viši sadržaj ove kiseline ukazuje da je čokolada dobijena od plemenitih sorti kakaovca (Goldoni, 2004).

Tabela 1. Nutritivni sastav čokolade (Afoakwa, 2010)

| Sastojak                       | Crna čokolada | Mlečna čokolada |
|--------------------------------|---------------|-----------------|
| Energetska vrednost (kJ/100 g) | 2218          | 2168            |
| Proteini (g/100 g)             | 5             | 7               |
| Ugljeni hidrati (g/100 g)      | 55            | 57              |
| Masti (g/100 g)                | 32            | 33              |
| Kalcijum (mg/44 g)             | 14.1          | 84              |
| Magnezijum (mg/44 g)           | 90            | 26.4            |
| Gvožđe (mg/44 g)               | 1.4           | 0.6             |
| Bakar (mg/44 g)                | 0.3           | 0.2             |
| Fosfor (mg/44 g)               | 58.1          | 95              |
| Kalijum (mg/44 g)              | 160.6         | 169.4           |
| Natrijum (mg/44 g)             | 4.8           | 36.1            |
| Cink (mg/44 g)                 | 0.7           | 0.6             |

Osnovni sastojci čokolade (kakao–masa, kakao–maslac i šećer) mogu se uspešno kombinovati sa velikim brojem drugih prehrambenih sastojaka, čineći tako asortiman čokoladnih proizvoda jednim od najbogatijih. Još od kada je 1875. godine švajcarski hemičar Henri Nestle, po zamisli Daneila Petera, uspeo proizvesti prvu mlečnu čokoladu,

dodavši kondezovano mleko osnovnoj smeši, mleko je jedna od komponenata koja se najčešće kombinuje sa čokoladom i to u različitim oblicima (ugušćeno mleko, mleko u prahu, obrano mleko u prahu, supermasno mleko u prahu, maslac, slatka pavlaka, surutka u prahu) (Bolenz i sar., 2003).

Po hemijskom sastavu, *mleko* spada u najsloženije biološke tečnosti i sadrži nekoliko stotina različitih supstanci. Sastavu čokolade doprinosi prvenstveno sadržajem visokovrednih proteina (Gavrilović, 2003), svih grupa vitamina, kao i mlečne masti koja je kompatibilna sa kakao-maslacem (Pajin, 2004). Osim toga, mlečna mast predstavlja jedan od prekusora mlečno-kremaste arome karakteristične za mlečne čokolade, a zajedno sa svojim frakcijama visoke tačke topljenja priznati je inhibitor pojave sivljenja (Minifie, 1989; Torbica, 2003; Pajin, 2004).

U proizvodnji čokolade najčešće se upotrebljava mleko u prahu (Bolenz i sar., 2003). Izbor mleka u prahu je vrlo bitan budući da udeo slobodne mlečne masti, veličina čestica i volumen vakuola mleka u prahu utiče na tehnološke parametre proizvodnje čokolade, a posebno na njena fizičko-hemijska, reološka i senzorna svojstva (Liang i Hartel, 2004). Tradicionalno se najčešće koristilo punomasno mleko u prahu sušeno na valjcima, zbog velikog udela slobodne mlečne masti, no budući da je danas sušenje na valjcima zastareli postupak, sve više se pažnje usmerava na sušenje mleka u prahu raspršivanjem. Međutim, njegova primena predstavlja izazov jer zbog nižeg udela slobodne mlečne masti i prisustva vakuola ova vrsta mleka u prahu dovodi do promene nekih procesnih parametara, u prvom redu viskoziteta čokoladne mase (Belčak-Cvitanović i sar., 2009b). Sa druge strane, mleko dobijeno na raspršivaču zadržava svoju strukturu, bolje se raspoređuje, ima veću otpornost prema kvarenju i njegova proizvodnja je ekonomičnija (Gavrilović, 2003). Zbog svega navedenog, danas se čine napori da se u tehnologiji raspršivanja razviju nove metode sa ciljem postizanja većeg sadržaja slobodne mlečne masti (Attaie i sar., 2003; Franke i Heinzelmann, 2008). Obezbeđenje visokog nivoa kristalne laktoze u finalnom prahu predstavlja jedan od načina da se poveća sadržaj slobodne masti, zbog toga što kristali laktoze tokom nastajanja stvaraju mrežu finih pukotina na česticama mleka u prahu, čime se omogućava migracija masti iz unutrašnjosti čestice mleka na površinu (Koc i sar., 2003).

### 2.1.1. Kakao-maslac

Od kakao-zrna do gotove table – kakao-maslac je esencijalni sastojak čokolade.

Kakao-maslac je najznačajnija sirovina u čokoladi za koju se odavno zna da poseduje izrazito vredne sastojke. Struktura triglicerida kakao-maslaca daje mu specifična svojstva očvršćavanja i topljenja, bitna za tehnološki postupak proizvodnje (*Morgan, 1994*).

U čokoladi je kakao-maslac jedina ili dominantna masnoća, tako da njegova svojstva očvršćavanja i topljenja moraju udovoljiti svim zahtevima izrade i kvaliteta proizvoda jer utiču na izgled površine, boju, vreme očvršćavanja i održivost čokolade (*Goldoni, 2004*), kao i na teksturu i svojstva topljenja u ustima (*Torbica i sar., 2005*).

Kakao-maslac je na temperaturi ispod 27°C čvrsta i krta mast. Omekšava na temperaturi od 27-29°C (tačka omekšavanja ili mutnog topljenja), a potpuno je otopljen u intervalu od 33-35°C, odnosno 36°C (tačka bistrog topljenja) (*Gobec, 1965; Gavrilović, 2003*).

Razlog ovakog postepenog topljenja kakao-maslaca je njegov sastav. Kakao-maslac je sastavljen od mešovityh triglicerida sa različitim tačkama topljenja (*Gobec, 1965*). Ukupna količina triglicerida u kakao-maslacu iznosi od 97-99 %, od čega približno 80 % čine tri simetrična, međusobno slična triglicerida, sa oleinskom kiselinom vezanom u sredini, koji se često označavaju kao SOS trigliceridi, pri čemu S predstavlja bilo koju zasićenu masnu kiselinu. Posledica činjenice da je ova mast relativnog jednostavnog sastava i da sadrži samo nekoliko glavnih komponenti, je da se ona brzo topi u vrlo uskim temperaturnim granicama, koje su između sobne temperature i temperature u ustima.

Između 1 i 2 % kakao-maslaca je potpuno zasićeno (SSS, dugački lanci trizasićenih triglicerida, kod kojih je zasićena kiselina uglavnom palmitinska ili stearinska), i topi se na znatno višoj temperaturi nego obični trigliceridi SOS tipa. S druge strane, 5 – 20 % triglicerida kakao-maslaca sadrži po dve oleinske kiseline, uz nastajanje SOO tipa triglicerida, a poznato je da je ova kiselina tečna na sobnoj temperaturi. Kada se ovakva dva tipa triglicerida kombinuju, na način kako je to slučaj u kakao-maslacu, dobija se mast koja je na sobnoj temperaturi jednim delom tečna. Ukoliko je prisutna i mlečna mast, povećava se navedena proporcija i čokolada postaje mekša. Sa povišenjem temperature, ova mast se topi u zavisnosti od udela različiti tipovi triglicerida (*Beckett, 2002*).



#### 2.1.1.1. Kristalizacija

Iznad tačke topljenja neke masti molekuli se nalaze u stanju nasumičnog termalnog kretanja i stalno se udružuju i razdvajaju. Sa smanjenjem temperature molekuli teže da se grupišu. Kada tako formirana grupa molekula dostigne određenu veličinu sa kritičnim radijusom, molekuli su u stanju da oforme stabilno kristalizaciono jezgro tj. nukleus (*Sato, 2001*). Kritična vrednost radijusa zavisi od površinske energije i od slobodne energije prelaska tečnog u čvrsto stanje. U procesu formiranja jezgra postoje dve suprotne sile. Nukleacija je favorizovana pošto se pri udruživanju molekula energija oslobađa. Međutim, na dodirnoj površini tečno-čvrsto potreban je unos energije kako bi se savladao površinski napon. Stabilno jezgro se formira samo kada je toplota kristalizacije veća od površinskog napona (*Timms, 1995; citat: McGauley, 2001*).

Proces nukleacije masti je složen i indukuju ga nepravilnosti u otopljenom, tečnom stanju, kao što su npr. grube površine proizvodnih uređaja, čestice prašine i sl., koje smanjuju potrebnu slobodnu energiju (aktivacije). Sekundarna nukleacija nastupa onda kada su formirani kristali putem primarne nukleacije. Ona nastaje usled slamanja rastućih kristala u manja stabilna jezgra ili nukleuse. Ukoliko su ovi delovi kristala manji od kritične veličine, oni se ponovo otapaju. Kada pređu određenu veličinu, jezgra postaju aktivni rastući kristali. Kristali tada flokuliraju usled dejstva privlačnih Van der Waals-ovih sila. Za rast kristala je neophodno da kristališući molekuli difunduju iz tečne faze na površinu rastućeg kristala i nađu svoj put na samoj rešetci. Ovaj proces rezultuje istim emitovanjem latentne toplote kao i nukleacija (*Metin i Hartel, 2005*).

Faza rasta kristala je sporija od faze nukleacije uglavnom iz dva razloga:

- za rast kristala neophodna je organizacija strukture i stoga je potrebno dosta vremena da se molekuli triglicerida uklope u kristalnu rešetku u ispravnoj konfiguraciji na pravom mestu;
- za određeno mesto u kristalnoj rešetci molekulima triglicerida mogu da konkurišu i druge komponente, kao što su mono- ili digliceridi; ovakva kompeticija je dugotrajna i to je razlog što složene masti kristalizuju sporije od čistih komponenata (eutektički efekat) (*Metin i Hartel, 2005*).

Brzina rasta kristala proporcionalna je stepenu hlađenja a obrnuto proporcionalna viskozitetu, pošto je sa porastom viskoziteta tečne faze smanjena difuzija molekula. Kako se temperatura kristalizacije smanjuje, viskozitet se povećava, pa brzina rasta kristala doseže svoj maksimum, nakon čega opada sa nastavkom hlađenja (Timms, 1995; citat: McGauley, 2001).

Intenzivnije hlađenje rezultira bržom kristalizacijom ali sa manje nastalih kristala zbog toga što molekuli koji se iz tečne faze vezuju na kristalnu rešetku nemaju dovoljno vremena da budu optimalno uređeni pre nego što dođe do sledećih vezivanja. Usled toga dolazi do formiranja termodinamički nestabilne metafaze tj. manje stabilnog oblika. Kinetički gledano, nastajanje najmanje stabilnog oblika kristala je favorizovano zbog manje razlike u slobodnoj površinskoj energiji između tečne faze i površine nestabilnog kristala (Le Reverend i sar., 2011).

Pri umerenijim brzinama hlađenja veća je verovatnoća inkorporiranja novih molekula u optimalnoj konfiguraciji u kristalnu rešetku, zbog toga što molekuli imaju više vremena da se orijentišu pravilno (Timms, 1995; citat: McGauley, 2001). Kao rezultat toga mast kristališe u stabilnijim polimorfnim oblicima. Kako se nastavlja rast kristala, dolazi do zasićenosti, što uzrokuje povećanje njihove kritične veličine. Zbog toga nastaje rast većih kristala na račun manjih.

Kada se između čvrste i tečne faze postigne ravnoteža, rast kristala prestaje, što označava kraj kristalizacije (Le Reverend, 2009).

Međutim, u složenom sistemu kakav je kakao-maslac, kristalizacija nikada ne mora biti potpuna, zbog toga što se stalno dešavaju rearanžiranja molekula i ne dostiže se termodinamička ravnoteža.

Tokom vremena sastav kristala se može menjati uz nastajanje čistijih kristala. Nestabilni polimorfi prelaze u stabilnije pri čemu do transformacije može doći bilo preko čvrste ili tečne faze. Tranzicija preko čvrste faze je funkcija vremena i, posebno, temperature. Prelaz preko tečne faze uključuje otapanje manje stabilnih kristala, nukleaciju i rast stabilnijih oblika uz tranfser mase u tečnom stanju usled topljenja najlabilnije forme. Ovaj način tranzicije odvija se brže u odnosu na polimorfnu transformaciju u čvrstoj fazi (McGauley, 2001).

### 2.1.1.2. Polimorfizam

Sastav i struktura triglicerida određuju specifična kristalizaciona svojstva kakao-maslaca - polimorfizam monotrofnog tipa.

Postojanje dva ili više kristalnih oblika u istoj materiji, ili *polimorfizam*, poznato je još od 1820. godine. Jedan od indikatora prisustva različitih polimorfničkih oblika je postojanje više tački topljenja iste masti, što je primećeno 1849. godine. Ove pojave proučavane su više od jednog veka, a do potpunijih saznanja došlo se primenom difrakcije pomoću X-zraka (XRD) i infracrvene spektroskopije. U savremenim uslovima, za proučavanje kristalne strukture kakao-maslaca, uspešno se kombinuju i druge tehnike, među kojima su i nuklearna magnetna rezonanca, diferencijalna termalna analiza (DTA), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), kao i mikroskopija (*Narine i Marangoni, 1999; McGauley, 2001*).

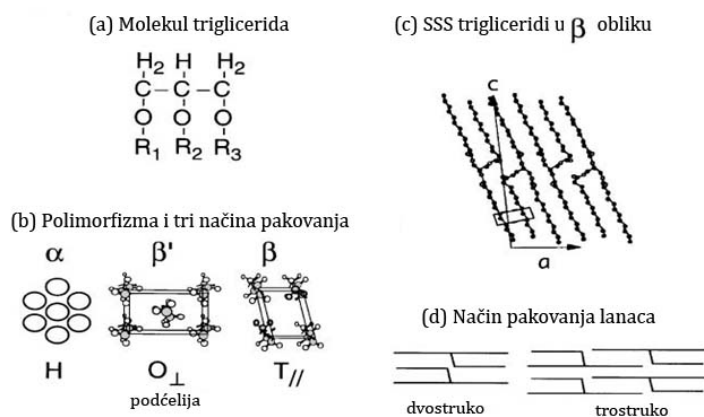
Poznata su dva modela polimorfničkih kristalizacionih procesa u trigliceridima: jednostavno hlađenje i kristalizacija posrednim topljenjem. U prvom slučaju se tečni trigliceridi brzo hlade do temperatura kristalizacije, dok je u drugom modelu kristalizacija stabilnijih formi indukovana brzim otapanjem manje stabilnih oblika (*Ueno i sar., 1999*).

Polimorfne forme triglicerida se razlikuju po rastojanju između lanaca masnih kiselina, uglu nagiba u odnosu na horizontalnu ravan i načina na koji se pakuju pri kristalizaciji.

Polimorfizam nastaje zbog mogućnosti različitih pakovanja ugljovodoničnih lanaca. Način pakovanja ugljovodoničnih lanaca se može objasniti podćelijskim konceptom. Naime, kada dođe do kristalizacije masti, molekuli triglicerida usvajaju određenu konformaciju i određeni raspored prilikom pakovanja kako bi optimizovali unutrašnje i spoljašnje interakcije i postigli što efikasnije pakovanje. Najmanja gradivna jedinica kristala naziva se jedinična ćelija a ponavljanje ove ćelije u tri aksijalna pravca dovodi do rasta kristala. Sa druge strane, podćelija je manja jedinica koja se ponavlja u okviru jedinične ćelije. Potrebno je samo sedam različitih podćelija da bi nastale sve moguće strukture kristala. U literaturi se pominju tri načina pakovanja triglicerida: heksagonalno-šestougao ( $\alpha$ ), ortorombičko-normalno ( $\beta'$ ) i trikličničko-paralelno ( $\beta$ ) (*Aronbime i sar., 1988; Guth i sar., 1989; McGauley, 2001*) (slika 1 (b)).

Trigliceridi se takođe odlikuju i razlikama u nagibu ugljenohidratnih molekula. Ovo je fenomen poznat kao *politipizam*, a kao rezultat toga postoji više od jedne forme svakog polimorfa, što za posledicu ima da se u okviru grupe sa istim podćelijama mogu javiti različite tačke topljenja.

Smatra se da se trigliceridi dugih lanaca pakuju uporedo, jedni pored drugih, formirajući zasebne slojeve. Pri tome molekuli triglicerida formiraju konformaciju stolice, i pri kristalizaciji, pakuju se u parovima, antiparalelno, po sistemu “glava-na-rep”, pri čemu su moguće dve vrste strukture: dvoslojna – koja se formira kada su masne kiseline slične hemijske strukture i troslojna, koja nastaje kada je jedna od masnih kiselina znatno različite strukture od drugih ili ima drugačiju dužinu lanca (slika 1 (d)). Tokom polimorfne transformacije dvoslojna struktura može preći u troslojnu, a u nekim slučajevima se dešava i obrnut proces. Dvoslojna i troslojna struktura se označavaju brojevima -2 i -3 koji stoje uz oznaku odgovarajućeg polimorfa. Budući da ovakvo obeležavanje može biti konfuzno, treba voditi računa da se razlikuju, na primer  $\beta_2$  i  $\beta$ -2 jer predstavljaju dve različite stvari: prva oznaka se odnosi na manje stabilnu od dve  $\beta$  polimorfne kristalne modifikacije kakao-masti, dok druga označava bilo koju  $\beta$  modifikaciju sa dvoslojnom strukturom (Sato, 2001; McGauley, 2001; Beckett, 2009)(slike 1 i 2).

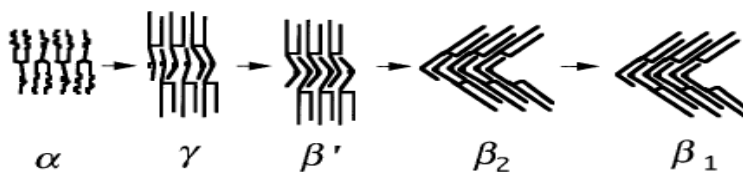


Slika 1. Prikaz molekula triglicerida (a), polimorfizma i tri načina pakovanja triglicerida (b), jedinične strukture SSS triglicerida u  $\beta$  obliku (c) načina pakovanja lanaca (d) (Sato, 2001)

Iako je kristalizacija kakao-maslaca bila predmet istraživanja tokom dugog niza godina, još uvek ne postoji uniformna nomenklatura za različite kristalne oblike koji se formiraju. Šta više, i samo postojanje određenih polimorfne oblike je i dalje predmet debate među naučnicima.

Trenutno je možda najispravnije smatrati da kakao-maslac može očvrnuti u više različitih kristalnih oblika, pri čemu se pet prepoznatljivih polimorfnih oblika mogu razlikovati, šesti je pod sumnjom, a četiri oblika su osnovana (Goldoni, 2004).

Konditorska industrija tradicionalno prihvata postojanje šest polimorfnih oblika u kakao-maslacu definisanih prema modelu Wille-a i Lutton-a 1966. godine, po kome se polimorfi obeležavaju rimskim brojevima od I do VI po redosledu rastuće stabilnosti. U industriji ulja i masti, konvencionalno se za definisanje polimorfnih oblika upotrebljavaju grčka slova  $\gamma$ ,  $\alpha$  i  $\beta$ , predložena od strane Larsson-a iste godine. Kristalni oblik  $\beta$  je, pri tome, podeljen na  $\beta'$  i  $\beta$  oblike ( $\beta_1'$  i  $\beta_2'$ , odnosno  $\beta_1$  i  $\beta_2$ ) (Beckett, 2002; Schenk i Peschar, 2004; Beckett, 2009).



Slika 2. Kristalne forme kakao-maslaca (Sato, 2001)

Svaka od polimorfnih kristalnih modifikacija kakao-maslaca odlikuje se različitim fizičkim karakteristikama, kao što su interval otapanja i relativna stabilnost. Polimorfne transformacije mogu prelaziti jedna u drugu, i to iz manje stabilnog u više stabilan oblik. Taj prelaz nastaje u određenim temperaturnim intervalima, i ireverzibilan je za dati interval (Schenk i Peschar, 2004).

Pored navedenog, kristalne modifikacije razlikuju se međusobno i po obliku i volumenu kristala, kao i po brzini prelaska u naredni oblik.

I ili  $\gamma$ -oblik (pod  $\alpha$ -oblik) nastaje vrlo brzim hlađenjem tečne čokoladne mase; to je amorfna gusta masa koja zauzima najveću zapreminu; ovaj oblik je daleko najnestabilniji od svih prisutnih (Van Malsen i sar., 1999) i veoma brzo (za oko 60 sekundi) prelazi u  $\alpha$ -oblik (Goldoni, 2004);

II ili  $\alpha$ -oblik se javlja i kod niskih temperatura hlađenja, nastaje iz  $\gamma$ -oblika, ima krupne i zrakaste kristale, stabilniji je od  $\gamma$ -oblika, ali nedovoljno stabilan da bi se sprečio njegov prelazak u  $\beta'$ -oblik nakon, približno, sat vremena (Van Malsen i sar., 1999; Goldoni, 2004);

III i IV, odnosno  $\beta'$ -oblik ( $\beta_1'$  i  $\beta_2'$ ) može nastati iz  $\alpha$ -oblika ili direktnim

očvršćavanje čokoladne mase na temperaturama između tačke topljenja  $\gamma$ - i  $\alpha$ -oblika; stabilniji je od  $\alpha$ -oblika i prelazi u  $\beta$ -oblik posle dužeg vremenskog perioda od više nedelja (Goldoni, 2004); ovaj tip polimorfa odlikuje se veoma sitnim ( $\sim 1\mu\text{m}$ ), igličastim kristalima (Narine i Marangoni, 1999);

V,  $\beta$  oblik (ili  $\beta_2$ ) nastaje iz  $\beta'$ -oblika ili direktnim očvršćavanjem čokoladne mase na temperaturi iznad navedene za  $\alpha$ -oblik; može prelaziti u druge oblike samo otapanjem; ovaj kristalni oblik je trajno stabilan i nastaje uz najveći stepen kontrakcije zapremine (Goldoni, 2004);

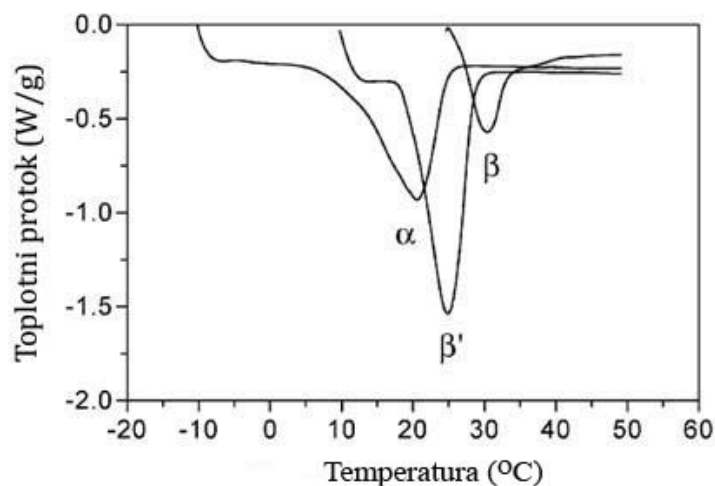
VI,  $\beta$  -oblik (ili  $\beta_1$ ), kakao-maslaca, nastaje veoma sporo i pojavljuje se na površini čokolade nakon dugotrajnog skladištenja (Gavrilović, 2003).

U proizvodnji čokolade optimalnim se smatra kakao-maslac u formi  $\beta$  (V) (ili  $\beta_2$ ) jer daje čokoladi sjajnu površinu, čist prelom i, kao posledica više tačke topljenja, omogućava topljenje čokolade u ustima, a ne u ruci (Svenstrup i sar., 2005). Pored toga, smatra se da navedeni kristalni oblik kakao-masti ima sposobnost da „zarobi“ tečnu mast u svojoj kristalnoj rešetki, čime obstruira migraciju tečnih triglicerida na površinu (Dibildox-Alvarado i sar., 2004).

Međutim, prema nekim autorima (Van Malsen i sar., 1996; Loisel i sar., 1998; Beckett, 2009) oblik III u stvari, odgovara mešavini oblika II i IV i ne predstavlja posebnu kristalnu formu. Takođe, zbog velike brzine transformacije u naredni polimorf, oblik I ( $\gamma$ ) se smatra podoblikom forme  $\alpha$ , a oblik VI može nastati zbog fazne separacije, drugim rečima, ne predstavlja zaseban polimorf, već je identična obliku V samo bez tečne trigliceridne frakcije (McGauley, 2001).

Van Malsen i sar. (1996; 1999), kao i Marangoni i McGauley (2003) opsežno su se bavili proučavanjem kristalnih oblika i faznih transformacija u kakao-maslacu, služeći se pri tome DSC i XRD kao korisnim tehnikama za istraživanje čvrsto-čvrsto i tečno-čvrsto-tečno faznih prelaza (slika 3). Za razliku od podataka prisutnih u literaturi koji podržavaju tradicionalno shvatanje polimorfizma kakao-masti, ova grupa autora negira postojanje samo dva  $\beta'$  oblika (III i IV), već naglašava da se navedeni oblik javlja u vidu opsega formi, sugerišući time postojanje pet polimorfnih oblika (ukoliko se ceo opseg tretira kao jedan oblik) ili mnogo više različitih oblika (ukoliko se polimorfne forme u okviru opsega

posmatraju pojedinačno). Nadalje, navodi se da polimorfi  $\gamma$ ,  $\alpha$  i  $\beta'$  mogu kristalirati direktno iz otopljenog maslaca, a nastajanje oblika  $\beta'$  transformacijom preko  $\alpha$  forme je mnogo brže nego direktno iz istopljene kakao-masti. Sa druge strane, dva  $\beta$  oblika, mogu da nastanu samo faznom transformacijom preko  $\beta'$  oblika.



Slika 3. Karakteristični profil topljenja različitih polimorfni oblika kakao-maslaca dobijen pomoću DCS (Marangoni i McGauley, 2003)

Veliki broj autora u svojim radovima navodi četiri osnovna kristalna oblika u kojima kakao-maslac može da kristališe:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta'$  i  $\beta$  (Gobec, 1965; Ueno i sar., 1999; Van Malsen i sar., 1999; Gavrilović, 2003; Brunello i sar., 2003; Tobica, 2003; Goldoni, 2004; Schenk i Peschar, 2004; Pajin, 2004; Svenstrup i sar., 2005). Schlichter-Arnheim i sar. (1988) navode postojanje samo tri oblika kristala kakao-maslaca. Postoji, međutim, mogućnost da neki od istraživača nisu primetili određene forme kristala zbog toga što uzorci nisu bili temperirani kako bi se oformio određeni oblik ili je korišćen samo jedan uzorak kakao-masti (McGauley, 2001).

Pregled kristalnih oblika kakao-maslaca nađenih od strane različitih grupa istraživača, njihova nomenklatura zajedno sa tačkama topljenja i pakovanjem triglicerida prikazan je u tabeli 2.

Smatra se da utvrđivanje različitih polimorfni formi kakao-maslaca predstavlja jedno od najkontroverznijih područja nauke o konditorskim proizvodima koje svakako, zahteva dalja istraživanja.

Tabela 2. Pregled polimorfnih oblik kakao-maslaca, njihovih tačaka topljenja (°C) i struktura pakovanja triglicerida

| A u t o r i     |                 |                |                             |                   |                             |                              |                             |                             |                             |                                |                          |                                | Struktura/<br>Pakovanje |
|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Vaeck<br>(1951) | Vaeck<br>(1960) | Duck<br>(1964) | Wille i<br>Lutton<br>(1966) | Larsson<br>(1966) | Chapman<br>i sar.<br>(1971) | Lovegren<br>i sar.<br>(1976) | Merken i<br>Vaeck<br>(1980) | Hicklin<br>i sar.<br>(1985) | Davis i<br>Dimick<br>(1986) | Dimick i<br>Manninig<br>(1987) | Windhab i Zeng<br>(1998) | Van Malsen<br>i sar.<br>(1999) |                         |
| $\gamma$ 18.0   | $\gamma$ 17.0   | $\gamma$ 18.0  | I 17.3                      | $\beta_2$         | I                           | VI 13.0                      | $\gamma$ 16-18              | I 17.9                      | I 13.1                      | 13.1-17.6                      | $\gamma$ 13.0-18.0       | $\gamma$ /pod $\alpha$ -5 - +5 | dvoslojna               |
| $\alpha$ 23.5   | $\alpha$ 21-24  | $\alpha$ 23.5  | II 23.3                     | $\alpha$          | II                          | V 20.0                       | $\alpha$ 20.7-24.2          | II 24.4                     | II 17.1                     | 17.6-19.9                      | $\alpha$ 18.0-22.5       | $\alpha$ 17-22                 | dvoslojna               |
|                 |                 |                | III 25.5                    | mešavina          | III                         | IV 23.0                      |                             | III 27.7                    | III 22.4                    | 22.4-24.5                      | III 22.5-27.0            | $\beta'$ opseg 20-27           | dvoslojna               |
| $\beta''$ 28.0  | $\beta'$ 28.0   | $\beta''$ 28.0 | IV 27.5                     | $\beta_1$         | IV 25.0                     | III 25.0                     | $\beta'$ 26-28              | IV 28.4                     | IV 26.4                     | 26.4-27.9                      | $\beta_{IV}$ 27.0-29.0   |                                | dvoslojna               |
| $\beta$ 34.5    | $\beta$ 34-35   | $\beta'$ 33.0  | V 33.8                      | $\beta_2$         | V 30.8                      | II 30.0                      | $\beta$ 33.7-34.9           | V 33.0                      | V 30.7                      | 30.7-34.4                      | $\beta_V$ 29.0-33.5      | $\beta^V$ 29-34                | troslojna               |
|                 |                 | $\beta$ 34.4   | VI 36.3                     | $\beta_1$         | VI 32.2                     | I 33.5                       |                             | VI 34.6                     | VI 33.8                     | 33.8-34.1                      | $\beta_{VI}$ 33.5-37.5   | $\beta^{VI}$                   | troslojna               |

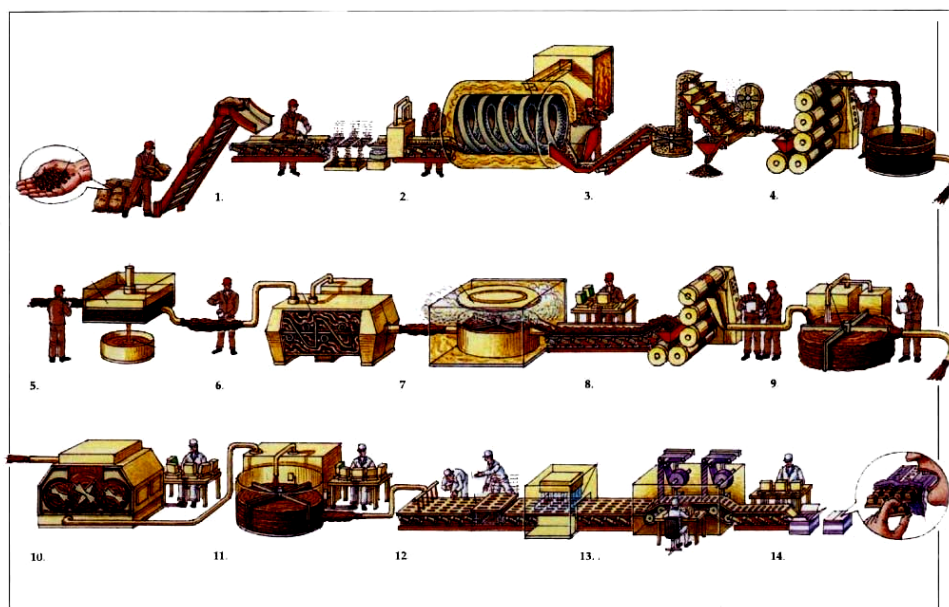


## 2.2. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE ČOKOLADE

Čokolada poseduje dve značajne senzorne karakteristike po kojima se izdvaja od drugih namirnica: to su ukus i tekstura. Iako postoji mnogo različitih ukusa čokolade, svaki od njih mora biti bez nepoželjnih nota i sadržati one prijatne, koje će potrošači povezivati sa proizvodom. Primarna odlika teksture jeste da čokolada mora biti čvrsta na sobnoj temperaturi (20-25°C), a da se ipak brzo topi u usnoj duplji na 37°C, stvarajući glatki fluid na receptorima jezika. Proces proizvodnje čokolade ima za cilj dobijanje navedenih karakteristika, te je zbog toga, okrenut ka razvijanju ukusa proizvoda od sirovih kakao-zrna i tretiranju istih, kako bi se dobila čokoladna masa sa dobrim svojstvima proticanja bez prisustva većih, grubih čestica (Beckett, 2009).

Tehnološki postupci proizvodnje čokolade u svetu se razlikuju pre svega zbog variranja u preferencama potrošača u pojedinim zemljama, kao i usled razlika u proizvođačkoj praksi (Afoakwa, 2010).

Postoji mnogo različitih postupaka proizvodnje čokolade, a oni tradicionalni bazirani su na operacijama prikazanim na slici 4.



Slika 4. Šema tehnološkog postupka proizvodnje čokolade:

1. Čišćenje kakaovih zrna; 2. Termička obrada; 3. Drobljenje (odvajanje jezgra i ljuske); 4. Mlevenje → kakaomasa; 5. Presovanje (odvajanje kakaomaslaca); 6. Mešanje kakaomase sa šećerom i /ili mlekom u prahu;
7. Isparavanje vlage; 8. Usitnjavanje (petovaljak); 9. Dodavanje arome i mešanje; 10. Končiranje;
11. Temperiranje; 12. Izlivanje u kalupe, hlađenje; 13. Pakovanje; 14. Distribucija

Da bi se mogao zvati čokoladom, neophodno je da proizvod sadrži odgovarajuću količinu kakaa. Kakao ili kakao-zrno predstavlja plod kakao-drвета koje vodi poreklo iz topskih šuma Amazona i Orinoka u Južnoj Americi. Drevni narodi američkog kontinenta su ga raširili sve do Centralne Amerike, a dolaskom španskih osvajača, kakao dospeva i u ostale tropske krajeve širom sveta. Danas se komercijalno uzgaja područjima između 20° severno i južno od ekvatora, pri čemu se izdvajaju tri glavna regiona gajenja: Zapadna Afrika, Severoistočna Azija i Južna Amerika.

Švedski naučnik Carl Von Linne dao je botaničko ime kakao-drvetu - *Theobroma cacao* L. Naziv potiče od grčke reči „*theobroma*“ (Teos-Bog i bromo-hrana) i više je nego adekvatan, ako se ima u vidu rasprostranjena uporeba i veliko poštovanje koje čokolada, najpoznatiji proizvod od kakaa, uživa već decenijama.

U plodu kakao-drвета nalazi se od 20 do 50 ljuskom pokrivenih kakao-zrna. Plod se nakon branja raseče po dužini na dve polovine a zrna se pažljivo vade zajedno sa pulpom koja ih okružuje i ostavljaju da fermentišu na gomilama ili u drvrnim kutijama (Gavrilović, 2003).

Tokom fermentacije koja podrazumeva intenzivne enzimske i mikrobiološke aktivnosti u periodu od 5 do 7 dana, dešavaju se brojne hemijske i biohemijske promene, a pre svega dolazi do promene boje zbog reakcija polifenola sa proteinima i peptidima, kao i do razvoja prekusora kakao-arome u kojem učestvuju polifenolna jedinjenja, slobodne amino- i druge kiseline, šećeri i alkaloidi. Takođe se uništava biološka aktivnost klice, dolazi do hidrioloze srži kakao-ploda, te smanjenja gorčine. Nakon završene fermentacije kakao-zrna se suše na suncu ili u sušarama, uz smanjenje sadržaja vlage sa oko 60 % na ispod 8 %, čime se ograničava razvoj plesni tokom skladištenja kakao-zrna ili transportovanja do mesta dalje prerade (Gavrilović, 2003; Schwan i Wheals, 2004; Afoakwa, 2010).

Pre obrade kakao-zrna prolaze kroz procese čišćenja, sortiranja i termičkog tretiranja. Stepem termičke obrade (sušenje ili pečenje) zavisi od kvaliteta upotrebljene sirovine i svojstava kakao-mase koja se žele postići. Pod dejstvom toplote formira se kakao-boja i kakao-aroma zahvaljujući, uglavnom, brojnim reakcijama sa monosaharidima, isparava vlaga iz zrna, kao i deo lako isparljivih kiselina i jedinjenja koja doprinose kiselosti i gorčini, dešava se degradacija aminokiselina i delimična denaturacija proteina, a broj mikroorganizama prisutan u zrnu se značajno smanjuje (Afoakwa, 2010). Tokom pečenja nastaju aldehidi, ketoni, alkoholi i estri (Camu i sar., 2008). Jedinjenja koja podležu samo

manjim promenama su kakao-maslac, polifenoli i alkaloidi (Minifie, 1989). Važna zadatak tokom ovog postupka jeste da se obezbedi odvajanje kotiledonskih listića od ljuske unutar zrna kako bi se ona mogla potpuno ukloniti u fazi drobljenja, čime se olakšava i izdvajanje kakao-maslaca (Gavrilović, 2003; Goldoni, 2004).

Nakon termičke obarde kakao-zrna izdvaja se kakao-jezgro, koje se dalje drobi u kakao-lom, uz uklanjanje kakao-klice i kakao-ljuske. Kakao-lom se potom postepeno sitni radi dobijanja kakao-mase (Gavrilović, 2003). Kako-jezgro ima ćelijsku strukturu sa oko 55 % kakao-maslaca u čvrstom stanju zarobljenog unutar ćelija. Pri sitnjenju ćelije kakao-jezgra se razaraju i propuštaju kakao-maslac, koji se, zbog toplote trenja topi i difunduje na površinu usitnjenih kakao-čestica. Kakao-masa, predstavlja stabilnu suspenziju usitnjenog ćelijskog tkiva kakao-jezgra u kakao-maslacu koji ispunjava sve njegove međuprostore (Gavrilović, 2003; Goldoni, 2004; Afoakwa, 2010).

Presovanjem kakao-loma ili kakao-mase izdvaja se kakao-maslac a zaostala kakao-pogača se finim mlevenjem prerađuje u kakao-prah.

Kakao-masa se nadalje izlaže oplemenjivanju arome i alkalizaciji i služi kao osnovni poluproizvod za dobijanje čokoladne mase, odnosno čokolade, kao i ostalih kakao-proizvoda.

Tehnološki postupak proizvodnje čokolade sastoji se od niza proizvodnih operacija od kojih su najvažnije: mešanje, rafinacija, končiranje, temperiranje, oblikovanje, hlađenje i pakovanje.

### 2.2.1. Mešanje

Sirovine za proizvodnju čokoladne mase su kakao-masa, šećer u prahu, kakao-maslac, emulgatori, arome i, u zavisnosti od vrste čokolade, mleko u prahu. Posle pripreme sirovina, čokoladna masa se sastavlja u melanžeru mešanjem čvrstih i tečnih sastojaka, pri čemu se dodaje celokupna količina šećera u prahu i kakao-masa, a samo deo ukupnih iznosa lecitina i kakao-maslaca, dok se ostatak dodaje postepeno tokom procesa. Režimi sastavljanja čokoladne mase zavise od njenog sirovinskog sastava i vrste uređaja, a u literaturi se pominje vreme mešanja od 10-20 minuta na 35°C (Gobec, 1965; Minifie, 1989), ili karće : od 12-15 minuta na 40-50°C (Afoakwa, 2010).

### 2.2.2. Rafinacija

Postupak rafinacije podrazumeva sitnjenje čokoladne mase na uređaju koji se naziva petovaljak, a čine ga pet šupljih, čeličnih cilindara vertikalno poređanih jedan iznad drugog, na kojima se obavlja sitnjenje čokoladne mase.

Cilj ove faze prerade jeste dobijanje proizvoda sa konačnom raspodelom čestica po veličini, u intervalu od 6 do 25  $\mu\text{m}$ . Finalna veličina čestica presudno utiče na reološka svojstva i senzorne osobine čokolade, jer obezbeđuje odgovarajući viskozitet čokoladnoj masi u narednim fazama obrade, a sprečava pojavu peskovitosti. Osim toga, tokom usitnjavanja deo saharoze prelazi u amorfno stanje u kome apsorbuje, sem vlage, i aromatične materije iz čokoladne mase, postajući, na taj način, jedan od nosilaca arome čokolade (Gavrilović, 2003; Afoakwa, 2010).

### 2.2.3. Končiranje

Končiranjem čokoladne mase, tokom koga se ona izlaže dugotrajnom intenzivnom mešanju uz dejstvo toplote i vazduha, dolazi do njenog oplemenjivanja, formiranja konačnog sirovinskog sastava, fizičko-hemijskih osobina, reoloških i senzornih svojstava. Menjaju se vlažnost, kiselost, gorčina, čvrstoća, površinski sjaj, snižava se temperatura topljenja čokolade, a razvija se svojstvena, prijatna aroma i fina homogenost strukture (Gavrilović, 2003).

Naziv postupka potiče od španske reči „concha“ (konča), u prevodu školjka, a podseća na kamen za mlevenje oblika školjke na kojem su drevni Asteci trljali i usitnjavali kakao-zrno. Švajcarac Lindt prvi je uočio da dugotrajno mešanje čokoladne mase povoljno utiče na topivost i poboljšanje arome čokolade. Godine 1879. konstruisao je po svojoj zamisli uređaj za obradu čokoladne mase – konču, po kojoj je i postupak dobio ime.

Proces končiranja se izvodi u cilju:

- isparavanja vode i nepoželjnih lako isparljivih jedinjenja;
- formiranja željene arome finalnog proizvoda što se postiže kontrolom

- temperature tokom procesa, kao i dejstvom kiseonika iz vazduha koji dovode do termičkih i oksidativnih promena pojedinih sastojaka čokoladne mase;
- postizanja konačnog viskoziteta i svojstava plastičnog proticanja čokoladne mase, dodavanjem preostalih količina kakao-maslaca i emulgatora pred kraj procesa;
  - obavijanja svih čvrstih čestica kakao-maslacem, radi dobijanja homogene suspenzije čvrste i masne faze uz primenu dva tipa mešanja (smicajnog mešanja - trenjem čestica između dve površine i produženog mešanja – istiskivanjem mase kroz ili razmazivanjem preko određene površine);
  - obezbeđivanja optimalne čvrstoće i topivosti čokolade sa kakao-maslacem kao nosiocem strukture (Gavrilović, 2003; Beckett, 2009).

Postoje tri faze procesa končiranja, mada je njihova primena uslovljena zadatom recepturom i vrstom konče.

Suva faza: vlaga i nepoželjne, isparljive komponente se uklanjaju postepenim povećanjem temperature, čokoladna masa postaje suva i mrvljiva, usled gnječenja i smicanja razvija se toplota trenja pa masa postaje više glatka, čvrste čestice se ubrzano prevlače slojem kakao-maslaca posle čega čokoladna masa prelazi u pastozni oblik.

Pastozna faza: čokoladna masa je u obliku guste paste, iziskuje intenzivan rad konče i održavanje stalne temperature, čime se pospešuje razvoj arome i poboljšavaju svojstva proticanja čokoladne mase.

Tečna faza: pri velikim brzinama mešanja uz dodatak preostalih porcija masti i emulgatora postiže se dalje smanjenje viskoziteta, konačna homogenizacije mase i njen prelazak u tečno stanje (Goldoni, 2004; Beckett, 2009).

Vreme trajanja i temperature tokom končiranja variraju: kod mlečne čokolade sa punomasnim mlekom u prahu končiranje traje od 16-24 sata pri temperaturama do 60°C, dok kod crnih čokolada temperature mogu ići do 70°C, pa i do 80°C. U savremenim uslovima proizvodnje nastoji se da se vreme trajanja končiranja skрати. Ukoliko se kod proizvodnje mlečne čokolade punomasno mleko u prahu zameni obranim mlekom ili

puterom, mogu se primeniti i temperature do 70°C (Afoakwa, 2010). Međutim, neki autori ne preporučuju končiranje mlečnih čokolada na temperaturama preko 52°C, dok za određene vrste crnih čokolada dozvoljavaju primenu i vrlo visokih temperatura (90°C)(Goldoni, 2004).

#### 2.2.4. Temperiranje

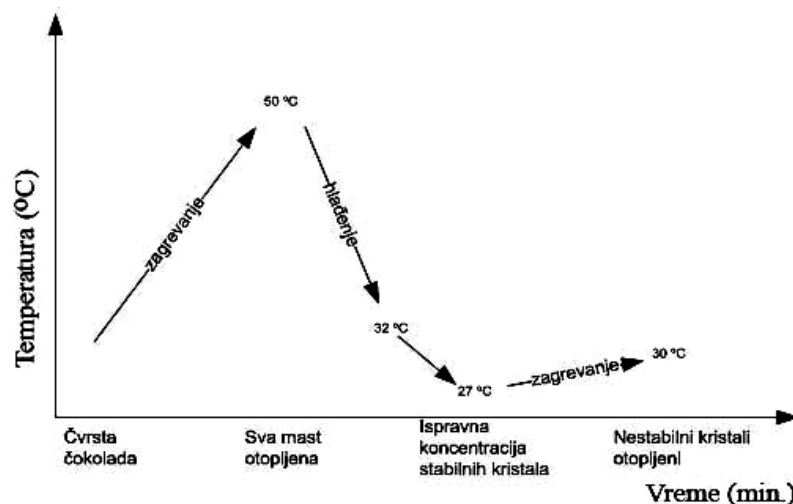
Obrada čokoladne je u velikoj meri uslovljena kristalizacionim svojstvima masne faze.

Zbog polimorfne prirode kakao-maslaca, čokolada se mora temperirati, odnosno predkristalisati pre prelaska iz tečnog u čvrsto stanje. Temperiranje je kontrolisani proces kristalizacije, čiji je cilj stvaranje stabilnih polimorfnih oblika kakao-maslaca (pre svega oblika  $\beta$  (V)) u čokoladnoj masi od koje će se dobiti čokolada odgovarajućeg kvaliteta (Pajin, 2004; Beckett, 2009). Ovo je jedna od najvažnijih faza u tehnološkom postupku proizvodnje čokolade, odgovorna za niz kvalitativnih svojstava finalnog proizvoda, kao što su: čvrstoća i prelom na sobnoj temperaturi, brzo i potpuno otapanje u ustima, sjaj, kontrakcija volumena čokolade radi lakšeg istresanja iz kalupa, aroma (De Oliveira i sar., 2004). Takođe, određuje karakteristike tokom čuvanja i skladištenja čokolade, budući da ima presudan uticaj na pojavu sivljenja čokolade.

Najčešće primenjivani postupak temperiranja započinje zagrevanjem čokoladne mase na 45-50°C, kako bi se postiglo potpuno otapanje kakao-maslaca tj. razrušavanje kristalizacione memorije. Istopljena čokoladna masa se zatim hladi uz mešanje na 32-33°C kako bi se inicirala kristalizacija. Sledeći korak je pothlađivanje na temperaturu od 27-29°C tokom koga se formiraju kristalizacioni centri stabilnog polimorfnog oblika kakao-maslaca, ali i manje stabilni kristalni oblici. Na kraju se čokoladna masa blago podgreva na 30-32°C čime se omogućava otapanje eventualno nastalih nestabilnih kristala masti a zaostaje samo stabilan oblik kakao-maslaca (Briggs i Wang, 2004; Pajin, 2004; Beckett, 2009; Afoakwa, 2010; Svanberg i sar., 2011)(slika 5).

Pravilnim vođenjem postupka temperiranja dobija se čokoladna masa u termostabilnom stanju sa konstantnim reološkim svojstvima koja zadržava u fazi oblikovanja. Nastala optimalna količina kristalizacionih centara stabilnog oblika kakao-

maslaca uslovljava formiranje trodimenzionalne mrežaste strukture kristala što daje finu teksturu čokoladi.



Slika 5. Dijagram temperiranja čokoladne mase (Afoakwa i sar., 2007)

Ispravno temperirana čokolada poseduje karakterističan sjaj usled malih dimenzija kristala  $\beta$  (V) polimorfa kakao-masti ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ) (Rousseau i Smith, 2008). Nepravilan postupak temperiranja dovodi do nastanka male količine kristalizacionih centara čineći teksturu čokolade grubom (Gavrilović, 2003; Pajin, 2004). Isto tako, u nepravilno temperiranoj čokoladi može doći da pojave sivljenja (Schenk i Peschar, 2004).

### 2.2.5. Oblikovanje, hlađenje i pakovanje

Oblikovanje čokoladne mase (upločnjavanje), podrazumeva izlivanje čokoladne mase u zagrejane kalupe, protresanje radi ravnomernog raspoređivanja mase i istiskivanja vazduha, hlađenje i istresanje iz kalupa. Važno je da se prilikom oblikovanja sačuvaju stabilne viskozne osobine temperirane čokoladne mase.

Nakon doziranja u kalupe, čokoladna masa je još uvek u tečnom stanju. Kako bi bila dovoljno čvrsta za dalju manipulaciju i pakovanje, potrebno je da se obavi završna kristalizacija kakao-maslaca u stabilnom polimorfnom obliku. Ovo zahteva oduzimanje velike količine latentne toplote i relativno male količine specifične toplote (Beckett, 2002).

Hlađenje napunjenih kalupa sa čokoladnom masom obavlja se u vazdušnoj struji čija temperatura iznosi 12°C na početku i kraju hlađenja, dok je u sredini procesa u intervalu od 4-7°C. Uslovi hlađenja zavise od vrste čokoladne mase i debljine sloja u kalupu. Očvršćavanje čokoladne mase tokom hlađenja predstavlja proces spontane kristalizacije velikog broja kristala kakao-maslaca u stabilnom obliku, pri čemu brzina rasta kristala zavisi od koncentracije kristalizacionih centara i brzine oduzimanja toplote. Suviše niske temperature hlađenja dovode do nepoželjne kristalizacije kakao-maslaca. Formiranje većeg broja kristalnih oblika sa nižim tačkama topljenja rezultuje nastankom čokolade koja ima niži viskozitet (mekša je) na sobnoj temperaturi, pokazuje manji efekat kontrakcije zapremine, čime se otežava istresanje iz kalupa, a takođe utiče i na pogoršavanje svojstava teksture čokolade i pojavu sivljenja (*Gavrilović, 2003; Keijbets i sar., 2010*).

Nakon hlađenja, čokolada se istresa iz kalupa i, posle izjednačavanja sa temperaturom proizvodne prostorije, pakuje.

### 2.3. SIVLJENJE ČOKOLADE

Sivljenje čokolade je jedno od najčešćih manjkavosti čokolade i predstavlja najveći problem vezan za kvalitet u konditorskoj industriji (*Briones i Aquilera, 2005; Choi i sar., 2007*). Uglavnom nastaje kao posledica grešaka u postupku proizvodnje čokolade ili se javlja tokom njenog skladištenja kao spontani proces. Manifestuje se kada iskristalisana mast na površini čokolade remeti refleksiju svetlosti i postaje vidljiva u vidu sivo-beličastog filma (*Afoakwa, 2010*) na jednom ili više mesta na površini čokolade (*Schenk i Peschar, 2004*). Nakon dužeg vremena skladištenja, naročito pri neodgovarajućim uslovima, dolazi do unutrašnjeg sivljenja, odnosno do pomeranja strukture posivele skrame sa površine u unutrašnjost čokolade (*Torbica, 2003*).

Iako sivljenje čokolade ne predstavlja opasnost po zdravlje ljudi, odnosno bezbednosni hazard po potrošače, ono ipak čini proizvod neprivlačnim za konzumiranje, te stoga nepogodnim za tržište i potrošnju.

Prema navodima *Beckett-a (2002)* i *Afoakwa-e (2010)* sivljenje mogu uzrokovati:

- nedovoljna kristalizacija tokom temperiranja;



- rekristalizacija kakao-maslaca bez odgovarajućeg temperiranja;
- nehomogenost čokolade;
- neadekvatni uslovi hlađenja;
- migracija masti;
- neodgovarajući uslovi skladištenja tj. temperatura i vlažnost.

Glavni uzročnici pojave sivljenja su identifikovani, međutim, način na koji se ovaj fenomen dešava nije još sasvim razjašnjen. Većina istraživača ističe četiri mehanizma nastanka sivljenja (*Beckett, 2002; Altimiras i sar., 2007; Afoakwa, 2010*).

Pre svega, smatra se da migracija masti na površinu čokolade ima ključnu ulogu u nastanku navedene pojave. Naime, sivljenje nastaje zbog loše izvedenog procesa temperiranja tokom koga se ne stvara dovoljna količina stabilnog  $\beta$  (V) polimorfa. Umesto toga nastaje meki IV oblik kristala kakao-maslaca koji se vremenom transformiše u gušću i stabilniju  $\beta$  (V) formu. Tokom ove transformacije, deo kakao-maslaca ostaje u tečnom stanju, kako stabilan  $\beta$  (V) oblik kristališe. Zbog toga tečna faza kakao-maslaca biva potisnuta između čvrstih čestica na površinu gde očvršćava u obliku velikih kristala stvarajući beličastu skramu posivele čokolade (*Beckett, 2002; Afoakwa i sar., 2008a; Altimiras i sar., 2007*). Osim vizuelne promene, menja se i tekstura čokolade zbog toga što stabilna modifikacija kristala ima manju zapeminu od nestabilne, pa usled toga u čokoladi nastaju praznine, međuprostori i međuslojevi, a sama čokolada postaje prhka, ispucana i počinje da se mrvi (*Hartel, 1999*). Latentna toplota koja se oslobađa prilikom polimorfne transformacije, dovodi do otapanja nestabilnih modifikacija koje se, eventualno, još nalaze u čokoladi, što može podstaći migraciju masti.

Drugi mehanizam stvaranja sivljenja vezan je za prelazak  $\beta$  (V) polimorfa u stabilniji  $\beta$  (VI) oblik tokom dugotrajnog skladištenja, što se smatra normalnim procesom prelaska sistema u stabilnije stanje, a promovisano je temperaturom (*Beckett, 2002; Altimiras i sar., 2007; Afoakwa, 2010*).

Još jedan mehanizam nastanka sivljenja direktno je povezan sa temperaturom skladištenja. Ukoliko se čokolada koja je ispravno temperirana skladišti pod visokim

temperaturama, ili se izloži delovanju sunčeve svetlosti, dolazi do njenog topljenja, a potom ponovnog očvršćavanja, pod nekontrolisanim uslovima, što dovodi do postepenih faznih prelaza iz nestabilnih u stabilne oblike kakao-masti i, posledično, do pojave sivljenja (Beckett, 2002; Altimiras i sar., 2007; Afoakwa, 2010). Navodi se da temperaturne oscilacije ubrzavaju navedenu pojavu, što objašnjava nastanak ovakvih transformacija i kod čokolada koje su na pravilan način temperirane (Bricknell i Hartel, 1998; Walter i Cornillon, 2001; Gavrilović, 2003; Pajin, 2004; Svenstrup i sar., 2005).

Nightingale i sar. (2011) posmatrali su promene na crnim čokoladama skladištenim pod različitim režimima temperature i relativne vlažnosti vazduha tokom perioda od 4 i 8 nedelja. Kod uzoraka skladištenih 8 nedelja pri visokim temperaturama bez fluktuacija, i onih skladištenih 4 nedelje sa kolebanjima temperature, došlo je do tranzicije oblika  $\beta$  (V) u formu  $\beta$  (VI), uz posledičnu pojavu sivljenja, što je utvrđeno pomoću DSC i XRD metoda. Obe navedene forme (V i VI) kakao-maslaca poseduju troslojnu strukturu i kristališu sa trikliničkim pakovanjem podćelija. Temperaturne varijacije podspešuju prelazak forme V u formu VI zbog toga što se sa porastom temperature povećava tečna frakcija koja očvršćava kako se temperatura smanjuje. Viša temperatura takođe doprinose povećanju mobilnosti molekula što može pogoršati njenim fluktuacijama (Bricknell i Hartel, 1998). Variranja temperature povećavaju mogućnost nastanka polimorfne transformacije posredstvom tečne faze, pri čemu se oblik V rastvara u tečnoj frakciji, a prilikom hlađenja nastaje forma VI. Osim toga, nastanak forme  $\beta$  (VI) dovodi do povećanja hrapavosti površine čokolada, što je praćeno smanjenjem broja kristala a povećanjem njihove veličine. Uzorci skladišteni na visokim temperaturama bez kolebanja istih, imali su hrapave, šiljaste kristale, a kada je temperatura varirala kristali su bili glatkiji ali veći, što je dovelo do izraženije difrakcije svetlosti sa površine čokolada stvarajući tako svetliji izgled. Slično crnim, povećanje hrapavosti površine dešava se i kod jako posivelih mlečnih čokolada, što su pokazali Hodge i Rounsseau (2002) posmatranje njihove površine pod „atomic-force“ mikroskopom.

Četvrti mehanizam nastanka sivljenja vezan je za migraciju mekih masti kod složenih strukturalnih sistema, kakvi su prisutni kod punjenih čokolada, čokolada sa dodacima ili pralina, kada tečne masti iz dodataka migriraju zajedno sa jednim delom kakao-maslaca na površinu proizvoda i rekristališu uz nastanak sivljenja (Beckett, 2002;

*Altimiras i sar., 2007; Choi i sar., 2007; Afoakwa, 2010).*

Sa aspekta mikrostrukture čini se da i difuzija i kapilarno kretanje imaju ulogu kako u iniciranju, tako i u širenju sivljenja, premda temperatura i prisustvo drugih masti, osim kakao-maslaca, snažno diktiraju koji mehanizam će dominirati (*Rousseau i Smith, 2008*).

Prema navodima *Jamesa-a i Smith-a (2009)* skladištenje čokolade na temperaturi od oko 18°C može znatno usporiti pojavu sivljenja.

*Garti i sar. (1986), Aronhime i sar. (1990), Kaylegian (1999), Jovanović i Pajin (2004), Pajin i Jovanović (2005)*, smatraju da se proces sivljenja čokolade može usporiti korištenjem inhibitora sivljenja (mlečna mast, frakcije mlečne masti, asimetrični trigliceridi, stearin iz palminog ulja, poliestri saharoze, sorbitan tristearati).

Veza između presudnih faza procesa proizvodnje (temperiranje, hlađenje) i mikrostrukture čokolade, ima takođe uticaja na kvalitet tokom skladištenja i trajnost čokolade, jer se pokazalo da gušća struktura dobijena tokom optimalne obrade rezultuje manjom pojavom sivljenja (*Afoakwa i sar., 2008a; Svanberg i sar., 2011*).

U procesu razvoja novih proizvoda, kada se čokoladi dodaju komponente drugačijih svojstava od uobičajenih, može doći do remećenja kristalografske strukture kakao-masti, što, između ostalog, može dovesti do pojave sivljenja. Razumevanje interakcija između sastojaka je ključalno za postizanje što dužeg roka održivosti, ali i u održanju kvaliteta novih proizvoda tokom vremena.

#### 2.4. SENZORNA SVOJSTVA KVALITETA ČOKOLADE

Senzorna svojstva čokolade predstavljaju jedan od najvažnijih parametara u definisanju ukupnog kvaliteta proizvoda.

Senzorna analiza se, prema Upravi za senzornu evaluaciju Instituta prehrambenih tehnologa, upotrebljava da bi se “evocirale, izmerile, analizirale i interpretirale reakcije na one karakteristike hrane koje se doživljavaju čulima vida, mirisa, ukusa, dodira i sluha“ (*Ross, C. F., 2009*). Senzorna analiza se smatra multidisciplinarnom naukom strukturiranom na naučnim principima koji se odnose na različite oblasti znanja, kao što su nauka o hrani, psihologija, fiziologija, statistika, sociologija i proizvođačka praksa, sa ciljem dobijanja

objektivnih odgovora o namirnicama i načinima na koje one bivaju percipirane od strane potrošača i njihovih čula (Stone i Sidel 2004).

Opšta, senzorna prihvatljivost ili dopadljivost od strane potrošača, je ključni faktor za uspešno plasiranje čokolada na tržište. Čokolada se konzumira više iz zadovoljstva, tj. uživanja, a manje zbog nutritivne vrednosti, pa je samim tim važno ukazati na osnovna senzorna svojstva kvaliteta. Da bi senzorna analiza, tj. definisanje specifičnih, dominantnih senzornih svojstava, dalo objektivne rezultate, veoma je značajan visok nivo znanja, odgovarajuća oprema (baždarena), optimalni uslovi rada i pravilno odabrana metodologija rada (Radovanović i Popov-Raljić, 2000/2001). Konkretno, moraju se znati opšti termini, termini koji se odnose na čula, termini koji definišu senzorna svojstva i termini koji se odnose na metode neposrednog ispitivanja (SRPS ISO 5492: 2002 E). U senzornom ocenjivanju kvaliteta svih prehrambenih proizvoda, pa i čokolada, moraju da učestvuju samo odabrani ocenjivači, kao i stručnjaci iz grupe eksperata (ISO 8586-1: 1993E i ISO 8586-2: 1994 E). Za dobijanje objektivnih rezultata senzornog ocenjivanja kvaliteta bitan je i prostor za pripremu uzoraka, prostor za senzorno ocenjivanje i kancelarija za rukovodioca ispitivanja (analitičara – senzoričara) (SRPS ISO 8589: 1998).

Po navodima Gavrilović (2003), prilikom senzorne analize kvaliteta čokolade vrednuju se spoljašnja i unutrašnja svojstva, a ocenjuju se ocenama od 1.00 do 5.00 i ponderišu sa faktorom značaja za svaki kvalitetni broj.

Kennedy i Heymann (2009) su upoređivali metodu mapiranja proizvoda za utvrđivanje razlika među uzorcima crnih i mlečnih čokolada, koji su izveli neobučeni ocenjivači, sa deskriptivnom analizom sprovedenom od strane obučениh ocenjivača. Najviše razlika uočeno je u pogledu arome, odnosno ukusa, kao i teksture, a atributi koji karakterišu mlečne ili crne čokolade činili su čak 40 % svih primećenih razlika, budući da za takvo razlikovanje nije potrebna posebna obuka. U tom smislu se pokazalo da je angažovanje neobučениh potrošača za mapiranje proizvoda ekvivalentno deskriptivnoj analizi sprovedenoj od strane obučеноg panela. Međutim, kada se radi o skupu uzoraka koji imaju više međusobnih sličnosti, obučeni panel pokazuje bolje razlikovanje, zbog čega u takvim slučajevima može biti neophodno da se ocenjivači osposobe pre nego što pristupe mapiranju ili da se koriste već uvežbani panelisti.

Zapažanja koja se registruju čulima služe za prijem, obradu, evaluaciju i interpretaciju utisaka stečenih u postupku senzorne analize. Praktično, najvažnije je definisanje tri senzorna svojstva kvaliteta: izgled (čulo vida), konzistencija/tekstura (čulo vida – čulo dodira – čulo ukusa) i aroma (čulo mirisa i ukusa).

Senzorna svojstva (izgled, boja, miris i ukus) čokolade prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za kakao-proizvode, čokoladne proizvode, proizvode slične čokoladi i krem-proizvode (*Sl. list SRJ broj 1/2005*) moraju biti karakteristična tj. specifična za deklarirani proizvod.

### Izgled – sivljenje

U vizuelne utiske (izgled) spadaju zapažanja o karakteristikama prehrambenih proizvoda koja se registruju čulom vida (očima), a to su boja, oblik, površina, struktura, ... (*MacDougall, 1988*).

Izgled prehrambenih proizvoda, pa i čokolada, uključuje sledeće vizuelne utiske: sjaj, boju, oblik, hrapavost, površinsku teksturu, zamućenje, providnost i drugo. Izgled, po navodima *Briones-a i sar. (2006)*, predstavlja rezultat složene interakcije upadne svetlosti, njenih optičkih svojstava i vizuelne senzorne percepcije. Kako prehrambeni proizvodi, sa aspekta definisanja kvaliteta, pre svega treba da zadovolje zahteve potrošača, izgled je jedno od najvažnijih komercijalnih atributa.

Greške u različitim etapama tehnološkog postupka proizvodnje čokolade prouzrokuju promenu kvaliteta finalnog proizvoda.

Najčešća tehnološka greška u procesu proizvodnje jeste sivljenje čokolade. Vidljivo je golim okom, a pod mikroskopom se uočava da je kristalne strukture (*Gavrilović, 2003*). *Timms (2003; citat: Pajin, 2004)*, sivljenje objašnjava kao razvoj nove faze u masnoj fazi čokolade, koja postaje vidljiva na površini u vidu skrme sive boje. Do sivljenja dolazi usled neadekvatnog temperiranja, oblikovanja, hlađenja ili neuslovnog, odnosno dugotrajnog skladištenja (*Gavrilović, 2003*).

Tako, recimo, primena nepravilnih režima tokom temperiranja, kao što je nedovoljno temperiranje, posledično dovodi do razvoja sivljenja kod crnih čokolada tokom skladištenja pod ambijentalnim uslovima, zajedno sa pratećim promenama mikrostrukture,

teksture, izgleda i topivosti. Instrumentalnim merenjima se može utvrditi da su pojava površinskog sivljenja i promene teksture na početku veoma brze, sa posledičnim smanjenjem sjaja u prvih 96 sati skladištenja, a nakon toga dolazi do postepenog opadanja brzine ovih pojava do postizanja asimptotskih vrednosti. Skladištenje utiče na svojstva topivosti nedovoljno temperiranih čokolada i uzrokuje polimorfne transformacije kakao-masti iz  $\beta$  (IV) u  $\beta$  (VI) formu u roku od 72 sata. Primećeno je da se kod crnih čokolada sa različitim veličinama čestica dešavaju slične promene u prvih 24 sata skladištenja, jer kod svih dolazi do pojave i tečne faze masti i nestabilnih kristalnih oblika na površini. Nestabilne forme rekristališu u stabilnije oblike, a rast kristala tokom skladištenja podspešen je Ostwald-ovim fenomenom da veći kristali nastaju srastanjem manjih, uz pojavu beličaste kristalne strukture koja se postepeno širi celom površinom čokolada nakon 96 sati. Čokolade sa najvećim česticama najbrže su posivele, dok su one sa česticama manjih veličina sporije sivele. Smatra se da kapilarno kretanje uslovljava početak sivljenja, koje se potom širi difuzijom rekristalisane masti celom masom čokolade dok ne dođe do potpunog sivljenja (*Afoakwa i sar., 2009b*).

*Jovanović i Pajin (2002)* su određivale pojedine parametre kvaliteta laboratorijski temperirane čokolade (na 23, 25 i 27°C), bez dodataka inhibitora sivljenja i uz dodatak 1 %, 2 % i 3 % (računato na sadržaj masti u čokoladnoj masi) inhibitora sivljenja. Od uzoraka čokolade kojima nisu dodati emulgatori – inhibitori sivljenja, najbolja senzorna svojstva su imali uzorci uz dodatak 1 % emulgatora, koji su predkristalisani na 23°C. Povećanje temperature predkristalizacije i koncentracije emulgatora u čokoladama, prouzrokovalo je gubitak sjaja površine čokolade, došlo je do pojave sivih tačkica i, konačno, do oštećenja površine. Takođe, došlo je do pojave nekarakterističnog, grubog loma i dobijanja teksture sa grubim kristalima, peskovite ili zrnaste.

*Jovanović i Pajin (2004)* su istraživale uticaj emulgatora Lactem P22 (estar mlečne kiseline) na kvalitet i stabilnost prema sivljenju uzoraka čokolade napravljenih u laboratorijskim uslovima. Eksperiment je pokazao da Lactem P22 poboljšava otpornost čokolada prema sivljenju, ali da utiče na opadanje senzornog kvaliteta. Bolja senzorna svojstva dobijena su upotrebom promotera kristalizacije - Dynasan 118. Najbolja senzorna svojstva čokolade su postignuta sa 0.5 % Dynasan-a 118 i 1 % i 2 % Lactem-a P22. Uzorci

čokolade koji su pretkristalisani na 23°C uz upotrebu 3 % Lactem-a P22, ispoljili su najveću otpornost ka sivljenju.

### Izgled -boja-površina

Boja proizvoda je jedan od najvažnijih pokazatelja senzornog kvaliteta. Za precizno senzorno ocenjivanje boje neophodno je da ocenjivači imaju potpuno zdravo čulo vida, odnosno normalnu moć registrovanja i razlikovanja boja. Svi uslovi su definisani standardom (*ISO/FDIS 11037: 1999 E* i *SRPS ISO 11037:2002*).

*Briones i Aguilera (2005)*, ukazuju na mogućnost kompjuterskog CVSIA sistema za praćenje vizuelnih promena kvaliteta i kvantiteta boje čokolade. *Yam i Papadakis (2004)* navode da je kompjuterski sistem za praćenje vizuelnih promena kvaliteta boje alternativna tehnika, dok, *Briones i Aguilera (2005)* zaključuju da je navedena tehnika jednostavna, mnogostrana i jeftina. Naime, predloženo metod može kvantitativno da utvrdi opšte vizuelne promene, kao i promene pojedinih svojstava na površini čokolade, omogućavajući na taj način standardnu procenu kvaliteta. Predviđa se da će kompjuterski sistem kontrole prehrambenih proizvoda biti stalan, efikasan i isplativ.

Opšti termini koji se odnose na senzorni kvalitet boje prehrambenih proizvoda, definisani su u rečniku senzorne analize (*SRPS ISO 5492: 2002 E*). Neki od njih bili bi: nijansa boje, zasićenost boje, svetloća, neprovidno, providno i prozračno. Tako, pod pojmom nijansa boje, podrazumevamo variranja u određenom području talasne dužine; pojam zasićenost (boje) posmatramo kao stepen čistoće boje, dok svetloću definišemo kao sjajnost boje (*Popov-Raljić i sar. 2005; Popov-Raljić i sar., 2006; Popov-Raljić i Laličić-Petronijević, 2009*).

U okviru vizuelnih utisaka, pored boje, moraju se razlikovati i sledeći pojmovi: oblik (vizuelni utisak o spoljašnjoj geometrijskoj formi), zatim površina (vizuelni utisak o spoljašnjem izgledu) i struktura (vizuelni utisak o unutrašnjem rasporedu čestica tj. gradivnih elemenata). Tako, na primer, površina prehrambenih proizvoda može da bude i vlažna i suva, polusuva, svetlucava, zrnasta, neravna ili glatka. Sloj ispod površine može da bude providan, poluprovidan ili neprovidan, prozračan ili neprozračan, a pigmentacija jednolična (uniformna) ili delimična (mestimična), u zavisnosti od vrste deklarisanog proizvoda (*Popov-Raljić i sar., 2005, 2006*). Čokolada treba da ima glatku i sjajnu površinu (*Gavrilović, 2003*).

*Briones i sar.* (2006) su ispitivali hrapavost komercijalnih uzoraka mlečne čokolade, pomoću laserske skenirajuće mikroskopije i vizuelnu površinsku teksturu (digitalni sistem slika). Analizirani uzorci čokolada su pokazali velike međusobne razlike u hrapavosti izražene preko dva parametra, koji se koriste za opisivanje njihove površine: srednje hrapavosti ( $R_a$  ili  $ARA$ ,  $\mu\text{m}$ ) i frakcijske kompleksnosti sa površinskom skalom ( $Asfc$  – bezdimenziona veličina). Autori navode da je  $ARA$  uobičajeni parametar kojim se opisuje svojstvo hrapavosti ili intenzitet uzdignuća i ulegnuća površine čokolade. Korelacija između hrapavosti uzoraka čokolade izmerena pomoću  $ARA$  i  $Asfc$  je bila prilično visoka i iznosila je  $R^2=0.95$ . Na osnovu ove korelacije autori izvode zaključak da se svojstva površine čokolada koja uzrokuju frakcijsku kompleksnost povezanu sa  $Asfc$ , nalaze u granicama od 3 do 14  $\mu\text{m}$ . Veća vrednost  $Asfc$  je znak veće kompleksnosti, komplikovanosti ili hrapavosti površine. Manja  $Asfc$  vrednost ukazuje na glatku površinu čokolade, svetlije boje ( $L^*$  i  $WI$  parametara).

## Miris

Nakon vizuelnih utisaka, u postupku senzorne analize kvaliteta čokolade su mirisni ili olfaktorni utisci. Čulo mirisa karakteriše osnovnu čulnu informaciju za utvrđivanje kvaliteta mirisa, a pored toga i ukusa, što je od primarnog značaja za utvrđivanje arome (flavour) (Maruniak, 1988).

*Radovanović i Popov-Raljić* (2000/2001) konstatuju da je senzorna ocena mirisa, zapravo i najsuptilniji deo senzorne analize. Naime, neophodno je da ocenjivači imaju potpuno zdravo čulo mirisa i normalnu sposobnost registracije i razlikovanja različitih mirisnih stimulacija (ISO 5496: 1992 E).

Miris se definiše kao olfaktorni utisak pri udisaju i/ili izdisaju preko nosa, pa pozitivno doživljen miris jeste dobar (svojestven) miris, a negativno doživljen – loš miris. Smatra se da postoji oko sedam različitih mirisnih nadražaja koji selektivno stimulišu određene mirisne receptore (Guyton, 1985). Pretpostavlja se da su to sledeći mirisni nadražaji: kamforni, mošusni, cvetni, metilni, etarski, sirćetni i truležni (Popov-Raljić, 1999).



## Ukus

Ukus je, pored mirisa, jedno od najvažnijih senzornih svojstava čokolade. Čulo ukusa čoveka može da registruje i razlikuje ne samo četiri primarna (SRPS ISO 5492: 2002 E), već i više stotina različitih ukusa. Međutim, može se reći da su svi oni mešavina ili uspešna kombinacija četiri osnovna modaliteta ukusa. Tako, sladak ukus ne izaziva samo jedno, već više grupa jedinjenja. Uopšteno, nosioci slatkog ukusa su, uglavnom, organska jedinjenja, kao što su: šećeri, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, aminokiseline i sulfonske kiseline, dok su izuzetak samo neorganske soli olova i berilijuma.

Punioci kao što je laktoza, u tehnološkom postupku proizvodnje čokolade mogu se koristiti u količini do 5 %, a da pri tome ne proizvode negativnu senzornu percepciju u okviru slatkog ili gorkog ukusa (Bolenz i sar., 2003).

Senzorno ocenjivanje ukusa može da bude isključivi predmet ispitivanja, mada je mnogo češći slučaj da se ukus, a posebno aroma, ocenjuju samo kao jedno od pojedinačnih svojstava u okviru ukupnog senzornog ocenjivanja kvaliteta. S obzirom na mogućnost brzog zamora gustativnih receptora i pojavu efekta “naknadnog ukusa” tokom senzorne analize ukusa, neophodno je obezbediti optimalnu dinamiku prezentacije uzoraka, kao i odmaranje čulnih receptora neutralizacijom prethodno izazvanih senzornih nadražaja i stečenih utisaka (“after taste”) (Radovanović i Popov-Raljić 2000/2001). Prema standardu SRPS ISO 5492:2002 E, termin “aroma” u francuskom i engleskom jeziku nije ekvivalentan. Francuski “arôme” podrazumeva senzorna svojstva koja se registruju olfaktornim čulom, preko pozadine nosa, ali prilikom ispitivanja ukusa. U engleskom “aroma” označava – prijatan miris.

U praksi postoji nekoliko deskriptivnih metoda za ispitivanje arome, ali se uglavnom koriste sledeće:

- metode koje se zasnivaju na jedinstvenom opisu arome proizvoda, a predstavljaju tzv. “metod konsenzusa” i
- metode koje ne zahtevaju jedinstven pristup opisu arome “nema konsenzusa”, a zovu se “nezavisne metode”.

Pojam “ukusno arhaičan” opisuje proizvod (čokoladu) koja ima prijatan ukus za razliku od termina “bezukusno – bez mirisa i ukusa”, što ukazuje da je proizvod bez mirisa

i ukusa, a što sve konkretno zavisi od vrste deklarisanog proizvoda.

Na osnovu rečnika senzorne analize mogu se upotrebiti i sledeći pojmovi: neukusno, blago, neutralno, bljutavo i slično.

Treba naglasiti da “naknadni ukus, zaostali ukus” predstavlja olfaktorni i/ili gustativni osećaj koji se javlja posle uklanjanja proizvoda, i koji se razlikuje od osećaja opaženih dok je proizvod bio u ustima (*Radovanović i Popov-Raljić, 2000/2001*).

*Thammke i sar. (2009)* su, koristeći tehniku profilisanja slobodnog izbora, ispitivali analitičke sposobnosti potrošača sa dve lokacije (Beč-Austrija i Drezden-Nemačka) u pogledu karakterisanja crnih čokolada. Uzorci čokolada su sadržavali od 60 do 75 % kakao-delova, a ocenjivani su u pogledu ukusa, arome i osećaja u ustima. Dva panela iz različitih zemalja, koje imaju isti maternji jezik, ali i značajne razlike u kolokvijalnom govoru, upotrebila su gotove iste izraze kojima su ocenili crne čokolade. Najčešće korišćeni deskriptori su bili gorak, sladak, kiselkast, kakao i topiv. Grupisanje uzoraka na osnovu podataka senzorne analize pokazalo je da postoji jasna korelacija između ukusa i osećaja u ustima, sa jedne strane, i kakao-delova u ispitivanim uzorcima čokolada, sa druge strane. U pogledu osećaja u ustima, čokolade sa manjim sadržajem kakao-delova su okarakterisane kao topive i kremaste, dok su one sa višim sadržajem kakao-delova opisane kao suve, brašnjave i lepljive.

## Aroma

Prema navodima *Afoakwa-e i sar. (2008b)* aroma čokolade predstavlja kompleksnu mešavinu preko 600 isparljivih komponenata analitički detektovanih, i to, pre svega, pirazina, estara, amina i amida, kiselina i ugljovodonika.

Aroma čokolade sadrži svojstveni miris i ukus i zaokružena je dodatom aromom. Tako je, recimo, aroma mlečne čokolade zaokružena aromom mleka, aroma nugat čokolade – aromom pečenog lešnika, u čokoladi sa dodacima, npr. sa jezgrastim ili sušenim voćem, to je aroma voća i slično. Osnovni nosioci arome čokolade su saharoza i laktoza, posebno u amorfnom stanju, i kakao-maslac, jer svaki od navedenih sastojaka rastvara mnoga aromatična jedinjenja i raspoređuje ih po velikoj specifičnoj površini čokolade (*Gavrilović, 2003*).

Mleko u prahu je osnovni sastojak mlečne čokolade (oko 20 % ukupne mase) koji

određuje senzorni profil čokolade (ukus, tekstura) i utiče na njena fizičko-hemijska i reološka svojstva. Sušenjem raspršivanjem nastaje prah malog udela slobodne mlečne masti u odnosu na ono proizvedeno sušenjem na valjcima, što je poželjno za proizvodnju gotovo svih vrsta prehrambenih proizvoda, osim čokolade (Bleščak-Cvitanović i sar., 2009b). Zato se iznalaze novi načini i prave različite kombinacije komponenata kako bi se obezbedio veći udeo slobodne mlečne masti u mleku dobijenom raspršivanjem, koja je na raspolaganju za reagovanje sa kakao-maslacem. Zavisno od načina dobijanja, mleko u prahu, kao jedan od sastojaka čokolade, može uticati na senzorna svojstva čokolade, kao što su: intenzitet boje, aroma čokolade i brzina njenog oslobađanja, intenzitet arome mleka, obloženost usne duplje, intenzitet nepoželjnih aroma, brzina otapanja čokolade, tekstura, itd. (Liang i Hartel, 2004).

Ocenjujući senzorni kvalitet uzoraka mlečnih čokolada proizvedenih uz dodatak različitih proizvoda od mleka, po navodima Bolenz-a i sar. (2003), čokolade proizvedene uz dodatak proizvoda od mleka sa većim sadržajem slobodne mlečne masti (obrano mleko u prahu i anhidrovana mlečna mast) ocenjene su bolje (imali su izraženiju aromu mleka) od uzoraka čokolada gde je korišćena vezana mlečna mast (punomasno mleko u prahu).

Osim sastojaka, proizvodni postupak je u direktnoj vezi sa aromom čokolade.

Fermentacija i pečenje kakao-zrna su ključni postupci za razvoj kakao- i čokoladne arome. Tokom fermentacije kakao-zrna smanjuju se nepoželjna gorčina i oporost, dok se poželjne voćne, cvetne i kakao note arome razvijaju i tokom fermentacije i tokom sušenja. Prisustvo nekih komponenata arome uslovljeno je trajanjem procesa fermentacije, odnosno razvojem prekusora arome, što zavisi od mikrobne aktivnosti tokom ovog procesa, a na Maillard-ove reakcije utiču temperatura i vreme pečenja, tokom koga nastaju aldehidi, ketoni, alkoholi i estri.

Camu i sar. (2008) sprovedli su interesantan eksperiment da bi utvrdili u kojoj meri pomenuti postupci utiču na aromu čokolade. Oni su posmatrali spontanu fermentaciju 7 različitih gomila kakao-zrna poreklom iz Gane, prateći mikrobu aktivnost, smenu mikroorganizama, nastanak metabolita, promene temperature i pH vrednosti, kao i variranja u sadržaju polifenolnih jedinjenja i alkaloida tokom ovog procesa. Nakon pečenja fermentisanih kakao-zrna obavili su senzorno ocenjivanje arome od njih proizvedenih čokolada. Deskriptori arome/ukusa čokolada su bili: kisela, voćna, kakao, gorka, cvetna, a

izraženi kroz numeričke vrednosti između 0 i 100. Takođe su ocenjivani i intenzitet (osnovnog) ukusa i naknadnog ukusa. Rezultati eksperimenta su pokazali da sadržaj polifenola doprinosi gorčini i oporosti čokolada, a smanjenju kakao-arome. Međutim, polifenolne komponente nemaju uticaja na ostale ispitivane note arome čokolade, kao što su npr. kisela, voćna/cvetna, sirova/zelena, buđava/zemljasta nota. Isto tako, pokazalo se da je čokolada sa najizraženijom kakao-romom proizvedena od kakao-zrna koja su imala najmanji sadržaj mlečne kiseline i polifenola. Manje izražena kakao-roma primećena je kod čokolada proizvedenih od kakao-zrna koja su fermentisana na najvišoj temperaturi, kod kojih je gotovo sav etanol prešao u sirćetnu kiselinu, što je dovelo do prebrzog smanjenja pH vrednosti u samim zrnima a time i do smanjenja enzimske aktivnosti. Nasuprot tome, kakao-zrna koja su imala najviši sadržaj etanola, a najniže nivoe mlečne i sirćetne kiseline, zbog izraženog dejstva kvasaca tokom fermentacije, dala su čokoladu sa naglašenom voćnom aromom, nastalom verovatno usled formiranja estara. Autori zaključuju da razlike u mikrobnjoj aktivnosti između fermentacija kakao-zrna na različitim gomilama rezultuju dobijanjem fermentisanih i osušenih kakao-zrna i od njih proizvedenih čokolada sa drugačijim karakteristikama arome. Dakle, proces fermentacije kakao-zrna može direktno uticati na aromu i ukus čokolade, zbog čega je od velike važnosti uspostavljanje pouzdane i kontrolisane fermentacije radi dobijanja finalnog proizvoda konzistentnog kvaliteta.

Razvoj arome čokolade iz prekusora se nastavlja i tokom postupka sušenja, posle fermentacije. Indikatori dobro obavljenog sušenja su nastanak karakteristične braon boje, kao i niska oporost i gorčina, te odsustvo nepoželjnih nota arome (npr. po dimu) i prevelike kiselosti. Preduga fermentacija ili nedovoljno sušenje krivci su za razvoj netipičnih nota, od kojih je najčećša ona koja podseća na meso/sušenu šunku. Tokom pećenja dominiraju Maillard-ove reakcije (u kojima učestvuju aminokiseline, peptidi i redukujućí šećeri), zajedno sa Strecker-ovim degradacionim reakcijama (kod kojih se strukture nastale od aminokiselina dele na tri dela). Leucin i glukoza doprinose nastanku nota arome opisanih kao „slatka čokolada“, treonin, glutamin i glukoza pri zagrevanju na 100°C daju tipičnu aromu čokolade, dok valin i glukoza pri zagrevanju na 160°C stvaraju još intenzivniju aromu opisanu kao „prodiruća čokolada“. U završnim fazama pećenja nastaju brojna jedinjenja, poput pirazina, pirola, piridina, imidazola, tiazola i oksazola. Tokom dalje obrade

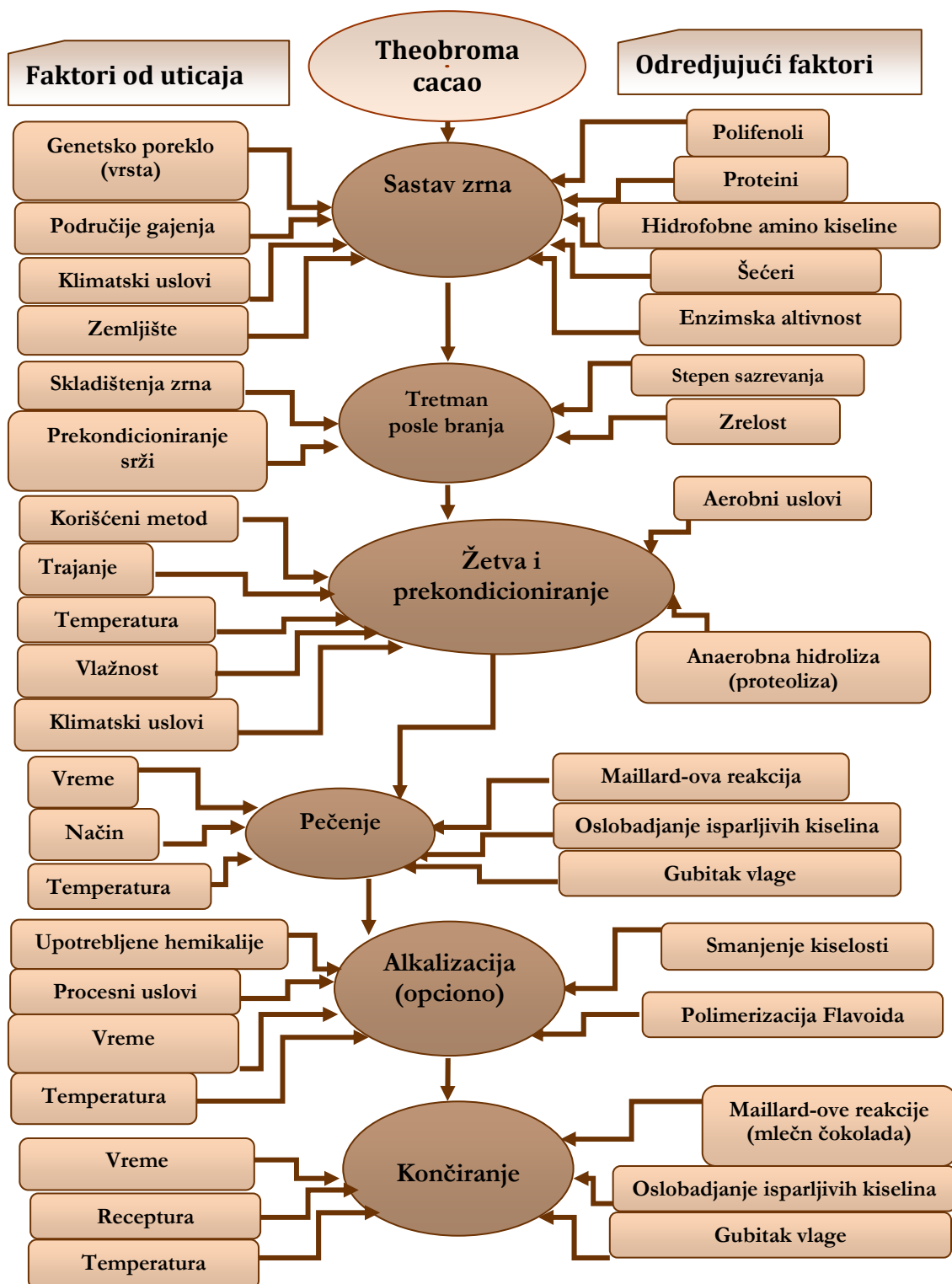
u procesu končiranja dolazi do zaokruživanja finalne arome čokolade i isparavanja nepoželjnih komponenata. Polifenolna jedinjenja putem oksidacije ili enzimske aktivnosti formiraju komplekse sa aminokiselinama, peptidima i proteinima, što dovodi do otklanjanja veoma isparljivih komponenata, smanjenja trpkosti i nastanka blaže finalne arome (*Afoakwa i sar., 2008b*). Na slici 6 prikazana je šema formiranja arome čokolade tokom manipulacije kakao-zrna i pojedinih faza obrade.

*Goldoni (2004)* navodi da je za aromu čokolade od presudnog značaja odabir vrsta kakao-zrna, kao i način tj. postupak izrade čokoladne mase. Autor navodi niz primera za čokolade sa i bez dodataka mleka, u kojima se sa povećanjem sadržaja kakao-delova povećava kakao-aroma i gorčina, a smanjuje slatkoća čokolada.

Kao ključne isparljive komponente u mlečnoj čokoladi idenifikovane od strane *Schmermann-a* i *Schieberle-a (1997)* navode se: 3-metil butanal (poput slada), 2-etil-3,5-dimetil pirazin (slično čipsu od krompira), 1-okten-3-on (po pečurkama), 2-etil-3,6-dimetil pirazin (orašasto, zemljano), 2,3-dietil-5-metil pirazine (slično čipsu od krompira), (*Z*)-2-nonenal (zeleno, masno), 2-metil-3-(metilditio)furan (puput kivanog mesa), (*E,E*)-2,4-nonadienal (masno, voskasto), (*E,E*)-2,4-dekadial (masno, voskasto) i *R*- $\delta$ -dekalakton (slatko, poput breskve). Od isparljivih jedinjenja iz kisele frakcije identifikovano je 14 komponenata koje doprinose aromi, uključujući i vanilin (vanilu) koja se dodaje tokom proizvodnje, što je praćeno 2- i 3-metil buternom kiselinom (na užeglo) i sotolonom (laktonom sa aromom po kariju pri višim koncentracijama, tj. po javorovom sirupu ili karamelu pri nižim koncentracijama).

Kada je u pitanju crna čokolada, dominiraju heterociklična jedinjenja azota i kiseonika, aldehidi i ketoni, estri, alkoholi, ugljovodonici, nitrili i sulfidi. Među nova jedinjenja koja su izolovana spadaju i: 1-pentanol (1), 3-(metiltiol)-propion aldehyd (po krompiru), metil benzen, pirazin (po lešniku, zeleno), etenil pirazin, piridin, 2-metil piridin, 1-(2-furanilmetil)-1*H*-pirol (na pečeno, čokoladu, zeleno), 1*H*-indol i dimetil disulfid. Dva jedinjenja, i to benzil alkohol i dihidro-2-metil-3(2*H*)-furanon, do nedavno su bila izolovana samo iz mlečne čokolade. Specifična heterociklična jedinjenja azota, nastala u Maillard-ovim reakcijama se smatraju važnim u formiranju arome crne čokolade: 3(ili 2),5-dimetil-2(ili 3)-etil pirazin, 3,5-(ili 6)-dietil-2-metil pirazin (kakao, čokolada, rum, slatko, pečeno), acetil pirol i furfural pirol, svi sa dominantnom notom arome koja podseća na praline i

čokoladu. Za sintezu arome čokolade važnu ulogu ima alanin i/ili njegov aldehid nastao Strecker-ovim degradacijama, acetaldehid. Identifikovana su još 4 heterociklična jedinjenja: 2,3-dimetil pirazin, trimetil pirazin, tetrametil pirazin i 2-izopropil-3-metoksi pirazin. Tetrametil pirazin, najzastupljeniji pirazin u crnoj čokoladi sa preko 6 ppm-a doprinosi nastanku mlečno-kafenaste-pečene note arome. Od 33 posebno aktivne komponente arome u neutralnoj/baznoj frakciji (Counet i sar., 2002) tri su imale naročito jak čokoladni karakter: 2-metil propanal, 2-metil butanal i 3-metil butanal. Ostale se karakterišu kakao/pralinastim/orašastim/kafenastim notama: 3(ili 2),5-dimetil -2(ili 3)-etil pirazin, 3,5(ili 6)-dietil-2-metil pirazin i furfural pirol. Karakter arome kisele frakcije (fenolna, slatka) veoma se razlikovao od neutralne/bazne frakcije koja je, u suštini, imala čokoladnu aromu. Samo 6 od 18 komponentata su bile aktivne aromatične komponente, jedna od njih, vanilin, bila je dodata pre končiranja. Furaneol je percipiran kao sladak i karamelast (Schieberle i Pfner, 1999; Counet i sar., 2002).



Slika 6. Mehanizam formiranja arome čokolade i proces njenog razvoja  
(preuzeto iz *Afoakwa i sar., 2008b*)

## Tekstura

Pod pojmom tekstura/konzistencija podrazumeva se osobina prehrambenog proizvoda proistekla iz kombinacije fizičkih svojstava i svojstava registrovanih čulom dodira (uključujući konzistenciju i osećaje u ustima), čulima vida i sluha (BS 5098: 1985).

Tako, pojam teksture obuhvata sva mehanička, geometrijska i druga svojstva površine prehrambenih proizvoda (Popov-Raljić, 1999; Radovanović i Popov-Raljić, 2000/2001).

Mehanička svojstva su ona koja se odnose na reakciju proizvoda na naprezanje i mogu se podeliti na sledeća svojstva: tvrdoća, kohezivnost, lomljivost, žvakljivost, gumoznost, viskoznost, elastičnost i adhezivnost (ISO 11036: 1994 E i SRPS ISO 11036:2002).

Geometrijska svojstva su ona koja se odnose na veličinu i raspored čestica u proizvodu. Tako, geometrijsko svojstvo teksture koje se odnosi na opažanje veličine i oblika čestica je zrnastost (glatko, peskovito, grizasto, grubo). Geometrijska svojstvo teksture koje se odnosi na opažanje oblika i orijentaciju čestica je građa (vlaknasto, ćelijsko, kristalno).

Na kraju, svojstva površine su ona koja su povezana sa osećajima koji se stvaraju usled vlažnosti i/ili sadržaja masti. Takođe mogu biti povezana i sa načinom kako se ovi sastojci oslobađaju u ustima. Površinsko svojstvo teksture koje se odnosi na opažanje vode koju je proizvod apsorbovao i oslobodio je pojam vlažnosti ili sledeći pridevi, kojima se opisuju različiti nivoi vlažnosti: suvo, vlažno, mokro, sokasto, sočno, vodeno. Proširivanjem ovaj termin bi dobio hedonistički smisao, tj. značio bi da je proizvod odličan – izvrstan. Površinsko svojstvo teksture koje se odnosi na opažanje količine i kvaliteta masti u proizvodima je pojam masnost (uljasto, zamašćeno, masno, ... ) (SRPS ISO 11036: 2002).

Peleg (1983) je razmatrao semantiku tj. značenje termina koji se odnose na teksturu, pre svega, čvrste hrane, pri tome skrenuvši pažnju na preklapanja ili interakcije koji se među terminima mogu javiti.

Proučavanjem teksture prehrambenih proizvoda, njenim definisanjem i načinima instrumentalnog merenja, te senzornom evaluacijom ovog složenog svojstva bavio se Bourne (2002). Autor je izvršio podelu svih namirnica prema uticaju teksture na njihova



svojstva, i to na proizvode u kojima je tekstura od izuzetne važnosti, odnosno u kojima predstavlja dominantnu karakteristiku kvaliteta, potom na proizvode (u koje spadaju i čokolada), kod kojih tekstura ima važnu, ali ne i dominantnu ulogu, doprinoseći opštem kvalitetu u istoj meri kao i izgled i aroma, i, konačno, na hranu kod koje je uticaj teksture na opšti kvalitet zanemarljiv.

O složenosti teksture kao senzornog svojstva koje potiče od strukture hrane (molekularne, mikroskopske i makroskopske), kao i o nezamenljivosti čoveka u opisivanju ovog multiparametarskog svojstva koje se opaža pomoću nekoliko čula, pisala je *Szczesniak (2002)*.

*Gavrilović (2003)*, ističe da se pri senzornom vrednovanju čokolade posebna pažnja poklanja teksturi. Tekstura čokolade treba da bude glatka, odgovarajuće čvrstoće pri žvakanju, kao i da poseduje svojstvenu topivost u ustima. Autor je mišljenja da se, pored senzorne analize teksture čokolade, moraju obaviti i druga ispitivanja, kao što je, recimo, instrumentalno određivanje čvrstoće, pomoću penetrometra. Tako su *Padley i sar. (1972; citat: Gavrilović, 2003)* konstatovali da čvrstoća čokolade sa 30 % kakao-maslaca, nakon skladištenja od četiri nedelje, iznosi 52 N/cm<sup>2</sup>, na temperaturi merenja od 20°C.

Nasuprot ovim navodima, *Torbica (2003)* smatra da definisanje optimalne vrednosti za čvrstoću čokolade, određivanjem čvrstoće čokolade penetrometrom, nije adekvatno, jer postignute maksimalne vrednosti za čvrstoću mogu da budu uzrok pogoršanja ukupnog kvaliteta čokolade, kao što je bio slučaj sa analiziranim uzorcima čokolade, u koje je dodat poboljšivač kakao-maslaca (PKM – Illexao 30-96). Isti autor smatra, da se određivanjem čvrstoće penetrometrom dobijaju relativne vrednosti pogodne za međusobno upoređivanje u jednoj seriji ispitivanja.

*Jovanović i Pajin (2002)* navode da emulgatori – inhibitori sivljenja (dodati u količini od 1 %, 2 % i 3 % na sadržaj masti u čokoladnoj masi), nemaju većeg značaja na čvrstoću čokolade (penetraciona vrednost), dok povećanje temperature predkristalizacije dovodi do smanjenja čvrstoće.

Uticaj količine i stanja laktoze (kristalnog ili amorfno) na čvrstoću i senzornu percepciju mlečnih čokolada, uočeni su pri korišćenju mleka u prahu, sa različitim sadržajem laktoze. Instrumentalno određena i senzorno ocenjena čvrstoća mlečnih

čokolada se smanjuje sa povećanjem sadržaja mlečne masti (*Bolenz i sar., 2003*).

Da uslovi čuvanja i skladištenja bitno utiču na promenu čvrstoće (penetraciona vrednost) čokolada, pišu *Ali i sar. (2001)*. Čokolade punjene uz dodatak srednja frakcija palminog ulja i osušenog kokosa, te skladištene na 30°C, bile su mekše od ostalih uzoraka koji su skladišteni na 18°C. Isto tako, *Laličić (2007)* u svom eksperimentu potvrđuje da je skladištenjem različitih vrsta čokolada do godinu dana na T=15°C, kod svih uzoraka došlo do promene čvrstoće, odnosno penetracione vrednosti. Navedene promene su tokom prvih 6 meseci bile neznatne, da bi nakon jednogodišnjeg perioda bio zabeležen izvestan porast čvrstoće, što je i očekivano, s obzirom na moguću rekristalizaciju masne faze čokolada. Autor, međutim, konstatuje da su sve nastale promene u čvrstoći u granicama prihvatljivih vrednosti.

Prema navodima *Dimick i Maning (1987)*, povećanje količine tečne faze masti uzrokuje omekšavanje čokolade.

Na svojstva teksture finalnih proizvoda determinišući uticaj ima sam tehnološki postupak proizvodnje, pre svega, faza rafinacije, odnosno mlevenja, kao i faza temperiranja tj. pretkristalizacije, tokom kojih se određuje konačna veličina čestica i veličina i oblik kristala. Veličina čestica i specifična površina čvrstih čestica spadaju među ključne parametre u proizvodnji čokolade. Najveće čestice utiču na osećaj u ustima sa aspekta finoće/grubosti i na karakter teksture, dok je specifična površina čestica povezana sa poželjnim svojstvima proticanja čokoladne mase. U eksperimentu sa nekoliko veličina čestica i četiri stepena temperiranja *Afoakwa i sar. (2008a)* su utvrdili da su tvrdoća i lepljivost crnih čokolada u obrnutoj vezi sa veličinom čvrstih čestica, odnosno da veće čestice uslovljavaju manju tvrdoću i lepljivost. Zaključeno je da kod nedovoljno temperiranih ili previše temperiranih čokolada dolazi do povećanja tvrdoće u odnosu na optimalno temperirane. Dakle, kombinovanim uticajem veličine čvrstih čestica i uslova temperiranja može se doći do poželjne tvrdoće i lepljivosti crnih čokolada.

U drugom eksperimentu isti autori su ispitivali uticaj distribucije čvrstih čestica i sastava (različitih udela masti i lecitina) na teksturu i izgled crnih čokolada u otpljenom i očvrslom obliku. Veličina čestica je iznosila od 18 do 50 µm, što obuhvata optimalne, minimalne i maksimalne veličine i ima direktan uticaj na teksturu i senzorni karakter

čokolada. Povećanjem veličine čestica sa 18 na 50  $\mu\text{m}$  prouzrokovalo je značajno smanjenje čvrstoće i konzistentnosti pri svim udelima masti, sa najvećim smanjenjem od oko 6 puta pri sadržaju masti od 25 %. Slično tome, kohezivnost i indeks viskoziteta su ispoljili trend značajnog smanjenja sa povećanjem veličine čestica pri svim udelima masti, tačnije vrednost kohezivnosti se smanjila 8 puta, a indeksa viskoziteta 6 puta. Uzorci sa prečnikom od 18  $\mu\text{m}$  su bili čvršći, konzistentniji, kohezivniji i viskoziji od onih sa dijametrom od 50  $\mu\text{m}$ , što je uslovljeno povećanjem broja čestica sa smanjenjem njihovog srednjeg prečnika, a paralelno je došlo do povećanja ukupne specifične površine, čime se povećavaju međučestični kontakti i nastaju veće vrednosti čvrstoće, konzistentnosti i kohezivnosti (Afoakwa i sar., 2008c).

Nadalje, značaj distribucije čvrstih čestica i njenog uticaja na teksturalna i svojstva otapanja čokolada istakli su i Do i sar. (2007) demonstrirajući kako se optimizacijom raspodele čvrstih čestica po veličini, odnosno formiranjem specifične mešavine malih i velikih čestica u odnosu koji omogućava njihovo najefikasnije pakovanje, mogu smanjiti viskozitet i tvrdoća koncentrovanih suspenzija kakva je čokolada, čak i kada se sadržaj masti istovremeno smanjuje do kritične granice od 22 %. Redukcija količine masti u čokoladi uslovljava povećanje viskoziteta, što, ne samo da otežava proizvodnju, već dovodi do osetnog opadanja konzumnog kvaliteta čokolade, koja ima slaba svojstva topivosti, zadržava tvrdoću i teška je za gutanje. Optimizacijom raspodele čvrstih čestica smanjuje se tvrdoća i viskozitet a poboljšavaju pomenute senzorne karakteristike čokolada, što je, uglavnom, bazirano na smanjenju kontakata između čestica i njihove agregacione sposobnosti. Isprekidana mreža čestica čini celokupnu strukturu manje otpornom na kompresiju i lom, tako da se čokolada lakše lomi i topi.

Kakao-maslac ima prepoznatljivu teksturu zbog svoje polimorfne strukture. Osećaj u ustima predstavlja jedan od razloga privlačnosti čokolade. Međutim, nastankom sivljenja, usled kristalizacije masti, ili beljenja usled kristalizacije šećera, remeti se specifična tekstura čokolade. Andrae-Nightingale i sar. (2009) analizirali su nastanak sivljenja ili beljenja i iz toga proistekle teksturalne promene tokom skladištenja crnih i mlečnih čokolada u periodu od 5 nedelja, pri različitim uslovima okoline. Svi atributi teksture, osim elastičnosti, bili su značajno promenjeni, uključujući i tvrdoću, kohezivnost, žvkljivost i guminoznost. Pri

skladištenju na 30°C uz velike temperaturne varijacije, došlo je do ozbiljnog sivljenja čokolada. Fluktuacije temperature tokom skladištenja imale su veći uticaj na opažanje teksture nego skladištenje na visokim temperaturama ili vlažnosti vazduha.

### Interakcija aroma-ukus-tekstura

*Tournier i sar. (2007)* proučavali su interakcije između arome i teksture, kao važnih parametara pri senzornom ocenjivanju, kao i moguće mehanizme koji uzrokuju te interakcije. Ti mehanizmi mogu biti fizičko-hemijskog ili kognitivnog porekla. Ukus i miris imaju ključnu ulogu u prepciji arome, ali je dobro poznato da hemijski sastav i matriks, odnosno struktura namirnice, utiču na oslobađanje i detektovanje arome. Kada hrana dospe u usnu duplju, različiti procesi koji se dešavaju tokom žvakanja menjaju njena fizička svojstva i utiču na percepciju teksture i arome (ukusa i mirisa). Isto tako, prepcija arome može uticati na doživljaj teksture. Autori navode primere istraživanja u kojima je upoređivan efekat slasti na viskozitet, određen instrumentalno i senzorno. Pri istim vrednostima viskoziteta, uzorci koji su imali viši sadržaj saharoze, ocenjeni su kao viskoziji od onih sa nižom koncentracijom saharoze. Dakle, percepcija viskoziteta je bila veća u prisustvu veće količine saharoze, a smatra se da je to posledica promene reoloških svojstava, do čega dolazi dodatkom ugušćivača kakva je saharoza.

Uticaj strukture matriksa na oslobađanje isparljivih komponenata arome uočen je i kod crnih čokolada koje su se razlikovale po raspodeli čvrstih čestica i sadržaju masti. Sa povećanjem veličine čestica značajno se smanjilo oslobađanje 3-metil butanala, 2-fenil etanola, furfural alkohola (furfural), sirćetne kiseline, metil pirazina, 2,3-dimetil pirazina, 2,5-dimetil pirazina, trimetil pirazina, tetrametil pirazina i 2,3,5-trimetil-6-etil pirazina, 2-feniletal acetata, 2-metil butanala i 5-etenil tetrahidro-R,R,5-trimetil-cis-2-furan metanola. Sadržaj masti direktno je povezan sa oslobađanjem komponenata karakterističnih po kakao, čokoladnoj, pralinastoj, voćnoj ili pečenoj noti arome kao što su: trimetil pirazin, 3-metil butanal, 2,3-dimetil pirazin, 2,5-dimetil pirazin, tetrametil pirazin, linalul oksid i 2,3,5-trimetil-5-metil pirazin, pri svim veličinama čvrstih čestica. Nasuprot tome, neke od komponenata, među kojima su i: 2-fenil etanol, furfural alkohol, metil pirazin, fenil acetaldehid, 2, 3, 5-trimetil-6-etil pirazin i 2-karboksaldehid- 1-H-pirol, detektovani su u

manjoj koncentraciji sa rastućim sadržajem masti, verovatno usled interakcije lipofilnih isparljivih komponenata sa matriksom, odnosno čokoladom (*Afoakwa i sar., 2009c*).

Ispitujući primenu različitih proizvoda od mleka, koji su se međusobno razlikovali po tehnološkom postupku proizvodnje, tipu i proizvođačima, *Bolenz i sar. (2003)* navode da zamena 15 % obranog mleka u prahu proteinima surutke u prahu nema negativan uticaj na kvalitet mlečnih čokolada i prihvatljivost od strane potrošača. Koncentrat surutke u prahu može delimično da zameni obrano mleko u prahu. Autori zaključuju da primena različitih proizvoda od mleka, utiče na dopadljivost mlečnih čokolada, tj. na parametre kvaliteta kao što su veličina čestica/peskovitost, viskoznost/topivost – osećaj u ustima i mlečna aroma.

*Guinard i Mazzucchelli (1999)* su ispitivali senzorna svojstva mlečnih čokolada sa različitim sadržajem saharoze (400, 475 i 550 g/kg) i kakao-maslaca (280, 320 i 360 g/kg). Uzorci mlečnih čokolada sa nižim sadržajem šećera, senzorno su, za oralno ocenjen ukus, okarakterisani kao gorki, a uzorci sa većim sadržajem šećera – slađi. Pored toga, manji sadržaj šećera uslovio je pojavu atributa kao što su peskovit ili pečen, a veći je davao čokolade sa više mlečnom, karamelnom ili aromom vanile, i većom čvrstoćom. Čokolade sa većim sadržajem kakao-maslaca su se brže topile u ustima. Iznenađujuće je da je površinsko svojstvo teksture, koje se odnosi na opažanje količine i kvaliteta masti u proizvodu, ili masno/uljasti nivo intenziteta, obrnuto proporcionalan sadržaju (koncentraciji) masti. Autori pretpostavljaju da je to zbog činjenice da ocenjivači povezuju mast sa viskoznim karakteristikama i svojstvima oblaganja usne duplje, te da je u skladu sa ograničenim sposobnostima ljudi da detektuju različite nivoe masti u čvrstim namirnicama.

Simultanom upotrebom deskriptivnog senzornog ocenjivanja pomoću panela i više instrumentalnih metoda, *Nightingale i sar. (2011)* posmatrali su uticaj uslova i dužine skladištenja na senzorna svojstva crnih čokolada. Ispitivani su sveži uzorci čokolada i oni skladišteni 4 i 8 nedelja pod različitim režimima temperature (ambijentalna, temperatura zamrzavanja, visoke temperature uz velike fluktuacije) i relativne vlažnosti vazduha (od 45.4 do 75.3 %). Pokazalo se da su nepovoljni uslovi skladištenja najviše kompromitovali teksturalna svojstva, aromu i izgled crnih čokolada. Naime, najnepoželjnije promene nastale su prilikom skladištenja na visokim temperaturama sa i bez velikih kolebanja, što je uslovalo rearanžiranje triglicerida kakao-masti i polimorfne transformacije, uglavnom iz  $\beta$  (V) u  $\beta$

(VI) formu, i, nastanak sivljenja kada je temperatura znatno varirala. Navedene promene činile su uzorke tvrdim, kohezivnijim (lomljivijim), manje žvakljivim, prijemčivijim za zube prilikom konzumiranja i sporije topivim. Autori navode da uzorci sa povećanom tvrdoćom imaju veći sadržaj čvrste faze (SČF), što je u direktnoj vezi sa percepcijom arome, posebno ukusa, pošto je na raspolaganju manji udeo tečne faze masti u kojoj se rastvaraju isparljiva i aromatična jedinjenja koja doprinose ovim parametrima. Pretpostavka je da je to uzrok smanjenja slatkoće i manje izražene kremaste arome, koje su senzorno detektovane. Sa druge strane, sveže čokolade i one skladištene na sobnoj temperaturi, temperaturi zamrzavanja i pri visokoj relativnoj vlažnosti vazduha, bile su kohezivnije, žvakljivije, slađe, ostavljale su suvlji osećaj u ustima i imale su jaču kremastu aromu. Uočene su i promene izgleda, budući da je površina takvih čokolada postala hrapavija, sa manjim brojem kristala većih dimenzija, zbog otapanja i rekristalizacije kakao-maslaca.

#### 2.4.1. Značaj senzorne analize u razvoju novih proizvoda

Profilisanje i karakterizacija prehrambenih proizvoda ostvaruju se na dva osnovna načina: analitičkim metodama i senzornom analizom. Tradicionalno, ove dve tehnike se koriste zasebno, pri čemu se senzornom analizom angažuju ljudski resursi radi ocene senzornih i fizičkih svojstava hrane, dok analitika daje podatke o hemijskim i fizičkim svojstvima hrane određenim pomoću instrumenata.

Smatra se da su instrumentalna analitička merenja objektivna i da reprezentuju nezavisne istinite činjenice. Međutim, ni ona nisu lišena izazova, pogotovo u pogledu rada operatera koji obavlja određene analize ili sistemskih uticaja laboratorije u kojoj se merenja vrše. Osim toga, senzorna svojstva se ne mogu u potpunosti i temeljno izmeriti instrumentima, zbog izostanka interakcije između namirnice i osobe koja je konzumira, kao i zbog kompleksnosti ljudske percepcije i brojnih faktora koji na nju utiču (genetske karakteristike receptora, način konzumiranja hrane, međudejstvo komponenata namirnice i dr.). U poređenju sa instrumentalnim metodama senzorna analiza obezbeđuje neposrednije merenje percepcije čulima čoveka, tako da, iako joj nedostaje preciznost, smata se generalno ispravnom sa višim stepenom relevantnosti. Međutim, upotrebljene zajedno,

kombinacija senzornog ocenjivanja sa instrumentalnom analizom obezbeđuje vrlo važne informacije i daje kompletniju sliku namirnice koja se ispituje. Zbog toga su za razvijanje relevantnog i validnog merenja ukusa, arome ili teksture nekog proizvoda, obe metode od krucijalnog značaja (Ross, C. F., 2009). Štaviše, prema navodima *Guinard-a i Mazzucbelli-a (1999)*, koji su obavili opsežan eksperiment upoređivanja senzorno ocenjenih svojstava mlečnih čokolada sa instrumentalnim merenjima, dva pomenuta načina evaluacije su praktično bila vrlo visoko međusobno korelirana, pogotovo u pogledu određivanja boje/svetloće i teksturalnih karakteristika (npr. plastičnog viskoziteta i čvrstoće) ispitivanih uzoraka mlečnih čokolada. Sličnu situaciju kod crnih čokolada su prijavili *Nightingale i sar. (2011)*, potvrđujući visok stepen slaganja instrumentalno određene boje, izgleda pod “atomic-force” mikroskopom, topivosti utvrđene DSC metodom i sadržaja triglicerida, sa senzorno ocenjenom tvrdoćom, vremenom topljenja i lepljivošću za zube.

Senzorna evaluacija, dakle, obezbeđuje istraživačima vitalne informacije o prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača, o kontroli kvaliteta, skladištenju i trajnosti, ali i o eventualnim promenama tokom proizvodnje, daljem razvoju proizvoda ili reformulaciji postojeće recepture (*Popov-Raljić i sar., 2008; Ross, C. F., 2009*).

*Durrschmid i sar., (2006)* su ukazali na značaj senzorne analize kao jednog od osnovnih alata u procesu razvoja novog proizvoda. U svom istraživanju oni su oformili panele za ocenjivanje koji su se sastojali od sedam grupa potrošača podeljenih na osnovu starosnog doba. Njihov zadatak je bio da ocene senzorna i fizička svojstva mlečnih čokolada, od kojih su dve bile proizvodi renomiranih kompanija, a treća je predstavljala novi proizvod jednog austrijskog proizvođača. Ideja je bila da rezultati ovog ocenjivanja posluže u procesu razvoja novog proizvoda, time što bi obezbedili podatke o tome kako ga treba modifikovati da bi dobio makar slične hedonske evaluacije kao dve konkurentske čokolade. Pokazalo se da je prvenstveno potrebno eliminisati ustajao/neutralan ukus koji se javljao kod novog proizvoda. Ocenjivači su takođe smatrali da je neophodno da se nova čokolada ravnomernije i brže topi, a da tekstura bude mekša i kremastija. Novi proizvod bi, po njihovoj oceni, trebalo da bude slađi, svetlije boje, sa manje izraženim crvenim tonom. Na osnovu smernica dobijenih putem senzorne analize, proizvođač je primenio određene modifikacije u prvobitnoj recepturi i upotrebio drugu vrstu kakao-maslaca, što je dovelo do

dobijanja nove mlečne čokolade koja je u potpunosti zadovoljavala zahteve potrošača.

*Cruz i sar. (2010)* su ukazali na presudan značaj senzorne analize u procesu razvoja novih proizvoda sa funkcionalnim svojstvima. Iako povećanje funkcionalnosti hrane ne mora obavezno da promeni njen senzorni kvalitet, rezultati nekoliko studija ukazuju da potrošači nisu spremni da podrede senzorna svojstva funkcionalne hrane eventualnim benefitima po zdravlje. Navedeno se posebno odnosi na ukus takvih namirnica, budući da je to parametar od izuzetne važnosti pri odabiru bilo koje vrste hrane. Tako se navodi da povećanje intenziteta gorkog, oporog ukusa ili oštine koji su često pratioci obogaćivanja hrane bioaktivnim komponentama, ili pojava nepoželjnih slankastih nota, ne nailaze na prijem kod potrošača. Može se pretpostaviti da su potrošači voljni da kupe namirnicu sa određenim benefitima po zdravlje kada je ukus takvog proizvoda jednako dobar kao i ukus neizmenjene namirnice, standardnog sastava (*Verbeke, 2006; Siegrist i sar., 2008*).

*Golob i sar. (2004)* su i istraživali uticaj inulina na senzorna svojstva čokolada. Tri vrste čokolade (mlečna, sa lešnicima i sa rižom), u kojima je saharoza zamenjena inulinom i fruktozom, su upoređivane sa kontrolnim čokoladama istog sastava koje su sadržale saharozu. Sproveden je upitnik među 80 dijabetičara i 52 zdrava, nasumična potrošača, koji je pokazao da su čokolade sa inulinom bile dobro prihvaćene. Potom je sprovedeno testiranje upotrebom hedonske skale u kojem je učestvovalo šezdeset petoro dece uzrasta između 11 i 13 godina, koja su prednost dala kontrolnim čokoladama (bez inulina). Sledeći korak je obuhvatao primenu tri senzorna testa razlike: duo-trio, test trougla i test poređenja parova, koji su pokazali da postoje razlike između čokolada sa inulinom i kontrolnih. Na kraju je formiran panel od 7 obučanih ocenjivača koji su obavili analitički test sa kvantitativnom karakterizacijom 8 senzornih atributa ispitivanih čokolada (izgled, prelom, raspoređenost dodataka, rastvorljivost, slatkoća, osećaj u ustima, aroma i naknadni ukus). Utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike između ispitivanih i kontrolnih čokolada. Najveće razlike su se odnosile na slatkoću i rastvorljivost. Uprkos ovim razlikama autori su zaključili da su novi proizvodi – funkcionalne čokolade sa inulinom, bili dosta dobro prihvaćeni od strane potrošača različitog starosnog doba, jer su ocenjeni slično kontrolnim čokoladama, a zbog smanjenog sadržaja šećera i energetske vrednosti mogu se preporučiti kako zdravoj populaciji, tako i dijabetičarima.



Kada je u pitanju vrsta senzornog ocenjivanja koje se primenjuje u procesu razvoja novih proizvoda sa funkcionalnim komponentama, pre svega sa probioticima i prebioticima, *Cruz i sar. (2010)* navode da se u najvećem broju slučajeva upotrebljavaju afektivni testovi, koji za cilj imaju utvrđivanje prihvatljivosti proizvoda, međutim, ne obezbeđuju više detalja vezanih za dodatak probiotika u novi proizvod i njihove interakcije sa konzumentima. Zbog toga je neophodno da razvoj novog proizvoda bude praćen specifičnim senzornim analizama kako bi se omogućilo sticanje najboljih uslova i saznanja u potrazi za dobro prihvaćenim proizvodom na tržištu.

Primena deskriptivnih testova, kao vrlo sofisticiranih alata u senzornoj analizi, obezbeđuje potpuni opis ispitivanog proizvoda, zatim pruža osnove za mapiranje sličnosti i razlika i utvrđivanje onih senzornih atributa koji su važni za prihvatljivost proizvoda. Pored toga ove metode omogućavaju razvijanje profila proizvoda, pomažu u identifikovanju svih senzornih karakteristika, njihovih pozitivnih i negativnih tačaka u poređenju sa konvencionalnim i komercijalnim proizvodima u statičkom i dinamičkom obliku; dozvoljavju poboljšanje recepture proizvoda: zamenu sastojaka, povećanje/smanjenje količine probiotika; i pomažu u dobijanju opštije i globalne ocene kada se primene u različitim periodima tokom skladištenja novog/funkcionalnog proizvoda. Međutim, ove metode zahtevaju rigorozan odabir ocenjivača, koje mogu činiti samo dobro obučeni panelisti u cilju pravilne i efikasne primene metoda senzorne analize, kako bi se izbegle greške koje mogu ugroziti uspeh proizvoda na tržištu (*Cruz i sar., 2010*).

Generalno se može reći da, kada je reč o parametrima senzornog kvaliteta, probiotici imaju najveći uticaj na ukus i aromu proizvoda u koje se dodaju. Naime, metabolizam probiotskih kultura može proizvesti određene komponente koje doprinose pojavi nepoželjne arome i ukusa. Isto tako, bifidobakterije proizvode sirćetnu kiselinu kao produkt njihovog metabolizma koja može doprineti nastanku sirćetastog ukus proizvoda, čime se smanjuje njegov celokupni uspeh prilikom senzornog ispitivanja (*Cruz i sar., 2010; Mohammadi i sar., 2011*). Međutim, pokazalo se da u većini proizvoda u koje se dodaju probiotici ne remete senzorna svojstva (*Nebesny i sar., 2005; Aragon-Alegro i sar., 2007; Nebesny i sar., 2007; Patel i sar., 2008; Mohammadi i sar., 2011*), kao i da je stepen nastalih promena u direktnoj vezi sa stanjem (metabolizma) dodatih probiotskih bakterija.

Kada je reč o uticaju mikroinkapsuliranih probiotika na senzorna svojstva hrane, u literaturi postoje podaci da na ovakav način zaštićeni probiotici mogu potpomoći i poboljšati senzorna svojstva fermentisanih mlečnih proizvoda, pre svega zbog smanjene proizvodnje kiseline i pada pH vrednosti, što rezultuje nastankom proizvoda sa blažim kiselim ukusom u odnosu na onaj sa neinkapsuliranim probioticima. Sa druge strane, neodgovarajuća upotreba inkapsuliranih probiotika može isprovocirati nastanak nepoželjnih aroma, što se pripisuje promeni metaboličkih puteva koji vode nastanku gorčkih peptida (*Mortazavian i sar., 2007*). Međutim, najveći uticaj na senzorna svojstva namirnica inkapsulirani probiotici mogu ostvariti u pogledu remećenja osobina teksture proizvoda kao i osećaja u ustima. Uočeno je da mikrokapsule sa dijametrom preko 100  $\mu\text{m}$ , a posebno preko 1 mm, mogu da pogoršaju osećaj u ustima zbog pojave grubosti. Nadalje, mikrokapsule veličine 1-3 mm u prečniku mogu negativno uticati i na teksturu i na ukus proizvoda (*Chandramouli i sar., 2004*).

Primer ocenjivanja senzornih karakteristika čokolada sa funkcionalnim (probiotskim i prebiotskim) svojstvima navodi *Carić (2010)*. Ocenjivanje je obavljeno primenom metode trugla, pri čemu su ocenjivačima ponuđena 3 kodirana uzorka, od kojih su dva ista a jedan je različit tj. probni. Njihov zadatak je bio da uoče razlike među prezentovanim uzorcima. Ovom metodom ocenjivani su uzorci standardne crne (odnosno mlečne) čokolade i uzorci crne (odnosno mlečne) čokolade u koje dodat probiotski soj *Lactobacillus helveticus* M92. Drugo ocenjivanje činili su uzorci crnih (odnosno mlečnih) čokolada sa prebiotskim svojstvima u kojima je deo saharoze zamenjen maltitolom i inulinom, sa i bez dodatka probiotskog soja. Utvrđeno je da, bilo u standardnim uzorcima čokolada (crnih i mlečnih) ili u uzorcima sa zamenama za šećer, prisustvo probiotskog soja *L. helveticus* ne dovodi ni do kakvih promena senzornih svojstava čokolada. Kod prebiotskih čokolada, pak, uočene su izvesne promene senzornih atributa u odnosu na standardne. Najviše je primećena promena slatkoće i gorčine, što je posledica smanjene slatkoće maltitola i neznatne slatkoće inulina u poređenju sa saharozom.

U dva odvojena eksperimenta, ista grupa autora je ocenjivala senzorna svojstva čokolada sa probioticima. Od senzornih parametara su ocenjivani izgled čokolada u originalnom ambalažnom materijalu, oblik, boja, površina (gornja i donja), prelom, tekstura

(tvdroća i glatkoća), miris i ukus. Evaluaciju su izveli obučeni panelisti primenom petobodne skale, sa odgovarajućim koeficijentom značaja za svaki parametar. U istraživanju u kojem su crne čokolade bile obogaćene laktobacilima (*L. casei* i *L. paracasei*) liofilizovanim u mleku, nisu utvrđene statistički značajne razlike u pogledu senzornih svojstava čokolada tokom skladištenja do 12 meseci (Nebesny i sar., 2007). Mlečne i crne čokolade sa dodatkom *S. thermophilus* i *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus* tokom skladištenja do 6 meseci dobile su visoke ocene za senzorna svojstva, samo nešto malo niže od odgovarajućim mlečnih čokolada, prvenstveno zbog korišćenja jogurta koji nije standardni sastojak čokolada (Nebesny i sar., 2005).

Upotreba prebiotika i punioca, odnosno inulina, polidekstroze i maltodekstrina u različitim odnosima može uzrokovati niz efekata na senzorna, teksturalna i fizičko-hemijska svojstva niskenergetskih mlečnih čokolada, što su na osnovu svojih eksperimenata dokumentovali Abbasi i Farzanmehr (2009). Zamene za šećer u većim iznosima rezultuju visokim sadržajem vlage i niskom tvrdoćom dobijenih čokolada. Najniži sadržaj vlage i najviše vrednosti tvrdoće dobijaju se upotrebom navedenih komponenata u umerenim količinama. Ocenjivana senzorna svojstva obuhvatala su slatkoću, tvrdoću, brzinu otapanja, obloženost usne duplje i boju, a određivana su primenom testova razlika tj. četvorostepene skale (1 = neprihvatljivo, 2 = podnošljivo, 3 = dobro i 4 = poželjno) od strane sedmočlanog panela, dok je opšta prihvatljivost dobijena sabiranjem 5 pomenutih senzornih atributa. Čokolade sa maltodekstrinom (100 %) i kombinacijom maltodekstrina i polidekstroze (75:25) dobile su najniže ocene za senzorna svojstva i značajno su se razlikovale od ostalih ( $p < 0.05$ ). Nasuprot tome, uzorci sa visokim udelom inulina i polidekstroze (75:25 i 50:50) dobili su najviše ocene nakon kontrolnih mlečnih čokolada i imali su najveći stepen prihvatljivosti.

#### 2.4.2. Karakteristike kvaliteta boje čokolade

Boja prehrambenih proizvoda tj. boja površine čokolada, predstavlja bitan parametar za praćenje tehnološkog procesa proizvodnje, kao i ukupnog kvaliteta finalnog proizvoda (Papadakis i sar., 2000; Beckett, 2002; Gavrilović, 2003; Torbica, 2003; Briones i

*Aguilera, 2005; Briones i sar, 2006 i drugi).*

Mnogi analitičari veruju da je boja najvažniji pokazatelj prihvatljivosti prehrambenih proizvoda, jer ako proizvod nema svojstvenu boju, konzument verovatno nikada neće ocenjivati ostale pokazatelje prihvatljivosti (*Grujuć, 2003*).

U svetu postoji više sistema za definisanje boje, od kojih su najznačajniji (*Popov–Raljić, 1999; Radovanović i Popov–Raljić, 2000/2001*):

- Munsell-ov sistem boja,
- Ostwald-ov sistem boja,
- CIE sistem boja,
- CIE  $L^*a^*b^*$  sistem boja,
- ANLAB - Adams Nickerson–ov sistem boja,
- Hunter–ov sistem boja i
- boja na osnovu količine i hemijskog stanja pigmenata.

Najpoznatiji od sistema boja je standardni sistem koji je preporučila CIE (Internacionalna komisija za osvetljenje) 1986. godine, kao i CIE  $L^*a^*b^*$  tj. Hunter–ov sistem boja (*Hunter Lab, 2001*).

Pored navedenih sistema, prilikom definisanja karakteristika kvaliteta boje primenjuju se i psihometrijski pokazatelji, kao što su: ugao boje (hue angle) i zasićenost (hrome), a koji proizilaze iz matematičkih relacija karakteristika kvaliteta boje. Takođe, koristi se i pojam odnos boja (hue), a za bele prehrambene proizvode i merilo beline po Taube-u (*Pribiš i sar., 1997*).

Tokom beljenja površine čokolade stvara se površinski sloj mikrokristala saharoze iz ovlaženih tj. omekšanih (otopljenih) površinskih slojeva čokolade (*Gavrilović, 2003*).

Bitan parametar kod ispitivanja i evaluacije boje je, svakako, tip svetlosnog izvora kojim se osvetljava posmatrani objekat. CIE je definisala standardizovane izvore svetlosti, kako za instrumentalno, tako i za senzorno ocenjivanje boje. Svaki od ovih izvora svetlosti emituje drugačiji sastav različitih talasnih dužina vidljive svetlosti. Najčešće upotrebljavani izvori svetlosti su: A - usijana (užarena), ili volframova svetlost; C - prosečna dnevna svetlost; D65 - srednja podnevna svetlost; D50 - svetlost pri zalasku sunca; D55 - srednja prepodnevna ili srednja popodnevna svetlost; D75 - svetlost pri oblačnom vremenu; M F 2,

Fcw, CWF, F - fluorescentna hladno bela; TL 4 ili TL 84 - uobičajena fluorescentna svetlost, Philips TL 84 fluorescentna lampa; Ultralume 3000 - uobičajena fluorescentna svetlost; Westinghouse fluorescentna lampa (*Hünter Lab, 2000*).

Promena boje površine čokolade uglavnom se ocenjuje senzorno (vizuelnom tehnikom) ili kolorimetrijskim ili spektrofotometrijskim instrumentalnim metodama (*Gonzalez i Woods, 1992; Jovanović i Pajin, 2002; Bolenz i sar., 2003; Torbica, 2003; Pajin, 2004; Briones i Aguilera, 2005; Briones i sar., 2006, Popov-Raljić i Laličić-Petronijević, 2009*).

*Bolenz i sar. (2003)* su određivali boju uzoraka mlečnih čokolada koje su proizvedene uz dodatak različitih vrsta proizvoda od mleka, pod standardizovanim uslovima rada. Boja je merena pomoću aparata Minolta hromametra (Osaka, Japan), a rezultati su izraženi u CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu, kao psihometrijski pokazatelji: svetlost ( $L^*$ ), ton ( $a^*$ ) i hroma ( $b^*$ ). Autori zaključuju da nije došlo do bitnijih promena karakteristika kvaliteta boje. Konkretno, vrednosti za psihometrijsku svetlost su iznosile od  $L^*=34.10$  do  $L^*=37.20$ , a promene psihometrijskog tona ( $a^*$ ) i hrome ( $b^*$ ) su zanemarljive.

*Briones i Aguilera (2005)* su pratili promenu boje površine uzoraka komercijalne mlečne čokolade "Trencito" – Nestle – Chile, pomoću kompjuterskog sistema za praćenje vizuelnih promena i analizu slika (fotografija) – CVSIA sistema, i ručnog kolorimetra. Uzorci čokolada su bili izloženi dvanaestočasovnim ciklusima zagrevanja/hlađenja, na temperaturi od 16-28°C, u toku 52 dana, i relativnoj vlažnosti vazduha  $\varphi=50\%$ . Najveće promene boje su se pojavile nakon 36 dana čuvanja i skladištenja, što je moglo da se uoči vizuelno, kao i određivanjem psihometrijske svetlosti ( $L^*$ ), indeksa beline (WI), tona ( $a^*$ ) i hrome ( $b^*$ ).

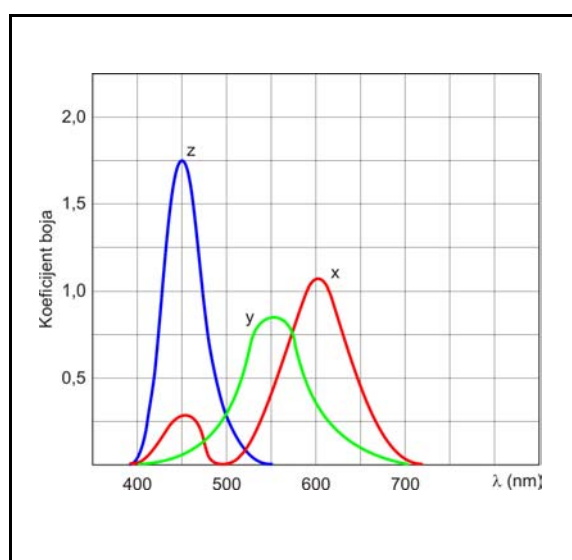
### Instrumentalno određivanje boje po CIE i CIE $L^*a^*b^*$ sistemu

Standardni sistem boja preporučen od strane CIE je i najpoznatiji. Ovaj sistem se zasniva na "standardnom posmatraču", koji se može shvatiti kao standardno oko sa filtrima za primarne boje (crvena, plava, zelena) (*Sears, 1963*). Po CIE sistemu, boja se definiše preko:

- sjajnosti Y (%) (srednja reflektanca)
- dominantne talasne dužine  $\lambda$  (nm) i čistoće boje  $\checkmark$  (%), koji zajedno predstavljaju

pokazatelje hromatičnosti.

Kao početne tačke za izračunavanje vrednosti boje koriste se tristimulusne vrednosti X, Y i Z, koje se dobijaju uz pomoć standardnih CIE krivih  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$  i  $\bar{z}$  za smeše boja (slika 7). Ove standardne krive zavise od vrednosti tzv. “standardnog posmatrača” odnosno od veličine površine posmatranog objekta sa koje se reflektuje svetlost do detektora. U praksi se najčešće koriste vrednosti standardnog posmatrača od 2° i 10°.



Kriva  $\bar{X}$  odgovara crvenom filtru,

Kriva  $\bar{Y}$  odgovara zelenom filtru,

Kriva  $\bar{Z}$  odgovara plavom filtru

Slika 7. Standardne CIE krive za smeše boja (Pribiš, 1980)

Za izračunavanje CIE – tristimulusnih vrednosti koriste se sledeće formule (Hünter Lab, 1996a):

$$X = 100 \frac{\int E_{\lambda} \cdot R_{\lambda} \cdot \bar{x}_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int E_{\lambda} \cdot \bar{y}_{\lambda} \cdot d\lambda}$$

$$Y = 100 \frac{\int E_{\lambda} \cdot R_{\lambda} \cdot \bar{y}_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int E_{\lambda} \cdot \bar{y}_{\lambda} \cdot d\lambda}$$

$$Z = 100 \frac{\int E_{\lambda} \cdot R_{\lambda} \cdot \bar{z}_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int E_{\lambda} \cdot \bar{y}_{\lambda} \cdot d\lambda}$$

gde su:

$\bar{x}$ ,  $\bar{y}$  i  $\bar{z}$  - standardne CIE funkcije (krive) za smeše boja,

$E_{\lambda}$  - kriva distribucije spektralne energije,

$R_{\lambda}$  - kriva reflektance za dati objekat posmatranja i datu talasnu dužinu,

$\lambda$  - talasna dužina merenja.

CIE tristimulusne vrednosti (X, Y i Z) ne odgovaraju svim vizuelnim atributima boje i jedino Y – vrednost može lako da se shvati, zato što je povezana sa svetlošću. Stoga su uvedene veličine x, y i z koje se nazivaju trihromatski koeficijenti ili koeficijenti hromatičnosti ili koordinate hromatičnosti, a koje se izračunavaju iz tristimulusnih vrednosti, na sledeći način (*Hünter Lab, 1996b*):

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad z = \frac{Z}{X + Y + Z}$$

Pošto je iz navedenih jednačina očigledno da je  $x + y + z = 1$ , bilo koja dva od navedenih koeficijenata, pored vrednosti za sjajnost Y, su dovoljna da se definiše boja u CIE xy sistemu, a obično se koriste vrednosti x i y. Naime, za izračunavanje dominantne talasne dužine i čistoće boje iz dijagrama hromatičnosti potrebno je poznavati samo vrednosti za koeficijente hromatičnosti x i y. Ceo postupak određivanja dominantne talasne dužine i čistoće boje opisan je u poglavlju *Materijal i metode rada*.

Pored dominantne talasne dužine  $\lambda$  (nm) i čistoće boje  $\check{C}$  (%), veoma važna karakteristika kvaliteta boje u CIE sistemu je srednja reflektanca ili sjajnost (*Pribiš, 1980*).

Ako se posmatra slika 8, koja je predstavljena nizom kvadrata koji su nijansirani od belog do crnog, preko sivog, zapaža se da je beli kvadrat izazivač najvećeg osećaja sjajnosti, a crni najmanjeg.

“Sjajnost je ono svojstvo boje koje omogućava da se neka boja klasifikuje u smislu ekvivalentnosti sa osećajem koje izaziva neki član niza neutralnog sivog”. Po CIE sistemu sjajnost se određuje na osnovu veličine Y (%).



Slika 8. Skala sivog za određivanje osećaja sjajnosti (Pribiš, 1980)

O uticaju površinske topografije na promenu boje i sjajnost površine komercijalnih uzoraka čokolade (mlečne čokolade “Nestle”) pišu *Briones i sar. (2006)*. Sjaj je optički fenomen povezan sa izgledom površine i predstavlja sposobnost površine da reflektuje direktnu svetlost (*ASTM, 1995*). Sjaj je važan parametar kvaliteta čokolada i pri temperiranju i ključni faktor za kontrolu temperiranja (*Beckett, 2002*). Po navodima *Boutin-a (1997)*, čokolade koje se izvoze u vlažna područja se oblažu jestivim oblogama (premazima) sa ciljem da im se poveća površinski sjaj i da se postignu bolja barijerna svojstva. Stabilnost sjaja jestivih obloga čokoladnih površina proučavali su *Trežna i Krochta (2000)*.

Sjajnost površine uzoraka (mlečna čokolada “Nestle”) može se instrumentalno odrediti i korišćenjem višeugaonog Micro-Tri sjajomera (*Briones i sar., 2006*).

CIE L\*a\*b\* sistem je promovisan od strane CIE 1976. godine u cilju uspostavljanja standardne i približno uniformne skale za određivanje boje koja bi mogla da se koristi u svim oblastima, i kako bi se na taj način omogućilo i olakšalo upoređivanje različitih merenja. CIE L\*a\*b\* se prikazuje u vidu trodimenzionalnog pravougaonog koordinatnog sistema, u kome razlike između pojedinih prostornih tačaka odgovaraju vizuelnim razlikama u boji (*Lukacs, 1985*). Termini za boju se prema *Hünter-u (1978; citat: Popov-Raljić, 1999)* dele na subjektivne i objektivne. Subjektivni ili psihosenzorni termini su: svetloća, oštrina, ton, zasićenost i punoća boje. Objektivni se odnose na stimulans i dele na psihofizičke i psihometrijske. Kako nas interesuje instrumentalno određivanje boje,



opredelićemo se samo na psihometrijske veličine:

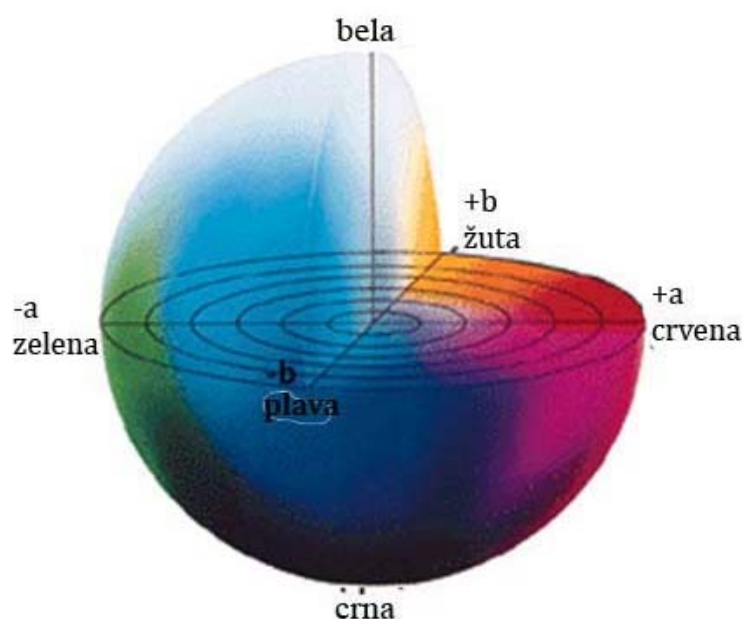
- psihometrijska svetlost ( $L^*$ )
- psihometrijski ton ili psihometrijska nijansa ( $a^*$ ) i
- psihometrijska hroma ( $b^*$ ).

Vrednost  $L^*$  se odnosi na svetloću, vrednost  $a^*$  je povezana sa dominantnom talasnom dužinom, dok je vrednost  $b^*$  povezana sa pojmom zasićenosti boje. U trodimenzionalnom CIE  $L^*a^*b^*$  prostoru, vertikalna osa odgovara vrednostima psihometrijske svetlosti ( $L^*$ ) i kreće se u opsegu od 0 (apsolutno crna) do 100 (apsolutno bela). Ose  $a^*$  i  $b^*$  nemaju neke specifične limite, a mogu da obuhvataju i pozitivne i negativne vrednosti, koje variraju od -120 do +120 (Papadakis i sar., 2000). Pozitivne  $a^*$  vrednosti se odnose na udeo crvene, a negativne na udeo zelene boje. Sa druge strane, pozitivne vrednosti za  $b^*$  se odnose na udeo žute, a negativne na udeo plave boje. Što su vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  broičano veće (u apsolutnom smislu), veći je i udeo odgovarajućih primarnih boja u boji merenog objekta (slika 9).

Ukoliko je potrebno utvrditi relativan odnos između uzorka i standarda, odnosno u kom stepenu se boja uzorka razlikuje od boje standarda, izračunavaju se vrednosti  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  i  $\Delta b^*$ , odnosno  $\Delta E^*$  kao pokazatelji ukupne razlike u boji, i to na sledeći način (Hünter Lab, 1996c):

$$\Delta L^* = L^*_{\text{uzorak}} - L^*_{\text{standard}}$$

+ $\Delta L^*$  označava da je uzorak svetliji od standarda  
- $\Delta L^*$  označava da je uzorak tamniji od standarda

Slika 9. Prikaz boje u prostoru ([www.lightemittingdiodes.org](http://www.lightemittingdiodes.org))

$\Delta a^* = a^* \text{ uzorak} - a^* \text{ standard}$        $+\Delta a^*$  označava da je uzorak crveniji od standarda  
 $-\Delta a^*$  označava da je uzorak zeleniji od standarda

$\Delta b^* = b^* \text{ uzorak} - b^* \text{ standard}$        $+\Delta b^*$  označava da je uzorak žući od standarda  
 $-\Delta b^*$  označava da je uzorak plavlji od standarda

pri čemu je:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Svojstvo izgleda i boja crnih čokolada u velikoj meri su uslovljeni stepenom temperiranja čokoladne mase, kao i raspodelom čvrstih čestica. *Afoakwa i sar. (2008a)* proučavali su uticaj izostanka, zatim nedovoljnog, optimalnog i prekomernog temperiranja zajedno sa različitim veličinama čvrstih čestica, na kristalizaciju kakao-maslaca u crnim čokoladama sa ciljem uočavanja onih svojstava čokolada na koje se navedene varijacije najviše odražavaju. Trend smanjenja svetloće boje  $L^*$  uočen je i kod optimalno i kod

prekomerno temperiranih čokolada sa porastom veličine čestica, pri čemu su previše temperirani uzorci imali nešto niže vrednosti svetloće od pravilno temperiranih, što je bilo praćeno i gubitkom sjaja. Navedeno sugerise da prekomerno temperiranje utiče na smanjenja stepena svetloće, dovodeći tako do potamnivanja proizvoda i pogoršanja njegovog kvaliteta. Nasuprot tome, u nedovoljno temperiranim uzorcima crnih čokolada došlo je do pojave sivljenja, što je rezultiralo većim koeficijentima rasejavanja svetlosti i povećanjem svetloće, odnosno  $L^*$  vrednosti. Sivljenje je izazvalo beljenje površinskih i unutrašnjih slojeva čokolada, sa krajnjim posledicama ne samo po izgled, već i po teksturu proizvoda. Zbog toga je održavanje optimalnih uslova temperiranja od vitalnog značaja za dobijanje crnih čokolada odgovarajućeg izgleda i teksture.

*Torbica (2003)* navodi uticaj ekvivalenata (EKM) i poboljšivača kakao-maslaca (PKM) na fizičke osobine smeša sa kakao-maslacem, osobine kristalizacije čokoladne mase, kao i fizičke osobine i kvalitet čokolade. Kvalitet boje uzoraka čokolada pripremljenih u laboratorijskim uslovima rada, određen je instrumentalno pomoću fotoelektričnog tristimulusnog kolorimetra MOM-color-a 100. Autor zaključuje da tristimulusna kolorimetrija u navedenim istraživanjima daje dragocene podatke pri praćenju promena svetloće boje na površini čokolade, kao i ukupne ili prostorne razlike boja. Rezultati merenja svetloće boje uzoraka čokolade, nakon izlaganja testu sivljenja 32/20°C, pokazuju da se svetloća boje povećava u uzajamnoj zavisnosti od koncentracije primenjenog EKM (Illexao 30-61) i temperature podhladivanja.

*Jovanović i sar., (2000)* ispitivali su uticaj primene klasičnog i modifikovanog postupka pretkristalizacije (odnosno različitih temperatura pothladivanja), kao i dodatka sredstva za ubrzavanje kristalizacije Dynasan 118 u različitim koncentracijama na boju i svetloću laboratorijski pripremljenih čokolada. Rezultati za karakteristike kvaliteta boje izraženi u Hunter-ovom sistemu su pokazali da se pri primeni klasičnog postupka kristalizacije, vrednosti za svetloću boje kreću u uskom intervalu i zavise, pre svega od temperature pothladivanja, dok koncentracija Dynasan-a 118 nema većeg uticaja. Obrnuto, kod primene modifikovanog postupka sa intermedijalnim hlađenjem se pokazalo da dodatak sredstva za ubrzavanje kristalizacije ima većeg uticaja na svetloću boje površine čokolada od temperature pothladivanja.

Skladištenje pri različitim temperaturama i relativnoj vlažnosti vazduha dovodi do značajne promene karakteristika kvaliteta boje crnih čokolada ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  i WI), što zaključak *Nightingale-a i sar. (2011)*. Uzorci skladišteni na visokim temperaturama sa velikim fluktuacijama postali su znatno svetliji sa većim udelom žutih i crvenih tonova.

Međutim, ukoliko se čokolade čuvaju pod odgovarajućim uslovima, mogu zadržati svoj kvalitet, uključujući i boju, tokom dugog vremena skladištenja, što su pokazale *Popov-Raljić i Laličić-Petronijević (2009)* u svom eksperimentu. Naime, one su dijetetske čokolade različitog sastava (crne i mlečne) skladištile pod optimalnim uslovima tj. temperaturi od 18-20°C, a potom u odgovarajućim vremenskim periodima tokom 360 dana utvrđivale eventualne promene senzornih svojstava i boje čokolada. Karakteristike kvaliteta boje bile su određene instrumentalno, pomoću tristimulusne kolorimetrije primenom MINOLTA CR 400 Chroma, a izražene u CIE i CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu. Rezultati su pokazali da su promene boje gornje i donje površine čokolada bile neznatne, i gotovo neprimetne vizuelno. Isto tako, ni kod jednog ispitivanog uzorka čokolada nije došlo do pojave sivljenja, što je potvrđeno i na osnovu izračunatog indeksa beline (WI).

Ipak, prilikom dugotrajnog skladištenja dolazi do promene strukture masti, čak i pri konstantnoj temperaturi usled polimorfnih transformacija koje dovode do promene kvaliteta proizvoda - starenje proizvoda. Promena sjaja površine čokolade u toku stajanja je posledica kristalne transformacije kakao-maslaca iz  $\beta$  (V) u  $\beta$  (VI) polimorfni oblik i smatra se prirodnim fenomenom koji se može usporiti, ali ne i zaustaviti. Takođe je ustanovljeno da je gubitak sjaja usko vezan za narušavanje strukture površine. U trenutku gubljenja sjaja, površina postaje gruba, neravna ispucala (*Jovanović i sar., 2000*).

Raspodela čvrstih čestica, sadržaj masti i lecitina, kao i njihove međusobne interakcije značajno su uticali na promenu boje crnih čokolada, određenu kolorimetrijski i izraženu u CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu preko  $L^*$  - svetloće,  $C^*$ -hrome i h-ugla boje. Prema nalazima *Afoakwa i sar., (2008a)* sa povećanjem veličine čestica od 18 do 50  $\mu\text{m}$  primećeno je opadanje svetloće  $L^*$ , što je zavisilo i od sadržaja masti (vrednosti svetloće bile su niže kod većih sadržaja masti) u crnim čokoladama. Slično smanjenje oučeno je i kod  $C^*$  i h vrednosti sa povećanjem veličine čestica i sadržaja masti. Prema tome, crne čokolade su postajale svetlije kako se veličina čvrstih čestica smanjivala sa 50 na 18  $\mu\text{m}$ . Vrednosti  $C^*$  i

h značajno su se smanjivale sa povećanjem veličine čestica, pogotovo pri sadržaju masti od 25 %. Veći sadržaj masti uticao je na redukciju hrome i nijanse boje, ali je uticaj bio manje izražen pri sadržaju masti od 25 % nego pri 30 %. Sadržaj lecitina nije imao primetnih efekata na karakteristike kvaliteta boje crnih čokolada, koje su dominantno zavisile od raspodele čvrstih čestica po veličini i sadržaja masti.

*Hutchings (1994)* je tvrdio da vrednosti  $L^*$ ,  $C^*$  i  $h$  predstavljaju refleksiju svetlosti, stepen zasićenja i nijansu osvetljenja, koje zavise od distribucije čestica, apsorpcije i koeficijenta rasejavanja. U gustom medijumu, koeficijent rasejavanja je obrnuto povezan sa dijametrom čestica. Čokolade sa različitim veličinama čestica razlikuju se i u pogledu strukture, odnosno aranžmana čestica, što dalje utiče na rasejavanje svetlosti i, prema tome, na izgled.

Čokolade sa finijim česticama (18-25  $\mu\text{m}$ ) čiji su prečnici manji imaju veću specifičnu površinu i veći broj međučestičnih interakcija zbog čega su gušće, rasipaju više svetlosti i izgledaju svetlije od onih sa grubljim (35-50  $\mu\text{m}$ ) česticama. To dovodi do većih vrednosti koeficijenta rasejavanja svetlosti, što, dalje vodi ka posvetljavanju – višim  $L^*$  vrednostima. Dakle, povećanje zasićenosti vodi ka višim  $C^*$  i  $h$  vrednostima unutar suspenzije. Sa druge strane, kakao-maslac predstavlja kristalnu mrežu koja je nerazdvojivi deo čokolade, koja rasejava svetlost samnjujući indekse svetloće i zasićenosti u proizvodima sa višim sadržajem masti (*Afoakwa i sar., 2008c*).

## 2.5. POLIFENOLI KAO BIOAKTIVNE KOMPONENTE ČOKOLADE

Hromatografska analiza ostataka ekstrakata iz grnčarskih posuda i pehara otkrivenih u jednom selu u Hondurasu, pokazuje da su napici od kakaa bili pravljani u tom području 1000 godina p.n.e, čime se do sada poznata upotreba kakaa pomera za najmanje 500 godina dalje u prošlost (*Henderson i sar., 2007*).

Upotreba kakaa ili čokolade u medicinske svrhe, bilo kao osnovnog leka ili sredstva za uzimanje drugih medikamenata, nastala je u Novom Svetu a raširila se u Evropi sredinom XVI veka. Ova praksa ustalila se kod Olmeka, Maya i Asteka, iz čije etimologije reči „kakao“ i „čokolada“ vode poreklo. Dokumenti iz rane kolonijalne ere sadrže i uputstva za korišćenje kakaa u medicinske svrhe. U Badianus-ovom kodeksu iz 1552. godine notirana je upotreba cveta kakao-stabla za lečenje umora, dok je firencijski kodeks (1590) nudio recept sastavljen od mešavine kakao-zrna, kukuruza i anđeoske glave (*Calliandra anomala*) za ublažavanje groznice, zadihanosti i slabosti srca. U rukopisima iz perioda od XVI do XX veka nastalim u Evropi i Novoj Španiji otkriveno je preko 100 upotreba kakaa i čokolade u medicinske svrhe, uključujući i lečenje neuhranjenosti, iscrpljenosti, za stimulaciju apatičnog nervnog sistema, rada bubrega i creva, za poboljšanje varenja, postizanje dugovečnosti i podizanje libida, protiv anemije, gihta i mentalnog zamora. Dodatno, čokoladna pasta upotrebljavana je kao sredstvo za lakše uzimanje gorkih lekova. Pored kakao-zrna, preparati od kore kakao-drвета, lišća, cvetova i kakao-maslaca, su se pokazali uspešnim kod tretiranja opekotina, posekotina i iritacija kože (*Dillinger i sar., 2000*).

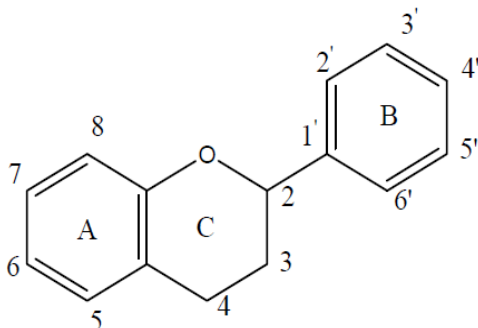
Iako dugo nije smatrana delom zdrave ishrane, pre svega zbog svoje visoke energetske vrednosti, može se reći da je tokom protekle decenije započeta rehabilitacija čokolade. Mnoge od njenih prednosti, uočene od strane nativnih Amerikanaca, su, zapravo, potvrđene. Moderna medicina je objasnila mehanizme njihovog delovanja, čime je čokolada povratila status preporučene namirnice za održavanje dobrog zdravlja (*Lippi, 2010*), zahvaljujući, pre svega, visokom sadržaju polifenola, komponenata sa antioksidativnim svojstvima.

### 2.5.1. Sastav polifenolnih komponenata kakaa i čokolade

Polifenoli predstavljaju jednu od mnogobrojnih i široko prisutnih grupa jedinjenja u biljnom svetu. Poznato je više od 8000 fenolnih struktura a **jestivi** polifenoli predstavljaju osnovni izvor antioksidanasa za ishranu ljudi (*Ruscioni i Conti, 2010*).

Na osnovu hemijske strukture polifenoli su klasifikovani u najmanje 10 različitih klasa. Flavonoidi, najvažnija grupa, su podeljeni u 13 klasa, sa više od 5000 komponenata. Njihova uobičajena struktura je difenilpropana (C6-C3-C6) i sastoji se od dva aromatična prstena povezana preko tri ugljenika koji obično obrazuju oksidovanu heterocikličnu formu. Flavonoidi se ponekad pojavljuju u biljkama kao aglikoni, mada se najčešće nalaze u obliku derivata glukoze. Glikoliza se prvenstveno odvija na poziciji 3, a ređe na poziciji 7. Glukoza je najčešće šećerni ostatak, ali to može biti i galaktoza, ramnoza i ksiloza (*Rice-Evans i sar., 1996; Wollgast i Anklam, 2000a*) koje mogu biti linearno ili račvasto povezane. Individualne razlike između svake grupe flavonoida uslovljene su varijacijama u broju i razmeštaju hidroksilnih grupa, pri čemu se najčešće javlja dihidroksilacija na poziciji 3' i 4' (*Rice-Evans i sar., 1996*).

Flavonoidi mogu biti podeljeni u više podklasa, od kojih važne klase čine flavoni, flavonoli (ili flavan-3-oli), flavanoni, katehini, antocijanidini i izoflavoni (*Ding i sar., 2006*). Flavonoidi, posebno flavan-3-oli, katehin, epikatehin, galokatehin i epigalokatehin, su monomerni sastojci kondenzovanih tanina, iako se vrlo često javljaju i u obliku slobodnih monomera (*Kealey i sar., 2001*). Na slici 10 prikazana je osnovna struktura flavonoida (*Wollgast i Anklam, 2000a*).



Slika 10. Osnovna struktura i numeracija flavonoida  
(*Wollgast i Anklam, 2000a; Apak i sar., 2007*)

Antocijanini su najvažnija grupa biljnih pigmenata rastvorljivih u vodi i odgovorni su za boju cveća i voća viših biljaka. Termin "antocijanin" odnosi se na glukozide antocijanidina (npr. malvidin, cijanidin) (Wollgast i Anklam, 2000a).

Za razliku od biljnih fenola prethodno opisanih, tanini su jedinjenja srednje do velike molekulske težine. Tanini su visoko hidroksilovani molekuli i mogu formirati nerastvorne komplekse sa ugljenim hidratima i proteinima. Navedena funkcija biljnih tanina je odgovorna za osećaj oporosti koji izaziva hrana bogata taninima, zbog taloženja proteina pljuvačke (Baxter i sar., 1997).

Biljni tanini se dele u dve glavne grupe: hidrolizujući i kondenzovani tanini. Hidrolizujući tanini su estri fenolnih kiselina i šećera, i derivati galne i elagne kiseline. Kondenzovani tanini ili proantocijanidini su polimeri velike molekulske težine. Oni se sastoje od monomernih jedinica flavan-3-ol, kao što su katehin ili epikatehin, sa molekulom flavan-3,4-diola kao prekursorom. Oksidativna kondenzacija se dešava između heterocikličnog ugljenika C-4 i ugljenika C-6 i C-8 susednih jedinica. Većina literature koja se tiče sadržaja kondenzovanih tanina odnosi se samo na oligomerne proantocijanidine (dimeri, trimeri, tetrameri) zbog teškoće analiziranja visokopolimerizovanih molekula. Međutim, proantocijanidini se mogu pojaviti kao polimeri sa stepenom polimerizacije 50 i više. Autooksidativna ili enzimatska polimerizacija jedinica flavan-3-ola i flavan-3,4-diola smatra se procesom koji vodi ka formiranju kondenzovanih tanina (Kealey i sar., 2001; Wollgast i Anklam, 2000a).

Oligomerni proantocijanidini su rastvorljivi u vodi i organskim rastvaračima, kao što su aceton i metanol. Međutim, kondenzovani tanini velike molekulske težine su nerastvorni, kao i njihovi kompleksi sa proteinima i polisaharidima (Wollgast i Anklam, 2000a). Kakao-zrno predstavlja bogat izvor polifenola, a navodi se da njihov sadržaj može iznositi oko 10 % suve materije zrna (Rusconi i Conti, 2010), preko 12-18 % (Richelle i sar., 1999), odnosno 15-20 % osušenog i obezmašćenog zrna (Wollgast i Anklam, 2000a).

Polifenoli kakao-zrna skladišteni su u pigmentnim ćelijama kotiledona. U zavisnosti od količine antocijanina ove pigmentne ćelije, koje se takođe zovu i skladišnim ćelijama polifenola, mogu biti bele do tamno purpurne boje. Razlikuju se tri grupe polifenola: katehini ili flavan-3-oli (37 %), antocijanini (4 %) i proantocijanidini (58 %).



Osnovni katehin je (-)-epikatehin koji čini i do 35 % polifenolnog sadržaja. U jednoj studiji sadržaj (-)-epikatehin bio je u intervalu od 34.65 do 43.27 mg/g obezmašćenog uzorka kakao-zrna (Forastero i Catongo). U manjem iznosu nađen je i (+)-katehin, kao i tragovi (+)-galokatehina i (-)-epigalokatehina. Antocijaninska frakcija sastojala se uglavnom od cijanidin-3- $\alpha$ -L-arabinozida i cijanidin-3- $\beta$ -D-galaktozida. Procijanidini su većinom flavan-3,4-dioli koji su na pozicijama 4 $\rightarrow$ 8 ili 4 $\rightarrow$ 6 vezani sa kondenzovanim dimerima, trimerima ili oligomerima, sa epikatehinom kao glavnom podjedinicom u nastavku (Wollgast i Anklam, 2000a).

U kakao-proizvodima takođe su pronađene i male količine kvercetina, kvercentin glukozida, naringenina, luteolina, apigenina, klovamida i fenolnih kiselina, kao što su kafena kiselina, ferulična kiselina, galna i *p*-kumarna kiselina (Borchers i sar., 2004).

Ukratko, različiti polifenoli koji su identifikovani u kakao-zrnu ili kakao-proizvodima su sledeći (Wollgast i Anklam, 2000a):

- ♦ Katehini: (-)-epikatehin, (+)-katehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin.
- ♦ Procijanidini: procijanidin B1=epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-katehin, procijanidin B2=epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin, procijanidin B3=katehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-katehin, procijanidin B4=katehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin, procijanidin B5=epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 6)-epikatehin, procijanidin C1=epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin, procijanidin D=epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epikatehin, kao i viši oligo- i polimeri, uglavnom homolozi epikatehina sa od 2 do 18 monomernih jedinica.
- ♦ Antocijanini: cijanidin-3- $\alpha$ -L-arabinozid, cijanidin-3- $\beta$ -D-galaktozid.
- ♦ Flavonol glikozidi: kvercetin-3-O- $\alpha$ -D-arabinozid, kvercetin-3-O- $\beta$ -D-glukopuranozid.
- ♦ Ostali: klovamid, dideoksiklovamid.

Hemijska struktura polifenola kakaa prikazana je na slici 11.

Prema navodima Manach-a i sar. (2005) biodostupnost polifenola je vrlo različita i za pojedina jedinjenja zavisi od formi koje sadrže. U organizmu čoveka najbolje se absorbuju izoflavoni i galna kiselina, potom katehini, flavanoni i kvercetin glikozidi.

Sadržaj i profil polifenola u hrani, generalno, može biti uslovljen uticajem nekoliko

činilaca, uključujući i faktore okoline (poreklo sirovine, varijetet, stepen oštećenja, klima itd.), proizvodne procese (zagrevanje, alkalizacija) i skladištenje (*Prior i Gu, 2005*).

Kakao-zrna koja se koriste u konditorskoj industriji potiču iz različitih geografskih područja, i mogu imati različit sastav i hemijska svojstva, pa tako variranja postoje i u sadržaju polifenolnih jedinjenja. *Rusconi i Conti (2010)*, navode da razlike mogu biti znatne, npr. sadržaj epikatehina u obezmašćenim uzorcima kakao-zrna različitog porekla kreće se od 2.66 mg/g, utvrđenog kod zrna sa Jamajke, do 16.52 mg/g, nađenog kod zrna poreklom sa Kostarike.

Tokom fermentacije kakao-zrna, polifenoli difunduju sa ćelijskim sokovima iz ćelija u kojima su bili skladišteni i podležu oksidaciji u kondezovane, uglavnom nerastvorne tanine velike molekulske težine. Ove reakcije su ili neenzimske ili ih katalizuju enzimi polifenoloksidaze, iako su ovi enzimi gotovo inaktivisani tokom prvih dana fermentacije. Odvijanje reakcija kondenzacije potvrđeno je oštrim padom sadržaja epikatehina između drugog i trećeg dana fermentacije. Sadržaj epikatehina i rastvorljivih polifenola se smanjuje na približno 10 do 20 % tokom fermentacije. Navedeno se ne dešava samo zbog oksidacije, već i zbog difuzije polifenola u tečnosti nastaloj tokom fermentacije (*sweatings*) (*Wollgast i Anklam, 2000a; Camu i sar., 2008*). Međutim, ne zna se pouzdano da li je gubitak epikatehina definitivn. Naime, pošto učestvuje u građenju tanina, može se govoriti o izmeni profila pre nego o smanjenju sadržaja polifenola tokom fermentacije (*Cooper i sar., 2008b*).

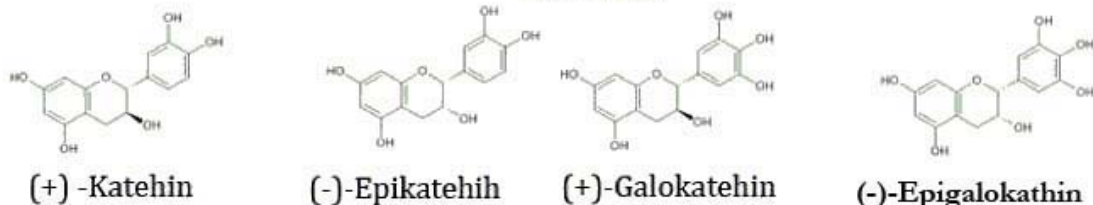
Tokom procesa fermentacije antocijanini se hidrolizuju do antocijanidina, a ovi polimerizuju zajedno sa prostim katehinima stvarajući kompleksne tanine. Sadržaj antocijanina se obično brzo smanjuje tokom fermentacije, te se smatra dobrim pokazateljem za utvrđivanje stepena fermentacije kakao-zrna.

Većina kakao-zrna namenjenih proizvodnji čokolade podleže fermentaciji, međutim, ona se nipošto ne može smatrati standardizovanim procesom širom sveta, čak ni u okviru određenog regiona. Tome u prilog idu i nalazi pojedinih autora u kojima su se koncentracije epikatehina u 10 uzoraka fermentisanih kakao-zrna razlikovale i do 6 puta (*Wollgast i Anklam, 2000a*).

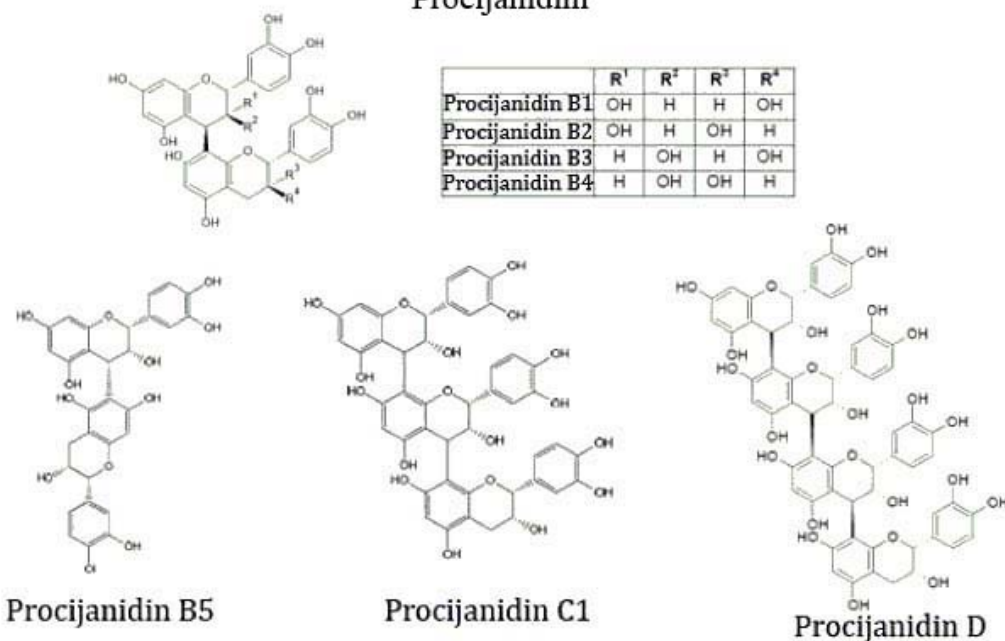
Promene u sadržaju i sastavu polifenolnih jedinjenja tokom procesa proizvodnje čokolade, posebno tokom pečenja i mlevenja kakao-zrna, kao i rafinacije (finog mlevenja) i končiranja, gde se dostižu prilično visoke temperature uz prisustvo vazduha (kiseonika), moraju se očekivati zbog visoke redukcione aktivnosti polifenola. Prilikom proučavanja uticaja nekih od faza proizvodnje na sadržaj polifenola u kakao-zrnima različitog porekla *Arlorio i sar., (2008)* su označili pečenje kao postupak tokom koga se dešava najdrastičniji pad u sadržaju polifenola i to u intervalu od 32.63-54.74 %. Istraživanje *Cervellati-a i sar., (2008)* pokazalo je da se sve bioaktivne komponente prisutne u kakao-zrnu daleko bolje očuvaju tokom zanatske proizvodnje čokolada u odnosu na industrijsku, uglavnom usled primene direktnog postupka prerade, čime se dobija kvalitetniji proizvod. Međutim, generalno, saznanja vezana za promene polifenolnih jedinjenja tokom proizvodnje čokolada su još uvek ograničena (*Adamson i sar., 1999; Wollgast i Anklam, 2000a; Belščak-Cvitanović i sar., 2009a*).

Mnoga istraživanja pokazuju da se sadržaj polifenola razlikuje i kod finalnih proizvoda - čokolada u zavisnosti od vrste, odnosno sadržaja nemasnih kakao-delova koji su i nosioci navedenih bioaktivnih komponenata, uz konstataciju da su crne čokolade bogatije polifenolima od mlečnih, kao i da sa porastom sadržaja kakao-delova raste i količina polifenola (*Vinson i sar., 1999; Cooper i sar., 2008b; Belščak-Cvitanović i sar., 2009b*). Tako, npr. *Pimentel i sar. (2010)* saopštavaju da je kod mlečne čokolade (sa 34 % kakao-delova) sadržaj polifenola izraženih u  $\mu\text{mol}$  ekvivalenata katehina po gramu, iznosio 39.2, kod crne čokolade sa 40 % kakao-delova – 49.9, dok je kod crne čokolade sa 71 % kakao-delova sadržaj polifenola bio čak 62.9. Nadalje, crna čokolada sarži znatno više ukupnih fenola od mlečne po porciji ( $126 \pm 7.4 \mu\text{mol/g}$ , naspram  $52.2 \pm 20.2 \mu\text{mol/g}$ ) (*Vinson i sar., 1999*), a dodatna prednost crne čokolade se sastoji u tome što bi biološki učinci u njoj prisutnih flavonoida mogli biti veći od onih u mlečnoj čokoladi, zbog toga što mleko može inhibirati intestinalnu adsorpciju flavonoida (*Serafini i sar., 2003*).

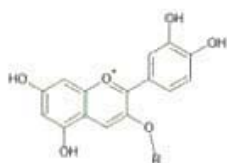
### Katehini



### Procijanidini

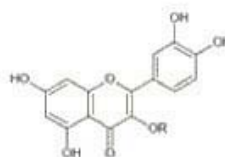


### Antocijani

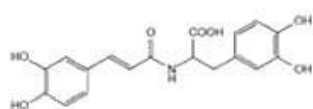


|                                   | R           |
|-----------------------------------|-------------|
| cijanidin- $\alpha$ -L-arabihozid | L-arabinoza |
| cijanidin- $\beta$ -D-galaktozid  | D-galaktoza |

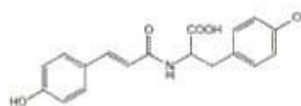
### Flavonol glikozidi



|                                       | R                |
|---------------------------------------|------------------|
| Kvecertin-O- $\alpha$ -D-arabihozid   | D-arabinozid     |
| Kvecertin-O- $\beta$ -D-glukpuranozid | D-glukopuranozid |



Klovamid



Didoksiklovamid

Slika 11. Hemijska struktura polifenola kakao-zrna

I pored prisutne raznolikosti u pogledu sadržaja polifenolnih jedinjenja u čokoladi u zavisnosti od porekla kakao-zrna, postupka proizvodnje i samog sastava čokolade, nesporno je da ona predstavlja veoma važan izvor polifenola, kako zbog superiornijeg sadržaja navedenih komponenata u odnosu na neke druge namirnice, tako i zbog njene široke potrošnje.

U cilju postizanja ujednačenijeg sadržaja polifenola u konvencionalnim čokoladama prisutnim na tržištu, a u svetlu prethodnih saznanja, pojedini istraživači sugerišu utvrđivanje tzv. "standarda identiteta" za mlečnu i crnu čokoladu, ističući pri tome da mlečna čokolada treba da sadrži najmanje 1000 µg polifenola po g čokolade (pa sve do više od 5000 µg/g), dok bi crna čokolada trebalo da sadrži najmanje 3600 µg/g (pa sve do više od 8000 µg/g) (Kealey i sar., 2001).

U mnogim studijama je poređen sadržaj polifenola, flavonoida ili antioksidativnog kapaciteta čokolade sa ostalim namirnicama.

Pri analizi 4 vrste čokolade sa 4 vrste vina *Pimentel i sar. (2010)* ustanovili su da 49 g crne čokolade sadrži istu količinu flavonoida kao i 196 ml Tannat vina.

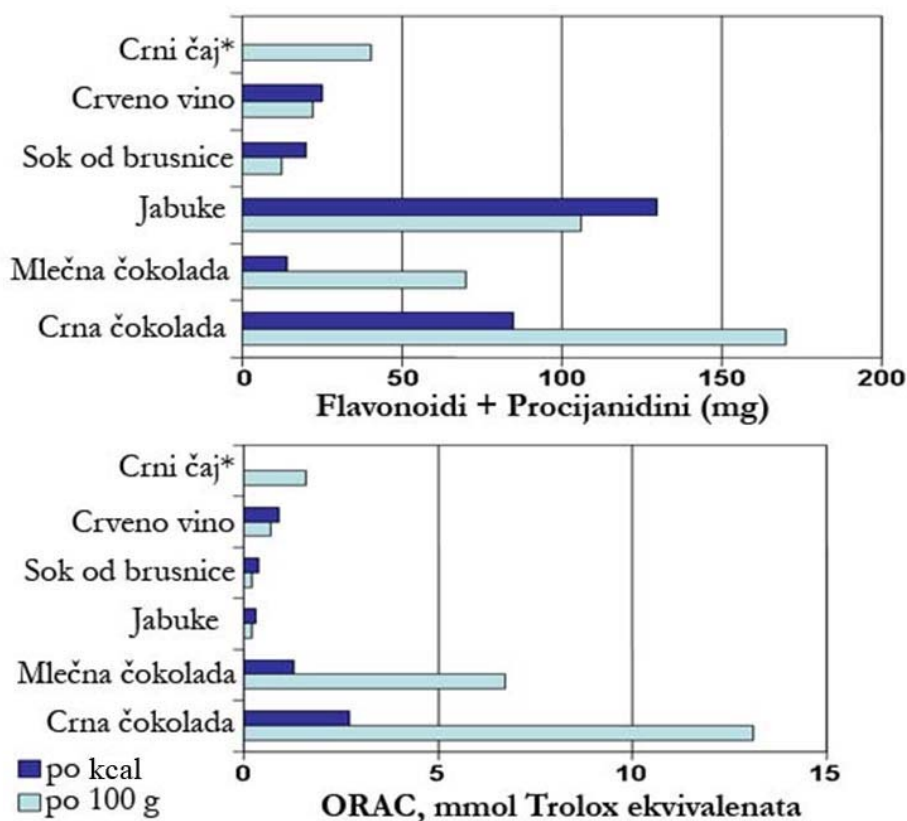
Grupa istraživača predvođena *Vinson-om (Vinson i sar., 1998; Vinson i sar., 1999; Vinson i sar., 2001)* došla je do interesantnih poređenja. U njihovim studijama utvrđeno je da je prosečan sadržaj ukupnih fenola obezmašćene čokolade iznosio 133.9 µmol/g računato na suhu materiju. Čokolada je imala viši sadržaj polifenola nego 23 analizirane vrste povrća, nekoliko vrsta voća i napitaka koji su ispitivani.

Na slici 12 prikazan je uporedni sadržaj flavonoida u mlečnoj i crnoj čokoladi nasuprot druge hrane bogate flavonoidima.

Kao što se može videti, crna čokolada sadrži značajno više flavonoida od jabuka, soka od brusnice, crvenog vina i crnog čaja. Dodatno, čokolada sadrži sve flavonoide čaja, ima 4 puta više katehina od čaja (*Kelishadi, 2005*) i ima mnoge flavonoide koji nisu nađeni u čaju (*Lazarus i sar., 1999*) te bitno doprinosi unosu ukupnih fenola u ishrani u mnogim zemljama.

Procenjuje se da je čokolada vodeći izvor unosa procijanidina u zapadnom svetu (18-20 %) (*Steinberg i sar., 2003*) i treći najviši dnevni izvor antioksidanasa po glavi stanovnika godišnje (*Vinson i sar., 2006*).

Iako se koristi više kao desert ili snek hrana, utvrđeno je da u SAD-u čokolada obezbeđuje 100-107 mg antioksidanasa dnevno. Ukoliko se ima u vidu da se drugim namirnicama, kao što su voće i povrće, unosi u proseku po 255 mg, odnosno, 233 mg antioksidanasa, lako se može izračunati da čokolada doprinosi sa oko 20 % antioksidanasa unetih voćem i povrćem (ukupno 588 mg), ali sigurno da nije zamena za ovu grupu proizvoda.



Slika 12. Sadržaj flavonoida i antioksidativni kapacitet (ORAC) mlečne i crne čokolade nasuprot ostalih namirnica bogatih flavonoidima

\*Kuvan, 2 kesice na 200ml vode

Antioksidativna aktivnost izražena je kao kapacitet apsorbovanja radikala kiseonika (oxygen radical absorbance capacity – ORAC)

Adaptirano iz: *Steinberg i sar. (2003)*.

Čokolada obezbeđuje još više antioksidanasa za stanovnike Evropske Unije zbog toga što oni konzumiraju više kilograma čokolade po glavi stanovnika godišnje u odnosu na

žitelje SAD-a (*Vinson i sar., 2006*). Na primer, u Holandiji konzumiranjem čokolade postiže se do 20% od ukupnog unosa flavonoida kod odraslih ljudi, a kod dece je taj procenat i viši (*Lamuela-Raventos i sar., 2005; Rusconi i Conti, 2010*).

Osim toga, veliki procenat populacije u zapadnim i razvijenim zemljama, i nešto manji, ali rastući deo stanovništva u zemljama u razvoju, čak i u Kini i Indiji, ima averziju prema voću i povrću, bilo zbog brzog stila života, bilo zbog loše ponude i pripreme ovih namirnica u restoranima brze hrane. Kao posledica toga ne unose dovoljno polifenola svojom ishranom. Mnogi od njih se nadaju da će jednoga dana biti u prilici da uzmu pilule kojima bi obezbedili dovoljno polifenola svome organizmu, a da pri tome ne unose, ili unose samo minimalne količine voća i povrća (*Hu, 2007*). Iako je konzumiranje voća i povrća od veće važnosti, u ovom kontekstu, nekoliko kockica crne čokolade, sa standardizovanim sadržajem polifenola, može biti od većeg značaja kao dodatak ishrani nego uzimanje pilula sa flavonoidima (*Rusconi i Conti, 2010*).

### 2.5.2. Uticaj polifenolnih komponenata čokolada na zdravlje

Dobrobiti po zdravlje koje ispoljava čokolada potiču od polifenolnih jedinjenja i njihovog antioksidativnog kapaciteta, opravdavajući povećan interes naučnika širom sveta za ovu temu. Zbog toga oni predstavljaju važne nutritivne komponente što je i dokazano njihovim uticajem na brojne biohemijske i fiziološke funkcije čovekovog organizma (*Middleton i sar., 2000; Engler i Engler, 2004; Abbe Maleyki i Amin, 2008*).

Polifenoli ispoljavaju antioksidativna svojstva putem „hvatanja“ slobodnih radikala i stvaranja helatnih kompleksa sa metalima (Cu, Fe), smanjuju formiranje slobodnih radikala, zbog čega se smatra da imaju korisne implikacije po zdravlje (*Wollgast i Anklam, 2000a; Afoakwa, 2008*). Metaboličke i epidemiološke studije ukazuju da redovno konzumiranje proizvoda bogatih polifenolima povećava nivo antioksidanasa u krvnoj plazmi, što je poželjan faktor u odbrani protiv reaktivnih oblika kiseonika i različitih disfunkcija i bolesti koje oni mogu izazvati (*Afoakwa, 2008*).

Nagomilani dokazi u proteklih 10 godina pokazuju da umereno konzumiranje čokolade, posebno crne, može imati pozitivne uticaje na sprečavanje razvoja kardiovaskularnih bolesti (*Lippi i sar., 2009*).

Kardiovaskularne bolesti su dominantne hronične bolesti u industrijski razvijenim zemljama i na prvom su mestu uzročnika smrtnosti u ovim populacijama. U poslednje vreme pojavilo se nekoliko istraživanja o vezi čokolade i kardiovaskularnih bolesti (*Vinson i sar., 2006; Fernandez-Murga i sar., 2011; Buijsse i sar., 2010*).

Flavonoidi iz čokolade utiču na sniženje krvnog pritiska jer povećavaju lokalno stvaranje azot-monoksida (NO), što vodi boljoj prohodnosti krvnih sudova, a time uzrokuje sniženje krvnog pritiska (*Lippi i sar., 2009*). Pored toga, inhibira se agregacija trombocita i trenje monocita, što su sve faktori povezani sa napredovanjem arteroskleroze, pa se može reći da produkcija NO ima multidimenzionalan uticaj na organizam (*Wollgast i Anklam, 2000b*).

Ključni mehanizam kod nastanka arteroskleroze je oksidacije LDL (lipoproteini niske gustine) holesterola. Istraživanja pokazuju da je epikatehin, osnovni polifenol čokolade, snažan inhibitor oksidacije lipida u plazmi *ex vivo*, zbog sposobnosti polifenola da vežu lipoproteine niže gustine (*Kelishadi, 2005*). Oksidovani LDL uzrokuje oštećenja zidova krvnih sudova, što na kraju može izazvati stvaranje plaka i nastanak arteroskleroze. *Tokede i sar. (2011)* dali su pregled rezultata dobijenih tokom 10 kliničkih ispitivanja sa zajedničkim zaključkom da konzumiranje crne čokolade značajno smanjuje nivo LDL i ukupnog holesterola u serumu. Osim toga, pokazalo se da polifenoli iz čokolade dovode do povećanja nivoa HDL (lipoproteini visoke gustine) holesterola, tzv. "dobrog holesterola" (*Mellor i sar., 2010*). Od značaja je i činjenica, potkrepljena dokazima, da stearinska kiselina iz kakao-maslaca, za razliku od drugih zasićenih kiselina, ima neutralan uticaj na nivo holesterola, kao i da može dovesti do smanjenja aktivnosti trombocita (*Bruinsma i Taren, 2003*).

U zanimljivom ispitivanju u kojem je učestvovalo 49 odraslih osoba sa povišenim nivoom holesterola, *Allen i sar., (2008)* su ustanovili da je primena crnih čokolada bogatih flavanolima uz dodatak biljnih sterola u obliku estara, doprinela snižavanju nivoa holesterola i poboljšanju krvnog pritiska kod svih ispitanika.

Flavonoidi iz čokolade su se pokazali kao dobri antiinflamatorni agensi koji smanjuju zapaljenja preko nekoliko mehanizama. Hronične upale smatraju se još jednim od bitnih mehanizama koji dovodi do stvaranja tromba i arteroskleroze (*Lippi i sar., 2009*).

Najoučljiviji efekat flavonoida kakaa jeste njihova antiagregaciona aktivnost, odnosno sprečavanje sakupljanja krvnih pločica. Reaktivnost i sakupljanje trombocita



povećava zgrušavanje krvi i može dovesti do tromboze. U više ispitivanja pokazalo se da flavonoidi dovode do promena u aktivaciji, ulozi i agregaciji trombocita, ispoljavajući efekat sličan aspirinu (Afoakwa, 2008; Lippi i sar., 2009).

Modulacija imune funkcije i upalnih procesa se takođe pojavljuju kao potencijalni protektivni uticaji flavonoida iz čokolade (Engler i Engler, 2004). Disbalans imunog sistema vodi ka povećanoj produkciji radikala kiseonika i peroksida, što može dovesti do stvaranja akutnih upalnih procesa i autoimunih bolesti. Pokazano je da antioksidansi kakaa i čokolade mogu igrati važnu ulogu u regulisanju funkcionisanja imunog sistema i sprečiti pojavu infekcija i autoimunih bolesti (Kelishadi, 2005; Sanbongi i sar., 1997).

Većina istraživanja o blagotima polifenola iz čokolade fokusirana je na kardiovaskularna oboljenja, ali postoje i istraživanja na ljudima *in vivo* koja su povezana sa pojavom kancera i dijabetesa (Cooper i sar., 2008a).

Nedavni dokazi pokazuju da dugoročno konzumiranje čokolade bogate flavanolima poboljšava insulinsku osetljivost kod osoba sa smanjenom tolerancijom na glukozu (Grassi i sar., 2008; Lippi i sar., 2009).

Nekoliko studija je ukazalo da je dejstvo reaktivnih oblika kiseonika koje je povezano sa kancerogenim procesima takođe inhibirano povećanim unosom polifenola (Middleton i sar., 2000; Ren i sar., 2003; D'Archivio i sar., 2008; Afoakwa, 2008).

Pored svega navedenog, u literaturi je prijavljeno da polifenoli ispoljavaju i antialergijsko, antimikrobno, analgetičko (Wollgast i Anklam, 2000b) i kariostatsko dejstvo (Ferrazzano i sar., 2009), te da usporavaju procese starenja ćelija (Kelishadi, 2005).

Jasno je da flavonoidi iz kakaa i čokolade predstavljaju uzbudljivo novo područje nutritivnih istraživanja sa značajnim uticajem na zaštitu kardiovaskularnog sistema. Dalje studije sa flavonoidima čokolade su potrebne radi definisanja specifičnih mehanizama njihovog delovanja. Dugoročna istraživanja na velikim uzorcima su takođe opravdana kako bi se utvrdile optimalne doze i dalekosežni efekti namirnica bogatih flavonoidima, uključujući kakao i čokoladu (Engler i Engler, 2004). Isto tako, potrebno je podstaći proizvođače prehrambenih proizvoda da na ambalaži deklariraju sadržaj polifenola/flavonoida u čokoladama i drugim kakao-proizvodima (Rimbach i sar., 2009) radi što bolje informisanosti potrošača.

## 2.6. REOLOŠKA SVOJSTVA ČOKOLADNE MASE

Reologija je nauka o deformacijama i proticaju materijala pod dejstvom sile, a reološka svojstva se smatraju ključnim parametrima za određivanje kvaliteta čokolade.

Reološka merenja često daju informacije na osnovu kojih se može odrediti senzorni karakter čokolade, budući da utiču na dobijanja finalnog proizvoda visokog kvaliteta sa dobro definisanom teksturom, kao i na intenzitet arome tokom konzumiranja (*Afoakwa i sar., 2007*).

Oformljivanje reoloških svojstava čokoladne mase vezano je uglavnom za tehnološki postupak končiranja. Jedan od zadataka ove faze predstavlja i oblaganje slobodnih površina čvrstih čestica mastima, tako da one mogu da klize jedne preko drugih. Primenom dugotrajnog, intenzivnog mešanja uz zagrevanje, pod dejstvom sila smicanja dolazi do smanjenja viskoziteta čokoladne mase. Usled toga dešava se transformacija iz guste paste u oblik konzistentne mase od koje je moguće napraviti finalni proizvod (*Beckett, 2002; Gavrilović, 2003*).

### 2.6.1. Opšte teorijske postavke

Ukoliko je neki sistem podvrgnut dejstvu spoljašnjih sila, prisutna međumolekularna privlačenja pružaće izvestan otpor nametnutom dejstvu (*Daković, 1985*).

Viskozitet je mera unutrašnjeg trenja čokolade. Ovo trenje dolazi do izražaja kada se jedan sloj čokolade kreće različitom brzinom u odnosu na drugi sloj. Kada je trenje veće, potrebna je veća količina sile koja dovodi do kretanja, što se naziva smicanje. Do smicanja dolazi kada se čokolada fizički pomera ili na bilo koji način poremećuje, kao pri mešanju, pumpanju, skladištenju i sl. Zbog toga je za pomeranja čokolade velikog viskoziteta potreba veća sila nego za manje viskoznu čokoladu.

Newton je definisao viskozitet posmatrajući model od dva paralelna sloja tečnosti jednakih površina, koje se nalaze na međusobnom rastojanju  $dx$ , i koja se kreću u istom smeru različitim brzinama. Pretpostavio je da je sila, koja je potrebna za održavanje razlike u brzini kretanja slojeva, proporcionalna razlici u brzini kroz tečnost ili gradijentu brzine u delu tečnosti koji se posmatra.

Newton-ov zakon viskoznosti važi samo za laminarno strujanje tečnosti (za čiste tečnosti i prave rastvore) i glasi:

$$\eta = F/A \, dx/dv \quad \text{tj.} \quad F = \eta A \, dv/dx \quad (1)$$

gde je:

F - sila unutrašnjeg trenja (N);

A – površina dva susedna sloja tečnosti u pokretu između kojih deluje sila trenja F (m<sup>2</sup>) na rastojanju dx koja se kreću različitim brzinama (razlika brzina dv);

dv/dx - gradijent brzine u tečnosti koja protiče (s<sup>-1</sup>);

η – koeficijent viskoziteta – viskozitet (Pas)

U slučaju da je A=1 i dv/dx =1, sledi da je :

$$\eta = F \quad (2)$$

iz čega proizilazi da je koeficijent viskoziteta (viskozitet η) sila unutrašnjeg otpora proticanju, koju pruža sloj tečnosti na jedinicu površine kada je gradijent proticanja jednak jedinici.

Kod razmatranja viskoznih osobina, za gradijent brzine dv/dx umesto brzine strujanja ili brzine proticanja, koristi se izraz brzina smicanja (D). Količnik F/A obeležava se sa τ i naziva napon smicanja ili smicajno naprezanje. Zamenom u izraz Newton-ovog zakona viskoziteta dobija se:

$$\tau = \eta \cdot D \quad (3)$$

gde je D - brzina smicanja u s<sup>-1</sup>, a τ - napon smicanja u Pa (1Pa = 1 N/m<sup>2</sup>).

η je, dakle, koeficijent proporcionalnosti između napona smicanja i brzine smicanja. Naravno, to nije uvek slučaj. Najčešće je ipak:

$$\eta = f(D) \quad (4)$$

Pojednostavljeno, viskozitet se matematički može definisati pomoću izraza:

$$\eta = \tau / D \quad (5)$$

odnosno količnikom napona i brzine smicanja (*Beckett, 2009*).

Sistemi za koje u području laminarnog kretanja važi Njutnov zakon nazivaju se njutnovski, a oni za koje ovaj zakon ne važi nenjutnovski (kao što su koloidni rastvori, suspenzije).

### 2.6.2. Specifičnosti proticanja čokoladne mase

Svojstva proticanja čokoladne mase su važna kako za potrošače, tako i za proizvođače čokolade.

Iako postoje mnogi sofisticirani uređaji za merenje viskoziteta i teksture, usna duplja čoveka je znatno osetljivija od većine njih. Pri konzumiranju, prvo se dešava zagrižaj kroz čvrsto parče čokolade zbog čega je njena tvrdoća vrlo bitna. Budući da je temperatura u usnoj duplji iznad tačke topljenja kakao-masti, čokolada se brzo otapa, pogotovo ukoliko je podvrgnuta intenzivnom mešanju i trenju uz pomoć zuba i jezika. Kada čokolada počne da se topi, dva važna činioca dolaze do izražaja.

Prvi od njih je maksimalna veličina čestica prisutna u čokoladi. Ukoliko je prisutna značajna količina čestica većih od 30  $\mu\text{m}$  javiće se osećaj peskovitosti/zrnavosti na jeziku, dok se smanjenje veličine čestica za 2 – 3  $\mu\text{m}$  pri veličinama ispod 30  $\mu\text{m}$ , može detektovati kao različit nivo glatkoće. Veličina čestica utiče na viskozitet, kao i na teksturu, tako da će, recimo, mlečna čokolada sa maksimalnom veličinom čestica od 20  $\mu\text{m}$  imati više kremast ukus i teksturu od one sa maksimalnom veličinom čestica od 30  $\mu\text{m}$ . Drugi činilac pri topljenju čokolade je viskozitet. On ne samo što utiče na kretanje čokolade u ustima, tj. na teksturu, već se pod njegovim uticajem menja i ukus čokolade. Ovo se dešava zbog toga, što su receptori senzornih karakteristika smešteni na različitim mestima u usnoj duplji. Kako se čokolada otapa, postepeno dolazi u kontakt sa ovim receptorima. Vreme za koje čvrste čestice čokolade dospevaju do receptora zavisi upravo od njenog viskoziteta. Ovo znači da će dve čokolade, napravljene od identičnih sirovina, ali obrađene tako da poseduju različite viskozitet, imati veoma različite ukuse (*Beckett, 2002*).

Za proizvođače, svojstva proticanja i viskozitet čokoladne mase važni su, pre svega, zbog kontrole težine proizvoda. Čokolada je relativno skupa namirnica, kako zbog sirovina, tako iz zbog postupka proizvodnje. Zato je, sa ekonomskog aspekta, značajno da se ne stavlja suviše čokolade u kalupe, ili na proizvode koji se njome prelivaju ili oblažu. Ukoliko je viskozitet čokolade neodgovarajući, dobiće se proizvod lošeg kvaliteta. Tako, čokoladnom masom niskog viskoziteta ne obavlja se pravilno čokoladiranje različitih punjenja ili korpusa, koji ostaju neobloženi, čime se smanjuje održivost gotovih proizvoda. Ukoliko je, pak, viskozitet previsok, nastaju deformacije oblika kod obloženih proizvoda ili ne dolazi do istiskivanja mehurića vazduha iz čokolade u kalupima, a takva čokolada izaziva pastozan osećaj pri konzumiranju koji se dugo zadržava (Beckett, 2002; Beckett, 2009). Osim toga, svojstva proticanja čokoladne mase, odnosno njen viskozitet, određuju vrstu, dizajn i karakteristike uređaja za transport, cevovoda, pumpi i osetljivih aparata kao što su temperirke, a poznato je da je odgovarajuća oprema suštinski preduslov optimalne proizvodnje (Goncalves i Lannes, 2010).

Otopljena čokolada je kompleksan reološki sistem u kom su čvrste čestice dispergovane u masnoj fazi. Masnu fazu najčešće čini kakao-maslac koji spada u njutnovske fluide sa konstantnim viskozitetom koji ne zavisi od brzine smicanja (Beckett, 2009; Windhab, 2006).

Čokolada, međutim, sadrži između 60 i 70 % čvrstih čestica (Afoakwa, 2010) zbog čega je kod nje situacija kompleksnija. Ove čestice, sastavljene od šećera, nemasnih kakao-čestice i/ili čvrstih čestica mleka, imaju različit oblik, raspodelu po veličini i svojstva površine, zbog čega se disperzna faza koju one čine u čokoladi ne može smatrati uniformnom (Pajin, 2004). S toga se čokoladna masa ubraja u nenjutnovske fluide čiji viskozitet zavisi od vremena dejstva spoljašnje sile. Takođe ispoljava neidealno plastično proticanje, što znači da je potrebna izvesna minimalna vrednost napona tj. smicajnog naprezanja, da bi uopšte došlo do njenog proticanja, a ta vrednost se naziva prinosni napon (prinosna vrednost) (Đaković, 1985). Ispod ove kritične vrednosti sistem ne protiče, već trpi samo elastične deformacije, a nakon postizanja prinosnog napona sistem popušta i ponaša se kao tečnost. Navedeno je prouzrokovano rušenjem trodimenzionalne rešetke i asimetričnim česticama koje se usklađuju sa strujnicama kako se brzina smicanja povećava,

uzrokujući smanjenje viskoziteta, sve dok on ne postane nezavistan od brzine smicanja pri velikim brzinama smicanja (Afoakwa, 2010). Reološke karakteristike čokoladne mase kvantifikuju se pomoću još jednog parametra, koji se naziva plastični viskozitet, a označava količinu energije neophodnu za nastavak proticanja kada je ono već otpočelo (Afoakwa i sar., 2007; Afoakwa, 2010).

Nadalje, čokoladna masa se svrstava u pseudoplastična tela i pokazuje svojstva tiksotropije i reopeksije (Gavrilović, 2003). Pseudoplastičnim sistemima nazivaju se oni kod kojih se ne dobija pravolinijska zavisnost napona smicanja u širem području brzina smicanja. Pod tiksotropijom se podrazumeva pojava da neki sistemi prelaze u čvrsto stanje, dok pri mehaničkom dejstvu ponovo postaju tečni. Opadanje viskoziteta, odnosno napona smicanja je posledica primene spoljne sile, pri čemu dolazi do razrušavanja unutrašnje strukture. Kada dejstvo spoljne sile prestane ili se njen intenzitet smanji, dolazi do ponovnog uspostavljanja razrušenih veza i sistem se „oporavlja“ (Daković, 1985). Reološke osobine pseudoplastičnih tela se definišu merenjem napona smicanja pri postepenom povećanju brzine smicanja do maksimalno postignute vrednosti, a zatim pri postepenom smanjenju brzine smicanja. Ulazna i povratna kriva proticanja se za čokoladnu masu ne poklapaju i naponi smicanja imaju veće vrednosti pri ulaznom merenju. U uslovima povećane brzine smicanja, pri ulaznom merenju, postepeno se narušava strukturiranost suspenzije čokoladne mase i zbog orijentacije čvrstih čestica dolazi do smanjenja napona smicanja. Pri silaznom merenju, kada se brzina smicanja postepeno smanjuje, jačaju međumolekulske sile i orijentisane čvrste čestice se međusobno približavaju. Međutim, broj ponovo uspostavljenih veza manji je od broja razrušenih veza pri ulaznom smicanju, što rezultira manjim otporom i manjim vrednostima napona smicanja. Usled sporog oporavljanja strukture viskozitet tiksotropnog tela je smanjen, pa ulazna i povratna kriva zatvaraju izvesnu površinu koja se naziva tiksotropna petlja. Veličina površine tiksotropne petlje zavisi od sirovinskog sastava čokoladne mase, veličine dejstva sile i vremena mešanja (Gavrilović, 2003). Površina petlje predstavlja merilo gubitka energije veza koje su razrušene tokom smicanja, a takođe je i merilo tiksotropnih promena unutar sistema. Ako se eksperimentalne krive dobijene pri uzlaznom i povratnom smicanju poklapaju jedna s drugom, onda sistem ne pokazuje tiksotropne osobine već je pseudoplastičan (Zarić i sar., 2011).

Sistemi čije reološke karakteristike zavise od vremena mogu da ispoljavaju i druge pojave. Tako pri laganom mešanju čokoladne mase može doći do bržeg očvršćavanja, odnosno do porasta napona smicanja pri ulaznom merenju u području malih brzina smicanja. Posledično, dolazi do porasta viskoziteta, što se naziva reopeksija (*Hadnađev, 2012*).

Koeficijent viskoznosti pseudoplastičnih sistema se određuje za svaku datu vrednost napona i brzine smicanja, tako da se za svaki par tačaka dobija druga vrednost. Zato se zove prividni viskozitet,  $\eta_{pr}$ . Prividni viskozitet kod sistema sa pseudoplastičnim tipom proticanja opada sa porastom brzine smicanja,  $D$ .

Dakle, viskozitet čokolade ne predstavlja jednu veličinu već se menja sa brzinom kojom se čokoladna masa kreće. Zbog toga bi ga trebalo meriti na brzini smicanja na kojoj se čokoladna masa obrađuje. Često je to više brzina smicanja, koje su npr. vrlo visoke prilikom deponovanja tj. skladištenja, ali niske prilikom uklanjanja mehurića iz kalupa. Međutim, prezentovanje viskoziteta čokolade grafički, u vidu krive, nije najzgodnije u svakodnevnoj praksi. U tu svrhu može poslužiti prividni viskozitet, ukoliko se obezbedi pažljiva kontrola tehnike merenja i korišćenje istih brzina smicanja. Međunarodna asocijacija za konditorske proizvode (ICA) preporučila je da prividni viskozitet treba meriti u najmanje 5 tačaka tako da se pokriju niske, srednje i visoke brzine smicanja.

Alternativni metod za izražavanje viskoziteta predstavlja prilagođavanje odgovarajuće matematičke jednačine krivoj proticanja čokoladne mase (*Beckett, 2009*). Postoji više takvih matematičkih modela, kao što su Herschel-Bulkley-ov ili Bingham-ov model, ali je model po Casson-u najčešće korišćen u industriji čokolade.

Pre 2000. godine ICA je za utvrđivanje reoloških parametara preporučivala upotrebu rotacionih viskozimetara sa koncentričnim cilindrima, kao i Casson-ove jednačine. Posle velikog međulaboratorijskog ispitivanja koje su objavili *Aeschlimann i Beckett* 2000. godine, pokazalo se da Casson-ov matematički model nema dovoljan stepen ponovljivosti u međulaboratorijskim ispitivanjima, zbog čega je predložen i objavljen novi model koji je uključivao interpolaciju podataka za viskozitet čokolade. Predložena je primena predsmicanja pri brzini od  $5 \text{ s}^{-1}$  u trajanju duže od 5 minuta, a potom merenje napona smicanja i viskoziteta uz postepeno povećanje brzine smicanja od  $2\text{-}50 \text{ s}^{-1}$ , a zatim smanjenje iste od  $50\text{-}2 \text{ s}^{-1}$  (*ICA, 2000*). Kasnije se pokazalo da se radi o jednostavnoj i tačnoj metodi koja bi mogla biti verifikovana za različite sisteme (*Servais i sar., 2007*).

*Goncalves i Lannes (2010)* su dali opsežan pregled rezultata i zapažanja brojnih istraživača koji su se bavili podesnošću različitih matematičkih modela i njihovom primenjivošću na svojstva proticanja čokoladne mase. Došli su do zaključka da je Casson-ov model još uvek koristan zahvaljujući primenjenim poboljšanjima koja su dovela do dobijanja pouzdanih rezultata. Sa navedenim su saglasni i *Afoakwa i sar. (2009a)* koji konstatuju da iako ICA metod pokazuje nešto više koeficijente korelacije i regresije u odnosu na Casson-ov metod, ove dve metode su međusobno visoko korelirane, tako da se bilo koja od njih može koristiti za analiziranje reoloških parametara čokoladne mase.

### 2.6.3. Faktori koji utiču na reološka svojstva čokoladne mase

Osnovna prednost merenja viskoziteta čokoladne mase jeste mogućnost njegove korekcije, tokom poteškoća koje se javljaju u proizvodnom postupku. Neke od njih mogu biti vezene za prinosnu vrednost, dok se druge javljaju kod plastičnog viskoziteta. Zbog toga je važno znati koji faktori utiču na svojstva proticanja, kako bi se na njih moglo delovati u pravcu dobijanja čokoladne mase odgovarajućih reoloških karakteristika.

#### Temperatura

Viskozitet čokoladne mase zavisi od temperature i što je temperatura niža, to je njen viskozitet veći (*Gavrilović, 2003; Beckett, 2009*).

#### Proces končiranja

Da bi se dobila najređa moguća čokolada pri datom sadržaju masnoća, stepen smicanja/mešanja je kritičan. Ovo u velikom stepenu zavisi od konstrukcije konče i elemenata za mešanje. Postoje i drugi faktori koji su značajni, od kojih naročito redosled dodataka sirovina (emulgatora i masti) u konču i kontrola pogona elemenata za mešanje (*Beckett, 2002*). Takođe je od važnosti i vreme končiranja. Kraće vreme končiranja dovodi do intenzivnog povećanja viskoziteta, jer čvrsta čestice ne bivaju obavijene masnom fazom, što uzrokuje intenzivan kontakt među njima i rast viskoziteta. Sa druge strane, predugo končiranje takođe može prouzrokovati porast viskoziteta, pošto tokom dugog vremena



mešanja dolazi do oslobađanja toplote, koja izaziva otapanje kakao-maslaca i oslobađanje čvrstih čestica (Pajin, 2004).

Osim oblaganja čvrstih čestica mašću, tokom končiranja se uklanja vlaga iz čokoladne mase što ima veliku efekat na viskozitet (Beckett, 2009).

### Sadržaj masti

U većini čokolada sadržaj masti je između 25 – 35 %, a upravo je slobodna mast ta koja omogućava proticanje čokoladne mase, jer povećava razdaljinu između čvrstih čestica zbog čega dolazi do opadanja viskoziteta (Lanoiselle i Lecoupeau, 2003; Beckett, 2002; Beckett, 2009). Uticaj dodatka 1 % masti na viskozitet zavisi od količine već prisutnih masnoća i parametara viskoziteta koji se posmatraju. Ako je sadržaj masti u čokoladnoj masi preko 35 %, viskozitet se sa daljim dodacima masti veoma malo menja. Ali, kod sadržaja masti od 25 %, povećanje od 1 % ima dramatičan uticaj, posebno na plastični viskozitet, koji se smanjuje skoro na polovinu. Ove promene postaju još izraženije pri daljem smanjenju sadržaja masti, tako da je čokoladna masa sa manje od 23 % masti, u stvari, više pastozna nego tečna (Beckett, 2002; Beckett, 2009).

Uticaj masti se proporcionalno mnogo više odražava na plastični viskozitet nego na prinosnu vrednost. Beckett (2009) objašnjava da ovaj fenomen ne iznenađuje, jer se višak masti samo pridodaje na onu količinu koja se slobodno kreće, što potpomaže da čestice protiču jedna pored druge i dramatično smanjuje plastični viskozitet. Prinosna vrednost je više rezultat reakcija među čvrstim česticama i rastojanjima između njih, što znači da je manje pod uticajem dodatka masti.

Treba imati u vidu da uticaj na svojstva toka čokoladne mase ima, ne samo ukupan sadržaj masti, već i sadržaj čvrste faze masti, odnosno kristala kakao-maslaca. Kako se najčešće reološka ispitivanja čokoladne mase obavljaju na visokim temperaturama, nema mnogo podataka o sadržaju i vrsti kristala kakao-masti pod ovim uslovima. Gabriele i sar. (2008) su ispitivali reološka svojstva uzoraka čokolada sa različitim sadržajem masti na temperaturama od oko 30°C uz primenu dve brzine hlađenja. Pomoću modula elastičnosti i krivih puzanja utvrđeno je da količina i svojstva kristala zavise na različite načine od sadržaja masti i brzina hlađenja.

Mlečna mast ima jednak uticaj na viskozitet kao kakao-maslac, ako se unese u čokoladnu masu na 40°C, ali umanjuje brzinu očvršćavanja čokolade, utiče ne mekoću finalnog proizvoda i način rastapanja u ustima (*Beckett, 2002*).

Alternative kakao-maslacu dodaju se čokoladi iz različitih razloga, kao što su smanjenje troškova, ujednačavanje variranja svojstava kakao-maslaca u zavisnosti od porekla, smanjenja energetske vrednosti ili poboljšanja otpornosti na toplotu. Odabir ovih masti mora biti veoma pažljivo obavljen jer one mogu ispoljiti negativan uticaj na reološke karakteristike čokolade. *Mabeshwari i Reddy (2005)* navode da se alternative kakao-maslaca mogu upotrebljavati u količini do 5 % na masu čokolade, radi povećanja čvrstoće, bez značajnijih promena plastičnog viskoziteta ili napona smicanja mlečnih i crnih čokolada.

### Sadržaj šećera

Smatra se da je šećer inertni sastojak čokolade s obzirom na pokazatelje ukusnosti, i da on „samo“ doprinosi slatkoći. Promena sadržaja šećera za 1 – 2 % veoma utiče na proizvodne troškove i druge ekonomske pokazatelje, a kod 5 % dolazi do velikih promena ukusa čokolade. Fina kristalna saharoza se prilikom dobijanja čokoladnih konditorskih proizvoda koristi u količini do 50 % (*Beckett, 2002*). Laktoza, koja je komponenta suve materije mleka, je prisutna u manjim udelima u amorfnom obliku i u svom staklastom obliku ona održava deo mlečne masti (*Beckett, 2002*), što utiče na ukus čokolade i karakteristike njenog toka. Monosaharidi glukoza i fruktoza se retko koriste u proizvodnji čokolade, jer se oni teško suše. Njihova upotreba bi imala za posledicu da dodatna količina vlage u čokoladnoj masi pojačava interakcije između čestica šećera, uz porast viskoziteta. Laktoza može uspešno zameniti saharozu u mlečnoj čokoladi (*Afoakwa i sar., 2007*). Međutim, pri stajanju tečne čokoladne mase, može doći do prelaska laktoze iz amorfnog u kristalno stanje, što je praćeno oslobađanjem vlage, povezivanjem čestica mleka u prahu i povećanjem viskoziteta (*Beckett, 2009*).

Šećerni alkoholi, među kojima su ksilitol, sorbitol, manitol i laktitol se koriste u proizvodnji niskokaloričnih čokolada ili proizvoda bez šećera. Međutim, zamena saharoze sa šećernim alkoholima utiče na reološke osobine (*Sokmen i Gunes, 2006*), pa samim tim i na uslove proizvodnje i na kvalitet čokolade. *Sokmen i Gunes (2006)* su primetili da se prilikom

korišćenja maltitola dobijaju slične reološke osobine kao i prilikom primene saharoze, tako da se maltitol može preporučiti kao dobra zamena za saharozu u recepturama za čokoladu. Isti autori su takođe zapazili da čokolada sa izomaltom ima veći plastični viskozitet, dok ksilitol izaziva dobijanje povećanog indeksa ponašanja toka. U zemljama EU, dnevna potrošnja šećernih alkohola ograničena je na 20 g, zbog njihovog laksativnog dejstva (Krujer, 2009), a efekti hlađenja i nadimanja, kao i higroskopnost predstavljaju još neke od limitirajućih faktora za njihovu širu upotrebu u većini namirnica (Goldman, 2006).

Abbasi i Farzānmehr (2009) ispitivali se dodatak prebiotika inulina i polisaharida polidekstroze i maltodekstrina, kao zamena za šećer, i njihov uticaj na reološka svojstva mlečnih čokolada. Pokazalo se da oni uzrokuju povećanje sadržaja vlage u čokoladi i dodatno smanjenje Casson-ovog viskoziteta i napona smicanja kada se dodaju u srednjim količinama, dok pri višim koncentracijama dovode do povećanja pomenutih parametara u odnosu na kontrolne čokolade sa saharozom.

### Sadržaj mleka i proizvoda od mleka

Pošto voda vezuje čestice šećera, u proizvodnji čokolade se koristi suva materija mleka, a ne mleko u tečnom stanju, i njen udeo je oko 12 – 25 %. Trigliceridi mlečne masti, u kojima dominiraju zasićene masne kiseline, imaju drugačiju kristalnu strukturu od onih u kakao-masti, mada se u njima nalaze odgovarajuće količine palmitinske, stearinske i oleinske kiseline – osnovnih kiselina samog kakao-maslaca. Mlečna mast je na sobnoj temperaturi uglavnom tečna (15 – 20 % čvrstih čestica), a čini oko 30 % ukupnog sadržaja masti u čokoladi (Afoakwa i sar., 2007).

Suva materija mleka se dodaje u obliku obranog ili punomasnog mleka u prahu i doprinosi ukusnosti, teksturi i karakteristikama toka čokoladne mase, zavisno od toplotnog tretmana i uslova sušenja. Za proizvodnju čokolade poželjno je mleko u prahu sa visokim udelom slobodne mlečne masti koja može direktno reagovati sa kakao-maslacem. Povećanje udela slobodne mlečne masti u mleku u prahu smanjuje odnos disperzne prema kontinualnoj fazi u čokoladi, te tako povoljno deluje na smanjenje vrednosti viskoziteta prema Casson-u (Keogh i sar., 2004), što omogućava lakšu i ekonomičniju proizvodnju čokolade (ušteda kakao-maslaca koji se dodaje u svrhu smanjenja viskoziteta).

Jedan od načina povećanja udela masti tokom sušenja raspršivanjem je povećanje udela proteina u mleku, što se postiže ultrafiltracijom (Keogh i sar., 2003). Naime, tokom postupka ultrafiltracije koncentrišu se proteini i mlečna mast, a smanjuje se udeo laktoze u suvoj materiji. Povećani udeo proteina, međutim, nepovoljno utiče na viskoznost čokolade čime smanjuje pozitivan učinak većeg sadržaja slobodne masti (Belščak-Cvitanović i sar., 2009b). Beckett (2002) navodi oprečno delovanje proteina mleka na reološka svojstva čokolade: frakcija kazeina deluje kao površinski aktivna materija i smanjuje viskozitet, dok proteini surutke dovode do njegovog povećanja.

### Raspodela čvrstih čestica po veličini

Slično viskozitetu, veličina čestica ne predstavlja pojedinačnu vrednost, već se radi o distribuciji, koja se može izmeriti pomoću uređaja sa rasejavanjem laserskog svetla. Realnu situaciju opisuje kriva, koja je poznata kao kriva raspodele veličina čestica, iz koje se može zaključiti kako treba voditi proces proizvodnje i kontrole kvaliteta čokolade.

Raspodela veličina čestica je ključna odrednica reoloških osobina čokolade i ona direktno utiče na senzorno opažanje. Najveće čestice su važne za osećaj u ustima s obzirom na peskovitost/zrnavost, ali manje čestice su važnije za karakteristike toka čokolade, posebno za prinosnu vrednost (Beckett, 2002). Tradicionalno, smatra se da su u kontinentalnoj Evropi dimenzije čestica čokolade 15 – 22  $\mu\text{m}$ , a u Severnoj Americi 20 – 30  $\mu\text{m}$  (Afoakwa i sar., 2007).

Generalno, plastični viskozitet i napon smicanja se smanjuju sa povećanjem prosečne veličine čestica u rasponu od 2  $\mu\text{m}$  do 50  $\mu\text{m}$ , pri konstantnom sadržaju masti i emulgatora (Pajin, 2004). Manja prosečna veličina čestica, a samim tim i veća površina, čine čokoladu gušćom, zbog toga što tako velika površina čestica nije potpuno obavijena kakao-maslacem.

Sa povećanjem finoće čestica prinosna vrednost raste dramatično, dok plastični viskozitet ostaje skoro nepromenjen, smanjujući se samo neznatno u jednom stadijumu. Ovo se dešava zbog toga što preko polovine zapremine čokolade zauzimaju čvrste čestice. Kako se njihova specifična površina povećava pri usitnjavanju, javlja se sve veći broj tačaka njihovog međusobnog kontakta, pa dolazi do njihovog strukturiranja. Ova struktura se

mora razoriti pre nego što čokolada počne da teče, što povećava prinosnu vrednost. Kada čokolada počne da teče, struktura se razara i male čestice mogu se zajedno kretati. Prema tome, između njihovog toka i toka velikih čestica ima vrlo malo razlika, pa plastični viskozitet ostaje skoro nepromenjen. Neznatno smanjenje njegove vrednosti je verovatno posledica oslobađanja vezane masti ili načina pakovanja čvrstih čestica (Beckett, 2002; Beckett, 2009).

Iako gornja granica veličine čestica iznosi 30  $\mu\text{m}$  zbog osetljivosti čula čoveka, ne usitnjavaju se sve čvrste čestice do uniformne vrednosti, zbog toga što se u tom slučaju ne bi mogle dobro međusobno složiti, tj. upakovati. Ako su prisutne i čestice drugih veličina, tolikih da se one mogu smestiti u prostor između prisutnih većih čestica, stepen ispunjenosti se povećava, a pri dodatku i čestica još jedne veličine, taj porast je izraženiji. Prema tome, za proizvođača čokolade bi bilo idealno da mlevenje čestica bude takvo da se one dobro mogu upakovati da bi zauzele najveću zapreminu, ali da se pri tome dobije najmanja površina koju treba pokriti mastima (Beckett, 2002).

Kod mnogih čokoladnih proizvoda javlja se bimodalna i trimodalna raspodela čestica (Afoakwa i sar., 2007). Do i sar. (2007) pokazali su da optimizacija raspodele čvrstih čestica zasnovana na smanjenju međučestičnih kontakata i njihovog agregacionog potencijala, mešanjem finih i grubih čestica, dovodi do poboljšanja reoloških i teksturalnih svojstava čokoladne mase. Naime, prividni viskozitet (pri brzini smicanja od 40  $\text{s}^{-1}$ ) i prinosna vrednost se smanjuju čak i pri veoma redukovanom sadržaju masti, što pomaže poboljšanju senzornih karakteristika takvih čokolada, pogotovo svojstava topljenja.

### Sadržaj površinski aktivnih materija (emulgatora)

Kontinualnu fazu čokolade čini mast, u kojoj se šećer, kao važan sastojak polidisperzne faze, ne rastvara, budući da je hidrofilan, ali lipofoban. Protok tečne čokolade omogućen je jer su šećer i druge čvrste čestice obložene mastima. Površinski aktivne materije imaju vrlo značajnu ulogu u obezbeđivanju toka čokoladne mase, zbog toga što pokrivaju površinu šećera i drugih čvrstih čestica, formirajući granični sloj između dveju faza, čime omogućavaju da se sadržaj masti u čokoladi smanji, uz održavanje odgovarajućih karakteristika toka.

Najpoznatije površinski aktivno sredstvo je lecitin, koji se u proizvodnji čokolade koristi od tridesetih godina prošlog veka, zahvaljujući svojoj sposobnosti da se posebno snažno veže za šećer. Lecitin, sporedni proizvod prilikom dobijanja sojinog ulja, je mešavina prirodnih fosfoglicerida (Minifie, 1989). Površinski najaktivnija komponenta sirovog lecitina u čokoladi je, kako se veruje, fosfatidilholin. Dodatak 0.1 – 0.3 % lecitina soje smanjuje viskozitet čokoladne mase više nego 10 puta veća količina kakao-maslaca i povećava toleranciju čokolade prema vlazi. Udeli lecitina veći do 0.5 % mogu uticati štetno na karakteristike toka jer se prinosna vrednost povećava sa povećanjem dodatka lecitina, mada obično plastični viskozitet nastavlja da se smanjuje (Schantž i Rohm, 2005). Porast prinosnih vrednosti je povezan sa međusobnim slepljivanjem čestica lecitina i nastajanjem micela u kontinualnoj fazi, ili stvaranjem dvostrukog sloja lecitina oko šećera, što, u oba slučaja ometa tok (Beckett, 2002; Afoakwa i sar., 2007). Stvarna količina lecitina koja se može upotrebiti pre nego što otpočne zgušnjavanje u izvesnoj meri zavisi od raspodele veličina čestica. Fino mlevena čokolada sa visokim sadržajem šećera može tolerisati veće količine lecitina, od grubo mlevene čokolade sa nižim sadržajem šećera. Faza proizvodnog postupka u kojoj se emulgator dodaje je od velikog značaja za njegovu efikasnost. Na primer, dodatak lecitina pred kraj končiranja smanjuje viskozitet više nego kada se ista količina lecitina doda na početku, jer dolazi do njegove apsorpcije od strane kakao-čestica. Njegovu efikasnost može, takođe, smanjiti i dugotrajno izlaganje relativno visokim temperaturama (Beckett, 2009).

Poliglicerol poliricinoleat (PGPR) dobijen polikondenzacijom i esterifikacijom ricinusovog ulja i glicerola, je veoma različito površinski aktivno sredstvo. On nema velikog uticaja na plastični viskozitet, ali dramatično utiče na prinosnu vrednost. Dodatkom samo 0.2 % PGPR-a u čokoladu, prinosna vrednost se smanjuje na polovinu one koja se dobija sa lecitinom, a pri dodatku od 0.8 % prinosna vrednost potpuno iščezava (Rector, 2000; Beckett, 2002; Schantž i Rohm, 2005), pa čokolada postaje njutnovski fluid, tako da lakše teče i brže očvršćava. Sličan rezultat se može postići dodatkom više kakao-maslaca, ali po većoj ceni. Rector (2000) je saopštio da čokolada sa 35 % kakao-maslaca ima sličnu prinosnu vrednost kao čokolada sa 32 % kakao-maslaca i 0.1 % PGPR-a. Nasuprot lecitinu, PGPR se u čokoladi ne strukturira unutar suspenzije, već povećava frakciju kontinualne faze i vezuje vodu preostalu u čokoladi, koja tako postaje nedostupna za hidrataciju i bubrenje

čvrstih čestica (Rector, 2000; Schantz i Rohm, 2005; Afoakwa i sar., 2007). Isto tako, pri koncentracijama od 0.3 % i većim, PGPR toliko smanjuje prinosnu vrednost da čak ni smanjenje veličine čestica nema uticaja, kako pokazuju probe koje su *Karnjanolarn i McCarthy (2006)* izvele na mlečnim čokoladama sa finim i grubim mlevenjem. Međutim, PGPR je manje efikasan u inhibiranju pojave sivljenja (Walter i Cornillon, 2001).

Mnogi proizvođači čokolade koriste PGRP i lecitin u kombinaciji kako bi ostvarili željenu prinosnu vrednost i plastični viskozitet – uravnotežavajući efekte koji smanjuju viskozitet (Schantz i Rohm, 2005).

### Sadržaj vode

Viskozitet čokolade je utoliko manji ukoliko ona sadrži manje slobodne vode (Gavrilović, 2003), a sa svakim novim procentom dodate vode ona postaje gušća, uz porast viskoziteta. Viskozitet raste sve do sadržaja vlage od 20 %, posle čega se izdvaja vodena faza (Beckett, 2002). Čokoladna masa obično sadrži oko 0.5 do 1.5 % vlage, koja je uglavnom vezana za njene sastojke (kakao-čestice, laktozu i sl.) i ima malo uticaja na svojstva proticanja. Ako je, pak, sadržaj vlage veći od navedenog, voda migrira na površinu čestica šećera slepljujući ih i formirajući agregate peskastih grudvica koje izazivaju povećanje trenja i prividnog viskoziteta. Beckett (2009) smatra da će, ukoliko čak i mala količina od 0.3 % vlage zaostane u čokoladnoj masi, biti potrebno dodati još 1 % kakao-maslaca da bi se dobio odgovarajući viskozitet, a pošto je kakao-maslac daleko najskuplja komponenta čokolade, važno je da se slobodna vlaga otkloni koliko god je to moguće tokom suve faze končiranja. Naravno, dodatak lecitina omogućava prisustvo većih količina vode u čokoladnoj masi uz zadržavanje korektnih svojstava toka.

### Vibracije

Vibriranje je važno pri uklanjanju mehurića vazduha iz čokolade ili pri kontroli težine tokom čokoladiranja. Prividni viskozite pri nižim brzinama smicanja se smanjuje sa povećanjem amplitude vibracija, a prinosni napon nestaje. Navedeno važi i za crne i za mlečne čokolade pri čemu frekvencija ima veću važnost od amplitude. Prema navodima Beckett-a (2009) moguće je dobiti čokoladu sa njutnovskim protokom primenom vibracija od 50 Hz i amplitude od 0.1 mm. Efekat je, međutim, povratan, i čokolada zadobija svoj prethodni viskozitet nakon prestanka vibracija.

## 2.7. KARAKTERISTIKE AMBALAŽNIH MATERIJALA ZA PAKOVANJE ČOKOLADA

Osim primarne uloge, da sadrži proizvod i pruža mu zaštitu od promena uzrokovanih spoljašnjim faktorima, ambalaža svojim dizajnom komunicira sa potrošačima, pružajući im nepohodne informacije o upakovanom proizvodu i olakšava njegovo konzumiranje, ispunjavajući tako i zadatak reklamiranja proizvoda (*Lazić i sar., 2004*). Ambalaža, takođe, održava nutritivna i senzorna svojstva proizvoda, produžava mu svežinu, a sama ne sme biti štetna po čovekovo zdravlje niti okolinu (*Curaković i sar., 1991; Robertson, 1992; Bureau i Multon, 1996; Abvenainen, 2003*).

Čokolada je proizvod osetljiv na variranja temperature, koje može dovesti do pojave sivljenja ili do izbijanja masne faze na površinu, što narušava senzorna svojstva čokolade, pre svega izgled i ukus. Takođe, ukoliko dođe do topljenja i ponovnog očvršćavanja, remeti se i tekstura čokolade. Neodgovarajući uslovi skladištenja, uticaj toplote u letnjim mesecima kao i visoka relativna vlažnost vazduha mogu biti uzročnici pojave još jednog nedostatka - beljenja čokolade.

Pojave oksidativne i lipolitičke užeglosti dovode do promene ukusa čokolade, a javljaju se kao posledica oksidacije nezasićenih masti, odnosno enzimske hidrolize triglicerida sa lancima kraće i srednje dužine. Kako je čokolada u pogledu sastava bogata mastima, vrlo je velika mogućnost apsorpcije stranih mirisa iz okolnog prostora ako nije adekvatno zaštićena odgovarajućim ambalažnim materijalima.

Na neke od navedenih pojava, koje dovede do pogoršanja kvaliteta čokolada, može se uticati pravilnim izborom ambalažnog materijala i ambalaže (*Robertson, 1992*).

Osnovni zahtevi za pakovanje čokolada su relativno jednostavni. Potrebno je obezbediti zaštitu od nečistoća, vlage, propuštanja masti i oštećenja pri rukovanju. Dugi niz godina, ove zahteve ispunjava aluminijumska folija, sa papirnom trakom koja pruža informaciju o proizvodu. Smanjenjem debljine folija i sličnim uštedama usled korišćenja papira dolazi do izražaja ekonomičnost ovog stila pakovanja. Istraživanja tržišta pokazuju da su potrošači naviknuti na ovakav način pakovanja čokolada.

Određen broj tabli čokolada se pakuje zajedno u kutije za zbirno pakovanje, najčešće od tvrdog kartona, mada se koriste i zupčasti E-tip valovitog kartona kao i



mikrovalni karton za slučaj potrebe veće jačine. Kada je potrebno produžiti održivost proizvoda, čokolada se umotava u termozavarivu ili polietilensku foliju.

Za većinu tržišta određen broj kutija za zbirno pakovanje se postavlja u mikrovalnu transportnu kutiju, koja se ili lepi lepkom ili zatvara lepljivom trakom. Druga mogućnost je da se one, zbog lakšeg rukovanja, zapakuju zajedno u providan, rastegljiv film, iako je u tom slučaju završna jedinica slabija od transportne kutije.

Još veća transportna i izložbena jedinica je paletna kutija, u kojoj je veliki sud, najčešće od valovitog kartona, napunjen proizvodom u rinfuznom stanju. Sve što prodavac treba da uradi je da skine poklopac i stavi ga ispred kutije, čime automatski dobija reklamu proizvoda (*Beckett, 2002*).

Prilikom izbora ambalažnog materijala mora se obratiti pažnja i na njegove karakteristike i sastav kako ne bi došlo do migracije komponenata iz ambalažnog materijala u proizvod. Naime, iako se ambalaža koristi radi zaštite namirnice od kontaminacije i kvarenja, ona ponekad može biti razlog pojave različitih hemikalija u samom proizvodu (*Baigrie, 2003*), čiji izvor predstavlja sam ambalažni materijal, ili upotrebljeni lepkovi i boje za štampanje (*Werlein, 2001; Duncan i Webster, 2009*). Čokolada ima snažnu tendenciju poprimanja hemikalija iz pakovanja, pa je s toga veoma bitno utvrditi postoje li određeni mirisi i ukusi koji su strani čokoladi a pripadaju ambalaži. U cilju utvrđivanja da li se uticaji različitih ambalažnih materijala mogu detektovati u prisustvu čokolade *Werlein (2001)* pribegao instrumentalnim merenjima pomoću elektronskog nosa. Utvrdio je da se mlečne čokolade i one bez mleka mogu međusobno razlikovati pri zagrevanju na 60°C a različiti ambalažni materijali na 120°C. Prenošenje isparljivih komponenata iz ambalaže u čokolade je bilo moguće ustanoviti na 120°C, što pruža mogućnost utvrđivanja obojenih materijala za pakovanje čokolada koji su bez mirisa i onih kod kojih dolazi do izvesne transmisije mirisa pri visokim temperaturama.

Savremena tehnološka dostignuća omogućavaju da se kvalitet hrane, proizveden raznim tehnološkim postupcima sačuva u odabranoj ambalaži optimalnim postupkom pakovanja. Da bi se nutritivna vrednost i kvalitetna svojstva prehrambenih proizvoda što duže zadržali, potrebno je odabrati adekvatnu i funkcionalnu ambalažu. Pri tome, trajnost visoko vrednih prehrambenih proizvoda, zavisi od zaštitnih karakteristika kombinacija

ambalažnog materijala, vrste i oblika ambalaže. U zavisnosti od kvaliteta upakovanog sadržaja, potreba, odnosno dužine održivosti proizvoda, postoji široka paleta ambalažnih materijala, njihovih kombinacija, specifičnosti primene ambalaže kao i raznovrsnost oblika i dizajna upotrebljene ambalaže (Gvozdenović i Lazčić, 2008).

Noviji literaturni navodi ukazuju na mogućnost korišćenja takozvane "aktivne" i "inteligentne" ambalaže, sa ciljem da se održi kvalitet i bezbednost upakovanog prehrambenog proizvoda. "Inteligentna" ambalaža podrazumeva korišćenje indikatora za kontrolisanje kvaliteta upakovanih proizvoda. Indikatori mogu biti prišvršćeni na spoljašnjoj strani ambalažne jedinice (indikatori vremena i temperature) ili, pak, mogu biti postavljeni u unutrašnjost ambalaže (bilo na dnu ili poklopcu), kao indikatori propuštanja kiseonika, ugljen-dioksida, indikatori rasta mikroorganizama i slično.

*Mexis i sar. (2010)* sproveli su zanimljivo istraživanje uticaja aktivne ambalaže, pakovanja u modifikovanoj atmosferi, kao i propustljivosti ambalaže prema kiseoniku na održanje kvaliteta crnih čokolada sa lešnicima tokom skladištenja na 20°C do 12 meseci. Čokolade su bile upakovane u kombinovane ambalažne materijale: polietilen tereftalat/polietilen niske gustine (PET/LDPE), polietilen tereftalat obložen silicijum oksidom/polietilen niske gustine (PET-SiOx/LDPE), i pakovane pod vakuumom, u prisustvu azota ili u prisustvu apsorbera kiseonika. Kontrolni uzorci su bili upakovani u aluminijumsku foliju. Rezultati analize brojnih parametara kvaliteta su pokazali da su crne čokolade sa lešnicima upakovane u aluminijumsku foliju zadržale prihvatljivost tokom 8 meseci skladištenja. Uzorci upakovani u PET/LDPE, nezavisno od atmosfere pakovanja, imali su trajnost između 8 i 9 meseci, oni upakovani u PET-SiOx/LDPE, bez obzira na atmosferu održali su se 11 meseci, dok su čokolade pakovane zajedno sa apsorberom kiseonika, bez obzira na vrstu upotrebljenog ambalažnog materijala, imale trajnost najmanje 12 meseci. Dakle, čokolade upakovane sa apsorberom kiseonika zadržavaju svoju aromu i nutritivni kvalitet znatno duže u odnosu na druge načine pakovanja.

Tokom proteklih nekoliko godina potrošnja hrane sa funkcionalnim svojstvima, pogotovo namirnica koje sadrže probiotike, značajno je povećana, pre svega zbog pozitivnih uticaja na zdravlje ljudi. Uz ostale faktore, ambalažni materijal ima važnu ulogu u očuvanju vijabilnosti ovih mikroorganizama na zadovoljavajućem nivou, radi obezbeđivanja

njihovog terapijskog dejstva tokom celokupnog roka održivosti. U tom kontekstu, osnovni pravac razmišljanja podrazumevao bi otklanjanje kiseonika kao štetnog elementa, bilo korišćenjem apsorbera, bilo upotrebom materijala nepropusnih za kiseonik ili selektivnih filmova. Međutim, uzimajući u obzir sve stresogene faktore koji nepovoljno utiču na vijabilnost probiotika, potrebno je izvesti dalja istraživanja radi izbora i razvoja adekvatnog ambalažnog materijala za pakovanje probiotske hrane, koji bi uz optimizaciju procesa proizvodnje, bio i tehnološki i ekonomski održiv (Talwalkar i sar., 2004; Da Cruz i sar., 2007).

## 2.8. PROBIOTSKE BAKTERIJE KAO FUNKCIONALNI DODACI HRANI

Podaci o pozitivnom učinku bakterija na zdravlje čoveka datiraju još iz persijske verzije Starog Zaveta (*Postanak 18:8*) (Rijkers i sar., 2010), međutim, ozbiljniji naučni interes za ovu temu pobudio je početkom prošlog veka ruski naučnik Elie Metchnikoff, mlađi kolega i saradnik Louis Pasteur-a, predloživši tezu da konzumiranje jogurta koji sadrži *Lactobacillus* smanjuje broj patogenih bakterija stvarajući kiselu sredinu u probavnom traktu čoveka. U svojoj poznatoj „Autointoksikacijskoj teoriji“ izneo je da se ljudski organizam polagano truje toksinima iz hrane te da postupno slabi zbog proliferacije crevnih patogenih bakterija čiji se broj može smanjiti upotrebom fermentisanih mlečnih napitaka. Inspirisan njegovom teorijom, japanski mikrobiolog Minoru Shirota prvi je izolovao soj “dobrih” bakterija koje su nakon ingestije uspele žive dospeti do creva. Te bakterije, pod imenom *Lactobacillus casei* vrste shirota, postale su tako prvi probiotski soj koji se od 1935. godine koristi u komercijalne svrhe (Heasman i Mellentin, 2001).

### 2.8.1. Sastav gastrointestinalnog trakta

Gastrointestinalni (GI) trakt čoveka predstavlja kompleksni eksoistem u kojem se odigravaju reakcije između hrane, mikroorganizama i ćelija domaćina. Bakterijska populacija crevnog trakta odrasle osobe sastoji se od preko 500 različitih vrsta. Mikroflora

probavnog sistema ima snažan uticaj na nutritivne, fiziološke i protektivne procese u organizmu. Konkretno, crevne bakterije direktno sprečavaju kolonizaciju od strane patogena putem kompeticije za nutrijente ili za mesta vezivanja na crevnom epitelu. Proizvodnjom antimikrobnih komponenata, isparljivih masnih kiselina i hemijskom izmenom žučnih kiselina, endogene bakterije takođe stvaraju i lokalno okruženje koje je nepovoljno za patogene, što je poznato kao „zaštitni efekat“ ili „otpor kolonizaciji“ (Radulović i sar., 2012; Šušković i sar., 2001). Koje vrste bakterija će trajno kolonizovati GI trakt zavisi od biohemijskih sposobnosti mikroorganizama, mikookruženja određenog od strane ćelija domaćina, kao i od dostupnosti hranljivih sastojaka.

Sastav GI mikroflore prolazi kroz značajne promene od rođenja do odraslog doba čoveka. Probavni sistem novorođenčeta je sterilan ali kolonizacija počinje odmah nakon rođenja i zavisi od načina i tipa ishrane, higijene i eventualne upotrebe lekova. Tokom prvih meseci života ishrana ima značajan uticaj na razvoj intestinalne flore. U periodu od nekoliko dana nakon rođenja dominiraju fakultativni anaerobi koji stvaraju okruženje povoljno za rast striktnih anaeroba. Tokom trećeg i četvrtog dana pojavljuju se bifidobakterije koje postaju dominantne sa brojem od  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/g kod dojenih beba, dok ih kod odojčadi hranjenih zamenama majčinog mleka ima u manjem broju. Tokom odvikavanja od mleka broj bifidobakterija se smanjuje za 1 log, a sastav mikroflore počinje da poprma karakteristike one kod odraslog čoveka. Tada dolazi do razmnožavanja obaveznih anaeroba poput *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* i *Clostridium*, koje postaju brojnije od bifidobakterija koje čine 5-10 % od ukupne flore. Starenjem, bifidobakterije karakteristične za odojčad (*B. bifidum*), bivaju zamenjene onima koje su tipičnije za odrasle osobe (*B. adolescentis*, *B. longum*) (Manojlović i sar., 2010).

Kod odraslih osoba sistem za varenje je pod uticajem nekoliko faktora koji mogu dovesti do promena u njegovom sastavu: upotrebe lekova (posebno antibiotika), ishrane, klime, starenja, bolesti, stresa, pH, infekcije, geografskog položaja, pa čak i rase (Murphy i sar., 2009). Zbog toga ne predstavlja iznenađenja da se flora GI sistema ne razlikuje samo od osobe do osobe, već varira i kod pojedinaca tokom života. Pored toga, prisutne bakterije nisu nasumično raspoređene duž probavnog trakta već se nalaze na nivou populacija sa pojedinim vrstama distribuiranim u specifičnim delovima trakta koji pružaju veoma različite uslove za preživljavanje raznim mikroorganizama.

Tako je u želucu rast mikroorganizama znatno smanjen zbog visokog aciditeta i prisustva kiseonika usled gutanja. Kao rezultat toga prisutni su acidotolerantni mikroorganizmi i fakultativni anaerobi kao što su laktobacili, streptokoke, kvasci, itd. U drugom delu trakta – tankom crevu, mikrofloru čine uglavnom fakultativno anaerobne bakterije kao što su laktobacili, streptokoke i enterobacterium, kao i anaerobi poput *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium*. U poslednjem delu probavnog sistema – kolonu, broj bakterija je vrlo visok zbog niskog redoks potencijala i relativno visoke koncentracije masnih kiselina kratkog lanca i iznosi oko  $10^9$ - $10^{12}$  cfu/ml (*Cummings i sar., 1989*). Kolon ima važnu ulogu i procesu digestije hrane i njegova mikroflora učestvuje u razgrađivanju ugljenih hidrata, proteina i aminokiselina. Mikroflora ovog regiona je veoma kompleksna i u njoj dominiraju anaerobne bakterije (vrste *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, itd.), dok fakultativnih anaeroba ima u manjem broju i predstavljaju ih uglavnom laktobacili, enterokoke, streptokoke i *Enterobacteriaceae*.

### 2.8.2. Bakterije mlečne kiseline kao probiotske bakterije

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju heterogenu grupu bakterija koje su široko rasprostranjene u prirodi. Ove bakterije nalaze se u GI i urogenitalnom traktu čoveka i životinja; ima ih u biljnom materijalu, svuda gde su prisutne složene organske materije i šećeri, nalaze se u mleku i mesu, u brojnim fermentisanim namirnicama; vezuju se za biološki konzervisane proizvode, pekarske proizvode i sokove koji previru; upotrebljavaju se i kao starter kulture u prehrambenoj industriji (*Radulović i sar., 2012*).

Neki rodovi BMK čine izuzetno važnu grupu probiotskih bakterija, koje kao deo autohtone mikroflora GI trakta ljudi i životinja, ispoljavaju značajan probiotski potencijal, zbog njihove istorije bezbednog korišćenja i opštih dokaza koji podržavaju njihovu pozitivnu ulogu. Naime, probioticima se mogu smatrati oni mikroorganizmi koji su bili uključeni u različite (fermentisane) namirnice tokom dugog niza godina bez ikakvih neželjenih dejstava ili su, pak, bili prisutni u gastrointestinalnom traktu zdravih ljudi i životinja (*Šušković i sar., 2001*).

Prema definiciji *FAO/WHO (2001)* probiotici su živi mikroorganizmi koji, primenjeni u adekvatnim količinama, ispoljavaju pozitivne efekte po zdravlje domaćina. Ti

uticaji se pre svega odnose na održavanje ili poboljšavanje ravnoteže intestinalne mikroflore (Fuller, 1989), a mogu ih ispoljavati bilo mono – ili mešane kulture živih mikroorganizama (Havenaar i Huis in't Veld, 1992). Najčešći probiotici su bakterije mlečne kiseline iz roda *Lactobacillus* spp., kao i neki sojevi *Bifidobacterium* spp. koje su ujedno i najviše korišćene i najpodrobnije ispitane probiotske bakterije danas. Pored navedenih mikroorganizama probiotska svojstva pripisuju se i određenim streptokokama, enterokokama, bakterijama propionske kiseline, te nekim kvascima i plesnima (Saarela i sar., 2000; Kailasapathy i Chin, 2000; Holzappel i sar., 2001; Hojsak, 2010). Pregled pojedinih sojeva mikroorganizama sa probiotiskim svojstvima prikazan je u tabeli 3.

Rod *Lactobacillus* predstavlja veliku grupu bakterija, koje i pored toga što su anaerobi, mogu da rastu u prisustvu kiseonika što ih čini mikroaerofilnim (aerotolerantnim) mikroorganizmima. To su gram-pozitivne, katalaza negativne, nesporogene, uglavnom nepokretne koke ili štapići, koje ne redukuju nitrate. Imaju striktno fermentativan metabolizam i prevode glukozu isključivo ili delimično u mlečnu kiselinu. Klasifikuju se kao homofermentativne (proizvode uglavnom mlečnu kiselinu) ili heterofermentativne (proizvode ugljen-dioksid, etanol, sirćetnu i mlečnu kiselinu). Optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u mezofilnom području (30-40°C), mada pojedini sojevi mogu rasti ispod 15°C, dok drugi uspevaju i na 55°C (Radulović i sar., 2012).

*Lactobacillus* vrste razlikuju se na osnovu fizioloških kriterijuma, fermentacije ugljenih hidrata, biohemijske i molekularne karakterizacije. Laktobacili imaju ključnu ulogu u proizvodnji fermentisanih namirnica: povrća, mesa i proizvoda od mleka. Tradicionalni proizvodi od mleka imaju veliki potencijal u pogledu mogućnosti izolacije novih sojeva koji se mogu upotrebljavati bilo kao starter kulture ili kao probiotici u proizvodnji funkcionalne hrane (Radulović i sar., 2012).

Tabela 3. Pojedini sojevi mikroorganizama sa probiotskim svojstvima  
Adaptirano iz: *Holzappel i sar. (2001)* i *Parvez i sar. (2006)*, uz dodatak sojeva

| <i>Lactobacillus</i> vrste   | <i>Bifidobacterium</i> vrste  | Ostale BMK  | Ostali mikroorganizmi   |
|--|---|---|---|
| <i>L. acidophilus</i> NCFM<br><i>L. acidophilus</i> LA-5<br><i>L. acidophilus</i> M92  | <i>B. adolescentis</i><br>ATCC 15703  | <i>Enterococcus faecalis</i><br>UGRA 10                               | <i>Bacillus cereus</i> var.<br>Toyo                                 |
| <i>L. amylovorus</i> DSM 20531   | <i>B. animalis</i> DN-173 010<br><i>B. animalis</i> MB5   |   | <i>Bacillus coagulans</i><br>GBI-30, 6086                           |
| <i>L. brevis</i> CD 2  | <i>B. bifidum</i> Rosell – 71<br><i>B. bifidum</i> G9-1   | <i>Enterococcus faecium</i> M-74<br><i>Enterococcus faecium</i> SF 68 | <i>Escherichia coli</i> Nissle<br>1917                              |
| <i>L. casei</i> Shirota<br><i>L. casei</i> DN114001<br><i>L. casei</i> CRL431  | <i>B. breve</i> YIT4010 (BBG)<br><i>B. breve</i> R070   |   |   |
| <i>L. crispatus</i> CVT-05<br><i>L. curvatus</i> CRL705  | <i>B. infantis</i> Rosell – 33<br><i>B. infantis</i> BBI  | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i><br>HV219                 | <i>Propionibacterium freudenreichii</i><br>ssp. <i>shermanii</i> JS |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i><br>151  | <i>B. lactis</i> HN019 (DR10)<br><i>B. lactis</i> Bi-07<br><i>B. lactis</i> BI-04<br><i>B. lactis</i> BB-12 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i><br>DSM 8865                          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>CNCM I-3856                      |
| <i>L. fermentum</i> RC-14<br><i>L. fermentum</i> VRI-033   | <i>B. longum</i> CNCM I-<br>3470  | <i>Pediococcus acidilactici</i><br>CNCM MA18/5M                       | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>Unique 28 S                       |
| <i>L. gallinarum</i> JCM2011<br><i>L. gasseri</i> OLL.2716<br><i>L. gasseri</i> ADH  | <i>B. longum</i> Rosell-175<br><i>B. longum</i> BB536   |   |   |
| <i>L. helveticus</i> CNCM I-1722<br><i>L. johnsonii</i> La1  | <i>B. subtilis</i> PB6<br><i>B. thermophilum</i> 20210  | <i>Sporolactobacillus inulinus</i><br>BCRC 14647                      | <i>Aspergillus oryzae</i>   |
| <i>L. salivarius</i> UCC118<br><i>L. salivarius</i> WB 21  |   | <i>Streptococcus thermophilus</i><br>CNRZ368                          |   |
| <i>L. paracasei</i> B21060<br><i>L. paracasei</i> CRL-341<br><i>L. paracasei</i> NFBC 338<br><i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i><br>DN114001 |   | <i>Streptococcus cremoris</i><br>NCIM 2285                            |   |
| <i>L. plantarum</i> 299v<br><i>L. plantarum</i> ST 31  |   | <i>Streptococcus salivarius</i> K12                                   |   |
| <i>L. reuteri</i> MM53<br><i>L. reuteri</i> ATTC 55730   |   |   |   |
| <i>L. rhamnosus</i> GG<br><i>L. rhamnosus</i> Rosell – 11  |   |   |   |

Vrste iz roda *Bifidobacterium* se generalno karakterišu kao gram-pozitivne, nesporogene, nepokretne i katalaza negativne. One su striktni anaerobi, iako neke vrste i sojevi mogu da tolerišu kiseonik u prisustvu ugljen-dioksida. Različitog su oblika: kratki savijeni štapići, mali štapići ili štapići u obliku slova Y. Mogu biti pojedinačni, u lancima od više ćelija, u zvezdolikim agregatima ili palisadnim formama. Kolonije su glatke, konveksne, bele boje, sjajne i meke konzistencije. Bifidobakterije se razlikuju od drugih mikroorganizama postojanjem specifičnog metaboličkog puta, tzv. bifidnog šanta, čiji je ključ enzim fruktozo-6-fosfat-fosfoketolaza (F6PPK) i na taj način se bifidobakterije direktno dokazuju. Tokom fermentacije sirćetna i mlečna kiselina proizvode se u molarnom odnosu od 3:2. Optimalna temperatura za njihov rast je od 31-41°C, u opsegu od 25-45°C. Bifidobakterije su manje tolerantne prema kiselinama od laktobacila i ne rastu pri pH manjim od 4.5. Sa druge strane, nutritivni zahtevi za rast bifidobakterija su manje složeni od onih za laktobacile, ali u pojedinim slučajevima bifidobakterija zahtevaju posebne uslove za optimalan rast. Bifidobakterije su prirodni stanovnici GI trakta i sojevi sa probiotskim svojstvima su uglavnom humanog porekla. *Bifidobacterium* vrste čine značajan deo probiotskih kultura koje se koriste u proizvodnji funkcionalne hrane (Radulović i sar., 2012).

### 2.8.3. Mehanizmi delovanja probiotskih bakterija

Generalno, tokom života zdrave osobe javljaju se periodi neoptimalnog zdravlja. Uzroci za to su raznoliki, kao što su respiratorne ili crevne infekcije, umor, upotreba lekova, hroničan stres, bilo fiziološki ili psihološki, kao i brojni spoljašnji nadražaji koji mogu oslabiti prirodni odbrambeni sistem organizma (Janković i sar., 2010).

Iako je poznato da probiotici ispoljavaju određene blagodeti po zdravlje, malo se zna o mehanizmima njihovog dejstva na molekularnom nivou. Mehanizam delovanja može varirati u zavisnosti od vrste probiotika (npr. isti efekat se postiže na različite načine), ili, pak, može nastati kao rezultat kombinacije faktora, čineći njegovo razjašnjenje veoma kompleksnim.

Ispoljeni efekti mogu poticati od samih probiotika i biti vezani za proizvodnju određenih enzima ili metabolita koji deluju direktno na nepoželjne mikroorganizme ili se mogu ispoljavati posredstvom bakterijske DNK ili komponenata ćelijskog zida (Rijkers i sar., 2010). Sa druge strane, moguće je da probiotici podstiču organizam domaćina da sam proizvede korisno dejstvo (FAO/WHO, 2001).



Pretpostavlja se da načini delovanja probiotika uključuju sledeće:

- inhibicija rasta i delovanja patogenih mikroorganizama u GI traktu (promenom pH vrednosti, proizvodnjom bakteriocina, kiselina i dr. komponenata, kompeticijom za hranljive materije, posebno ugljene hidrate, potom faktore rasta i mesta za vezivanje na crevnom epitelu)(*Collado, 2009; Hojsak, 2010*);
- modulacija metaboličkih procesa u GI traktu (bilo povećanjem aktivnosti nekih enzima kao što je  $\beta$ -galaktozidaza, koji je deficitaran kod osoba koje su osetljive na laktozu, bilo smanjenjem aktivnosti određenih bakterijskih enzima koji učestvuju u kancerogenim procesima) (*FAO/WHO, 2001; WGO, 2008*);
- stimulacija imunog sistema domaćina (povećavanjem nivoa antitela i prenošenjem imuno-odgovora preko imunog sistema sluzokože creva na druga mesta u organizmu prekrivena sluzokožom, pre svega respiratorni i urogenitalni sistem) (*Ng i sar., 2009*);
- regulacija funkcije crevnog epitela (obnavljanjem oštećene crevne barijere i sprečavanje oštećenja epitela uzrokovanog citokinima, blokiranje proinflamatornih odgovora patogenih bakterija)(*Ng i sar., 2009; Tang, 2009*).

Na bazi navedenih mehanizama delovanja mogući su pozitivni učinci probiotika na zdravlje.

#### 2.8.4. Uticaj probiotskih bakterija na zdravlje

Zdravstveni efekti povezani sa upotrebom probiotika su brojni (*Otles i sar., 2003; Brown i Valiere, 2004*). Navedeni mehanizmi delovanja otvaraju mogućnost različitim kliničkim primenama, koje su na početku bile ograničene na crevne bolesti i infekcije, a danas su njihove indikacije proširene.

Benefiti po zdravlje pripisani probioticima u literaturi mogu se kategorizovati kao nutritivni i terapijski (*Tamime i sar., 2003; Radulović i sar., 2010*).

Nutritivni benefiti uključuju njihovu ulogu u povećanju biodostupnosti gvožđa i minerala (*Oda i sar., 1994; Scholz-Abrens i sar., 2007; Sażawal i sar., 2010a*), poboljšanju svarljivosti proteina i sintezi mnogih vitamina (*Lee i Salminen, 2009*).

Terapeutski efekti probiotika saopšteni u literaturi obuhvataju:

- prevenciju i lečenje različitih vrsta dijareja, hroničnih upalnih bolesti creva (kao što su Kronova bolest, gnojni i ulcerozni kolitis i dr.) i sindroma nadražanog creva;
- lečenje infekcije izazvane delovanjem *Helicobacter pylori* odgovorne za nastanak gastritisa, čira i kancera želuca (Marteau i Boutron-Ruault, 2002; Sullivan i Nord, 2005; Sheil i sar., 2007, Lee i Salminen, 2009);
- stimulaciju proizvodnje  $\gamma$ -interferona koji povećava otpornost prema infekcijama, kao što su npr. infekcije respiratornih puteva (Hojsak, 2010);
- povećanje aktivnosti laktaze u mleku čime se smanjuje intolerancija na laktozu (De Vres i sar., 2001; Lomer i sar., 2008);
- smanjenje broja faktora koji dovode do bolesti srca i krvnih sudova (Naruszewicz i sar., 2002);
- snižavanje nivoa holesterola u serumu (Klaver i Van der Meer, 1993; De Smet i sar., 1998);
- suzbijanje alergija (Prescott i Bjorksten, 2007; Carić, 2010);
- povećanje nivoa imunoglobulina (IgG), čime se pospešuje otpornost organizma;
- smanjenje rizika od pojave nekih vrsta kancera, kao što su kancer debelog creva (Wollonski i sar., 2001; Rafter, 2003; Rafter, 2004; Brown i Valiere, 2004), bešike ili dojke (Bruce i Reid, 2003; Rao i sar., 2007; Lee i Salminen, 2009);
- pospešivanje lečenja oralnih infekcija i karijesa (Tvetman i Stecksén-Blicks, 2007; Glavina, 2010);
- sprečavanje ponovne pojave bakterijskih vaginoza i gljivičnih vaginitisa (FAO/WHO, 2001; Falagas i sar., 2006; Falagas i sar., 2007).

Budući da je poslednjih nekoliko godina došlo do naglog širenja antibiotske rezistencije i smanjivanja delotvornosti antibiotika, razvoj primene probiotika kao bioterapeutika predstavlja obećavajuću alternativu sa ciljem smanjenja upotrebe antibiotika (Sleator i Hill, 2008). Pojedini probiotski sojevi su ispoljili višestruke efekte u pravcu sprečavanja invazije i vezivanja patogenih mikroorganizama, inhibiranja rasta enteropatogena *in vivo* i jačanja imunog odgovora. Uzimajući navedeno u obzir, upotreba probiotika može da smanji zavisnost od antibiotskih tretmana (Radulović i sar., 2012). Zbog

toga su mogućnosti biotehnoške proizvodnje i primene probiotika kao “živih lekova” dospeli u središte naučnih istraživanja (Šušković i sar., 2009).

Smatra se da učinak probiotika ne zavisi samo od njihove vrste već i od upotrebljene doze. Neophodne doze probiotika veoma variraju u zavisnosti od soja, a u literaturi se kao faktori od značaja navode još i učestalost dnevne primene, kao i njeno trajanje, te način njihovog dostavljanja u organizam (hrana, napici, kapsule, tablete ili prah) i vijabilnost probiotskih bakterija (Lee, 2009). Da bi ostvarile svoju terapijsku funkciju, minimalan broj probiotskih bakterija prilikom konzumiranja, prema nekim autorima, mora biti  $\geq 10^6$  cfu/g (Doleyres i Lacroix, 2005; Bernardeau i sar., 2006), dok drugi tvrde da ne sme biti manji od  $10^7$  cfu/g (Ouwehand i Salminen, 1998). Na osnovu smernica predloženih od strane Udruženja svetskih gastroenterologa, nije moguće izneti opštu potrebnu dozu probiotika, već se doziranje mora zasnivati na istraživanjima na ljudima i pokazanim benefitima po zdravlje (WGO, 2008).

Lee i Salminen (2009) na spisak faktora koji uslovljavaju efikasnost primene probiotika pridodaju još i vrstu bolesti/tegober/stanja koji se tretiraju, kao i stanje (GI trakta) samog domaćina.

Naravno, ne mogu se sva povoljna svojstva pripisivati svakoj vrsti probiotika i potrebno je da za svaki soj postoje dokumentovani dokazi o efektima koji se postižu. U daljem tekstu navedene su koristi primećene kod pojedinih sojeva probiotskih bakterija.

### *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Istraživanja *in vitro* su pokazala da *Lactobacillus acidophilus* NCFM poseduje nužan preduslov za preživljavanje tranzita kroz GI trakt, otpornost na žučne soli, nizak pH kao i digestivne enzime (Daniel i sar., 2006; Ouwehand i sar., 2009). *L. acidophilus* NCFM pokazuje dobro prijanjanje na epitel ćelija (Greene i Klaenhammer, 1994) i intestinalnu sluzokožu (Collado i sar., 2007), a pored toga, može da spreči prijanjanje nekih patogena (Collado i sar., 2008).

U kombinaciji sa još 4 probiotska soja, pokazalo se da *L. acidophilus* NCFM stabilizuje intestinalnu mikrofloru kod ljudi nakon terapije antibioticima (Engelbrekston i sar., 2006), a da u kombinaciji sa rastvorljivim vlaknima i glutaminom poboljšava stanje kod dijareja povezanih sa antiretroviralnim terapijama (Heiser i sar., 2004).

U jednom nasumičnom istraživanju velikog opsega uočeno je da *L. acidophilus* NCFM, upotrebljavan pojedinačno ili u kombinaciji *B. lactis* Bi-07, smanjuje pojavu simptoma infekcija respiratornog trakta, kao što su groznica, kašalj, “curenje” nosa kod dece (Leyer i sar., 2009). Navedeno se, između ostalog, može objasniti uticajima ovog soja na modulaciju imunih odgovora (Ouwehand i sar., 2009).

Nadalje se pominje da ovaj soj smanjuje simptome netolerancije na laktozu kod dece i pomaže u kontroli urogenitalnih infekcija kod žena (Sanders i Klaenhammer, 2001).

Jedno od najnovijih saznanja o *L. acidophilus* NCFM vezano je za njegovu sposobnost da pobuđuje  $\mu$ -opioidne i kanabinoidne receptore u probavnom traktu životinja. Tako dolazi do nestanka bola u stomaku, što može imati veliki značaj kod oboljenja kakva su npr. sindrom nadraženih creva ili dečiji kolitis, ali navedeno zahteva dalja istraživanja na ljudima (Rousseaux i sar., 2007; Ouwehand i Lahtinen, 2009).

#### *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019

Slično prethodnom soju, i u slučaju *B. lactis* HN019 *in vitro* istraživanja su pokazala da poseduje neophodne preduslove za preživljavanje tranzita kroz probavni sistem, otporan je na žučne soli, nizak pH i enzime digestivnog trakta (Prasad i sar., 1999). Takođe ovaj soj ima sposobnost prijanjanja na epitel ćelija čoveka (Gopal i sar., 2001) i ne degradira intestinalnu sluzokožu (Shu i sar., 1999). Odsusutvo negativnih uticaja tokom ispitivanja na ljudima i duga istorija komercijalne upotrebe indikator su njegove bezbednosti (Zhou i sar., 2005; Ouwehand i sar., 2009).

Najveći benefit soja *B. lactis* HN019 jeste sposobnost modulacije imunog sistema, što je potvrdio čitav niz ispitivanja, kako na životinjama, tako i na ljudima, pogotovo strarijom populacijom, koja najčešće ima smanjeni imunitet. Iako kod najvećeg broja probiotskih sojeva uticaj na imuni sistem jenjava odmah nakon prestanka njihove primene, u slučaju *B. lactis* HN019, efekti su primećeni i nakon 6 nedelja od upotrebe (Gill i sar., 2001; Zhou i Gill, 2005).

Mnoge studije su potvrdile aktivnost *B. lactis* HN019 protiv gastrointestinalnih oboljenja (Shu i Gill, 2001; Shu i sar., 2001). Ispitivanja koja su uključivala više od 600 dece uzrasta od 1-3 godine ukazala su da konzumiranje *B. lactis* HN019 tokom godine dana, u kombinaciji sa galaktooligosaharidima, smanjuje mogućnost pojave dizenterije. Dodatno,

primena ovog probiotika vremenski smanjuje trajanje ozbiljne bolesti ili groznice, kao i pojave infekcije srednjeg uha (Sazawal i sar., 2010b). Isto tako, istraživanje koje su sprovedeli Sazawal i sar., (2010a) pokazalo je da ovaj probiotski soj u kombinaciji sa prebiotikom doprinosi boljoj resorpciji gvožđa i smanjenju pojave anemije kod predškolske dece.

### *Streptococcus thermophilus*

Ima dugu tradiciju upotrebe kao starter kultura za proizvodnju jogurta, i u unapređenju opšteg i, posebno, zdravlja digestivnog trakta. Fermentiše laktozu u mlečnu kiselinu koja je vrlo efikasna u prevenciji intolerancije na laktozu. Nastankom mlečne kiseline snižava se pH čime se prevenira razvoj bakterija koje dovode do trovanja ([www.probiotic.org](http://www.probiotic.org)).

Ćelijska struktura *S. thermophilus* omogućava mu da izdrži povišene temperature tokom industrijskih postupaka. Ovim bakterijama nedostaju geni koji sadrže površinske proteine. Navedeno je važno zbog toga što patogene bakterije koriste ove površinske proteine kako bi se vezale za sluzokožu i “sakrile” od odbranbenog sistema organizma. Pomažu kod hroničnog gastritisa (Rodríguez i sar., 2010), a pokazale su se kao vrlo dobre kod smanjenja dijareja kod odojčadi i dece (Marteau i Boutron-Ruault, 2002; Sullivan i Nord, 2005).

Imaju sposobnost da spreče pretvaranje nitrata u kancerogene nitrite. Takođe, pomažu kod infekcija tankog creva koje mogu biti veoma ozbiljne a ponekad i fatalne, kojima su podložni pacijenti pod hemoterapijom ([www.probiotic.org](http://www.probiotic.org)).

### *Bifidobacterium breve*

Ove bakterije odlikuju se jedinstvenom sposobnošću kompeticije sa ostalim bakterijama zbog velike raznovrsnosti molekula koje mogu da svare. Poseduju superiornu sposobnost da razgrade bilo koju vrstu hrane, čak i biljna vlakna koja se smatraju nesvarljivim.

Posebno važnu ulogu imaju u funkcionisanju kolona. U medicinskim istraživanjima obolenja kakva su npr. dijareja izazvana antibioticima, sindrom nadraženog creva, alergije i sl. povezuju se sa manjkom ovih bakterija. Izgleda da *B. breve* inhibira *E. coli*. Kitajima i sar. (1997) su utvrdili da *B. breve* može efikasno da kolonizuje nedovoljno razvijena creva kod

nedonoščadi i da doprinese njihovom bržem dobitku na težini, što je, verovatno, rezultat stabilizacije intestinalne flore. Manje poželjne bakterije koje ne ispoljavaju iste imune benefite kao *B. breve* mogu da kolonizuju organizam tokom bolesti ili stresnih perioda, tako da je potrebno nadomestiti nedostatak ovog probiotika, kako bi bolesti digestivnog trakta i nelagodnosti koje one prouzrokuju bile redukovane (*www.probiotic.org*).

Na kraju treba napomenuti da, i pored svih prednosti koje pružaju, upotreba živih probiotskih mikroorganizama nije potpuno oslobođena rizika, kako potencijalnog, tako i realnog, pogotovo u određenim populacijama (*Marteau, 2001*). Zbog toga je od nemalog značaja utvrditi mogu li se zdravstveni benefiti probiotika dostići bez hazarda povezanih sa upotrebom živih mikroorganizama. U poslednjih nekoliko godina pojavljuju se dokazi da čak i neživi ili inaktivisani organizmi i njihove komponente mogu biti jednako efektivni po zdravlje konzumenata, ali i značajno sigurniji za upotrebu (*Kataria i sar., 2009*).

#### 2.8.5. Kriterijumi za selekciju probiotskih bakterija

Izbor soja koji će biti upotrebljivan kao efikasan probiotik je složen proces.

Prilikom selekcije sojeva preporučuje se upotreba kombinacije fenotipskih i genetskih tehnika da bi se postigla identifikacija, klasifikacija i tipizacija. Za nomenklaturu bakterija potrebno je upotrebiti naučno priznata imena, i preporučeno je da se soj deponuje u međunarodnoj kolekciji kultura. Prema preporukama *FAO/WHO (2006)* neophodno je da se identifikacija mikroorganizma prilikom selekcije obavi do nivoa vrste, odnosno soja, s obzirom da sojevi probiotskih bakterija mogu ispoljavati različite uticaje na osnovu svojih specifičnih sposobnosti i enzimatske aktivnosti, čak i u okviru jedne vrste. Zbog toga su utvrđena probiotska svojstva vezana za određeni soj i ne mogu se pripisati drugom soju, nevezano za to pripada li on istoj bakterijskoj vrsti ili ne (*Schrezenmeir i De Vrese, 2001; Margolles i sar., 2009*).

Probiotski sojevi se mogu upotrebljavati i efiksano ispoljavati pozitivne uticaje u organizmu domaćina samo ukoliko ispunjavaju određene kriterijume (tabela 4). U osnovi, zahtevi za selekciju probiotskih mikroorganizama uključuju, pre svega, aspekt bezbednosti, potom funkcionalnosti, kao i tehnološki aspekt.

Mada je u poslednje vreme bilo predmet debata, humano poreklo probiotskih bakterija ipak se izdvaja kao najpoželjnije, između ostalog i zbog toga što se smatra da probiotski soj može funkcionisati bolje u okruženju sličnom onom iz koga je prvobitno i izolovan (npr. GI trakt čoveka) (Saarela i sar., 2000). Aspekt bezbednosti podrazumeva još i da sojevi imaju dugu istoriju bezbednog konzumiranja ili, pak, poseduju status “generalno priznati kao bezbedni” (GRAS) od strane Američke asocijacije za hranu i lekove (FDA) ili “kvalifikovanu pretpostavku bezbednosti” (QPS) od strane Evropske stručne komisije za bezbednost (EFSA), te da ne ispoljavaju patogena svojstva, ne izazivaju infektivne bolesti GI trakta, kao i da ne razlažu žučne soli (Saarela i sar., 2000).

Pojedine BMK poseduju gene antibiotske rezistencije, što, s obzirom na njihovu prisutnost u GI sistemu u velikom broju, može imati povoljno dejstvo na organizam domaćina. Međutim, zbog mogućnosti prenošenja ovih gena na patogene bakterije u crevima postoji potreba da se proceni bezbednost potencijalnih probiotskih sojeva vezano za njihovu sposobnost sticanja i širenja antibiotske rezistencije, što je jedan od esencijalnih kriterijuma pri selekciji probiotika (Radulović i sar., 2012).

Nadalje, probiotici moraju preživeti prolaz kroz gornji GI trakt, stići živi na mesto delovanja i, naravno, neophodno je da budu sposobni za funkcionisanje u okruženju prisutnom u crevima. Mikroorganizmi uneti sa hranom koji započinju svoj put ka donjem delu intestinalnog trakta preko usne duplje, izloženi su tokom tranzita kroz probavni sistem sukcesivnom stresu koji utiče na njihovo preživljavanje. Probiotske bakterije moraju da prevaziđu fizičke i hemijske barijere u GI sistemu, posebno kiselo okruženje u želucu, a potom i dejstvo hidrolitičkih enzima i žučnih soli u tankom crevu. Žuč utiče na smanjenje preživljavanja bakterija uništavanjem njihovih ćelijskih membrana, čije osnovne komponente čine lipidi i masne kiseline, a ovakve modifikacije mogu da utiču ne samo na propustljivost ćelija i njihovu vijabilnost, već i na interakcije između membrane i okruženja (Radulović i sar., 2012). Rezistencija na uslove humanog probavnog trakta varira od soja do soja. Karakteristično je za laktobacile da svoje pozitivne efekte ispoljavaju u tankom crevu - ileumu, dok je za bifidobakterije svojstveno da su aktivne u debelom crevu – kolonu (Goldin i Gorbach, 1992). Za proučavanje probiotskih sojeva u GI traktu potrebno je da postoje molekularne tehnike pomoću kojih bi se uneseni probiotici razlikovali od hiljada drugih bakterija

koje čine crevni ekosistem, kao i načini da se utvrde efekti probiotika na domaćina (*Saarela i sar., 2000*).

Sposobnost adhezije, kao i interakcije sa patogenim mikroorganizmima se smatraju važnim funkcionalno-fiziološkim kriterijumom za izbor probiotskih sojeva (*Salminen i sar., 2010*). Od sposobnosti adhezije tj. adsorpcije na crevni epitel zavisi zadržavanje probiotika u GI traktu, a samim tim i njihov uticaj na zdravlje. Adhezija probiotskih sojeva u intestinalnom traktu može biti specifična i nespecifična. Specifična adhezija označava vezivanje adhezina na površni bakterijske ćelije sa receptorom na ćeliji crevnog epitela. Nespecifična adhezija obuhvata elektrostatičke i hidrofobne interakcije (*Radulović i sar., 2012*) koje su često inicijalna faza koja prethodi specifičnoj adheziji (*Carić, 2010*). Probiotske bakterije ne moraju se vezivati isključivo na same epitelne ćelije, već i za sluzavi (mukozni) sloj koji izlučuju humane crevne ćelije, čime se podstiču imuni efekti i stabilizuje intestinalna barijera sluzokože (*Saarela i sar., 2000*).

Tabela 4. Zahtevi pri selekciji probiotskih sojeva (*Radulović i sar., 2012*)

---

|   |
|---|
| Procena bezbednosti: nepatogeni, netoksični, antialergijski, antimutageni |
| Poželjne metaboličke aktivnosti i otpornost na antibiotike/osetljivost    |
| Rezistencija na nizak pH, žučne soli                                      |
| Sposobnost adhezije na intestinalne ćelije                                |
| Sposobnost supresije adhezije patogena                                    |
| Proizvodnja antimikrobnih supstanci                                       |
| Kolonizacija GI sistema čoveka  |
| Antagonizam prema kancerogenim i patogenim bakterijama                    |
| Preživljavanje različitih tehnoloških postupaka u proizvodnji             |
| Klinički potvrđeni i dokumentovani uticaji na zdravlje                    |

---

Eksperimenti *in vivo* i *in vitro* su pokazali da se neki sojevi laktobacila vezuju za specifične receptore na zidu creva, zauzimajući na taj način mesto štetnim bakterijama (*Helicobacter pylori, Escherichia coli*). Još jedno od funkcionalnih svojstava neophodno pri selekciji probiotskih bakterija jeste i proizvodnja antimikrobnih komponenata. Među antimikrobne supstance koje proizvode probiotici, a koje predstavljaju značajnu prednost u borbi sa patogenim i drugim štetnim bakterijama, spadaju i masne kiseline, organske kiseline, vodonik-peroksid, diacetil, aceton, kao i najproučavaniji od svih - peptidi sa inhibitornim dejstvom - bakteriocini (*Todorov i sar., 2011*). Sposobnost probiotika da se



nastane u GI traktu povećava se sa njihovom sposobnošću da eliminišu konkurentske mikroorganizme.

Bakterijski enzim  $\beta$ -glukuronidaza može hidrolizovati mnoge glukuronoide (što je jedan od mehanizama detoksifikacije u organizmu) i tako oslobađati kancerogene aglikone u crevo. Radovi nekih istraživača pokazali su da je dodatak BMK u ishrani pacova značajno smanjio aktivnost nekih fekalnih enzima, povezanih sa kancerogenim efektom. Tako *L. acidophilus* smanjuje aktivnost spomenute  $\beta$ -glukuronidaze, ali i nitroreduktaze i azotoreduktaze (Rafter, 2003).

Pored gore navedenih kriterijuma, izabrani probiotski sojevi moraju biti u stanju da opstanu dobro u hrani i da poseduju odgovarajuća tehnološka svojstva (adekvatan rast, oporavak, pogodnost zamrzavanja, dehidratacije, skladištenja, distribucije). Osim toga, važno je da probiotik dodat u hranu obezbedi održavanje poželjnih senzornih svojstava, odnosno da ne utiče negativno na ukus, miris i teksturu hrane ili pića (Saarela i sar., 2000; Šušković i sar., 2001; Radulović i sar., 2012). Tehnološki aspekti neophodni za primenu probiotika u hrani detaljnije su opisani u poglavlju 2.8.5.1.

*In vitro* testiranja na osnovu navedenih kriterijuma za selekciju probiotika, iako ne predstavljaju definitivan korak u izboru soja, mogu da pruže korisne početne informacije. Od značaja u izboru soja je i validacija upotrebom model sistema, kao što je npr. SHIME (simulator humanog crevnog ekosistema), čiji je cilj da imitira kompleksne fiziološke i fizičko-hemijske reakcije *in vivo*. Međutim, krajnji dokaz probiotskih efekata zahteva proveru valjanosti kroz dobro osmišljena i statistički solidno izvedena klinička ispitivanja. Alati koji se mogu koristiti u takvim procenama obuhvataju *in vitro* studije, ispitivanja svojstava soja, farmakokinetičke studije, istraživanja na životinjama, korišćenje intestinalnih modela, ispitivanja na ljudima i epidemiološki nadzor. Pri navedenim istraživanjima neophodno je ispitati svaki soj pojedinačno (Radulović i sar., 2012).

#### 2.8.5.1. Tehnološki aspekti selekcije probiotika i faktori koji utiču na njihovu primenu u prehrambenim proizvodima

Generalni termin “probiotici” uključuje probiotske lekove/preparate (koji tretiraju, leče ili sprečavaju određenu bolest), probiotsku hranu (uključujući same namirnice ili

njihove sastojke, kao i dijetetske suplemente), mikrobe za direktno konzumiranje (probiotici za životinjsku upotrebu), kao i dizajnirane probiotike (genetski modifikovane) (Sanders, 2009).

Ishrana se samatra osnovnim faktorom u regulisanju kolonizacije mikroorganizama u GI traktu čoveka. Hrana štiti probiotike u želucu, a osim toga može sadržati i druge funkcionalne sastojke koji mogu interagovati sa probioticima i uticati na njihovu funkcionalnost (Ranadheera i sar., 2010).

Tradicionalni prehrambeni proizvodi sa probiotskim bakterijama su jogurt i kiselo mleko. Tehnike i tehnologije za inkorporaciju ovih organizama u mlečne proizvode su danas relativno razrađene. Permanentna pojava kliničkih dokaza o dobrobitima po konzumente i medijska pažnja koja prati ovakve sastojke, učinili su da probiotici danas postanu kategorija komponenata funkcionalne hrane koja se najbrže razvija (Sloan, 2004; Janković i sar., 2010; Cruz i sar., 2010). Fabrike prehrambenih proizvoda širom sveta tragaju za daleko širim opsegom primene probiotika u hrani i napicima. Međutim, inkorporiranje živih probiotskih mikroorganizama u hranu i, potom, održavanje istih u životu tokom celokupnog perioda skladištenja, predstavlja značajan izazov za prehrambene tehnologe.

Uopšteno gledano, kako navodi Crittenden (2009) postoji pet osnovnih momenata na koje se mora obratiti pažnja prilikom primene probiotika u hrani:

1. odabir kompatibilne kombinacije probiotskog soja i vrste namirnice u koju se probiotik dodaje;
2. primena postupaka proizvodnje koji omogućavaju preživljavanje probiotika;
3. obezbeđivanje sastava namirnice koji pogoduje razmnožavanju probiotika, ukoliko je potrebna fermentacija;
4. odabir sastava namirnice, ambalaže i uslova sredine koji omogućavaju adekvatno preživljavanje probiotika tokom lanca prodaje finalnog proizvoda i vremena skladištenja;
5. sprečavanje pojave neželjenih uticaja na ukus i teksturu proizvoda od strane probiotika.

Većina probiotskih preparata koji su komercijalno dostupni se dostavljaju u veoma koncentrovanoj formi i uglavnom su napravljeni za direktnu upotrebu u insutriji.

Korišćenje ovakvih preparata je uobičajeno imajući u vidu poteškoće vezane za razmnožavanje probiotskih mikroorganizama na licu mesta. Najčešće se ove komercijalne kulture mogu naći u zamrznutom ili u liofilizovanom obliku (*Saarela i sar., 2000*). Preparati se moraju skladištiti prema uputstvima proizvođača kako bi se izbegao brz gubitak vijabilnih ćelija. Za preparate u suvom, praškastom obliku to podrazumeva skladištenje na hladnom mestu i izbegavanje dodira sa vlagom, dok je za smrznute kulture važno održavanje konstantne temperature i sprečavanje ponovnih otapanja (*Mattila-Sandholm i sar., 2002*).

Probiotici mogu biti inkorporirani u hranu ili napitke na različite načine:

- suvim umešavanjem u hranu (kao što je npr. dečija);
- dispergovanjem u tečne ili polutečne proizvode (u tipu sokova ili sladoleda);
- inokuliranjem u fermentisane proizvode (slično jogurtu ili kiselom mleku).

U prva dva navedena slučaja probiotici se ne razmnožavaju u proizvodu i najčešće se dodaju u dozama reda veličine  $10^7$ - $10^8$  cfu/g. U fermentisanim proizvodima postoji mogućnost izvesnog rasta i povećanja broja probiotskih mikroorganizama tokom fermentacije, što omogućava dodatak nešto manjeg početnog broja mikroorganizama.

Broj održivih ćelija probiotika obično opada tokom skladištenja proizvoda, pri čemu stepen opadanja zavisi od niza faktora. Da bi se nadomestili eventualni gubici, teoretski je moguće postići prihvatljiv broj živih ćelija unošenjem veće količine probiotika tokom same proizvodnje, budući da je konzumiranje probiotskih organizama, generalno, bezbedno, tako da ne bi trebalo da predstavlja rizik po zdravlje (*Salminen i sar., 1998; Marteau, 2001; Snyderman, 2008*). Međutim, u praksi značajno prekoračenje u dozama probiotika, se može pokazati kao veoma skupa investicija, imajući u vidu relativno visoku cenu probiotskih kultura. Takođe, mogu postojati i ograničenja u smislu senzornih svojstava proizvoda u odnosu na količinu probiotika dodatih u hranu. Zbog svega navedenog, postavlja se kao imperativ održavanje vijabilnosti probiotika u hrani tokom njene proizvodnje i skladištenja (*Crittenden, 2009*).

Osnovni faktori od značaja koji mogu uticati na sposobnost probiotika da prežive u hrani uključuju:

- ♣ fiziološko stanje dodatih probiotika;

- ▲ fizičke i hemijske uslove proizvodnje namirnice;
- ▲ hemijski sastav proizvoda (kiselost, nutrijenti, vlaga, kiseonik);
- ▲ interakcije sa ostalim komponentama proizvoda (inhibitornim ili protektivnim);
- ▲ fizičke uslove skladištenja proizvoda (npr. temperatura) (Crittenden, 2009).

Prvi korak pri inkorporiranju probiotika u hranu je identifikovanje stepena podudaranja svojstava izabranih sojeva probiotika i tehnoloških faza proizvodnje namirnice, njenog sastava i uslova skladištenja. Navedeno može da označava i kompromis između željenih efekata po zdravlje i tehnoloških mogućnosti određene vrste probiotika za primenu u odgovarajućoj namirnici. Tokom procesa razvoja novog prehrambenog proizvoda potrebno je raditi sa sojem koji poseduje proverena probiotska svojstva, na kome su sprovedena istraživanja, kako bi se obezbedilo da izabrani soj ima dobru sposobnost preživljavanja u hrani, potom odgovarajuća tehnološka svojstva i, najvažnije, da ne utiče štetno na ukus, miris i teksturu namirnice.

Važan faktor u preživljavanju predstavlja *fiziološko stanje probiotika* u kome se nalaze jer suve ćelije u stanju mirovanja mogu imati dužu trajnost od vegetativnih ćelija. Bakterije su sposobne da odole nepovoljnim uslovima sredine aktiviranjem različitih mehanizama tolerancije stresa. Aktiviranje proteina stresa, izlaganjem ćelija nepovoljnim uslovima kao što su toplota, hladnoća, nedostatak hrane, nizak pH i osmotski pritisak, može usloviti da probiotici bolje podnose nepovoljne uslove tokom proizvodnje hrane, skladištenja i tranzita kroz GI trakt (Ross i sar., 2005).

*Temperatura* je jedan od kritičnih faktora koji utiču na preživljavanje probiotika tokom proizvodnje i skladištenja. Generalno se može smatrati da, što je temperature niža, to će i održivost probiotika u hrani biti stabilnija. Tokom same proizvodnje hrane, temperature iznad 45-50°C su škodljive po preživljavanje probiotika. Što je temperature viša, potrebno je kraće vreme izlaganja istoj, kako bi se izbegao ozbiljan pad u broju vijabilnih ćelija, i to vreme se meri u satima ili minutima na 45-50°C, a sekundama na višim temperaturama. Iz toga proizilazi da probioitike treba dodavati u fazama snižavanja temperature tokom proizvodnjih procesa. Povišene temperature, takođe imaju i štetno dejstvo tokom transporta i skladištenja proizvoda.

Za probiotske preparate koji su u obliku praha sa bakterijama u stanju mirovanja *aktivnost vode* je ključna determinanta za preživljavanje tokom skladištenja (Mattila-Sandholm i sar., 2002; Nebesny i sar., 2007). Sa povećanjem sadržaja vlage i aktivnosti vode, preživljavanje probiotika se značajno smanjuje. Probiotici mogu da prežive tokom dugog vremena skladištenja (12 meseci i više) na sobnoj temperaturi u suvim proizvodima, sve dok se u njima može održavati nizak nivo vlage (barem između vrednosti  $a_w$  od 0.2 do 0.3). Uopšteno se može smatrati da, što je aktivnost vode niža, to će preživljavanje bakterija biti bolje. Postoji značajna interakcija između aktivnosti vode i temperature, kada je reč o njihovom uticaju na preživljavanje probiotika u stanju mirovanja. Sa povećanjem temperature skladištenja povećava se i štetno dejstvo vlage. Mada precizan mehanizam koji dovodi do odumiranja probiotskih ćelija ostaje nepoznanica, smatra se da izvesnu ulogu u ovim procesima ima osmotski pritisak (Mugnier i Jung, 1985). Uprkos jasnim dokazima da vrlo niska vrednost aktivnosti vode pospešuje vijabilnost probiotika, mogu se javiti izvesna ograničenja u tehnološkom smislu vezana za smanjenje vrednosti aktivnosti vode do veoma niskog nivoa. Navedeno uključuje troškove energije za sušenje, nepovoljan uticaj na ukus hrane i poteškoće u vlaženju i dispergovanju preparata u prahu. Upotrebom odgovarajućeg ambalažnog materijala moguće je sprečiti gubitak vlage tokom skladištenja.

Laktobacili i bifidobakterije se smatraju anaerobnim mikroorganizmima i *kiseonik* može biti štetan po njihov rast i preživljavanje. Međutim, nivo senzitivnosti na kiseonik znatno varira među različitim vrstama i sojevima (Kawasaki i sar., 2006). Generalno, laktobacili, koji su uglavnom mikroaerofilni, su tolerantniji prema kiseoniku od bifidobakterija, na nivou na kom kiseonik ne predstavlja najvažniji faktor za njihovo preživljavanje. Sa druge strane, većina probiotskih bifidobakterija se ne razmnožava u prisustvu kiseonika (Crittenden, 2009). Međutim, mnoge bifidobakterije imaju enzimatske mehanizme (preko NADH-oksidade i NADH-peroksidade) za limitiranje štetnog dejstva kiseonika (Shimamura i sar., 1992). Soj *B. animalis* subsp. *lactis* je relativno otporan na oksidativni stres. Za sojeve osetljive na kiseonik dostupne su izvesne strategije za preveniranje štetnosti kiseonika u prehrambenim proizvodima. Antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina ili cistein, pokazali su se kao komponente koje poboljšavaju preživljavanje probiotika (Dave i Shah, 1997; Bolduc i sar., 2006), a isto tako i korišćenje

barijere prema kiseoniku ili pakovanje u modifikovanoj atmosferi (Tabvalkar i sar., 2004). Kako prisustvo kiseonika katkad šteti vijabilnosti probiotika u hrani, preporučuje se minimiziranje procesa koji uključuju visok nivo aeracije, posebno kada se upotrebljavaju bifidobakterije.

Kompatibilnost probiotika sa *ostalim komponentama u sastavu hrane* može imati značajan uticaj na preživljavanje bakterija. Interakcije između probiotika i drugih prisutnih sastojaka mogu biti štetne, neutralne ili, pak zaštitne po stabilnost probiotika (Mattila-Sandholm i sar., 2002). Na preživljavanje probiotika štetno dejstvo imaju antimikrobne komponente, ili povišen sadržaj sastojaka kao što su npr. soli, organske kiseline i nitrati (Boylston i sar., 2004; Kourkoutas i sar., 2006).

Posebno je interesantna interakcija između polifenolnih jedinjenja, sa dominantnim antioksidativnim svojstvima, i probiotika, do kojih može doći u nekim vrstama funkcionalne hrane, kao što su voćni jogurti ili probiotske čokolade. Naime, u pojedinim istraživanjima (Duda-Chodak i sar., 2008) se pominje da, interesovanje za polifenolne komponente raste, između ostalog, i zbog njihovih antibakterijskih svojstava prema mnogim bakterijskim vrstama, ali je većina radova zasnovana na patogenim mikroorganizmima ili onima koji izazivaju kvarenje hrane. Međutim, pojedini autori ukazuju da antioksidansi mogu takođe imati negativan uticaj i na bakterije koje su u čovekovom organizmu poželjne, kao što su probiotske bakterije (Tabasco i sar., 2011). Poznavanje interakcija između određenog probiotika i antioksidanasa je neophodno radi odgovarajuće upotrebe ovih komponenata. Naročito se javljaju nedoumice kada se hrana bogata antioksidativnim komponentama dopunjava probiotskim bakterijama (Duda-Chodak i sar., 2008), kao što je slučaj u eksperimentu sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije. Na osnovu rezultata dobijenih sa drugim mikroorganizmima moglo bi se pretpostaviti da bi prisustvo antioksidanasa moglo značajno da smanji broj probiotskih bakterija ili čak da dovede do njihovog uništenja. Osim toga, i neke druge komponente, kao što su tanini ili alkaliodi, mogu ispoljiti antibakterijske efekte. LoCasio i sar., su u svojoj studiji sprovedenoj 2006. godine ispitivali sposobnost pojedinih mikroorganizama uobičajeno prisutnih u hrani, među kojima i jednog probiotskog soja bifidobakterija, da apsorbuju i/ili transformišu određene flavonoide, uključujući i katehin. Čelije mikroorganizama su bile u stanju u kojem

se nisu razmnožavale ali su bile metabolički aktivne. Utvrđeno je da su gubici katehina bili minimalni (< 5 %), ili su potpuno izostali. *Duda-Chodak i sar. (2008)*, ispitivali su uticaj komponenata sa antioksidativnim svojstvima na *L.casei* kao predstavnika probiotskih mikroorganizama. Između ostalog, rezultati su pokazali da je katehin u koncentraciji od 100-400  $\mu\text{M}$  ispoljio stimulatívni efekat na rast *L. casei*. Nasuprot tome, *Tabasco i sar., (2011)* proučavali su dejstvo ekstrakta koštica grožđa bogatog flavan-3-olima na rast BMK i bifidobakterija. Rezultati su pokazali preovlađujući inhibirni uticaj ispitivanih ekstrakata na rast probiotskih bakterija. Međutim, bez obzira da li su u svojim istraživanjima utvrdili da pojedine polifenolne komponente sa antioksidativnim svojstvima ispoljavaju neutralan, stimulatívni ili inhibitoran uticaj na probiotske bakterije, svi pomenuti autori su došli do zajedničkog zaključka da navedeni uticaj veoma zavisi od koncentracije polifenola, njihove strukture i da se povećava sa sadržajem procijanidina. Osim toga, krajnji efekat zavisi i od vrste probiotskih bakterija, odnosno, specifičan je čak i na nivou soja.

Nadalje, neke supstance, substrati rasta, kao što su npr. izvori ugljenika (glukoza), izvori azota i faktori rasta (npr. ekstrakt kvasca ili proteinski hidrolizati), ili, pak, minerali i vitamini, mogu se dodati da bi pospešili rast probiotskih bakterija (*Rajiv i Shah, 1997; Kailasapathy i Chin, 2000; Mattila-Sandholm i sar., 2002*). Ostali sastojci namirnice mogu protektivno delovati na vijabilnost probiotika time što će delovati kao nosači (*Ross i sar., 2005; Saarela i sar., 2006*). Na kraju i sama struktura/matriks namirnice može delovati zaštitno. Primer za to je sir, u kome anaerobna sredina, visok sadržaj masti i celokupan sastav deluju kao branik koji pomaže zaštititi probiotskih ćelija, kako u samom proizvodu, tako i u intestinalnom traktu (*Boylston i sar., 2004*).

Komponente koje u najvećoj meri doprinose razvoju probiotika su, svakako, prebiotici. Ovi nesvarljivi oligosaharidi selektivno stimulišu razmnožavanje i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u kolonu, a zajedno sa njima ispoljavaju sinergistički efekat koji doprinosi zdravlju domaćina.

Od faktora koji mogu dovesti do smanjenja broja živih ćelija, pominju se određeni postupci tokom proizvodnje ili manipulacije same namirnice. Iako laktobacili i bifidobakterije spadaju u mikroorganizme sa debelim ćelijskim zidovima koji su u stanju da podnose sile trenja koje nastaju prilikom standardnih proizvodnih procesa hrane, izvesni

postupci koji uključuju jake sile trenja, kao što su mešanje ili homogenizacija, mogu dovesti do gubitaka ćelija. Isto tako, ponovno zamrzavanje jednom otopljenih ćelija uzrokuje oštećenje ćelijskih membrana i štetno je po preživljavanje probiotika.

Niske *pH* vrednosi u želucu predstavljaju jednu od prvih prepreka sa kojom se sreću probiotske kulture nakon ingestije, pa je sposobnost njihovog preživljavanja u ovakvim uslovima od izuzetne važnosti (Ross *i sar.*, 2005). Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da probiotske bakterije mogu da prežive tranzit kroz GI trakt čoveka u kojem su ćelije izložene vrednostima *pH* oko 2.0, mada je vreme izlaganja ovakvim uslovima relativno kratko (1-2 sata) (Salminen *i sar.*, 2004; Radulović *i sar.*, 2010). Bifidobakterije pokazuju manju toleranciju ka kiselosti, u odnosu na laktobacile, međutim, vrsta *B. animalis* subsp. *lactis* je tolerantnija prema kiselosti od većine ostalih bakterija u čovekovom intestinalnom traktu, te je zbog toga najčešće korištena bifidobakterija u hrani (Salminen *i sar.*, 2004).

Nosači, kao što su dijetalna vlakna, poboljšavaju vijabilnost na niskim vrednostima *pH* (Saarela *i sar.*, 2006). Preživljavanje laktobacila u kiseloj sredini je poboljšano u prisustvu šećera koji se mogu metabolisati, a koji omogućavaju protonima ćelijskih membrana da spreče snižavanje *pH* vrednosti unutar ćelije (Corvoran *i sar.*, 2005). Navedeno može poboljšati preživljavanje tokom tranzita kroz probavni trakt, mada poboljšanje preživljavanja tokom skladištenja hrane nije ispitano. Takođe, prisustvo mleka ili mlečnih proteina u želudačnom soku može znatno povećati *pH* vrednost i time omogućiti bolje preživljavanje nekih laktobacila i bifidobakterija (Charteris *i sar.*, 1998).

Uprkos nespornim benefitima koje ispoljavaju probiotski mikroorganizmi, njihova osetljivost na veliki broj pomenutih faktora, bilo tokom samog proizvodnog postupka, bilo nakon ingestije, može umnogome uticati na konkretne koristi njihove primene. Zbog toga se u poslednje vreme ulažu istraživački napor za iznalaženje novih tehnika zaštite probiotika, kako tokom proizvodnje i skladištenja, tako i tokom prolaska kroz sistem organa za varenje. U tom smislu indukcija urođenog ćelijskog odgovora na stres (Ross *i sar.*, 2005) tj. sposobnosti adaptacije na stres može značajno povećati preživljavanje tokom izlaganja toploti, sušenju ili dejstvu želudačne kiseline (Saarela *i sar.*, 2004; Desmond *i sar.*, 2004). Pored navedenog, dadavanje različitih protektivnih komponenata probiotskim



kulturama može takođe dovesti do poboljšanja njihove vijabilnosti tokom proizvodnje: na primer upotreba termoprotektanata kao što je trehaloza (Conrad i sar., 2000) tokom sušenja u spreju, ili krioprotektanata, poput inulina, nekih šećera ili sorbitola tokom procesa sušenja zamrzavanjem (liofilizacije) (Carvalho i sar., 2004).

#### 2.8.6. Mikroinkapsulacija kao način zaštite probiotskih bakterija

Kao jedan od načina zaštite korisnih probiotskih bakterija od nepovoljnih uslova okruženja, poput dejstva kiseonika, kiselosti hrane, smrzavanja, visokih temperatura ili vlage, prisutnih pri proizvodnim postupcima (liofilizacija, sušenje u spreju), delovanja bakteriofaga, i dr., koji ujedno predstavlja i sistem njihove isporuke ali i očuvanja u GI traktu čoveka, jeste mikroinkapsulacija. Ova tehnika se definiše kao proces pakovanja osetljivog materijala u specijalne polupropustljive polimerne membrane formiranjem čestica ili kapsula, koje potom mogu osloboditi svoj sadržaj kontrolisanom brzinom pod specifičnim uslovima (Shabidi i Han, 1993; Zuidam i Nedović, 2010). Na taj način se omogućava da aktivne komponente koje čine jezgro, budu odvojene od okruženja pomoću protektivnog filma, pri čemu samo odvajanje traje do momenta željenog oslobađanja funkcionalnog sastojka jezgra (Ross i sar., 2005). Polupropustljiva membrana omogućava prolaz nutrijenata ili metabolita, a sadržaj jezgra se oslobađa bilo mehaničkim cepanjem, rastvaranjem ili topljenjem membrane, bilo procesom difuzije (Kailasapathy, 2002), osmotskim šokom ili delovanjem povišenog pritiska (Zuidam i Nedović, 2010). Pominju se i agensi koji dovode do otpuštanja, tzv. okidači, među koje spadaju i promena pH vrednosti, dejstvo toplote, enzimska aktivnost, osmotski pritisak, prisustvo određenih hemijskih komponenata i vreme skladištenja (Gouin, 2004; Mortazavian i sar., 2007). U prehrambenoj industriji najčešće primenjivan način oslobađanja mikrokapsule je rastvaranje, npr. dodatkom vode u dehidrisane preparate. Osim zaštite, ovom tehnikom se doprinosi većoj stabilnosti komponenata jezgra, produžava trajnost i obezbeđuje njihovo neprekidno i kontrolisano otpuštanje (Vidhyalakshmi i sar., 2009).

Pri mikroinkapsulaciji probiotskih sojeva svaka mikrokapsula se sastoji od hidrokoloida obavijenih oko bakterijske ćelije. Najčešći geometrijski oblik kapsula je sferan

ili eliptičan, sa ujednačenom/glatkom ili, pak, hrapavom površinom. Kao što jezgro može biti sačinjeno od jedne ili više ćelija, tako se i membrana može sastojati od jednog ili nekoliko zidova, čime se povećava efikasnost inkapsulacije (*Strand i sar., 2004; Mortazavian i sar., 2007*). Kapsule mogu biti različitih veličina, od submikronskih, do onih od nekoliko milimetara.

Za izvođenje postupka mikroinkapsulacije na raspolaganju je nekoliko tehnika: emulgovanje, ekstruzija, sušenje (u spreju, u fluidizovanom sloju, sušenje zamrzavanjem - liofilizacija), kao i tehnike sprej-oblaganja (*Nedović i Willaert, 2004; Nedović i Willaert, 2005; Manojlović i sar., 2010; Petrović, 2011*). Najčešće se kao nosači koriste: alginat, kapa-karagenan, škrob, hitozan, želatin, lipidi, proteini surutke, voskovi (npr. karnauba), biogume, kao što su ksantan, guar guma ili guma rogača. Sa opremom koja je trenutno na raspolaganju tehnike poput emulgovanja ili ekstruzije ne mogu da obezbede velike količine mikro ili nano kapsula uniformne veličine. Uvođenjem tehnika sušenja ili sprej-oblaganja omogućilo je proizvodnju kapsula, odnosno čestica u dovoljnim količinama za industrijsku upotrebu (*Petrović i sar., 2007*).

Za uspešnu mikroinkapsulaciju postoji nekoliko neophodnih uslova:

- materijal za formiranje kapsula mora biti jestiv, jeftin, i kompatibilan sa namirnicom u koju će probiotik biti primenjen;
- proces mikroinkapsulacije mora biti jednostavan, jeftin i ne sme uticati na redukciju i vijabilnosti probiotika;
- efikasnost inkapsulacije mora biti visoka (npr. 100 % bakterija u suspenziji mora biti inkapsulisano);
- mikrokapsule moraju sadržavati veliku količinu (%v/v) probiotika;
- mikrokapsule ne smeju imati štetan uticaj na ukus i teksturu hrane ili pića (male kapsule veličine <30 μm);
- mikrokapsule moraju štititi probiotike od velikog broja spoljnjih faktora tokom proizvodnje i skladištenja, pri čemu su dva najvažnija faktora niska pH vrednost i vlaga;
- mikrokapsula mora biti u stanju da ispusti/oslobodi probiotske bakterije u crevima na tačno određenoj poziciji (*Crittenden, 2009*).

Ding i Shab (2009) su inkapsulisali deset probiotiskih sojeva (*L. rhamnosus*, *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* BI-04, *B. lactis* BI-07, HOWARU *L. rhamnosus* i HOWARU *B. bifidum*) na različitim nosačima: alginatu, guar gumi, ksantan gumi, gumi rogača i karagenan gumi, a potom su ispitivali njihovu otpornost prema dejstvu želudačne kiseline i žučnih soli u odnosu na kontrolne ćelije koje nisu bile inkapsulisane. Generalno, primena ove tehnike se pokazala uspešnom pri čemu su se alginat, ksantan i karagenan gume pokazale kao najbolji materijali za inkapsulaciju, budući da su u većoj meri odbezbjedili preživljavanje probiotiskih bakterija u odnosu na slobodne, pri izlaganju vrlo niskom vrednostima pH (2.0) i visokim koncentracijama soli. U drugom istraživanju ćelije *B. bifidum* koje su bile inkapsulisane na nosaču načinjenom od alginata, pektina i proteina surutke i zaštićene sa dve membrane, preživele su pH vrednost od 2.5 u trajanju od 2 sata, dok slobodne ćelije nisu preživele navedene uslove, a ovim sistemom je obezbeđena i dalja zaštita pri izlaganju ćelija dejstvu žučnih soli (Guerin i sar., 2003). Na osnovu *in vitro* testiranja nekoliko različitih probiotiskih sojeva, Kotikalapudi (2009) je u eksperimentu u okviru svoje magistarske teze, selektovala *L. acidophilus* kao soj koji će podvrgnuti inkapsulaciji na matriksu sačinjenom od mešavime proteina graška i alginata. Trimilimetarske kapsule su, zatim, izložene simuliranim uslovima želuca. Inkapsulacija navednih bakterija pokazala je značajan ( $p < 0.05$ ) protektivni efekat tokom dvočasovnog izlaganju pH = 2.0, pošto je gubitak vijabilnih ćelija unutar kapsula iznosio oko 1 log cfu/ml, dok su nezaštićene ćelije ispoljile gubitak veći od 6 log cfu/ml, tokom istog vremenskog perioda. Takođe je ustanovljeno da su laktobacili inkapsulisani na nosaču od kalcijum alginata pokazali povećanu toleranciju prema toploti (Selmer-Olsen i sar., 1999), a *B. ruminantium* sušene u spreju imale su produženu vijabilnosti tokom skladištenja (O'Riordan i sar., 2001). Isto tako, inkorporacija gumi akacije u medijum za sušenje bila je uspešna u poboljšanju stabilnosti sušenih kultura *L. paracasei* NFBC 338 tokom skladištenja na 15 i 30°C i to do 1000 puta, a pružila je i zaštitu bifodobakterijama (Lian i sar., 2002). Laktobacili sušeni u spreju koji je sadržao gumi akaciju, ispoljile su mnogo bolje preživljavanje nego kontrolne kulture tokom četvoronedeljnog skladištenja u širokom rasponu temperatura od 4 do 30°C. U istom eksperimentu je pokazano je da je njihovo preživljavanje čak 100 puta veće pri izlaganju životinjskim želudačnim sokovima tokom 120 minuta u poređenju sa kontrolnim kulturama sušenim u spreju (Desmond i sar., 2002).

*Vidhyalakshmi i sar. (2009)* predviđaju da će, uz stalan razvoj, u skoroj budućnosti mikroinkapsulacija dobiti još više na značaju pošto nije daleko dan kada će ona poslužiti kao alat za višestruku ispostavu korisnih komponenata na željena mesta u GI sistemu, uključujući probiotike, prebiotike i nutraceutike koinkapsulisane u istoj membrani, otvarajući tako nove oblasti njihove terapijske primene, a ujedno i ispitivanje složenijih matriksa namirnica.

Pored mikroinkapsulacije, jedan od najsavremenijih načina za održavanje vijabilnosti probiotika tokom dugog vremenskog intervala na sobnoj temperaturi predstavlja fizičko odvajanje probiotika od namirnice i okolne atmosfere. Ovo se na najjednostavniji način može postići smeštanjem probiotika u suvom stanju (prahu) u zapečaćene kesice sa određenom namirnicom ili napitkom, najčešće u sklopu ambalaže, kako bi sa njima izmešali neposredno pre konzumiranja (*Cittenden, 2009*).

#### 2.8.7. Primena probiotika u proizvodnji čokolade

Prehrambeni proizvodi koji sadrže probiotike predstavljaju jedno od najvećih tržišta funkcionalne hrane, pri čemu su najdostupniji proizvodi od mleka, poput jogurta, kiselog mleka, kefira, sireva, sladoleda ili smrznutih deserata. Imajući u vidu da je savremeni koncept ishrane evoluirao i da ishrana dobija novi terapijski i preventivni značaj, sve veći broj potrošača shvata njenu ulogu u zaštiti zdravlja i postizanja većeg kvaliteta života i blagostanja organizma. Međutim, kod jednog, nemalog, dela potrošača upotreba mleka i proizvoda od mleka je limitirana bilo zbog načina ishrane (vegeterijanska) ili iz tradicionalnih razloga, bilo zbog intolerancije na laktozu, sadržaja holesterola ili alergije na proteine mleka. Ovi razlozi promovišu ideju o redukovanju komponenata mleka kao nosača probiotskih bakterija, ili čak o zameni mleka drugim medijumima, čineći tako razvoj nemlečnih namirnica sa probioticima koje bi bile dostupne širim kategorijama potrošača, od suštinske važnosti (*Granato i sar., 2010*).

U tom svetlu probiotici se dodaju proizvodima na bazi soje ili cerealijskih, voćnim sokovima ili fermentisanom mesu (*Rivera-Espinoza i Gallardo-Navarro, 2010*), ali je najnovija ideja vezana za inkorporiranje probiotskih mikroorganizama u jednu od najomiljenijih namirnica – čokoladu.

Pretpostavlja se da čokolada može da bude mnogo superiorniji sistem za intestinalnu dostavu probiotika (Maillard i Landuyt, 2009). Primena probiotika u čokoladi može da ponudi dobru alternativu proizvodima od mleka, čime bi se omogućilo obogaćivanje asortimana čokolade (Maillard i Landuyt, 2009). Osim toga, prema nedavnom istraživanju sprovedenom na Univerzitetu u Gentu (Belgija), koje je podržano od strane Barry Callebaut, jednog od vodećih svetskih proizvođača kakao- i čokoladnih proizvoda, preko 80 % probiotika u čokoladi kao nosaču bezbedno prođu kroz želudac, naspram svega 20 % kada su nosači mlečni/jogurtne napici.

*Possemiers i sar. (2010)* su proširili ovu vrstu istraživanja na celokupan GI trakt. Oni su najpre poredili preživljavanje inkapsulisane mešavine probiotskih kultura *L. helveticus* CNCM I-1722 i *B. longum* CNCM I-3470 u crnoj i mlečnoj čokoladi u odnosu na mleko kao nosač, u simuliranim uslovima želuca i tankog creva. Došli su do podataka da je preživljavanje u mleku pomenutih probiotika bilo svega 17 % u uslovima želuca i tankog creva, dok su obe vrste čokolade obezbedile visok nivo preživljavanja: crna oko 80 %, a mlečna čak 91 %, zbog čega je mlečna čokolada izdvojena kao nosač probiotika za dalja istraživanja u adaptiranim uslovima debelog creva. Iako je mlečna čokolada kao matriks za probiotike ispoljila zanemarljiv uticaj na laktobacile i bifidobakterije, sa čak, primećenim smanjenjem njihovog broja, autori su utvrdili da nakon ingestije dolazi do znatnog povećanja broja korisnih bakterija oba soja i do uspešne kolonizacije creva nakon dugotrajene primene, dokazavši tako da čokolada predstavlja odlično rešenje za protekciju probiotika od stresnih uslova različitog porekla.

U drugom eksperimentu konstatovano je da probiotski soj *L. helveticus* M92 preživljava bolje u simuliranim uslovima GI trakta kada su ćelije mikroinkapsulisane na aliginatu, karagenanu i kazeinu, s tim što alginat daje najbolje rezultate u pogledu preživljavanja. Potom se pokazalo da navedeni probiotski soj preživljava pomenute uslove bolje kada se nalazi inkorporiran u čokoladi (crnoj i mlečnoj) kojoj su dodati maltitol i inulin, nego kao čista mikroinkapsulisana liofilizovana kultura. To pokazuje da čokolada (crna i mlečna) sa dodatkom prebiotika ima zaštitno delovanje na probiotske bakterije i čini dobar matriks za pripremu novog proizvoda sa funkcionalnim svojstvima (Carić, 2010).

Važan zaključak ovih istraživanja predstavlja i činjenica da je, kada je u pitanju čokolada, potrebna manja količina namirnice da bi se postigli terapijski efekti pripisani određenim probiotskim sojevima. Nadalje, kakao-maslac iz čokolada obezbeđuje zaštitu probiotskim bakterijama, pa nije potrebno čuvanje u frižideru, a rok trajanja samog proizvoda daleko premašuje onaj kod namirnica na bazi mleka ([www.maramor.com](http://www.maramor.com)).

Međutim, da bi se prevazišla ograničenja vezana za osetljivost probiotika i da bi oni u što većem broju dospeli u probavni sistem čoveka, potrebno je primeniti novi ili prilagoditi postojeći tehnološki postupak kako bi se omogućilo ne samo preživljavanje uslova tokom proizvodnje, već i dovoljna održivost probiotskih bakterija tokom dugotrajnog skladištenja (Nebesny i sar., 2007; Maillard i Landuyt, 2009). Navedeno svakako predstavlja veliki izazov za tehnologe i proizvođače namirnica koje ne pripadaju proizvodima od mleka, pogotovo ako se ima u vidu da se oni čuvaju na sobnoj temperaturi (Nebesny i sar., 2007).

Obogaćivanje čokolade vijabilnim ćelijama bakterija mlečne kiseline i bifidobakterijama, kao i razvoj modifikovanog tehnološkog postupka proizvodnje, kako bi se obezbedilo preživljavanje pomenutih bakterija doprinelo bi povoljnom uticaju ovih proizvoda na zdravlje ljudi. Ovakav pristup je od izuzetne važnosti budući da je čokolada jedna od omiljenih poslastica među decom.

Međutim, treba naglasiti da zbog njenog jedinstvenog ukusa i specifične teksture, zbog kojih je i naročito cenjena kod potrošača, senzorna svojstva čokolade ne smeju biti poremećena, uprkos dodatku bakterija mlečne kiseline, o čemu je potrebno posebno voditi računa.

Nebesny i sar. (2005) proizveli su u laboratorijskim uslovima čokolade bez šećera sa dodatkom izomalta, obogaćene bakterijama mlečne kiseline. Probiotske kulture *S. thermophilus* MK-10 i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 151 dodate su u čokolade sa jogurtom u prahu dobijenim sprej sušenjem. Čokolade sa izomaltom i jogurtom pokazale su zadovoljavajuća senzorna svojstva. Njihova energetska vrednost i konzistencija (čvrstoća) su bili slične u poređenju sa kontrolnim čokoladama bez šećera. Crne čokolade sa jogurtom i probioticima imale su nešto veće vrednosti ukupnog aciditeta i povišene reološke parametre u poređenju sa kontrolnim čokoladama bez šećera. Najvažnije, obe vrste čokolade imale su visok broj vijabilnih ćelija (približno  $10^7$  cfu/g) i nakon 6 meseci čuvanja na 4 i 18°C.

Nešto kasnije, isti autori su sproveli sličan eksperiment u kojem su crnoj čokoladnoj masi dodali sojeve *L. casei* i *L. paracasei* sa potencijalnim probiotskim svojstvima, koji su pri tome bili liofilizovani u mleku. Kao zaslađivači su korišćeni saharoza, izomalt ili aspartam. Primenjene BMK imale su dobru vijabilnost i nakon 12 meseci čuvanja na temperaturama od 4 i 18°C ( $10^6 - 10^7$  cfu/g). Senzorna svojstva i aciditet ispitivanih uzoraka crnih čokolada nisu se promenili dodatkom liofilizovanog preparata laktobacila. Jedina promena zapažena je kod energetske vrednosti i reoloških svojstava u zavisnosti od primenjene recepture, odnosno upotrebljenog zaslađivača i količine masti (Nebesny i sar., 2007).

Carić (2010) je proizvela čokolade sa sinbiotskim svojstvima, dodavši i crnu i mlečnu čokoladnu masu inkapsulisani liofilizovani probiotski soj *L. helveticus* M92 i prebiotike inulin i maltitol. Hemijska i senzorna svojstva ovako dobijenih čokolada bila su slična standardnim čokoladama, a broj živih probiotskih bakterija održao se na nivou  $10^6$  cfu/g tokom 12 meseci čuvanja. Ispitivanjima u simuliranim uslovima GI trakta pokazalo se da soj *L. helveticus* M92 bolje preživljava uslove želuca i tankog creva kada se nalazi u čokoladi nego kao čista mikroinkapsulisana liofilizovana kultura, čime je još jednom dokazano puferno dejstvo čokoladnog matriksa na preživljavanje probiotika.

Prema navodima Manojlović i sar. (2010), jednu od najnovijih tržišnih strategija predstavlja proizvodnja namirnica sa jasno vidljivim mikrokapsulama (po mogućstvu obojenim) raspoređenim u samom proizvodu, koje bi pored zaštitnog imale i dekorativni efekat. Čokolada je jedna od namirnica u kojoj bi navedena ideja mogla zaživeti i imati višestruke koristi posebno imajući u vidu njenu omiljenost kod dece.

Kao što se vidi iz navedenih primera primena probiotika u proizvodnji čokolada, je, iako veoma interesantna, još uvek u povoju i velikim delom je zastupljena na nivou naučnih istraživanja, bez većeg komercijalnog značaja.

Zainteresovani i ohrabreni rezultatima pomenutih autora, uz sagledavanje šireg potencijala čokolade kao namirnice bogate polifenolnim jedinjenjima, došli smo na ideju da proizvedemo različite vrste čokolada sa dodatkom probiotskih sojeva u industrijskim uslovima. Nasuprot većini pomenutih eksperimenata obavljenih u laboratorijskim uslovima uz korišćenje neke od komponenata mleka za aplikaciju probiotskih bakterija, ili, pak, upotrebom prebiotika kojim se pospešuje razvoj korisnih bakterija, opredelili smo se za teži

put koji je podrazumevao uključivanje probiotskih bakterija u mlečne i crne čokolade standardnog sastava, bez prisustva komponenata koje bi potpomogle njihovu održivost. U cilju utvrđivanja dužine perioda funkcionalnosti, kao i pojave i/ili stepena mogućih promena proisteklih dodatkom probiotika, obavljeno je određivanje vijabilnosti probiotskih kultura na dve temperature čuvanja (4 i 20°C), te ispitivanje senzornih, antioksidativnih i reoloških svojstava proizvedenih čokolada neposredno nakon proizvodnje i tokom skladištenja.



### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Savremena naučna saznanja u oblasti ishrane ukazuju da je uloga hrane, pored energetske i nutritivne, dopunjena funkcionalnim aspektom i zbog toga predstavlja izazov za istraživače u sferi nauke i biotehnologije hrane. Hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno deluju na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu. Stoga je sve više potrošača zainteresovano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi očuvanja ili poboljšanja zdravlja, podizanja kvaliteta života i opšteg blagostanja svakog pojedinca.

Permanentna pojava kliničkih dokaza o dobrobitima po konzumente i velika pažnja koju izazivaju ovi sastojci, učinili su da probiotici danas predstavljaju kategoriju komponenata funkcionalne hrane koja se najbrže razvija. Težnja da korisne, probiotske bakterije bezbednije i lakše prežive uslove gastrointestinalnog trakta, kao i potreba da budu dostupne tokom dužeg vremenskog perioda u odnosu na onaj koji je ograničen trajnošću proizvoda od mleka, nametnula je ideju da se obave opsežnija ispitivanja primene probiotika na čokoladi kao nosaču.

Kombinacija terapijskih efekata probiotika sa dobrobitima koje ispoljavaju polifenolna jedinjenja iz čokolada, kao priznate bioaktive komponente, integrisana u jednom proizvodu, čini takav proizvod jednom vrstom funkcionalne hrane.

Imajući u vidu sve prethodno navedene činjenice, osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sastojao se u:

- ♣ utvrđivanju optimalnih koncentracija probiotika koje bi bile inkorporirane u čokoladne mase različitog sastava (udeo kakao-delova, masti, šećera i/ili mleka) kako bi se dobio proizvod sa funkcionalnim svojstvima;
- ♣ praćenju vijabilnosti probiotskih bakterija dodatih u različite vrste čokolada nakon proizvodnje i tokom skladištenja na temperaturama od 4 i 20°C, kao i određivanju roka funkcionalnosti finalnih proizvoda.

Pored toga, cilj je bio da se utvrde eventualni uticaji probiotskih bakterija na:

- ▲ senzorna svojstva kvaliteta čokolada (izgled, tekstura, aroma), sa posebnim osvrtom na promenu boje i termalnih svojstava;
- ▲ sadržaj polifenolnih jedinjenja kao i antioksidativni kapacitet čokolada;
- ▲ reološke karakteristike (prinosni napon, viskozitet),  
u periodu od 0-30, 90 i 180 dana skladištenja.

Takođe, jedan od zadataka predstavljalo je ispitivanje pogodnosti upotrebljenih ambalažnih materijala za pakovanje čokolada sa probioticima.

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

### 4.1. MATERIJAL

#### 4.1.1. Uzorci čokolada

U okviru ovog eksperimenta korišćene su tri vrste čokoladnih masa različitog sastava i različitog udela kakao-delova, od kojih su proizvedene tri vrste čokolada. Sirovinski sastav čokolada, kao i njihove oznake prikazani su u tabeli 5. Sve čokolade proizvedene su u industrijskim uslovima fabrike „Štark“ a.d., Beograd.

Tabela 5. Nazivi, oznake i sastav različitih vrsta čokolada

| UZORAK                                     | TRGOVAČKI NAZIV                                      | OZNAKA UZORKA | SASTAV:   | PROIZVOD SADRŽI:                                   |
|--|--|---------------|---|--|
| Mlečna čokolada sa visokim sadržajem mleka | “Najlepše želje”, mlečna čokolada                    | <b>ML</b>     | Šećer, mleko u prahu, kakao-maslac, kakao-masa, obrano mleko u prahu, emulgator (soja lecitin), etilvanilin | <b>Min. 27 % ukupne suve materije kakao-delova</b> |
| Crna čokolada                              | “Menaž”, crna čokolada                               | <b>M</b>      | Šećer, kakao-masa, kakao-maslac, emulgator (soja lecitin), etilvanilin                                      | <b>Min. 44 % ukupne suve materije kakao-delova</b> |
| Crna čokolada                              | “Najlepše želje”, crna čokolada sa 75 % kakao-delova | <b>C</b>      | Kakao-masa, šećer, kakao-prah, kakao-maslac, emulgator (soja lecitin), etilvanilin                          | <b>Min. 75 % ukupne suve materije kakao-delova</b> |

**Kontrolni uzorci** čokolada, bez dodatih probiotika, u daljem tekstu označeni su kao u prethodnoj tabeli sa **ML, M i C**.

#### 4.1.2. Probiotske bakterije

Za rad su upotrebljene liofilizovane koncentrovane probiotske bakterije (slika 13, tabela 6) i to:

- ➔ *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup>, komercijalnog naziva HOWARU DOPHILUS (Danisco, Danska), u daljem tekstu skraćenog naziva Dophilus ili D;
- ➔ *Bifidobacterium lactis* HN019, komercijalnog naziva HOWARU BIFIDO (Danisco, Danska), u daljem tekstu skraćenog naziva Bifido ili B;

kao i DUOLAC MIX L3 mikroinkapsulisana mešavina sledećih probiotskih kultura:

- ➔ *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium breve* (Cell Biotech, Danska), u daljem tekstu skraćenog naziva L3, obavijenih dvostrukim (proteinskim i polisaharidnim) omotačem.



Slika 13. Izgled upotrebljenih preparata sa probiotskim bakterijama

Tabela 6. Nazivi, skraćenice, sastav probiotika i koncentracija ćelija u probiotskom preparatu

| Komercijalni naziv probiotskih bakterija | Skraćenice            | Sastav   | Koncentracija probiotskih ćelija u komercijalnoj kulturi cfu/g |
|--|-----------------------|--|--|
| HOWARU DOPHILUS                          | <b>Dophilus ili D</b> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <sup>®</sup> | $\geq 10^{11}$   |
| HOWARU BIFIDO                            | <b>Bifido ili B</b>   | <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019                | $\geq 10^{11}$   |
| DUOLAC MIX L3                            | <b>L3</b>             | <b>LA</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i>         | $\geq 10^{11}$   |
|  |                       | <b>ST</b> <i>Streptococcus thermophilus</i>        | $\geq 10^{11}$   |
|  |                       | <b>BB</b> <i>Bifidobacterium breve</i>             | $\geq 10^9$  |

## 4.2. METODE RADA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije podrazumevala su različite aktivnosti koje su se odvijale u nekoliko faza.

**Prva faza** ispitivanja predstavljala je sprovođenje **preliminarnog ogleđa** koji je realizovan u laboratoriji fabrike „Štark“ a.d., Beograd, kao i u mikrobiološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ovim ogledom utvrđene su optimalne koncentracije svake komercijalne probiotske kulture koje je potrebno dodati u čokoladne mase različitog sastava (sadržaja kakao-delova, masti, šećera, mleka), radi postizanja funkcionalnih efekata bez nepotrebnih prekoračenja u dodatim količinama, a koje, istovremeno, ne uzrokuju remećenje njihovih senzornih karakteristika.

U tom cilju obavljeno je niz proba pri čemu su u različite vrste čokolada dodavani svaki od ispitivanih sojeva probiotika u tri različite koncentracije (tabela 7), određene na osnovu smernica proizvođača komercijalnih kultura za postizanje funkcionalnog nivoa liofilizovanih, odnosno inkapsulisanih bakterija. Istovremeno, pod istim uslovima rada proizvedene su i tzv. kontrolne čokolade, koje nisu sadržavale probiotske kulture. Nakon toga je obavljena mikrobiološka analiza kojom je utvrđen broj vijabilnih ćelija dodatih probiotskih bakterija u različitim vrstama čokolada. Isto tako, senzornom analizom ocenjene su osnovna senzorna svojstva dobijenih čokolada (izgled, tekstura, aroma).

Tabela 7. Količine probiotika dodate u različite čokoladne mase tokom preliminarnog ogleđa

| Probiotik    | Dodata probna koncentracija (g/kg) |      |      |
|--------------|------------------------------------|------|------|
|              | C 1                                | C 2  | C 3  |
| DOPHILUS (D) | 1.75                               | 3.50 | 5.25 |
| BIFIDO (B)   | 0.85                               | 1.75 | 2.65 |
| L3           | 1.00                               | 3.50 | 5.00 |

**Druga faza** ogleđa obuhvatala je postupak proizvodnje različitih vrsta čokolada sa nekoliko sojeva probiotika utvrđenih koncentracija. Nakon proizvodnje finalni proizvodi su upakovani u odgovarajuću ambalažu, skladišteni na sobnoj temperaturi (20°C) i dalje ispitivani tokom perioda čuvanja. Jedan deo čokolada od svake vrste je skladišten i na temperaturi hlađenja (4°C), radi utvrđivanja vijabilnosti pod različitim uslovima čuvanja.

**Treća faza** istraživanja podrazumevala je, pre svega, praćenje vijabilnosti dodatih probiotskih sojeva tokom skladištenja. Nadalje, ovim delom eksperimenta obuhvaćeno je ispitivanje pojedinih svojstava čokolada, relevantnih za ovakvu vrstu proizvoda, i to: osnovni hemijski sastav, izračunavanje energetske vrednosti, utvrđivanje senzornih svojstava, karakteristika kvaliteta boje, osobina topljenja, sadržaja polifenolnih jedinjenja i, s tim u vezi, antioksidativne moći odnosno kapaciteta, zatim reoloških svojstava, kao i fizičko-mehaničkih i barijernih karakteristika ambalažnih materijala upotrebljenih za pakovanje. Kako bi se utvrdio mogući rok održivosti ovakvih proizvoda, ispitan je uticaj vremena čuvanja na navedena svojstva, a vremenske odrednice u kojima su obavljene analize obuhvatile su period odmah nakon proizvodnje (0-30 dana), dok su ostali intervali bili uslovljeni vijabilnošću probiotskih bakterija, tako da je drugi period ispitivanja sproveden nakon tri meseca (90 dana), a treći nakon šest meseci (180 dana) skladištenja.

#### 4.2.1. Proizvodnja uzoraka čokolada

Proces proizvodnje sastojao se od standardnih faza proizvodnje čokolade: mešanja, usitnjavanja (rafinacije), končiranja, temperiranja, oblikovanja i hlađenja, uz izvesne modifikacije nakon faze temperiranja i tokom livenja, radi uvođenja probiotskih kultura.

*Mešanje* je obavljeno sjedinjavanjem osnovnih sirovina u mešalici, odnosno melanžeru prema zadatim recepturama, radi dobijanja homogene suspenzije. Odnos masne i čvrste faze u suspenziji čokoladne mase je od 26:74 do 29:71. Veliki udeo čvrste faze i vlage kakao-mase (i mleka u prahu) zahtevaju mešanje i gnječenje sastojaka – da bi se savladali visoki površinski naponi i sile smicanja između čvrstih čestica i masne faze i da bi se dobila odgovarajuća konzistencija čokoladne mase. Zbog sila smicanja i trenja razvija se toplota tokom mešanja i gnječenja koja utiče na omekšavanje, širenje i povećanje zapremine kakao-mase.



Slika 14. Mešanje

Sirovine su u melanžer ubacivane automatski, sistemom cevovoda dopremane su na automatsku vagu koja je na vrhu melanžera i koja propušta količinu sirovine zadatu po recepturi. Redosled ubacivanja sirovina u melanžer je vrlo bitan za kvalitet buduće smeše i obavljan je sledećim redom: 1) kakao-masa 2) kakao-maslac 3) šećer u kristalu i, kod mlečnih čokolada 4) mleko u prahu. Mešanje sirovina trajalo je oko 2 časa. Ispod samog ispusta melanžera nalaze se dva suprotnosmerna valjka, čija je uloga da datu smešu (naročito šećer) grubo usitne i kao takvu pripreme za dalje sitnjenje na petovaljcima. Pužnim elevatorima masa je prenetna na transportnu traku, sa koje je posebnim skretnicama usmerena na neki od petovaljaka koji se nalaze u nizu.



Slika15. Usitnjavanje



*Usitnjavanje* - Formirana masa je podvrgnuta dvostepenom usitnjavanju na petovaljcima da bi se olakšala dalja prerada i postigla glatka tekstura finalnih proizvoda. Na petovaljcima se podešava veličina čestica čokoladne mase njenim postepenim sitnjenjem. Masa prolazi između pet valjaka u nizu i neophodno je da se ravnomerno raspoređuje po površini valjaka. Valjci se pri radu zagrevaju pa kroz njih mora proticati rashlađena voda kako čokoladna masa ne bi zagorela. Kontrolise se koliko mase ulazi u petovaljak što zavisi od razmaka između valjaka, i automatski se podešava kod savremenijih modela petovaljaka.



Slika 16. Končiranje

*Končiranje* je faza tehnološkog procesa proizvodnje u kojoj se odvija dugotrajno mešanje čokoladne mase uz dejstvo toplote. Početna temperatura končiranja bila je u intervalu od 40 do 50°C, a na kraju procesa oko 45°C.

U proizvodnim pogonima fabrike „Štark“ končiranje se izvodi u dve faze: suvo i tečno. Upotrebom savremenih konči Carle&Montanari mlečna čokoladna masa je končirana 7-9 sati na 60-70°C, dok su obe crne čokoladne mase (sa 44 % i 75 % kakao-delova) končirane 9 sati na 75°C.

Po završenom procesu končiranja, čokoladna masa se sistemom cevovoda odvodi u spremnike (tankove sa duplim zidovima), u kojima se čuva na temperaturi od 40-45°C do procesa livenja.



Slika 17. Temperiranje

*Temperiranje* podrazumeva predkristalizaciju malog dela triglicerida pri čemu se formiraju kristalizacioni centri koji obezbeđuju da ostatak masti kristališe u ispravnom polimorfnom obliku.

Uređaji koji se koristi za temperiranje sastoje se od višefaznih izmenjivača toplote kroz koje prolazi čokoladna masa u širokom rasponu stopa, čineći teškim utvrđivanje optimalnih uslova. Kombinacija vremena i temperature je od izuzetne važnosti za projektovanje procesa i kontinualno temperiranje. Rastopljena čokolada održavana je na 45°C, a zatim je polako hladena radi pokretanja rasta kristala. Kako se povećavao viskozitet, čokoladna masa je ponovo zagrevana da bi se sprečilo očvršćavanje. U poslednjoj fazi kristali su sazreli. Pri proizvodnji uzoraka čokolade u okviru ovog eksperimenta korišćene su turbo temperirke čime je znatno smanjeno vreme temperiranja i temperatura pothlađivanja. Tako je mlečna čokoladna masa pothlađivana na temperaturi i za dva stepena nižoj od teoretske (25°C), dok su crne (sa 44 i 75 % kakao-delova) pothlađivane na 28-29°C.



Posle faze temperiranja deo čokoladnih masa od svake vrste izdvojen je sa proizvodne linije, a potom je obavljeno dodavanje/umešavanje probiotika (svaki od probiotika u svaku vrstu čokoladne mase) u količinama koje su se pokazale najoptimalnijim tokom preliminarnih ispitivanja.



Slika 18. Izlivanje u kalupe

Čokoladne mase sa dodatim probiotskim kulturama su zatim ručno *izlivene* u kalupe i ravnomerno raspoređene pomoću ravnog noža i stresanjem. Deo čokoladne mase koji je prelazio preko ivica kalupa skinut je kao višak. Kalupi tj. forme su prethodno oprani, osušeni i zagrejani na 26°C kako bi razlika u temperaturi formi i čokoladnih masa bila što manja.



Slika 19. Trešenje

Tako napunjeni kalupi su vraćeni u dalji tok standardnog proizvodnog postupka, odnosno na vibracioni sto kako bi se obavile završne tehnološke operacije, konkretno, trešenje kalupa radi ravnomernog raspoređivanja čokoladnih masa i istiskivanja zaostalih mehurića vazduha.



Slika 20. Hlađenje

Temperatura *hlađenja* zavisi od brzine proizvodne linije i iznosila je 10-15°C tokom 15-20 minuta. Potrebno je da temperatura na izlazu iz hladnjaka bude što približnija temperaturi prostorije, jer u suprotnom može nastati beljenje usled kondenzacije. Po izlasku iz hladnjaka ohlađene čokolade su iz kalupa istrešene na podmetače, oslobađajući kalupe za novi ciklus livenja, a zatim poređane na kolica radi izjednačavanja temperature.



Slika 21. Pakovanje

Nakon proizvodnje finalni proizvodi su *upakovani* u odgovarajuću ambalažu, pri čemu je kao primarni ambalažni materijal upotrebljena štampana i lakirana aluminijumska folija, a kao sekundarna ambalaža štampane papirne/kartonske blankete.

#### 4.2.2. Određivanje vijabilnosti probiotskih bakterija

Broj živih ćelija određuje se radi procene živih/aktivnih mikroorganizama u određenom materijalu, a zasniva se na pretpostavci da će iz svake žive ćelije porasti po jedna kolonija mikroorganizama. Kolonije koje porastu na čvrstoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih ćelija. Dobijene vrednosti označavaju se kao cfu (“colony-forming units”), odnosno jedinice koje stvaraju kolonije.

U okviru preliminarnog oglada, nakon eksperimentalne proizvodnje čokolada, broj probiotskih bakterija je određivan tako što je 10 g od svih ispitivanih uzoraka različitih vrsta čokolade dodato u 90 ml fiziološkog rastvora i homogenizovano u Stomacher aparatu (Lab Blender Stomacher 400, Seward, UK), pri čemu je dobijeno osnovno razređenje. Daljim decimalnim razređivanjem dobijena su razređenja koja su zasejavana na odgovarajuće selektivne podloge.

Tokom glavnog oglada broj probiotskih bakterija određivan je istim postupkom zasejavanja kao i u preliminarnom ogledu, s tim što su ispitivanja izvršena za vreme celokupnog perioda skladištenja (180 dana) i to na uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi (20°C), kao i na uzorcima koji su čuvani u frižideru na 4°C. Ispitivanja vijabilnosti bakterija su obavljena 5., 30., 90., 120., 150., i 180. dana skladištenja u tri ponavljanja.

*Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup> određivan je na MR-IM agaru sa dodatkom 20 % -tnog rastvora maltoze, inkubacijom na 37°C tokom 48 sati u fakultativno anaerobnim uslovima u Gas-Pak sistemu (BBL, Nemačka).

*Bifidobacterium lactis* HN019 određivan je na Merck-ovoj selektivnoj za bifidobakterije sa galaktooligosaharidima i litijum-mupirocinom (TOS-MUP agar), inkubacijom na 37°C tokom 48 sati u fakultativno anaerobnim uslovima u Gas-Pak sistemu (BBL, Nemačka).

Broj ćelija *Lactobacillus acidophilus* iz preparata DUOLAC MIX L3 određivan je na MRS agaru (Torlak) na 37±2°C, 24-72 časa u fakultativno anaerobnim uslovima.

Broj ćelija *Streptococcus thermophilus* iz preparata DUOLAC MIX L3 određivan je na *Streptococcus thermophilus* isolation agaru (Fluka), koji je selektivan za razlikovanje od *L. acidophilus* na 37±2°C, 24-72 časa.

Broj ćelija *Bifidobacterium breve* iz preparata DUOLAC MIX L3 određivan je na Merck-ovoj selektivnoj podlozi za bifidobakterije sa galaktooligosaharidima i litijum-mupirocinom (TOS-MUP agar) u anaerobnim uslovima na 37±2°C, tokom 24-72 časa.

#### 4.2.3. Određivanje osnovnog hemijskog sastava

Na proizvedenim uzorcima različitih vrsta čokolada sa tri različita probiotika neposredno posle proizvodnje, obavljena su ispitivanja osnovnog hemijskog sastava prema Pravilniku (*Sl. list SFRJ broj 41/1987*):

- ◆ Određivanje sadržaja vode sušenjem pod normalnim pritiskom;
- ◆ Određivanje sadržaja sirovih proteina metodom po Kjeldahl – u;
- ◆ Određivanje sadržaja masti metodom po Soxhlet – u;
- ◆ Određivanje sadržaja saharoze-polarimetrijska metoda.

Ukupni ugljeni hidrati su izračunati na osnovu prethodno određenih vrednosti za sadržaj proteina, masti i šećera (razlika do 100 %), u cilju izračunavanja energetske vrednosti.

Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih navoda, **izračunata je energetska vrednost čokolada**, koja je izražena u kJ/100g proizvoda.

Hemijska ispitivanja obuhvatila su i:

- ◆ Određivanje aktivnosti vode ( $a_w$  vrednosti).

#### 4.2.3.1. Određivanje sadržaja vode sušenjem pod normalnim pritiskom

Sadržaj vode se određuje sušenjem uzorka pod normalnim pritiskom do konstantne mase.

Metoda se primenjuje kod kakao-proizvoda, proizvoda sličnih čokoladi, krem-proizvoda, bombonskih proizvoda, osim želea, ratluka i gumenih bombona, keksa i proizvoda srodnih keksu i kolača.

#### 4.2.3.2. Određivanje sadržaja sirovih proteina metodom po Kjeldahl – u

Grejanjem sa sumpornom kiselinom u prisustvu katalizatora azotna jedinjenja (osim nitrata i nitrita) prevode se u amonijum-sulfat. Dodatkom natrijumove baze oslobađa se amonijak, koji se sa vodenom parom destiliše u određenu količinu kiseline poznate koncentracije. Višak kiseline određuje se retitracijom.

#### 4.2.3.3. Određivanje sadržaja masti metodom po Soxhlet - u

Posle hidrolize uzorka sa hlorovodoničnom kiselinom, vrši se višestruka ekstrakcija masti sa organskim rastvaračem (pertol-etar) u aparatu po Soxhlet-u.

#### 4.2.3.4. Određivanje sadržaja saharoze-polarimetrijska metoda

a) Određivanje saharoze u proizvodima koji sadrže samo saharozu – metoda jednostruke polarizacije (kod uzoraka crnih čokolada)

Saharoza se ekstrahuje iz uzorka vrućom destilovanom vodom, a dodatkom baznog olovo-acetata istalože se balastne materije. Na polarimetru se, u čistom filtratu, očita ugao skretanja.

b) Određivanje saharoze u proizvodima koji uz saharozu sadrže i druge šećere – metoda dvostruke polarizacije (kod uzoraka mlečnih čokolada)

Saharoza se ekstrahuje iz uzorka vrućom destilovanom vodom, a dodatkom baznog olovo-acetata istalože se balastne materije. Na polarimetru se očita ugao skretanja rastvora pre i posle inverzije.

Korišćen je polarimetar Carl Zeiss DR 286 (Jena, Nemačka) sa natrijumovom svetiljkom kao izvorom svetlosti.

#### 4.2.3.5. Izračunavanje energetske vrednosti 100 g proizvoda

Energetska vrednost je izračunata na osnovu sadržaja osnovnih grupa jedinjenja (ugljenih hidrata, proteina, masti) u ispitivanim uzorcima čokolada. Izračunavanje energetske vrednosti 100 g proizvoda obavljeno je prema Rubnerovim koeficijentima (Kostić, 1998):

1g ugljenih hidrata – 17.1658 kJ,

1g proteina – 17.1658 kJ,

1g masti – 38.9372 kJ.

#### 4.2.3.6. Određivanje aktivnosti vode ( $a_w$ vrednosti)

Određivanje aktivnosti vode obavljeno je na  $a_w$  metaru – model TH2/RTD-33/BSK, Novasina (Švajcarska).

#### 4.2.4. Senzorna analiza

Senzorna analiza ispitivanih uzoraka čokolada obavljena je tokom čitavog perioda skladištenja čokolada sa probioticima u toku kojih je vršena provera kvaliteta, dakle u periodu 0-30 dana od datuma proizvodnje čokolada, odnosno nakon isteka 90 i 180 dana.

Ukupni senzorni kvalitet svih ispitivanih uzoraka čokolada sa probioticima tokom perioda skladištenja utvrđen je primenom modifikovane metode senzornog ocenjivanja čokolada (Popov-Raljić i Laličić-Petronijević, 2009) (tabela 7) ocenjivanjem prethodno odabranih reprezentativnih svojstava kvaliteta. Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1.00 do 5.00 sa mogućnošću dodeljivanja polovine i četvrtine boda. Za svako odabrano svojstvo kvaliteta određen je koeficijent važnosti (KV) pomoću koga je obavljena korekcija (množenjem) date ocene. Koeficijenti važnosti se izabiraju prema uticaju pojedinih svojstava na ukupan kvalitet, a izbalansirani su tako da njihov zbir bude 20. Sabiranjem

pojedinačnih ocena dobija se jedan kompleksni pokazatelj koji reprezentuje ukupan senzorni kvalitet a izražava se kao "% od maksimalno mogućeg kvaliteta". Deljenjem ove vrednosti sa zbirom koeficijenata važnosti dobija se ponderisana srednja vrednost ocene, koja, takođe, reprezentuje ukupan senzorni kvalitet ispitivanih uzoraka čokolada.

Kategorija kvaliteta ocenjenih uzoraka se određuje na osnovu raspona kojem pripada ponderisana srednja vrednost ocene za svaki uzorak. Rasponi ocena i odgovarajuće kategorije kvaliteta prikazane su u tabeli 8.

U cilju objektivizacije i pouzdane senzorne evaluacije u ocenjivanju su učestvovali odabrani ocenjivači (5) koji su prošli izbor, obuku i praćenje prema zahtevima standarda *ISO 8586-1:1993E* i *ISO 8586-2:1994E* tj. *SRPS ISO 8586-1:2002* i *SRPS ISO 8586-2:2002*.

Tokom senzornog ocenjivanja svi uzorci su bili adekvatno označeni, prezentovani optimalnom dinamikom, a dobijeni rezultati statistički obrađeni.

Poseban akcenat tokom senzornog vrednovanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima stavljen je na određivanje teksturalnih svojstava (od mehaničkih svojstava: tvrdoća, lomljivost, žvakljivost, adhezivnost; od geometrijskih svojstava: zrnastost; od površinskih svojstava: vlažnost i masnost). Pored navedenih svojstava ocenjena je i topivost čokolada (tabela 8).

Tabela 8. Senzorno ocenjivanje kvaliteta čokolade (Popov-Raljić i Laličić-Petronijević, 2009)

| Senzorno svojstvo kvaliteta                        |   | KV  | Opis ocenjivanog svojstva   | Ocena |
|--|---|---|---|-------|
| <b>I<br/>Z<br/>G<br/>L<br/>E<br/>D</b>             | Boja<br>Sjaj<br>Oblik<br>Površina   | <b>2.00</b>   | Svojstven oblik i boja (prema udelu kakao-delova), površina glatka i sjajna, jasna gravura  | 5.00  |
|  |   |   | Neznatno odstupanje od svojstvenog oblika, boje i površine, gravura slabije izražena  | 4.00  |
|  |   |   | Primetno odstupanje od svojstvenog oblika, boje i sjaja, na površini primetni otisci prstiju uz prisustvo vidljivih mehurića                        | 3.00  |
|  |   |   | Jasno izraženo odstupanje od svojstvenog oblika i sjaja, površina delimično siva ili bela, prisustvo strugotina                                     | 2.00  |
|  |   |   | Jako izraženo odstupanje od svojstvenog oblika - deformisan oblik, površina siva ili bela, jača oštećenja, gravura izuzetno slaba                   | 1.00  |
| <b>T<br/>E<br/>K<br/>S<br/>T<br/>U<br/>R<br/>A</b> | ▪ MEHANIČKA<br>SVOJSTVA<br><br>Tvrdoća<br><br>Lomljivost<br><br>Žvkljivost<br><br>Adhezivnost | <b>2.00</b>   | Svojstvena čvrstoća i ujednačen, krt prelom, svojstvena žvkljivost i neprionjivost  | 5.00  |
|  |   |   | Neznatno odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma, vrlo dobra žvkljivost, neznatna prionjivost   | 4.00  |
|  |   |   | Primetno odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma uz prisustvo mehurića vazduha na preseku, dobra žvkljivost, primetno jača prionjivost          | 3.00  |
|  |   |   | Jasno izraženo odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma uz pojavu sivljenja, jasno izražena mrvljivost i prionjivost, zadovoljavajuća žvkljivost | 2.00  |
|  |   |   | Jako izražena tvrdoća i mrvljivost uz izraženo sivljenje na prelomu, izrazito loša žvkljivost i izrazito jaka prionjivost                           | 1.00  |
|  | ▪ GEOMETRIJSKA<br>SVOJSTVA<br><br>Zrnavost  | <b>2.50</b>   | Svojstvena zrnavost ili odsustvo zrnivosti - svojstvena glatka tekstura   | 5.00  |
|  |   |   | Neznatno odstupanje od svojstvene zrnivosti   | 4.00  |
|  |   |   | Primetno odstupanje od svojstvene zrnivosti   | 3.00  |
|  |   |   | Jasno izražena zrnavost ili peskovitost   | 2.00  |
|  |   |   | Jako izražena zrnavost ili peskovitost - jako izražena gruba tekstura   | 1.00  |
|  | ▪ POVRŠINSKA<br>SVOJSTVA<br><br>Vlažnost<br>Masnost   | <b>0.50</b>   | Bez površinski izdvojene vode/masti   | 5.00  |
|  |   |   | Neznatno izdvajanje vode/masti na površini  | 4.00  |
|  |   |   | Primetno izdvajanje vode/masti na površini  | 3.00  |
|  |   |   | Jasno izraženo izdvajanje vode/masti na površini  | 2.00  |
|  |   |   | Jako izraženo izdvajanje vode/masti na površini   | 1.00  |
| ▪ OSTALA DINAMIČKA<br>SVOJSTVA<br><br>Topivost     | <b>2.00</b>   | Svojstvena, postepena topivost  | 5.00  |       |
|  |   | Neznatno odstupanje od svojstvene, postepene topivosti  | 4.00  |       |
|  |   | Primetno odstupanje od svojstvene, postepene topivosti  | 3.00  |       |
|  |   | Jasno izraženo odstupanje od svojstvene, postepene topivosti                                    | 2.00  |       |
|  |   | Jako izraženo odstupanje od svojstvene, postepene topivosti - vrlo spora ili vrlo brza topivost | 1.00  |       |
| <b>A<br/>R<br/>O<br/>M<br/>A</b>                   | <b>MIRIS</b>  | <b>4.00</b>   | Svojstven, zaokružen, aromatičan miris  | 5.00  |
|  |   |   | Svojstven, slabije zaokružen, aromatičan miris  | 4.00  |
|  |   |   | Svojstven, slabo zaokružen, slabo aromatičan  | 3.00  |
|  |   |   | Nije svojstven, kiselkast, ustajao miris  | 2.00  |
|  |   |   | Strani, kiseo, ustajao, plesniv miris   | 1.00  |
|  | <b>UKUS</b>   | <b>7.00</b>   | Svojstven, zaokružen, aromatičan ukus   | 5.00  |
|  |   |   | Svojstven, slabije zaokružen, aromatičan ukus   | 4.00  |
|  |   |   | Slabo zaokružen, slabo aromatičan ukus  | 3.00  |
|  |   |   | Slabo kiseo, nije zaokružen ukus  | 2.00  |
|  |   |   | Strani, kiseo, gorak ukus   | 1.00  |

Tabela 9. Raspon ocena i kategorije kvaliteta pri senzornom ocenjivanju

| Raspon ocena   | Kategorija kvaliteta |
|----------------|----------------------|
| < 2.50         | Neprihvatljiv        |
| od 2.50 – 3.50 | Dobar                |
| od 3.5 – 4.50  | Vrlo dobar           |
| od 4.50 – 5.00 | Odličan              |

#### 4.2.4.1. Instrumentalno određivanje karakteristika kvaliteta boje

Karakteristike kvaliteta boje analiziranih uzoraka čokolada sa probioticima, su određene na fotoelektričnom tristimulusnom kolorimetru MINOLTA Chroma Meter CR–400. Rezultati određivanja karakteristika kvaliteta boje interpretirani su u tri različita sistema definisanja boje: CIE xyY, CIE L\*a\*b\* i Hunter Lab sistemu. Tristimulusne vrednosti karakteristika boje ispitivanih uzoraka, određene su na gornjoj i donjoj površini čokoladnih tabli (za svaku površinu n = 3).

Uslovi rada prilikom merenja su bili sledeći:

- standardni posmatrač (standard observer): 65°
- izvor svetlosti (illuminant): D
- prečnik svetlosnog snopa: 8 mm.

Vrednosti pokazatelja svetloće (Y, L, L\*) i hromatičnosti (x, y, a\*, b\*, a<sub>Hu</sub> i b<sub>Hu</sub>) direktno su očitavane sa instrumenta, dok su vrednosti za dominantnu talasnu dužinu (λ) i čistoću boje (Č) očitavane sa dijagrama hromatičnosti.

CIE dijagram hromatičnosti prikazan je na slici 22, odnosno 23. Tačka C u sredini dijagrama predstavlja standardni izvor svetlosti C koji na zadovoljavajući način zamenjuje dnevnu svetlost, a naziva se još i "bela tačka". Osa Y koja definiše **svetloću** leži normalno u odnosu na dijagram hromatičnosti.

**Dominantna talasna dužina (λ)** se određuje na sledeći način (Pribiš, 1980): na osnovu vrednosti koeficijenata hromatičnosti (trihromatskih koeficijenata) **x** i **y** ucrtta se odgovarajuća tačka u dijagramu hromatičnosti (npr. tačka F). Ova tačka se spaja sa tačkom C uz produžavanje prave do preseka sa spektralnom krivom. Na mestu preseka (G) očitava se odgovarajuća dominantna talasna dužina za datu boju. U slučaju da se tačka nalazi ispod

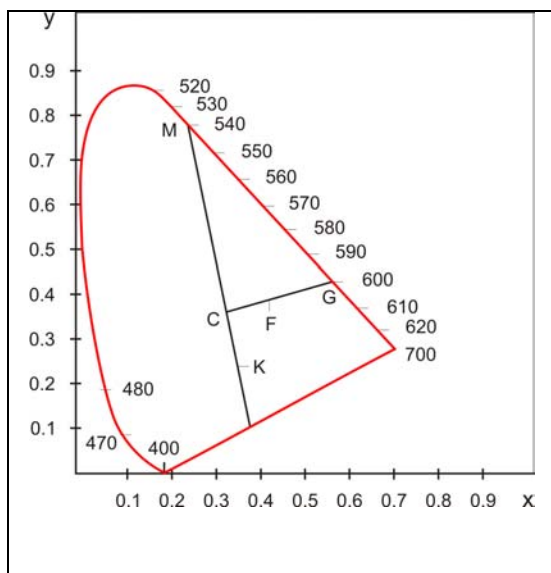


tačke C (tačka K), tako da se prava koja ih spaja seče sa pravom koja spaja spektralne krive, prava se produžava u suprotnom smeru i na tom preseku sa spektralnom krivom određuje se dominantna talasna dužina (tačka M) (slika 22).

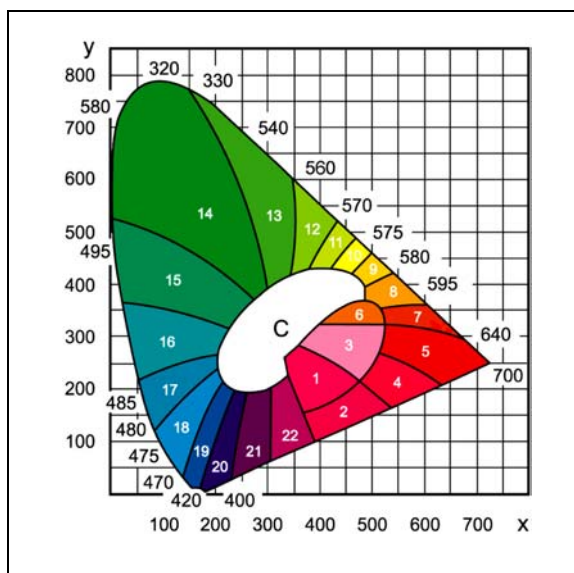
Na osnovu dijagrama hromatičnosti po CIE sistemu, oznake boje tj. polja koje obuhvata spektralna kriva na slici 23 su: 1 - ljubičastoružičasta; 2 - crvenoljubičasta; 3 - ružičasta; 4 - ljubičastocrvena; 5 - crvena; 6 - narandžastocrvena; 7 - crvenkastonarandžasta; 8 - narandžasta, 9 - žućkastonarandžasta; 10 - žuta; 11 - zelenkastožuta; 12 - žuto-zelena; 13 - žućkasto zelena; 14 - zelena; 15 - plavkasto-zelena; 16 - plavozelena; 17 - zelenkastoplava; 18 - plava; 19 - ljubičastoplava; 20 - ljubičasta; 21 - ljubičastocrvena; 22 - crvenkastoljubičasta.

**Čistoća boje (Č)** je u kvantitativnom smislu definisana kao razdaljina dotične tačke od "bele tačke". Čistoća je najveća ako se tačka pripada spektralnoj krivoj i tada se radi o čistoj spektralnoj boji (Č = 100 %). Što je tačka bliže izvoru C čistoća se smanjuje, a čistoća "bele tačke" iznosi 0 % (slika 23).

$$\check{C} = \frac{\overline{FC}}{\overline{GC}} \cdot 100 \% \quad (6)$$



Slika 22. CIE dijagram hromatičnosti  
Određivanje dominantne talasne dužine i  
čistoće boje (Pribiš, 1980)



Slika 23. Dijagram hromatičnosti po CIE  
sistemu sa prikazom boja koje obuhvata  
spektralna kriva (Pribiš, 1980)

Po CIE sistemu **sjajnost** se određuje na osnovu veličine  $Y$  (%), tj. u CIE  $L^*a^*b^*$  i Hunter–ovom sistemu određuje se na osnovu vrednosti psihometrijske svetlosti ( $L^*$  i  $L_{Th}$ ) (Popov-Raljić, 1999; Radovanović i Popov-Raljić, 2000/2001).

#### 4.2.4.2. Određivanje termalnih svojstava čokolada metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC)

Termalna analiza različitih čokolada sa probioticima i kontrolnih uzoraka obavljena je primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) na aparatu DSC Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) sa RSC hladnjakom, u temperaturnom opsegu od 2-60°C, brzinom grejanja/hlađenja  $Hr=5^\circ\text{C}/\text{min}$ , u aluminijumskim čančićima pri protoku azota od 50 ml/min. Uzorak mase 4-5 mg odmeravan je u aluminijumsko čance, dok je kao referentno služilo prazno čance. Eksperimentalna metoda je kreirana pomoću softvera Q series Explorer i elektronski sačuvana. Obrada DSC krivih, određivanje temperature topljenja i kristalizacije uzoraka čokolada ( $T_m$  i  $T_c$ ), kao i entalpije navedenih procesa ( $\Delta H_{\text{melt}}$  i  $\Delta H_{\text{cryst}}$ ) izvršena je pomoću program TA Universal Analysis 2000.

#### 4.2.5. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja

##### 4.2.5.1. Priprema uzoraka čokolada

Radi određivanja sadržaja polifenolnih komponenata i antioksidativnih svojstava uzoraka čokolada potrebno je prvo pripremiti uzorke, što obuhvata njihovo odmaščivanje i ekstrakciju polifenolnih jedinjenja.

##### Odmaščivanje uzoraka čokolada

Uzorci čokolada su odmaščeni prema postupku koji navede Adamson i sar., (1999) koji uključuje trostruku ekstrakciju sa *n*-heksanom. Odmaščeni uzorci ostave se preko noći na sobnoj temperaturi da ispari rastvarač i zaostanu čvrsti talozi, koji se potom produvaju azotom i spreme u hladnjak do analize (Adamson i sar., 1999). Na ovaj način ekstrahovane

masti iz analiziranih uzoraka različitih vrsta čokolada upotrebljene su za određivanje oksidativne stabilnosti (4.2.6.4. i 4.2.6.5.).

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja u čokoladama

Odmašćeni uzorci čokolada ekstrahovani su dva puta 70 % -tnim metanolom.

Nakon centrifugiranja supernatanti se spoje u odmernoj tikvici i prema potrebi dopune rastvaračem koji je korišćen za ekstrakciju (70 % metanol) do 10 ml, kako bi se dobila poznata masena koncentracija odmašćenog uzorka (0.2 g/ml). Dobijeni ekstrakti prodivaju se azotom i čuvaju u zamrzivaču do dalje analize (*Guyot i sar., 1998; Hammerstone i sar., 1999*).

#### 4.2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin – Ciocalteu-ovim reagensom

Ukupni fenoli u ekstraktima uzoraka čokolada određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se bazira na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (*Singleton i Rossi, 1965*). Folin-Ciocalteu reagens je smeša fosforvolframove i fosformolibdenove kiseline, koji reaguje sa fenoksid jonom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-jon oksiduje, a Folin-Ciocalteu reagens redukuje do plavo obojenih oksida volframa i molibdena (*Singleton i sar., 1999*). Intenzitet nastalog plavog obojenja meri se pri 765 nm (*Ough i Amerine, 1988*).

Pri svim spektrofotometrijskim određivanjima korišćen je spektrofotometar Helios  $\gamma$ , (ThermoSpectronic, Velika Britanija).

Izrada standardne krive za određivanje ukupnih fenola

Pripremi se osnovni rastvor standarda galne kiseline u etanolu, koncentracije 500 mg/l iz kojeg se zatim u tikvicama od 100 ml naprave razređenja tako da se dobiju rastvori galne kiseline koncentracija 0, 50, 100, 150, 250 mg/l.

U odmerne tikvice od 50 ml, otpipetira se 0.5 ml rastvora odgovarajuće koncentracije galne kiseline, nakon čega se dalje prati prethodno opisana procedura za određivanje ukupnih fenola.

Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance nacrtana se standardna kriva, a prema

jednačini te krive izračuna se udeo ukupnih fenola u uzorcima:

$$y = 0.001x - 0.018 \quad (7)$$

$$R^2 = 1.000$$

gde su:

x – izračunat udeo ukupnih fenola (mg GAE/g odmašćene čokolade)

y – izmerene vrednosti apsorbance na 765 nm.

#### 4.2.5.3. Određivanje sadržaja ukupnih neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih jedinjenja primenjuje se formaldehid koji reaguje sa C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reaguju sa drugim flavonoidnim jedinjenjem takođe na C-6 ili C-8 položaju, itd. Kondenzovani molekuli nastali ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih fenola određuje se prema metodi za ukupne fenole (*Ough i Amerine, 1988*).

#### 4.2.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Udeo ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udela prethodno određenih ukupnih fenola i neflavonoida prema formuli:

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni fenoli} - \text{ukupni neflavonoidi} \quad (8)$$

[mg GAE/g odmašćenog uzorka]

#### 4.2.5.5. Određivanje sadržaja flavan-3-ola

##### 4.2.5.5.1. Reakcija sa vanilinom (vanilin indeks)

Metoda se zasniva na reakciji vanilina (*p*-hidroksibenzaldehida) sa alkoholnim grupama na položajima C6 i C8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet crvenog obojenja, koji se određuje spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 500 nm, direktno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (*Di Stefano i sar., 1989*).

Udeo (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema formuli:

$$\text{(+)katehin} = 290.8 \times \Delta E \times \text{razređenje} \quad (9)$$

gde je:

$\Delta E$  = razlika apsorbancije između uzorka i slepe probe

Rezultati su izraženi kao mg (+)-katehina/g odmašćenog uzorka.

##### 4.2.5.5.2. Reakcija sa *p*-dimetilamino-cinamaldehydom (*p*-DAC)

Ova metoda se zasniva na istom principu određivanja udela (+)-katehina i proantocijanidina kao i metoda sa vanilinom, ali se razlikuje po tome što *p*-dimetilamino-cinamaldehyd (*p*-DAC) reaguje samo sa hidroksilnom grupom na položaju C-8 u molekulu flavan-3-ola. Intenzitet nastalog zelenog obojenja određuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 640 nm (*Di Stefano i sar., 1989*).

Udeo (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema formuli:

$$\text{(+)katehin} = 32.1 \times \Delta E \times \text{razređenje} \quad (10)$$

gde je:

$\Delta E$  = razlika apsorbance između:

- a) uzorka i reagensa
- b) vode i reagensa
- c) uzorka i vode

$$\Delta E = a - b - c \quad (11)$$

Rezultati se izražavaju kao mg (+)-katehina/g odmašćenog uzorka.

#### 4.2.5.6. Određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina modifikovanom metodom po Bate-Smith-u

Primenjena metoda razvijena je modifikacijom metode po *Bate-Smith-u (1954)* a bazira se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula procijanidina sa hlorovodoničnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Navedena reakcija praćena je nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 550 nm (*Porter i sar., 1986*).

Izrada standardne krive za kvantitativno određivanje ukupnih proantocijanidina

Za izradu standardne krive pripremi se osnovni metanolni rastvor cijanidin hlorida koncentracije 100 mg/l. Iz tako pripremljenog rastvora naprave se razređenja rastvora cijanidin hlorida koncentracija 1, 5, 10, 12.5 i 25 mg/l. U odmernim tikvicama od 10 ml pomeša se 2 ml prethodno dobijenih razređenja sa navedenim reagensima prema prethodno opisanom postupku, te se nakon zagrevanja i hlađenja izmeri apsorbance na 550 nm, uz metanol kao slepu probu.

Na osnovu izmerenih vrednosti nacrtana se standardna kriva, a rezultati se izračunavaju iz jednačine te krive:

$$y = 0.0321x + 0.0574 \quad (12)$$

$$R^2 = 0.9901$$

gdje su:

x – poznata koncentracija rastvora cijanidin hlorida (mg/l)

y – izmerene vrednosti apsorbance na 550 nm.

Rezultati se izražavaju kao mg cijanidin-hlorida/g odmašćenog uzorka.

## 4.2.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta čokolada

### 4.2.6.1. FRAP metoda

Ova metoda se zasniva na redukciji bezbojnog kompleksa gvožđe(III)-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) u fero formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intenzivne plave boje (Benzje i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka čokolada određuje se spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 593 nm.

#### Izrada standardne krive za FRAP metodu

Za izradu standardne krive pripremi se osnovni vodeni rastvor gvožđe(II)sulfat-heptahidrata koncentracije 1 mM. Iz tako pripremljenog rastvora naprave se razređenja koncentracija 0.1, 0.25, 0.5 i 0.75 mM.

U kiveti se pomeša 200  $\mu\text{l}$  prethodno pripremljenih razređenja rastvora gvožđe(II)sulfat-heptahidrata sa 3.8 ml FRAP reagensa te se izmeri apsorbance na 593 nm nakon tačno 4 minuta, uz vodu kao slepu probu. Na bazi izmerenih vrednosti nacrtana se standardna kriva, a rezultati se izračunaju iz jednačine standardne krive:

$$y = 0.0016x \quad (13)$$

$$R^2 = 0.9942$$

gde su:

x – koncentracija rastvora gvožđe(II)sulfat-heptahidrata (mM)

y – izmerene vrednosti apsorbance na 593 nm.

Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$  odmašćenog uzorka čokolade.

### 4.2.6.2. ABTS metoda

Ova metoda se bazira na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-katjona 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-katjona), koji se formira bilo

hemijskom ili enzimskom oksidacijom rastvora ABTS-a nekoliko sati pre analize. Udeo ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi meri se praćenjem smanjenja apsorbance ABTS radikala te se poredi sa smanjenjem apsorbance koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E rastvorljivog u vodi, pri istim uslovima (*Prior i sar., 2005*).

Izrada standardne krive za ABTS metodu

Za izradu standardne krive pripremi se 1 mM rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) u etanolu. Iz tako pripremljenog rastvora naprave se razređenja rastvora Trolox-a, koncentracija 0.05, 0.1, 0.125, 0.25 i 0.5 mM.

U kivetu se pomeša 20 µl prethodno dobijenih razređenja rastvora Trolox-a s 2 ml rastvora ABTS<sup>+</sup> radikala te se izmeri apsorbance na 734 nm nakon tačno 1 minut, uz etanol kao slepu probu. Na osnovi izmerenih vrednosti nacrtava se standardna kriva, a rezultati se izračunavaju iz jednačine te krive:

$$y = -0.0014x + 0.7 \quad (14)$$

$$R^2 = 0.9936$$

gde su:

x – koncentracija rastvora Troloxa (mM)

y – izmerene vrednosti apsorbance na 734 nm.

Rezultati su izraženi kao µmol Trolox-a/g odmašćenog uzorka čokolade.

#### 4.2.6.3. Polarografska metoda (HPS)

Polarografija sa jednosmernom strujom (DC-direct current), odnosno klasična polarografija, je elektrohemijaska tehnika kod koje se sporom promenom potencijala polarizuje elektroda male površine (tzv. radna elektroda). U klasičnoj (DC) polarografiji kao

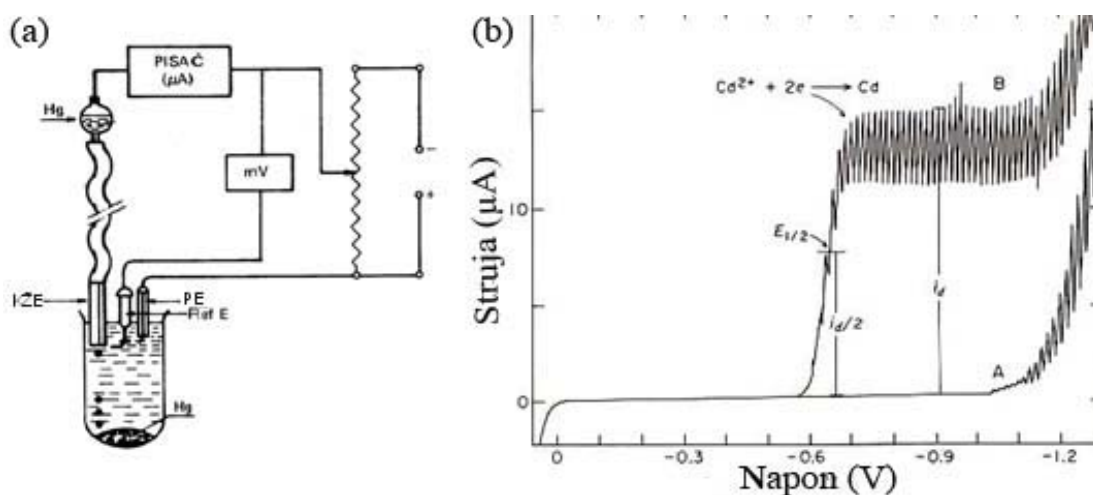


radna elektroda se koristi takozvana kapljuća živina elektroda (KŽE). Ona se sastoji iz staklene kapilare veoma malog unutrašnjeg prečnika čiji je gornji kraj crevom vezan za rezervoar sa živom dok se na donjem kraju, koji je uronjen u rastvor, formira kap žive. Kap raste nekoliko sekundi nakon čega se otkida i počinje formiranje nove kapi. Ta, uvek sveža kap žive na dnu kapilare, predstavlja radnu elektrodu. Da bi strujno kolo bilo zatvoreno u rastvor se uranja i takozvana pomoćna elektroda. Pomoćna elektroda ne treba da se polarizuje. Da bi se njena polarizacija sprečila potrebno je da je gustina struje na njoj daleko manja nego na površini radne elektrode, te joj je, s toga, površina višestruko veća. Pomoćna elektroda je najčešće od platine ili staklastog ugljenika da bi se izbeglo njeno elektrohemijsko rastvaranje. Treća elektroda u rastvoru je referentna elektroda. Referentna elektroda je elektroda tačno poznatog potencijala. Ona se sa radnom elektrodom povezuje strujnim kolom ogromnog otpora ( $10^{12}$  i više  $\Omega$ ) sa ciljem da kroz to kolo praktično ne protiče struja, a ono služi da izmeri razliku potencijala između radne i referentne elektrode. Iz te razlike potencijala i poznate vrednosti potencijala referentne elektrode određuje se potencijal radne elektrode. Kada se sporom promenom potencijala radna elektroda dovede na potencijal na kome se neka hemijska vrsta (jon ili molekul prisutan u rastvoru) oksiduje ili redukuje, ta elektrohemijska reakcija dovodi do depolarizacije radne elektrode i do protoka električne struje između radne i pomoćne elektrode. Na slici 24a prikazana je uprošćena šema polarografskog uređaja. Tokom polarografske analize snima se zavisnost jačine struje između radne i pomoćne elektrode od potencijala radne elektrode, i dobijena kriva se naziva i-E kriva, odnosno polarogram. Svaka vrsta koja reaguje na radnoj elektrodi daje na polarogramu takozvani polarografski talas. Primer polarografskog talasa za redukciju kadmijuma iz  $\text{Cd}^{2+}$  u elementarni, dat je na slici 24b. Polarografski talas ima dve važne karakteristike: visinu koja se zove granična difuziona struja i na slici 24b je označena sa  $i_d$ , i ona je proporcionalna koncentraciji vrste koja reaguje na elektrodi (kadmijuma (II) u našem primeru) i polutalasni potencijal. Polutalasni potencijal je potencijal na kome difuziona struja dostigne polovinu svoje maksimalne (granične) vrednosti. Vrednost polutalasnog potencijala je karakteristična za određenu hemijsku vrstu. Polutalasni potencijal se koristi za kvalitativnu, a vrednost granične difuzione struje (visina talasa) za kvantitativnu analizu.

Polarografska merenja u ovom radu obavljana su polarografskim uređajem PAR (Princeton Applied Research) 174A sa priključenim X-Y pisačem (Houston Instruments, Omnigraph 2000) za automatsko beleženje polarografskih i-E krivih. Elektroadni sistem elektrolitičke ćelije sastojao se od tri elektrode:

- radne kapljuće živine elektrode (KŽE) kapilarnih karakteristika (masa žive istekle iz kapilare u jednoj sekundi)  $m = 2.5 \text{ mg s}^{-1}$  pri visini Hg rezervoara od 75 cm,
- referentne zasićene kalomelske elektrode (ZKE),
- platinskog (Pt) lima kao pomoćne elektrode.

Korišćena je polarografska ćelija zapremine 30 ml prilagođena za termostatiranje. Programirano vreme kapanja ( $\tau$ ) KŽE od 1 s podešeno je instrumentom. Brzina promene polarizujućeg napona iznosila je  $10 \text{ mV/s}$ , a početni potencijal  $0.1 \text{ V}$  prema ZKE. Promena potencijala polarizacije je usmerena ka negativnijim vrednostima potencijala. Suzbijanje kapacitivne komponente struje i-E signala vršeno je filterom instrumenta na poziciji 3 s. Strujna osetljivost u većini slučajeva iznosila  $20 \mu\text{A}$  (pun otklon skale od 250 mm). Radi uklanjanja prisutnog kiseonika struja analitički čistog azota propuštana je kroz rastvor u ćeliji u trajanju od 5 minuta. Tokom snimanja održavana je inertna atmosfera (struja azota iznad rastvora). Po dodatku uzorka rastvor je 30 s homogenizovan mešanjem azotom.



Slika 24. a) Šema polarografskog uređaja: KŽE-kapljuća živina elektroda; PE pomoćna elektroda; Ref E referentna elektroda, b) Polarografske i-E krive: A-osnovni elektrolit 0.1 M KCl; B-redukcija jona kadmijuma iz osnovnog elektrolita ( $E_{1/2}$ -polutaladni potencijal,  $i_d$ -granična difuziona struja)

Postupak pri radu bio je sledeći. Optimalna koncentracija vodonik peroksida (5 mM) u puferskom rastvoru (Clark Lubs pufer pH 9.8) je određena iz koncentracione zavisnosti anodne struje peroksida (*Sužnjević i sar., 2011*). U 20 ml rastvora peroksida u puferu, ekstrakti različitih vrsta čokolada su najpre dodavani u alikvotima od 100  $\mu$ l. Prvo je snimljena i-E kriva polaznog rastvora peroksida, a zatim nakon svakog dodatog alikvota ispitivanog ekstrakta. Alikvoti od 100  $\mu$ l ekstrakata mlečnih čokolada su izazivali ravnomerno smanjenje struje peroksida. Prvi dodatak ekstrakta crnih čokolada sa 44 % kakao-delova, a naročito crnih sa 75 % kakao-delova, izazvao je veliko smanjenje struje peroksida, koje je posle svakog sledećeg dodatka bilo sve manje. Da bi smanjenje bilo ravnomerno zapremina dodatka ekstrakta crnih čokolada je smanjena na 50  $\mu$ l. Meren je itenzitet, tj. visina granične struje osnovnog anodnog pika peroksida ( $i_{l0}$ ), kao i visina pikova dobijenih po svakom dodatku uzorka ( $i_{lr}$ ). Izračunato je smanjenje struje pika po svakom dodatku pojedinačno. Procenat smanjenja početne struje vodonik peroksida izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ smanjenje } [\text{H}_2\text{O}_2] = \left( 1 - \frac{i_{lr}}{i_{l0}} \right) \times 100 \quad (15)$$

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta smanjenja od zapremine dodatog uzorka. Aktivnost uzorka izražena je kao nagib pravolinijskog dela te zavisnosti. Zavisnost je za uzorke mlečnih čokolada bila linearna u celom intervalu zapremine od 100 do 500  $\mu$ l. U eksperimentima sa crnim čokoladama (sa 44 % i 75 % kakao-delova) je pri većim zapreminama primećena nelinearnost, tj. formiranje platoa pomenute zavisnosti. Kao što je ranije pomenuto, to je i bio razlog da se ekstrakti crnih čokolada dodaju u manjim zapreminama u odnosu na ekstrakte mlečnih čokolada.

#### 4.2.6.4. Određivanje indukcionog vremena oksidacije (OIT) primenom DSC

Na uzorcima masti ekstrahovanim iz svih analiziranih čokolada sa probioticima (4.2.5.1.) određeno je indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperatura početka oksidacije (OOT) primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.

Za oba navedena ispitivanja uzorci su pripremljeni na isti način. Nakon ekstrakcije na hladno i otparavanja rastvarača u aluminijumskom čančetu odmereno je od 3 do 3.33 mg svakog analiziranog uzorka masti sa tačnošću od  $\pm 0.01$  mg. Čanče sa odmerenim uzorkom, bez poklopca, postavi se u DSC ćeliju na poziciju za uzorak, a na referentnu poziciju prazno čanče, bez poklopca.

Određivanje indukcionog vremena oksidacije (OIT) primenom DSC obavlja se prema standardu *ASTM E 1858-08*.

Uzorak se greje brzinom  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  u struji azota (protok  $50\text{ ml}/\text{min}$ ) od sobne temperature do uspostavljanja izotermalne temperature ( $140^{\circ}\text{C}$ ), kada se umesto azota uvodi kiseonik (protoka  $50\text{ ml}/\text{min}$ ). Uzorak se održava pod navedenim uslovima sve do početka egzotermnog odstupanja toplotnog protoka. Eksperimentalna metoda je kreirana pomoću softvera Q series Explorer i elektronski sačuvana. Za određivanje oksidacionog indukcionog vremena koristi se program TA Universal Analysis 2000.

#### 4.2.6.5. Određivanje temperature početka oksidacije (OOT) primenom DSC

Određivanje temperature početka oksidacije (OOT) uzoraka masti ekstrahovanih iz različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika, primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, obavljeno je prema standardu *ASTM E 2009-08*.

Uzorak se greje brzinom  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  u struji kiseonika (protok  $50\text{ ml}/\text{min}$ ) od sobne temperature do početka egzotermnog odstupanja toplotnog protoka. Eksperimentalna metoda je kreirana pomoću softvera Q series Explorer i elektronski sačuvana. Za određivanje temperature početka oksidacije iz dobijenog termograma, koristi se program TA Universal Analysis 2000.

#### 4.2.7. Određivanje reoloških karakteristika prema ICA (IOCCC) metodi

Reološka svojstva uzoraka različitih vrsta čokolada sa probioticima, kao i kontrolnih uzoraka, određena su po metodi preporučenoj od strane Međunarodne asocijacije za konditorske proizvode (ICA, bivša IOCCC) za merenje viskoziteta kakao-proizvoda i čokolade (Viscosity of Cocoa and Chocolate, Analytical Method 46, 2000).

Pre početka merenja uzorci čokolada su otopljeni zagrevanjem u sušnici na 40-42°C (niža temperatura za mlečne čokolade) tokom 60 minuta.

Za određivanje viskoziteta upotrebljen je rotacioni viskozimetar sa koncentričnim mernim cilindrom i mernom geometrijom SV-DIN, model VT550 (Visco Tester, Haake, Nemačka).

Otopljeni uzorci su uneti u predgrejanu mernu posudu viskozimetra – stator, i potom kondicionirani na 40°C i izloženi stalnoj brzini smicanja (od 5 s<sup>-1</sup>) do postizanja stabilnih očitavanja instrumenta u opsegu od 2 % tokom 2 minuta. Ovim se postiže izjednačavanje temperature i uniformno raspoređivanje čokoladne mase unutar anularnog prostora viskozimetra, posle čega se pristupa merenju pri početnoj brzini smicanja. Merenja svojstava proticanja su obavljena na temperaturi od 40°C primenom brzina smicanja u intervalu od 2-50 s<sup>-1</sup>. Podaci za viskozitet su izračunati na osnovu napona smicanja merenog kroz ceo interval brzina smicanja. Za interpolaciju između tačaka i izračunavanje ostalih reoloških podataka korišten je matematički model po Casson-u. Na osnovu izmerenih vrednosti napona smicanja u zavisnosti od brzine smicanja provereno je važenje sledeće jednačine proticanja:

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_{CA}} + \sqrt{\eta_{CA}} \cdot \sqrt{D} \quad (16)$$

gde je:

$\tau$  - napon smicanja (Pa)

$\tau_{CA}$  - prinosni napon po Casson-u (Pa)

$\eta_{CA}$  – plastični viskozitet po Casson-u (Pas)

D - brzina smicanja (s<sup>-1</sup>).

Rezultati su prikazani u vidu krivih proticanja (krive napona smicanja i viskoziteta) i tabelarno. Pored toga, određen je i statistički pokazatelj kvaliteta podudaranja date jednačine u vidu koeficijenta korelacije (r).

#### 4.2.8. Analize ambalažnih materijala

Različite vrste čokolada (mlečne, crne sa 44 % i sa 75 % kakao-delova) sa dodate tri vrste probiotskih kultura (D, B i L3), kao i kontrolne čokolade, bile su upakovane u

identične ambalažne materijale, pri čemu je štampana lakirana aluminijumska folija predstavljala primarnu ambalažu (u dodiru sa proizvodom) (označena kao uzorak 1), a sekundarni ambalažni materijal je bio sačinjen od štampane papirne/kartonske blankete (označene kao uzorak 2).

#### 4.2.8.1. Određivanje debljine materijala

Debljina uzoraka ambalažnih materijala je određena metodom *SRPS G.S2.703:1968*, a merenje je izvršeno mernim vijkom "Mikro 2000". Merenje debljine se izvodi stavljanjem uzorka tj. isečene epruvete između mernih pipaka mikrometra i očitavanjem debljine na displeju mikrometra. Na svakoj isečenoj epruveti debljina se meri na 8 različitih mesta, a debljina ispitivanog uzorka se izračunava kao srednja vrednost pojedinačnih epruveta.

#### 4.2.8.2. Određivanje mase po jedinici površine materijala

Masa po jedinici površine je određena metodom *SRPS G.S2.702:1968*. Od folije se iseku uzorci poznate površine, izmeri se njihova masa i preračuna na jedinicu površine. Nakon razdvajanja, na isti način se izračunava i površinska masa monomaterijala.

#### 4.2.8.3. Određivanje mehaničkih svojstava ambalažnih materijala

Određivanje mehaničkih svojstava ispitivanih materijala (zatezna jačina i izduženje pri kidanju) obavnjeno na aparatu „INSTRON 4301“ po metodi opisanoj u standardu «Plastične mase - Ispitivanje folija zatezanjem», oznaka standarda: *SRPS G.S2.734:1972*.

#### 4.2.8.4. Određivanje propustljivosti gasova

Barijerna svojstva materijala (propustljivost gasova: CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) ispitana su metodom po Lyssy-u, prema *DIN-u 53380* na aparatu Lyssy GPM-200, sa pripadajućim gasnim hromatografom Gasukuro Kogyo GC-320 i integratorom HP 3396A, a propustljivost vazduha određena je računskim putem.

#### 4.2.8.5. Određivanje hermetičnosti vara

Var se prvo ispituje vizuelnim pregledom, pri čemu se posmatra da li ivice pravilno naležu jedna na drugu, da li je došlo do nabiranja ili gužvanja materijala pri formiranju vara, itd. Zatim se hermetičnost vara ispituje 1%-tnim rastvorom rodamina B. Ukoliko rastvor prođe kroz var, dokazana je njegova nehermetičnost.

#### 4.2.9. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

Izračunavanje srednjih vrednosti i standardnih devijacija obavljeno je u Excel-u (Microsoft Office 2007). Proračun HSD Tukey – evog testa je obavljen u programu StatSoft Statistica 10.0, istovremeno za tri različite vrste čokolada (mlečne i dva tipa crnih), uz dodatke različitih probiotika (D, B, L3), uključujući i kontrolne uzorke, tokom tri perioda skladištenja (0-30, 90 i 180 dana). Izuzetak su rezultati ocenjivanja senzornog kvaliteta čokolada, kod koji su poređena vršena samo u okviru iste vrste čokolada sa dodatim probioticima.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. PRIKAZ REZULTATA PRELIMINARNOG OGLEDA

Početa istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom sprovedena su u okviru preliminarnog ogleda, koji se sastojao u inkorporiranju tri koncentracije ispitivanih probiotika u tri čokoladne mase različitog sastava. Bilo je predviđeno da se na ovaj način dođe do optimalne količine svakog probiotika koja obezbeđuje dovoljan broj vijabilnih probiotskih ćelija i dobar senzorni kvalitet različitih vrsta čokolada.

S obzirom na visoku cenu probiotskih preparata težnja je bila da se izbegne dodavanje prekomernih količina probiotika ukoliko to nije neophodno, što bi doprinelo ekonomičnosti finalnog proizvoda u eventualnoj daljoj industrijskoj proizvodnji i omogućilo postizanje njegove pristupačne cene, a time i šire potrošnje. Međutim, treba imati u vidu da bi dodata količina probiotika trebalo da bude tolika da nadoknadi eventualne gubitke tokom proizvodnje i skladištenja i tako obezbedi dostavu korisnih bakterija u što većem broju i aktivnom stanju u GI trakt čoveka. Sa druge strane, senzorna svojstva su jedan od najvažnijih parametara kvaliteta koji u najvećoj meri opredeljuje potrošače pri izboru određene hrane. Navedeno ima poseban značaj kod čokolade, kao „namirnice za povlađivanje“, koja čak kod nekih konzumenata dovodi do nastanka žudnje (*chocolate craving*) - fenomena koji je, pre svega, uzrokovan senzornim svojstvima čokolade (*Michener i Rozin, 1994*). Zbog toga je neophodno očuvati senzorni kvalitet pri isprobavanju bilo koje nove formulacije, naročito ukus i teksturu koje potrošači nisu spremni da podrede funkcionalnosti (*Siegrist i sar., 2008*). Pored toga, dodatak probiotskih kultura u pravom momentu tokom proizvodnog procesa je od krucijalne važnosti za kvalitet i delotvornost ovakve vrste proizvoda.

Inkorporiranje probiotika u čokoladu u industrijskim uslovima povezano je sa nizom faktora, pri čemu je jedan od najvećih (radna) temperatura. Poznato je, naime, da je temperatura činilac koja utiče na rapidno opadanje broja vijabilnih ćelija i to čak 7 puta brže



na 30°C i 12 puta brže na 40°C u donosu na 25°C, zbog čega se probiotici mogu izlagati temperaturama od 40-45°C vrlo kratko vreme. U malobrojnim radovima objavljenim na ovu temu preporučuje se inkorporiranje probiotskih bakterija u čokoladnu masu kada je njena temperatura oko 40°C, što je uglavnom pre proizvodne faze temperiranja (Nebesny i sar., 2005; Nebesny i sar., 2007). Tokom ovog eksperimenta bili smo vođeni idejom da smanjimo rizik od izlaganja probiotskih bakterija letalnim temperaturama u što je moguće većoj meri, ali i da izbegnemo štetno dejstvo snažnog mehaničkog smicanja tokom dugotrajnog končiranja. Nakon nekoliko isprobanih varijanti inkorporiranja probiotskih kultura i usled tehničkih ograničenja u fabrici „Štark“ a. d., Beograd, odlučili smo se za umešavanje probiotika posle postupka temperiranja, odnosno pre faze oblikovanja, kada je temperatura čokoladne mase već snižena na 30-32°C.

Posle očvršćavanja i hlađenja, uzorci svih ispitivanih čokolada (ML, M i C) sa po tri različite koncentracije svakog od upotrebljenih probiotika (tabela 7, *Mat. i metode rada*) analizirani su u mikrobiološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dobijeni rezultati broja vijabilnih ćelija tri vrste probiotika (D, B i L3) dodatih u tri različite koncentracije u čokoladne mase različitog sastava (ML, M i C) prikazani su u tabeli 10.

Istovremeno, dobijeni probni uzorci različitih vrsta čokolada sa probioticima dodatim u tri koncentracije, podvrgnuti su senzornoj analizi od strane grupe stručnih ocenjivača iz oblasti senzornog ocenjivanja kvaliteta prehrambenih proizvoda, pri čemu su ocenjivani parametri obuhvatali izgled, teksturu i aromu (miris i ukus) čokolada.

Na osnovu dobijenih rezultata preliminarnog ogleada, konstatovano je da se primenom najniže koncentracije probiotskih bakterija C1 ne dobija dovoljan početni broj aktivnih ćelija, pa je ova koncentracija odbačena kao nezadovoljavajuća. Pored toga, uočeno je da se dodatkom probiotika u najvećoj koncentraciji C3 ne postiže značajno povećanje broja vijabilnih ćelija u odnosu na onaj broj koji se dobija dodavanjem koncentracije C2. Drugim rečima, dodavanjem probiotskih bakterija u koncentraciji C2 obezbeđuje se optimalan broj vijabilnih ćelija probiotika u čokoladama različitog sastava.

Tabela 10. Broj vijabilnih ćelija utvrđen nakon dodatka različitih probiotika u tri koncentracije u čokoladne mase različitog sastava tokom preliminarnog ogleda

| Vrsta čokolade | Probiotik | Utvrđeni broj vijabilnih ćelija pri različitim koncentracijama dodatih probiotika |                      |                      |                      |
|----------------|-----------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
|                |           | C 1   | C 2                  | C 3                  |                      |
| ML             | D         | 2.20x10 <sup>8</sup>  | 5.35x10 <sup>8</sup> | 7.95x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | B         | 6.50x10 <sup>7</sup>  | 1.30x10 <sup>8</sup> | 2.20x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | L3        | LA  | 2.70x10 <sup>8</sup> | 5.95x10 <sup>8</sup> | 8.90x10 <sup>8</sup> |
|                |           | ST  | 3.00x10 <sup>8</sup> | 6.75x10 <sup>8</sup> | 9.90x10 <sup>8</sup> |
| BB             |           | 3.15x10 <sup>6</sup>  | 6.50x10 <sup>6</sup> | 9.50x10 <sup>6</sup> |                      |
| M              | D         | 2.00x10 <sup>8</sup>  | 4.80x10 <sup>8</sup> | 7.20x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | B         | 5.95x10 <sup>7</sup>  | 1.20x10 <sup>8</sup> | 2.10x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | L3        | LA  | 2.90x10 <sup>8</sup> | 5.80x10 <sup>8</sup> | 8.80x10 <sup>8</sup> |
|                |           | ST  | 2.40x10 <sup>8</sup> | 5.10x10 <sup>8</sup> | 7.70x10 <sup>8</sup> |
| BB             |           | 2.80x10 <sup>6</sup>  | 5.90x10 <sup>6</sup> | 8.75x10 <sup>6</sup> |                      |
| C              | D         | 2.10x10 <sup>8</sup>  | 5.00x10 <sup>8</sup> | 7.50x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | B         | 6.75x10 <sup>7</sup>  | 1.35x10 <sup>8</sup> | 2.25x10 <sup>8</sup> |                      |
|                | L3        | LA  | 2.60x10 <sup>8</sup> | 5.85x10 <sup>8</sup> | 8.75x10 <sup>8</sup> |
|                |           | ST  | 2.35x10 <sup>8</sup> | 4.95x10 <sup>8</sup> | 7.40x10 <sup>8</sup> |
| BB             |           | 2.50x10 <sup>6</sup>  | 5.30x10 <sup>6</sup> | 7.95x10 <sup>6</sup> |                      |

Osim toga, na osnovu rezultata senzorne analize utvrđeno je da se najoptimalniji senzorni kvalitet postiže upravo pri koncentraciji probiotika C2, budući da se primenom veće koncentracije C3, znatno češće oseti peskovitost pri žvakanju pojedinih uzoraka, čime se remeti fina, glatka tekstura čokolada. Zbog svega navedenog, odlučeno je da se tokom glavnog eksperimenta tri vrste probiotskih kultura inkorporiraju u tri vrste čokoladnih masa različitog sastava u koncentraciji C2 (tabela 7, *Mat. i metode rada*).

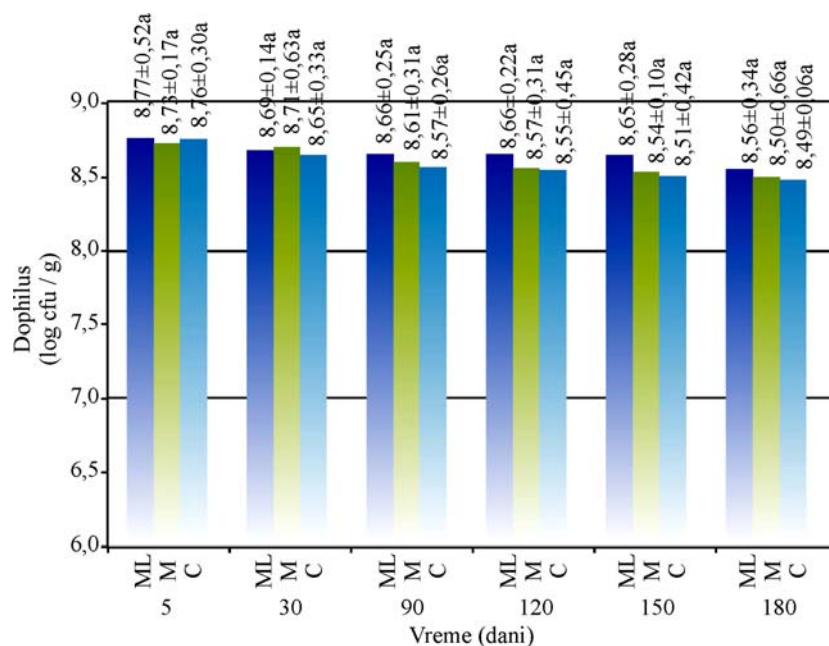
## 5.2. REZULTATI ODREĐIVANJA VIJABILNOSTI PROBIOTSKIH BAKTERIJA U ČOKOLADAMA

Promene broja inkorporiranih probiotskih bakterija u različitim vrstama čokolada, tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C prikazane su u tabelama od 11-13. Radi lakšeg sagledavanja trenda kretanja broja pojedinih vrsta probiotskih bakterija podaci su prikazani i na graficima od 1-6.

Potrošači u pravi mah ne povezuju BMK sa konditorskim proizvodima, iako postoje proizvodi ili puluproizvodi iz ove grupe (kao što su neka punjenja za čokolade ili bombone, karamelna masa, neke vrste deserata, itd.) koji su čak deklarirani kao npr. “jogurti”. Oni se delom dobijaju iz fermentisanih mlečnih napitaka, tradicionalnih nosača BMK. Međutim, unošenjem u konditorske proizvode bivaju izloženi pojedinim fazama prerade sa štetnim efektima po bakterijske ćelije, te ne uspevaju da prežive ni pomenute proizvodne faze, niti kasnije uslove čuvanja na sobnoj temperaturi. Preživljavanje BMK, uključujući i probiotske sojeve, u hrani, povezano je sa nizom destabilizujućih činilaca zbog čega obogaćivanje namirnica vijabilnim probiotskim ćelijama, pogotovo van domena proizvoda od mleka, zahteva prilagođavanje pojedinih proizvodnih etapa. Ipak, treba istaći da se, iako se na taj način povećavaju izgledi za postizanje većeg broja aktivnih ćelija, navedeno ni u kom slučaju ne može smatrati izvesnim, prvenstveno zbog osetljivosti probiotika prema velikom broju faktora.

Tabela 11. Promene broja probiotskih ćelija soja *L. acidophilus* NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C

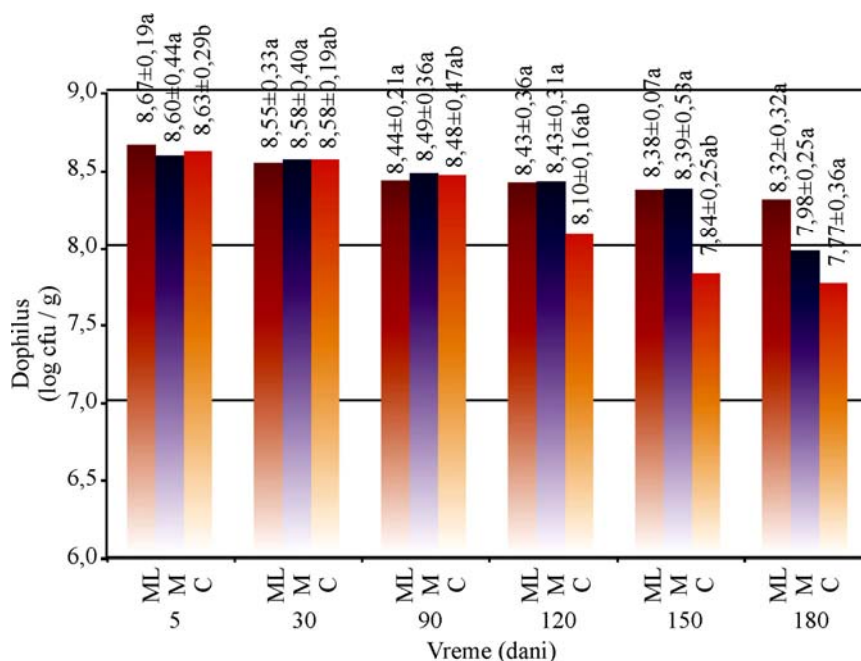
| Vreme skladištenja (dani) | Temperatura skladištenja |                      |                      |                      |                      |                      |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                           | T=4°C                    |                      |                      | T=20°C               |                      |                      |
|                           | Vrsta čokolade           |                      |                      |                      |                      |                      |
|                           | ML                       | M                    | C                    | ML                   | M                    | C                    |
| 5                         | 5.90x10 <sup>8</sup>     | 5.40x10 <sup>8</sup> | 5.80x10 <sup>8</sup> | 4.72x10 <sup>8</sup> | 3.99x10 <sup>8</sup> | 4.25x10 <sup>8</sup> |
| 30                        | 4.88x10 <sup>8</sup>     | 5.14x10 <sup>8</sup> | 4.50x10 <sup>8</sup> | 3.57x10 <sup>8</sup> | 3.77x10 <sup>8</sup> | 3.76x10 <sup>8</sup> |
| 90                        | 4.59x10 <sup>8</sup>     | 4.07x10 <sup>8</sup> | 3.72x10 <sup>8</sup> | 2.77x10 <sup>8</sup> | 3.07x10 <sup>8</sup> | 3.00x10 <sup>8</sup> |
| 120                       | 4.55x10 <sup>8</sup>     | 3.70x10 <sup>8</sup> | 3.56x10 <sup>8</sup> | 2.68x10 <sup>8</sup> | 2.72x10 <sup>8</sup> | 1.25x10 <sup>8</sup> |
| 150                       | 4.50x10 <sup>8</sup>     | 3.50x10 <sup>8</sup> | 3.25x10 <sup>8</sup> | 2.40x10 <sup>8</sup> | 2.45x10 <sup>8</sup> | 6.90x10 <sup>7</sup> |
| 180                       | 3.64x10 <sup>8</sup>     | 3.19x10 <sup>8</sup> | 3.06x10 <sup>8</sup> | 2.07x10 <sup>8</sup> | 9.65x10 <sup>7</sup> | 5.95x10 <sup>7</sup> |



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotikom D;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 1. Promene broja probiotskih ćelija soja *L. acidophilus* NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotikom D;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 2. Promene broja probiotskih ćelija soja *L. acidophilus* NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C

Rezultati do kojih smo došli tokom ovog eksterimenta pokazuju da je preživljavanje probiotkog soja *L. acidophilus* NCFM® (D) u različitim vrstama čokolada (mlečna, crna sa 44 % i crna sa 75 % kakao-delova) bilo veoma dobro (tabela 11, grafici 1 i 2). Može se konstatovati da je tokom čitavog perioda skladištenja od 180 dana broj vijabilnih ćelija navedenog soja ostao na nivou od 8 log cfu/g, odnosno kod manjeg broja uzoraka 7 log cfu/g, na obe ispitivane temperature.

Zapaža se da je pri čuvanju na temperaturi od 4°C broj aktivnih ćelija bio veoma ujednačen na samom početku ispitivanja (5. dana skladištenja) kod sve tri vrste čokolada (ML:  $5.90 \times 10^8$ ; M:  $5.40 \times 10^8$  i C:  $5.80 \times 10^8$ , tabela 11). Sa odmicanjem vremena skladištenja broj vijabilnih ćelija se postepeno smanjivao, ali se odražao na nivou od 8 log cfu/g, kako kod mlečnih, tako i kod dve vrste crnih čokolada. Po isteku 180 dana skladištenja broj ćelija bio je u intervalu od  $3.06 \times 10^8$  (kod crnih čokolada sa 75% kakao-delova, tabela 11) do  $3.64 \times 10^8$ , koliko je nađeno kod uzoraka mlečnih čokolada, iz čega proizilazi da su razlike u broju živih ćelija između različitih vrsta čokolada ispoljene samo u nijansama.

Pri skladištenju na sobnoj temperaturi vijabilnost je, tokom 120 dana skladištenja, bila u uskim granica kod sve tri vrste čokolada, održavši se na nivou od 8 log cfu/g (tabela 11). Nakon tog perioda u mlečnim čokoladama zadržava se visok broj vijabilnih ćelija do samog kraja ispitivanja ( $2.07 \times 10^8$  posle 180 dana), dok se nešto brži trend opadanja zapaža kod crnih čokolada: crne sa 44 % kakao-delova su posle 180 dana skladištenja imale  $9.65 \times 10^7$  aktivnih ćelija, dok je kod crnih sa 75 % kakao-delova smanjenje broja nastupilo nakon 150 dana skladištenja ( $6.90 \times 10^7$ ), ostavši na tom nivou do kraja eksperimenta ( $5.95 \times 10^7$ ).

Navedene promene na temperaturama skladištenja mogu se pratiti na graficima 1 i 2.

Rezultati statističke analize primenom Tukey-evog testa (grafik 1) pokazuju da, pri skladištenju na 4°C, nisu postojale statistički značajne razlike u broju vijabilnih ćelija probiotika D u različitim vrstama čokolada, kao i da opadanje tog broja sa vremenom nije statistički značajno. Takođe, tokom skladištenja na 20°C (grafik 2), značajnije razlike ( $p < 0.05$ ) u broju vijabilnih ćelija javljaju se jedino u crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova, i to samo između prvog (5. dan) i poslednjeg perioda ispitivanja (180. dan).

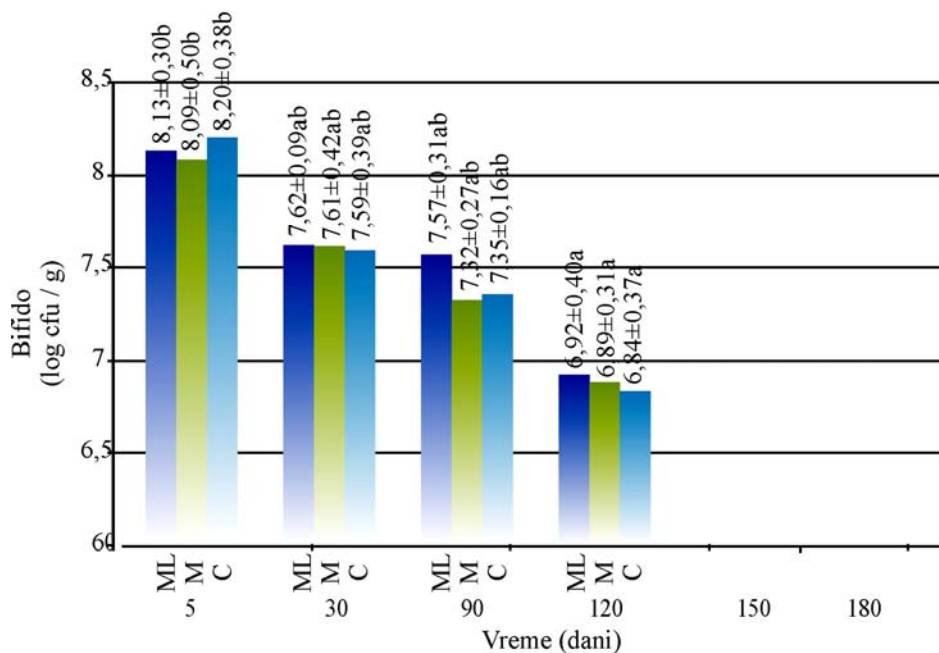
Slično prethodnom, i probiotki soj *B. lactis* HN019 (B) neposredno posle

proizvodnje je pokazao dobru vijabilnost u svim vrstama čokolada i to na nivou 8 log cfu/g (tabela 12, grafici 3 i 4). Međutim, za razliku od *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup> (D), kod soja *B. lactis* HN019 (B) došlo je do bržeg smanjenja broja aktivnih ćelija, koji se nakon 30 dana skladištenja na obe ispitivane temperature spustio do nivoa od 7 log cfu/g, na kom se zadržao i nakon 90 dana. U sledećem periodu ispitivanja, 120. dana skladištenja, broj vijabilnih ćelija ovog soja smanjio se na 6 log cfu/g u svim vrstama čokolada na obe temperature, što se statistički značajno razlikuje u odnosu na 5. dan ispitivanja (Tukey test, grafici 3 i 4).

Tabela 12. Promene broja probiotskih ćelija soja *B. lactis* HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C

| Vreme skladištenja (dani) | Temperatura skladištenja |                      |                      |                      |                      |                      |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                           | T=4°C                    |                      |                      | T=20°C               |                      |                      |
|                           | Vrsta čokolade           |                      |                      |                      |                      |                      |
|                           | ML                       | M                    | C                    | ML                   | M                    | C                    |
| 5                         | 1.35x10 <sup>8</sup>     | 1.22x10 <sup>8</sup> | 1.60x10 <sup>8</sup> | 1.00x10 <sup>8</sup> | 1.08x10 <sup>8</sup> | 1.15x10 <sup>8</sup> |
| 30                        | 4.20x10 <sup>7</sup>     | 4.10x10 <sup>7</sup> | 3.90x10 <sup>7</sup> | 4.90x10 <sup>7</sup> | 6.30x10 <sup>7</sup> | 5.75x10 <sup>7</sup> |
| 90                        | 3.70x10 <sup>7</sup>     | 2.10x10 <sup>7</sup> | 2.25x10 <sup>7</sup> | 4.15x10 <sup>7</sup> | 5.20x10 <sup>7</sup> | 4.25x10 <sup>7</sup> |
| 120                       | 8.40x10 <sup>6</sup>     | 7.70x10 <sup>6</sup> | 6.90x10 <sup>6</sup> | 7.20x10 <sup>6</sup> | 5.00x10 <sup>6</sup> | 3.30x10 <sup>6</sup> |
| 150                       | /                        | /                    | /                    | /                    | /                    | /                    |
| 180                       | /                        | /                    | /                    | /                    | /                    | /                    |

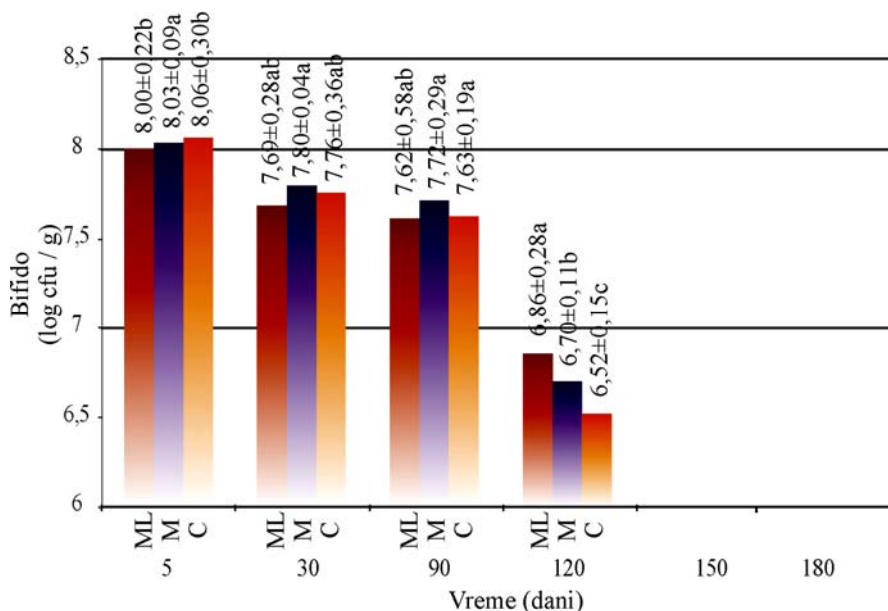
Posle isteka 150 dana došlo je do još značajnijeg redukovanja brojnosti bifidobakterija, tako da je kod svih analiziranih uzoraka čokolada utvrđeno smanjenje ispod nivoa neophodnog za postizanje terapijskih efekata u momentu konzumiranja (vrednosti nisu prikazane). Dakle, evidentno je da je probiotski soj *B. lactis* HN019 (B) ispoljio znatno manji stepen vijabilnosti u svim ispitivanim uzorcima u odnosu na *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup> (D), te je, kao posledica toga, funkcionalnost čokolada sa navedenim sojem ograničena na period od 90 dana od momenta proizvodnje. Što se tiče vrsta čokolada, podaci dobijeni Tukey-evim testom pokazuju da se tokom skladištenja na 4°C utvrđeni broj ćelija nije statistički značajno razlikovao između mlečnih i crnih čokolada (grafik 3).



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotikom B;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 3. Promene broja probiotskih ćelija soja *B. lactis* HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotikom B;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 4. Promene broja probiotskih ćelija soja *B. lactis* HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C

Na 20°C uočava se da je početni broj ćelija bio neznatno viši u crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova ( $1.15 \times 10^8$ , tabela 12) u odnosu na mlečne ( $1.00 \times 10^8$ ), dok je na kraju eksperimenta situacija obrnuta, i veća vijabilnost je ustanovljena kod mlečnih ( $7.20 \times 10^6$ ) nego kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova ( $3.30 \times 10^6$ ), kada su razlike značajne na nivou  $p < 0.05$  (Tukey test, grafik 4). *B. lactis* HN019 (B) u crnim čokoladama sa 44 % kakao-delova na 20°C ispoljio je ponašanje slično soju *L. acidophilus* NCFM® (D) u ovim čokoladama na istoj temperaturi, konkretno, u pojedinim intervalima ispitivanja (30. i 90. dana) imao je veću vijabilnost u odnosu i na mlečne i na crne sa 75 % kakao-delova ( $6.30 \times 10^7$ , tj.  $5.20 \times 10^7$ , tabela 12). Zanimljiv je i podatak da je *B. lactis* HN019 (B) u pojedinim periodima ispitivanja imao veću vijabilnost na 20°C nego na 4°C u sve tri vrste čokolada, što ukazuje da se ovakvi proizvodi mogu sačuvati svoju funkcionalnost i tokom čuvanja na sobnoj temperaturi.

Mikrobiološki status uzoraka čokolada sa inkorporiranim probiotskim preparatom L3 je posebno interesantan. Navedeni preparat sadrži laktobacile, bifodobakterije, kao i streptokoke, odnosno predstavlja mešavinu tri mikroinkapsulisane probiotske kulture (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium breve*) koje su pokazale vrlo dobru vijabilnost tokom celokupnog perioda ispitivanja od 180 dana (tabela 13, grafici 5 i 6). Posmatrano pojedinačno, u prvom periodu ispitivanja nakon 5 dana od momenta proizvodnje, laktobacili i streptokoke su imali dobru održivost u broju koji omogućava ispoljavanje svih željenih benefita tokom konzumiranja (8 log cfu/g) u svim vrstama čokolade na obe posmatrane temperature (tabela 13). Laktobacili su, kao i u slučaju liofilizovanih kultura, ostali na visokom nivou vijabilnosti od 8 log cfu/g do kraja ispitivanja u sve tri vrste čokolada na dve temperature čuvanja. Opadanje broja streptokoka za jednu logaritamsku jedinicu u crnim čokoladama sa 44 % i 75 % kakao-delova nastupilo je 150. dana skladištenja na temperaturi hlađenja, dok je na 20°C do redukovanja njihovog broja došlo 120. dana, a potom 150. dana od proizvodnje ponovo, za još jednu logaritamsku jedinicu, da bi na samom kraju eksperimenta njihov broj bio 6 log cfu/g. Nasuprot tome, u mlečnim čokoladama streptokoke su ispoljile veoma dobro preživljavanje u području 8 log cfu/g, kako na nižoj, tako i na višoj temperaturi tokom šest meseci čuvanja (tabela 13). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa nalazima drugih autora u pogledu održivosti laktobacila na temperaturi frižidera i sobnoj (Nebesny i sar., 2007), i gotovo identični kada je u pitanju



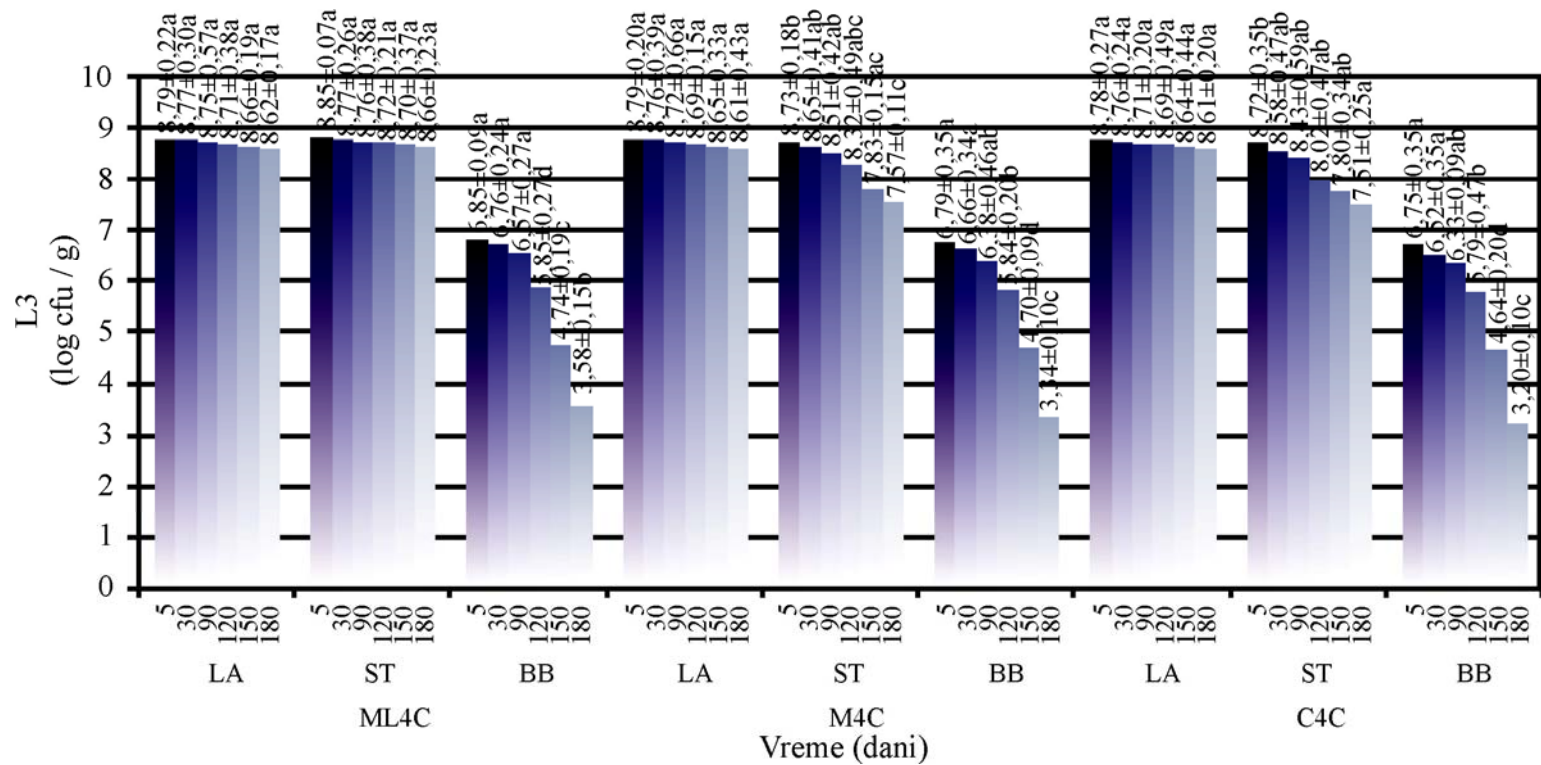
broj streptokoka u čokoladama čuvanim pod istim uslovima i u jednakom vremenskom intervalu (Nebesny i sar., 2005). Sa druge strane, početni broj ćelija soja *Bifidobacterium breve* bio je znatno niži u odnosu na ostale kulture iz mešavine (6 log cfu/g) i ostao je u navedenom području u tri vrste čokolada tokom 90 dana skladištenja na 4°C, kao i u mlečnim čokoladama na 20°C, dakle na samom minimumu funkcionalnosti (tabela 13). U obe vrste crnih čokolada na sobnoj temperaturi vijabilnost bifidobakterija opala je sa 6 na 5 log cfu/g posle 30 dana skladištenja. Slične promene zapažene su i kod liofilizovanih bifidobakterija soja *B. lactis* HN019 (B) (tabela 12), s tim što ne treba izgubiti iz vida da se radi o različitim sojevima, kao i da su bifidobakterije u inkapsulisanoj formi imale nešto nižu startnu koncentraciju u samom preparatu L3 u odnosu na one u liofilizovanom stanju (tabela 6, *Mat. i metode rada*). Trend opadanja *B. breve* u inkapsulisanoj formi nastavljen je i sa proticanjem vremena skladištenja, pa je u poslednjem periodu ispitivanja (180. dana) broj bifidobakterija bio reda veličine 3 log cfu/g u svim ispitivanim uzorcima čokolada. Pored toga što su gotovo sve probiotske bakterije osetljive na uticaje okoline i uslove tokom proizvodnje, smatra se da bifidobakterije, iako jedne od najblagotvornijih u zdravstvenom smislu (*Champagne i sar., 2005*), istovremeno spadaju i u najpodložnije dejstvu različitih faktora, pogotovo vazdušnog kiseonika (*Crittenden, 2004*), što može biti jedan od uzroka rapidnijeg opadanja njihove vijabilnosti prilikom primene u različitim vrstama čokolada.

Na bazi podataka dobijenih Tukey-evim testom, uočljivo je da se broj laktobacila iz mešavine L3 nije značajnije menjao u zavisnosti od vrste čokolade, kao ni sa vremenom skladištenja na obe posmatrane temperature (grafici 5 i 6). Vijabilnost streptokoka u mlečnim čokoladama čuvanim na 4°C nije se statistički značajno razlikovala od one na 20°C, a takođe nije došlo do značajnih razlika u broju ćelija tokom 180 dana skladištenja. U crnim čokoladama, sa manjim i sa većim sadržajem kakao-delova, broj streptokoka značajno se razlikovao ( $p < 0.05$ ) u odnosu na mlečne, a na istom nivou značajnosti javljaju se razlike i po vremenskoj koordinati (grafici 5 i 6). Statističkom analizom je potvrđeno i značajnije opadanje broja bifidobakterija na 4°C posle 90 dana u mlečnim (grafik 5), a već posle 30 dana u crnim čokoladama, s tim što se do navedenih perioda broj vijabilnih ćelija nije razlikovao u poređenju sa laktobacilima, već samo sa streptokokama. Pri višoj temperaturi skladištenja takođe je prisutana takva tendencija, ali je broj vijabilnih ćelija bifidobakterija bio značajno manji u odnosu i na laktobacile i streptokoke (grafik 6).

Bez obzira na opadanje vijabilnosti pojedinih sojeva (naročito *B. breve*) u smeši L3 ispod željenog nivoa, kod ovog probiotskog preparata je od značaja činjenica da se broj ćelija može posmatrati na nivou preparata, drugim rečima, zbirno. To, praktično, znači da je ukupan broj vijabilnih probiotskih ćelija u uzorcima čokolada sa inkorporiranom mešavinom kultura L3 bio vrlo visok, i kretao se u području od 9 log cfu/g neposredno nakon proizvodnje (5. dan skladištenja) do 8 log cfu/g posle isteka 180 dana skladištenja kod svih analiziranih vrsta čokolada i pri svim režimima čuvanja (tabela 13). Na taj način čokolade sa dodatom smešom kultura L3 poseduju funkcionalna svojstva koja potiču od probiotskih bakterija tokom čitavog eksperimenta. Isto tako, od velikog značaja je što se u slučaju mešavine probiotskih kultura može govoriti o sinergističnom efektu različitih sojeva koji omogućava višestruke benefite po zdravlje. Kada je u pitanju temperatura čuvanja uzoraka, uočava se da su se probiotske kulture kod pojedinih uzoraka čokolada održale na nešto višem nivou pri temperaturi od 4°C u odnosu na 20°C, ali ne u tolikoj meri da bi se moglo govoriti o pravilu uz potpuno isključenje nedovoljne homogenosti uzoraka, kao jednog od mogućih uzročnika. Dobijeni rezultati ukazuju da su svojim sastavom mlečne čokolade bile nešto povoljnije za održavanje probiotskih bakterija L3 u aktivnom obliku u odnosu na crne čokolade. Navedeno je posebno uočljivo kod *S. thermophilus* koje su imale najveću vijabilnost upravo u mlečnim čokoladama na obe temperature skladištenja, sa većim brojem ćelija i od *L. acidophilus*, dok je kod crnih čokolada (sa 44 % i 75% kakao-delova) konstatovana suprotna situacija. Kod crnih čokolada broj sterptokoka je znatno opao i bio niži ne samo u odnosu na njihov broj kod mlečnih čokolada, već i u odnosu na broj laktobacila utvrđen u crnim čokoladama (tabela 13). Naposljetku, imajući u vidu uslove tokom izvođenja ovog ogleada, dobijeni rezultati za probiotik L3 su više nego zadovoljavajući. Tome u prilog ide i veoma dobra zaštita sprovedena tokom mikroinkapsulacije mešavine probiotskih sojeva, odnosno primena proteinskog i polisaharidnog omotača, kojom se omogućava dodatna stabilnost, te se može pretpostaviti da će prilikom konzumiranja doći do kolonizacije GI trakta, i do eventualnog razmnožavanja unetih sojeva, uz obezbeđivanje najveće moguće koristi po domaćina. *Possemiers i sar. (2010)*, koji su ispitivali stepen preživljavanja mikroinkapsulisanih probiotika u crnim i mlečnim čokoladama tokom prolaska kroz simulirani gastrointestinalni model sistem (SHIME), rezultatima svojih istraživanja su potvrdili da je nakon konzumiranja probiotskih čokolada došlo do porasta broja kako laktobacila, tako i bifidobakterja u probavnom traktu.

Tabela 13. Promene broja probiotskih ćelija **L3** (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C

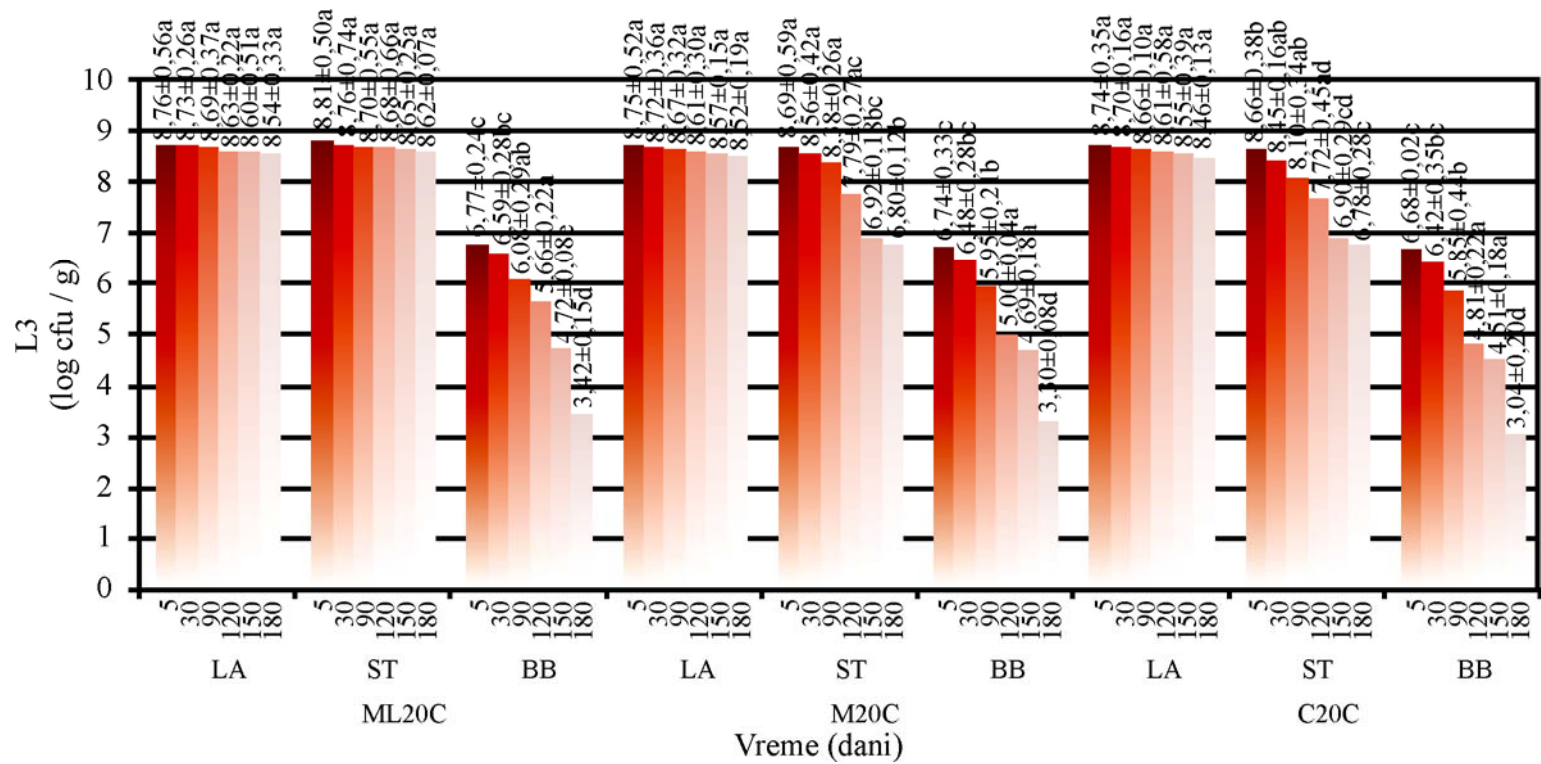
| Vreme skladištenja (dani) | Temperatura skladištenja |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                           | T=4°C                    |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      | T=20°C               |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|                           | Vrsta čokolade           |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|                           | ML                       |                      |                      | M                    |                      |                      | C                    |                      |                      | ML                   |                      |                      | M                    |                      |                      | C                    |                      |                      |
| LA                        | ST                       | BB                   | LA                   | ST                   | BB                   | LA                   | ST                   | BB                   | LA                   | ST                   | BB                   | LA                   | ST                   | BB                   | LA                   | ST                   | BB                   |                      |
| 5                         | 6.20x10 <sup>8</sup>     | 7.00x10 <sup>8</sup> | 7.00x10 <sup>6</sup> | 6.15x10 <sup>8</sup> | 5.40x10 <sup>8</sup> | 6.20x10 <sup>6</sup> | 6.00x10 <sup>8</sup> | 5.30x10 <sup>8</sup> | 5.65x10 <sup>6</sup> | 5.70x10 <sup>8</sup> | 6.50x10 <sup>8</sup> | 5.95x10 <sup>6</sup> | 5.60x10 <sup>8</sup> | 4.95x10 <sup>8</sup> | 5.50x10 <sup>6</sup> | 5.50x10 <sup>8</sup> | 4.55x10 <sup>8</sup> | 4.80x10 <sup>6</sup> |
| 30                        | 5.85x10 <sup>8</sup>     | 5.90x10 <sup>8</sup> | 5.75x10 <sup>6</sup> | 5.80x10 <sup>8</sup> | 4.45x10 <sup>8</sup> | 4.60x10 <sup>6</sup> | 5.70x10 <sup>8</sup> | 3.80x10 <sup>8</sup> | 3.30x10 <sup>6</sup> | 5.40x10 <sup>8</sup> | 5.75x10 <sup>8</sup> | 3.90x10 <sup>6</sup> | 5.20x10 <sup>8</sup> | 3.65x10 <sup>8</sup> | 3.00x10 <sup>6</sup> | 5.00x10 <sup>8</sup> | 2.85x10 <sup>8</sup> | 2.65x10 <sup>6</sup> |
| 90                        | 5.65x10 <sup>8</sup>     | 5.70x10 <sup>8</sup> | 3.70x10 <sup>6</sup> | 5.30x10 <sup>8</sup> | 3.20x10 <sup>8</sup> | 2.40x10 <sup>6</sup> | 5.15x10 <sup>8</sup> | 2.70x10 <sup>8</sup> | 2.15x10 <sup>6</sup> | 4.90x10 <sup>8</sup> | 5.05x10 <sup>8</sup> | 1.20x10 <sup>6</sup> | 4.70x10 <sup>8</sup> | 2.40x10 <sup>8</sup> | 8.95x10 <sup>5</sup> | 4.60x10 <sup>8</sup> | 1.25x10 <sup>8</sup> | 7.10x10 <sup>5</sup> |
| 120                       | 5.10x10 <sup>8</sup>     | 5.25x10 <sup>8</sup> | 7.15x10 <sup>5</sup> | 4.95x10 <sup>8</sup> | 2.10x10 <sup>8</sup> | 6.90x10 <sup>5</sup> | 4.90x10 <sup>8</sup> | 1.05x10 <sup>8</sup> | 6.10x10 <sup>5</sup> | 4.25x10 <sup>8</sup> | 4.80x10 <sup>8</sup> | 4.60x10 <sup>5</sup> | 4.10x10 <sup>8</sup> | 6.10x10 <sup>7</sup> | 9.90x10 <sup>4</sup> | 4.05x10 <sup>8</sup> | 5.20x10 <sup>7</sup> | 6.45x10 <sup>4</sup> |
| 150                       | 4.60x10 <sup>8</sup>     | 5.00x10 <sup>8</sup> | 5.50x10 <sup>4</sup> | 4.50x10 <sup>8</sup> | 6.80x10 <sup>7</sup> | 5.00x10 <sup>4</sup> | 4.35x10 <sup>8</sup> | 6.35x10 <sup>7</sup> | 4.35x10 <sup>4</sup> | 3.95x10 <sup>8</sup> | 4.50x10 <sup>8</sup> | 5.30x10 <sup>4</sup> | 3.70x10 <sup>8</sup> | 8.30x10 <sup>6</sup> | 4.90x10 <sup>4</sup> | 3.55x10 <sup>8</sup> | 8.00x10 <sup>6</sup> | 3.25x10 <sup>4</sup> |
| 180                       | 4.20x10 <sup>8</sup>     | 4.60x10 <sup>8</sup> | 3.80x10 <sup>3</sup> | 4.10x10 <sup>8</sup> | 3.70x10 <sup>7</sup> | 2.20x10 <sup>3</sup> | 4.05x10 <sup>8</sup> | 3.25x10 <sup>7</sup> | 1.60x10 <sup>3</sup> | 3.50x10 <sup>8</sup> | 4.20x10 <sup>8</sup> | 2.60x10 <sup>3</sup> | 3.30x10 <sup>8</sup> | 6.30x10 <sup>6</sup> | 2.00x10 <sup>3</sup> | 2.90x10 <sup>8</sup> | 6.00x10 <sup>6</sup> | 1.10x10 <sup>3</sup> |



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotskim preparatom L3;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 5. Promene broja probiotskih ćelija **L3** (cfu/g) različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C



\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa probiotskim preparatom L3;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Grafik 6. Promene broja probiotskih ćelija **L3** (cfu/g)u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C

Tokom ovog eksperimenta, koji je obuhvatio i proizvodnju različitih vrsta čokolada sa probioticima, tradicionalni postupak je modifikovan u korist opstanka inkorporiranih probiotskih kultura, naročito u pogledu izlaganja visokim temperaturama i to uvođenjem probiotskih bakterija na temperaturama oko 30°C. Međutim, prolaskom kroz proizvodne faze probiotici su izloženi i dejstvu drugih stresogenih faktora, posebno delovanju kiseonika, visokoj koncentraciji šećera i osmotskom pritisku, kao i mehaničkim smicanjima i dejstvu vlage (Mohammadi i sar., 2011). Sve navedeno utiče na broj aktivnih probiotskih ćelija i može uzrokovati opadanje njihove vijabilnosti, kako u toku same proizvodnje, tako u kombinaciji sa ostalim faktorima, i tokom perioda skladištenja, i svakako je doprinelo postepenom smanjenju dela živih ćelija korišćenih probiotika tokom našeg istraživanja. Ovo je posebno tačno kod bifidobakterija humanog porekla, pošto one često zahtevaju specifične nutritivne i uslove okoline za rast i preživljavanje (Lähtinen i sar., 2007). I pored evidentnog smanjenja sa vremenom, može se zaključiti da je vijabilnost liofilizovanih i inkapsulisanih probiotskih kultura u mlečnim i crnim (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokoladama, generano, bila dobra, sa izvesnom prednošću kod mlečnih. Očekivano, najbolje rezultate ispoljile su mikroinkapsulisane kulture, pre svega zbog toga što se radi o mešavini tri soja, kao i zbog primenjenih tehnika zaštite od uticaja spoljnih faktora. S obzirom na to, u ovom slučaju se može pretpostaviti i najbolje očuvanje tokom prolaska kroz gornji GI sistem. Dobru vijabilnost imale su i bakterije soja *L. acidophilus* NCFM® (D) u liofilizovanom obliku, budući da su se održale na funkcionalnom nivou tokom celokupnog ispitivanja. Najniži rezultat u pogledu preživljavanja imala je liofilizovana kultura *B. lactis* HN019 (B), sa padom funkcionalnog broja ćelija nakon 90 dana skladištenja. Slična situacija uočena je i kod kulture *B. breve* iz mešavine L3 čiji je broj ćelija već na samom startu bio na samoj granici funkcionalnosti. U slučaju liofilizovanih kultura, opadanje broja vijabilnih ćelija bifidobakterija dovelo je do skraćivanja perioda funkcionalnosti čokolada koje ih sadrže, dok je kod inkapsulisanih bifidobakterija taj gubitak donekle nadomešten prisustvom preostala dva soja iz mešavine. I pored konstatovanog vremenskog ograničenja funkcionalnosti čokolada sa inkorporiranim bifidobakterijama na period od 90 dana, treba naglasiti da se ipak radi o intervalu koji prevazilazi održivost fermentisanih proizvoda od mleka koji su do sada bili najčešći nosači

probiotika, te bi se, u tom smislu, proizvodnjom čokolada koje ih sadrže postigao napredak u produženju dostupnosti ovih delikatnih, a blagotvornih bakterija. Navedeno je kod laktobacila i streptokoka neosporno, imajući u vidu da su se u čokoladama održale u dovoljnom broju tokom 180 dana, a, pretpostavlja se, i duže. Mada je u određenom broju slučajeva bolja vijabilnost probiotskih bakterija utvrđena na nižoj temperaturi skladištenja, pojava suprotnih podataka kod pojedinih analiziranih uzoraka čokolada, ukazuje da se ne radi o pravilu. Naše istraživanje pružilo je potvrdu da se čokolade sa probioticima mogu skladištiti i na sobnoj temperaturi, bez bojazni od drastičnog pada funkcionalnosti proizvoda. Navedeno je od posebnog značaja za trgovce i potrošače, budući da se čokolade najčešće i čuvaju na sobnoj temperaturi, znatno češće nego u frižideru. Nadalje, treba istaći da se svi dobijeni rezultati u pogledu broja prisutnih živih ćelija pojedinih probiotskih sojeva odnose na gram proizvoda, odnosno čokolada. Međutim, čokolade se uobičajeno konzumiraju u količini većoj od 1g. Tako se ingestijom samo 20 g određene vrste čokolade sa probioticima, broj unetih korisnih bakterija povećava za ceo red veličine, što svakako predstavlja prednost. Takve čokolade povećane funkcionalnosti pružaju dvostruke benefite: rok njihove upotrebe je duži nego kod tradicionalnih proizvoda sa probiotskim bakterijama, a same čokolade, bilo mlečne ili crne, omogućavaju bolju zaštitu probioticima prilikom tranzita kroz želudac i efikasniju kolonizaciju crevnog trakta (*Maillard u Landuyt, 2009; Possemiers i sar., 2010*).

Generalno se može konstatovati da su ispitivani sojevi probiotskih bakterija u liofilizovanom i inkapsulisanom obliku ispoljili dobru vijabilnost u mlečnim i crnim čokoladama prilikom skladištenja na temperaturi hlađenja i sobnoj temperaturi u periodu od šest meseci, potvrdivši tako da čokolada predstavlja veoma povoljan matriks za intestinalnu dostavu ovih korisnih sastojaka.

### 5.3. REZULTATI ISPITIVANJA OSNOVNOG HEMIJSKOG SASTAVA

Sa izuzetnim i posebnim svojstvima ukusa tj. arome, čokolada je predstavnik naročite grupe hrane. Njena hranljiva vrednost potiče od sastojaka unetih sirovinama čiji se sadržaj zadrži u celini s obzirom na uslove u tehnološkom procesu proizvodnje. Hranljiva vrednost čokolade može se, između ostalog, povećati unošenjem biološki aktivnih sirovina u njen sirovinski sastav.

Čokolada u svom sastavu sadrži ugljene hidrate, masti i proteine, sastojke sa energetskom vrednošću.

Zahtevi za pojedine vrste čokolada definisani su Pravilnikom (*Sl. list SCG broj 1/2005*).

Tako se pod *mlečnom čokoladom sa visokim sadržajem mleka* podrazumeva proizvod dobijen od prerađenog kakao-zrna, šećera i mleka ili mlečnih proizvoda, koji sadrži:

1. najmanje 20 % ukupne suve materije kakao-delova računato na suhu materiju gotovog proizvoda;
2. najmanje 20 % suve materije mleka računato na suhu materiju gotovog proizvoda;
3. najmanje 2.5 % suvih nemasnih kakao-delova računato na suhu materiju gotovog proizvoda;
4. najmanje 5 % mlečne masti računato na suhu materiju gotovog proizvoda;
5. najmanje 25 % ukupne masti (kakao-maslaca i mlečne masti) računato na suhu materiju gotovog proizvoda.

Sa druge strane, ovim Pravilnikom nisu definisani zahtevi kvaliteta za crnu čokoladu. Međutim, opšte je prihvaćeno da se pod *crnom čokoladom* podrazumeva čokolada dobijena od prerađenog kakao-zrna i šećera bez dodatog mleka ili proizvoda od mleka, koja može sadržati veći ili manji udeo ukupnih kakao-delova, odnosno bezmasne suve materije kakao-delova. U zavisnosti od navedenog, crne čokolade se označavaju kao polugorke ili gorke. Prema standardu *Codex Alimentarius*-a koji se odnosi na čokoladu i čokoladne proizvode (*Codex stan 87-1981, rev. 1 – 2003*), *polugorka čokolada* treba da sadrži najmanje 30 % ukupnih kakao-delova (od čega minimalno 15 % kakao-maslaca i minimalno



14 % nemasnih kakao-delova) računato na suhu materiju gotovog proizvoda, dok *gorke čokolada* treba da sadrži najmanje 40 % ukupnih kakao-delova (od čega najmanje 22 % kakao-maslaca i minimum 18 % nemasnih kakao-delova) računato na suhu materiju gotovog proizvoda. Na tržištu su, pak, dostupne crne čokolade kod kojih sadržaj kakao-delova može iznositi od 30 %, pa sve do 70-75 %, ili čak preko 80 %, kod izuzetno tamnih čokolada.

Rezultati analize osnovnog hemijskog sastava mlečnih i crnih čokolada sa različitim udelom kakao-delova i dodatim probioticima, kao i kontrolnih čokolada bez probiotskih bakterija, prikazani su u tabeli 14.

Iz prikazanih rezultata se može videti da je, kada je reč o sadržaju proteina, najviši udeo utvrđen kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, i to oko 10 %, potom kod mlečnih čokolada - oko 9 %, dok najmanju količinu sadrže crne čokolade sa 44 % kakao-delova – oko 5 %. Nešto veća količina proteina kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, u odnosu na mlečne čokolade može izgledati neočekivano na prvi pogled, pogotovo što se radi o mlečnim čokoladama sa visokim sadržajem mleka za koje se pretpostavlja da imaju najveći udeo proteina. Objašnjenje se nalazi u recepturi, odnosno u samom sastavu čokolada. Naime, prema primenjenoj formulaciji u sastav crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, pored kakao-mase, ulazi i kakao-prah bogat proteinima, tako da njihov unos sa navedenim komponentama rezultuje višim ukupnim sadržajem proteina nego kod mlečnih čokolada, bez obzira na prisutne proteine mleka.

Količina masti se kod ispitivanih uzoraka čokolada sa i bez probiotika bila je u području od oko 28 % za crne čokolade sa 44 % kakao-delova, preko približno 31 % - kod mlečnih čokolada (sa 27 % kakao-delova), pa čak do oko 40 % kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova. Ovde je potrebno istaći dve stavke: pod pojmom kakao-delovi podrazumevaju se komponente koje potiču od kakao-zrna, a čine ih suve, nemasne kakao-čestice i kakao-maslac. Zbog toga je logično da čokolade sa većim udelom kakao-delova imaju i veći udeo ukupne masti. Nešto veći sadržaj masti kod mlečnih čokolada u odnosu na crne sa 44 % kakao-delova potiče od dodatka mlečne masti, dok je kod crnih čokolada prisutna isključivo kakao-mast.

Tabela 14. Osnovni hemijski sastav različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika

| Uzorak | Ukupni sadržaj (%) |            |                  |                 |           | Energetska vrednost (kJ/100 g) |
|--------|--------------------|------------|------------------|-----------------|-----------|--------------------------------|
|        | Proteini           | Masti      | Šećer (saharoza) | Ugljeni hidrati | Vlaga     |                                |
| ML     | 9.00±0.05          | 30.93±0.08 | 51.95±0.13       | 59.42           | 0.65±0.05 | 2379.8                         |
| MLD    | 9.03±0.08          | 31.10±0.10 | 51.92±0.17       | 59.16           | 0.71±0.03 | 2381.5                         |
| MLB    | 9.02±0.10          | 30.88±0.08 | 52.12±0.16       | 59.53           | 0.57±0.03 | 2379.1                         |
| ML L3  | 9.02±0.15          | 31.05±0.05 | 51.97±0.21       | 59.18           | 0.75±0.05 | 2379.7                         |
| M      | 4.98±0.10          | 28.05±0.05 | 54.17±0.15       | 66.69           | 0.28±0.03 | 2322.5                         |
| MD     | 5.03±0.10          | 28.20±0.10 | 54.22±0.14       | 66.32           | 0.45±0.03 | 2322.8                         |
| MB     | 5.02±0.13          | 28.35±0.10 | 54.10±0.20       | 66.16           | 0.47±0.03 | 2325.7                         |
| M L3   | 4.95±0.05          | 28.00±0.10 | 54.32±0.16       | 66.67           | 0.35±0.05 | 2320.2                         |
| C      | 10.03±0.03         | 40.00±0.10 | 25.12±0.08       | 49.12           | 0.85±0.05 | 2572.8                         |
| CD     | 9.97±0.06          | 39.90±0.05 | 24.92±0.08       | 49.21           | 0.92±0.10 | 2569.5                         |
| CB     | 10.00±0.05         | 39.88±0.08 | 24.90±0.05       | 49.17           | 0.95±0.05 | 2568.5                         |
| C L3   | 9.95±0.10          | 40.32±0.25 | 25.25±0.17       | 48.95           | 0.87±0.03 | 2577.5                         |

Iako čokolade sadrže i druge ugljene hidrate, iz tabele 14 se vidi da sadržaj ukupnih ugljenih hidrata korelira sa sadržajem šećera, odnosno saharoze. Najveći udeo šećera imale su crne čokolade sa 44 % kakao-delova – oko 54 %, praćene mlečnim čokoladama sa oko 52 % saharoze. Znatno niži nivo šećera utvrđen je kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova – oko 25 %.

Budući da prema Rubnerovim koeficijentima najviše energije nose masti, kao jedna od osnovnih grupa jedinjenja, proizilazi da su uzorci čokolada sa najvećim sadržajem masti imali i najveću energetska vrednost i obrnuto. Energetske vrednosti analiziranih uzoraka čokolada bile su se u području između 2320 kJ, što je najniža vrednost utvrđena kod crnih čokolada sa 44 % kakao-delova, preko 2380 kJ, kao prosečne energetske vrednosti mlečnih čokolada, pa sve do maksimalnih 2577 kJ, izračunato kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova.

Na osnovu svega navedenog, može se konstatovati da su sve najvažnije grupe jedinjenja zastupljene u mlečnim i crnim čokoladama, u količinama koje odgovaraju primenjenih recepturama. Dobijeni rezultati su, prema tome, očekivani i u dobroj korelaciji sa objavljenim literaturnim podacima (*Moros i sar., 2007, Sorensen i Astrup, 2011*).

Imajući u vidu da u literaturi do sada nisu objavljeni detaljniji podaci o OHS čokolada kojima su dodate probiotske bakterije, jedno od važnijih zapažanja koje je proizašlo iz ovog eksperimenta jeste da dodatak probiotskih kultura, bilo u liofilizovanom

ili mikroinkapsulisanom obliku, ne utiče na promenu osnovnog hemijskog sastava ispitivanih uzoraka čokolada. Navedena teza, mada očekivana s obzirom na neaktivan metabolizam probiotika u obliku u kom su inkorporirani u različite čokoladne mase, ovim istraživanjem je potvrđena.

Uopšteno posmatrano, čokolada, kao i većina drugih konditorskih proizvoda, nisu pogodni za razvoj patogenih mikroorganizama. Čokolada se posebno karakteriše niskom vrednošću aktivnosti vode, što je faktor koji najviše doprinosu gore pomenutom. U principu, što je niža vrednost aktivnosti vode nekog proizvoda, to je sam proizvod stabilniji u mikrobiološkom smislu (Cordier, 2000), mada je činjenica da aktivnost vode može imati važnu ulogu kako u destrukciji, tako i u prezervaciji mikroorganizama. Jedino spore bakterija i filamentoznih gljiva mogu perzistirati u čokoladi, ali se ne mogu aktivirati zbog nepovoljnih uslova samog medijuma. Kada je reč o probioticima i njihovom preživljavanju, prema navodima Abe i sar., (2009), viša  $a_w$  vrednost indukuje manju stabilnost bifidobakterija u obliku liofilizata, dok Kailasapathy i Chin (2000) navode još konkretnije, da bi za maksimalno preživljavanje laktobacila u liofilizovanom obliku vrednosti  $a_w$  trebalo da budu niže od 0.25. Imajući u vidu da je aktivnost vode u tesnoj vezi sa ostalim parametrima okoline, posebno sa temperaturom, smatra se da je jedan od faktora koji pospešuje preživljavanje probiotika vezan za pojavu da se sa redukcijom  $a_w$  povećava njihova otpornost prema zagrevanju, što je posebno naglašeno pri smanjenju vrednosti sa 0.998 na interval od 0.40-0.20 (Christian, 2000). Utvrđene vrednosti aktivnosti vode ispitivanih uzoraka čokolada su bile: za mlečne čokolade  $0.20 \pm 0.03$ ; za crne čokolade sa 44 % kakao-delova  $0.16 \pm 0.04$  i za crne čokolade sa 75 % kakao-delova  $0.19 \pm 0.07$ . Navedene vrednosti spadaju u domen tzv. monosloja. Tako niska vrednost  $a_w$  i visoka koncentracija šećera u čokoladama eliminiše mogućnost rasta bakterija i gljiva, pa čak i osmofilnih kvasaca i kserofilnih filamentoznih gljiva (Zyżelewicz i sar., 2010), ali favorizuje preživljavanje probiotskih bakterija.

## 5. 4. REZULTATI OCENJIVANJA SENZORNOG KVALITETA

Rezultati ocenjivanja senzornog kvaliteta uzoraka mlečnih i crnih (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokolada sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana na temperaturi od 20°C, su prikazani u tabelama od 15-17.

Uticaj dodatka probiotskih kultura na senzorna svojstva proizvoda kakva je čokolada do sada nije temeljno ispitan. Zbog mogućnosti da preparati sa probiotskim bakterijama poremete kristalizaciju kakao-masti i budu okidač pojave sivljenja ili da svojom granulacijom utiču na teksturalna svojstva (pre svega žvkljivost, zrnastost i topivost čokolada), izgled i, pogotovo, tekstura čokolada sa probioticima su tokom ovog eksperimenta detaljno ocenjeni. Otečnjavanje čokolade u ustima definisano je teksturalnim svojstvom topivosti, koja je u direktnoj vezi sa sadržajem masti, i koja olakšava percepciju arome, tj. mirisa i ukusa ispitivanog uzorka. Dodatak probiotika može rezultovati nastankom određenih komponenata koje imaju negativan uticaj na ukus i miris proizvoda u koji se inkorporiraju, kao što je npr. nastanak tzv. sirćetaste arome (*Mohammadi i sar., 2011*). Iako su u prikazanom eksperimentu upotrebljene probiotske bakterije u stanju neaktivnog metabolizma, ocenjivanje ukusa i mirisa ispitivanih vrsta čokolada, kao najvažnijih parametara senzornog kvaliteta, bilo je od posebnog značaja, imajući u vidu da prihvatljivost od strane potrošača i eventualni komercijalni učinak proizvoda sa probioticima zavisi pre svega od navedenih svojstava (*Heenan i sar., 2004*).

Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 15) vidi se da su, neposredno nakon proizvodnje, uzorci mlečnih čokolada sa tri probiotika ocenjeni visokim ocenama za senzorni kvalitet, tj. da prema ponderisanoj srednjoj vrednosti ocene spadaju u kategoriju odličnog kvaliteta. Brojčano najviše vrednosti srednje ocene kao i % od maksimalno mogućeg kvaliteta imali su uzorci mlečnih čokolada sa dodatkom probiotskih kultura L3 (ML L3) (4.90, odnosno 98.10 % od maksimalno mogućeg kvaliteta) kojima su dodeljene najviše srednje ocene za izgled, mehanička svojstva teksture (tvrdoću, lomljivost, žvkljivost i adhezivnost), kao i za svojstvo arome – mirisa, i visoke ocene za geometrijska (zrnastost),

površinska (vlažnost, masnost) i dinamička (topivost) svojstva teksture, kao i za ukus. Uzorci mlečnih čokolada sa probiotskim bakterijama *B. lactis* HN019 (MLB) su bili sledeći po ukupnoj srednjoj vrednosti ocene u grupi mlečnih čokolada (4.79, odnosno 95.77 % od maksimalno mogućeg kvaliteta), ponajviše zbog ocena za ukus ( $X_{sr}=4.60$ ) tj. nešto izraženije slasti. I pored najviših ocena dodeljenih od članova ocenjivačke komisije za svojstva izgleda i mirisa, te prilično visokih ocena za mehanička ( $X_{sr}=4.75$ ), površinska ( $X_{sr}=4.90$ ) i dinamička ( $X_{sr}=4.85$ ) svojstva teksture, znatno niža srednja ocena za geometrijsko svojstvo zrnivosti ( $X_{sr}=3.55$ ) mlečnih čokolada sa probiotskim sojem *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup> je parametar koji je u velikoj meri doprineo snižavanju ukupne srednje ocene ovih uzoraka u grupi mlečnih čokolada (4.67, tj. 93.42 % od maksimalno mogućeg kvaliteta). Zanimljivo je da su kod istih uzoraka (MLD) u prvom periodu ispitivanja (tabela 27: *Rezultati - Reologija*) ustanovljene nešto veće vrednosti reoloških parametara (prinosnog napona i prividnog viskoziteta) i izvesna odstupanja od Casson-ovog modela proticanja, što je senzornim ocenjivanjima potvrđeno.

Crne čokolade sa 44 % kakao-delova sa dodatim probioticima takođe su okarakterisane odličnim senzornim kvalitetom u toku prvog meseca nakon proizvodnje sa najvišom ponderisanom srednjom ocenom za uzorke ML3 (4.86, odnosno 97.22 % od maksimalno mogućeg kvaliteta), zatim uzorke MD (4.78, odnosno 95.60 % od maksimalno mogućeg kvaliteta), te uzorke MB (4.74, tj. 94.87 % od maksimalno mogućeg kvaliteta). Bez obzira na izražen sjaj, ove čokolade imale su za nijansu niže ocene za izgled u odnosu na mlečne čokolade, uglavnom zbog uočenih tragova od kalupa (uzorak MB) ili prisutnih neistisnutih mehurića vazduha na donjoj površini (uzorak ML3). Mehanička svojstva uzoraka ML3 su ocenjena nižom ocenom ( $X_{sr}=4.70$ ) u odnosu na ostale uzorke ove vrste čokolada pre svega zbog malo veće tvrdoće, što je uslovalo i najnižu ocenu za topivost ( $X_{sr}=4.50$ ). Ipak, izražen miris i svojstveni ukus navedenih uzoraka doprineli su najvišoj oceni u grupi crnih čokolada sa 44 % kakao-delova. Pri ocenjivanju uzoraka MD uočena je mestimična pojava zrnivosti, zbog čega su geometrijska svojstva teksture ocenjena sa srednjom ocenom 4.00. Pojednini članovi ocenjivačke komisije konstatovali su dominantniju slast pri oceni ukusa uzoraka MB, što je rezultovalo njihovom najnižom srednjom ocenom za navedeno svojstvo u ovoj grupi čokolada ( $X_{sr}=4.60$ ), kao i najnižom ukupnom srednjom ocenom za senzorni kvalitet među crnim čokoladama sa 44 % kakao-delova.

Crne čokolade sa 75 % kakao-delova sa tri probiotska preparata u periodu od 0-30 dana imale su odličan senzorni kvalitet sa vrlo visokim ocenama koje su iznosile u intervalu od 4.89 (tj. 97.80 % od maksimalno mogućeg kvaliteta) za uzorke CL3, preko 4.91 (odnosno 98.12 % od maksimalno mogućeg kvaliteta) za uzorke CD, pa do 4.92 (tj. 98.47 % od makimalno mogućeg kvaliteta) za uzorke MB. Pored sjajnosti, svojstvene tamne boje, izrazite kakao-arome i dobro izbalansiranih nota gorčine i slasti kod ukusa, ovi uzorci su se isticali i veoma dobrim teksturalnim svojstvima, pogotovo svojstvenom topivošću, što je i u skladu sa njihovim sastavom, tako da najviše ocene za ukupan senzorni kvalitet u odnosu na sve ispitivane uzorke čokolada sa probioticima nisu predstavljale iznenađenje. Takođe, kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova uočavaju se najmanje razlike srednjih ocena za senzorni kvalitet u zavisnosti od vrste dodatih probiotika, što je trend koji će, uz manja ili veća odstupanja, biti zadržan do samog kraja ispitivanja.

Analizirani uzorci tri vrste čokolada (mlečnih i crnih sa 44 %, odnosno 75 % kakao-delova) sa probioticima imali su odličan ukupni senzorni kvalitet i u drugom periodu ispitivanja, posle 90 dana skladištenja (tabela 16). Tako su uzorci mlečnih čokolada imali ponderisane srednje vrednosti ocene od 4.62 za uzorke MLD, preko 4.66 za uzorke MLB, dok su uzorci ML L3 ostali najbolje ocenjeni u grupi sa ukupnom srednjom ocenom od 4.78. Uzorci MLD su dobili niže ocene za izled ( $X_{sr}=4.60$ ) usled uočenih mehurića vazduha "zarobljenih" u čokoladnim tablama i mnogo rupica na donjoj površini, kao i za mehanička svojstva teksture ( $X_{sr}=4.40$ ), pretežno zbog malo veće adhezivnosti, što se odrazilo i na topivost ( $X_{sr}=4.55$ ). Uprkos tome, navedeni uzorci su između prva dva perioda ispitivanja imali najmanju promenu u ponderisanoj srednjoj vrednosti ocene (od 4.67 do 4.62), s obzirom da su im ocene za svojstva arome (ukus i miris) opale samo neznatno. Osim toga, posle 90 dana geometrijskom svojstvu zrnivosti ovih uzoraka dodeljena je veća srednja ocena ( $X_{sr}=4.45$ ) u odnosu na prvi period (0-30 dana), što se može objasniti nedovoljnom homogenošću dispergovanih probiotika. Ocene za senzorna svojstva uzoraka MLB nisu se značajnije menjale u prva dva perioda ispitivanja, ali su ovi uzorci zadržali najniže ocene za ukus u grupi mlečnih čokolada ( $X_{sr}=4.50$ ). Zbog izuzetnih svojstava izgleda ocenjenih najvišom ocenom među svim analiziranim vrstama čokolada sa probioticima ( $X_{sr}=4.80$ ) za posmatrani period ispitivanja, dobre lomljivosti, gotovo neizmenjenog mirisa ( $X_{sr}=4.95$ ) i najbolje vrednovanog ukusa svojstvenog mlečnim čokoladama, uzorci ML L3 su i posle 90 dana skladištenja ostali lideri u tipu mlečnih čokolada sa probioticima.

Kada se posmatraju rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta crnih čokolada sa 44 % kakao-delova posle 90 dana skladištenja, treba ukazati na dve interesantne stavke. Prva se odnosi na činjenicu da su ponderisane srednje vrednosti ocena ovih čokolada sa dodatim različitim probioticima veoma bliske ocenama dodeljenim mlečnim čokoladama sa istim probiotskim vrstama. Tako su npr. uzorci MLD imali srednju ocenu 4.63, MB 4.69, a uzorci ML3 identičnu ocenu kao i mlečne čokolade sa dodatim istim probiotskim sojem MLD: 4.78, iako sa nešto većim procentom od maksimalno mogućeg kvaliteta (ML L3 95.57 %, a ML3 95.67 %). Druga stvar koja se primećuje jeste da su uzorci MLD i MLB zamenili mesta u grupi crnih čokolada sa 44 % kakao-delova na osnovu visine ocena za ukupni senzorni kvalitet u odnosu na prvo ispitivanje, dok su uzorci ML3 i u drugom periodu ocenjeni kao najbolji. Naime, uzorci MLB su i posle 90 dana skladištenja zadržali iste srednje ocene za svojstva topivosti i ukusa ( $X_{sr}=4.60$ ) kao i u prethodnom periodu, a ocene za svojstvo zrnivosti su čak bile neznatno veće ( $X_{sr}=4.65$ ). Sa druge strane, uzorci MD dobili su niže ocene za izgled ( $X_{sr}=4.60$ ), mehanička svojstva teksture (pre svega, žvkljivost:  $X_{sr}=4.65$ ) i topivost ( $X_{sr}=4.40$ ), ali je do najvećeg opadanja ocena došlo pri ocenjivanju geometrijskih svojstava teksture usled odstupanja od svojstvene zrnivosti ( $X_{sr}=3.70$ ), što je potvrđeno i reološkim ispitivanjima (grafik 51, *Rezultati - Reologija*) i uslovalo najnižu ponderisanu srednju vrednost ocene ovih uzoraka u grupi crnih čokolada sa 44 % kakao-delova.

Crne čokolade sa većim udelom kakao-delova su i nakon 90 dana skladištenja imale prililčno visoke vrednosti ponderisanih srednjih ocena, a razlike među njima bile su još manje uočljive. Uzorci CD su i u ovom periodu dobili visoke ocene za sva teksturalna svojstva, a posebno su se isticali svojstvenom, postepenom topivošću ( $X_{sr}=4.80$ ), kao i aromatičnim mirisom ( $X_{sr}=4.90$ ). Međutim, smanjenje sjaja i mestimično “isprskana” gornja površina uticali su na opadanje ocena za izgled ( $X_{sr}=4.25$ ) i naposljetku najnižom ukupnom ocenom među čokoladama sa 75 % kakao-delova. Uzorci crnih čokolada CB i CL3 imali su izuzetno međusobno ujednačen senzorni kvalitet 90. dana skladištenja ( $X_{sr}=4.74$ ), iako su po % od maksimalno mogućeg kvaliteta uzorci CB bili u blagoj prednosti u poređenju sa CL3 (94.84 % naprema 94.75 %). Na osnovu procene iskusnih ocenjivača uzorcima CB dodeljene su u proseku više ocene za dinamička i površinska

svojstva teksture, kao i za aromu – ukus, dok su se uzorci CL3 odlikovali nešto boljim mehaničkim i dinamičkim teksturalnim svojstvima (adhezivnošću i topivošću), kao i zaokruženijim mirisom.

Ukupan senzorni kvalitet svih analiziranih vrsta čokolada sa probioticima ostao je u domenu odličnog i posle isteka 180 dana skladištenja (tabela 17).

Mlečne čokolade imale su ponderisane srednje vrednosti ocene od 4.51 za uzorke MLD, preko 4.55 za uzorke MLB, od 4.68 za uzorke ML L3. Uprkos smanjenju ukupnih ocena za senzorni kvalitet svi analizirani uzorci mlečnih čokolada sa probioticima su održali % od maksimalno mogućeg kvaliteta u zoni iznad 90 %. Isto tako, redosled uzoraka sa različitim probioticima je kod mlečnih čokolada nije menjao ni u poslednjem periodu ispitivanja. Kod uzoraka MLD ponovo je uočena malo veća adhezivnost (s toga  $X_{sr}$  za mehanička svojstva teksture 4.25) i osetnija zrnavost ( $X_{sr}=4.40$ ) u odnosu na uzorke sa probioticima B i L3. Zamerke ocenjivačke komisije koje su uzrokovale smanjenje ocena kod uzoraka MLB odnosile su se na postojanje tragova kalupa na gornjoj površini ( $X_{sr}=4.50$ ), i na izraženiju slast ( $X_{sr}=4.40$ ), dok se svojstva zrnivosti nisu menjala od 90. dana ( $X_{sr}=4.75$ ), a topivost ovih uzoraka ocenjena je kao najbolja među mlečnim čokoladama ( $X_{sr}=4.60$ ). Uzorci ML L3 bili su najbolje ocenjeni u pogledu izgleda ( $X_{sr}=4.70$ ), imali bolju lomljivost i žvakljivost od ostalih iz iste grupe, a njihova aroma je okarakterisana kao tipična mlečno-kremasta ( $X_{sr}=4.80$  za miris i  $X_{sr}=4.70$  za ukus), i pored nešto brže topivosti ( $X_{sr}=4.40$ ).

Od svih analiziranih vrsta čokolada sa probioticima, u grupi crnih čokolada sa 44 % kakao-delova nalaze se najbolje i najlošije ocenjeni uzorci za period od 180 dana skladištenja.

Kao i u prethodnom intervalu ispitivanja (90 dana) uzorci MD ocenjeni su najnižom srednjom ocenom za zrnivost ( $X_{sr}=3.55$ ), koja se i ovoga puta manifestovala i tokom reoloških merenja (tabela 29 i gfarik 54, *Reologija-Rezultati*). Navedeno je, zajedno sa opadanjem ocena za izgled ( $X_{sr}=4.45$ ) zbog prisustva mehurića vazduha i tragova od kalupa i lošijom topivošću ( $X_{sr}=4.20$ ), uslovalo da ponderisana srednja ocena ovih uzoraka bude redukovana do same granice odličnog i vrlo dobrog kvaliteta (4.50 ili 90.07 % od maksimalno mogućeg kvaliteta). Sa druge strane, uzorci MB i ML3 između 90. i 180. dana skladištenja pretrpeli su minimalne promene senzornih svojstava. Uzorcima MB dodeljene



su najviše ocene u grupi za teksturalna svojstva, ali je na ukusu dominirala slast nad gorčinom ( $X_{sr}=4.50$ ). Uzorci ML3 sa sjajnom površinom, pravilnim oblikom i svojstvenom bojom ( $X_{sr}=4.70$ ), u kombinaciji sa svojstvenim ukusom ( $X_{sr}=4.85$ ) i aromatičnijim mirisom ( $X_{sr}=4.85$ ) koji se veoma malo promenio od početka eksperimenta, predstavljali su najbolje ocenjene uzorke čokolada sa probioticima na kraju ispitivanja (4.71, odnosno 94.22 % od maksimalno mogućeg kvaliteta).

U grupi crnih čokolada sa 75% kakao-delova najviše su se, u pogledu senzornih svojstava, promenili uzorci CD, dok su uzorci CB i CL3 i dalje bili veoma ujednačeni, s tim što su, na osnovu visine ukupnih ocena, uzorci CL3 preuzeli primat među crnim čokoladama sa većim procentom kakao-delova posle 180 dana skladištenja. Pojava "isprskane" i nedovoljno sjajne gornje površine, te ponegde okrnjenih ivica tabli, doveli su do smanjenja srednje ocene za izgled ( $X_{sr}=3.85$ ) za uzorke CD, što je bio jedan od osnovnih razloga opadanja ukupne ocene za senzorni kvalitet (4.59, tj. 91.77 % od maksimalno mogućeg kvaliteta). Za većinu senzornih svojstava posle 180 dana skladištenja došlo je do izvesnog opadanja ocena, ali su uzorci CL3 zadržali iste ocene za pojedine parametre kao i u prethodnom ispitivanju (npr. za zrnavost i vlažnost/masnost), što je, uz jedva uočljive promene mirisa, dovelo do njihovog boljeg kotiranja u grupi u odnosu na uzorke CB (4.66 naprema 4.64). Svi uzorci iz ove grupe odlikovali su se dobrim svojstvima topivosti, izraženijim u odnosu na ostale analizirane vrste čokolada, što je u skladu sa njihovim sastavom.

Promene senzornih svojstava analiziranih čokolada sa probioticima ilustrovane na graficima od 7 do 9, prikazane su prema tipu čokolada sa različitim probiotskim bakterijama u tri perioda skladištenja. Takođe, statistička analiza podataka dobijenih tokom senzornog ocenjivanja primenom Tukey-evog testa (tabele P1 – P3 u *Prilogu*) obavljena je posebno za mlečne i za dva tipa crnih čokolada, pri čemu je vršeno poređenje za vremensku koordinatu i za tri vrste dodatih probiotika.

Na osnovu prikazanih rezultata senzornog ocenjivanja različitih vrsta čokolada sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana može se konstatovati da su svi analizirani uzorci pripadali kategoriji odličnog senzornog kvaliteta u sva tri perioda ispitivanja (0-30, 90 i 180 dana). Nešto niže ocene za ukupni kvalitet dodeljene su uzorcima mlečnih čokolada

MLD (4.51) i crnih čokolada sa 44 % kakao-delova MD (4.50) na samom kraju eksperimenta (posle 180 dana), ali su još uvek ostali u kategoriji odličnog kvaiteta. Tokom ocenjivanja svojstva izgleda analiziranih uzoraka, članovi ocenjivačke komisije su kao nedostatke navodili uglavnom nedovoljno istisnute mehiriće vazduha iz čokoladnih tabli ili uočljive tragove od kalupa, mnogo češće nego matiranost površine ili pojavu sivljenja, čak i posle 180 dana skladištenja. Svi uzorci čokolada, bez obzira na dodate probiotske kulture, imali su svojstvenu smeđu boju s obzirom na udeo kakao-delova, i, osim u par slučajeva, odgovarajuću svetloću površine. Ovakvi rezultati potvrđeni su i na osnovu instrumentalnog određivanja karakteristika kvaliteta boje ispitivanih uzoraka čokolada, tokom kojeg takođe nije bila detektovana pojava sivljenja, a vrednosti dobijenih parametara odgovarale su tipu čokolada. Izostanku pojave sivljenja svakako je doprinelo čuvanje uzoraka čokolada u uslovima ujednačene temperature (20°C), bez većih fluktuacija. Zbog sastava i oblika dodatih probiotskih preparata, u okviru teksturalnih svojstava ocenjivana je i zrnastost analiziranih uzoraka čokolada, u smislu njenog prisustva, odnosno odsustva. Interesantno je da su ocenjivači kod uzoraka sa pojedinim probioticima konstatovali zrnastost češće nego kod drugih u određenim periodima ispitivanja, ali je, pak, u nekom drugom intervalu ispitivanja zrnastost izostajala. Navedeno se može objasniti nešto većom granulacijom pojedinih probiotika, kao što je *Dophilus*, kod kojih je zrnastost najčešće i konstатовana tokom senzornog ocenjivanja, kao i nedovoljnom disperznošću dodatih kultura, budući da je ponekad njihovo prisustvo bilo moguće detektovati, a ponekad nije. Iznalaženje i primena drugačijih načina inkorporiranja probiotskih kultura bi, svakako, doprinelo eliminisanju ove pojave. Međutim, treba naglasiti da je među članovima ocenjivačke komisije postignut konsenzus u pogledu toga da prisustvo zrnastosti ne predstavlja preovlađujući nedostatak, odnosno da ona, u meri u kojoj je uočena, ne remeti ukupan senzorni kvalitet analiziranih uzoraka, te da, eventualno prisustvo zrnastosti ne bi trebalo da bude razlog odbijanja ovakvih proizvoda od strane potrošača. Nadalje, kao pomoćno sredstvo, odnosno punioc, kod mikrokapsula sa probiotskim kulturama L3 bio je korišćen skrob. Njegovo svojstvo adsorbovanja vode i (delimičnog) želiranja pri zagrevanju, može usloviti povećanja čvrstoće proizvoda, što je primećeno pri dodatku inkapsulisanih probiotika npr. tokom proizvodnje jogurta (*Kailasapathy, 2006*). Međutim, usled niskih

temperatura kojima su bile izložene čokolade sa dodatim probioticima, nije došlo do manifestacije navedenih pojava, tako da nisu uočena značajnija povećanja tvrdoće čokolada sa L3 probioticima, kao ni povećanje njihove viskoznosti. U okviru teksturalnih svojstava zapaža se, takođe, dobra veza između mehaničkih (naročito žvkljivosti) i dinamičkih svojstava tj. topivosti, koja ostvaruje združeni efekat na aromu-miris ispitivanih uzoraka a uočeno je i od strane drugih istraživača (*Tournier i sar., 2007; Afoakwa i sar., 2009c; Nightingale i sar., 2011*). Kada je reč o površinskim svojstvima teksture (pogotovo masnosti), članovi ocenjivačke komisije su, tokom čitavog eksperimenta, najviše ocene dodelili uzorcima crnih čokolada sa 44 % kakao-delova koji su zaista i sadržali najmanju količinu masti (tabela 14), potom mlečnim, i na kraju crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova. Međutim, tokom drugog i trećeg perioda ispitivanja, uzorci mlečnih čokolada sa probioticima su ocenjeni kao masniji u odnosu na crne sa 75 % kaka-delova, iako to realno, nije slučaj. Moguće objašnjenje je da je prisustvo šećera maskiralo senzornu ocenu masnosti, što je fenomen koji su opisali *Drewnowski i Schwartz (1990)*. Bez obzira na ocene, ni kod jednog analiziranog uzorka nije uočeno izdvajanje masne faze na površini tabli, što bi, svakako, dovelo do redukovanja bodova za površinska svojstva teskture.

Tabela 15. Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)

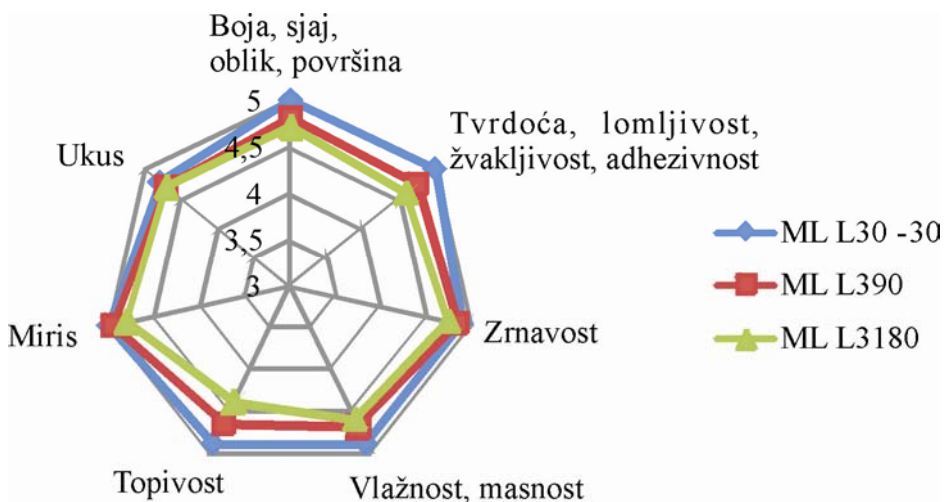
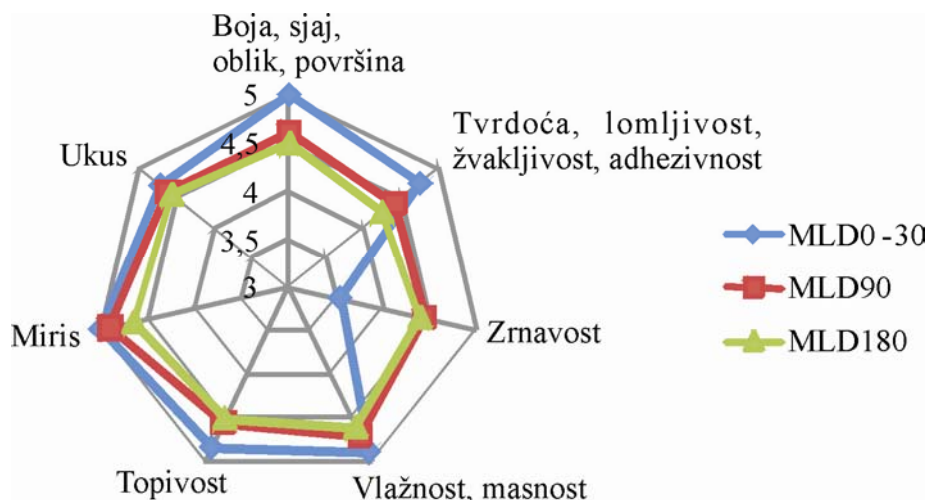
| Uzorak      | Izračunati pokazatelji | Izgled<br>Boja, sjaj, oblik, površina | Tekstura  |                           |                                  |                                  | Aroma       |       | % od maks. mogućeg kvaliteta | Ponderisana srednja vrednost ocene |
|-------------|------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
|             |                        |                                       | Svojstva  |                           |                                  |                                  | Miris       | Ukus  |                              |                                    |
|             |                        |                                       | Mehanička:<br>Tvrdća, Lomljivost,<br>Žvakljivost, Adhezivnost | Geometrijska:<br>Zrnavost | Površinska:<br>Vlažnost, Masnost | Ostala<br>dinamička:<br>Topivost |             |       |                              |                                    |
| <b>KV</b>   | <b>2.00</b>            | <b>2.00</b>                           | <b>2.50</b>   | <b>0.50</b>               | <b>2.00</b>                      | <b>4.00</b>                      | <b>7.00</b> |       |                              |                                    |
| <b>MLD</b>  | X <sub>sr</sub>        | 10.00                                 | 9.50  | 8.87                      | 2.45                             | 9.70                             | 20.00       | 32.90 | 93.42                        | 4.67                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.00                                  | 0.18  | 0.21                      | 0.14                             | 0.22                             | 0.00        | 0.21  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 0.00                                  | 3.72  | 5.90                      | 2.79                             | 4.61                             | 0.00        | 4.50  |                              |                                    |
| <b>MLB</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.50                                  | 10.00   | 11.87                     | 2.40                             | 9.80                             | 20.00       | 32.20 | 95.77                        | 4.79                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.18                                  | 0.00  | 0.18                      | 0.21                             | 0.14                             | 0.00        | 0.14  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 3.72                                  | 0.00  | 3.72                      | 4.36                             | 2.79                             | 0.00        | 2.98  |                              |                                    |
| <b>MLL3</b> | X <sub>sr</sub>        | 10.00                                 | 10.00   | 12.25                     | 2.45                             | 9.80                             | 20.00       | 33.60 | 98.10                        | 4.90                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.00                                  | 0.00  | 0.14                      | 0.14                             | 0.14                             | 0.00        | 0.21  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 0.00                                  | 0.00  | 2.79                      | 2.79                             | 2.79                             | 0.00        | 4.36  |                              |                                    |
| <b>MD</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.80                                  | 9.60  | 10.00                     | 2.45                             | 9.10                             | 20.00       | 34.65 | 95.60                        | 4.78                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.14                                  | 0.21  | 0.18                      | 0.14                             | 0.21                             | 0.00        | 0.11  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.79                                  | 4.36  | 4.42                      | 2.79                             | 4.60                             | 0.00        | 2.26  |                              |                                    |
| <b>MB</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.70                                  | 9.80  | 11.50                     | 2.47                             | 9.20                             | 20.00       | 32.20 | 94.87                        | 4.74                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.14                                  | 0.14  | 0.14                      | 0.11                             | 0.22                             | 0.00        | 0.14  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.82                                  | 2.79  | 2.98                      | 2.26                             | 4.86                             | 0.00        | 2.98  |                              |                                    |
| <b>ML3</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.60                                  | 9.40  | 11.75                     | 2.47                             | 9.00                             | 20.00       | 35.00 | 97.22                        | 4.86                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.21                                  | 0.27  | 0.21                      | 0.11                             | 0.35                             | 0.00        | 0.00  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 4.36                                  | 5.83  | 4.45                      | 2.26                             | 7.86                             | 0.00        | 0.00  |                              |                                    |
| <b>CD</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.70                                  | 9.90  | 12.12                     | 2.45                             | 10.00                            | 20.00       | 33.95 | 98.12                        | 4.91                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.22                                  | 0.11  | 0.14                      | 0.14                             | 0.00                             | 0.00        | 0.22  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 4.61                                  | 2.26  | 2.82                      | 2.79                             | 0.00                             | 0.00        | 4.61  |                              |                                    |
| <b>CB</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.90                                  | 9.70  | 12.25                     | 2.42                             | 9.90                             | 20.00       | 34.30 | 98.47                        | 4.92                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.11                                  | 0.14  | 0.14                      | 0.14                             | 0.11                             | 0.00        | 0.14  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.26                                  | 2.82  | 2.79                      | 2.82                             | 2.26                             | 0.00        | 2.79  |                              |                                    |
| <b>CL3</b>  | X <sub>sr</sub>        | 10.00                                 | 9.80  | 12.00                     | 2.40                             | 10.00                            | 20.00       | 33.60 | 97.80                        | 4.89                               |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.00                                  | 0.14  | 0.21                      | 0.11                             | 0.00                             | 0.00        | 0.21  |                              |                                    |
|             | C <sub>v</sub>         | 0.00                                  | 2.79  | 4.36                      | 2.33                             | 0.00                             | 0.00        | 4.36  |                              |                                    |

Tabela 16. Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima nakon skladištenja od 90 dana

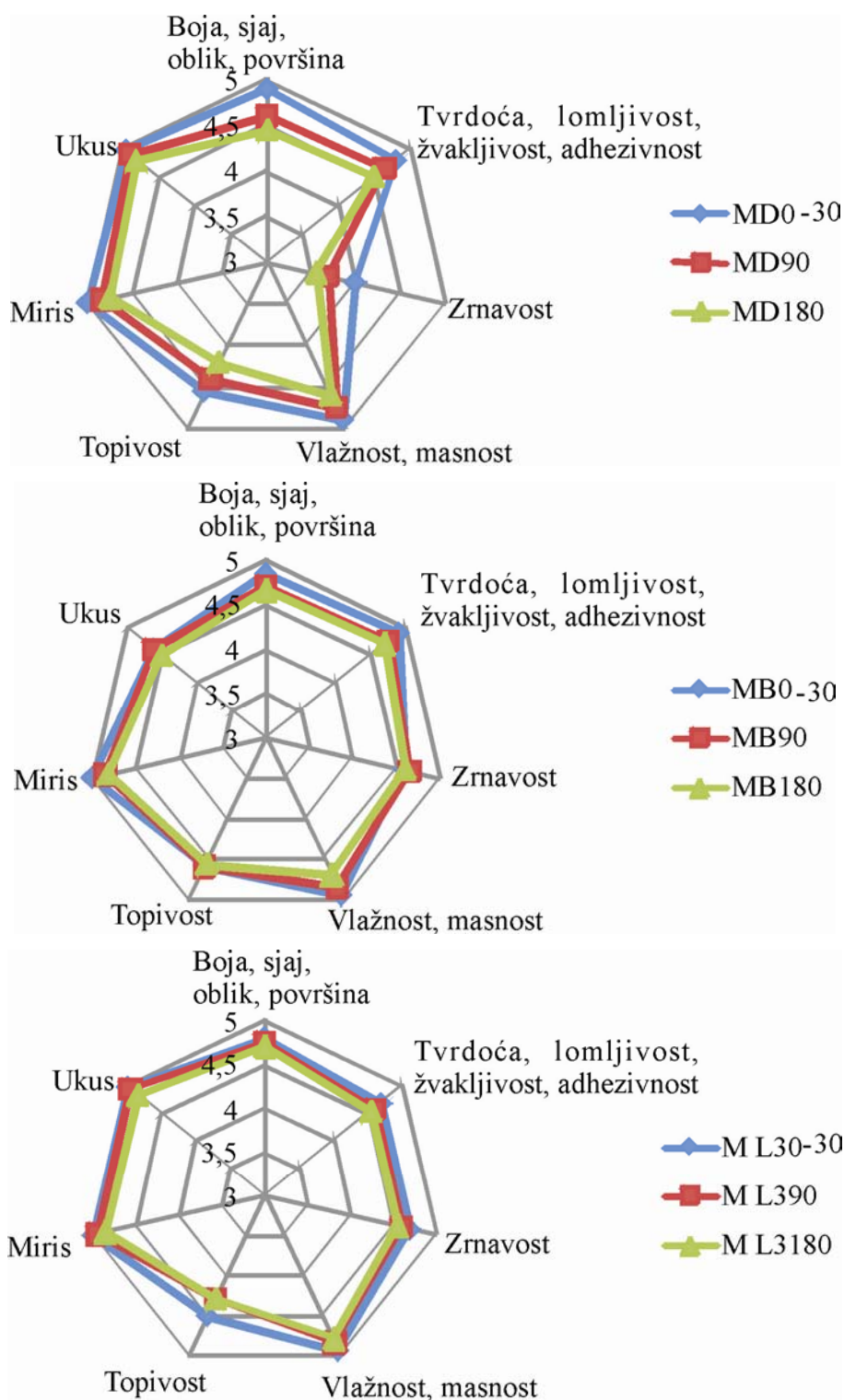
| Uzorak | Izračunati pokazatelji | Izgled<br>Boja, sjaj, oblik, površina | Tekstura  |                           |                                  |                                  | Aroma |       | % od maks. mogućeg kvaliteta | Ponderisana srednja vrednost ocene |
|--------|------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|-------|------------------------------|------------------------------------|
|        |                        |                                       | Svojstva  |                           |                                  |                                  | Miris | Ukus  |                              |                                    |
|        |                        |                                       | Mehanička:<br>Tvrdća, Lomljivost,<br>Žvakljivost, Adhezivnost | Geometrijska:<br>Zrnavost | Površinska:<br>Vlažnost, Masnost | Ostala<br>dinamička:<br>Topivost |       |       |                              |                                    |
| KV     | 2.00                   | 2.00                                  | 2.50  | 0.50                      | 2.00                             | 4.00                             | 7.00  |       |                              |                                    |
| MLD    | X <sub>sr</sub>        | 9.20                                  | 8080  | 11.12                     | 2.35                             | 9.10                             | 19.60 | 32.20 | 92.37                        | 4.62                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.14                                  | 0.38  | 0.27                      | 0.21                             | 0.11                             | 0.14  | 0.28  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 2.98                                  | 8.62  | 6.15                      | 4.45                             | 2.46                             | 2.79  | 6.20  |                              |                                    |
| MLB    | X <sub>sr</sub>        | 9.40                                  | 9.40  | 11.87                     | 2.30                             | 9.50                             | 19.20 | 31.50 | 93.17                        | 4.66                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.21                                  | 0.21  | 0.18                      | 0.14                             | 0.25                             | 0.11  | 0.18  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 4.45                                  | 4.45  | 3.72                      | 2.98                             | 5.26                             | 2.33  | 3.93  |                              |                                    |
| MLL3   | X <sub>sr</sub>        | 9.60                                  | 9.50  | 12.12                     | 2.35                             | 9.30                             | 19.80 | 32.90 | 95.57                        | 4.78                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.21                                  | 0.18  | 0.14                      | 0.21                             | 0.14                             | 0.11  | 0.21  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 4.36                                  | 3.72  | 2.82                      | 4.45                             | 2.95                             | 2.26  | 4.45  |                              |                                    |
| MD     | X <sub>sr</sub>        | 9.20                                  | 9.30  | 9.25                      | 2.37                             | 8.80                             | 19.40 | 34.30 | 92.62                        | 4.63                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.14                                  | 0.14  | 0.21                      | 0.25                             | 0.22                             | 0.22  | 0.14  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 2.98                                  | 2.94  | 5.63                      | 5.26                             | 5.08                             | 4.61  | 2.79  |                              |                                    |
| MB     | X <sub>sr</sub>        | 9.40                                  | 9.50  | 11.62                     | 2.42                             | 9.20                             | 19.40 | 32.20 | 93.74                        | 4.69                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.21                                  | 0.18  | 0.22                      | 0.22                             | 0.22                             | 0.22  | 0.14  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 4.45                                  | 3.72  | 4.81                      | 4.61                             | 4.86                             | 4.61  | 2.98  |                              |                                    |
| ML3    | X <sub>sr</sub>        | 9.50                                  | 9.20  | 11.50                     | 2.42                             | 8.60                             | 19.80 | 34.65 | 95.67                        | 4.78                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.25                                  | 0.28  | 0.14                      | 0.14                             | 0.27                             | 0.11  | 0.11  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 5.26                                  | 6.20  | 2.98                      | 2.82                             | 6.37                             | 2.26  | 2.26  |                              |                                    |
| CD     | X <sub>sr</sub>        | 8.50                                  | 9.50  | 12.00                     | 2.40                             | 9.60                             | 19.60 | 32.90 | 94.50                        | 4.72                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.25                                  | 0.18  | 0.11                      | 0.21                             | 0.21                             | 0.14  | 0.33  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 5.88                                  | 3.72  | 2.33                      | 4.36                             | 4.36                             | 2.79  | 6.94  |                              |                                    |
| CB     | X <sub>sr</sub>        | 9.20                                  | 9.30  | 12.12                     | 2.37                             | 9.40                             | 19.20 | 33.25 | 94.84                        | 4.74                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.22                                  | 0.14  | 0.14                      | 0.18                             | 0.21                             | 0.11  | 0.18  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 4.86                                  | 2.95  | 2.82                      | 3.72                             | 4.45                             | 2.33  | 3.72  |                              |                                    |
| CL3    | X <sub>sr</sub>        | 9.20                                  | 9.40  | 12.00                     | 2.35                             | 9.50                             | 19.40 | 32.90 | 94.75                        | 4.74                               |
|        | S <sub>d</sub>         | 0.22                                  | 0.21  | 0.21                      | 0.21                             | 0.18                             | 0.14  | 0.21  |                              |                                    |
|        | C <sub>v</sub>         | 4.86                                  | 4.45  | 4.36                      | 4.45                             | 3.72                             | 2.82  | 4.45  |                              |                                    |

Tabela 17. Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima nakon skladištenja od 180 dana

| Uzorak      | Izračunati pokazatelji | Izgled<br>Boja, sjaj, oblik,<br>površina | Tekstura  |                           |                                  |                                  | Aroma       |             | % od maks.<br>mogućeg<br>kvaliteta | Ponderisana srednja<br>vrednost ocene |
|-------------|------------------------|--|---|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|---------------------------------------|
|             |                        |  | Svojstva  |                           |                                  |                                  | Miris       | Ukus        |                                    |                                       |
|             |                        |  | Mehanička:<br>Tvrdća, Lomljivost,<br>Žvakljivost, Adhezivnost | Geometrijska:<br>Zrnavost | Površinska:<br>Vlažnost, Masnost | Ostala<br>dinamička:<br>Topivost |             |             |                                    |                                       |
|             | <b>KV</b>              | <b>2.00</b>                              | <b>2.00</b>   | <b>2.50</b>               | <b>0.50</b>                      | <b>2.00</b>                      | <b>4.00</b> | <b>7.00</b> |                                    |                                       |
| <b>MLD</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.00                                     | 8.50  | 11.00                     | 2.30                             | 9.00                             | 18.60       | 31.85       | 90.25                              | 4.51                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.00                                     | 0.25  | 0.22                      | 0.14                             | 0.00                             | 0.14        | 0.21        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 0.00                                     | 5.88  | 5.08                      | 2.98                             | 0.00                             | 2.94        | 4.60        |                                    |                                       |
| <b>MLB</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.00                                     | 9.00  | 11.87                     | 2.25                             | 9.20                             | 18.80       | 30.80       | 90.92                              | 4.55                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.00                                     | 0.00  | 0.18                      | 0.00                             | 0.22                             | 0.11        | 0.22        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 0.00                                     | 0.00  | 3.72                      | 0.00                             | 4.86                             | 2.38        | 5.08        |                                    |                                       |
| <b>MLL3</b> | X <sub>sr</sub>        | 9.40                                     | 9.20  | 11.87                     | 2.30                             | 8.80                             | 19.20       | 32.90       | 93.67                              | 4.68                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.11                                     | 0.14  | 0.00                      | 0.14                             | 0.22                             | 0.11        | 0.21        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.38                                     | 2.98  | 0.00                      | 2.98                             | 5.08                             | 2.33        | 4.45        |                                    |                                       |
| <b>MD</b>   | X <sub>sr</sub>        | 8.90                                     | 9.00  | 8.87                      | 2.30                             | 8.40                             | 19.00       | 33.60       | 90.07                              | 4.50                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.11                                     | 0.00  | 0.21                      | 0.14                             | 0.27                             | 0.25        | 0.11        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.51                                     | 0.00  | 5.89                      | 2.98                             | 6.52                             | 5.26        | 2.33        |                                    |                                       |
| <b>MB</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.30                                     | 9.40  | 11.50                     | 2.35                             | 9.10                             | 19.20       | 31.50       | 92.35                              | 4.62                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.14                                     | 0.11  | 0.14                      | 0.21                             | 0.21                             | 0.21        | 0.00        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 2.94                                     | 2.38  | 2.98                      | 4.45                             | 4.60                             | 4.36        | 0.00        |                                    |                                       |
| <b>ML3</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.40                                     | 9.10  | 11.37                     | 2.40                             | 8.60                             | 19.40       | 33.95       | 94.22                              | 4.71                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.21                                     | 0.21  | 0.11                      | 0.11                             | 0.27                             | 0.14        | 0.22        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 8.45                                     | 4.60  | 2.46                      | 2.33                             | 6.37                             | 2.82        | 4.61        |                                    |                                       |
| <b>CD</b>   | X <sub>sr</sub>        | 7.70                                     | 9.20  | 11.75                     | 2.32                             | 9.40                             | 19.20       | 32.20       | 91.77                              | 4.59                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.33                                     | 0.14  | 0.11                      | 0.22                             | 0.11                             | 0.21        | 0.22        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 8.71                                     | 2.98  | 2.38                      | 4.81                             | 2.38                             | 4.36        | 4.86        |                                    |                                       |
| <b>CB</b>   | X <sub>sr</sub>        | 9.00                                     | 9.10  | 11.87                     | 2.35                             | 9.20                             | 18.80       | 32.55       | 92.87                              | 4.64                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.18                                     | 0.21  | 0.00                      | 0.11                             | 0.14                             | 0.11        | 0.14        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 3.93                                     | 4.60  | 0.00                      | 2.38                             | 2.98                             | 2.38        | 2.94        |                                    |                                       |
| <b>CL3</b>  | X <sub>sr</sub>        | 9.00                                     | 9.00  | 12.00                     | 2.35                             | 9.40                             | 19.20       | 32.20       | 93.15                              | 4.66                                  |
|             | S <sub>d</sub>         | 0.18                                     | 0.18  | 0.21                      | 0.21                             | 0.11                             | 0.11        | 0.14        |                                    |                                       |
|             | C <sub>v</sub>         | 3.93                                     | 3.93  | 4.36                      | 4.45                             | 2.38                             | 2.38        | 2.98        |                                    |                                       |

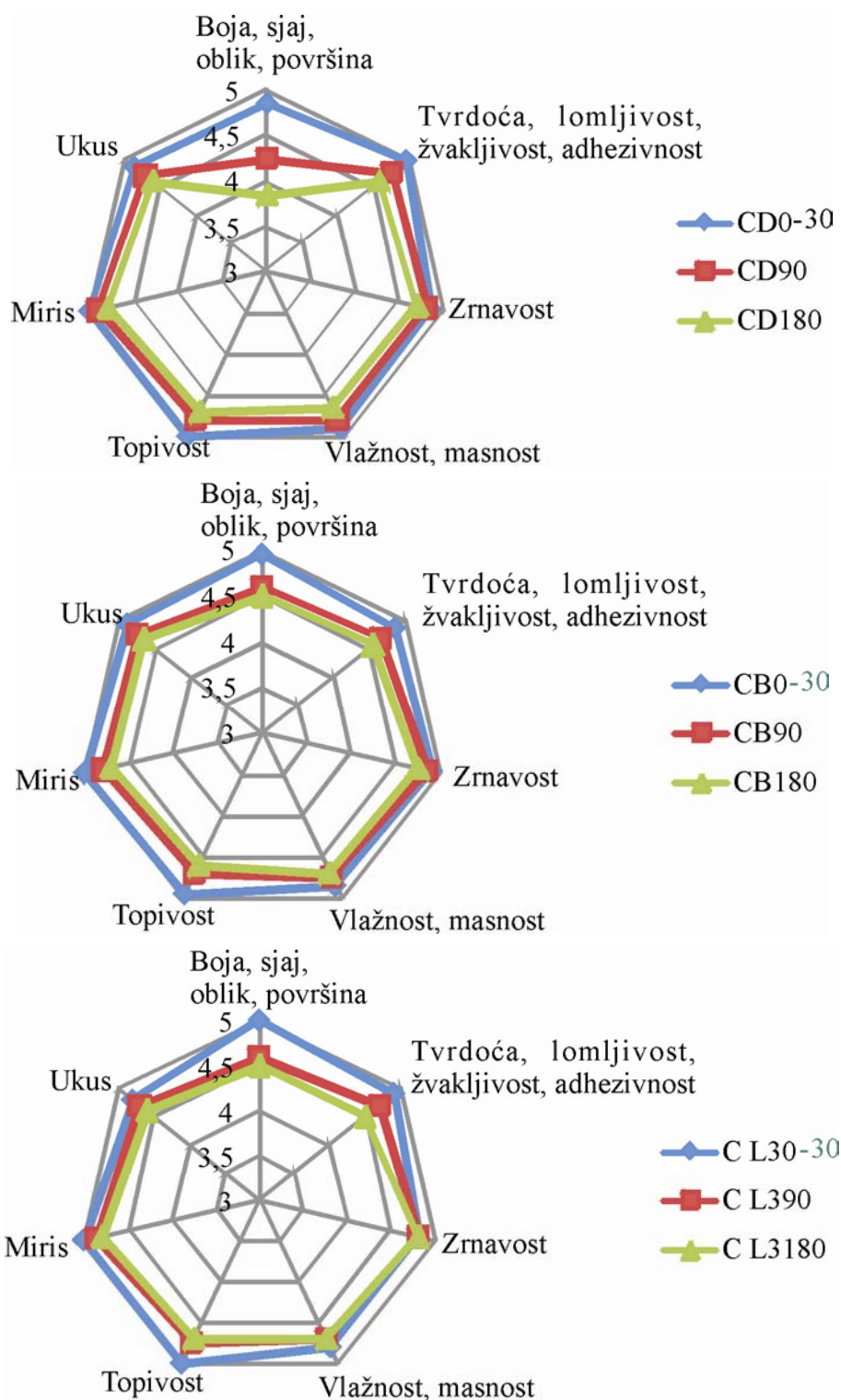


Grafik 7. Senzorna ocena kvaliteta mlečnih čokolada sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 8. Senzorna ocena kvaliteta crnih čokolada (44 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana





Grafik 9. Senzorna ocena kvaliteta crnih čokolada (75 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana

Generalno se može konstatovati da su razlike u ocenama senzornih svojstava čokolada više posledica njihovog različitog sastava, odnosno vrste kojoj pripadaju po sadržaju osnovnih grupa jedinjenja i udela kakao-delova, nego dodatih probiotskih bakterija. Odabranom recepturom određen je udeo sirovina za izradu različitih čokoladnih masa, što ima veliki uticaj na senzorna svojstva finalnog proizvoda, tj. intenzitet slasti, kakao-arome, gorčine ili mlečne arome proizvoda, kao i na njihova svojstva izgleda-boje. Dodatno, postepeno smanjenje ocena za pojedina senzorna svojstva rezultat je uobičajenih promena na čokoladama tokom dugotrajnog skladištenja i ne može se pripisati uočljivijim efektima izazvanih probioticima, i u potpunosti je u skladu sa našim ranijim istraživanjima (Laličić, 2007), da različite vrste čokolada, (bez dodatka probiotika), održavaju odličan senzorni kvalitet tokom šestomesečnog skladištenja pod odgovarajućim uslovima. Rezultati određivanja reoloških parametara analiziranih čokolada sa probioticima u pojedinim slučajevima su pokazali povećanje vrednosti prinosnog napona, dok se plastični i prividni viskozite nisu bitnije menjali sa dodatkom BMK. I pored nesporne veze između reoloških svojstava i senzornih atributa, navedene promene nisu ostavile traga na senzornim karakteristikama čokolada. Naime, plastični viskozitet je direktnija mera reoloških svojstava čokolada u uslovima većih brzina smicanja, kakvi su oni prisutni u usnoj duplji prilikom konzumiranja, od prinosnog napona koji je dominantniji pri malim brzinama smicanja (Guinard i Mazzucbelli, 1999). Kako se viskozitet čokolada sa probioticima nije izrazitije menjao tokom 180 dana skladištenja, posledično nije bilo ni većih promena senzornih svojstava. Možda najvažniju konstataciju ovog dela ispitivanja predstavlja i činjenica da nikakav strani ukus i miris nisu primećeni ni kod jedne vrste analiziranih čokolada sa probioticima tokom čitavog perioda skladištenja. Na osnovu svega navedenog, može se izvesti zaključak da dodatak različitih probiotskih sojeva, bilo liofilizovanih ili inkapsulisanih, u različite vrste čokolada, ne dovodi do značajnijeg remećenja njihovih senzornih svojstava. To ujedno znači da obogaćivanje čokolada probioticima obezbeđuje dodatnu vrednost ovim omiljenim poslasticama, bez rizika od odbijanja od strane potrošača. Dakle, kombinacija probiotskih bakterija i različitih vrsta čokolada predstavlja dobar put ka formiranju novih proizvoda koji na adekvatan način objedinjuju hedonističke i zdravstvene efekte.

#### 5.4.1. Rezultati instrumentalnog određivanja karakteristika kvaliteta boje

Osnovne vizuelne karakteristike svake čokolade predstavljaju boja i sjaj površine (Voltz i Beckett, 1997). S obzirom da prvo ocenjivanje započinje čulom vida, boja čokolade može da pruži uvid u to šta je moguće očekivati korišćenjem ostalih čula. Boja čokolada je određena vrstom i količinom kakao-mase, šećera i/ili komponenti mleka, dakle sastavom (Stauffer, 1998). Pojava i razvoj sivljenja, kao jednog od najvažnijih faktora koji limitira održivost čokolada, može se pratiti merenjem površinskog sjaja, budući da sivljenju često prethodi matiranost površine (Kilcast i Subramaniam, 2000). Boja i sjaj određuju se pri senzornoj oceni kvaliteta vizuelnom tehnikom. U skladu sa opštim nastojanjima da se senzorne ocene objektivizuju instrumentalnim metodama, karakteristike kvaliteta boje analiziranih čokolada sa i bez dodatih probiotika određene su i primenom tristimulusne kolorimetrije, na gornjoj i donjoj površini. Dobijeni rezultati su izraženi u tri sistema za definisanje kvaliteta boje: CIE xyY, CIE L\*a\*b\* i Hunter Lab sistemu. U CIE sistemu figurišu vrednosti: srednje reflektance tj. sjajnosti Y (%), dominantne talasne dužine  $\lambda$  (nm) i čistoće boje  $\check{C}$  (%), u CIE Lab sistemu vrednosti: psihometrijske svetlosti L\*, psihometrijskog tona a\* i psihometrijske hrome b\*, a u Hunter-ovom sistemu vrednosti: L<sub>Hu</sub>, a<sub>Hu</sub> i b<sub>Hu</sub> za psihometrijsku svetlost, ton i hromu.

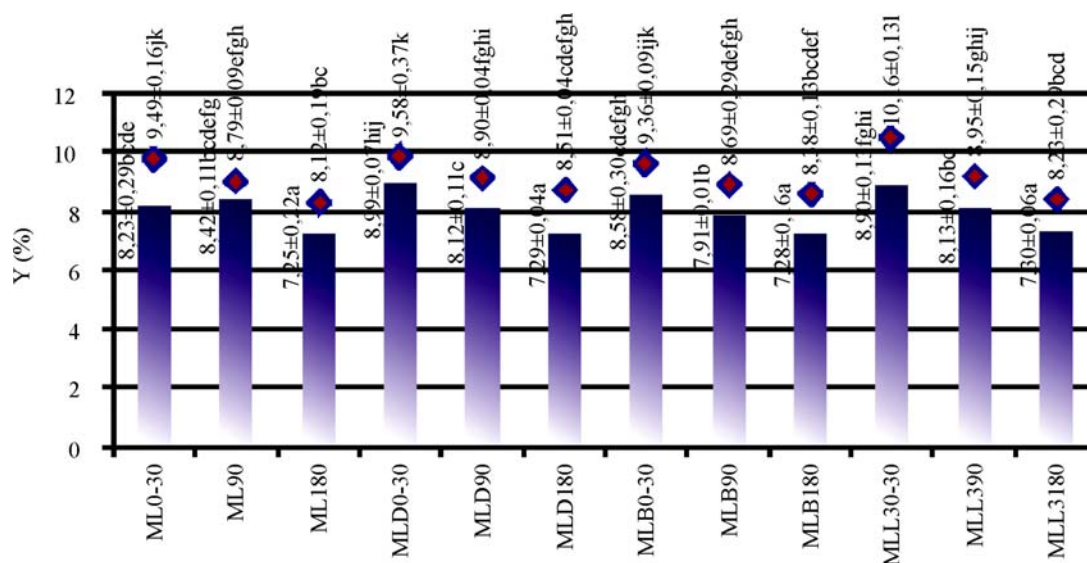
Prikaz rezultata instrumentalnog određivanja karakteristika kvaliteta boje u tri pomenuta sistema dat je na graficima od 10-34. Promena svake od analiziranih karakteristika kvaliteta boje ilustrovana je na jednom grafikonu za određeni vrstu čokolade sa i bez probiotika, na gornjoj i donjoj površini u tri vremena ispitivanja. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednost određenog parametra  $\pm$  standardna devijacija sa rezultatima Tukey-evog testa. Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Vrednosti srednje reflektance Y (%) kod uzoraka mlečnih čokolada sa i bez dodatih probiotika tokom celokupnog vremena skladištenja bile su u intervalu od 7.26 (ML gornja površina 180. dan) do 10.16 (ML L3 donja površina 0-30 dana), pri čemu su kod najvećeg broja uzoraka vrednosti iznosile 7-8 %, kako na gornjoj, tako i na donjoj površini

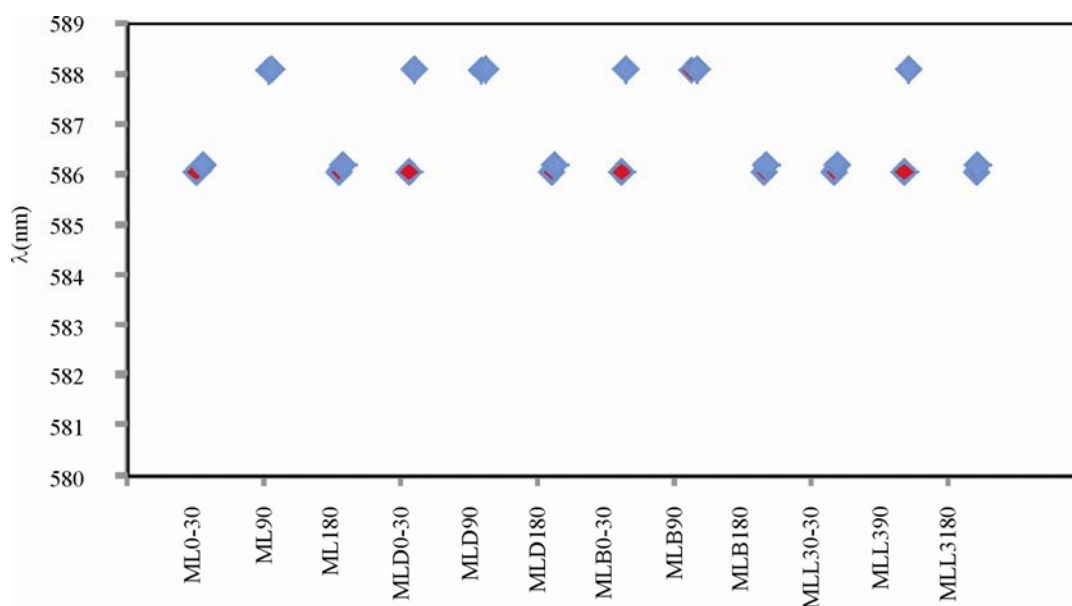
(grafik 10). Naravno, navedene vrednosti su praćene vrednostima za psihometrijsku svetlost u CIE  $L^*a^*b^*$  i Hunter Lab sistemu (ML gornja površina 180. dan:  $L^*=32.38$  i  $L_{Hu}=26.93$ ; ML L3 donja površina 0-30 dan:  $L^*=38.12$  i  $L_{Hu}=31.87$ )(grafici 13 i 16). Kada se posmatraju samo vrednosti dobijene za gornju površinu uzoraka mlečnih čokolada zapaža se da najveću sjajnost i svetloću imaju uzorci MLD neposredno nakon proizvodnje ( $Y=8.99\%$ ;  $L^*=35.96$ ;  $L_{Hu}=29.98$ ), odnosno ML L3 ( $Y=8.90\%$ ;  $L^*=35.79$ ;  $L_{Hu}=29.83$ )(grafici 10, 13 i 16), što je pri senzornom ocenjivanju okarakterisano kao pozitivno svojstvo, budući da su navedeni uzorci dobili maksimalne ocene za svojstvo izgleda (boja, sjaj, oblik, površina), uz potpun konsenzus svih članova ocenjivačke komisije (tabela 15, *Rezultati ocenjivanja senzornog kvaliteta*).

Vrednosti psihometrijskog tona  $a^*$  u CIE  $L^*a^*b^*$  i Hunter-ovom sistemu ukazuju na udeo crvenog i zelenog tona u analiziranim uzorcima, dok vrednost psihometrijske hrome  $b^*$  ukazuje na udeo žutog i plavog pigmenta. Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da je najmanje učešće i crvenog i žutog pigmenta nađeno na donjoj površini uzoraka MLB u poslednjem intervalu ispitivanja, posle 180 dana čuvanja i skladištenja  $a^*=10.45$  tj.  $a_{Hu}=7.34$ ;  $b^*=11.58$  tj.  $b_{Hu}=6.55$  (grafici 14 i 17, odnosno 15 i 18). Najveće učešće crvenog pigmenta po Hunter-ovom sistemu konstatovano je takođe kod uzoraka MLB na donjoj površini ali tokom prvog perioda ispitivanja  $a_{Hu}=8.71$ , dok su uzorci MLD imali najveći udeo žutog pigmenta na donjoj površini posle 90 dana skladištenja  $b_{Hu}=8.12$  (grafici 17 i 18).

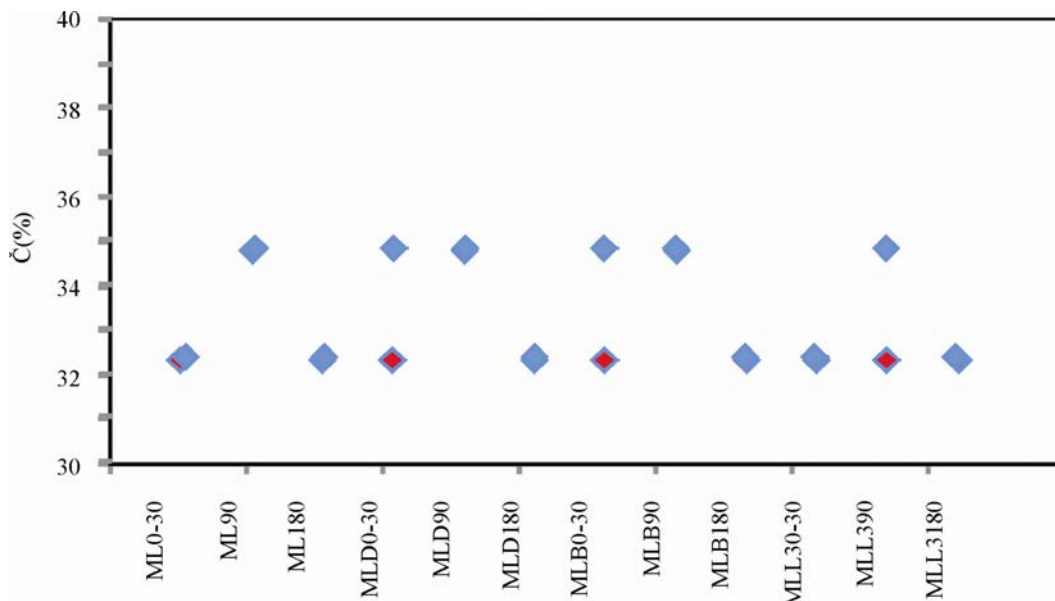
Ako se uporede očitane vrednosti za dominantnu talasnu dužinu, a na osnovu dijagrama hromatičnosti, vidljivo je da nema znatnijih variranja. Naime, svi analizirani uzorci mlečnih čokolada imali su vrednosti dominantnih talasnih dužina u intervalu od  $\lambda=586-588$  nm (grafik 11), što je bilo praćeno izračunatim vrednostima za čistoću boje od 32.26 do 34.74% (grafik 12).



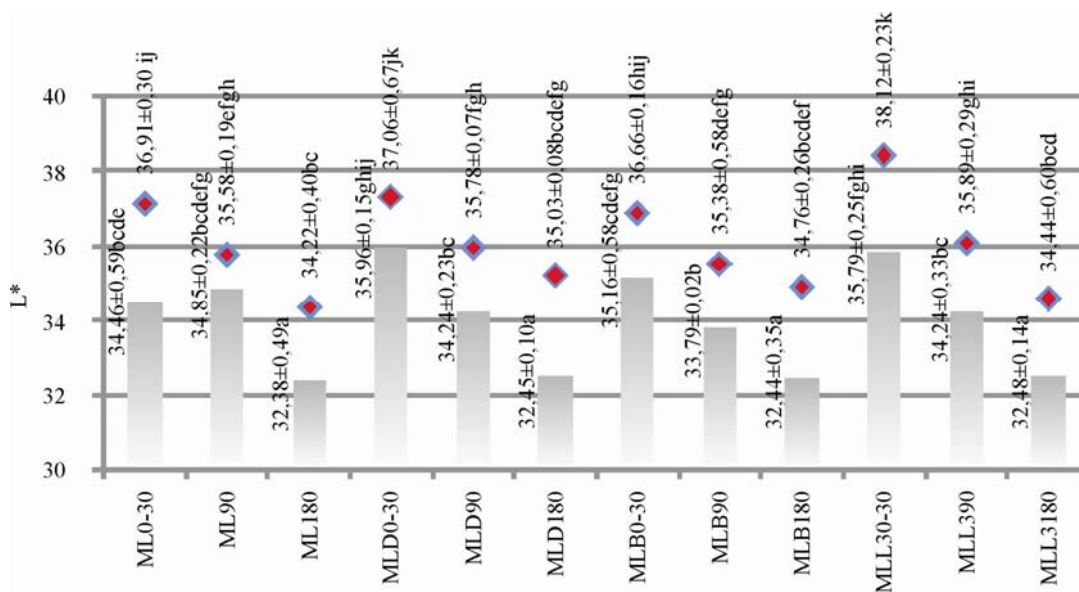
Grafik 10. Vrednosti srednje reflektance Y (%) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



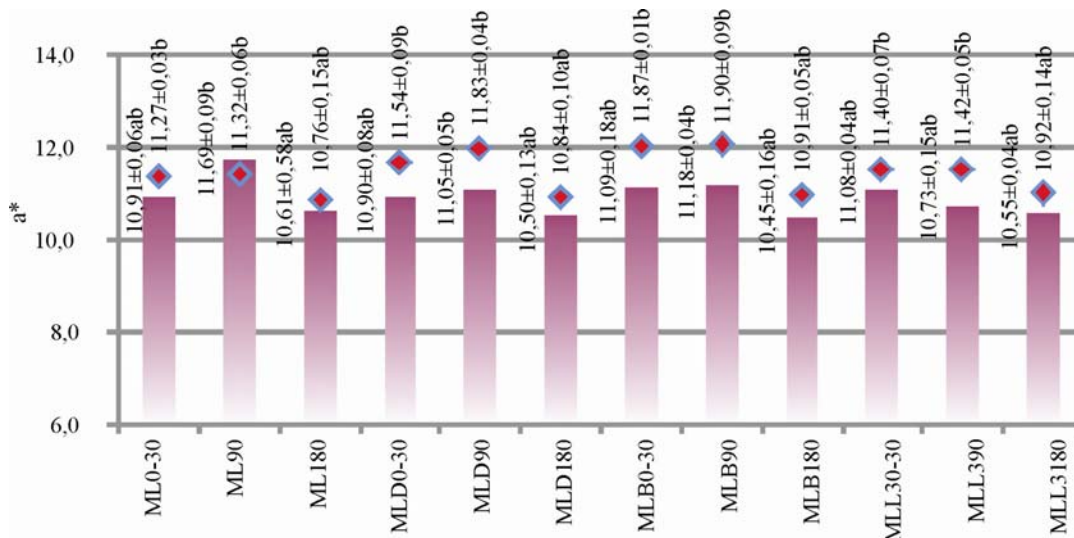
Grafik 11. Vrednosti za dominantnu talasnu dužinu  $\lambda$  (nm) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke) tokom skladištenja od 180 dana



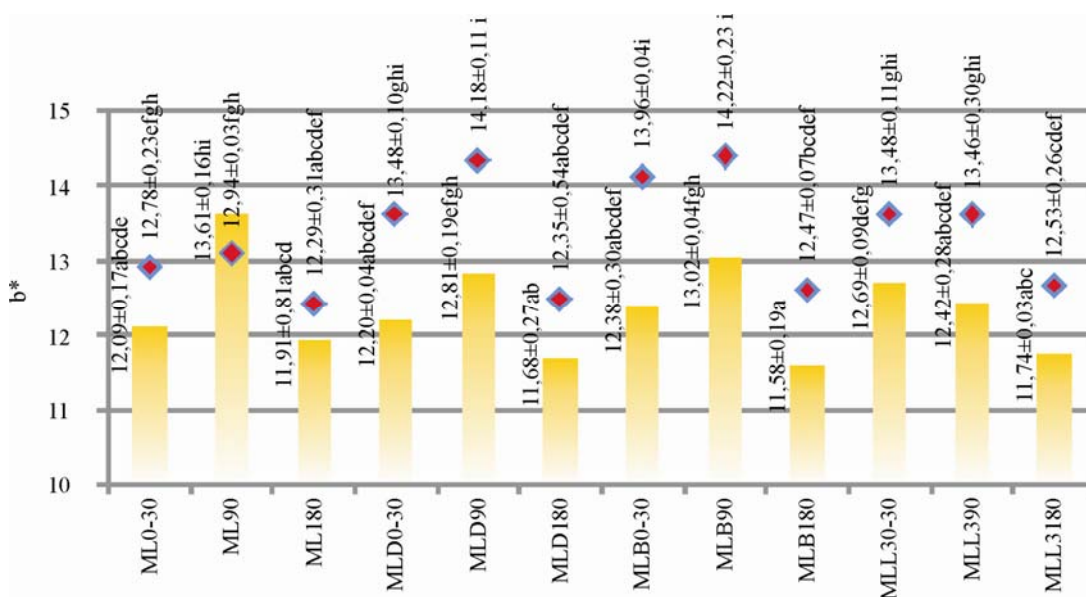
Grafik 12. Vrednosti za čistoću boje  $\check{C}$  (%) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke) tokom skladištenja od 180 dana



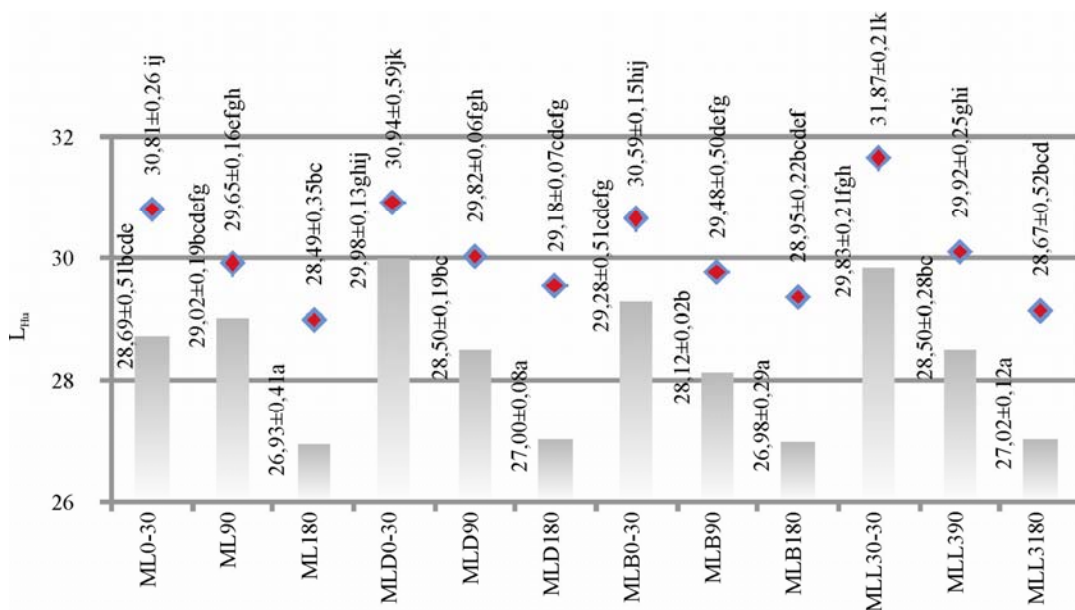
Grafik 13. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu ( $L^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



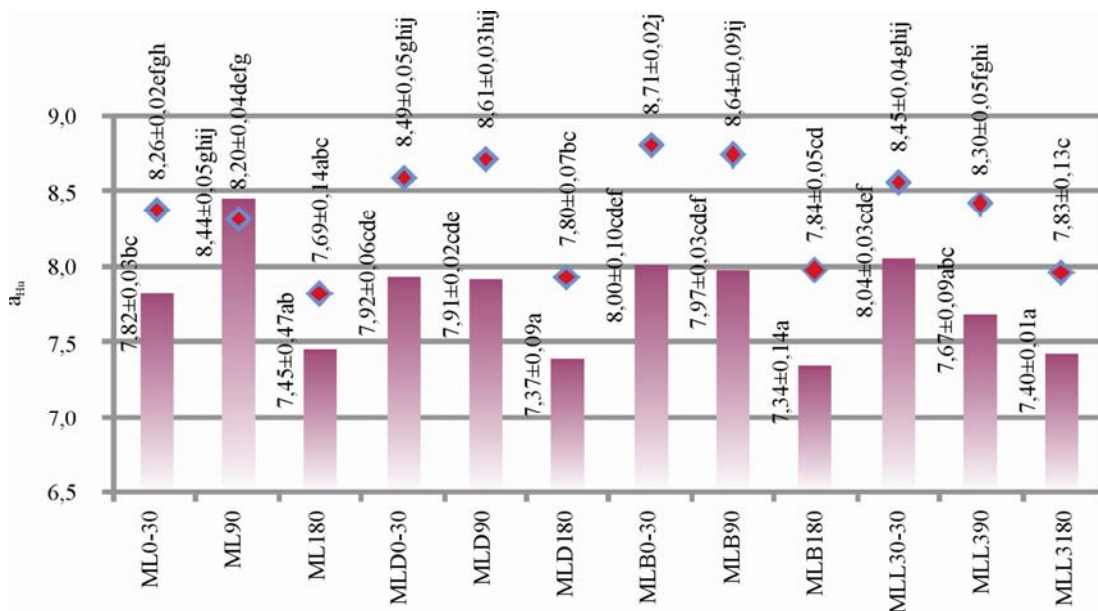
Grafik 14. Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu ( $a^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 15. Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu ( $b^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

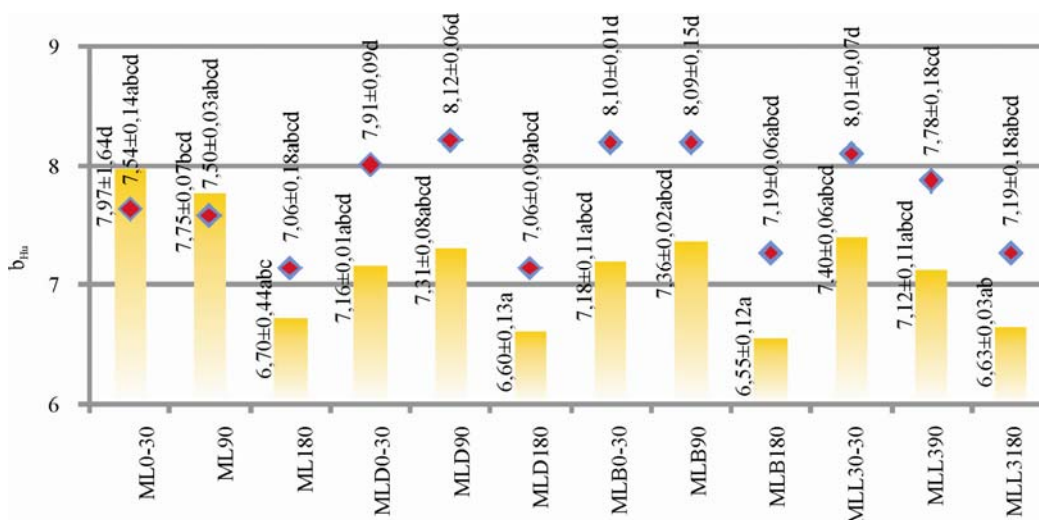


Grafik 16. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{H^*}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 17. Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{H^*}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

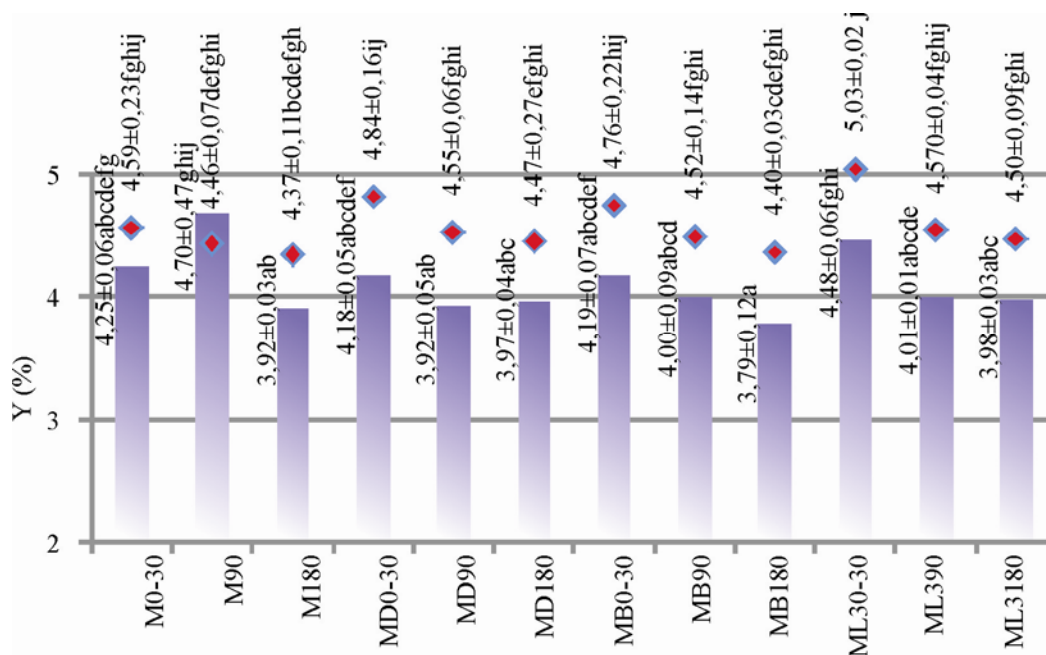




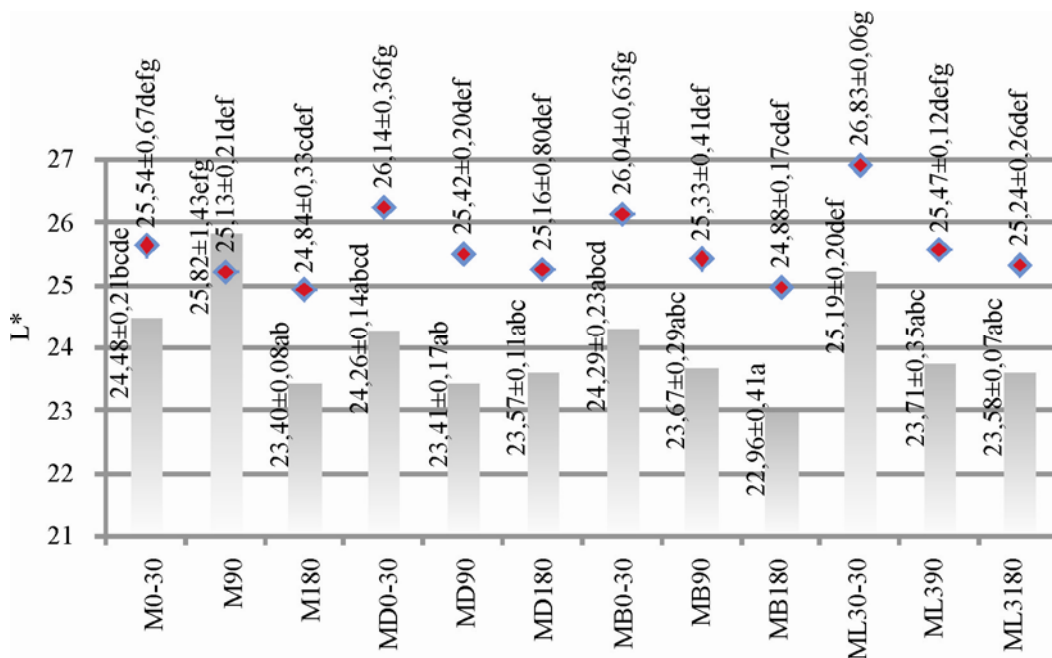
Grafik 18. Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

Sjajnost i svetloća crnih čokolada sa 44 % kakao-delova bila je najveća kod uzoraka ML3 na donjoj površini neposredno nakon proizvodnje ( $Y=5.03$  %;  $L^*=26.83$  i  $L_{Hu}=22.43$ ), dok je najsjajnija i ujedno najsvetlija gornja površina konstatovana kod uzoraka M nakon 90 dana skladištenja ( $Y=4.70$  %;  $L^*=25.82$  i  $L_{Hu}=21.65$ ) (grafici 19, 20 i 23). Najmanje vrednosti srednje reflektance i psihometrijske svetlosti zabeležene su kod uzoraka MB na gornjoj površini na samom kraju ispitivanja ( $Y=3.79$  %;  $L^*=22.96$  i  $L_{Hu}=19.46$ ) (grafici 19, 20 i 23). Donja površina uzoraka ML3 tokom prvog perioda ispitivanja, osim što je bila najsjajnija, odlikovala se i najvećim udelima crvenog i žutog pigmenta ( $a^*=7.31$  tj.  $a_{Hu}=4.77$ ;  $b^*=5.30$  tj.  $b_{Hu}=3.02$ ) (grafici 21, 24, 22 i 25), što je u saglasnosti sa senzornom ocenom ovih čokolada. Nasuprot tome, najniže, a brojčano istovetne vrednosti psihometrijskog tona zabeležene kod dva uzorka: na gornjim površinama uzoraka MD i ML3 posle 180 dana skladištenja ( $a^*=5.76$  tj.  $a_{Hu}=3.60$ ). Uzorci MD na donjoj površini u istom vremenu ispitivanja imali su i najnižu vrednost psihometrijske hrome ( $b^*=4.15$  tj.  $b_{Hu}=2.30$ ), dok su uzorci ML3 imali samo neznatno više vrednosti ( $b^*=4.29$  tj.  $b_{Hu}=2.37$ ) (grafici 21, 24, 22 i 25).

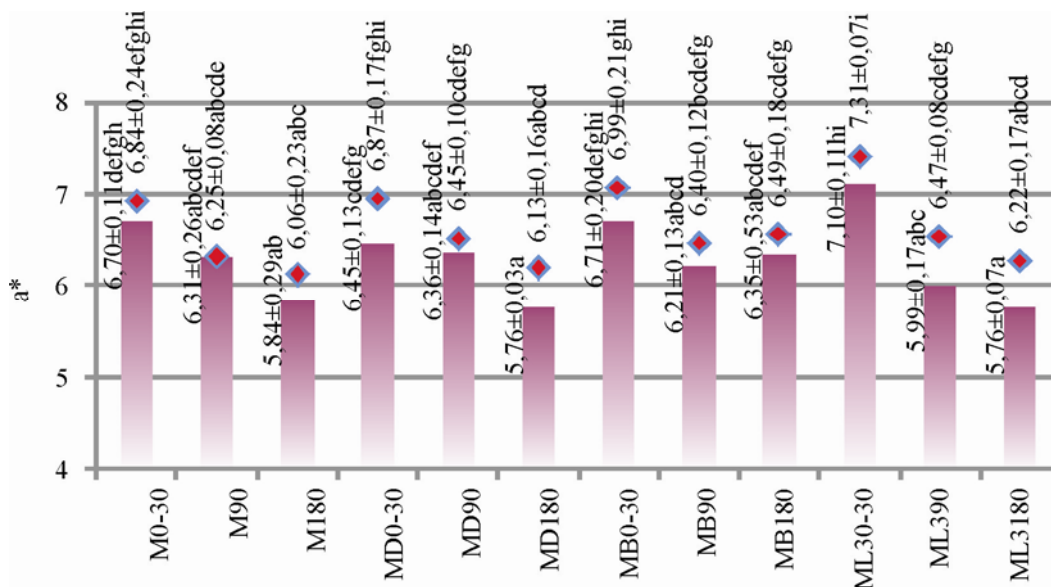
Vrednosti dominantne talasne dužine ( $\lambda$ ) kao i čistoće boje ( $\check{C}$ ) kod uzoraka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova bile su identične i nisu se menjale ni u zavisnosti od vrste dodatih probiotika, niti sa vremenom skladištenja, a iznosile su  $\lambda = 587$  nm i  $\check{C} = 18.95$  %.



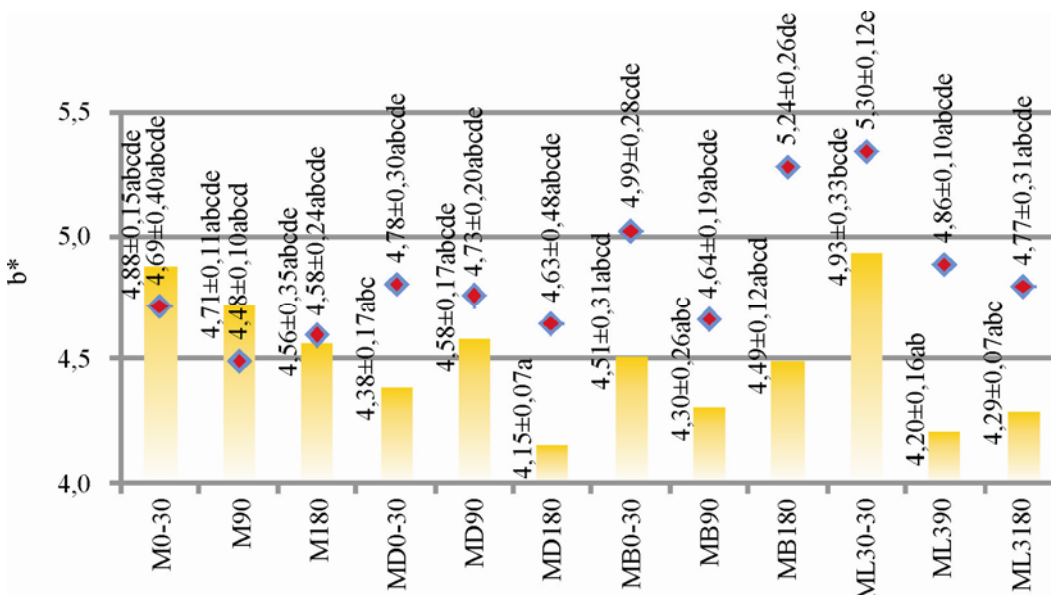
Grafik 19. Vrednosti srednje reflektance Y (%) crnih čokolada (sa 44 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



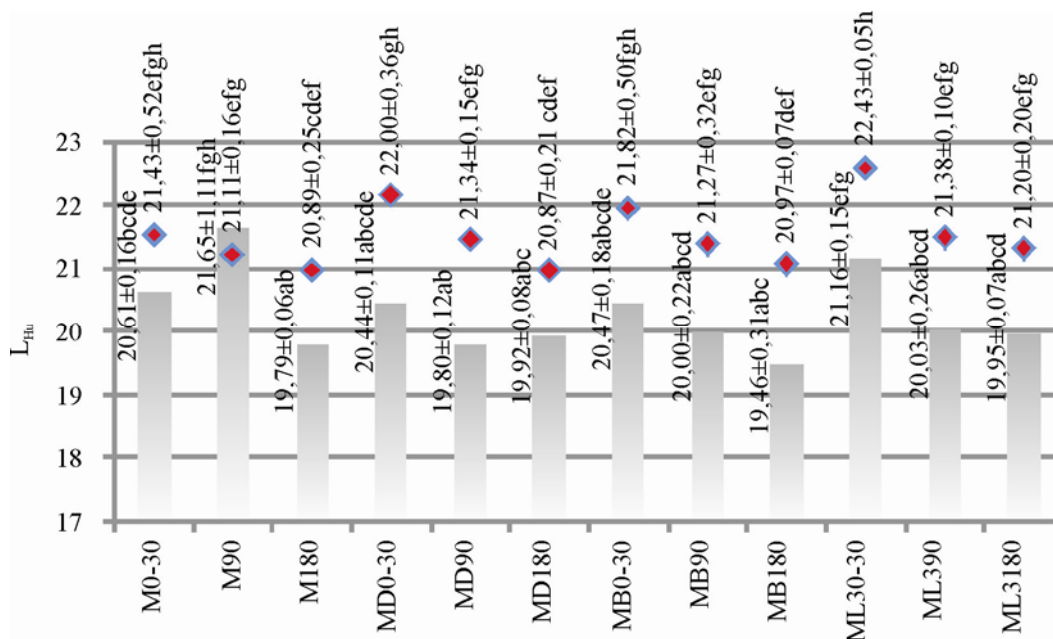
Grafik 20. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu (L\*) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



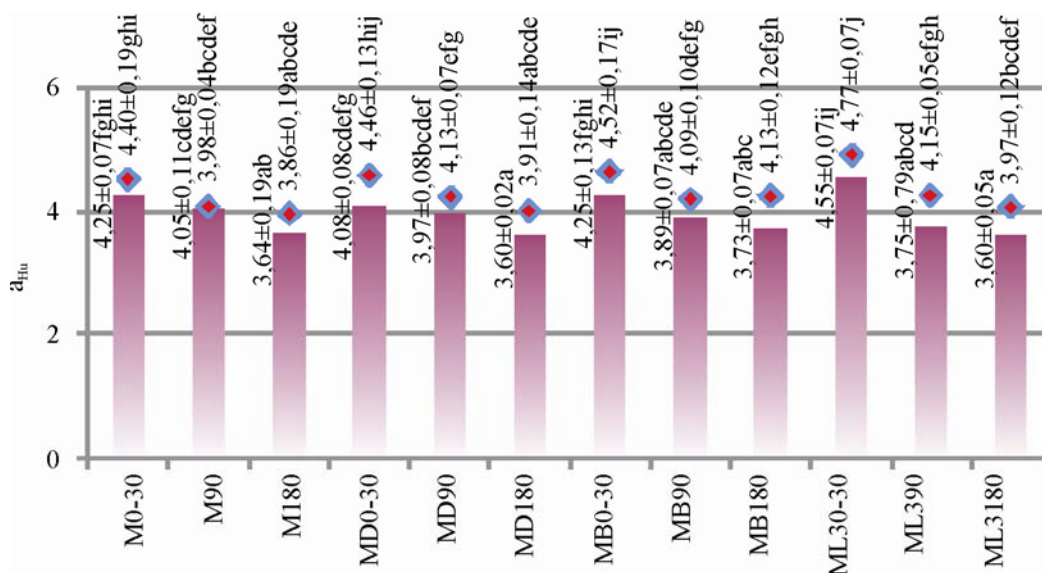
Grafik 21. Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu (a\*) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



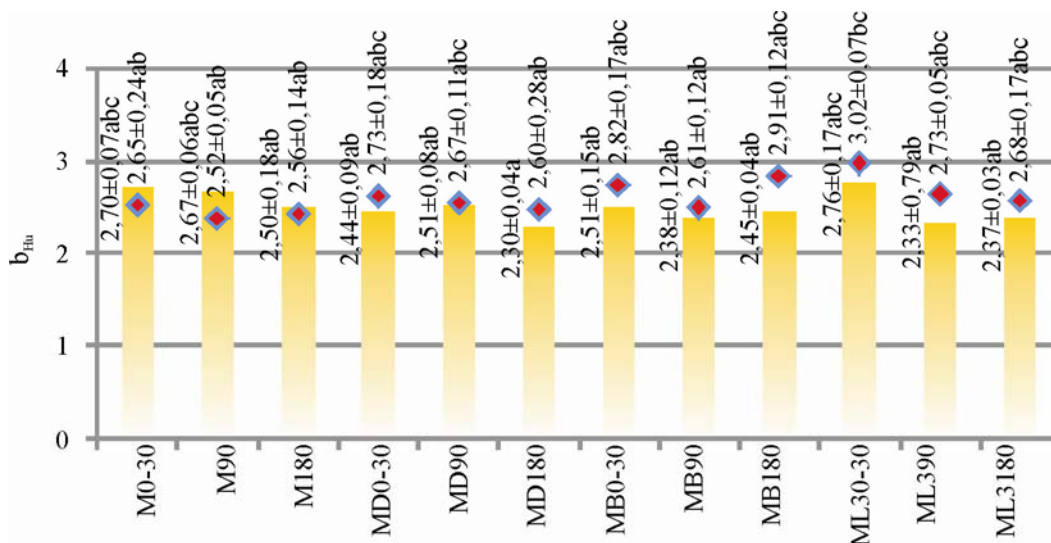
Grafik 22. Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu (b\*) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 23. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{Huv}$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 24. Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{Huv}$ ) crnih čokolada (sa 44 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

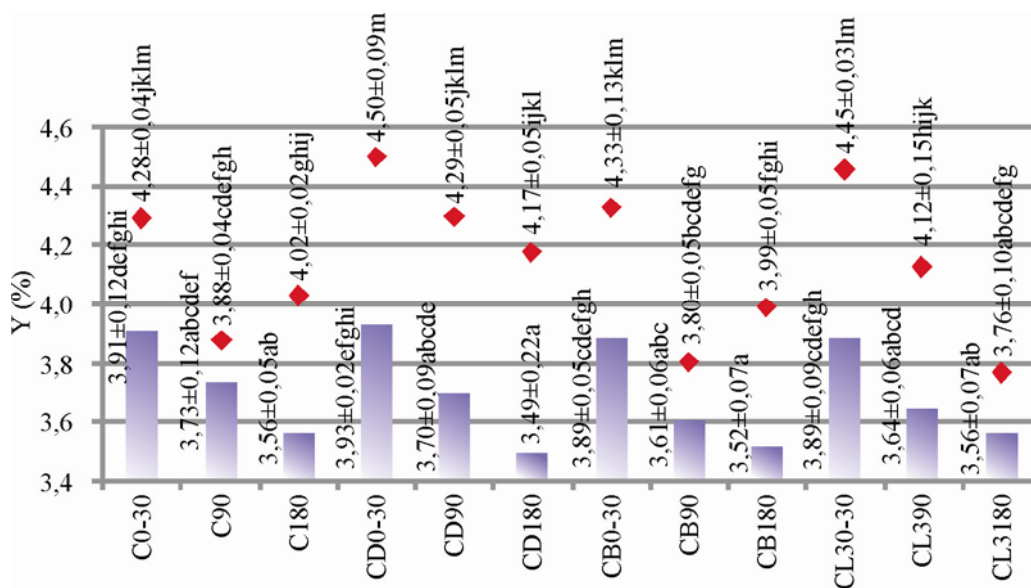


Grafik 25. Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

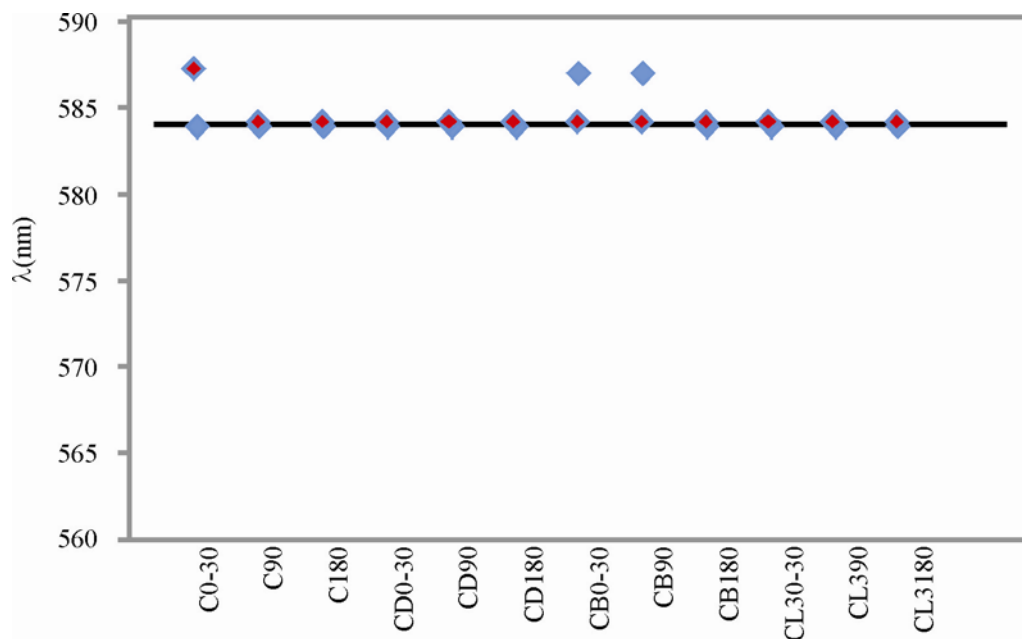
Kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova konstatovana je interesantna situacija u pogledu karakteristika kvaliteta boje, odnosno sjajnosti i svetloće, budući da su najviše i najniže vrednosti ovih parametara ustanovljene kod istih uzoraka - CD, samo na različitim površinama i u različitim vremenskim periodima ispitivanja. Naime, uzorci crnih čokolada sa većim udelom kakao-delova kojima je dodat probiotski soj *L. acidophilus* NCFM® (CD) imali su najveće utvrđene vrednosti srednje reflektance ( $Y=4.50\%$ ) (grafik 26) i psihometrijske svetlosti ( $L^*=25.25$  i  $L_{Hu}=21.21$ ) (grafici 29 i 32) na donjoj površini u prvom periodu ispitivanja (0-30 dana), što znači da je u tom intervalu donja površina ovih uzoraka bila najsajnija i, uslovno, najsvetlija u grupi crnih čokolada. Međutim, na kraju eksperimenta, posle 180 dana skladištenja, kod istih uzoraka konstatovana je najniža vrednost srednje reflektance ( $Y=3.49\%$ ) (grafik 26) i svetloće ( $L^*=21.90$  i  $L_{Hu}=18.68$ ) (grafici 29 i 32), ali na gornjoj površini. Odsustvo sjaja svojstvenog crnim čokoladama primećeno je kod ovih uzoraka i tokom senzorne analize, što je, između ostalog, doprinelo da navedeni uzorci u poslednjem vremenu ispitivanja dobiju najmanju srednju ocenu za svojstvo izgleda, ne samo u grupi crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, već od svih ispitivanih čokolada sa probioticima (tabela 17, *Rezultati ocenjivanja senzornog kvaliteta*). Dominantna talasna dužina crnih čokolada sa 75 % kakao-delova bila je u intervalu od

$\lambda=584$  nm do  $\lambda=587$  nm (grafik 27), a shodno tome, izračunate vrednosti za čistoću boje iznosile su od 16.13 do 18.95 % (grafik 28).

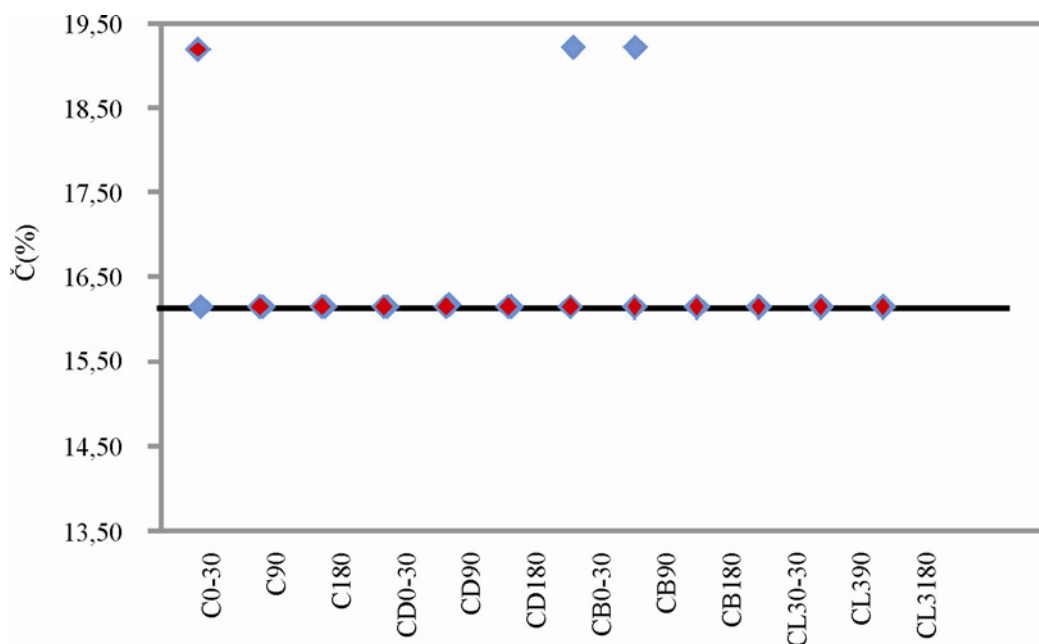
U CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu najvišu vrednost psihometrijskog tona imali su uzorci CB na donjoj površini neposredno nakon proizvodnje ( $a^*=6.11$ ), a najnižu uzorci C na gornjoj površini na kraju eksperimenta ( $a^*=4.62$ ) (grafik 30). Najveće učešće psihometrijske hrome ustanovljeno je na donjoj površini uzoraka CL3 180. dana ( $b^*=4.49$ ), a najmanje na gornjoj površini uzoraka CB posle 90 dana skladištenja ( $b^*=3.15$ ) (grafik 31). U Hunter-ovom sistemu najviše udele crvenog i žutog pigmenta imali su uzorci CL3 na donjoj površini u prvom vremenu ispitivanja ( $a_{Hu}=4.02$ ;  $b_{Hu}=2.45$ ) (grafici 33 i 34). Kod ovih uzoraka udeo žutog pigmenta se nije menjao ni posle 180. dana skladištenja (CL3 donja površina  $b_{Hu}=2.45$ ) (grafik 34). Najniža vrednost psihometrijskog tona nađena je na gornjoj površini kod uzoraka CB ( $a_{Hu}=2.55$ ) posle 180 dana (grafik 33), a psihometrijske hrome kod uzoraka CD ( $b_{Hu}=1.66$ ) posle 90 dana skladištenja (grafik 34).



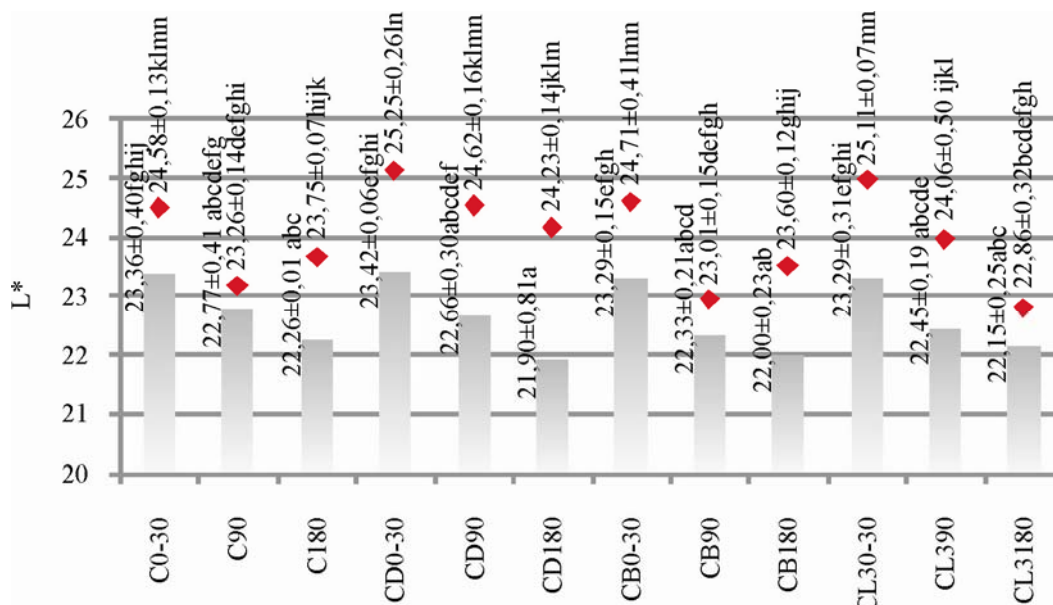
Grafik 26. Vrednosti srednje reflektance Y (%) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



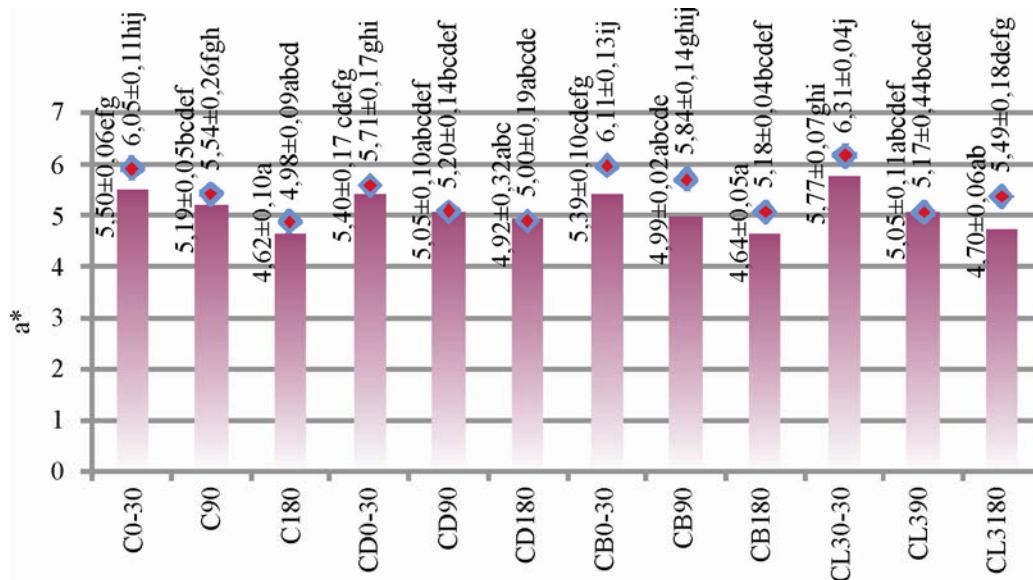
Grafik 27. Vrednosti za dominantnu talasnu dužinu  $\lambda$  (nm) crnih čokolada (sa 75% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 28. Vrednosti za čistoću boje  $\check{C}$  (%) crnih čokolada (sa 75% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke) tokom skladištenja od 180 dana

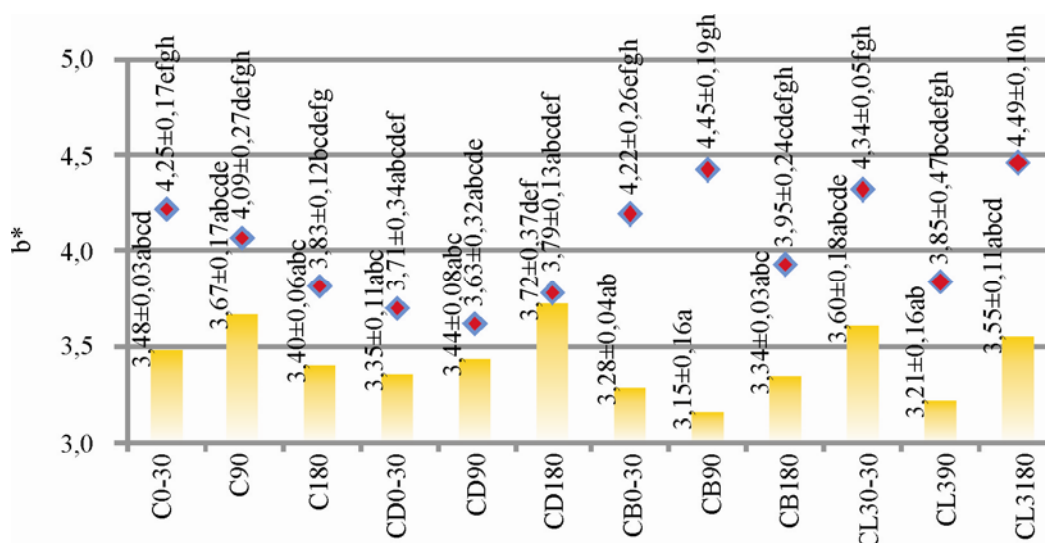


Grafik 29. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu ( $L^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

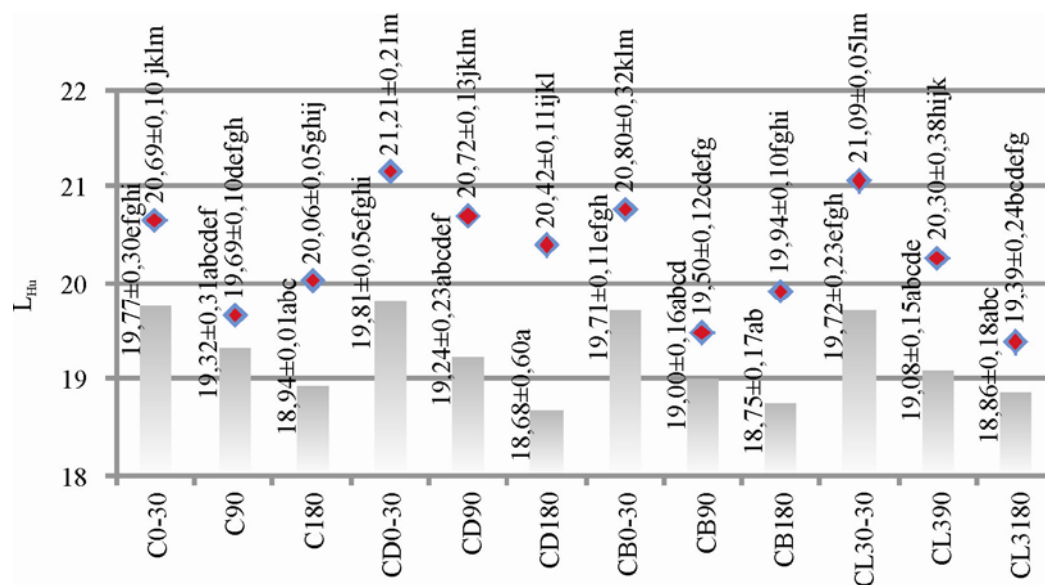


Grafik 30. Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu ( $a^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

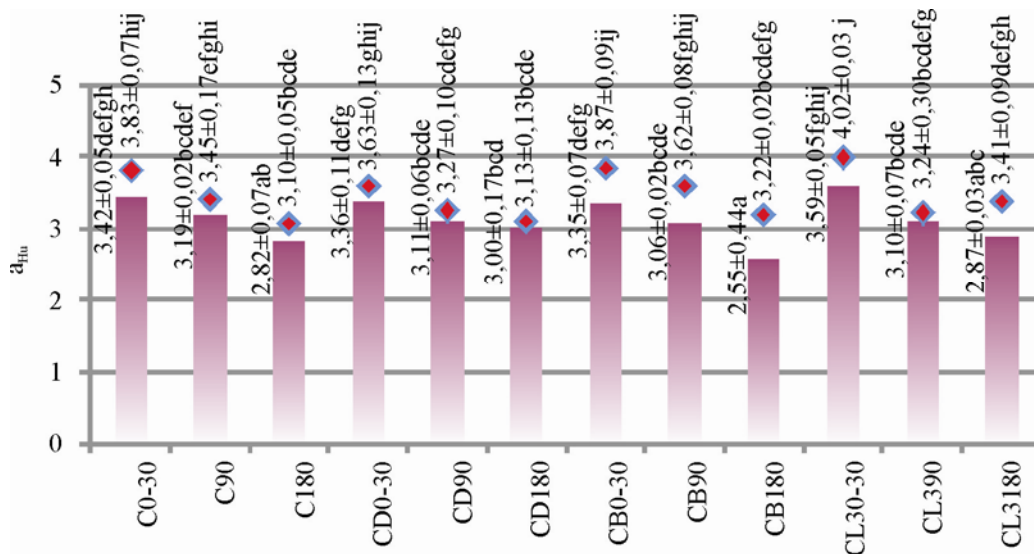




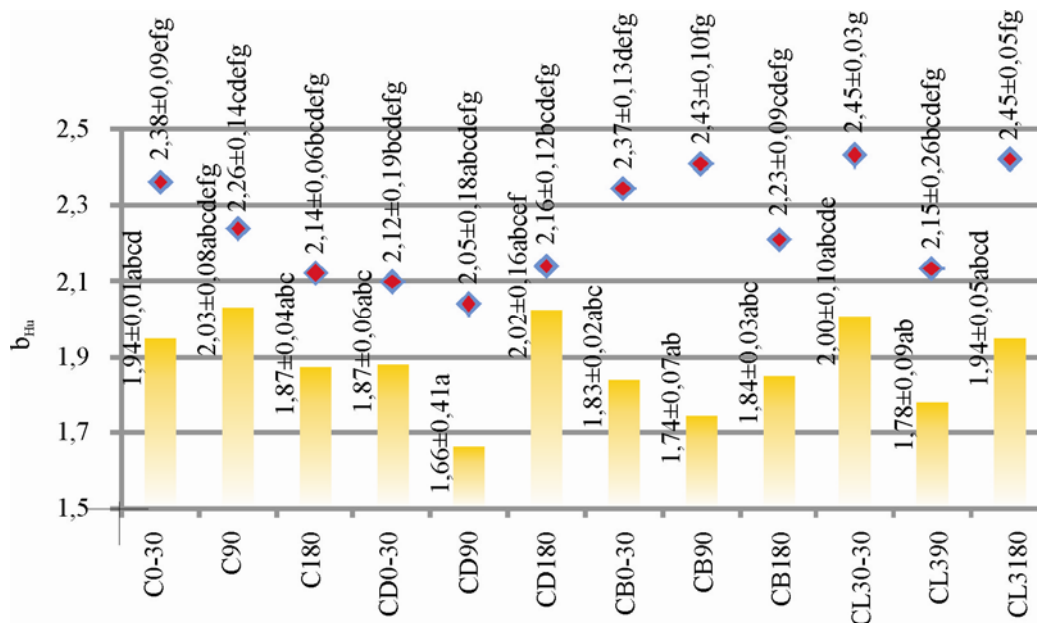
Grafik 31. Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu ( $b^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 32. Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{*H}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 33. Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana



Grafik 34. Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana

Dobijeni rezultati instrumentalnog određivanja karakteristika kvaliteta boje različitih vrsta čokolada sa (i bez) dodatkom probiotskih kultura tokom skladištenja od 180 dana upućuju na nekoliko važnih zaključaka. Najevidentnije je da se parametri kvaliteta boje razlikuju prema vrsti čokolade, u smislu da imaju najviše vrednosti kod mlečnih čokolada, niže vrednosti kod crnih čokolada sa 44 % kakao-delova, a najniže kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova. To se, pre svega, odnosi na vrednosti srednje reflektance ( $Y$ ) i psihometrijske svetlosti ( $L^*$  i  $L_{THu}$ ), i znači da su, u tom smislu, mlečne čokolade najsvetlije boje, crne sa 44 % kakao-delova su nešto tamnije, a crne sa 75 % kakao-delova – najtamnije, što se lako uočava i vizuelnim putem, pogotovo između mlečnih sa jedne strane, i crnih sa druge. Međutim, navedeno važi i za vrednosti ostalih psihometrijskih veličina, odnosno tona i hrome, što je svakako teže uočiti vizuelno. Nadalje, kod svih analiziranih uzoraka sve tri vrste čokolada uočava se da je donja površina svetlija od gornje, što se može pripisati razlici u zaravnjenosti površina, pošto su donje ravne, a na gornjim površinama postoje utisnuti tragovi kalupa, odnosno površinska topografija, što predstavlja faktore koji mogu doprineti različitom rasejavanju svetlosti. Mada su gubitak sjaja, matiranost i povećanje svetloće pojave koje se mogu očekivati tokom skladištenja čokolada jer prethode nastanku sivljenja zbog spontanog prelaska kristalnih oblika kakao-masti u najstabilniji polimorf (*Pastor i sar., 2007; Afoakwa i sar., 2008a*), ili, još više, zbog uvođenja dodatne čvrste faze u sastav čokolada dodatkom probiotika, ne može se reći da je do pomenutih pojava došlo tokom ovog eksperimenta. Drugim rečima, vrednosti sjajnosti i svetloće su se menjale sa odmicanjem vremena skladištenja, ali bez većih odstupanja od proseka, i svakako bez permanentnog povećanja koje bi ukazalo na razvoj pojave sivljenja. Dakle, može se zaključiti da inkorporiranje probiotika u čokolade različitog sastava nije uzrokovalo sivljenje istih. Prisutne razlike u iznosima pomenutih parametara, posebno kada je reč o sjajnosti, mogu, umnogome, zavisiti od pozicija na tabli čokolade na kojima se obavlja merenje. Uticaj pozicije merenja može se pripisati prenosu toplote u tabli čokolade tokom hlađenja i skladištenja i njenom delovanju na rekristalizaciju kakao-maslaca. Naime, na spoljašnjim pozicijama na čokoladnoj tabli može se očekivati veći temperaturni gradijent tokom neposrednog skladištenja, a takođe i manja brzina hlađenja na centralnim pozicijama što može izazvati promenu u kristalizaciji masti. Dakle, spoljašnje pozicije na čokoladnoj

tabli trpe veći uticaj fluktuacija temperature od centralnih, što uzrokuje dobijanje različitih vrednosti za sjajnost u zavisnosti od položaja tačke u kojoj je merenje parametara kvaliteta boje obavljeno (*Pastor i sar., 2007*).

Bez obzira na razlike psihometrijskih veličina s obzirom na udeo kakao-delova u čokoladama ili poziciju merenja, prema vrednostima dominantne talasne dužine, a na osnovu dijagrama hromatičnosti, svi analizirani uzorci čokolada (sa i bez probiotika) su pripadali istom – narandžastom delu spektra, u svim periodima ispitivanja tokom skladištenja od 180 dana.

Naposletku, treba istaći da rezultati ocene karakteristika kvaliteta boje gornje i donje površine uzoraka čokolada, dobijeni primenom tristimulusne kolorimetrije (u CIE, CIE  $L^*a^*b^*$  i Hunter-ovom sistemu) pokazuju dobru saglasnost sa senzornim ocenjivanjem istih karakteristika, i omogućavaju precizno praćenje i najmanjih promena boje. Ocenjivanje boje preko više izmerenih parametara daje mogućnost šire primene metode za objektivno ocenjivanje kvaliteta čokolada.

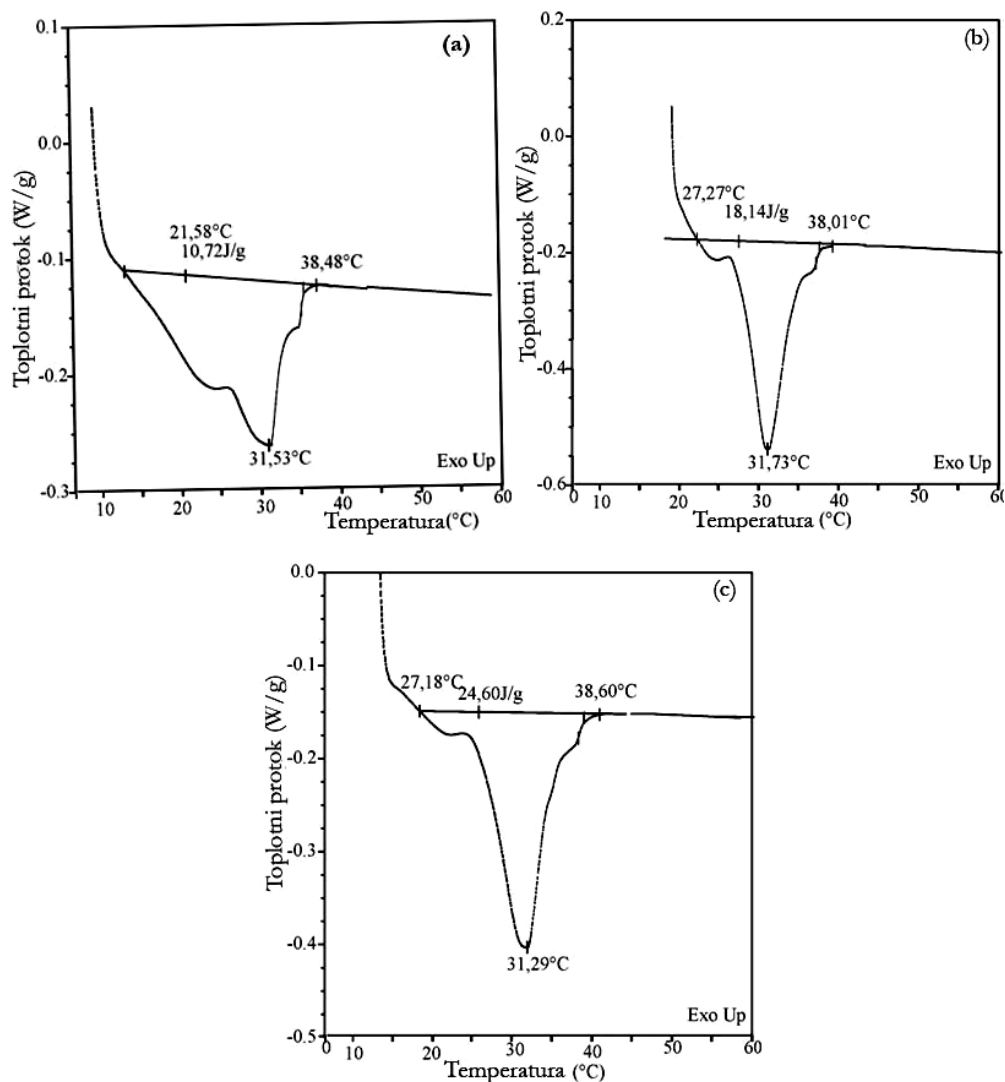
#### 5.4.2. Rezultati određivanja termalnih svojstava primenom DSC

Tokom proizvodnje čokolade, kristalno stanje i odnos prisutne čvrste masti su važni za utvrđivanje svojstava otapanja finalnog proizvoda. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija se koristi da bi se okarakterisale promene u profilu topljenja čokolade i da bi se izmerio relativan iznos svakog kristalnog oblika (*Walter i Cornillion, 2001*), a temperaturni pikovi koji odgovaraju latentnoj toploti uočavaju se u intervalima povezanim sa otapanjem pojedinih polimorfni oblika. Takva informacija je relevantna za senzorni kvalitet čokolada i utiče na mehanička i reološka svojstva, kao i na održivost (*Afoakwa, 2010*).

Primenom DSC obezbeđuje se bolji uvid u termalna svojstva i kristalografsku strukturu uzoraka čokolada i utvrđuje eventualni uticaj dodatih probiotskih bakterija na temperature koje karakterizuju ove procese. To su, pre svega, temperature topljenja i kristalizacije uzoraka čokolada ( $T_m$  i  $T_c$ ), kao i entalpije navedenih procesa ( $\Delta H_{melt}$  i  $\Delta H_{cryst}$ ). Od značaja su i  $T_{onset}$  - temperatura početka kristalizacije/topljenja,  $T_{peak}$  - temperature maksimuma pika,  $T_{end}$  - temperatura završetka kristalizacije/topljenja, a iz razlike  $T_{end}$  –

$T_{\text{onset}}$  moguće je izračunati i  $T_{\text{index}}$  – indeks otapanja. DSC prati promene u toplotnom protoku uzoraka čokolada tokom topljenja i kristalizacije a rezultati se izražavaju kao protok toplote (W/g) u funkciju temperature (°C).

Na grafiku 35 prikazani su termogrami dobijeni DSC-om za kontrolne uzorke ispitivanih vrsta čokolada (mlečne i crne sa 44 % i 75 % kakao-delova), koji su dati kao ilustrativni primer tipičnih DSC termograma na osnovu kojih se mogu oceniti svojstva topljenja ispitivanih čokolada. Na svakom od prikazanih termograma (grafik 35: a, b i c), početak pika odgovara temperaturi na kojoj određeni kristalni oblik kakao-maslaca prisutan u analiziranom uzorku počinje da se topi; maksimum pika korespondira temperaturi na kojoj je brzina topljenja najveća; kraj pika označava završetak otečnjavanja; sve navedene informacije odnose se na tip kristala. Visina pika, njegova pozicija i rezolucija zavise od sastava samog uzorka i raspoređenosti kristalnog stanja. Sa grafika se može videti da se kod svih prikazanih uzoraka različitih vrsta čokolada toplotni kapacitet postepeno ali dosledno povećavao do početne temperature ( $T_{\text{onset}}$ ), a potom progresivno brže rastao do dostizanja temperature na samom vrhu ( $T_{\text{peak}}$ ), nakon koje je opadao do krajnje temperature ( $T_{\text{end}}$ ), ukazujući na to da je čokolada potpuno otopljena.



Grafik 35. DSC termogrami za a) mlečnu čokoladu, b) crnu čokoladu sa 44 % kakao-delova i c) crnu čokoladu sa 75 % kakao-delova sa karakterizacijom svojstava topljenja snimljeni odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)

Na očvršćavanje čokolade tokom proizvodnje i kasnije, na svojstva topljenja pri konzumiranju, utiču, pre svega, procesni parametri. Faza temperiranja, preciznije, trajanje temperiranja, primenjena sila smicanja, kao i finalna temperatura topljenja, odnosno ponovnog zagrevanja, imaju najizraženiji uticaj na strukturu finalnog proizvoda. Međutim, kada se termalna svojstva čokolada ispituju pomoću DSC, veoma važan faktor koji se odražava na dobijene rezultate predstavlja i brzina hlađenja primenjena prilikom ispitivanja. Suviše velike brzine hlađenja dovode do formiranja netemperiranog uzorka, koji se pretvara

u više polimorfe tokom zagrevanja. Osim toga, *Foubert i sar., (2003)* navode da rezultati dobijeni DSC-om pri izotermalnoj kristalizaciji kakao-maslaca, zbog vizuelnog određivanja početnih i krajnjih temperatura ( $T_0$  i  $T_c$ ), veoma zavise od operatera koji obavlja očitavanja, te da mogu biti uslovljeni načinom pripreme uzorka. Sa druge strane, osnovna odlika senzornog kvaliteta čokolada jeste sastav kontinualne masne faze, odnosno kakao-maslaca, koji u čokoladama predstavlja dominantnu mast. Kakao-maslac se najvećim delom sastoji od simetričnih triglicerida, i u zavisnosti od njihovog sastava, može da kristališe u šest različitih polimorfni oblika, koji su odgovorni za svojstva topljenja i osećaj u ustima (*Afoakwa i sar., 2008a*). Hemijski sastav kakao-masti može, u izvesnoj meri, varirati, u zavisnosti od uslova gajenja i starosti kakao-stabla, sa jedne strane, ali i od primenjenog postupka dobijanja masti iz kakao-zrna i njene kasnije rafinacije, sa druge strane. Ova variranja u hemijskom sastavu kakao-maslaca mogu dovesti do razlika u njegovim fizičkim svojstvima, kao što je kinetika kristalizacije (*Foubert, 2003*).

U crnim čokoladama kakao-maslac predstavlja jedinu mast, međutim, kod mlečnih čokolada situacija je znatno usložnjena prisustvom još jedne važne komponente - mlečne masti. Kristalizacija mlečne masti je mnogo kompleksnija nego kod ostalih masti zbog njenog heterogenog sastava, formiranja mešovityh kristala i pojave polimorfizma. Iako se odlikuje inhibitornim svojstvima u odnosu na pojavu sivljenja, veoma širok interval topljenja i plastičnost mlečne masti limitira njenu upotrebu u čokoladi zbog smanjenja brzine kristalizacije kakao-maslaca i omekšavanja čokolade. Mlečna mast ne utiče na polimorfizam kakao-maslaca, ali je tačka topljenja svakog polimorfni oblika niža u mešavinama pomenutih masti zbog složene strukture lipida mlečne masti (*Metin i Hartel, 1998; Van Aken i sar., 1999*). Kako se u proizvodnji konditorskih proizvoda vrlo često koriste različite frakcije mlečne masti, treba naglasiti da efekatu odlaganja kristalizacije kakao-maslaca ne doprinose podjednako sve frakcije. Naime, frakcije sa višom tačkom topljenja koje su po hemijskom sastavu sličnije kakao-maslacu, kao i upotreba mleka u prahu sa dodatom slobodnom mlečnom mašću, imaju manji uticaj na odlaganje kristalizacije kakao-masti, usled čega dolazi do mešovite kristalizacije bez jasno odvojenih kristalizacionih pikova (*Attai i sar., 2003*).

Na osnovu dobijenih dijagrama tokom termalne analize uzoraka čokolada u ovom eksperimentu može se uočiti da crne čokolade (sa 44 % i 75 % kakao-delova) imaju veoma

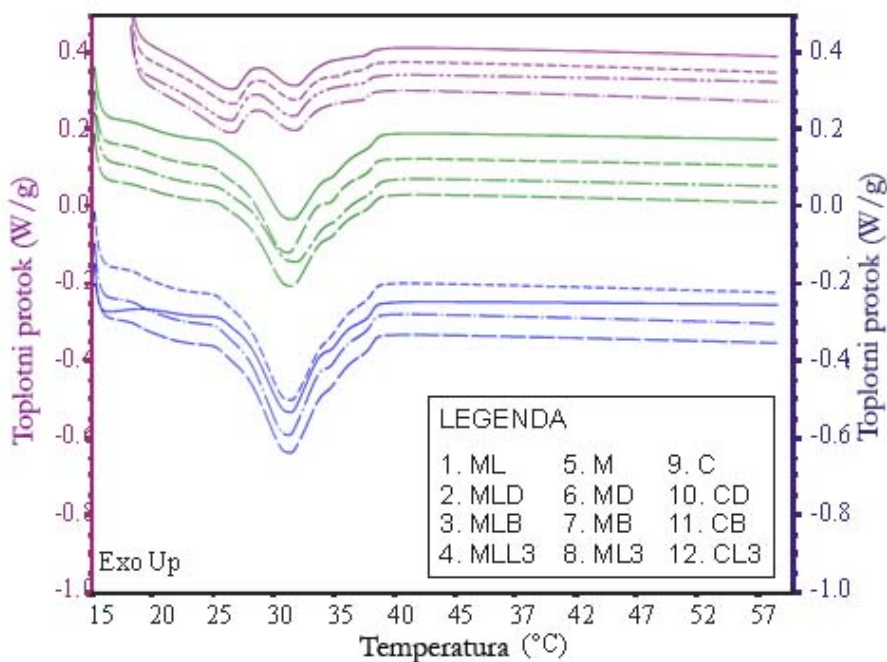
sličan profil topljenja, sa endotermnim pikovima na oko 32°C, i bliskim temperaturama početka topljenja (oko 27°C). To znači da se najveći deo prisutne masti topi iznad sobne temperature, zbog čega su ove čokolade pri unošenju u usta čvrste, a potom se postepeno tope. Međutim, za razliku od crnih čokolada, kod mlečnih čokolada dobija se drugačija slika. Naime, pri topljenju mlečnih čokolada uočavaju se dva endotermna pika na oko 24°C i 32°C, kao i niža temperatura početka topljenja u odnosu na crne čokolade (oko 21°C). Navedeno znači da se jedan deo masti otapa na temperaturi približnoj sobnoj, čime se objašnjava karakteristična meka tekstura mlečne čokolade. Kada određeni kristalni oblik počne da se topi, tokom zagrevanja konstantnom brzinom, potrebno je više energije da bi se održao stalan rast temperature, usled čega dolazi do pojave pika koji doseže svoj maksimum na temperaturi na kojoj je brzina topljenja najveća. Međutim, u istom uzorku moguć je nastanak više različitih pikova, što ukazuje na prisustvo više kristalnih oblika (Beckett, 2002). Ovakvo ponašanje mlečnih čokolada uočeno je i od strane drugih istraživača, pri čemu se ističe pojava bimodalne raspodele pikova tokom topljenja. Tako Stapley i sar., (1999) konstatuju da je polimorfizam kod mlečnih čokolada najevidentniji kod krivih dobijenih prilikom topljenja, gde se mogu uočiti dva različita tipa topljenja: sa višim i nižim opsegom. Više tačke topljenja predstavljaju stabilnije polimorfne oblike koji se povezuju sa temperiranom čokoladom, dok niže ukazuju na prisustvo nestabilnijih formi kristala. Međutim, na dijagramima dobijenim pri kristalizaciji, odnosno hlađenju mlečnih čokolada, teže se mogu uočiti polimorfne forme, budući da kinetički faktori utiču na vreme i temperaturu pri kojima dolazi do kristalizacije. Rezultati do kojih smo došli za mlečne čokolade u potpunosti odgovaraju navedenom, budući da se pri kristalizaciji javlja samo jedan endotermni pik. Iznosi viših i nižih polimorfa koji se javljaju pri topljenju, ne odgovaraju uvek proporcijama koje bi se mogle predvideti na osnovu krivih hlađenja (kristalizacije). Izgleda da je samo mala količina kristalizacije u višem polimorfu potrebna kako bi se primetile veće količine viših polimorfa tokom topljenja, i da pikovi koji odgovaraju višim temperaturama pri topljenju mogu nastati iz sistema kod kojih kristalizacioni pik može biti veoma nizak, čak oko 12°C. Navedeno se možda dešava zbog toga što viši polimorfni oblik kristališe na ovim nižim temperaturama, ili, što je verovatnije, zbog toga što se niži polimorf formira u početku, ali nakon toga prelazi u viši kristalni oblik, što je fenomen uočen i u literaturi (Stapley i sar., 1999).



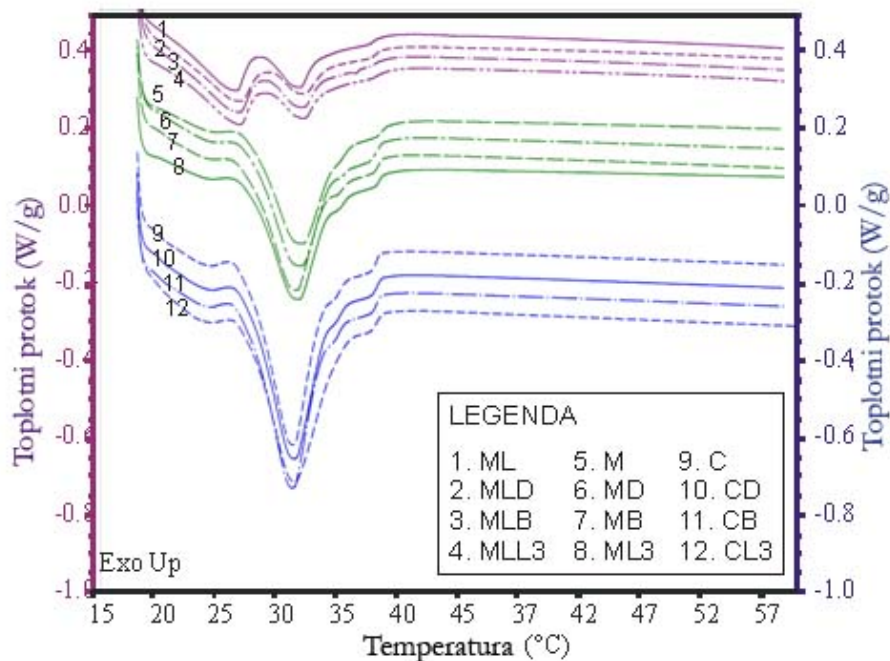
Radi potpunijeg sagledavanja istraživanja u ovoj oblasti, navešćemo da su pojedini autori (*Le Reverend, 2009*) pronalazili dva pika i pri topljenju i pri kristalizaciji pravilno temperiranih crnih čokolada, što kod nas nije bio slučaj, jer se sa dobijenih dijagrama vidi izrazita dominacija jednog pika koji odgovara višim polimorfnim oblicima kakao-maslaca ( $\beta$  (V)).

## Topljenje

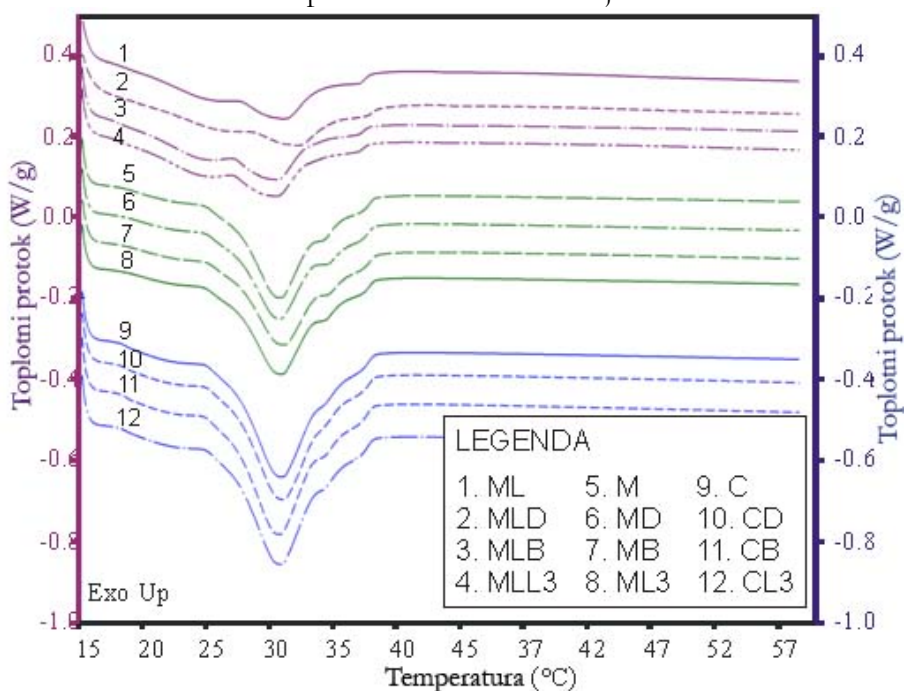
Na grafikonima od 36-38 prikazane su krive topljenja tri različite vrste čokolada, kontrolnih i sa dodatim probioticima, dobijene neposredno posle proizvodnje i nakon skladištenja od 90, tj. 180 dana. Termodinamički parametri topljenja prikazani su u tabeli 18.



Grafik 36. DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44 % kakao-delova (zeleno) i crnih sa 75 % kakao-delova (plavo) neposredno nakon proizvodnje (0-30 dana)



Grafik 37. DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44% kakao- delova (zeleno) i crnih sa 75% kakao-delova (plavo) posle 90 dana skladištenja



Grafik 38. DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44 % kakao- delova (zeleno) i crnih sa 75 % kakao-delova (plavo) posle 180 dana skladištenja

Imajući u vidu da se analizirani uzorci čokolada međusobno razlikuju prema ukupnom sadržaju masti, sa dobijenih dijagrama se može uočiti da sadržaj masti dovodi do nastanka razlika u kristalnom stanju uzoraka i njihovim svojstvima topljenja, što se pre svega može videti u razlikama u širini dobijenih pikova. To ukazuje da sadržaj masti kod uzoraka čokolada tokom proizvodnje utiče na nivo tj. količinu kristala, kao i na raspodelu veličine kristala kod odgovarajućih temperiranih finalnih proizvoda. *Lonchampt i Hartel (2006)* su takođe primetili da količina i sastav masti tokom proizvodnje čokolade ima presudan uticaj na veličinu kristala, kao i na polimorfizam i brzinu kristalizacije. *Hartel (2001)* navodi da raspored veličina kristala u hrani generalno, ima ključnu ulogu u kvalitetu finalnog proizvoda, koji je definisan ukupnim i pojedinačnim karakteristikama komponente koja kristališe. Broj kristala i raspon njihovih veličina, oblika i stabilnosti polimorfni formi, kao i njihovo slaganje u strukturalnoj mreži, diktiraju mehanička i reološka svojstva.

Iz tabele 18 je evidentno da je sa povećanjem sadržaja masti došlo je do konzistentnog povećanja u stepenu kristalčnosti, što je uticalo na promenu  $\Delta H_{\text{melt}}$ . Kraće trajanje otapanja u čokoladama sa više masti uočeno i pri ocenjivanju senzornog kvaliteta, može se pripisati smanjenju međučestičnih interakcija i povećanju plastičnog proticanja, što je verovatno u vezi sa prinosnim naponom proizvoda (*Beckett, 2002; Do i sar., 2007*). Mast, naime, popunjava praznine između čestica u otopljenoj čokoladi i smanjuje otpor proticanju, što sugerise direktnu vezu između sadržaja masti i  $\Delta H_{\text{melt}}$ . To implicira smanjenje entalpije kod uzoraka sa nižim sadržajem masti, što se može uočiti iz tabele 18.

Tokom vremena temperatura početka topljenja, temperatura maksimuma i temperatura kraja topljenja ( $T_{\text{onset}}, T_m, T_{\text{end}}$ ) su se menjala za sve uzorke čokolada, bilo sa dodatkom probiotika ili bez njih, što ukazuje da promene koje su se desile u uzorcima tokom skladištenja, nisu isključivo uzrokovane prisustvom BMK.

Tabela 18. Termodinamički parametri topljenja različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika dobijeni obradom DSC krivih tokom skladištenja od 180 dana

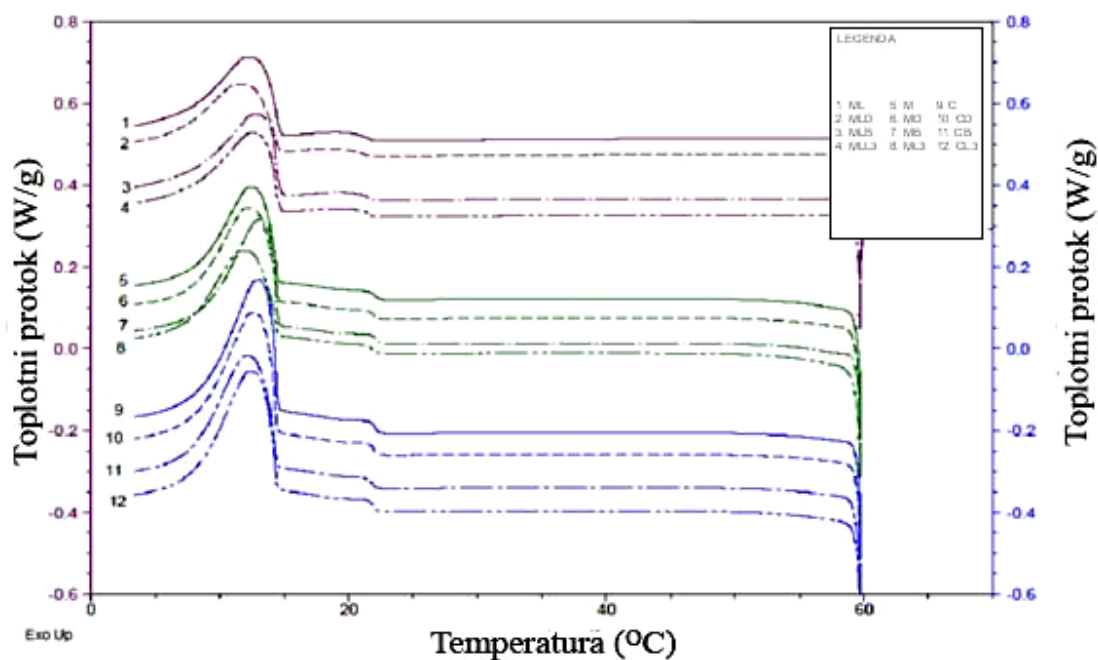
| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) |                        |                          |                          |                        |                        |                          |                          |                        |                        |                          |                          |
|--------|---------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
|        | 0-30                      |                        |                          |                          | 90                     |                        |                          |                          | 180                    |                        |                          |                          |
|        | Termodinamički parametri  |                        |                          |                          |                        |                        |                          |                          |                        |                        |                          |                          |
|        | T <sub>o</sub><br>(°C)    | T <sub>m</sub><br>(°C) | T <sub>end</sub><br>(°C) | ΔH <sub>m</sub><br>(J/g) | T <sub>o</sub><br>(°C) | T <sub>m</sub><br>(°C) | T <sub>end</sub><br>(°C) | ΔH <sub>m</sub><br>(J/g) | T <sub>o</sub><br>(°C) | T <sub>m</sub><br>(°C) | T <sub>end</sub><br>(°C) | ΔH <sub>m</sub><br>(J/g) |
| ML     | 21.58<br>±0.21            | 31.53<br>±0.38         | 38.48<br>±0.44           | 10.72<br>±0.12           | 20.85<br>±0.27         | 31.74<br>±0.32         | 38.37<br>±0.39           | 12.33<br>±0.88           | 18.94<br>±0.20         | 31.99<br>±0.43         | 37.90<br>±0.17           | 16.90<br>±0.15           |
| MLD    | 21.00<br>±0.32            | 31.98<br>±0.55         | 38.04<br>±0.20           | 12.63<br>±0.38           | 20.75<br>±0.43         | 31.88<br>±0.48         | 38.04<br>±0.24           | 12.44<br>±0.56           | 21.14<br>±0.33         | 32.09<br>±0.37         | 38.61<br>±0.24           | 14.63<br>±0.26           |
| MLB    | 21.16<br>±0.27            | 31.57<br>±0.25         | 38.53<br>±0.22           | 13.32<br>±0.43           | 20.69<br>±0.34         | 31.69<br>±0.35         | 38.16<br>±0.30           | 13.20<br>±0.52           | 18.71<br>±0.38         | 30.15<br>±0.27         | 37.70<br>±0.30           | 17.95<br>±0.19           |
| ML L3  | 21.22<br>±0.4             | 31.84<br>±0.27         | 38.84<br>±0.35           | 12.91<br>±0.84           | 20.31<br>±0.29         | 31.59<br>±0.41         | 38.17<br>±0.19           | 13.71<br>±0.26           | 18.52<br>±0.41         | 30.37<br>±0.17         | 37.73<br>±0.27           | 18.32<br>±0.31           |
| M      | 27.27<br>±0.36            | 31.73<br>±0.47         | 38.01<br>±0.14           | 18.14<br>±0.78           | 26.58<br>±0.59         | 31.22<br>±0.25         | 38.64<br>±0.37           | 21.98<br>±1.00           | 26.20<br>±0.12         | 30.67<br>±0.24         | 38.15<br>±0.31           | 24.43<br>±0.55           |
| MD     | 27.36<br>±0.48            | 31.55<br>±0.34         | 38.47<br>±0.38           | 18.49<br>±0.45           | 26.33<br>±0.40         | 31.56<br>±0.33         | 38.64<br>±0.27           | 21.86<br>±0.78           | 26.26<br>±0.37         | 30.67<br>±0.20         | 38.15<br>±0.22           | 21.67<br>±0.39           |
| MB     | 27.33<br>±0.55            | 31.18<br>±0.26         | 38.39<br>±0.21           | 17.88<br>±1.20           | 26.54<br>±0.21         | 31.05<br>±0.15         | 38.47<br>±0.40           | 19.45<br>±0.47           | 26.29<br>±0.21         | 30.95<br>±0.34         | 38.21<br>±0.43           | 21.60<br>±0.48           |
| ML3    | 27.31<br>±0.24            | 31.36<br>±0.47         | 38.56<br>±0.42           | 17.98<br>±0.89           | 26.19<br>±0.45         | 31.28<br>±0.51         | 38.64<br>±0.25           | 22.65<br>±0.532          | 26.12<br>±0.30         | 30.74<br>±0.29         | 38.10<br>±0.37           | 23.59<br>±0.88           |
| C      | 27.18<br>±0.31            | 31.29<br>±0.23         | 38.60<br>±0.27           | 24.60<br>±0.94           | 26.32<br>±0.19         | 31.19<br>±0.43         | 38.44<br>±0.22           | 28.34<br>±0.42           | 26.31<br>±0.24         | 30.90<br>±0.18         | 38.12<br>±0.22           | 27.14<br>±0.74           |
| CD     | 27.21<br>±0.40            | 30.95<br>±0.11         | 37.62<br>±0.16           | 24.62<br>±0.53           | 26.34<br>±0.13         | 30.99<br>±0.29         | 38.32<br>±0.36           | 28.46<br>±0.38           | 26.02<br>±0.35         | 30.60<br>±0.31         | 37.96<br>±0.45           | 31.69<br>±1.15           |
| CB     | 27.22<br>±0.27            | 31.91<br>±0.10         | 38.21<br>±0.33           | 24.21<br>±1.05           | 26.70<br>±0.28         | 31.33<br>±0.12         | 38.35<br>±0.20           | 21.72<br>±0.35           | 26.05<br>±0.19         | 30.70<br>±0.23         | 38.02<br>±0.20           | 30.83<br>±0.62           |
| C L3   | 27.31<br>±0.35            | 30.80<br>±0.38         | 38.77<br>±0.48           | 24.77<br>±1.30           | 26.29<br>±0.17         | 31.09<br>±0.40         | 38.42<br>±0.38           | 28.42<br>±0.50           | 13.09<br>±0.21         | 30.78<br>±0.20         | 38.07<br>±0.41           | 30.49<br>±0.70           |

## Kristalizacija

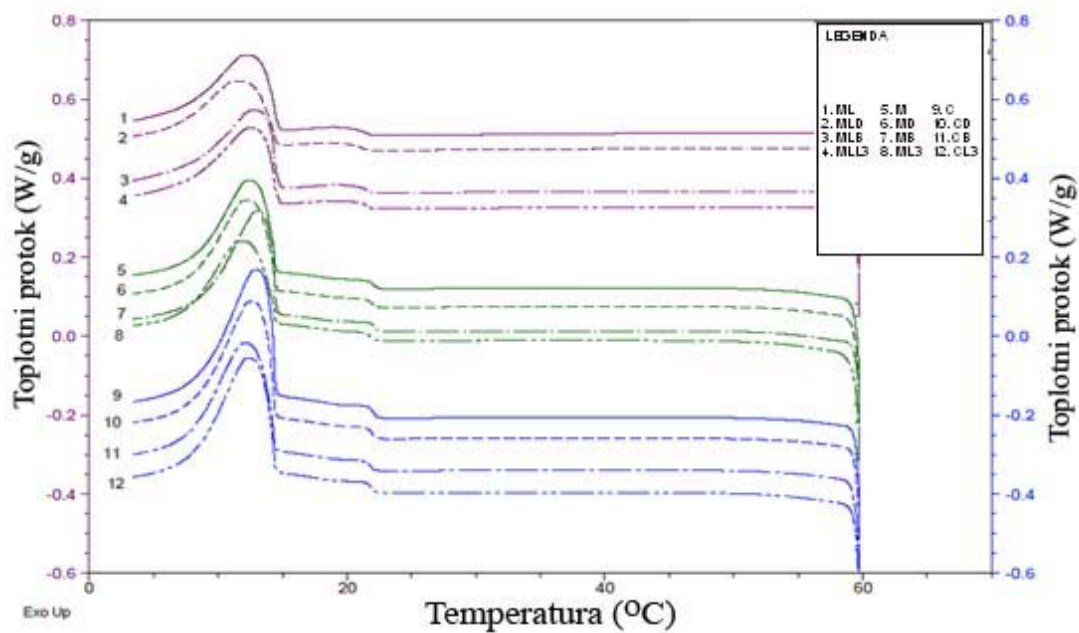
Krive kristalizacije tri različite vrste čokolada, kontrolnih i sa dodatim probioticima, dobijene neposredno posle proizvodnje i nakon skladištenja od 90, tj. 180 dana prikazane su na grafikonima od 39 do 41, a termodinamički parametri kristalizacije u tabeli 19.

Kao što se može videti iz table 19 pri primenjenim uslovima, odnosno zagrevanju do 60°C radi topljenja, a potom hlađenju do 2°C brzinom od 5°C/min, kristalizacija počinje oko 14°C, a maksimum doseže oko 12°C (T<sub>c</sub>), uz manje vrednosti entalpije kristalizacije (ΔH<sub>c</sub>=10.07 za uzorak MLD 0-30 dana do 17.90 za uzorak CB posle 180 dana skladištenja). S obzirom da je kristalizacija obavljena pri nekontrolisanim uslovima, odnosno bez

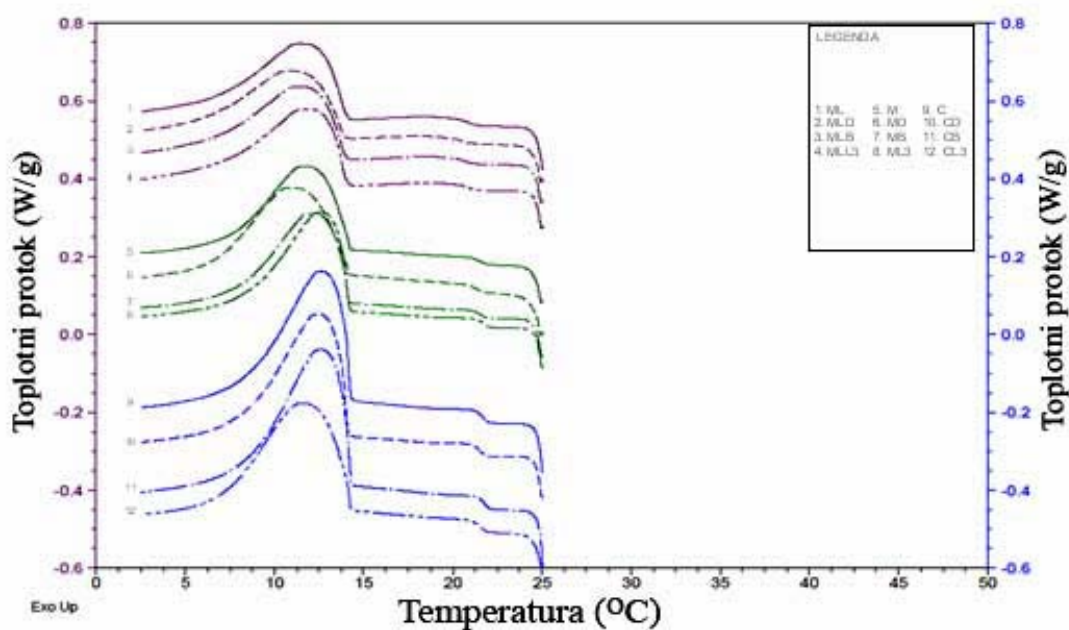
temperiranja, dobija se netemperirani uzorak, pa su ovako niske vrednosti temperature kristalizacije prihvatljive i odgovaraju rezultatima i drugih autora (*Stapley i sar., 1999*). Kako se može videti iz dobijenih vrednosti za termodinamičkih parametara kristalizacije i sa prikazanih grafika od 39 do 41 vrednosti dobijene za uzorke čokolada sa probioticima ne razlikuju se značajno od onih utvrđenih kod kontrolnih čokolada, niti se izrazitije menjaju sa vremenom skladištenja.



Grafik 39. DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4) crnih sa 44% kakao- delova (5-6) i crnih sa 75% kakao-delova (9-12) neposredno nakon proizvodnje (0-30 dana)



Grafik 40. DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4), crnih sa 44 % kakao- delova (5-8) i crnih sa 75 % kakao-delova (9-12) posle 90 dana skladištenja



Grafik 41. DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4), crnih sa 44 % kakao- delova (5-8) i crnih sa 75 % kakao-delova (9-12) posle 180 dana skladištenja

Tabela 19. Termodinamički parametri kristalizacije različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika dobijeni obradom DSC krivih tokom skladištenja od 180 dana

| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) |                     |                       |                     |                     |                       |                     |                     |                       |
|--------|---------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
|        | 0-30                      |                     |                       | 90                  |                     |                       | 180                 |                     |                       |
|        | Termodinamički parametri  |                     |                       |                     |                     |                       |                     |                     |                       |
|        | $T_o$<br>(°C)             | $T_c$<br>(°C)       | $\Delta H_c$<br>(J/g) | $T_o$<br>(°C)       | $T_c$<br>(°C)       | $\Delta H_c$<br>(J/g) | $T_o$<br>(°C)       | $T_c$<br>(°C)       | $\Delta H_c$<br>(J/g) |
| ML     | 14.65<br>$\pm 0.45$       | 12.35<br>$\pm 0.23$ | 11.89<br>$\pm 1.20$   | 14.66<br>$\pm 0.38$ | 12.40<br>$\pm 0.35$ | 11.68<br>$\pm 0.78$   | 14.02<br>$\pm 0.30$ | 11.59<br>$\pm 0.44$ | 12.02<br>$\pm 0.95$   |
| MLD    | 14.58<br>$\pm 0.34$       | 11.78<br>$\pm 0.36$ | 10.41<br>$\pm 1.00$   | 13.30<br>$\pm 0.26$ | 10.87<br>$\pm 0.28$ | 10.07<br>$\pm 0.92$   | 13.92<br>$\pm 0.25$ | 11.06<br>$\pm 0.31$ | 11.25<br>$\pm 0.79$   |
| MLB    | 14.56<br>$\pm 0.29$       | 12.85<br>$\pm 0.12$ | 11.73<br>$\pm 0.98$   | 14.57<br>$\pm 0.17$ | 12.80<br>$\pm 0.15$ | 12.01<br>$\pm 0.65$   | 13.97<br>$\pm 0.22$ | 11.50<br>$\pm 0.36$ | 11.67<br>$\pm 1.07$   |
| ML L3  | 14.54<br>$\pm 0.30$       | 12.61<br>$\pm 0.41$ | 11.47<br>$\pm 0.79$   | 14.53<br>$\pm 0.37$ | 12.50<br>$\pm 0.20$ | 11.67<br>$\pm 0.54$   | 14.01<br>$\pm 0.17$ | 11.86<br>$\pm 0.28$ | 12.14<br>$\pm 0.86$   |
| M      | 14.49<br>$\pm 0.41$       | 12.39<br>$\pm 0.33$ | 12.41<br>$\pm 0.85$   | 14.46<br>$\pm 0.43$ | 12.28<br>$\pm 0.32$ | 12.58<br>$\pm 0.46$   | 14.23<br>$\pm 0.14$ | 11.64<br>$\pm 0.37$ | 12.05<br>$\pm 0.59$   |
| MD     | 14.50<br>$\pm 0.36$       | 12.20<br>$\pm 0.24$ | 12.56<br>$\pm 0.69$   | 14.47<br>$\pm 0.40$ | 11.81<br>$\pm 0.40$ | 12.61<br>$\pm 0.89$   | 14.18<br>$\pm 0.35$ | 10.81<br>$\pm 0.42$ | 14.00<br>$\pm 0.64$   |
| MB     | 14.49<br>$\pm 0.19$       | 13.08<br>$\pm 0.20$ | 12.88<br>$\pm 0.57$   | 14.48<br>$\pm 0.20$ | 13.00<br>$\pm 0.34$ | 12.95<br>$\pm 0.94$   | 14.60<br>$\pm 0.40$ | 12.02<br>$\pm 0.20$ | 12.47<br>$\pm 0.55$   |
| M L3   | 14.48<br>$\pm 0.22$       | 11.72<br>$\pm 0.19$ | 12.21<br>$\pm 0.49$   | 14.42<br>$\pm 0.25$ | 11.46<br>$\pm 0.30$ | 12.22<br>$\pm 0.75$   | 14.18<br>$\pm 0.34$ | 12.56<br>$\pm 0.39$ | 12.76<br>$\pm 0.98$   |
| C      | 14.45<br>$\pm 0.25$       | 12.99<br>$\pm 0.36$ | 15.99<br>$\pm 0.67$   | 14.48<br>$\pm 0.38$ | 12.83<br>$\pm 0.25$ | 16.41<br>$\pm 1.05$   | 14.26<br>$\pm 0.25$ | 12.62<br>$\pm 0.21$ | 17.04<br>$\pm 1.00$   |
| CD     | 14.39<br>$\pm 0.39$       | 12.65<br>$\pm 0.28$ | 14.39<br>$\pm 0.83$   | 14.38<br>$\pm 0.41$ | 12.46<br>$\pm 0.32$ | 15.67<br>$\pm 0.98$   | 14.10<br>$\pm 0.27$ | 12.41<br>$\pm 0.28$ | 15.87<br>$\pm 0.72$   |
| CB     | 14.40<br>$\pm 0.45$       | 12.01<br>$\pm 0.21$ | 15.29<br>$\pm 1.05$   | 14.38<br>$\pm 0.27$ | 11.78<br>$\pm 0.27$ | 15.37<br>$\pm 1.15$   | 14.28<br>$\pm 0.33$ | 12.62<br>$\pm 0.30$ | 17.90<br>$\pm 0.68$   |
| C L3   | 14.42<br>$\pm 0.27$       | 12.34<br>$\pm 0.19$ | 15.53<br>$\pm 1.14$   | 14.40<br>$\pm 0.22$ | 12.17<br>$\pm 0.25$ | 15.77<br>$\pm 1.00$   | 14.27<br>$\pm 0.32$ | 11.48<br>$\pm 0.29$ | 16.56<br>$\pm 0.65$   |

Povećanje vrednosti entalpije ( $i$  topljenja i kristalizacije) sa odmicanjem vremena skladištenja se moglo očekivati jer dolazi do očvršćavanja većeg dela masti u uzorcima tokom stajanja (Stapley i sar., 1999). Pojedini autori (Afoakwa, 2010) povećanje entalpije topljenja pripisuju relativnoj čvrstini rekristalisane mreže masti koja se formira tokom sivljenja proizvoda. Ipak, navedene promene nisu takvog intenziteta koji bi ukazivao na eventualnu pojavu sivljenja, što je potvrđeno, kako vrednostima  $T_m$  (tabela 18), tako i ostalim analizama ispitivanih čokolada (boja, sensorika). Osim toga, entalpije topljenja tipične za pojavu sivljenja tokom skladištenja navedene u literaturi (Afoakwa, 2010) imale su znatno više vrednosti od onih dobijenih u ovom eksperimentu. Sa druge strane, izgleda da dodatak probiotskih bakterija nema značajnijeg uticaja na vrednosti entalpije topljenja i kristalizacije ( $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_c$ ), a svakako ne dovodi do njihovog povećanja u odnosu na kontrolne uzorke bez probiotika. Slično se uočava i na osnovu dobijenih vrednosti ostalih termodinamičkih parametara topljenja i kristalizacije ( $T_o$ ,  $T_m$ ,  $T_c$ ,  $T_{end}$ ), zbog čega se nameće

zaključak da dodatak probiotika nema značajnijeg uticaja na termalna svojstva različitih vrsta čokolada, već da uočene razlike potiču od sastava mlečnih i crnih (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokolada, pre svega, njihovog sadržaja masti.

## 5.5. REZULTATI ODREĐIVANJA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA

U cilju utvrđivanja izraženih funkcionalnih svojstava čokolada koja ne potiču samo od probiotskih mikroorganizama, već i od prisutnih polifenolnih jedinjenja, obavljeno je određivanje sadržaja ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola, preciznije ukupnih flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina, u analiziranim čokoladama odmah nakon proizvodnje (0-30 dana), i nakon skladištenja od 90, odnosno 180 dana. Dobijeni rezultati su prikazani u tabelama od 20-22. Radi utvrđivanja eventualnog dejstva dodatih probiotskih bakterija na sadržaj polifenolnih jedinjenja u različitim vrstama čokolada ispitivane su i čokolade bez probiotika koje su služile kao kontrolne.

Sadržaj ukupnih fenola određen je po Folin–Ciocalteu-ovoj metodi i izražen kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu odmašćenog uzorka čokolade. Tokom celokupnog perioda ispitivanja najmanji sadržaj ukupnih fenola utvrđen je kod uzoraka mlečne čokolade bez probiotika (ML) i iznosio je 1.25 mg GAE/g odmašćenog uzorka čokolade neposredno posle proizvodnje (0-30dana), 1.28 mg GAE/g posle 90 dana, odnosno 1.34 mg GAE/g nakon 180 dana skladištenja (tabele 19-21). Najveći sadržaj ukupnih fenola imao je uzorak crne čokolade sa 75 % kakao-delova i inkorporiranom kulturom *B. lactis* HN019 (CB), i to u prvom periodu ispitivanja 9.16 mg GAE/g odmašćenog uzorka čokolade, zatim 8.36 mg GAE/g posle 90 dana i 8.46 mg GAE/g nakon isteka 180 dana od proizvodnje. Sadržaj ukupnih flavonoida u najmanjem iznosu takođe je utvrđen kod uzorka ML i tokom skladištenja je ostao gotovo nepromenjen (0.75-0.74 mg GAE/g odmašćenog uzorka čokolade). Uzorak CB imao je najviše ukupnih flavonoida u periodu od 0-30 dana (7.83 mg GAE/g)(tabela 20) i 90 dana (7.28 mg GAE/g) (tabela 21), dok je u poslednjem periodu ispitivanja najveću udeo ukupnih flavonoida nađen kod uzorka ML3 (7.21 mg GAE/g odmašćenog uzorka čokolade) (tabela 22). Generalno se smatra da sadržaj i ukupnih fenola i ukupnih flavonoida zavisi od



procenta prisutnih (nemasnih) kakao-delova u čokoladi (Cooper i sar., 2008b). Prema tome, čokolade sa manje kakao-delova bi trebalo da imaju manji sadržaj prisutnih fenola i flavonoida, što je u našem istraživanju potvrđeno, imajući u vidu da su u tom pogledu prednjačile crne čokolade sa 75 % kakao-delova, praćene crnim čokoladama sa 44 % kakao-delova, dok su na začelju bile mlečne čokolade. Manje količine ukupnih fenola i flavonoida utvrđene kod mlečnih čokolada u odnosu na crne nesumljivo su rezultat manjeg procenta kakao-delova u njihovom sastavu (27 %), ali takođe mogu biti posledica i veoma kompleksnog sastava ove vrste čokolada u kojima je moguće nastajanje snažnih interakcija između katehina i mlečnih proteina, što se odražava na precizno utvrđivanje katehina (Abbe Malyki i Amin, 2008; Belščak i sar., 2009a).

Tabela 20. Sadržaj ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika neposredno posle proizvodnje (0-30 dana)

| Uzorak | Ukupni fenoli<br>(mg GAE/g<br>odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Ukupni flavonoidi<br>(mg GAE/g<br>odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Flavan-3-oli<br>(mg katehina/g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |                 | Proantocijanidini<br>(mg cijanidin<br>hlorida/g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |
|--------|--|--|---|-----------------|--|
|        |  |  | Vanilin   | <i>p</i> -DAC   |  |
| ML     | 1.25 ± 0.05 a  | 0.75 ± 0.02 a  | 0.23 ± 0.001 a  | 0.16 ± 0.01 a   | 0.11 ± 0.00 a  |
| MLD    | 2.01 ± 0.01 a  | 1.40 ± 0.06 b  | 0.45 ± 0.01 abc   | 0.12 ± 0.00 a   | 0.10 ± 0.01 a  |
| MLB    | 1.35 ± 0.07 a  | 1.12 ± 0.04 ab   | 0.22 ± 0.00 a   | 0.14 ± 0.00 a   | 0.13 ± 0.01 a  |
| MLL3   | 1.74 ± 0.04 a  | 1.00 ± 0.203 ab  | 0.29 ± 0.10 a   | 0.16 ± 0.00 a   | 0.10 ± 0.00 a  |
| M      | 8.15 ± 0.14 j  | 5.90 ± 0.04 gh   | 2.89 ± 0.10 l   | 1.20 ± 0.05 h   | 1.22 ± 0.05 hi   |
| MD     | 4.93 ± 0.18 b  | 3.60 ± 0.12 c  | 2.11 ± 0.07 def   | 0.83 ± 0.03 b   | 0.96 ± 0.04 cde  |
| MB     | 6.86 ± 0.07 ef   | 5.04 ± 0.11 de   | 2.56 ± 0.10 hij   | 1.06 ± 0.03 efg | 1.15 ± 0.05 gh   |
| ML3    | 6.89 ± 0.26 ef   | 5.90 ± 0.11 gh   | 2.13 ± 0.06 efg   | 1.05 ± 0.06 efg | 1.09 ± 0.04 fg   |
| C      | 6.95 ± 0.36 ef   | 5.90 ± 0.25 gh   | 2.34 ± 0.07 fgh   | 0.98 ± 0.08 def | 0.70 ± 0.02 b  |
| CD     | 8.22 ± 0.22 j  | 7.46 ± 0.23 kl   | 3.36 ± 0.06 mn  | 1.89 ± 0.10 i   | 0.90 ± 0.03 cde  |
| CB     | 9.16 ± 0.14 k  | 7.83 ± 0.40 l  | 3.21 ± 0.05 m   | 1.01 ± 0.03 def | 1.27 ± 0.04 i  |
| CL3    | 8.02 ± 0.30 ij   | 7.18 ± 0.31 jk   | 2.89 ± 0.10 l   | 1.13 ± 0.01 gh  | 0.92 ± 0.00 cde  |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Sa analitičkog stanovišta, treba istaći da sadržaj polifenola u čokoladama pre svega zavisi od efikasnosti njihove ekstrakcije koja je uslovljena faktorima poput vrste i stepena zrelosti kakao-zrna korišćenih za dobijanje čokolade, kao i upotrebljenog ekstrakcionog sredstva, odnosno metode ekstrakcije (Arlorio i sar., 2008; Zarić i sar., 2011). Zbog toga je, i pored brojnih podataka objavljenih na ovu temu, teško obaviti poređenja sa rezultatima drugih autora, pogotovo ako se ima u vidu da su načini njihovog prezentovanja u naučnoj

literaturi veoma heterogeni. Bez obzira na sve navedeno, rezultati do kojih smo došli su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom iste metodologije (Belščak *i sar.*, 2009a), i svakako ne odstupaju od trenda utvrđenog od strane drugih istraživača (Vinson *i sar.*, 1999).

U cilju određivanja osnovnih klasa polifenolnih jedinjenja prisutnih u analiziranim uzorcima čokolada primenjene su 3 spektrofotometrijske metode.

Tabela 21. Sadržaj ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika posle 90 dana skladištenja

| Uzorak | Ukupni fenoli<br>(mg GAE/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Ukupni flavonoidi<br>(mg GAE/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Flavan-3-oli<br>(mg katehina/g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |                  | Proantocijanidini<br>(mg cijanidin<br>hlorida/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |
|--------|---|---|---|------------------|--|
|        |   |   | Vanilin   | <i>p</i> -DAC    |  |
| ML     | 1.28 ± 0.06 ij  | 0.74 ± 0.02 a   | 0.29 ± 0.01 a   | 0.15 ± 0.00 a    | 0.11 ± 0.00 a  |
| MLD    | 1.82 ± 0.07 a   | 1.02 ± 0.02 ab  | 0.54 ± 0.01 bc  | 0.13 ± 0.00 a    | 0.10 ± 0.00 a  |
| MLB    | 1.39 ± 0.06 a   | 1.11 ± 0.05 ab  | 0.31 ± 0.02 ab  | 0.15 ± 0.01 a    | 0.13 ± 0.00 a  |
| MLL3   | 1.57 ± 0.06 a   | 0.83 ± 0.02 ab  | 0.30 ± 0.01 ab  | 0.16 ± 0.01 a    | 0.09 ± 0.00 a  |
| M      | 8.26 ± 0.42 j   | 5.81 ± 0.19 gh  | 2.68 ± 0.11 jkl   | 0.93 ± 0.01 bcd  | 1.24 ± 0.06 hi   |
| MD     | 5.43 ± 0.14 bc  | 3.87 ± 0.18 c   | 1.88 ± 0.01 d   | 0.89 ± 0.01 bc   | 0.89 ± 0.06 cd   |
| MB     | 6.48 ± 0.23 de  | 5.58 ± 0.20 efg   | 2.39 ± 0.05 h   | 0.96 ± 0.02 cde  | 0.98 ± 0.02 def  |
| ML3    | 7.13 ± 0.30 efg   | 6.79 ± 0.33 ij  | 2.88 ± 0.10 kl  | 1.02 ± 0.01 defg | 1.01 ± 0.02 ef   |
| C      | 6.56 ± 0.26 def   | 5.14 ± 0.20 def   | 2.64 ± 0.09 ijk   | 0.91 ± 0.05 bcd  | 0.74 ± 0.04 b  |
| CD     | 8.11 ± 0.12 j   | 7.25 ± 0.50 jkl   | 3.63 ± 0.05 o   | 0.93 ± 0.04 bcd  | 0.95 ± 0.04 cde  |
| CB     | 8.36 ± 0.11 j   | 7.28 ± 0.29 jkl   | 3.57 ± 0.05 no  | 1.02 ± 0.07 defg | 1.25 ± 0.005 hi  |
| CL3    | 8.01 ± 0.58 ij  | 6.76 ± 0.29 ij  | 2.36 ± 0.03 gh  | 1.06 ± 0.04 efg  | 0.98 ± 0.04 def  |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Sadržaj flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima čokolada određen je na osnovu reakcije sa vanilinom i sa *p*-dimetilamino-cinamaldehydom (*p*-DAC) i izražen kao miligram katehina po gramu odmašćenog uzorka čokolada, odmah nakon proizvodnje (0-30 dana), i nakon 90, odnosno 180 dana skladištenja, a rezultati su prikazani u tabelama 20-22. Vanilinski indeks/test predstavlja reakciju između vanilina i bočnih hidroksilnih grupa na C-6 i C-8 pozicijama u molekulima flavan-3-ola. Tokom ove reakcije samo krajnje jedinice flavan-3-ola u molekulu polimera reaguju sa vanilinom, pri čemu u prisustvu hlorovodonične kiseline nastaje crveno obojenje, što je u skladu sa oksidativnom razgradnjom proantocijanidina i oslobađanjem antocijanidina (Porter, *i sar.*, 1986).

Tabela 22. Sadržaj ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika posle 180 dana skladištenja

| Uzorak | Ukupni fenoli<br>(mg GAE/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Ukupni flavonoidi<br>(mg GAE/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) | Flavan-3-oli<br>(mg katehina/g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |                  | Proantocijanidini<br>(mg cijanidin<br>hlorida/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade) |
|--------|---|---|---|------------------|--|
|        |   |   | Vanilin   | p-DAC            |  |
| ML     | 1.34 ± 0.08 ij  | 0.74 ± 0.03 a   | 0.31 ± 0.01 ab  | 0.16 ± 0.01 a    | 0.12 ± 0.01 a  |
| MLD    | 1.83 ± 0.09 a   | 1.04 ± 0.07 ab  | 0.62 ± 0.05 c   | 0.16 ± 0.00 a    | 0.10 ± 0.00 a  |
| MLB    | 1.49 ± 0.05 a   | 0.98 ± 0.04 ab  | 0.36 ± 0.03 ab  | 0.16 ± 0.00 a    | 0.15 ± 0.01 a  |
| MLL3   | 1.51 ± 0.00 a   | 0.93 ± 0.03 ab  | 0.32 ± 0.00 ab  | 0.19 ± 0.01 a    | 0.15 ± 0.01 a  |
| M      | 8.20 ± 0.32 j   | 5.76 ± 0.09 fg  | 2.86 ± 0.04 kl  | 0.92 ± 0.04 bcd  | 1.27 ± 0.09 i  |
| MD     | 5.50 ± 0.11 bc  | 4.63 ± 0.12 d   | 1.99 ± 0.03 de  | 0.92 ± 0.03 bcd  | 0.93 ± 0.00 cde  |
| MB     | 7.15 ± 0.14 efgh  | 5.52 ± 0.17 efg   | 2.34 ± 0.13 fgh   | 0.91 ± 0.04 bcd  | 1.00 ± 0.05 def  |
| ML3    | 7.81 ± 0.54 ghij  | 7.21 ± 0.21 jkl   | 2.85 ± 0.20 kl  | 0.96 ± 0.04 cde  | 1.18 ± 0.06 ghi  |
| C      | 6.04 ± 0.23 ghij  | 5.41 ± 0.20 efg   | 2.70 ± 0.08 jkl   | 0.98 ± 0.01 cdef | 0.86 ± 0.03 c  |
| CD     | 7.32 ± 0.46 fghi  | 6.85 ± 0.14 ijk   | 3.53 ± 0.15 no  | 1.09 ± 0.03 fgh  | 1.01 ± 0.05 ef   |
| CB     | 8.46 ± 0.22 jkkk  | 6.70 ± 0.22 ij  | 3.51 ± 0.11 no  | 1.05 ± 0.06 efg  | 1.22 ± 0.04 hi   |
| CL3    | 7.92 ± 0.21 hij   | 6.44 ± 0.20 hi  | 2.40 ± 0.10 hi  | 0.97 ± 0.03 cde  | 1.20 ± 0.01 ghi  |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Sadržaj flavan-3-ola utvrđen vanilinskim testom kod uzoraka mlečnih čokolada iznosio je od 0.22 do 0.45 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade u prvom periodu ispitivanja (tabela 20), odnosno od 0.29 do 0.54 mg katehina/g posle 90 dana (tabela 21), da bi u poslednjem vremenu ispitivanja bio u području od 0.31 do 0.62 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade (tabela 22), a navedene vrednosti predstavljale su najmanji sadržaj flavan-3-ola tokom celokupnog eskperimenta. Kada su u pitanju pojedinačni uzorci mlečnih čokolada najmanji sadržaj su imale kontrolne mlečne čokolade (uzorak ML – u drugom i trećem periodu ispitivanja), odnosno one sa inkorporiranom kulturom *B. lactis* HN019 (MLB – u prvom periodu ispitivanja), a najveći sadržaj je utvrđen kod uzorka sa inkorporiranom kulturom *L. acidophilus* NCFM® (MLD) tokom sva tri perioda ispitivanja. Sledeće po sadržaju flavan-3-ola utvrđenih vanilin testom bile su crne čokolade sa 44 % kakao-delova sa 2.11-2.89 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade (0-30 dana) (tabela 20), 1.88-2.88 mg katehina/g za period nakon 90 dana (tabela 21) i 1.99-2.86 mg katehina/g posle 180 dana (tabela 22), pri čemu je minimalan sadržaj ustanovljen kod uzorka MD u sva tri perioda skladištenja. Crne čokolade sa 75 % kakao-delova su očekivano imale najviši sadržaj flavan-3-ola i to 2.34-3.36 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade odmah

nakon proizvodnje (tabele 19), 2.36-3.63 mg katehina/g posle 90 dana (tabela 21) i 2.40-3.53 mg katehina/g 180. dana (tabela 22), a uzorak CD se isticao najvećom količinom ne samo u grupi crnih, već svih analiziranih uzoraka čokolada.

Sličan trend uočava se i u pogledu sadržaja flavan-3-ola određenih pomoću *p*-DAC reagensa. Drugim rečima, najviše navedenih komponenata je zastupljeno kod crnih čokolada, i to onih sa 75 % kakao-delova (min. uzorak C 90. dan: 0.91; max. uzorak CD 0-30 dana: 1.89 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade) (tabele 20 i 19), praćenih onim sa 44 % kakao-delova (min. uzorak MD 0-30 dana: 0.83; max. uzorak M 0-30 dana: 1.20 mg katehina/g) (tabela 20), dok ih je, i u ovom slučaju, najmanje kod mlečnih čokolada (min. uzorak MLD 0-30 dana: 0.12; max. uzorak MLL3 180. dan. 0.19 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade) (tabele 19 i 21). Dakle, kao i u slučaju vanilin testa, primećeno je opadanje sadržaja flavan-3-ola utvrđenog *p*-DAC reagensom, uporedo sa smanjenjem sadržaja kakao-delova u analiziranim uzorcima čokolada. Međutim, ono što je odmah evidentno jeste da je brojčano sadržaj flavan-3-ola dobijen primenom *p*-DAC-a daleko manji u odnosu na vrednosti vanilinskog testa kod istih uzoraka čokolada. Naime, vanilinski indeks/test je specifičan u uskom opsegu flavan-3-ola (monomera i polimera) uključujući i monomere katehina. Dodatno, ovaj test je osetljiv na upotrebu različitih rastvarača, trajanje reakcije, temperaturu i upotrebljene koncentracije vanilina (*Dalzell i Kerven, 1998; Sun i sar., 1998*). Upravo iz tih razloga kao alternativa vanilinskom testu ispitan je sadržaj flavan-3-ola korišćenjem *p*-dimetilamino-cinamaldehida (*p*-DAC). Na rezultate vanilinskog testa mogu uticati sporedne reakcije zbog njihovog dejstva na razvijanje boje, koja se uobičajeno određuje apsorbancijom svetla na 550 nm. Pored toga, *p*-DAC reagens, kao i vanilin, reaguje sa pojedinim komponentama koje sadrže *meta*-orijentisane benzenove prstene sa dve ili tri hidroksilne grupe. Jedino flavan-3-oli sa slobodnim hidroksilnim grupama u *meta* položaju u A prstenu i jednostrukom vezom između pozicija 2 i 3 mogu da reaguju sa vanilinom. Navedeni strukturalni zahtevi su primenljivi i na reaktivnost sa *p*-dimetilamino-cinamaldehydom. Međutim, *p*-DAC reagens je u stanju da reaguje samo sa hidroksilnom grupom u položaju C-6 u benzenovom prstenu. Usled ovih razlika u strukturi sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima ispitivanih uzoraka čokolada utvrđen pomoću *p*-DAC reagensa je znatno niži od onog dobijenog vanilin testom (tabele 19-21). Nadalje, može se primetiti da su, za razliku od vanilinskog testa, vrednosti dobijene *p*-DAC-om ujednačenije

između vrsta čokolada, kao i u okviru iste vrste sa dodatim različitim probioticima, tako da su kod nekoliko uzoraka uočene identične vrednosti sadržaja flavan-3-ola (npr. uzorci ML3 i CB 90. dana: 1.02 mg katehina/g - tabela 21; uzorci M i MD 180. dan: 0.92 mg katehina/g, te uzorci ML, MLD i MLB 180. dana: 0.16 mg katehina/g odmašćenog uzorka čokolade - tabela 22).

Procijanidini - posebna klasa proantocijanidina, su oligomeri ili polimeri koji se sastoje isključivo od monomera – epikatehina i katehina. Procijanidini predstavljaju osnovne flavonoide kakao-zrna, koja sadrže više ovih komponenata nego borovnice ili brusnice, računato na suhu materiju (*Gu i sar., 2003; Gu i sar., 2006*). Procijanidini najčešće imaju jednostruke ugljenik-ugljenik veze između monomernih podjedinica (tip B). Oni sa dvostrukim vezama postoje i kao tip A. Molekulska težina i veličina oligomernih procijanidina izražava se kao stepen polimerizacije, a oni mogu biti dimeri, trimeri, tetrameri, itd. (*Robbins i sar., 2009*). Dobro je poznato da procijanidini kakaa i čokolade pokazuju viši antioksidativni potencijal od većine monomernih polifenolnih komponenata (*Coumet i Collin, 2003*). Pošto su interflavanoidne veze osetljive na dejstvo kiselina, analitički se određuju kiselinskom hidrolizom u prisustvu alkohola (hlorovodonična kiselina-butanol), pri čemu je crveno obojeni cijanidin jedini produkt njihove hidrolize (*Wollgast i Anklam, 2000a*). Nastalo obojenje proporcionalno je broju mesta rascepa među flavanolnim jedinicama koje čine polimere (*Porter i sar., 1986*). Kod mlečnih čokolada sadržaj proantocijanidina je bio prilično ujednačen tokom čitavog eksperimenta i iznosio je u intervalu od 0.10-0.15 mg cijanidin hlorida/g odmašćenog uzorka čokolade, sa izuzetkom uzorka ML L3 koji je posle 90 dana skladištenja imao 0.09 mg cijanidin hlorida/g, što ujedno predstavlja i najmanji sadržaj ove grupe polifenola utvrđen kod svih ispitivanih uzoraka (tabela 21). Zapaža se da je najviša vrednost procijanidina od 1.27 mg cijanidin hlorida/g odmašćenog uzorka čokolade detektovana kod uzorka crne čokolade sa 75 % kakao-delova (CB) odmah nakon proizvodnje (tabela 20), ali i kod uzorka crne čokolade sa 44 % kakao-delova (M) na samom kraju ispitivanja (tabela 22).

## 5. 6. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Odavno je poznato da čokolada i kakao-proizvodi sadrže visok nivo polifenolnih jedinjenja sa značajnom antioksidativnom aktivnošću. Nedavna istraživanja ukazuju na povezanost navedenih svojstava sa kratkoročnim i dugoročnim benefitima po zdravlje ljudi, uključujući i smanjenje oksidacije LDL holesterola i agregacije trombocita, povećanje arterijskog protoka krvi i snižavanje krvnog pritiska (*Hooper i sar., 2008; Stahl i sar., 2009*), što je uticalo na povećan naučni iteres za utvrđivanje antioksidativnog kapaciteta ovih, ali i drugih proizvoda biljnog porekla. Međutim, kako u kompleksnim biološkim sistemima može postojati nekoliko izvora antioksidanasa i mnogo izvora slobodnih radikala i kiseonika, a uobičajeno se dešavaju mnogobrojne reakcije sa različitim karakteristikama i mehanizmima, nijednim pojedinačnim testom se ne mogu obuhvatiti svi izvori radikala ili svi antioksidansi, zbog čega ne postoji jedinstven metod kojim se antioksidativni kapacitet može kvantitativno i precizno izmeriti (*Prior i sar., 2005*). Usled nedostatka standardizovane metode za utvrđivanje antioksidativnog kapaciteta određene vrste hrane preporučljivo je korišćenje više metoda (*Belščak i sar., 2009a*). Imajući u vidu da različite metode za određivanje antioksidativnosti daju drugačiji redosled rangiranja antioksidativnog kapaciteta usled nejednakih eksperimentalnih uslova (*Cervellati i sar., 2008*), u ovom eksperimentu smo se odlučili za upotrebu tri metode kako bismo dobili što realniju procenu antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka čokolada sa i bez probiotika.

Pored navedenog, u cilju potpunijeg sagledavanja ukupnog AO kapaciteta obavljeno je utvrđivanje oksidativne stabilnosti masti ekstrahovanih iz analiziranih uzoraka čokolada sa probioticima, kao i kontrolnih čokolada, metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.

### 5.6.1. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti primenom FRAP i ABTS metoda

Antioksidans može biti definisan kao supstanca koja u malim koncentracijama značajno odlaže ili inhibira oksidaciju nekog supstrata. Antioksidansi se mogu podeliti u dve grupe: primarne, koji prekidaju lančane rakcije (reaguju sa radikalima i sprečavaju

nastanak ili dalje odvijanje ovih reakcija) i sekundarne (koji usporavaju brzinu oksidacije) (Apak i sar., 2007).

Metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta se klasifikuju kao testovi zasnovani na transferu atoma vodonika i oni bazirani na transferu elektorna (Huang i sar., 2005). U ovom radu primenjeno je nekoliko elektron-transfer testova (Folin-Ciocalteu, FRAP i ABTS) zasnovanih na merenju kapaciteta antioksidansa da redukuje oksidirajući agens, koji prilikom redukcije menja boju. Stepem promene boje (bilo povećanje ili smanjenje apsorbance na određenoj talasnoj dužini) je u korelaciji sa koncentracijom antioksidansa u uzorku. Svaka od ovih metoda podrazumeva upotrebu drugačijeg hromogenog redoks reagensa sa različitim standardnim potencijalima (Apak i sar., 2007).

Benzje i Strain (1996) su definisali FRAP metodu kao “fero redukujuću/antioksidativnu moć”, koja meri potencijal određenog antioksidansa da redukuje feri tripiridiltiazin ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) kompleks i formira obojeni fero tripiridiltiazin ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ).

Slično Folin–Ciocalteu-ovoj metodi za određivanje ukupnih fenola, i FRAP metoda spada u testove koji se baziraju na transferu elektrona (Huang i sar., 2005), kao i na pretpostavci da redukujući kapacitet uzorka predstavlja direktnu meru njegovog antioksidativnog kapaciteta.

Kao što se iz dobijenih rezultata može videti (tabela 23) antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom i izražen kao  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$  odmašćenog uzorka čokolade je kod obe vrste crnih čokolada bio je u području od 25.37 (za uzorak C posle 90 dana skladištenja), do 48.81 kod uzorka CD posle 180 dana skladištenja), odnosno od 27.51 (za uzorak M odmah nakon proizvodnje), do 44.35  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$  odmašćenog uzorka čokolade (kod uzorka MD nakon 180 dana od početka ispitivanja).

Nasuprot crnim čokoladama, mlečne su ispoljile znatno manji antioksidativni kapacitet sa minimalnom vrednošću utvrđenom kod uzorka ML L3 od 3.14 tokom prvih mesec dana, i maksimalnom od 5.58  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$  odmašćenog uzorka čokolade određenom kod uzorka MLB na kraju ispitivanja.

Tabela 23. Antioksidativni kapacitet uzoraka čokolada sa i bez probiotika određen FRAP i ABTS metodama tokom skladištenja od 180 dana

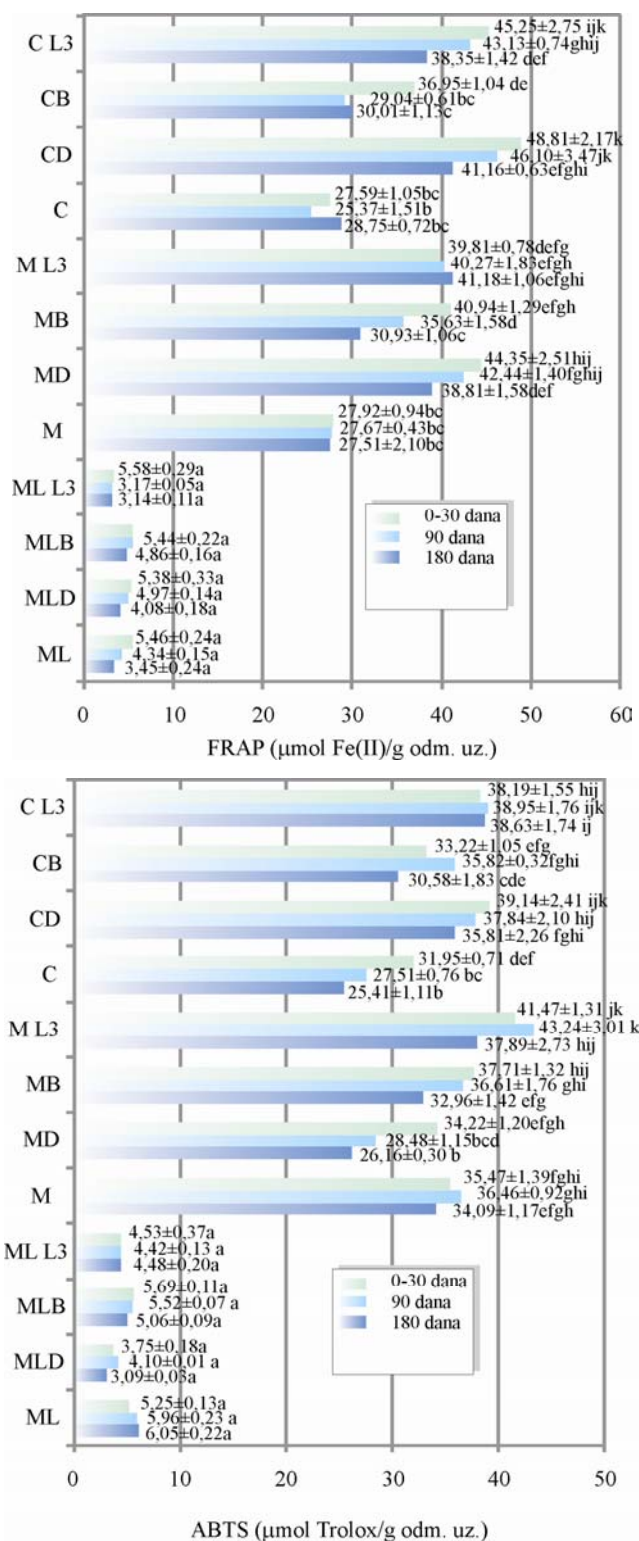
| Uzorak | Vreme skladištenja (dani)                                 |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|
|        | 0-30  |   | 90  |   | 180   |   |
|        | FRAP<br>[μmol Fe(II)/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] | ABTS<br>[μmol Trolox/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] | FRAP<br>[μmol Fe(II)/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] | ABTS<br>[μmol Trolox/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] | FRAP<br>[μmol Fe(II)/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] | ABTS<br>[μmol Trolox/<br>g odmašćenog<br>uzorka čokolade] |
| ML     | 3.45 ± 0.26 a   | 6.05 ± 0.22 a   | 4.34 ± 0.15 a   | 5.96 ± 0.23 a   | 5.46 ± 0.24 a   | 5.25 ± 0.24 a   |
| MLD    | 4.08 ± 0.18 a   | 3.09 ± 0.03 a   | 4.97 ± 0.14 a   | 4.10 ± 0.01 a   | 5.38 ± 0.33 a   | 3.75 ± 1.18 a   |
| MLB    | 4.86 ± 0.16 a   | 5.06 ± 0.09 a   | 5.44 ± 0.22 a   | 5.52 ± 0.07 a   | 5.58 ± 0.29 a   | 5.69 ± 0.11 a   |
| MLL3   | 3.14 ± 0.11 a   | 4.48 ± 0.20 a   | 3.17 ± 0.05 a   | 4.42 ± 0.13 a   | 3.45 ± 0.09 a   | 4.53 ± 0.37 a   |
| M      | 27.51 ± 2.10 bc   | 34.09 ± 1.17 efgh   | 27.67 ± 0.43 bc   | 36.46 ± 0.92 ghi  | 27.92 ± 0.94 bc   | 35.47 ± 1.39 fghi   |
| MD     | 38.81 ± 1.58 def  | 26.16 ± 0.30 b  | 42.44 ± 1.40 fghij  | 28.48 ± 1.15 bcd  | 44.35 ± 2.51 hij  | 34.22 ± 1.20 efgh   |
| MB     | 30.93 ± 1.06 c  | 32.96 ± 1.42 efg  | 35.63 ± 1.58 d  | 36.61 ± 1.76 ghi  | 40.94 ± 1.29 efgh   | 37.71 ± 1.32 hij  |
| ML3    | 41.18 ± 1.06 efghi  | 37.89 ± 2.73 hij  | 40.27 ± 1.83 efgh   | 43.24 ± 3.01 k  | 39.81 ± 0.78 defg   | 41.47 ± 1.31 jk   |
| C      | 28.75 ± 0.72 bc   | 25.41 ± 1.11 b  | 25.37 ± 1.51 b  | 27.51 ± 0.67 bc   | 27.59 ± 1.05 bc   | 31.95 ± 0.71 def  |
| CD     | 41.16 ± 0.63 efghi  | 35.81 ± 2.26 fghi   | 46.10 ± 3.47 jk   | 37.84 ± 2.10 hij  | 48.81 ± 2.17 k  | 39.14 ± 2.41 ijk  |
| CB     | 30.01 ± 1.13 c  | 30.58 ± 1.83 cde  | 29.04 ± 0.61 bc   | 35.82 ± 0.32 fghi   | 36.95 ± 1.04 de   | 33.22 ± 1.05 efg  |
| CL3    | 38.35 ± 0.43 def  | 38.63 ± 1.74 ij   | 43.13 ± 0.74 ghij   | 38.95 ± 1.76 ijk  | 45.25 ± 2.75 ijk  | 38.19 ± 1.55 hij  |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Opadajući redosled antioksidativnog kapaciteta ekstrakata čokolada određenog FRAP metodom prati sadržja ukupnih fenola određenih primenom Folin–Ciocalteu testa: crne čokolade sa 75 % kakao-delova > crne čokolade sa 44 % kakao-delova > mlečne čokolade. Ovakvi rezultati su takođe potvrđeni visokim koeficijentom korelacije dobijenim za dve pomenute metode ( $r = 0.921$ , tabela 26). Rezultati oba testa ukazuju da crne čokolade sa 75 % kakao-delova poseduju najveći redukujući kapacitet. U tabeli 22 (i na grafiku 42) takođe su prikazani i rezultati ABTS testa metanolnih ekstrakata analiziranih uzoraka čokolada izraženi kao μmol Trolox/g odmašćenog uzorka čokolade. Osim jednostavnosti, reproduktivnosti i raznolikosti, osnovna prednost ove metode je mogućnost određivanja i hidrofилnih i lipofilnih antioksidanasa, pošto je reagens rastvorljiv kako u vodenim, tako i u rastvorima organskih rastvarača, za razliku od Folin-ove i FRAP metode kojima se određuju samo hidrofилni antioksidansi (Prior i sar., 2005; Apak i sar., 2007).





Grafik 42. Antioksidativni kapacitet uzoraka čokolada sa i bez probiotika određen FRAP i ABTS metodama tokom skladištenja od 180 dana

Slično rezultatima dobijenim primenom FRAP metode, mlečne čokolade su ispoljile najmanju efikasnost u “gašenju” ABTS radikala (min. uzorak MLD 3.09, max. uzorak ML 6.05  $\mu\text{mol Trolox/g}$  odmašćenog uzorka čokolade u prvom vremenu ispitivanja, dok su u ostalim periodima vrednosti bile između navedenih). Crne čokolade su imale znatno veće vrednosti antioksidativnog kapaciteta određenog ABTS metodom u odnosu na mlečne, ali su među njima razlike bile manje uočljive. Tako, minimalne detektovane vrednosti kod obe vrste crnih čokolada bile su u prvom periodu ispitivanja i iznosile su 25.41 kod uzorka C (75 % kakao-delova), tj. 26.16  $\mu\text{mol Trolox/g}$  odmašćenog uzorka čokolade kod uzorka MD (44 % kakao-delova). Zanimljivo je da je najveću AO aktivnost od 43.24  $\mu\text{mol Trolox/g}$  odmašćenog uzorka čokolade pokazao uzorak crnih čokolada sa 44 % kakao-delova ML3 posle 90 dana skladištenja, što je bilo više i od najviše vrednosti utvrđene kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova kod uzorka CD na kraju ispitivanja (39.14  $\mu\text{mol Trolox/g}$  odmašćenog uzorka čokolade).

### 5.6.2. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti primenom polarografske metode (HPS)

Za merenje antioksidativne aktivnosti ekstrakta čokolade pored standardnih antioksidativnih metoda korišćena je i metoda zasnovana na klasičnoj polarografiji sa kapljućom Hg-elektrodom (KŽE). Ova metoda je nedavno razvijena u Elektrohemijskoj laboratoriji Instituta za opštu i fizičku hemiju (*Sušnjević i sar., 2011*).

U oblasti potencijala anodnog rastvaranja žive u prisustvu hidroksilnog i perhidroksilnog jona umesto karakterističnog polarografskog talasa (Slika 24b, *Mat. i metoda rada*) javlja se strujni pik. S obzirom da u alkalnim uslovima dolazi do nastanka perhidroksil jona, pretpostavljeno je formiranje mešovitog kompleks  $[\text{Hg}(\text{O}_2\text{H})(\text{OH})]$  koji daje pomenuti pik.

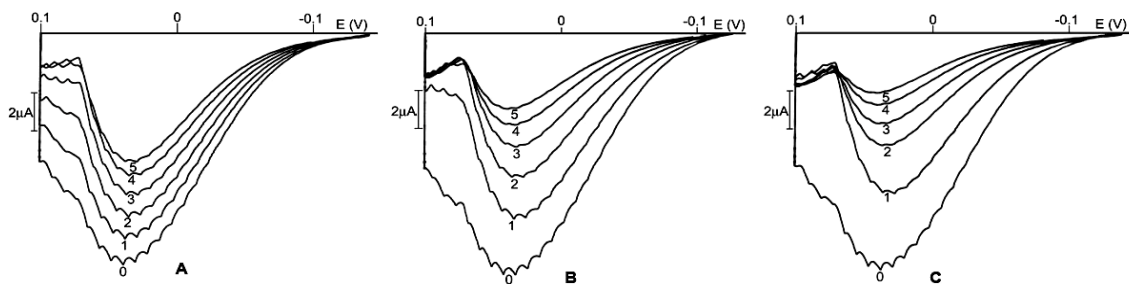
Metoda je bazirana na pojavi smanjenja anodne struje kompleksa žive(II) sa  $\text{OH}^-$  i  $\text{HOO}^-$  hidroksilnim i perhidroksilnim jonom, koji nastaje u alkalnom rastvoru vodonik peroksida, u prisustvu antioksidanasa.

Osetljivost ispitivanog anodnog pika kompleksa žive na prisustvo antioksidanasa je iskorišćena u smislu razvoja jednostavne, brze, reproduktivne i jeftine metode za određivanje antioksidativne aktivnosti. Razvoj i optimizacija metode su detaljno opisani u radu koji je nedavno publikovan (*Sušnjević i sar., 2011*). Određene su osnovne karakteristike pomentog pika, važne za primenu u analitičke svrhe, tj. optimalni eksperimentalni uslovi (temperatura, pH i koncentracija vodonik peroksida). Reprodutivnost merenja je zadovoljavajuća. Relativna standardna devijacija 33 puta uzastopno snimljenje i-E krive 5 mmolL<sup>-1</sup> vodonik peroksida u radnom puferu je 1.16 %. Prisustvo individualnih fenolnih jedinjenja, ili kompleksnih uzoraka sa odgovarajućom AO aktivnošću, izaziva smanjenje visine granične struje anodnog talasa i to proporcionalno aktivnosti ispitivanih uzoraka. Što je aktivnost uzorka veća, ovo smanjenje je izraženije. Uzorci se dodaju u nekoliko uzastopnih alikvota čija se optimalna zapremina ustanovi preliminarnim merenjem. Mutni i obojeni uzorci se mogu direktno, bez prethodne pripreme, uneti u elektrohemijsku ćeliju. Procedura je veoma jednostavna a merenja su brza, što su, uz činjenicu da metoda ne zahteva skupu instrumentaciju niti hemikalije, značajne prednosti u odnosu na klasične spektrofotometrijske metode koje se široko primenjuju.

Rezultati su do sada izražavani na nekoliko načina (*Sušnjević i sar., 2011, Gorjanović i sar., 2010a,b,c*). Nagib linearnog dela krive zavisnosti procenta smanjenja struje peroksida od zapremine dodatka je ustanovljen kao najpouzdanija mera antioksidativne aktivnosti. Za razliku od količine uzorka koja izaziva smanjenje struje za 50 % (EC<sub>50</sub>), preko nagiba se mogu izraziti aktivnosti ne samo jakih antioksidanasa već i veoma slabih, tj. onih koji ne izazivaju odgovarajuće smanjenje struje peroksida. Za razliku od većine antioksidativnih metoda kod kojih se aktivnost izražava poređenjem sa standardom (najčešće je to u vodi rastvoran analog vitamina E) ova metoda je apsolutna, tj. ne zahteva upotrebu internog standarda. Postojeće metode za određivanje AO aktivnosti najčešće koriste nefiziološke, veštačke radikalske vrste dok se u polarografskoj metodi primenjuje vodonik peroksid, tj. reaktivna kiseonična vrsta prisutna u ćeliji. Izražavanje aktivnosti preko njegovog smanjenja svakako daje značajniji uvid u aktivnost koju bi ispitivani uzorci mogli imati *in vivo* od metoda zasnovanih na veštačkim radikalskim vrstama koje ne postoje u prirodi. Pored toga, određivanje AO aktivnosti preko neradikalske kiseonične vrste, kao što je vodonik peroksid, je neuporedivo jednostavnije od rada sa kratkoživućim radikalskim kiseoničnim vrstama.

Polarografska metoda je do sada upotrebljena za određivanje aktivnosti različitih klasa fenolnih jedinjenja. Proučavan je odnos strukture i antioksidativne aktivnosti nekih fenolnih jedinjenja, kao što je npr. niz benzoevih kiselina i njihovih cimetnih analoga (Sužnjević i sar., 2011). Takođe, ova metoda je upotrebljena za merenje aktivnosti alkoholnih pića, kao što su komercijalna i specijalna (biljna) piva (Gorjanović i sar., 2010a), crna i bela vina (Gorjanović i sar., 2010b), jaka alkoholna pića (Gorjanović i sar., 2010c), ekstrakti maline (Novaković i sar., 2011) i ekstrakti hladno ceđenog bundevinog ulja (Gorjanović i sar., 2011). Procesi proizvodnje sladovine i piva, starenja rakije i sušenja maline, tj. promene antioksidativne aktivnosti do kojih dolazi tokom istih, su uspešno praćeni (Gorjanović i sar., 2010a,c; Novaković i sar., 2011). Metoda je primenjena i na drugim kompleksnim uzorcima, kao što su ekstrakti ulja semenki grožđa koji su dobijeni različitim tehnološkim postupcima, propolis i med, čajevi i biljne infuzije, kao i na različitim čistim jedinjenjima (izolovanim i sintetisanim). Dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima spektrofotometrijskih antioksidativnih metoda kao što su DPPH, ABTS, FRAP i ORAC. Pored visokih korelacija sa standardnim metodama, antioksidativna aktivnost kompleksnih uzoraka određena polarografskom metodom korelira sa ukupnim sadržajem fenola što potvrđuje validnost metode. U ovom doktorskom radu metoda je po prvi put primenjena na kakao-proizvode, budući da ekstrakti čokolada do sada nisu ispitivani polarografskom metodom.

Metanolni ekstrakti mlečnih i crnih (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokolada su dodavani u rastvor 5.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u radom CL puferu, u alikvotima od po 100 µl. Polarogrami dobijeni snimanjem rastvora peroksida pre i posle uzastopnog dodavanja ekstrakata su prikazanih na grafiku 43. Iz prikazanih polarograma se vidi da visina početne granične struje 5.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroksida  $i_1$  ( $i_{i_0}$ ) opada sa svakim dodatkom uzorka. Smanjenje osnovnog pika peroksida je najveće u slučaju crnih čokolada sa 75 % kakao-delova koje imaju i najveći procenat kakao-mase, tj. najveći sadržaj fenolnih jedinjenja. U slučaju mlečnih čokolada ovo smanjenje je najmanje, što je bilo očekivano jer one sadrže najmanji procenat kakao-delova.

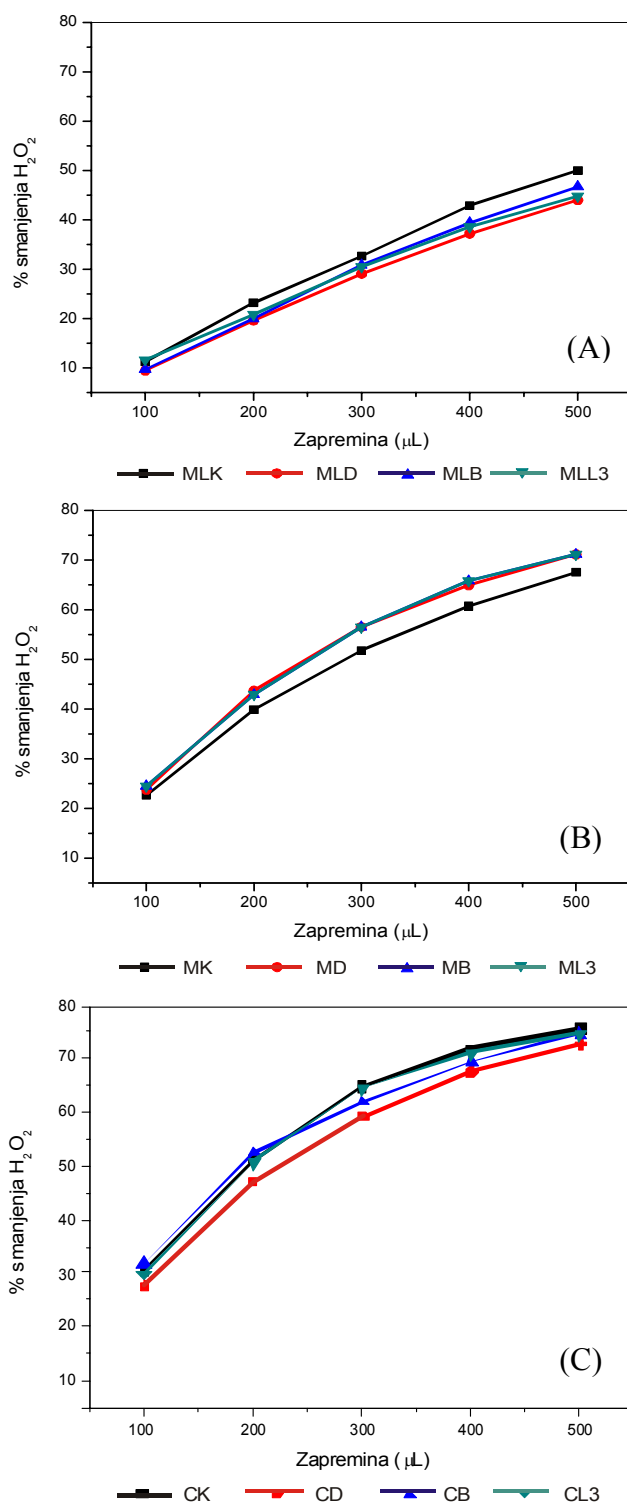


Grafik 43. Polarogrami osnovne struje vodonik peroksida ( $i_0$ ), pre (0) i po dodatku 5 alikvota od po 100  $\mu$ l (1,2,3,4,5) ekstrakta mlečnih čokolada (A), crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (B) i crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (C)

Granična struja 5.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  peroksida  $i_0$  je poređena sa visinom struje dobijenom po svakom dodatku  $i_p$ . Zavisnost procenta smanjenja granične struje od zapremine dodatih ekstrakata je data grafičkim prikazom (grafik 44).

U slučaju mlečnih čokolada zavisnost je linearna u celom opsegu dodatih zapremina uzorka, dok u slučaju crnih čokolada sa 44 % kakao-delova, a naročito crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, pri većim zapreminama uzorka dolazi do odstupanja od linearnosti. Merenja za crne čokolade su ponovljena. Dodavani su alikvoti od po 50  $\mu$ l. Na ovaj način dobijeni polarogrami nisu prikazani u ovom radu. Iako polarogrami prikazani na grafiku 43 nisu korišćeni za izračunavanje aktivnosti, zajedno sa pripadajućim grafcima zavisnosti (44: A, B i C), izabrani su kao ilustrativniji jer omogućavaju da se razlika u aktivnosti ispitivanih uzoraka lakše uoči. Takođe, dodacima većih zapremina dostiže se plato zavisnosti što pruža jasniji uvid u neophodnost pravilne procene zapremine alikvota ispitivanog uzorka.

Merenja su obavljena neposredno posle završetka proizvodnog procesa. Posle 90 i 180 dana stajanja u optimalnim uslovima, uzorci čokolada su ekstrahovani na isti način i merenja su ponovljena, tj. praćena je vremenska zavisnost antioksidativne aktivnosti. Aktivnost svih analiziranih uzoraka čokolada je izražena kao nagib linearnog dela pomenute zavisnosti. Rezultati određivanja su prikazani u tabeli 23 u kojoj je pored nagiba (B), dat i odsečak na ordinati (A) i koeficijent linearnosti (R).



Grafik 44. Procenat smanjenja polarografske struje vodonik peroksida u zavisnosti od dodate zapremine ekstrakta mlečnih čokolada (A), crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (B) i crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (C)

Vidi se da se mlečne, crne sa 44 % kakao-delova i crne čokolade sa 75 % kakao-delova veoma razlikuju u antioksidativnoj aktivnosti. Aktivnost mlečnih čokolada je najniža i iznosi od 0.9 do 0.11 %/ $\mu$ l. Crne čokolade sa 44 % kakao-delova pokazuju približno dvostruko veću aktivnost (0.22 do 0.28 %/ $\mu$ l) dok je aktivnost crnih čokolada sa 75 % kakao-delova gotovo tri puta veća od aktivnosti mlečnih (0.31 do 0.36 %/ $\mu$ l). Ovako velika razlika je očekivana. Antioksidativna aktivnost čokolade zavisi od udela kakao-delova, tj. prisustva fenolnih jedinjenja koji su nosioci antioksidativne aktivnosti. Ono što se može zapaziti jeste i da nema razlike unutar iste vrste čokolade bez obzira na dodate probiotike. Aktivnost čokolada sa dodatim probioticima se ne razlikuje od kontrole. Kulture probiotika koje su dodavane u čokolade različitog sastava očigledno nemaju značajnog uticaja na antioksidativnu aktivnost. Ovo zapažanje je potvrđeno i praćenjem AO aktivnosti tokom skladištenja. Nije uočena vremenska zavisnost antioksidativne aktivnosti mlečnih i crnih čokolada (sa 44 % i 75% kakao-delova), što se poklapa sa rezultatima drugih autora (*Hurst i sar., 2009*). Takođe, ni uzorci sa probioticima ne menjaju svoju antioksidativnu aktivnost tokom stajanja. Drugim rečima, antioksidativna aktivnost svih uzoraka, kako kontrolnih, tako i onih sa probioticima, merena neposredno po završetku proizvodnog procesa, ne razlikuje se od one utvrđene kod uzoraka koji su stajali u odgovarajućim uslovima 90, odnosno 180 dana.

Tabela 24. Antioksidativna aktivnost ekstrakta različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika neposredno nakon proizvodnje i posle skladištenja od 90 i 180 dana izražena kako nagib linernog dela zavisnosti procenta smanjenja polarografske anodne struje vodonik peroksida od zapremine uzorka (B)

| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) |               |        |               |                |        |                |               |        |
|--------|---------------------------|---------------|--------|---------------|----------------|--------|----------------|---------------|--------|
|        | 0-30                      |               |        | 90            |                |        | 180            |               |        |
|        | A (%)                     | B (%/μl)      | R      | A (%)         | B (%/μl)       | R      | A (%)          | B (%/μl)      | R      |
| ML     | 1.38±0.09 o               | 0.10±0.01 a   | 0.9963 | 0.59±0.02 ef  | 0.10±0.00 a    | 0.9961 | -0.09±0.01 c   | 0.10±0.01 a   | 0.9992 |
| MLD    | 0.91± 0.02 jkl            | 0.10±0.01 a   | 0.9987 | -1.23±0.01 a  | 0.09±0.00 a    | 0.9969 | -0.26±0.01 b   | 0.11±0.00 a   | 0.9941 |
| MLB    | 0.63± 0.01 efg            | 0.10±0.00 a   | 0.9982 | 0.00±0.00 cd  | 0.10±0.00 a    | 0.9986 | 0.52±0.01 e    | 0.10±0.01 a   | 0.9967 |
| MLL3   | 1.94±0.06 r               | 0.10±0.00 a   | 0.9966 | 0.78±0.04 hi  | 0.10±0.00 a    | 0.9984 | 2.38±0.04 t    | 0.10±0.00 a   | 0.9936 |
| M      | 0.98± 0.05 klm            | 0.24±0.01 bcd | 0.9971 | 1.36±0.03 o   | 0.27±0.01 de   | 0.9961 | -0.35±0.02 b   | 0.26±0.01 cde | 0.9959 |
| MD     | 0.65± 0.03 fg             | 0.22±0.01 b   | 0.9977 | 1.09±0.00 mn  | 0.27±0.01 de   | 0.9965 | 0.12±0.01 d    | 0.23±0.01 bc  | 0.9975 |
| MB     | 0.78± 0.03 hi             | 0.23±0.01 bc  | 0.9980 | -0.33±0.02 b  | 0.28±0.00 ef   | 0.9939 | 0.75±0.03 ghi  | 0.24±0.01 bcd | 0.9959 |
| ML3    | 1.02± 0.03 lmn            | 0.23±0.01 bc  | 0.9956 | 0.87±0.04 ijk | 0.25±0.01 bcde | 0.9899 | 1.04±0.05 mn   | 0.24±0.01 bcd | 0.9950 |
| C      | 1.67± 0.08 q              | 0.36±0.00 h   | 0.9937 | 0.81±0.03 hij | 0.35±0.02 h    | 0.9968 | -0.04±0.00 c   | 0.34±0.02 gh  | 0.9993 |
| CD     | 1.35± 0.06 o              | 0.34±0.01 gh  | 0.9951 | 1.94±0.04 r   | 0.31±0.01 fg   | 0.9946 | 1.11±0.03 n    | 0.35±0.02 h   | 0.9970 |
| CB     | 1.78±0.05 q               | 0.36±0.02 h   | 0.9932 | 0.69±0.02 fgh | 0.35±0.02 h    | 0.9989 | 0.91± 0.03 jkl | 0.35±0.01 h   | 0.9986 |
| CL3    | 1.53± 0.06 p              | 0.35±0.01 h   | 0.9946 | 0.59±0.01 ef  | 0.33±0.01 gh   | 0.9960 | 2.12±0.07 s    | 0.34±0.02 gh  | 0.9984 |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .



### 5.6.3. Rezultati određivanja indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) metodom DSC

Kakao-maslac se, generalno, karakteriše dobrom održivošću, što je uslovljeno sastavom masnih kiselina, strukturom triglicerida, ali i prisustvom prirodnih antioksidanasa (Gavrilović, 2003). Međutim, pod određenim uslovima (u dodiru sa vodom, vazdušnim kiseonikom, alkalnim solima, pod dejstvom sunčeve svetlosti ili povišene temperature) javljaju se nepoželjne promene izazvane hemijskim reakcijama (autooksidacija, termooksidacija, reverzija), enzimskom i mikrobiološkom aktivnošću (hidrolitička razgradnja ili  $\beta$ -ketooksidacija), što za posledicu ima pogoršanje senzornih svojstava (pre svega mirisa i ukusa) masti, i na kraju dovodi do kvarenja samog proizvoda. Jedinjenja koja nastaju tokom kvarenja masti su štetna po zdravlje ljudi.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) kao instrumentalna metoda analize, može se koristiti pri ispitivanju oksidacione stabilnosti masti, jer se njome može utvrditi vreme do početka oksidativnih promena na mastima (OIT), kao i temperatura početka oksidacije (OOT). U odnosu na standardne hemijske analize, DSC instrumentalna analiza ima prednost, budući da se obavlja bez upotrebe hemikalija, na maloj količini uzorka, a rezultati se postižu u kratkom vremenskom periodu (Sadadinović i sar., 2005). Oksidativna stabilnost masti iz čokolada je u direktnoj vezi sa sadržajem komponenata koje deluju kao antioksidansi.

U tabeli 25 prikazane su vrednosti indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) masti ekstrahovanih iz uzoraka različitih vrsta čokolade sa i bez probiotika tokom skladištenja od 180 dana.

Tabela 25. Vrednosti indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) masti ekstrahovanih iz uzoraka različitih vrsta čokolade sa i bez probiotika tokom skladištenja od 180 dana

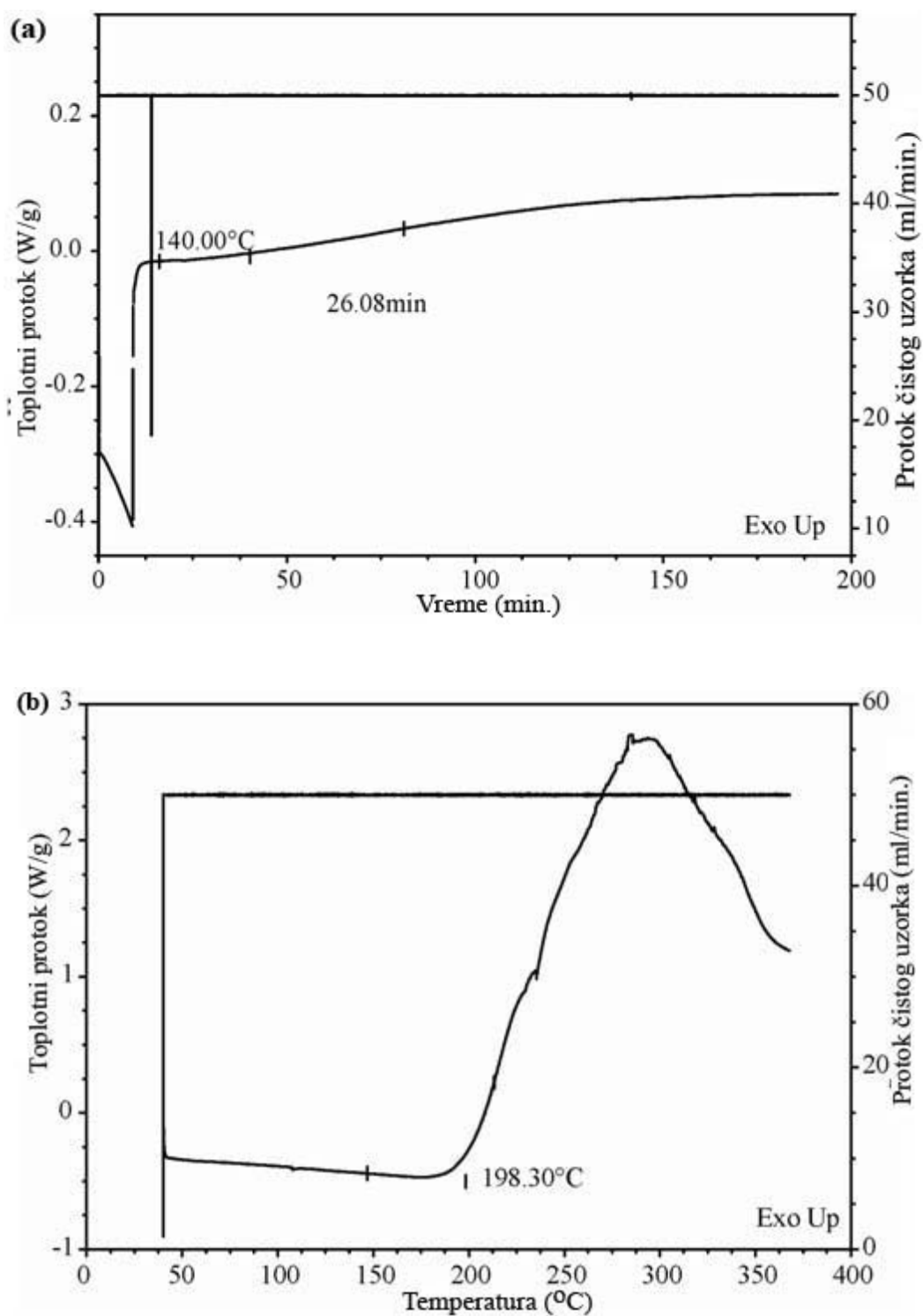
| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) |                       |                 |                       |                |                       |
|--------|---------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
|        | 0-30                      |                       | 90              |                       | 180            |                       |
|        | OIT<br>(min)              | OOT<br>(°C)           | OIT<br>(min)    | OOT<br>(°C)           | OIT<br>(min)   | OOT<br>(°C)           |
| ML     | 30.60±0.43 ab             | 201.90±12.03 abcdefgh | 31.30±0.81 ab   | 206.70±13.40 abcdefgh | 32.80±0.76 ab  | 190.90±4.40 abcde     |
| MLD    | 59.30±0.46 c              | 205.70±5.28 abcdefgh  | 53.70±2.36 bc   | 186.30±13.03 ab       | 54.00±3.05 bc  | 187.30±5.83 abc       |
| MLB    | 26.10±0.68 a              | 198.30±5.34 abcdefg   | 26.90±0.69 a    | 204.20±3.91 abcdefgh  | 28.80±1.69 a   | 200.30±10.46 abcdefgh |
| MLL3   | 34.10±1.02 ab             | 210.80±3.23 abcdefgh  | 30.80±0.88 ab   | 190.20±7.80 abcd      | 29.60±0.80 a   | 207.60±12.79 abcdefgh |
| M      | 142.40±6.66 d             | 219.70±4.66 defghij   | 140.00±9.32 d   | 207.40±6.10 abcdefgh  | 136.80±3.67 d  | 216.40±3.60 bcdefghi  |
| MD     | 137.00±4.33 d             | 218.90±7.24 defghij   | 136.50±7.06 d   | 216.00±9.82 bcdefghi  | 132.90±9.28 d  | 194.90±6.35 abcdef    |
| MB     | 153.30±2.84 d             | 216.90±9.10 cdefghi   | 131.20±6.10 d   | 198.00±9.30 abcdefg   | 133.90±4.58 d  | 218.90±17.91 defghij  |
| ML3    | 137.70±10.22 d            | 210.20±5.36 abcdefgh  | 137.50±5.33 d   | 210.00±9.26 abcdefgh  | 133.00±5.99 d  | 182.90±6.98 a         |
| C      | 256.20±9.27 fg            | 220.70±6.92 efghij    | 259.70±10.68 fg | 223.70±6.69 fghij     | 257.80±8.62 fg | 222.00±11.36 fghij    |
| CD     | 259.80±12.11 fg           | 221.70±2.67 fghij     | 286.10±13.13 hi | 244.20±8.73 ij        | 289.80±9.10 i  | 247.30±8.70 j         |
| CB     | 227.90±9.16 e             | 220.30±9.69 defghij   | 215.30±9.94 e   | 208.10±5.28 abcdefgh  | 237.50±4.42 ef | 229.60±6.02 hij       |
| CL3    | 254.60±3.29 fg            | 219.70±14.02 defghij  | 263.50±15.43 gh | 227.40±8.80 ghij      | 288.60±12.89 i | 249.00±19.73 j        |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolade sa i bez dodatih probiotika;

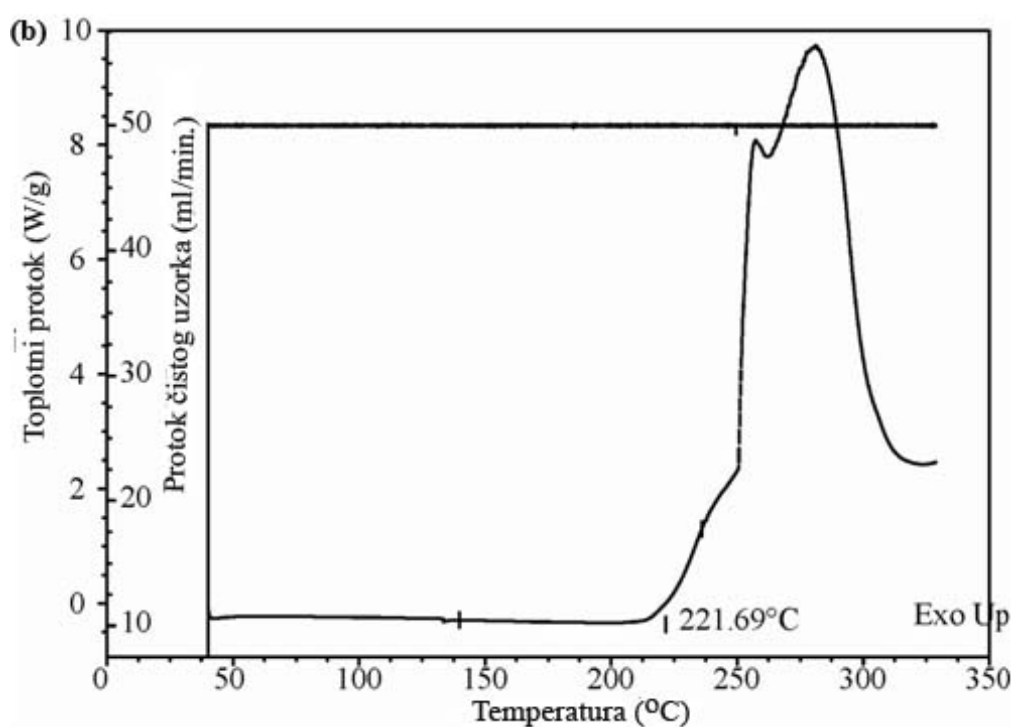
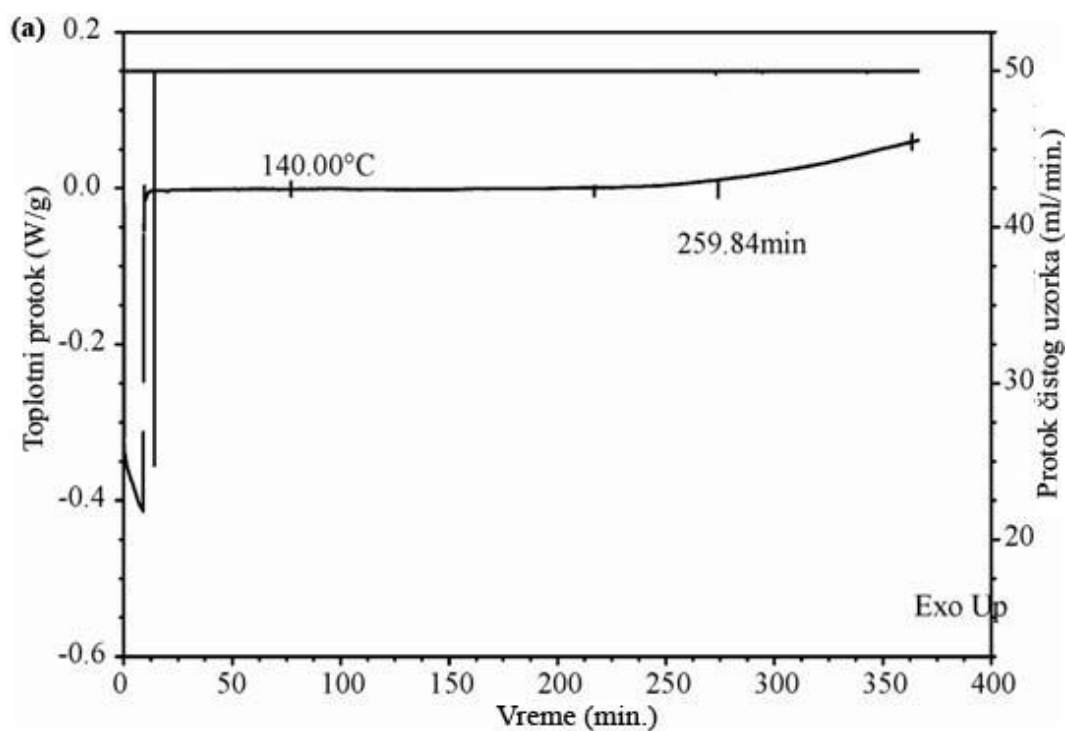
\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Iz prikazanih rezultata je uočljivo da su kod mlečnih čokolada dobijene najniže vrednosti, kako za indukciono vreme oksidacije (26.10-59.30 min), tako i za temperaturu početka oksidacije (186.30-210.80°C). Dalje po utvrđenim vrednostima navedenih veličina slede crne čokolade sa 44 % kakao-delova (131.20-153.30 min i 194.90-219.70°C), a najviše vremena do početka oksidacije potrebno je crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova (215.3-289.8 min), kod kojih takođe oksidacija počinje na najvišim temperaturama (208.1-249.0°C). To znači da crne čokolade sa 44 % kakao-delova imaju u proseku 4 puta duže indukciono vreme oksidacije u odnosu na mlečne, ali nešto iznad 1.5 put kraće OIT u poređenju sa crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova. Mast ekstrahovana iz crnih čokolada sa najviše kakao-delova odoleće oksidacionim promenama u proseku čak 6.5 puta duže od masti iz mlečnih čokolada. Iako su razlike u vrednostima temperature početka oksidacije između analiziranih čokolada manje izražene, ipak je evidentno da se sa povećanjem udela kakao-delova povećava i temperatura na kojoj otpočinju oksidacione promene. Dodatak probiotskih kultura nije imao značajnijeg uticaj na oksidativnu stabilnost masti u okviru iste vrste čokolada.

Više temperature početka oksidacije dobijene na DSC termogramima, kao i duže indukciono vreme oksidacije, znače veću oksidacionu stabilnost masti, što ukazuje na prisustvo antioksidanasa koji usporavaju oksidacione procese. Imajući u vidu da bi prikazivanje svih dobijenih termograma prevazišlo obim ove disertacije, na graficima 45 i 46 su, radi ilustracije, prikazani termogrami za pojedine ispitivane uzorke čokolada.



Grafik 45. Termogrami indukcionog vremena oksidacije (a) i temperature početka oksidacije (b) za uzorak mlečne čokolade sa probioticima (MLB), određen DSC-om (0-30 dana)



Grafik 46. Termogrami indukcionog vremena oksidacije (a) i temperature početka oksidacije (b) za uzorak crne čokolade sa 75 % kakao-delova sa probioticima (CD), određen DSC-om (0-30 dana)

#### 5.6.4. Poređenje rezultata sadržaja polifenolnih jedinjenja i primenjenih metoda za određivanje AO aktivnosti

Rezultati antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka čokolada (sa i bez probiotika) dobijeni primenom polarografske metode upoređeni su sa rezultatima dve standardne spektrofotometrijske metode - FRAP i ABTS. Rezultati su takođe korelirani i sa sadržajem ukupnih fenola. Po prvi put do sada, antioksidativna aktivnost određena polarografskom metodom korelirana je sa sadržajem flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina. Pored toga, rezultati sve tri antioksidativne metode primenjene u ovom radu su poređeni sa parametrima oksidativne stabilnosti masti ekstrahovanih iz mlečnih i crnih čokolada sa 44 % i 75 % kakao-delova, tj. indukcionim vremenom oksidacije (OIT) i temperaturom početka oksidacije (OOT), određenim diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 26.

Tabela 26. Korelacije između sadržaja fenolnih jedinjenja (ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina određenih metodom po Folin – Ciocalteu i metodom po Bate-Smith-u), antioksidativne aktivnosti određene FRAP, ABTS i HPS metodom, i oksidativne stabilnosti određene DSC-om

|                | Uk. fenoli | Uk. flavonoidi | Vanilin | <i>p</i> -DAC | Proantoc. | FRAP  | ABTS  | HPS   | OOT   | OIT |
|----------------|------------|----------------|---------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Uk. fenoli     | 1          |                |         |               |           |       |       |       |       |     |
| Uk. flavonoidi | 0.984      | 1              |         |               |           |       |       |       |       |     |
| Vanilin        | 0.967      | 0.967          | 1       |               |           |       |       |       |       |     |
| <i>p</i> -DAC  | 0.928      | 0.929          | 0.921   | 1             |           |       |       |       |       |     |
| Proantoc.      | 0.970      | 0.938          | 0.938   | 0.899         | 1         |       |       |       |       |     |
| FRAP           | 0.921      | 0.933          | 0.904   | 0.866         | 0.932     | 1     |       |       |       |     |
| ABTS           | 0.956      | 0.950          | 0.928   | 0.904         | 0.960     | 0.945 | 1     |       |       |     |
| HPS            | 0.956      | 0.943          | 0.942   | 0.912         | 0.929     | 0.856 | 0.932 | 1     |       |     |
| OOT            | 0.620      | 0.632          | 0.619   | 0.568         | 0.573     | 0.545 | 0.611 | 0.709 | 1     |     |
| OIT            | 0.915      | 0.905          | 0.897   | 0.848         | 0.876     | 0.796 | 0.877 | 0.969 | 0.782 | 1   |

Visoke korelacije sa standardnim metodama, kao i sa sadržajem fenolnih jedinjenja, mogu poslužiti kao dodatna potvrda validnosti nove (HPS) metode. Prikazane korelacije potvrđuju da se polarografska metoda može koristiti i za određivanje antioksidativne aktivnosti kakao-proizvoda, tj. njihovih ekstrakata.

Na osnovu rezultata sadržaja ukupnih i pojedinačnih grupa fenola i antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka različitih vrsta čokolada sa probiotskim bakterijama (i bez

njih) može se konstatovati da su ekstrakti onih uzoraka koji su imali najviše kakao-delova takođe sadržali i najviše fenolnih komponenata i istovremeno ispoljavali najveći antioksidativni kapacitet *in vitro*. Pored toga, nameće se zaključak da prisustvo probiotskih kultura nije imalo uticaja, kako na sastav ukupnih i pojedinačnih klasa fenola, tako ni na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka čokolada. Odsustvo vremenske zavisnosti antioksidativne aktivnosti kontrolnih i uzoraka čokolada sa probioticima, predstavlja još jednu potvrdu da probiotske bakterije ne remete AO potencijal čokolada u koje su inkorporirane.

## 5. 7. REZULTATI ODREĐIVANJA REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA

Kao i kod drugih strukturiranih proizvoda, reološka svojstva čokolade u otopljenom stanju (čokoladne mase) u bliskoj su vezi sa njenom mikrostrukturom koja, pre svega, zavisi od izabranih sastojaka i proizvodnog postupka (*Wolf, 2011*). Poznavanje reoloških karakteristika je od izuzetne važnosti tokom razvoja novih proizvoda i u procesnoj kontroli, pošto je (izmenjeni) sastav proizvoda najodgovorniji za promene u svojstvima proticanja (*Goncalves i Lannes, 2010*).

Otopljena čokolada predstavlja kompleksnu suspenziju najmanje dve vrste dispergovane faze, a poznato je da visok sadržaj čvrste faze, interakcije između suspendovanih čestica i njihova površinska svojstva utiču na reološke karakteristike čokolade (*Sokmen i Gunes, 2006: citat Bouzas i Brown, 1995*). Kako se inkluzijom probiotskih kultura, bilo u liofilizovanoj ili mikroinkapsulisanoj formi, uvodi još jedna disperzna faza, kao jedan od važnih ciljeva u ovom radu postavljeno je i utvrđivanje reoloških karakteristika čokolada sa probioticima, kako bi se ispitaio eventualni uticaj probiotskih preparata i primenjenih novih formulacija na svojstva toka, nakon proizvodnje i tokom skladištenja. Radi poređenja ispitane su i odgovarajuće čokoladne mase bez dodatka probiotika koje su služile kao etalon.

Generalno, podaci dobijeni eksperimentalnim merenjima se izražavaju u vidu viskoziteta u funkciji brzine smicanja, ili kao napon smicanja u funkciji brzine smicanja (*DeGraef i sar., 2011*) i nazivaju se krive proticanja.

Reološka merenja obavljena su prema ICA metodi za čokoladu (*Materijal i metode rada*), upotrebom rotacionog viskozimetra sa koncentričnim mernim cilindrom i SV-DIN geometrijom. Pre mernih ciklusa uzorci čokolada su prekondicionirani na 40°C pri stalnoj brzini smicanja od 5 s<sup>-1</sup>. Prvi merni korak bilo je određivanje vrednosti napona smicanja u funkciji povećanja brzine smicanja od 2 do 50 s<sup>-1</sup> (ulazna kriva proticanja) tokom 3 minuta, nakon čega je svaki analizirani uzorak održavan na 40°C pri brzini smicanja od 50 s<sup>-1</sup> tokom jednog minuta, da bi najzad bio određen napon smicanja pri postepenom smanjenju brzine smicanja od 50 do 2 s<sup>-1</sup> (silazna kriva proticanja) u periodu od 3 minuta. Tokom svakog opisanog koraka, merenja napona smicanja obavljana su u 100 tačaka, dakle, ukupno 300 tačaka, na osnovu kojih je formirana kriva napona smicanja (obeležena crveno na graficima od 47-55). Pored toga, obavljeno je i određivanje vrednosti viskoziteta, u funkciji povećanja brzine smicanja od 2 do 50 s<sup>-1</sup> (silazna kriva) a zatim smanjenja brzine smicanja od 50 do 2 s<sup>-1</sup> (uzlazna kriva), u istim vremenskim intervalima, uključujući i zadržavanje na 40°C pri brzini od 50 s<sup>-1</sup>, i sa merenjem vrednosti viskoziteta u jednakom broju tačaka, na osnovu čega je dobijena kriva viskoziteta označena plavom bojom na graficima od 47-55. Zabeležene su srednja vrednost i standardna devijacija 3 očitavanja. Interpolacija podataka i izračunavanje vrednosti prinosnog napona i plastičnog viskoziteta po Casson-u obavljeno je na osnovu jednačine Casson-ovog matematičkog modela (jednačina 16 - *Mat. i metode rada*) uz primenu softvera ThermoHaake RheoWin Pro 297 metodom najmanjih kvadrata.

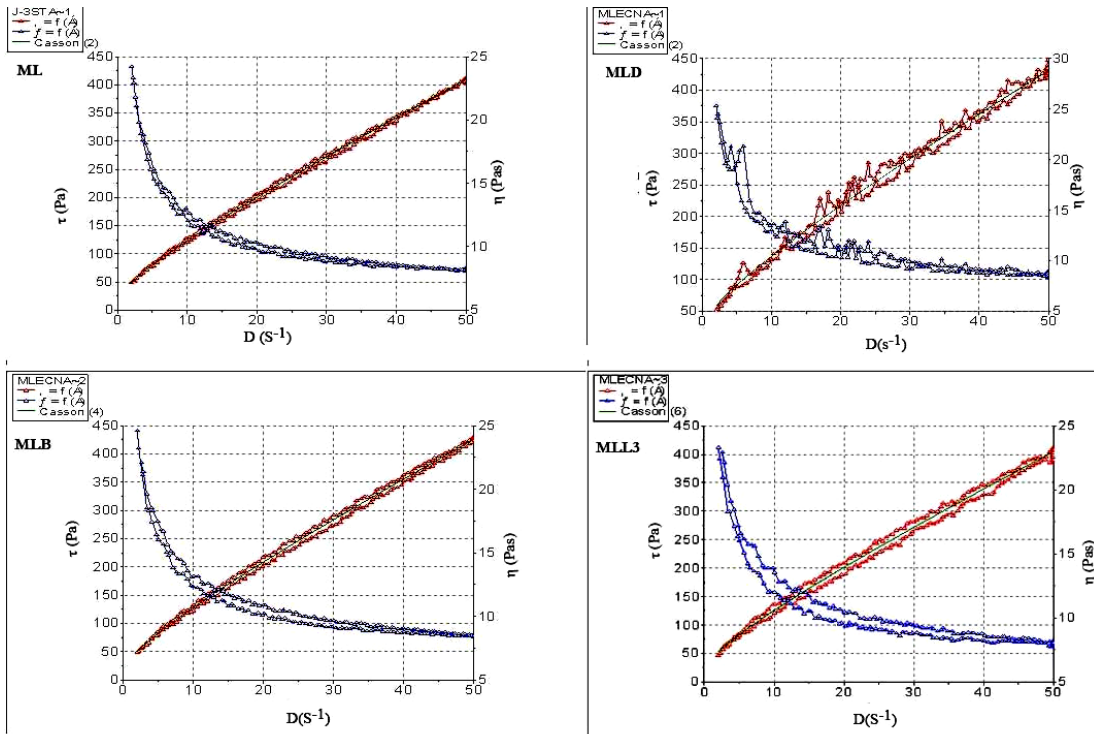
Tabela 27. Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)

| Uzorak | Prinosni napon (Pa) | Viskozitet (Pas) |                   | Koeff. korelacije |
|--------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|        |                     | Plastični        | Prividni          |                   |
| ML     | 13.73±0.49 d        | 5.46±0.27 gh     | 8.58±0.22 bcdefg  | 0.9995            |
| MLD    | 19.23±0.49 gh       | 5.37±0.18 g      | 9.21±0.36 efghij  | 0.9968            |
| MLB    | 14.47±0.76 de       | 5.66±0.26 gh     | 9.09±0.12 defghij | 0.9991            |
| MLL3   | 15.80±0.48 def      | 5.21±0.17defg    | 8.69±0.09 bcdefgh | 0.9978            |
| M      | 15.83±0.32 def      | 4.74±0.29 cdef   | 8.00±0.25 bc      | 0.9994            |
| MD     | 13.82±0.92 d        | 4.78±0.17 cdef   | 7.66±0.46 b       | 0.9979            |
| MB     | 15.22±0.56 de       | 4.66±0.20 cd     | 7.91±0.42 b       | 0.9994            |
| ML3    | 15.37±0.36 de       | 4.79±0.20 cdef   | 8.05±0.49 bc      | 0.9992            |
| C      | 5.33±0.09 ab        | 1.69±0.03 a      | 2.79±0.11 a       | 0.9997            |
| CD     | 4.42±0.10 a         | 1.71±0.04 a      | 2.68±0.10 a       | 0.9994            |
| CB     | 4.86±0.19 a         | 1.72±0.07 a      | 2.76±0.12 a       | 0.9996            |
| CL3    | 5.46±0.26 ab        | 1.69±0.05 a      | 2.80±0.15 a       | 0.9996            |

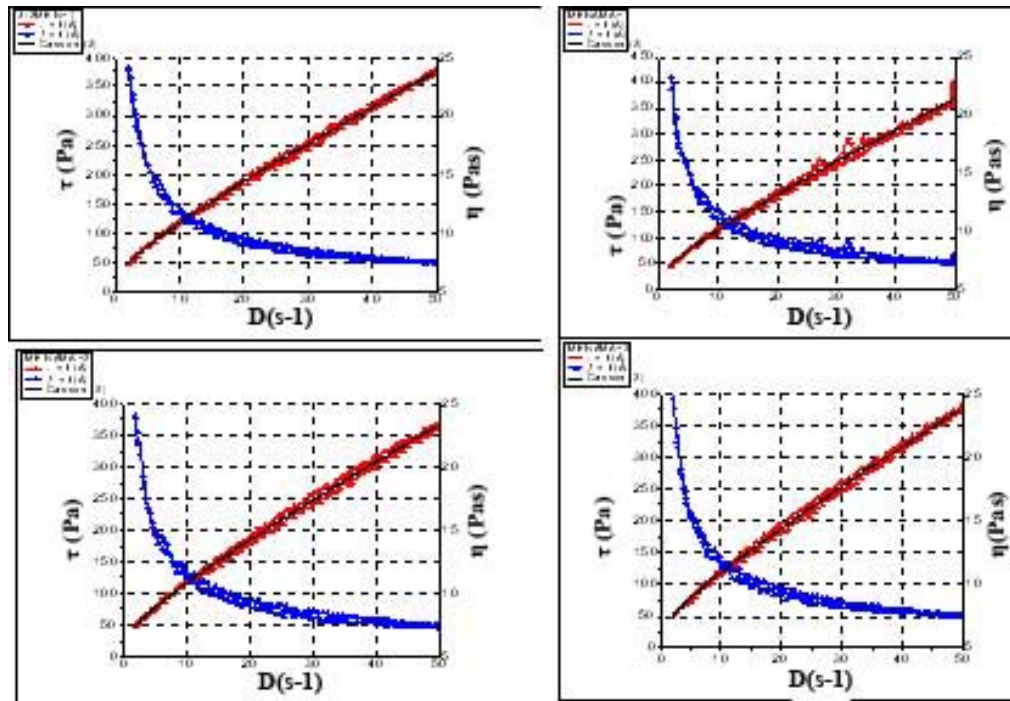
\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

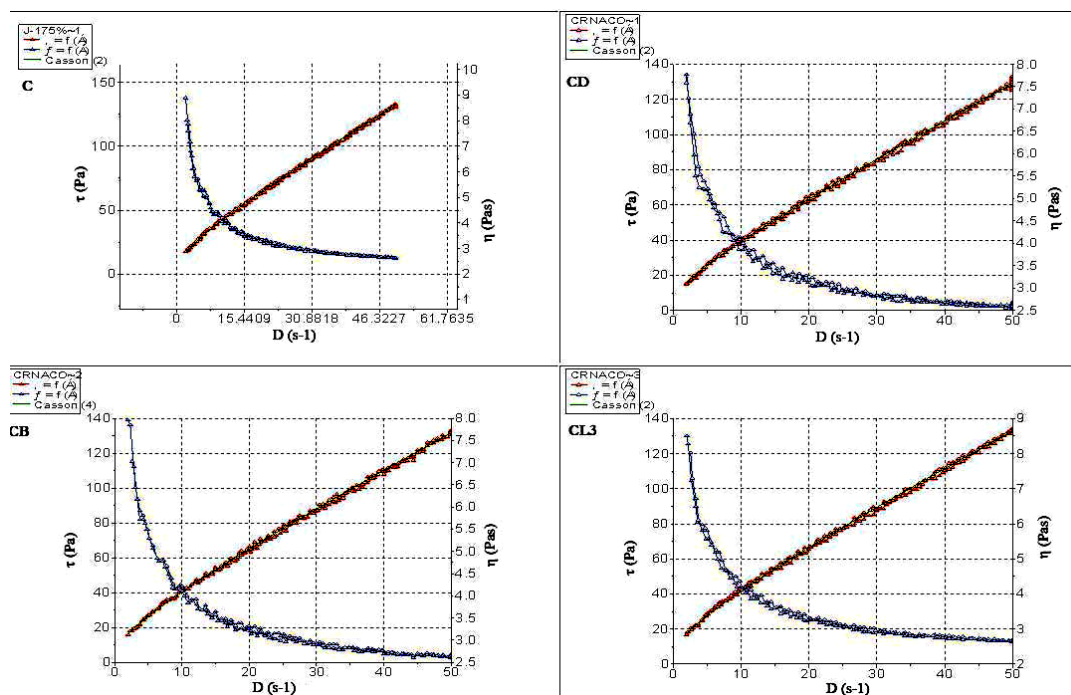




Grafik 47. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)



Grafik 48. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)



Grafik 49. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 26 evidentno je da se reološki parametri razlikuju među analiziranim uzorcima čokolada, i to pre svega, prema vrsti čokolade. Prinosni napon je kod uzoraka mlečnih čokolada imao vrednosti u rasponu od 13.73 Pa, utvrđenu kod kontrolnog uzorka (ML) do 19.23 Pa, nađenu kod uzorka mlečne čokolade sa inkorporiranim kulturom *L. acidophilus* NCFM® (MLD). Kod crnih čokolada sa 44 % kakao-delova dobijene su slične vrednosti prinosnog napona, ali je situacija sa uzorcima kod kojih su utvrđene ekstremne vrednosti upravo suprotna od one konstatovane kod mlečnih čokolada. Najmanju vrednost prinosnog napona imao je uzorak MD (13.82 Pa), dok je najveća vrednost ustanovljena kod kontrolnog uzorka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova, bez dodatih probiotika – M (15.83 Pa). Crne čokolade sa 75 % kakao-delova imale su znatno niže vrednosti prinosnog napona - od 4.42 Pa za uzorak CD, do 5.46 Pa kod uzorka sa mešavinom 3 probiotske kulture CL3. Kada je reč o viskozitetu, vrednosti i plastičnog i prividnog viskoziteta bile su dosta ujednačene u okviru iste grupe čokolada. Tako su najniži plastični viskozitet imale crne čokolade sa 75 % kakao-delova i to od 1.69 Pas, što je bila vrednost utvrđena kod dva uzorka (C i CL3), do 1.72 Pas (uzorak CB).

Prividni viskozitet iznosio je u intervalu od 2.68 (CD) do 2.80 Pas (CL3). Nešto više vrednosti viskoziteta imale su crne čokolade sa 44 % kakao-delova, i to za plastični od 4.66 (MB) do 4.79 (ML3), a prividni od 7.66 (MD) do 8.05 Pas (ML3). Mlečne čokolade imale su očekivano najviše vrednosti viskoziteta, pri čemu je plastični bio u intervalu od 5.21 (MLL3) do 5.66 Pas (MLB), a prividni od 8.58 Pas utvrđen kod kontrolnog uzorka (ML) do 9.21 Pas kod uzorka MD.

Reološko ponašanje svih analiziranih uzoraka čokolada u prvom periodu ispitivanja bilo je očekivano i u skladu sa Casson-ovim modelom proticanja, na šta ukazuju i visoki korelacioni koeficijenti (tabela 27). Izvesna odstupanja primećena su jedino kod uzorka mlečnih čokolada MLD. Tokom sprovođenja eksperimenta vizuelno je primećeno da od svih korišćenih probiotskih kultura dodatih u različite vrste čokoladnih masa, preparat sa kulturom *L. acidophilus* NCFM® ima najveću granulaciju (slika 13 - *Mat. i metode rada*), što se može smatrati jednim od razloga nešto viših reoloških pokazatelja kao što su prinosni napon i prividni viskozitet, kao i primetnijih odstupanja od Casson-ovog modela, što je uočljivo i na grafiku 47. Kako sugerišu *Fischer i Windhab (2011)* u slučajevima modifikovanja standardnih sastojaka čokolade, prilagođavanjem distribucije čvrstih čestica, kao i oblika samih čestica, mogu se kontrolisati viskozitet i optimizovati suspenzija. Pored toga, primenjenom tehnikom umešavanja probiotskih bakterija u čokoladne mase, očigledno nije obezbeđena dovoljna homogenost, što svakako može doprineti navedenim odstupanjima.

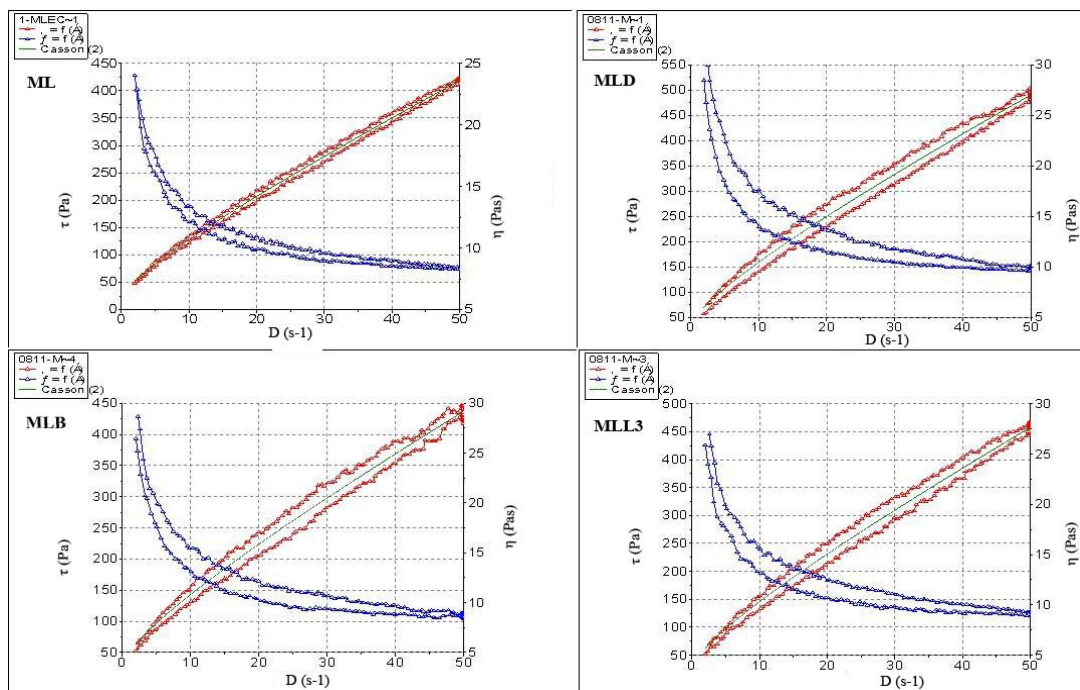
Na osnovu rezultata Tukey-ovog testa može se zaključiti da se svi reološki parametri (prinosni napon, plastični i prividni viskozitet) najmanje razlikuju među uzorcima crnih čokolada sa 75 % kakao-delova kod kojih gotovo da i nema variranja između kontrolnih uzoraka i onih sa dodatkom različitih probiotskih bakterija. Tek nešto veće razlike uočavaju se među crnim čokoladama sa 44 % kakao-delova, dok su najizraženije razlike prisutne kod mlečnih čokolada, što se, u većoj ili manjoj meri, ispoljava u svim periodima ispitivanja.

Tabela 28. Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika posle skladištenja od 90 dana

| Uzorak | Prinosni napon (Pa) | Viskozitet (Pas) |                   | Kof. korelacije |
|--------|---------------------|------------------|-------------------|-----------------|
|        |                     | Plastični        | Prividni          |                 |
| ML     | 15.39±0.66 de       | 5.47±0.16 gh     | 8.98±0.28 cdefghi | 0.9985          |
| MLD    | 23.87±0.30 j        | 5.95±0.21 h      | 10.84±0.32 k      | 0.9939          |
| MLB    | 22.29±0.94 ij       | 5.24±0.26 efg    | 9.72±0.28 hij     | 0.9936          |
| MLL3   | 20.45±0.37 hi       | 5.69±0.21 gh     | 10.09±0.52 jk     | 0.9945          |
| M      | 14.02±0.91 d        | 4.70±0.16 cde    | 7.73±0.44 b       | 0.9995          |
| MD     | 22.81±0.12 j        | 4.24±0.09 c      | 8.05±0.21 bc      | 0.9965          |
| MB     | 18.93±0.42 gh       | 4.43±0.09 c      | 7.94±0.45 b       | 0.9984          |
| ML3    | 19.60±0.71 gh       | 4.72±0.10 cde    | 8.40±0.55 bcdef   | 0.9984          |
| C      | 4.80±0.14 a         | 1.73±0.05 a      | 2.79±0.20 a       | 0.9997          |
| CD     | 5.97±0.21 abc       | 1.77±0.03 a      | 2.98±0.12 a       | 0.9993          |
| CB     | 7.97±0.61 c         | 1.56±0.10 a      | 2.86±0.15 a       | 0.9993          |
| CL3    | 7.12±0.43 bc        | 1.66±0.08 a      | 2.97±0.03 a       | 0.9994          |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

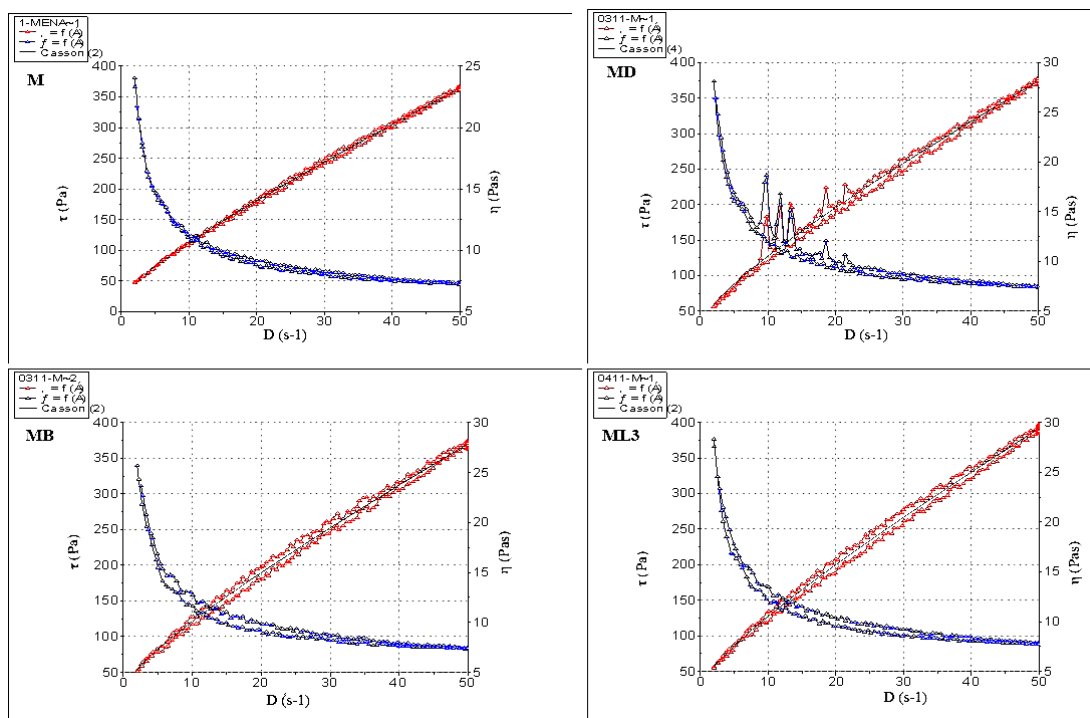
\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .



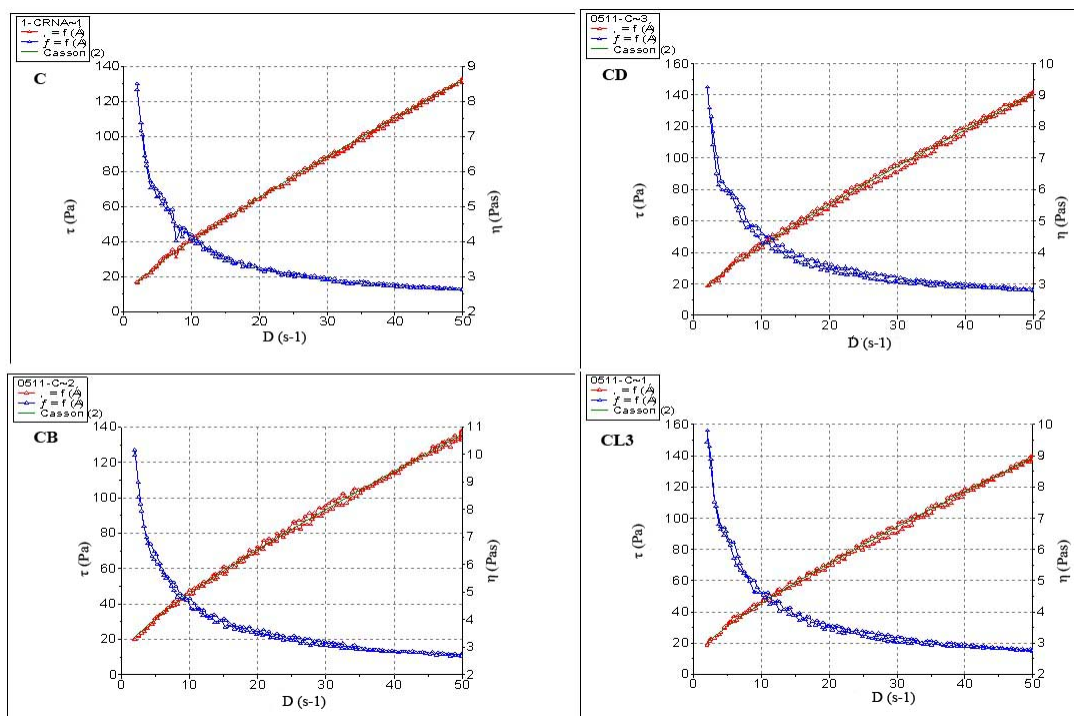
Grafik 50. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja

Posle čuvanja i skladištenja od 90 dana uočena je promena vrednosti reoloških

pokazatelja, koja se ogledala uglavnom u porastu prinosnog napona kod gotovo svih uzoraka, izuzev kontrolnih uzoraka obe vrste crnih čokolada (M i C). Navedeno je bilo praćeno i porastom vrednosti prividnog viskoziteta, mada u manjoj meri, dok je plastični viskozitet pretrpeo najmanje izmene i bio je na nivou vrednosti utvrđenih u prvom periodu ispitivanja. Najviši porast prinosnog napona utvrđen je kod uzoraka sa probiotskom kulturom *L. acidophilus* NCFM® i to kod mlečnih čokolada (MLD: sa 19.23 na 23.87 Pa) i crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (MD: sa 13.82 na 22.81 Pa) (tabela 28). Sa grafika 51 je uočljivo da je pomenuti probiotik uzrokovao odstupanja od Casson-ovog modela proticanja, ali samo u pojedinim mernim tačkama, što je najviše izraženo kod uzorka MD.



Grafik 51. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja



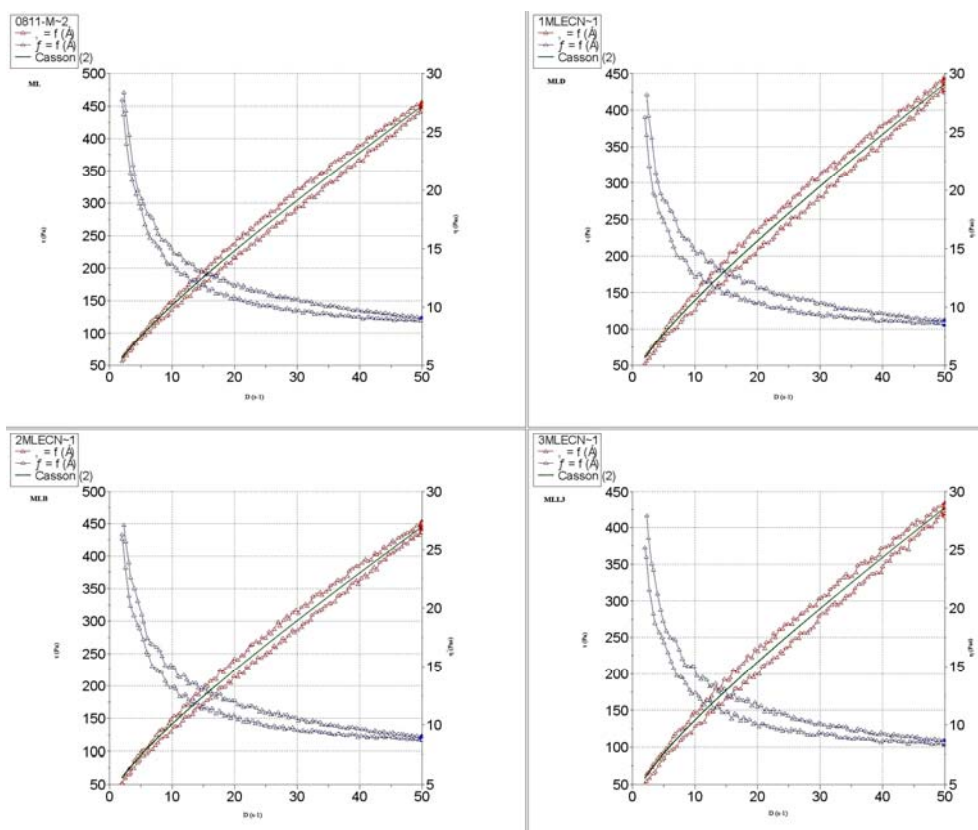
Grafik 52. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja

Tabela 29. Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika posle skladištenja od 180 dana

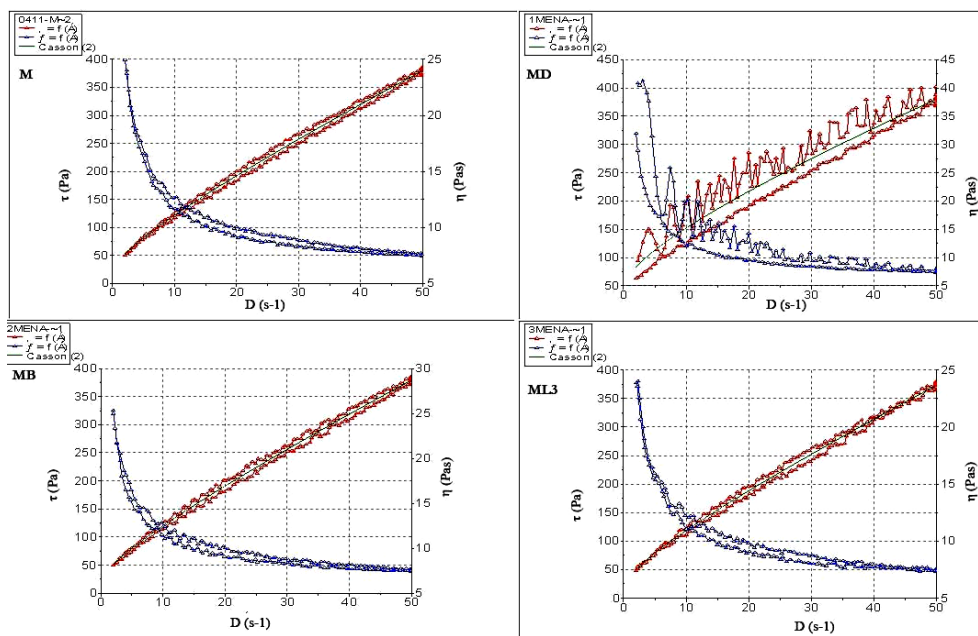
| Uzorak | Prinosni napon (Pa) | Viskozitet (Pas) |                 | Kof. korelacije |
|--------|---------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|        |                     | Plastični        | Prividni        |                 |
| ML     | 19.87±0.94 h        | 5.62±0.26 gh     | 9.73±0.52 ij    | 0.9975          |
| MLD    | 19.99±0.53 h        | 5.39±0.09 g      | 9.47±0.42 ghij  | 0.9966          |
| MLB    | 19.68±1.44 gh       | 5.55±0.27 gh     | 9.65±0.43 hij   | 0.9966          |
| MLL3   | 19.54±0.82 gh       | 5.28±0.17 fg     | 9.30±0.40 fghij | 0.9963          |
| M      | 17.64±0.56 fg       | 4.68±0.14 cd     | 8.17±0.31 bcd   | 0.9986          |
| MD     | 42.71±2.09 k        | 3.36±0.07 b      | 8.43±0.30 bcdef | 0.9733          |
| MB     | 16.54±0.62 ef       | 4.75±0.30 cdef   | 8.22±0.47 bcde  | 0.9982          |
| ML3    | 16.63±0.53 ef       | 4.64±0.28 c      | 7.94±0.34 b     | 0.9984          |
| C      | 6.31±0.13 abc       | 1.67±0.04 a      | 2.85±0.07 a     | 0.9986          |
| CD     | 6.11±0.25 abc       | 1.68±0.07 a      | 2.89±0.07 a     | 0.9991          |
| CB     | 5.79±0.27 abc       | 1.72±0.07 a      | 2.91±0.04 a     | 0.9993          |
| CL3    | 6.34±0.34 abc       | 1.69±0.07 a      | 2.19±0.08 a     | 0.9992          |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u sadržaju ispitivanog parametra u različitim vrstama čokolada sa i bez dodatih probiotika;

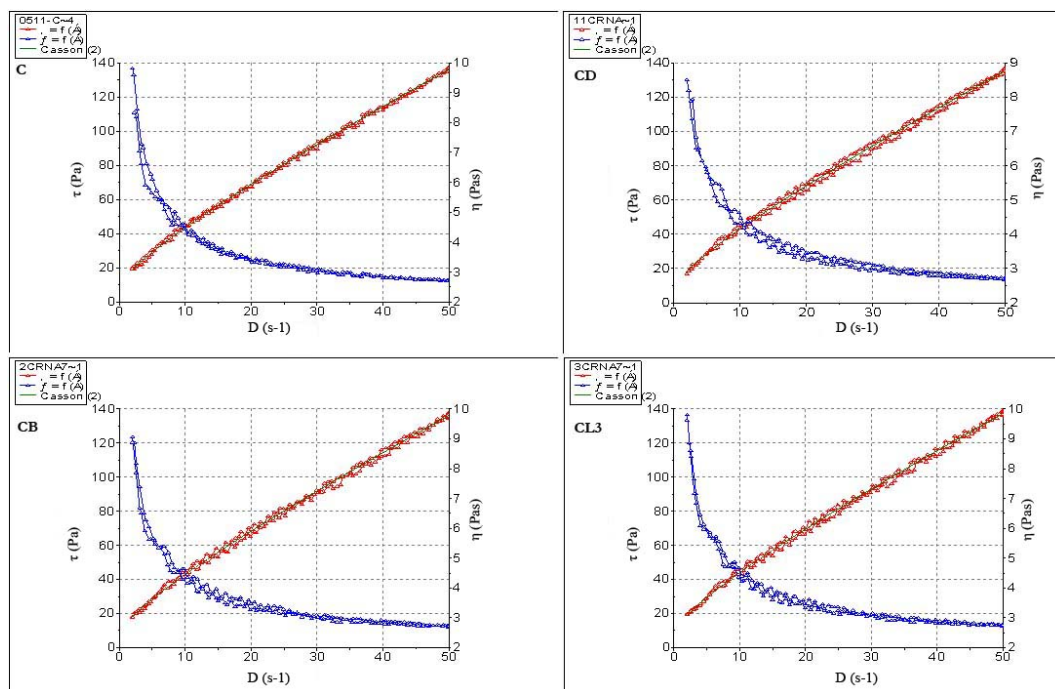
\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .



Grafik 53. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja



Grafik 54. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja



Grafik 55. Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja

Na samom kraju ispitivanja, po isteku 180 dana skladištenja, može se konstatovati porast prinosnog napona u odnosu na prvi period ispitivanja kod svih analiziranih uzoraka. Međutim, u odnosu na drugi period ispitivanja kod nekih uzoraka (ML L3, MB, ML3, CB i CL3) uočljivo je smanjenje prinosne vrednosti, zbog čega se može smatrati da je njena promena umerenija, odnosno približnija vrednostima sa početka ispitivanja. Izuzetak je jedino uzorak MD kod koga je došlo do velikog rasta prinosnog napona, i to sa 22.81 na čak 42.71 Pa, što se odrazilo na izraženija odstupanja od Casson-ovog modela proticanja (grafik 54), kao i na nezatno smanjenje koeficijenta korelacije svojstava toka sa navedenim modelom ( $r=0.9733$ ).

Kao i u prethodnim periodima ispitivanja plastični viskozitet bio je veoma ujednačen unutar iste vrste čokolada bez obzira na dodate probiotike. Za mlečne čokolade vrednosti su bile u rasponu od 5.28 Pas (ML L3) do 5.62 Pas kod kontrolnog uzorka; kod crnih čokolada sa 44 % kakao-delova od 3.36 Pas (MD) do 4.75 Pas (MB); najmanje razlike plastičnog viskoziteta dobijene su kod uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova: od 1.67 Pas (uzorak C) do 1.72 Pas (uzorak CB).



Navedeno je potvrđeno i na osnovu Tukey-ovog testa za period posle 90 dana skladištenja, kao i na samom kraju ispitivanja. Iako su razlike prisutne, i izraženije sa smanjenjem udela kakao-delova u uzorcima čokolada, u grupi crnih sa 44 % kakao-delova, kao i u grupi mlečnih čokolada, uočavaju se vrednosti koje se međusobno ne razlikuju. Tako se vrednosti plastičnog viskoziteta kod crnih čokolada sa manjim sadržajem kakao-delova posle 90 dana skladištenja ne razlikuju značajno među uzorcima MD i MB, odnosno između uzoraka ML3 i kontrolnih, što važi i za vrednosti prividnog viskozitet uzoraka M i MB. Kod mlečnih čokolada, na primer, dodatak probiotika L3 ne dovodi do statistički značajnih razlika plastičnog viskoziteta u odnosu na kontrolne posle 90 dana skladištenja nivou statističke značajnosti  $p < 0.05$  (tabela 28).

Kada se posmatraju dobijeni rezultati reoloških karakteristika kontrolnih i čokolada sa probioticima tokom celokupnog ispitivanja u periodu od 180 dana, može se konstatovati da su oni u domenu očekivanog i da predstavljaju posledicu, pre svega, osnovnog hemijskog sastava analiziranih uzoraka. Crne čokolade sa 75 % kakao-delova imaju najniže vrednosti svih određivanih reoloških parametara, posebno plastičnog i prividnog viskoziteta, što je prvenstveno uzrokovano visokim sadržajem masti (tabela 14, *Rezultati određivanja osnovnog hemijskog sastava*), koja oblaže čvrste čestice i olakšava kako započinjanje toka (prinosni napon), tako i nastavak proticanja (plastični viskozitet) čokoladne mase (*Afoakwa i sar., 2007*). Utvrđene vrednosti viskoziteta po Casson-u za ovu vrstu čokolada slažu se sa literaturnim navodima, jednako kao i rezultati dobijeni za mlečne čokolade, koje su viskoznije zbog prisustva i svojstava mleka u prahu (*Zyżelewicz i sar., 2010*). Konkretno, veoma sitne čestice mleka u prahu, veličine do 4  $\mu\text{m}$ , pogoršavaju svojstva proticanja i povećavaju viskozitet, zbog toga što dovode do povećanja specifične površine (*Gavrilović, 2003*). Crne čokolade sa 44 % kakao-delova su na osnovu reoloških parametara između prethodno navedenih vrsta čokolada, s tim što su, bez obzira na odsustvo mleka, bliže mlečnim čokoladama, što ne iznenađuje, s obzirom da su po sadržaju masti (kao i šećera) približnije njima nego crnim čokoladama sa 75 % kakao-delova.

Poznato je da porast sadržaja vlage pojačava interakcije između čestica šećera što je prouzrokovano stvaranjem tankog sloja sirupa na površini njihovih kristala (*Beckett, 2002; Nebesny i sar., 2007*). Navedeno dovodi do povećanja viskoziteta i za sobom povlači niz tehnoloških i ekonomskih nedostataka. Međutim, kako je utvrđeni sadržaj vlage u

kontrolnim i čokoladama sa probioticima bio veoma nizak (ispod 1%) (tabela 14, *Rezultati određivanja osnovnog hemijskog sastava*), i kako se radi o vezanoj vodi, uticaj na svojstva toka analiziranih uzoraka čokolada bio je neznatan.

Na osnovu prikazanih rezultata, evidentno je da je inkluzija probiotskih BMK u većoj meri delovala na prinosni napon, koji predstavlja više odraz delovanja sila između čvrstih čestica, odnosno, razdaljine između njih (*Afoakwa i sar., 2007*), nego na plastični i prividni viskozitet, koji nisu pretrpeli veće promene. Zbog toga je dodatak ovih komponenata, kao nove disperzne faze, uslovio povećanje međučestičnih interakcija, i posledično, povećanje energije koja je potrebna za početak proticanja čokoladne mase. Navedeno je naročito bilo uočljivo pri inkorporiranju probiotskih preparata koji su se odlikovali nešto krupnijim česticama, i to kod onih vrsta čokolada koje su imale najmanji sadržaj masti koji bi kompenzovao povećanje sadržaja čvrste faze. Ilustrativan primer za to je uzorak crne čokolade sa 44 % kakao-delova sa *L. acidophilus* NCFM® (MD) posle 180 dana skladištenja, kod koga je utvrđen izraziti skok prinosne vrednosti i primetnija odstupanja na krivoj proticanja (tabela 29 i grafik 54), a koji spada u grupu uzoraka sa najmanjim ukupnim sadržajem masti (tabela 14, *Rezultati određivanja osnovnog hemijskog sastava*).

Smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja reoloških parametara, zbog povećanja specifične površine usitnjenih čestica i nemogućnosti njihovog potpunog oblaganja kakao-maslacem. U prikazanom eksperimentu probiotici u vidu liofilizovanih i inkapsulisanih preparata su uključeni u čokoladne mase bez istovremenog povećanja sadržaja masti. To, praktično, znači da je ista količina masti za oblaganje čestica bila na raspolaganju i u čokoladama standardnog sastava i u onima sa probioticima kod kojih je povećan odnos disperzne prema kontinualnoj fazi. U tom smislu, izvesno povećanje pokazatelja toka se moglo očekivati. Pojava da su probiotske bakterije sa većim česticama više uticale na povećanje prinosnog napona može biti povezana sa distribucijom čvrstih čestica po veličini i njenim uticajem na reološke karakteristike. Naime, kako navodi *Stauffer (1998)* osim pogodnosti koje ispoljava prisustvo čestica različitih veličina na svojstva proticanja, važan je način njihovog međusobnog pakovanja. Ukoliko se čestice mogu čvrsto pakovati jedne pored drugih, nije potrebna dodatna količina kakao-masti za snižavanje prinosnog napona i plastičnog viskoziteta. Može se pretpostaviti da je inkorporiranjem

liofilizata probiotskih kultura sa većim česticama došlo do promene u načinu pakovanja čestica, što se odrazilo na količinu energije potrebnu za započinjanje toka. Sa druge strane, probiotici su dodati različitim čokoladnim masama u momentu kada su postupci rafinacije i končiranja već obavljani, i bez primene mešalica ili homogenizatora, zbog čega je moguće da je došlo do aglomeracije krupnijih čestica probiotika (*Dophilus*) koje se nisu gusto pakovale sa ostalim čvrstim česticama prisutnim u čokoladama, zbog čega su vrednosti prinosnog napona bile nešto veće u odnosu na kontrolne uzorke, ali i u odnosu na uzorke sa drugim probioticima finije granulacije (*Bifido*, L3), koje su se bolje uupakovale. Međutim, ne treba izgubiti iz vida i činjenicu da navedena pojava nije predstavljala pravilo, i da većina analiziranih uzoraka čokolada nije imala znatnije poremećaje u reološkim svojstvima toka. Krupnije čestice imaju manji uticaj na snižavanje prinosnog napona kod čokolada sa manjim sadržajem masti, nego kod onih koje imaju više masti (*Afoakwa, 2010*). Ovo se naročito odnosi na crne čokolade sa 75 % kakao-delova, koje su ispoljile najmanje promene reoloških svojstava tokom celokupnog ekpserimenta. Pored probiotskih prahova finije granulacije (kakvi su *Bifido* i, pogotovo, L3) i preparati veće granulacije (*Dophilus*) uklopili su se u čokoladnu masu sa 75 % kakao-delova ne izazvavši izrazitije povećanje prinosnog napona i plastičnog viskoziteta. Ovo, verovatno, stoga što su ove čokolade u svom sastavu imale dovoljnu količinu prisutne masti za oblaganje i nešto grubljih čestica, čime je omogućeno nesmetano proticanje.

Sve pomenuto nameće pitanje homogenosti dobijenih uzoraka, odnosno načina inkorporiranja koje se mogu smatrati jednim od osnovnih uzročnika promena reoloških svojstava, pre svega prinosne vrednosti. Imajući u vidu samo minimalne promene viskoziteta analiziranih uzoraka čokolada sa probioticima u odnosu na kontrolne, koje se nisu uvek ogledale u povećanju, kao i konstatovane veće vrednosti prinosnog napona u pojedinim slučajevima, koje, ipak, ne predstavljaju drastičan porast, može se zaključiti da je obogaćivanje različitih vrsta čokolada sa probiotskim bakterijama moguće izvesti bez značajnijih promena reoloških parametara. Primena efikasnijih tehnika mešanja i prilagođavanje raspodele čvrstih čestica po veličini predstavljaju dobar putokaz ka dobijanju funkcionalnih čokolada vrhunskog kvaliteta.

## 5.8. REZULTATI ANALIZA AMBALAŽNIH MATERIJALA

### 5.8.1. Rezultati određivanja debljine ambalažnih materijala

Debljina ambalažnih materijala utiče na njihova fizičko-mehanička svojstva, kao i na zaštitne osobine. Ujednačenost debljine ukazuje na kvalitet ambalažnog materijala i mogućnost pravilnog formiranja ambalažnih jedinica.

Debljina materijala određivana je samo kod uzorka 1, odnosno štampane lakirane aluminijumske folije, budući da je ona predstavljala primarnu ambalažu. Izmerene vrednosti za debljinu uzorka 1 date su u tabeli 30.

Tabela 30. Izmerene debljine primarnog ambalažnog materijala štampane lakirane aluminijumske folije ( $\mu\text{m}$ )

| Redni br. merenja | Pozicija merenja |       |       |       |       |       |       |       | Ukupno           |
|-------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
|                   | I                | II    | III   | IV    | V     | VI    | VII   | VIII  |                  |
| 1                 | 13.00            | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.25            |
| 2                 | 12.00            | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.25            |
| 3                 | 12.00            | 13.00 | 12.00 | 14.00 | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 12.50            |
| 4                 | 12.00            | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 12.25            |
| 5                 | 12.00            | 13.00 | 12.00 | 13.00 | 12.00 | 13.00 | 14.00 | 12.00 | 12.62            |
| $\bar{X}_{sr}$    |                  |       |       |       |       |       |       |       | 12.37 $\pm$ 0.17 |

Rezultati pokazuju ujednačenost debljine uzorka po pozicijama. Ujednačenost debljina je pozitivno svojstvo ambalažnog materijala i jedan od uslova za uspešnu primenu ovog materijala. Prosečna izračunata debljina materijala 12.37  $\mu\text{m}$ , što odgovara nominalnoj debljini od 12  $\mu\text{m}$ .

### 5.8.2. Rezultati određivanja površinske mase ambalažnih materijala

Određen je sastav materijala, kao i njihove površinske mase. Masa po jedinici površine predstavlja osnovno svojstvo ambalažnog materijala koje utiče na pravilnost

formiranja ambalaže, na ponašanje pri transportu i skladištenju, što može da bude od posebne važnosti prilikom pakovanja čokolada koje sadrže osetljive komponente kakvi su probiotici. Rezultati su prikazani u tabelama 31 i 32.

Tabela 31. Masa po jedinici površine ambalažnog materijala ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) za uzorak 1

| Redni br. merenja | M A T E R I J A L ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) |                  |                 |                  |
|-------------------|---|------------------|-----------------|------------------|
|                   | Boja  | Al               | Lak             | Ukupno           |
| 1                 | 0.98  | 33.12            | 3.40            | 37.50            |
| 2                 | 1.02  | 33.02            | 3.31            | 37.35            |
| 3                 | 1.07  | 33.17            | 3.36            | 37.60            |
| 4                 | 1,02  | 33.12            | 3.43            | 37.57            |
| 5                 | 0.98  | 33.12            | 3.37            | 37.47            |
| $\bar{X}_{sr}$    | $1.01 \pm 0.04$                             | $33.11 \pm 0.05$ | $3.37 \pm 0.04$ | $37.50 \pm 0.10$ |

Dobijeni sastav ambalažnog materijala označenog kao uzorak 1 je boja/Al/lak. Ukupna površinska masa prosečno iznosi  $37.50 \text{ g}/\text{m}^2$ .

Tabela 32. Masa po jedinici površine ambalažnog materijala ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) za uzorak 2

| Redni br. merenja | M A T E R I J A L ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) |                   |                   |
|-------------------|---|-------------------|-------------------|
|                   | Boja  | Karton            | Ukupno            |
| 1                 | 14.35                                       | 212.50            | 226.85            |
| 2                 | 14.28                                       | 211.57            | 225.85            |
| 3                 | 15.02                                       | 212.75            | 227.77            |
| 4                 | 14.18                                       | 213.22            | 227.40            |
| 5                 | 14.18                                       | 211.32            | 225.50            |
| $\bar{X}_{sr}$    | $14.40 \pm 0.35$                            | $212.28 \pm 0.79$ | $226.67 \pm 0.10$ |

Dobijeni sastav ambalažnog materijala označenog kao uzorak 2 je boja/karton. Ukupna masa po jedinici površine prosečno iznosi  $226.67 \text{ g}/\text{m}^2$ .

### 5.8.3. Rezultati određivanja zatezne jačine i izduženja pri kidanju

Zatezna jačina i izduženje pri kidanju su vrlo bitne mehaničke karakteristike ambalažnih materijala koje određuju ponašanje materijala na pakerici i otpornosti pri manipulaciji i skladištenju. Rezultati ispitivanja ovih mehaničkih karakteristika, za ispitivane ambalažne materijale, prikazani su u tabelama 33 i 34.

Tabela 33. Zatezna jačina i izduženje pri kidanju za uzorak 1

| Redni br. merenja | UZDUŽNO                 |                           | POPREČNO                |                           |
|-------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                   | Zatezna jačina (N/15mm) | Izduženje pri kidanju (%) | Zatezna jačina (N/15mm) | Izduženje pri kidanju (%) |
| 1                 | 15.30                   | 4.08                      | 12.10                   | 9.11                      |
| 2                 | 15.40                   | 3.97                      | 11.50                   | 8.09                      |
| 3                 | 15.20                   | 4.11                      | 12.90                   | 10.03                     |
| 4                 | 15.30                   | 4.61                      | 11.30                   | 9.45                      |
| 5                 | 15.60                   | 3.57                      | 11.90                   | 8.43                      |
| X <sub>sr</sub>   | 15.36±0.15              | 4.07±0.37                 | 11.94±0.62              | 9.02±0.78                 |

Tabela 34. Zatezna jačina i izduženje pri kidanju za uzorak 2

| Redni br. merenja | UZDUŽNO                 |                           | POPREČNO                |                           |
|-------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                   | Zatezna jačina (N/15mm) | Izduženje pri kidanju (%) | Zatezna jačina (N/15mm) | Izduženje pri kidanju (%) |
| 1                 | 194.60                  | 2.56                      | 123.50                  | 5.61                      |
| 2                 | 186.20                  | 2.48                      | 121.10                  | 5.55                      |
| 3                 | 180.40                  | 2.72                      | 123.20                  | 5.55                      |
| 4                 | 180.40                  | 2.88                      | 123.40                  | 5.83                      |
| 5                 | 180.90                  | 2.96                      | 125.90                  | 5.69                      |
| X <sub>sr</sub>   | 184.50±6.15             | 2.72±0.20                 | 123.42±1.70             | 5.65±0.12                 |

Dobijeni rezultati za mehaničke karakteristike su u skladu sa prirodom analiziranih ambalažnih materijala i njihovim debljinama.

#### 5.8.4. Rezultati određivanja propustljivosti gasova ambalažnih materijala

Propustljivost gasova zavisi od prirode materijala i gasa, a direktno je proporcionalna razlici koncentracija na površinama ambalažnog materijala i temperaturi, a obrnuto proporcionalna debljini ambalažnog materijala. Izražava se kao ml/m<sup>2</sup>/24h.

Tabela 35. Propustljivost gasova kod analiziranih uzoraka [ml/(m<sup>2</sup>/24h)]

| Uzorak | Propustljivost gasova [ml/(m <sup>2</sup> /24h)] |                |                |        |
|--------|--|----------------|----------------|--------|
|        | CO <sub>2</sub>                                  | O <sub>2</sub> | N <sub>2</sub> | vazduh |
| 1      | 8.1  | 0.0            | 6.2            | 2.6    |

Propustljivost gasova rađena je samo za primarni ambalažni materijal, dakle, štampanu i lakiranu aluminijsku foliju. Rezultati su pokazali da je navedeni materijal nepropustan za kiseonik, a neznatno propustljiv za ostale ispitivane gasove i vazduh.

Ambalažni materijal sa ovako dobrim barijernim svojstvima se može primeniti za pakovanje čokolada sa probioticima, jer se može očekivati da obezbedi dug rok održivosti upakovanih proizvoda.

#### 5.8.5. Rezultati određivanja hermetičnosti vara

Hermetičnost ima smisla samo kod uzorka 1, jer je formiranje primarne ambalaže izvedeno termozavarivanjem. Vizuelnim pregledom formiranih varova, zapaženi su nedostaci u vidu nabora, loše formiranje na poziciji uglova.

Ispitivanjem hermetičnosti varova, metodom mikroporoznosti, konstatovano je da su svi varovi nehermetični, na poziciji uglova (zapaženih vizuelnih mana). Navedeno, svakako, predstavlja nedostatak kod pakovanja čokolada sa probioticima, jer i pored nepropustljivosti samog primarnog ambalažnog materijala za gasove, oni ipak mogu doći u dodir sa proizvodom i uticati na njegovu održivost. U tom smislu se može pretpostaviti da je nehermetičnost vara na primarnom ambalažnom materijalu predstavljala jedan od mogućih uzroka osetnijeg pada broja aktivnih ćelija pojedinih probiotika, a naročito bifidobakterija koje su posebno osetljive na dejstvo kiseonika.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu izvršenih ispitivanja, dobijenih i prodiskutovanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ▲ Preliminarnim ogledom sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije ustanovljene su optimalne koncentracije upotrebljenih probiotika koja obezbeđuje dovoljan broj vijabilnih ćelija i dobar senzorni kvalitet različitih vrsta čokolada. Za soj *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (D) u liofilizovanoj formi utvrđena optimalna količina iznosila je 3.50 g/kg čokoladne mase, probiotska kultura *Bifidobacterium lactis* HN019 (B), takođe u obliku liofilizata, dodata je u koncentraciji od 1.75 g/kg, dok je mikroinkapsulisana mešavima kultura (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium breve*) DUOLAC MIX L3 u čokoladne mase različitog sastava uneta u količini od 3.50 g/kg.
- ▲ Tokom glavnog eksperimenta vijabilnost liofilizovanih i mikriionkapsulisanih probiotskih kultura u mlečnim i crnim (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokoladama, bez obzira na opadanje tokom vremena, je, generalno, bila dobra na obe posmatrane temperature (4°C i 20°C) tokom 180 dana skladištenja.
- ▲ Liofilizovani probiotski soj *L. acidophilus* NCFM® (D) imao je dobru vijabilnost u svim ispitivanim vrstama čokolada, budući da se broj ćelija održao na funkcionalnom nivou (8-7 log cfu/g) tokom 180 dana skladištenja.
- ▲ Najnižu vijabilnost ispoljila je liofilizovana kultura *B. lactis* HN019 (B), čiji je broj sa početnih 8 log cfu/g opao za jednu logaritamsku jedinicu posle 30 dana, kako na temperaturi hlađenja tako i na sobnoj temperaturi, a potom i na 6 log cfu/g posle 90 dana skladištenja, čime je i rok funkcionalnosti čokolada koje je sadrže ograničen na navedeni vremenski period.
- ▲ U pogledu vijabilnosti najbolji učinak imale su mikroinkapsulisane kulture DUOLAC MIX L3, što je bilo i očekivano, pre svega zbog toga što se radi o mešavini tri soja, čiji je ukupan broj ćelija bio na funkcionalnom nivou tokom celokupnog eksperimenta, kao i zbog primenjenih tehnika zaštite od uticaja spoljnih faktora, sprovedenih tokom



mikroinkapsulacije, odnosno primene proteinskog i polisaharidnog omotača, kojima se obezbeđuje dodatna stabilnost. Broj ćelija *L. acidophilus* iz mešavine L3, održao se na nivou od 8 log cfu/g tokom 180 dana, u svim ispitivanim vrstama čokolada i na obe temperature skladištenja (4°C i 20°C). Slično se odnosi i na bakterije *S. thermophilus* iz mešavine L3 u mlečnim čokoladama (8 log cfu/g) pri primenjenim režimima čuvanja. Međutim, u crnim čokoladama sa 44 % i 75 % kakao-delova 150. dana skladištenja došlo je do opadanja broja streptokoka u uzorcima čuvanim na temperaturi frižidera, dok je na 20°C do redukovanja njihovog broja došlo 120. dana, a potom je 150. dana utvrđeno smanjenje za još jednu logaritamsku jedinicu, da bi na samom kraju eksperimenta njihov broj bio 6 log cfu/g. Početni broj ćelija soja *Bifidobacterium breve* bio je znatno niži u odnosu na ostale kulture iz mešavine (6 log cfu/g) i ostao je u navedenom području u tri vrste čokolada tokom 90 dana skladištenja na 4°C, kao i u mlečnim čokoladama na 20°C, dok je kod crnih čokolada čuvanih na sobnoj temperaturi vijabilnost bifidobakterija opala na 5 log cfu/g posle 30 dana skladištenja. U poslednjem periodu ispitivanja (180. dana) broj bifidobakterija bio reda veličine 3 log cfu/g u svim ispitivanim uzorcima čokolada. Manji stepen preživljavanja bifidobakterija u odnosu na laktobacile i streptokoke iz mikroinkapsulisane mešavine L3 donekle je nadomešten prisustvom preostala dva probiotska soja, u smislu da ne dovodi do skraćivanja perioda funkcionalnosti čokolada.

- ▲ Mada je u određenom broju slučajeva bolja vijabilnost probiotskih bakterija utvrđena na nižoj temperaturi skladištenja, pojava suprotnih podataka kod pojedinih analiziranih uzoraka čokolada, ukazuje da se ne radi o pravilu. Naše istraživanje pružilo je potvrdu da se čokolade sa probioticima mogu skladištiti i na sobnoj temperaturi, bez bojazni od drastičnog pada funkcionalnosti proizvoda. Navedeno je od posebnog značaja za trgovce i potrošače, s obzirom da se čokolade najčešće i čuvaju na ambijentalnoj temperaturi, znatno češće nego na temperaturi hlađenja.
- ▲ Upotrebljene liofilizovane probiotske bakterije *L. acidophilus* NCFM® (D) i *B. lactis* HN019 (B), kao i mešavina mikroinkapsuliranih probiotskih kultura DUOLAC MIX L3 (*L. acidophilus*, *St. thermophilus* i *B. breve*) nisu uticale na promenu osnovnog hemijskog sastava ispitivanih uzoraka mlečnih i crnih (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokolada, s

obzirom da se sadržaj proteina, masti i ugljenih hidrata, kod čokolada sa dodatim probioticima nije značajnije razlikovao od kontrolnih uzoraka.

▲ Na osnovu rezultata senzornog ocenjivanja, svi ispitivani uzorci mlečnih i crnih čokolada sa dodatim probioticima (D, B, L3), pripadali su kategoriji odličnog kvaliteta, tokom 180 dana skladištenja na temperaturi od 20°C. Dodati probiotici nisu uzrokovali pojavu sivljenja, niti su doveli do nastanka stranog ukusa i mirisa kod analiziranih uzoraka čokolada. Od teksturalnih svojstava najčešće su bila izmenjena geometrijska svojstva, pošto je kod pojedinih uzoraka u određenim intervalima ispitivanja, konstatovano prisustvo zrnivosti. Navedeno je uslovljeno nešto većom granulacijom pojedinih probiotika, kao što je *L. acidophilus* NCFM® (D), kod kojih je zrnivost najčešće i uočena tokom senzornog ocenjivanja, kao i nedovoljnom disperznošću dodatih kultura, budući da je ponekad njihovo prisustvo bilo moguće detektovati, a ponekad nije, što nameće pitanje primene drugačijih načina inkorporiranja. Ipak, ocenjivačka komisija je bila saglasna da prisustvo zrnivosti ne dovodi do značajnijeg opadanja ukupnog senzornog kvaliteta i ne bi trebalo da bude razlog eventualnog odbijanja proizvoda od strane potrošača. Generalno se može konstatovati da su razlike u ocenama senzornog kvaliteta analiziranih uzoraka čokolada više posledica njihovog različitog sastava, odnosno vrste kojoj pripadaju po sadržaju osnovnih grupa jedinjenja i udela kakao-delova, nego dodatih probiotskih bakterija. Osim toga, postepeno smanjenje ocena za pojedina senzorna svojstva rezultat je uobičajenih promena na čokoladama tokom dugotrajnog skladištenja i ne može biti pripisano inkluziji probiotskih kultura. Na osnovu svega navedenog, može se izvesti zaključak da dodatak probiotskih sojeva, bilo liofilizovanih ili inkapsulisanih, u različite vrste čokolada, ne dovodi do bitnijeg remećenja senzornih svojstava, te da čokolade zadržavaju odličan senzorni kvalitet do kraja eksperimenta.

▲ Rezultati instrumentalnog određivanja karakteristika kvaliteta boje analiziranih čokolada sa probioticima u tri sistema definisanja boje (u CIE, CIE  $L^*a^*b^*$  i Hunter-ovom sistemu) pokazuju da su razlike u vrednostima parametara uslovljene vrstom čokolada, odnosno sadržajem kakao-delova, zaravnjenošću površine čokoladnih tabli (gornja ili donja površina), kao i pozicijom merenja. Vrednosti srednje reflektance (Y %) i

psihometrijske svetlosti ( $L^*$  i  $L_{Tu}$ ), su se menjale sa odmicanjem vremena skladištenja, ali bez većih odstupanja od proseka, i svakako bez permanentnog povećanja koje bi ukazalo na razvoj pojave sivljenja. Dakle, može se zaključiti da inkorporiranje probiotika u čokolade različitog sastava nije uzrokovalo sivljenje istih. Navedeno predstavlja važan zaključak s obzirom na moguć uticaj probiotika na kristalografsku strukturu masti. Prema vrednostima dominantne talasne dužine ( $\lambda$ ), a na osnovu dijagrama hromatičnosti, svi analizirani uzorci čokolada (sa i bez probiotika) su pripadali istom – narandžastom delu spektra, u svim periodima ispitivanja tokom skladištenja od 180 dana. Konačno, treba istaći da rezultati ocene karakteristika kvaliteta boje gornje i donje površine analiziranih uzoraka čokolada, dobijeni primenom tristimulusne kolorimetrije pokazuju dobru saglasnost sa senzornim ocenjivanjem istih karakteristika, i omogućavaju precizno praćenje i najmanjih promena boje. Ocenjivanje boje preko više izmerenih parametara daje mogućnost šire primene metode za objektivno ocenjivanje kvaliteta čokolada.

- ▲ Iz rezultata analize termalnih svojstava ispitivanih uzoraka čokolada diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom proizilazi da dodatak probiotskih bakterija nema uticaja na vrednosti entalpije topljenja i kristalizacije ( $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_c$ ), a svakako ne dovodi do njihovog povećanja u odnosu na kontrolne uzorke bez probiotika. Slično se uočava i na osnovu dobijenih vrednosti ostalih termodinamičkih parametara topljenja i kristalizacije ( $T_o$ ,  $T_m$ ,  $T_c$ ,  $T_{end}$ ), zbog čega se nameće zaključak da dodatak probiotika nema značajnijeg uticaja na termalna svojstva različitih vrsta čokolada, već da uočene razlike potiču od sastava mlečnih i crnih (sa 44 % i 75 % kakao-delova) čokolada, pre svega, njihovog sadržaja masti.
- ▲ Na osnovu rezultata sadržaja ukupnih i pojedinačnih grupa fenola (ukupnih flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina) i antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka različitih vrsta čokolada sa i bez dodatka probiotskih bakterija, potvrđeno je su ekstrakti onih uzoraka koji su imali najviše kakao-delova takođe sadržavali i najviše fenolnih komponenata i istovremeno ispoljavali najveći antioksidativni kapacitet *in vitro* određen FRAP i ABTS metodama. U ovom doktorskom radu nova, polarografska metoda (HPS) po prvi put je primenjena za određivanje AO kapaciteta ekstrakata čokolada. Na osnovu visokih koeficijenata korelacije HPS metode sa standardnim metodama i sadržajem

polifenolnih jedinjenja, potvrđena je njena validnost i mogućnost primene i na kakao-proizvode. Nadalje, može se konstatovati da prisustvo probiotskih kultura nije imalo uticaja, kako na sastav ukupnih i pojedinačnih klasa fenola, tako ni na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka čokolada unutar iste vrste. Antioksidativna aktivnost svih uzoraka čokolada, sa probioticima i bez njih, merena neposredno po završetku proizvodnog procesa, ne razlikuje se značajnije od one utvrđene kod uzoraka koji su stajali u odgovarajućim uslovima 90, odnosno 180 dana. Odsusutvo vremenske zavisnosti antioksidativne aktivnosti kontrolnih i uzoraka čokolada sa probioticima, predstavlja još jednu potvrdu da probiotske bakterije ne remete AO potencijal čokolada u koje su inkorporirane. Takođe, prema podacima za oksidacionu stabilnost masti ekstrahovanih iz analiziranih uzoraka čokolada, dobijenim primenom DSC, evidentno je da ona korelira sa prisustvom antioksidanasa koji usporavaju oksidacione procese, budući da su duže indukcione vreme oksidacije (OIT) i više temperature početka oksidacije (OOT) utvrđene kod uzoraka sa većim sadržajem polifenolnih jedinjenja. Dodatak probiotskih kultura nije ispoljio veće dejstvo na oksidativnu stabilnost masti u okviru iste vrste čokolada.

- ▲ S obzirom da prisustvo probiotika predstavlja dodatnu disperznu fazu u čokoladnim masama različitog sastava, posebno interesantno je bilo ispitivanje njihovih reoloških svojstava, nakon proizvodnje i tokom skladištenja. Upotrebljene probiotske bakterije, generalno, nisu dovele do izmene reoloških karakteristika čokolada u značajnijoj meri. U svim periodima ispitivanja (0-30, 90 i 180 dana), dobijeni su veoma visoki korelacioni koeficijenti sa Casson-ovim modelom proticanja, a vrednosti reoloških parametara su, u najvećem broju slučajeva, odgovarale tipu čokolada. Variranje vrednosti u okviru vrste bila su najmanje uočljiva kod crnih čokolada sa 75 % kakao-delova, potom kod crnih sa 44 % kakao-delova, dok su nešto izraženija bila u grupi mlečnih čokolada. Pored toga, inkluzija probiotskih kultura ispoljila je veći efekat na prinosni napon, nego na plastični i prividni viskozitet različitih čokoladnih masa, koji nisu pretrpeli osetnije promene. Navedeno je bilo naročito uočljivo pri inkorporiranju probiotika koji su se odlikovali nešto krupnijim česticama (D), i to kod onih vrsta čokolada koje su imale najmanju količinu masti koja bi kompenzovala povećanje sadržaja čvrste faze (M). Međutim, navedena pojava nije detektovana u kontinuitetu, s obzirom na to da većina analiziranih

uzoraka čokolada nije pretrpela izraženije promene u pogledu reoloških karakteristika. Povećanje vrednosti prinosnog napona koje je konstatovano u pojedinim slučajevima, se, osim granulacije samih probiotika i njihovog uticaja na način pakovanja čvrstih čestica, može pripisati i nedovoljnoj homogenosti proizvedenih uzoraka, koja je pogodovala agregaciji čestica. Imajući u vidu da se viskozitet čokolada sa probioticima nije znatnije menjao u odnosu na kontrolne čokolade, može se zaključiti da je obogaćivanje različitih vrsta čokolada sa probiotskim bakterijama, u liofilizovanom ili mikroinkapsulisanom obliku, moguće izvesti bez izrazitijih povećanja reoloških parametara. Primena efikasnijih tehnika mešanja i prilagođavanje raspodele čvrstih čestica po veličini svakako bi smanjilo mogućnost odstupanja u vrednostima prinosnog napona.

- ♣ Analiza ambalažnih materijala upotrebljenih za pakovanja ispitivanih vrsta čokolada sa probioticima, koja je obuhvatala utvrđivanje fizičko-mehaničkih karakteristika, određivanje propustljivosti gasova i hermetičnosti vara, je pokazala da su ambalažni materijali zadovoljili kriterijume u pogledu svih ispitivanih svojstva, sa izuzetkom hermetičnosti vara. Nehermetičnost vara na primarnom ambalažnom materijalu može biti jedan od mogućih uzroka opadanja broja aktivnih ćelija pojedinih probiotika u različitim vrstama čokolada, što se posebno odnosi na bifidobakterije.
- ♣ Imajući u vidu sve do sada izloženo, a na temelju rezultata dobijenih u uslovima prikazanog eksperimenta, nepobitno je dokazano da je moguće proizvesti različite vrste čokolada sa probioticima, koje, zbog objedinjenih terapijskih efekata dodatih probiotika i prisutnih polifenolnih jedinjenja, predstavljaju novi proizvod sa funkcionalnim svojstvima. Dalja istraživanja u ovoj oblasti bi trebalo usmeriti na iznalaženje efikasnijih tehnika dispergovanja probiotika, što bi doprinelo dobijanju proizvoda vrhunskog kvaliteta i omogućilo kontinualnu proizvodnju u industrijskim uslovima. Generalno se može zaključiti da razvoj tehnologije proizvodnje čokolada sa probioticima, svakako ima perspektivu, ne samo sa aspekta proširenja asortimana konditorskih proizvoda, već i sa aspekta prilagođavanja potrebama potrošača koje su, sve više, u skladu sa savremenim trendovima proizvodnje funkcionalne hrane.

## 7. LITERATURA

- Abbasi, S., Farzanmehr, H. (2009): Optimization of the Formulation of Prebiotic Milk Chocolate Based on Rheological Properties, *Food Technology and Biotechnology* 47, 4, 396–403.
- Abbe Maleyki, M. J., Amin, I. (2008): Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* 13, 2190-2219.
- Abe, F., Miyachi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. (2009): Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form, *International Journal of Dairy Technology* 62, 2, 234-239.
- Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., Kremers, B. G., Hammerstone, J. F., Rucker, R. B., Ritter, K. A., Schmitz, H. H. (1999): HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 10, 4184–4188.
- Aeschlimann, J.-M., Beckett, S. T. (2000): International inter-laboratory trials to determine the factors affecting the measurement of chocolate viscosity, *Journal of Texture Studies* 31, 5, 541-576.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M. (2007): Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review, *Trends in Food Science and Technology* 18, 290-298.
- Afoakwa, E. O. (2008): Cocoa and Chocolate consumption – Are there aphrodisiac and other benefits for human health? *The South African Journal of Clinical Nutrition* 21, 3, 107-113.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. (2008a): Effects of tempering and fat crystallisation behaviour on microstructure, mechanical properties and appearance in dark chocolate systems, *Journal of Food Engineering* 89, 128-136.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008b): Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 840–857.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. (2008c): Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates, *Journal of Food Engineering* 87, 181–190.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. (2009a): Comparison of rheological models for determining dark chocolate viscosity, *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1, 162-167.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. (2009b): Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered dark chocolates, *Journal of Food Engineering* 91, 4, 571-581.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2009c): Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry, *Food Chemistry* 113, 208-215.
- Afoakwa, O. E. (2010): *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell, SAD.
- Ahvenainen, R. (2003): *Novel Food Packaging Technoloques*, VTT, Biotechnology, Finland.
- Ali, A., Selamat, J., Che Man, Y. B., Suria, A. M. (2001): Effect of storage temperature on texture, polymorphic structure, bloom formation and sensory attributes of filled dark chocolate, *Food Chemistry* 72, 4, 491 – 497.
- Allen, R. R., Carson, L. A., Kwik-Urbe, C., Evans, E. M., Erdman, J. W. Jr. (2008): Daily Consumption of a Dark Chocolate Containing Flavanols and Added Sterol Esters Affects Cardiovascular Risk Factors in a Normotensive Population with Elevated Cholesterol, *The Journal of Nutrition* 138, 725-731.
- Altimiras, P., Pyle, L., Bouchon, P. (2007): Structure–fat migration relationships during storage of cocoa butter model bars: Bloom development and possible mechanisms, *Journal of Food Engineering* 80, 600-610.

- Andrae-Nightingale, L. M., Lee, S.-Y., Engeseth, N. J. (2009): Textural changes in chocolate characterized by instrumental and sensory techniques, *Journal of Texture Studies* 40, 427–444.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyrek, M., Celik, S. E., Bektasoglu, B., Berker, K. I., Ozyurt, D. (2007): Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules* 12, 1496-1547.
- Appel, L., Moore, F., Obarzanek, E., Vollmer, W. N., Svetkey, L. P., Sacks, F. M., Bray, G. A., Vogt, T. M., Cutler, J. A., Windhauser, M. M., Lin, P. H., Karanja, N. (1997): A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure, *New England Journal of Medicine* 16, 336, 1117–1124.
- Aragon-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., Cardarelli, H. R., Chiu, M. C., Saad, S. M. I. (2007): Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse, *LWT – Food Science and Technology* 40, 667-675.
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.-D., Del Grosso, E., Minassi, A., Appendino, G., Mortelli, A. (2008): Roasting impact on the contents of clovamide (*N*-caffeoyl-*L*-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), *Food Chemistry* 106, 967-975.
- Aronhime, J., Sarig, S., Garti, N. (1988): Dynamic Control of Polymorphic Transformations in Triglycerides by Surfactants: the Button Syndrome, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65, 7, 1144-1150.
- Aronhime, J., Sarig, S., Garti, N. (1990): Emulsifiers as additives in fats: Effect of polymorphic transformations and crystal properties of fatty acids and triglycerides, *Food Structure* 9, 337-352.
- Ashitani, H., Kamiwaki, T. (2005): Colour of chocolate-differences and characteristics of cocoa beans, *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* 210, 12, 1145-1151.
- ASTM (1995): Standard test method for specular gloss. Designation D 523. In 1995 Annual book of ASTM standards. Volume 6.01: Paint-test for chemical, physical and optical properties: appearance, durability of non-metallic materials. Philadelphia: American Society for Testing Materials.
- ASTM E 1858-08: Određivanje indukcionog vremena oksidacije ugljovodonika metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.
- ASTM E 2009-08: Određivanje temperature početka oksidacije ugljovodonika metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.
- Attaie, H., Breitschuh, B., Braun, P., Windhab, E. J. (2003): The functionality of milk powder and its relationship to chocolate mass processing, in particular the effect of milk powder manufacturing and composition on the physical properties of chocolate masses, *International Journal of Food Science and Technology* 38, 325–335.
- Baigrie, B. (Ed.) (2003): Taints and off-flavours in food, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 80.
- Bate-Smith, E. C. (1954): Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues, *Biochemical Journal* 58, 1, 122–125.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., Williamson, M. P. (1997): Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation, *Biochemistry* 36, 5566—5577.
- Beckett, S.T. (2002): The science of chocolate, I izdanje, Cambridge, Royal Society of Chemistry, UK.
- Beckett, S.T. (Ed.) (2009): *Industria Chocolate Manufacture and Use*, IV izdanje. Wiley-Blackwell, SAD.
- Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Kovačević-Ganić, K., Karlović, D. (2009a): Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition, *Food Research International* 42, 707-7016.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Božanić, R. (2009b): Mlijeko u prahu kao sirovina za proizvodnju mliječne čokolade, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4, 3-4, 109-115.

- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay, *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J. P. (2006): Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments, *FEMS Microbiology Review* 30, 487–513.
- Bolduc, M.-P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P., Vuilleumard, J.-C. (2006): Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk, *International Dairy Journal* 16, 1038-1048.
- Bolenz, S., Thiessenhusen T., Schäpe R. (2003): Influence of milk components on properties and consumer acceptance of milk chocolate, *European Food Research and Technology* 216, 28-33.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Hannum, S. M., Gershwin, M. E. (2004): Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability and Health Implications, *Journal of Medicinal Food* 3, 2, 77-105.
- Bourne, C. M. (2002): Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement, Academic Press, New York.
- Boutin, B. (1997): Finishing agents, *The Manufacturing Confectioner* 68, 10, 102 – 109.
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., Reinheimer, J. A. (2004): Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards, *International Dairy Journal* 14, 375-387.
- Bricknell, J., Hartel, R.W. (1998): Relation of fat bloom in chocolate to polymorphic transition of cocoa butter, *Journal of the American Oil Chemists' Society Biotechnology*. Symposium, Chicago, IL, ETATS-UNIS (12/05/98) 75, 11, 1471-1856 (16 ref.), 1609-1615.
- Briggs, J.L., Wang, T. (2004): Influence of Shearing and Time on the Rheological Properties of Milk Chocolate During Tempering, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81, 2, 117-121.
- Briones, V., Aguilera, J.M. (2005): Image analysis of changes in surface color of chocolate, *Food Research International* 38, 1, 87 – 94.
- Briones, V., Aguilera, J. M., Brown, C. (2006): Effect of surface topography on color and gloss of chocolate samples, *Journal of Food Engineering* 77, 776 – 783.
- Brown, A. C., Valiere, A. (2004): Probiotics and Medical Nutrition Therapy, *Nutrition in Clinical Care* 7, 2, 56-68.
- Bruce, A. W., Reid, G. (2003): Probiotics and urologist, *The Canadian Journal of Urology* 10, 2, 1785-17899.
- Bruinsma, K., Taren, D. L. (2003): Chocolate: Food or Drug? *Journal of American Dietetic Association* 99, 10, 1249-1256.
- Brunello, N., Mc Gauley, S.E., Marangoni A. (2003): Mechanical properties of cocoa butter in relation to its crystallization behavior and microstructure, *LWT – Food Science and Technology* 36, 5, 525-532.
- BS 5098:1985: Glossary of terms relating to sensory analysis of food, BSI, London.
- Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J., Kromhout, D. (2006): Cocoa Intake, Blood Pressure and Cardiovascular Mortality, *Archives of Internal Medicine* 166, 411-417.
- Buijsse, B., Weikert, C., Drogan, D., Bergmann, M., Boeing, H. (2010): Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults, *European Heart Journal* doi:10.1093/eurheartj/ehq068.
- Bureau, G., Multon, J. L. (1996): Food Packaging Technology. Vol 1, VCH Publisher, Inc, New York, Weinheim, Cambridge.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, K. S., Tarkama, J. S., Bernaert, H., De Vuyst, L. (2008): Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2288-2297.



- Carić, M. (2010): Uticaj probiotika i prebiotika na funkcionalna svojstva crne i mliječne čokolade, Doktorska disertacija, Univerzitet u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2004): Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Biotechnology Progress* 20, 248-254.
- Cervellati, R., Greco, E., Costa, S., Guerra, M. C., Speroni, E. (2008): A comparison of antioxidant properties between artisan-made and factory-produced chocolate, *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1866–1870.
- Champagne, C. P., Gardner, N J., Roy, D. (2005): Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 1, 61-84.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004): An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions, *Journal of Microbiological Methods* 56, 27-35.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998): Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract, *Journal of Applied Microbiology* 84, 759–768.
- Christian, J. H. B. (2000): Draying and Reduction of Water Activity. U: Lund, B. M., Baird-Parker, T., Gould, G. W.: The Microbiological Safety and Quality of Products, vol. I, poglavlje 7, 150-154. Aspen Publishers, Inc. Maryland, SAD.
- Choi, Y. J., McCarthy, K. L., McCarthy, M. J., Kim, M. H. (2007): Oil migration in chocolate, *Applied Magnetic Resonance* 32, 205-220.
- Codex standard for chocolate and chocolate products (codex stan 87-1981, Rev. 1 – 2003).
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007): Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus, *Letters in Applied Microbiology* 45, 454-460.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008): Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains, *European Food Research and Technology* 226, 5, 1065-1073.
- Collado, M. C. (2009): Role of probiotics in health and diseases, U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 257-259.
- Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., De Pablo, J. J. (2000): Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in Saccharide Matrices, *Cryobiology* 41, 17–24 .
- Cooper, K., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., Williamson, G. (2008a): Cocoa an health: A decade of research, *British Journal of Nutrition* 99, 1-11.
- Cooper, K., Campos-Gimenez, E., Jimenez-Alvarez, D., Rytz, A., Nagy, K., Williamson, G. (2008b): Predictive Relationship between Polyphenol and Nonfat Cocoa Solids Content of Chocolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 260-265.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005): Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars, *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6, 3060-3067.
- Cordier, J.-L. (2000): Sugars, Honey, Cocoa, Chocolate and Confectionery. U: Lund, B. M., Baird-Parker, T., Gould, G. W.: The Microbiological Safety and Quality of Products, vol. I, poglavlje 35, 951. Aspen Publishers, Inc. Maryland, SAD.
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., Collin, S. (2002): Use of Gas Chromatography-Olfactometry To Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2385-2391.
- Counet, C., Collin, S. (2003): Effect of the Number of Flavanol Units on the Antioxidant Activity of

- Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6816-6822.
- Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A. M., Granato, D., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. (2010): Sensory Analysis: Relevance for Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Product Development, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 358-373.
- Crittenden, R. (2004): An Update on Probiotic Bifidobacteria, U: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Ed.): Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects, poglavlje 3, 125-158, III izdanje, Marcel Dekker, Inc., New York, SAD.
- Crittenden, R. (2009): Incorporating probiotics into foods, U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 58-75.
- Cummings, J. H., Gibson, G. R., Macfarlane, G. T. (1989): Qualitative Estimates of Fermentation in the Hind Gut of Man, *Acta Veterinaria Scandinavica* Suppl. 86, 76-82.
- Curaković, M., Vujković, I., Gvozdenović, J., Lazić, V. (1991): Praktikum - Kontrola ambalažnih materijala i ambalaže, II dopunjeno izdanje, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Da Cruz, A., Faria, J. A. F., Van Dender, A. G. F. (2007): Packaging system and probiotic dairy foods, *Food Research International* 40, 951-956.
- Dalzell, S. A., Kerwen, G. (1998): A rapid method for the measurement of *Leucaena* spp proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78, 3, 405-416.
- Daniel, C., Poiret, S., Goudercourt, D., Dennin, V., Leyer, G., Pot, B. (2006): Selecting Lactic Acid Bacteria for Their Safety and Functionality by Use of a Mouse Colitis Model, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 9, 5799-5805.
- D'Archivio, M., Santangelo, C., Scazzocchio, B., Vari, R., Filesì, C., Masella, R., Giovannini, C. (2008): Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention, *International Journal of Molecular Sciences* 9, 213-228.
- Dave, R. I., Shah, N. P. (1997): Effectiveness of Ascorbic Acid as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures, *International Dairy Journal* 7, 435-443.
- De Graef, V., Depypere, F., Minnaert, M., Dewettinck, K. (2011): Chocolate yield stress as measured by oscillatory rheology, *Food Research International* 44, 9, 2660-2665.
- De Oliveira, C.K., Valdecir, L., De Nazare, H. M. J. (2004): Tempering or precrystallization of chocolate, *Brazilian Journal of Food Technology* 7, 1, 23-30.
- De Smet, I., De Boever, P., Verstraete, W. (1998): Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity, *British Journal of Nutrition* 79, 185-194.
- Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002): Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia, *Journal of Applied Microbiology* 93, 1003-101.
- Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, S., Ross, R. P. (2004): Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 10, 5929-5936.
- De Vres, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J. (2001): Probiotics compensation for lactase insufficiency, *American Journal of Clinical Nutrition* 73 421S-429S.
- Dibildox-Alvarado, E., Rodrigues, N. E., Gioielli, L. A., Toro-Vazquez, J. F., Marangoni, A. G. (2004): Effects of Crystalline Microstructure on Oil Migration in a Semisolid Fat Matrix, *Crystal Growth and Design* 4, 4, 731-736.
- Dillinger, T. L., Barriga, P., Escarcega, S., Jimenez, M., Salazar-Lowe, D., Grivetti, L. E. (2000): Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate, *The Journal*

of *Nutrition* 2057S-2072S.

- Dimick, P. S., Manning, D. M. (1987): Thermal and compositional properties of cocoa butter during static crystallization, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64, 12, 1663 – 1669.
- DIN 53380: Fizičko-hemijska ispitivanja ambalažnih materijala: Određivanje propustljivosti gasova i vazduha.
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., Girotra, S. (2006): Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review, *Nutrition and Metabolism* 3, 2, Open Access.
- Ding, W. K., Shah, N. P. (2009): Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria, *Food Microbiology and Safety* 74, 2, 100-107.
- Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989): Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini, *L' Enotecnio* 25, 83-89.
- Do, T-A. L., Hargreaves, J. M., Wolf, B., Hort, J., Mitchell, J. R. (2007): Impact of Particle Size Distribution on Rheological and Textural Properties of Chocolate Models with Reduced Fat Content, *Food Engineering and Physical Properties* 72, 9, 541-552.
- Doleyres, Y., Lacroix, C. (2005): Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection, *International Dairy Journal* 15, 10, 973-988.
- Drewnowski, A., Schwartz, M. (1990): Invisible fats: Sensory assessment of sugar/fat mixtures, *Appetite* 14, 3, 203-217.
- Duda-Chodac, A., Tarko, T., Statek, M. (2008): The effects of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures, *Acta Scientiarum Polonorum, Technol Aliment* 7, 4, 39-51.
- Duncan, S. E., Webster, J. B. (2009): Sensory Impact of Food-Packaging Interactions, *Advances in Food and Nutrition Research* 56, 17-64.
- Durrschmid, K., Albrecht, U., Schleining, G., Kneifel, W. (2006): Sensory Evaluation of Milk Chocolates as an Instrument of New Product Development, International Union of Food Science and Technology 1331-1332, DOI: 10.1051/IUFoST:20060822, <http://iufost.edpsciences.org>.
- Đaković, Lj. (1985): Koloidna hemija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Engelbrekston, A. L., Korzenik, J. R., Sanders, M. E., Clement, B. G., Leyer, G., Klaenhammer, T. R., Kitts, C. L. (2006): Analysis of treatment effects on themicrobial ecology of the human intestine, *FEMS Microbiology Ecology* 57, 239-250.
- Engler, M. B., Engler, M. M. (2004): The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate, *Nutrition Research* 24, 695–706.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2006): Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 266–272.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2007): Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis, *Clinical Microbiology and Infection* 13, 657-664.
- Fernandez-Murga, L., Tarin, J. J., Garcia-Perez, M. A., Cano, A. (2011): The impact of chocolate on cardiovascular health, *Maturitas* 69, 4, 312-321.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., De Natale, A., Pollio, A. (2009): Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), *Fitoterapia* 80, 255-262.
- Fischer, P., Windhab, E. J. (2011): Rheology of Food Materials, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 16, 1, 36-40.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (2001): Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (2006): Probiotics in Food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, *FAO Food and Nutrition Paper 85*, Rome, Italy, ISBN 92-5-105513-0.
- Foubert, I. (2003): Modelling isothermal cocoa butter crystallization: influence of temperature and chemical composition, Doktorska disertacija, Fakultet za poljoprivredu i primenjenu biologiju, Univerzitet u Gentu, Belgija.
- Foubert, I., Vanrolleghem, P. A., Dewettinck, K. (2003): A differential scanning calorimetry method to determine the isothermal crystallization kinetics of cocoa butter, *Thermochimica Acta* 400, 131-142.
- Franke, K., Heinzelmann, K. (2008): Structure improvement of milk powder for chocolate processing, *International Dairy Journal* 18, 9, 928-931.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Gabriele, D., Miglori, M., Baldino, N., De Cindio, B. (2008): Influence of Fat Content on Chocolate Rheology, Proceedings of the XV International Congress on Rheology: The Society of Rheology 80<sup>th</sup> annual meeting 1027, 1265-1267., Monterey, California, USA.
- Garti, N., Schlichter, J., Sarig, S. (1986): Effect of food emulsifiers on polymorphic transition of cocoa butter, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63, 2, 230-236.
- Gavrilović, M. (2003): Tehnologija konditorskih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., Gopal, P. K. (2001): Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019, *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 833-839.
- Glavina, D. (2010): Probiotički proizvodi u prevenciji karijesa, *Pediatrics Croatia* 54, 1, 169-175.
- Gobec, B. (1965): Tehnologija čokolade, bonbona i deserata, Moša Pijade, Zagreb.
- Goldman, F. (2006): Sugar substitute and bulking agent and chocolate. U.S. Patent Application, Number 20,060,088,637.
- Goldoni, L. (2004): Kakao-proizvodi i proizvodi slični čokoladi, Kugler, Zagreb.
- Goldin, B., Gorbach, S. (1992): Probiotics for humans, U: Probiotics: The Scientific Basis. Ed. R. Fuller. Chapman and Hall, London, England, 355-376.
- Golob, T., Mičović, E., Bertonec, J., Jamnik, M. (2004): Sensory acceptability of chocolate with inulin, *Acta agriculturae slovenica* 83, 2, 221-231.
- Goncalves, E. V., Lannes, S. C. da S. (2010): Chocolate rheology, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 4, 845-851.
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E. (1992): Digital image processing (282-325), II izdanje, Boston, MA: Addison-Wesley Longman Publishing Co. Inc.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., Gill, S. H. (2001): In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*, *International Journal of Food Microbiology* 67, 3, 207-216.
- Gorjanović, S., Novaković, M., Potkonjak, N., Leskošek-Čukalović, I., Sužnjević, D. (2010a): Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2, 744-751.
- Gorjanović, S., Novaković, M., Potkonjak, N., Sužnjević, D. (2010b): Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4626-4631.
- Gorjanović, S., Novaković, M., Vukosavljević, P., Pastor, F., Tešević, V., Sužnjević, D. (2010c):

- Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 14, 8400–8406.
- Gorjanović, S., Rabrenović, B., Novaković, M., Dimić, E., Basić, Z., Sužnjević, D. (2011): Cold-Pressed Pumpkin Seed Oil Antioxidant Activity as Determined by a DC Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88, 1875–1882.
- Grujić, S. (2003): Model upravljanja kvalitetom prehrambenih proizvoda kao osnova za zaštitu geografskih oznaka porijekla meda, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci.
- Gouin, S. (2004): Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science and Technology* 15, 330–347.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. (2010): Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts and Products, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 292-302.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J. B., Ferri, C. (2008): Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects after 15 Days of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate, *The Journal of Nutrition* 138, 1671-1676.
- Greene, J. D., Klaenhammer, T. R. (1994): Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cell, *Applied and Environmental Microbiology* 60, 12, 4487-4494.
- Gu, L. Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haztowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. L. (2003): Concentration of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption, *The Journal of Nutrition* 134, 613-618.
- Gu, L., House, S.E., Wu, X., Ou, B., Prior, R. L. (2006): Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4057-4061.
- Guerin, D., Vuilleumard, J.-C. Subirade, M. (2003): Protection of Bifidobacteria Encapsulated in Polysaccharide-Protein Gel Beads against Gastric Juice and Bile, *Journal of Food Protection* 66, 11, 2076-2084.
- Guinard, J. X., Mazzuchelli, R. (1999): Effect of sugar and fat on the sensory properties of milk chocolate: descriptive analysis and instrumental measurement, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 11, 1331–1399.
- Guth, O.J., Aronhime, J., Garti, N. (1989): Polymorphic transitions of mixed triglycerides, SOS, in the presence of sorbitan monostearate, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66, 11, 1606-1613.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J. F. (1998): Reversed-phase HPLC thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissues zones of French cider apple variety (*Malus domestica* var. *Kermerrien*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1698–1705.
- Guyton, C. A. (1985): Medicinska fiziologija. Medicinska knjiga. Beograd-Zagreb.
- Gvozdenović, J., Lazić, V. (2008): Pakovanje i održivost prehrambenih proizvoda, *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi / PTEP* 12, 1-2, 27-30.
- Hadnađev, M. (2012): Funkcionalne karakteristike smeša maltodekstrina i namenske masti kao komponenti niskoenergetskih masnih punjenja za konditorske proizvode, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., Schmitz, H. H. (1999): Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 490–496.

- Hartel, R.W. (1999): Chocolate: fat bloom during storage (The influence of structural elements). 53<sup>rd</sup> PMCS Production Conference, 80–90.
- Hartel, R. W. (2001): Crystallisation in Foods. Aspen Publishers Inc., SAD.
- Havenaar, R., Huis In't Veld, J. (1992): Probiotics. A General View, U: Wood J.B.J. (Ed.) Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Vol 1. Elsevier Applied Science Publisher; London, 151-170.
- Heasman, M., Mellentin, J. (2001): The Functional Foods Revolution Healthy people, healthy profits? Earthscan Publications, Ltd., London, Sterling, VA.
- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., Fleet, G. H. (2004): Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert, *LWT – Food Science and Technology* 37, 461-466.
- Heiser, C. R., Ernst, J. A., Barrett, J. T., French, N., Schulz, M., Dube, M. P. (2004): Probiotics, soluble fiber, and L-Glutamine (GLN) reduce nelfinavir (NFV)-or lopinavir/ritonavir (LPV/r)-related diarrhea, *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care* 3, 4, 121-129.
- Henderson, J. S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, W. J., McGovern, P. E. (2007): Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverage, *Proceedings of the National Academy of Science* 104, 48, 18937-18940.
- Hodge, S. M., Rousseau, D. (2002): Fat Bloom Formation and Characterization in Milk Chocolate Observed by Atomic Force Microscopy, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 11, 1115-1121.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365S-373S.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., A Le Cornu, K., Ryder, J. J., Hall, W. L., Cassidy, A. (2008): Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 38-50.
- Hojsak, I. (2010): *Lactobacillus* GG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u kolektivu, Doktorska disertacija, Univerzitet u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- Hu, M. (2007): Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms, *Molecular Pharmacology* 4, 6, 803–806.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005): The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6, 1841-1856.
- Hunter Lab (1996a): XYZ – CIE tristimulus values, *Insight on color*, 1–15, 8, 1.
- Hunter Lab (1996b): XYZ CIE chromaticity coordinates. *Insight on color*, 16–30, 8, 2.
- Hunter Lab (1996c): CIE L\*a\*b\* color scale. *Insight on color*, 1–15, 8, 7.
- Hunter Lab (2000): What is color and how is measured: *Insight on color*, 12, 5.
- Hunter Lab (2001): Hunter Lab versus CIE 1976 L\*a\*b\* color scale. *Insight on color*, 1–15, 13, 2.
- Hutchings, J. B. (1994): Food colour and appearance, II izdanje, Aspen Publishers, Inc.
- Hurst, W. J., Payne, M. J., Miller, K. B., Stuart, D. A. (2009): Stability of Cocoa Antioxidants and Flavan-3-ols over Time, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9547-9550.
- International Confectionery Association (ICA) (2000): Viscosity of Cocoa and Chocolate Products. Analytical Method 46.
- ISO 5496: 1992 E: Sensory analysis – Methodology – Initiation and training of assessors in the detection and recognition of odours.
- ISO 8586-1:1993E: Sensory analysis – General guidance for the selection, training and monitoring of

- assessors.
- ISO 8586-2: 1994E: Sensory analysis – General guidance for the selection, training and monitoring of assessors – Part 2: Experts.
- ISO 11036:1994 E: Sensory analysis-Methodology-texture profile.
- ISO/FDIS 11037:1999 E: Sensory analysis – General guidance and test method for assessment of the colour of foods.
- James, B., Smith, B. (2009): Surface structure and composition of fresh and bloomed chocolate analysed using X-ray photoelectron spectroscopy, cryo-scanning electron microscopy and environmental scanning electron microscopy, *LWT – Food Science and Technology* 42, 929-937.
- Janković, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., Mercenier, A. (2010): Application of probiotics in food products—challenges and new approaches, *Current Opinion in Biotechnology* 21, 175–181.
- Jovanović, B., Pribiš, V., Pajin, B., Torbica, A. (2000): Svetloća boje površine pokazatelj kvaliteta čokolade, *Acta Periodica Technologica* 31, 1-748, 265-272.
- Jovanović, O., Pajin, B. (2002): Sensory and instrumental evaluation of physical characteristics of laboratory-made chocolate, *Acta Periodica Technologica* 33, 1-174, 19-25.
- Jovanović, O., Pajin, B. (2004): Influence of lactic acid ester on chocolate quality, *Trends in food Science and Technology* 15, 128-136.
- Kailasapathy, K., Chin, J. (2000): Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp., *Immunology and Cell Biology* 78, 80-88.
- Kailasapathy, K. (2002): Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications, *Current Issues in Intestinal Microbiology* 3, 39-48.
- Kailasapathy, K. (2006): Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *LWT – Food Science and Technology* 39, 1221-1227.
- Karnjanolarn, R., Mc Carthy, K. L. (2006): Rheology of different formulations of milk chocolate and the effect on coating thickness, *Journal of Texture Studies* 37, 668–680.
- Kataria, J., Li, N., Wynn, J. L., Neu, J. (2009): Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial?, *Nutrition Reviews* 67, 9, 546-550.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K., Niimura, Y. (2006): Response of the Microaerophilic *Bifidobacterium* Species, *B. boum* and *B. thermophilum* to Oxygen, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 10, 6854–6858.
- Kaylegian, K.E. (1999): The Production of Specialty Milk Fat Ingredients, *Journal of Dairy Science* 82, 7, 1433-1439.
- Kealey, K. S., Snyder, R. M., Romanczyk, Jr., L. J., Geyer, H. M., Myers, M. E., Whitacre, E. J., Hammerstone, Jr., J. F., Schmitz, H. H. (2001): Cocoa components, edible products having enriched polyphenol content, method of making same and medical uses, United States Patent 6312753B1.
- Keijbets, E. L., Chen, J., Vieira, J. (2010): Chocolate demoulding and effects of processing conditions, *Journal of Food Engineering* 98, 133-140.
- Kelishadi, R. (2005): Cacao to cocoa to chocolate: Healthy Food? *ARYA Atherosclerosis Journal*, 1,1, 29-35.
- Kennedy, J., Heymann, H. (2009): Projective mapping and descriptive analysis of milk and dark chocolates, *Journal of Sensory Studies* 24, 220–233.
- Kilcast, D., Subramaniam, P. (Ed.) (2000): The stability and shelf-life of food, II izdanje, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
- Kitajima, H., Sumida, Y., Tanaka, R., Yuki, N., Takayama, H., Fujimura, M. (1997): Early administration of

- Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial, *Archives of Disease in Childhood* 76, 101-107.
- Klaver, F. A. M., Van der Meer, R. (1993): The Assumed Assimilation of Cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* Is Due to Their Bile Salt Deconjugation Activity, *Applied and environmental microbiology* 59, 4, 1120-1124.
- Keogh, K., Murray, C., O'Kennedy, B. (2003): Effects of selected properties of ultrafiltered spray-dried milk powders on some properties of chocolate, *International Dairy Journal* 13, 719-726.
- Keogh, K., Murray, C., Kelly, J., O'Kennedy, B. (2004): Effect of the particle size of spray-dried milk powder on some properties of chocolate, *Lait* 84, 375-384.
- Koc, A. B., Heinemann, P. H., Ziegler, G. R. (2003): A process for increasing the free fat content of spray-dried whole milk powder, *Journal of Food Science* 68, 1, 2010-216.
- Kostić, S. (1998): Praktikum iz tehnologije gotove hrane, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Kotikalapudi, B. L. (2009): Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix, Magistarska teza, Univerzitet u Saskatchewan-u, Fakultet za poljoprivredu i bioresurse, Institut za nauku o hrani i bioproizvodima, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada.
- Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., Kanellaki, M. (2006): Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces, *Journal of Dairy Science* 89, 1439-1451.
- Kris-Etherton, P. M., Mustad, V. A. (1994): Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipideffects of stearic acid, *American Journal of Clinical Nutrition* 60, 1029S-1036S.
- Kruger, C. (2009): Sugar and bulk sweetener. U: Beckett, S. T. (Ed.), *Industrial chocolate manufacture and use*, poglavlje 3, 48-75. IV izdanje. Wiley-Blackwell, SAD.
- Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Forsell, P., Myllarinen, P. (2007): Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains, *Letters in Applied Microbiology* 44, 500-505.
- Laličić, J. (2007): Uticaj sastava i vremena skladištenja na odabrana svojstva kvaliteta različitih vrsta čokolada, Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet-Beograd.
- Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Perez, A. I., Andres-Lacueva, C., Tornero, A. (2005): Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids, *Food Science and Technology International* 11, 3, 159-176.
- Lanoiselle, J.-L., Lecoupeau, J.-P. (2003): The effect of temperature and butter content on the rheological behavior of cocoa mass, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium of Food Rheology and Structure, EURORHEO 2003, 443-444, Zurich, Switzerland.
- Lazarus, S. A., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. (1999): Chocolate contains additional flavonoids not found in tea, *The Lancet* 354, 1825.
- Lazić, V., Gvozdenović, J., Prčić, I., Korhec, G. (2004): Ambalaža i deklaracija proizvoda, *Prehrambena industrija*, No. 1-2: 30-33.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Ruperez, P., Goya, L., Bravo, L. (2007): Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.), *Food Chemistry* 104, 948-954.
- Lee, Y. K. (2009): Effective dosage for probiotic effects, U: *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 52-58.
- Lee, Y. K., Salminen, S. (2009): Effects in Human Health and Disease, U: *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 267-321.



- Le Reverend, B. J. D. (2009): Modelling of the phase change kinetics of cocoa butter in chocolate and application to confectionery manufacturing, Doktorska disertacija, Univerzitet u Birmingham-u, Fakultet za hemijsko inženjerstvo, Birmingham, Velika Britanija.
- Le Reverend, B. J. D., Smart, I., Fryer, P. J., Bakalis, S. (2011): Modelling the rapid cooling and casting of chocolate to predict phase behaviour, *Chemical Engineering Science* 66, 6, 1077-1086.
- Leyer, G. J., Li, S., Mubasher, M. E., Reifer, C., Ouwehand, A. C. (2009): Probiotic Effects on Cold and Influenza-Like Symptom Incidence and Duration in Children, *Pediatrics* 124, 172-179.
- Lian, W.-C., Hsiao, H.- C. Chou, C.-C. (2002): Survival of bifidobacteria after spray-drying, *International Journal of Food Microbiology* 74, 79– 86.
- Liang, B., Hatrel, L.W. (2004): Effects of Milk Powder in Milk Chocolate, *Journal of Dairy Science* 87, 1, 20-31.
- Lippi, G., Franchini, M., Montagnana, M., Favalaro, E. J., Guidi, G. C., Targher, G. (2009): Dark chocolate: consumption for pleasure or therapy? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 28, 482-488.
- Lippi, D. (2010): Chocolate in health and disease, *Maturitas* 67, 195-196.
- LoCasio, R., Mills, D. A., Waterhouse, A. L. (2006): Reduction of catechin, rutin and quercetin levels by interaction with food related microorganisms in a resting state, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2105-2112.
- Loisel, C., Keller, G., Lecq, G., Bourgaux, C., Ollivon, M. (1998): Phase Transition and Polymorphism of Cocoa Butter, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 4, 425-439.
- Lomer, M. C. E., Parkers, G. C., Sanderson, J. D. (2008): Lactose intolerance in clinical practice-myths and realities, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 27, 93-103.
- Lonchampt, P., Hartel, W.H. (2006): Surface bloom on improperly tempered chocolate, *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 159-168.
- Lukacs, G. (1985): Hungarian Scientific Instruments (1).
- MacDougall, D.B. (1988): Colour vision and appearance measurement. In: "Sensory analysis of food", 2<sup>nd</sup> Edition, J.R. Piggot (Ed.), Elsevier, London.
- Maheshwari, B., Reddy, S.Y. (2005): Application of kokum (*Garcinia indica*) fat as cocoa butter improver in chocolate, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1, 135-140.
- Maillard, M., Landyut, A. (2008): Chocolate: an ideal carrier for probiotics, *Teknosciencia* 19, 3, 13-15.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230S– 242S.
- Manojlović, V., Nedović, V., Kailasapathy, K., Zuidam, N.J. (2010): Encapsulation of probiotics for use in food products, U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Ed. Nicolaas Jan Zuidam and Viktor A. Nedović, Springer Dordrecht New York Heidelberg London.
- Marangoni, A. G., McGauley, S. E. (2003): Relationship between Crystallization Behavior and Structure in Cocoa Butter, *Crystal Growth and Design* 3, 1, 95-108.
- Margolles, A., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P. (2009): Screening, identification and characterization *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains, U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 4-24.
- Marteau, P. (2001): Safety aspects of probiotics products, *Scandinavian Journal of Nutrition* 45, 22-24.
- Marteau, P., Boutron-Ruault, M. C. (2002): Nutritional advantages of probiotics and prebiotics, *British Journal of Nutrition* 87, 2, 153-157.
- Maruniak, J. A. (1988): The sense of taste. U: "Sensory analysis of food", II izdanje, J.R. Piggot (Ed.),

- Elsevier, London.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., Saarela, R. (2002): Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal* 12, 173–182.
- McGauley, S. E. (2001): The relationship between polymorphism, crystallization kinetics and microstructure of statically crystallized cocoa butter, Magistarska teza, Univerzitet u Guelph-u, Fakultet za diplomatske studije, Guelph, Ottawa, Kanada.
- Mexis, S. F., Badeka, A. V., Riganakos, K. A., Kontominas, M. G. (2010): Effect of active and modified atmosphere packaging on quality retention of dark chocolate with hazelnuts, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 177–186.
- Mellor, D. D., Sathyapalan, T., Kilpatrick, E. S., Beckett, S., Atkin, S. L. (2010): High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients, *Diabetic Medicine* 27, 1318-1321.
- Metin, S., Hartel, R. W. (1998): Thermal Analysis of Isothermal Crystallization Kinetics in Blends of Cocoa Butter with Milk Fat or Milk Fat Fractions, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 11, 1617-1624.
- Metin, S., Hartel, R. W. (2005): Crystallization of Fats and Oils, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, VI izdanje, Six Volume Set. Fereidoon Shahidi. Copyright, John Wiley & Sons, Inc. 45-75.
- Michener, W., Rozin, P. (1994): Pharmacological Versus Sensory Factors in the Satiation of Chocolate Craving, *Physiology and Behavior* 56, 3, 419-422.
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000): The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer, *Pharmacological Reviews* 52, 4, 674-687.
- Minifie, W.B. (1989): Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology, III izdanje. Aspen Publishers, Inc.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Da Cruz, A. G. (2011): Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties, *Annals of Microbiology* 61, 411–424.
- Morgan, J.M. (1994): Chocolate: a flavor and texture unlike any other, *American Journal of Clinical Nutrition* 60 (6 Suppl), 1065S-1067S.
- Moros, J., Inon, F.A., Garrigues, S., De la Guardia, M. (2007): Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples, *Analytica Chimica Acta* 584, 215-222.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S. (2007): Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, *Iranian Journal of Biotechnology* 5, 1, 1-18.
- Mugnier, J., Jung, G. (1985): Survival of Bacteria and Fungi in Relation to Water Activity and the Solvent Properties of Water in Biopolymer Gels, *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1, 108-114.
- Murphy, E., Murphy, C., O'Mahony, L. (2009): Influence of the Gut Microbiota with Aging, U: Microbiology and Aging: Clinical Manifestations, S.L. Percival, (Ed.), Springer-Verlag, New York, USA.
- Narine, S.S., Marangoni, A.G. (1999): Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review, *Food Research International* 32, 227-248.
- Naruszewicz, M., Johansson, M.-L., Zapolska-Downar, D., Bukowska, H. (2002): Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers, *American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1249-1255.
- Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., Libydzisz, Z. (2005): Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria, *European Food Research and Technology* 220, 358–362.
- Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., Libydzisz, Z. (2007): Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains, *European Food Research Technology* 225, 33–42.

- Nedović, V., Willaert, R. (2004): Methods and Technologies for Cell Immobilisation/Encapsulation, U: Nedović, V., Willaert, R. (Eds.), *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, 8a. Springer, 165-200.
- Nedović, V., Willaert, R. (2005): Applications of cell immobilization biotechnology, U: Nedović, V., Willaert, R. (Eds.), *Focus on Biotechnology*, 8b. Springer, 295–314.
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., Knight, S. C. (2009): Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances, *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 300-310.
- Nightingale, L. M., Lee, S.-Y., Engeseth, N. J. (2011): Impact of Storage on Dark Chocolate: Texture and Polymorphic Changes, *Journal of Food Science* 76, 1, 142-153.
- Novaković, M., Stevanović, S., Gorjanović, S., Jovanović, P., Tešević, V., Janković, M., Sužnjević, D. (2011): Changes of Hydrogen Peroxide and Radical-Scavenging Activity of Raspberry during Osmotic, Convective, and Freeze-Drying. *Journal of Food Science* 76, C663–C668.
- Oda, T., Kado-oka, Y., Hashiba, H. (1994): Effect of *Lactobacillus acidophilus* on iron bioavailability in rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* 40, 6, 613-616.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. (2001): Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage, *Journal of Applied Microbiology* 91, 1059-1066.
- Osawa, K., Miyazaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., Ooshima, T. (2001): Identification of Cariostatic Substances in the Cacao Bean Husk: Their Anti-glycosyltransferase and Antibacterial Activities, *Journal of Dental Research* 80, 11, 2000-20004.
- Otles, S., Cagindi, O., Akcicek, E. (2003): Probiotic and health, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 4, 369-372.
- Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988): *Methods for analysis of must and wine*, II izdanje, John Wiley & Sons, New York.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. (1998): The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria, *International Dairy Journal* 8, 749-758.
- Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Saarinen, M., Putaala, H., Rautonen, N. (2009): Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters, *British journal of Nutrition* 101, 367-375.
- Ouwehand, A. C., Lahtinen, S. (2009): *Lactobacillus acidophilus* NCFM, U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 447-449.
- Pajin, B. (2004): Uticaj frakcija mlečne masti na reološka svojstva i kvalitet čokolade, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Pajin, B., Jovanović, O. (2005): Influence of high-melting milk fat fraction on quality and fat bloom stability of chocolate, *European Food Research and Technology* 220, 389-394.
- Papadakis, S., Abdul-Malek, S., Kamden, R. E., Yam, K. L. (2000): Versatile and inexpensive technique for measuring color of foods, *Food Technology* 54, 12, 48 – 51.
- Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., Kim, H.-Y. (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology* 100, 1171-1185.
- Pastor, C., Santamaria, J., Chiralt, A., Aguilera, J. M. (2007): Gloss and Colour of Dark Chocolate During Storage, *Food Science and Technology International* 13, 1, 2734.
- Patel, P., Parekh, T., Subhash, R. (2008): Development of Probiotic and Symbiotic Chocolate Mousse: A Functional Food, *Biotechnology* 7, 4, 769-774.
- Peleg, M. (1983): The Semantics of Rheology and Texture, *Food Technology* 37, 11, 54-61.

- Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević-Branković, S., Bugarski, B., Lacroix, C. (2007): Protection of probiotic microorganism by microencapsulation, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 13, 3, 169-174.
- Petrović, T. (2011): Mikrokapsulacija potencijalnih probiotika sprej sušenjem i njihovo čuvanje u različitoj ambalaži, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Pimentel, F. A., Nitzke, J. A., Klipel, C. B., De Jong, E. V. (2010): Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content, *Food Chemistry* 120, 109-112.
- Popov-Raljić, J. (1999): Senzorni kvalitet hrane. Prilog u monografiji "Kontrola kvaliteta i bezbjednost namirnica", 69 – 99, Urednik: Grujić, R., Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, Banja Luka.
- Popov-Raljić, J., Gorjanović, R., Laličić, J., Sikimić, V. (2005): Specifičnosti senzornog vrednovanja kvaliteta meda. Zbornik radova XIII naučnog savetovanja sa međunarodnim učešćem, Kvalitet i promet meda i pčela, 32 – 37.
- Popov-Raljić, J., Gorjanović, R., Laličić, J., Sikimić, V. (2006): Uslovi objektivizacije senzornog vrednovanja boje meda, Zbornik radova XIII naučnog savetovanja sa međunarodnim učešćem, Kvalitet i promet meda i pčela, 64 – 71.
- Popov-Raljić, J., Laličić-Petronijević, J., Zarić, V., Popov, V. (2008): Mesto i uloga senzorne analize u definisanju ukupnog kvaliteta hrane kao osnove za povećanje konkurentnosti proizvoda. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet. Simpozijum agroekonomista sa međunarodnim učešćem povodom 45 godina Odsjeka za agroekonomiju. "Agroekonomska nauka i struka u tranziciji obrazovanja i agroprivrede".
- Popov-Raljić, J., Laličić-Petronijević, J. (2009): Sensory Properties and Color Measurements of Dietary Chocolates with different Composition During Storage for Up to 360 days, *Sensors*, 9, 3, 1996-2016.
- Popov-Raljić, J. (2011): Tehnologija šećera i skroba, skripta, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Porter, L. J., Hrstich, L., Chan, B. G. (1986): The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry* 25, 223–230.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2010): Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery, *International Journal of Food Microbiology* 141, 97–103.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P. K. (1999): Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics, *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za kakao-proizvode, čokoladne proizvode, proizvode slične čokoladi i krem – proizvode, Sl. list SCG broj 1/2005.
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama vršenja hemijskih i fizičkih analiza kakao-zrna, kakao-proizvoda, proizvoda sličnih čokoladi, bombonskih proizvoda, krem-proizvoda, keksa i proizvoda srodnih keksu, Sl. list SFRJ broj 41/1987.
- Prescott, S. L., Bjorksten, B. (2007): Probiotics for the prevention of treatment of allergic diseases, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, 255-262.
- Pribiš, V. (1980): Mogućnost određivanja i definisanja boje mesa, Specijalistički rad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Pribiš, V., Filipović, N., Kaluđerski, G., Šarić, M., Paljan, V. (1997): Primena instrumentalnih metoda za objektivnu ocenu vizuelnih i kinestetičkih svojstava proizvoda na bazi žita, *Žito-bleb* 1–2, 28 – 35.
- Prior, R. L., Gu, L. (2005): Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet, *Phytochemistry* 66, 18, 2264-2280.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005): Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290-4302.

- Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2000/2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., Paunović, D. (2010): Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability, *Mljekarstvo* 60, 2, 86-93.
- Radulović, Z., Petrović, T., Bulajić, S. (2012): Antibiotic Susceptibility of Probiotic Bacteria, U: Pana, M. (Ed.): Antibiotic Resistant Bacteria, A Continuous Challenge in the New Millenium, poglavlje 26, 549-576. InTech publisher, Rijeka, Croatia.
- Rafter, J. (2003): Probiotics and colon cancer, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 17, 5, 849-859.
- Rafter, J. (2004): The effects of probiotics on colon cancer development, *Nutrition Research Reviews* 17, 277-284.
- Rajiv, I. D., Shah, N. P. (1997): Effectiveness of Ascorbic Acid as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures, *International Dairy Journal* 7, 435-443.
- Ranadheera, R. D. C. S., Braines, S. K., Adams, M. C. (2010): Importance of food in probiotic efficacy, *Food Research International* 43, 1-7.
- Rao, V. P., Poutahidis, T., Fox, J. G., Erdman, S. E. (2007): Breast Cancer: Should Gastrointestinal Bacteria Be on Our Radar Screen? *Cancer Research* 67, 3, 847-851.
- Rector, D. (2000): Chocolate – Controlling the Flow, 54<sup>th</sup> PMCA Production Conference, 2000.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003): Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medical Research Review* 23, 519–534.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine* 20, 7, 933-956.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Enslin, M., Offord, E. A. (1999): Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate, *European Journal of Clinical Nutrition* 53, 22-26.
- Rijkers, G. T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E., Rabot, S., Rafter, J., Szajewska, H., Watzl, B., Wells, J., Wolvers, D., Antoine, J.-M. (2010): Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research, *The Journal of Nutrition* 140, 671S-676S.
- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J., Wagner, A. E. (2009): Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review, *International Journal of Molecular Sciences* 10, 4290-4309.
- Rivera-Esponzoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010): Non-dairy probiotic products, *Food Microbiology* 27, 1-11.
- Robbins, R., Leonczak, J., Christopher Johnson, J., Li, J., Kwik-Urbe, C., Prior, R. L., Gu, L. (2009): Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples, *Journal of Chromatography A* 1216, 4831-4840.
- Robertson, L. G. (1992): Food Packaging-Principles and Practice, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Rodriguez, C., Medici, M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2010): Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis, *World Journal of Gastroenterology* 16, 13, 1622-1630.
- Ross, C. F. (2009): Sensory science at the human-machine interface, *Trends in Food Science and Technology* 20, 63-72.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2005): Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods, *Journal of Applied Microbiology* 98, 1410–1417.
- Ross, C. F. (2009): Sensory science at the humane - machine interface, *Trends in Food Science and Technology* 20,

63-72.

- Rousseau, D., Smith, P. (2008): Microstructure of fat bloom development in plain and filled chocolate confections, *Soft Matter* 4, 1706-1712.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamaillard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.-F., Ardid, D., Desreumaux, P. (2007): *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors, *Nature Medicine* 13, 35-37.
- Rusconi, M., Conti, A. (2010): *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims, *Pharmacological Research* 61, 5-13.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajarvi, I., Matto, J. (2004): Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria, *Journal of Applied Microbiology* 96, 1205-1214.
- Saarela, M., Virkajarvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., Matto, J. (2006): Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals, *International Journal of Food Microbiology* 112, 2, 171-178.
- Sadadinović, J., Mičević, S., Đonlagić, N., Topčagić, R., Berić, Z. (2005): Praćenje oksidacione stabilnosti masti maslaca i kravljeg masla diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), *Mliječarstvo* 55, 3, 235-243.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Brikeland, S.- E., Mattila-Sandholm, T. (1998): Demonstration of safety of probiotics — a review, *International Journal of Food Microbiology* 44, 93-106.
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Ed.) (2004): Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, III revidirano i prošireno izdanje, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Carmen Collado, M., Vesterlund, S. El-Nezami, H. (2010) :Interaction of Probiotics and Pathogens—Benefits to Human Health? *Current Opinion in Biotechnology* 21,157-167.
- Sanbongi, C., Suzuki, N., Sakane, T. (1997): Polyphenols in Chocolate, Which Have Antioxidant Activity, Modulate Immune Functions in Humans *in Vitro*, *Cellular Immunology* 177, 129-136.
- Sanders, M. E., Klaenhammer, T. R. (2001): The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic, *Journal of Dairy Science* 84, 319-331.
- Sanders, M. E. (2009): How Do We Know When Something Called “Probiotic” Is Really a Probiotic? A Guideline for Consumers and Health Care Professionals, *Functional Food Reviews* 1, 1 3-12.
- Sato, K. (2001): Crystallization behavior of fats and lipids - a review, *Chemical Engineering Science* 56, 7, 2255-2265.
- Sazawal, S., Dhingra, U., Hiremath, G., Sarkar, A., Dhingra, P., Dutta, A., Menon, V. P., Black, R. E. (2010a): Effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 and Prebiotic Oligosaccharide Added to Milk on Iron Status, Anemia, and Growth Among Children 1 to 4 Years Old, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 51, 3, 341-346.
- Sazawal, S., Dhingra, U., Hiremath, G., Sarkar, A., Dhingra, P., Dutta, A., Verma, P., Menon, V. P., Black, R. E. (2010b): Prebiotic and Probiotic Fortified Milk in Prevention of Morbidities among Children: Community-Based, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial, *PLoS ONE* 5, 8.
- Schantz, B., Rohm, H. (2005): Influence of lecithin-PGPR blends on the rheological properties of chocolate, *LWT – Food Science and Technology* 38, 1, 41-45.
- Schenk, H., Peschar, R. (2004): Understanding the structure of chocolate, [Radiation Physics and Chemistry](#)

- 71, 3-4, 829-835.
- Schieberle, P., Pfner, P. (1999): Characterization of key odorants in chocolate. In: Flavor chemistry: Thirty years of progress (Proceedings of an American Chemical Society Symposium, Boston), 147-153.
- Schermann, P., Schieberle, P. (1997): Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 867-872.
- Schlichter-Arnheim, J., Sarig, S., Garti, N. (1988): Reconsideration of polymorphic transformations in cocoa butter using the DSC, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65, 7, 1140-1143.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, B., Timm, W., Acil, Y., Gluer, C.-C., Schrezenmeir, J. (2007): Prebiotic, Probiotic and Synbiotic Affect Mineral Adsorption, Bone Mineral Content and Bone Structure, *The Journal of Nutrition* 137, 838S-846S.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. (2001): Probiotics, prebiotics and symbiotics—approaching a definition, *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361S-364S.
- Schwan, F. R., Wheals, A. E. (2004): The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 4, 205-221.
- Sears, F.W. (1963): Optika, Naučna knjiga, Beograd.
- Selmer-Olsen, E., Sorhaug, T., Birkeland, S.-E., Pehrson, R. (1999): Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 79-85.
- Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., De Santis, S., Crozier, A. (2003): Plasma antioxidants from chocolate—dark chocolate may offer its consumers health benefits the milk variety cannot match, *Nature* 424, 1013.
- Servais, C., Ranc, H., Roberts, I. D. (2007): Determination of chocolate viscosity, *Journal of Texture Studies* 34, 5-6, 467-497.
- Shahidi, F., Han, X.-Q. (1993): Encapsulation of food ingredients, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 6.
- Sheil, B., Shanahan, F., O'Mahony, L. (2007): Probiotic Effects on Inflammatory Bowel Disease, *The Journal of Nutrition* 137, 819S-824S.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T., Tomita, M. (1992): Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* Species, *Journal of Dairy Science* 75, 3296-3306.
- Shu, Q., Zhou, J. S., Rutherford, K. J., Mervyn, J. B., Prasad, J., Pramond, K., Gopal, P. K., Gill, H. S. (1999): Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice, *International Dairy Journal* 9, 11, 831-836.
- Shu, Q., Gill, H. S. (2001): A dietary probiotic (*B. lactis* HN09) reduces severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, *Medical Microbiology and Immunology* 189, 147-152.
- Shu, Q., Qu, F., Gill, H. S. (2001): Probiotic Treatment Using *Bifidobacterium lactis* HN019 Reduces Weanling Diarrhea Associated With Rotavirus and *Escherichia coli* Infection in a Piglet Model, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 33, 171-177.
- Siegrist, M., Stampfli, N., Kastenholz, H. (2008): Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust, *Appetite* 51, 526-529.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation

- substrates and antioxidant means of Folin–Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology* 299, 152–178.
- Sleator, R. D., Hill, C. (2008): New frontiers in probiotic research, *Letters in Applied Microbiology* 46, 143-147.
- Sloan, A. E. (2004): Top 10 Functional Food Trends, *Food Technology* 58, 23-41.
- Snydman, D. R. (2008): The Safety of Probiotics, *Clinical Infectious Diseases* 46, 2, 104-111.
- Sokmen, A., Gunes, G. (2006): Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate, *LWT – Food Science and Technology* 39, 10, 1053-1058.
- Sorensen, L. B., Astrup, A. (2011): Eating dark and milk chocolate: a randomized crossover study of effects on appetite and energy intake, Citation: *Nutrition and Diabetes* 1, e21; doi:10.1038/nutd.2011.17.
- SRPS ISO: 8589: 1998: Opšte uputstvo za projektovanje prostorija za ispitivanje.
- SRPS ISO 5492: 2002 E: Senzorne analize – Rečnik.
- SRPS ISO 11036:2002: Senzorne analize: Metodologija – Profil teksture.
- SRPS ISO 11037: 2002: Senzorske analize – Opšte uputstvo i metoda ispitivanja za ocenjivanje boje prehrambenih proizvoda.
- SRPS ISO 8586-1: 2002: Senzorske analize - Opšte uputstvo za odabir, obuku i praćenje ocenjivača - Deo 1: Odabrani ocenjivači.
- SRPS ISO 8586-2: 2002: Senzorske analize - Opšte uputstvo za odabir, obuku i praćenje ocenjivača - Deo 2: Stručnjaci.
- SRPS G. S2.703:1968: Plastične mase - Ispitivanje veštačke kože - Određivanje debljine.
- SRPS G. S2.702:1968: Plastične mase - Ispitivanje veštačke kože - Određivanje mase po jedinici površine.
- SRPS G.S2.734:1972: Plastične mase - Ispitivanje folija zatezanjem.
- Stahl, L., Miller, K. B., Apgar, J., Sweigart, D. S., Stuart, D. A., McHale, N., Ou, B., Kondo, M., Hurst, W. J. (2009): Preservation of Cocoa Antioxidant Activity, Total Polyphenols, Flavan-3-ols, and Procyanidin Content in Foods Prepared with Cocoa Powder, *Journal of Food Science* 74, 6, C456-C461.
- Stapley, A.G.F., Tewkesbury, H., Fryer, P. J. (1999): The Effects of Shear and Temperature History on the Crystallization of Chocolate, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 6, 677-685.
- Stauffer, M. B. (1998): Chocolate Behavior—What Influences Your Selection? *The Manufacturing Confectioner* 75-79.
- Steinberg, F.M., Bearden, M. M., Keen, C. L. (2003): Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health, *Journal of the American Dietetic Association* 103, 2, 215-223.
- Stone, H., Sidel, J. L. (2004): Sensory evaluation practices. III izdanje, Elsevier, London, Velika Britanija.
- Strand, B. L., Skjak-Braek, G., Gaserod, O. (2004): Methods and Technologies for Cell Immobilisation/Encapsulation, **Microcapsule formulation and formation**, U: Nedović, V., Willaert, R. (Eds.), *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, 8a. Springer, 165-178.
- Sullivan, A., Nord, C. E. (2005): Probiotics and gastrointestinal diseases, *Journal of Internal Medicine* 257, 78-92.
- Sun, B., Da Silva, J. R., Sparnger, I. (1998): Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 10, 4267-4274.
- Sužnjević, D. Ž., Pastor, F. T., Gorjanović, S. Ž. (2011): Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination, *Talanta* 85, 3, 1398-1403.
- Svanberg, L., Ahrne, L., Loren, N., Windhab, E. (2011): Effect of sugar, cocoa particles and lecithin on cocoa butter crystallisation in seeded and non-seeded chocolate model system, *Journal of Food Engineering*, 104, 70-80.



- Svenstrup, G., Heimdal, H., Norgaard, L. (2005): Rapid instrumental methods and chemometrics for the determination of pre-crystallization in chocolate, *International Journal of Food Science and Technology* 40, 9, 953.
- Szczesniak, S. A. (2002): Texture is a sensory property, *Food Quality and Preference* 13, 215-225.
- Šušić, S., Petrov, S., Kukić, G., Sinobad, V., Perunović, P., Kornosovac, B., Bašić, Đ. (1995): Osnovi tehnologije šećera, Univerzitetski udžbenik – Beograd.
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001): Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Symbiotic Effect, *Food Technology and Biotechnology* 39, 3, 227-235.
- Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009): Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4, 3, 77-84.
- Tabasco, R., Sanchez-Patan, F., Monagas, M., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M. V., Pelaez, C., Requena, T. (2011): Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism, *Food Microbiology* 28, 1345-1352.
- Talwalkar, A., Miler, C. W., Kailasapathy, K., Nguyen, M. H. (2004): Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt, *International Journal of Food Science and Technology* 39, 6, 605-611.
- Tamime, A. Y., Božanić, R., Rogelj, I. (2003): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi, *Mlijekarstvo* 53, 2, 111-134.
- Tang, M. (2009): Immune Effects of Probiotic Bacteria, U: *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, II izdanje, Lee, Y. K. i Salminen, S., (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. Publication, 395-399.
- Tarka, S.M. (1982): The toxicology of cocoa and methylxanthines: A review of the literature. *Critical Reviews in Toxicology* 9, 4, 275-312.
- Thamke, I., Durrschmid, K., Rohm, H. (2009): Sensory description of dark chocolates by consumers, *LWT - Food Science and Technology* 42, 534–539.
- Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S. M. I., Tome, E. (2011): Potential Beneficial Properties of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Smoked Salmon, *Journal of Applied Microbiology* 110, 4, 971-986.
- Tokede, O. A., Gaziano, J. M., Djousse, L. (2011): Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis, *European Journal of Clinical Nutrition* 65, 879-886.
- Torbica, A. (2003): Uticaj ekvivalenta kakao-maslaca na fizičke osobine i trajnost čokolade, Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Torbica, A., Jovanović, O., Pajin, B. (2005): The advantages of the solid fat content determination in cocoa butter and cocoa butter equivalents by the Karlshamns method, *European Food Research and Technology* 22, 3-4, 385-391.
- Tournier, C., Sulmont-Rosse, C., Guichard, E. (2007): Flavour Perception: Aroma, Taste and Texture Interactions, *Food* 1,2, 246-257.
- Trezza, T. A., Krochta, J., M. (2000): The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time, *Journal of Food Science* 65, 4, 658.
- Twetman, S., Steckslen-Blicks, C. (2007): Probiotics and oral health effects in children, *International Journal of Paediatric Dentistry* 18, 3-10.
- Ueno, S., Minato, A., Yano, J., Sato, K. (1999): Synchrotron radiation X-ray study of polymorphic crystallization of SOS from liquid phase, *Journal of Crystal Growth* 198/199, 1326-1329.
- Van Aken, G. A., Ten Grotenhuis, E., Van Langevelde, A. J., Schenk, H. (1999): Composition and

- Crystallization of Milk Fat Fractions, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 11, 1323-1331.
- Van Malssen, K., Peschar, R., Schenk, H. (1996): Real-time X-ray powder diffraction investigations on cocoa butter. I. temperature-dependent crystallization behavior, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 10, 1209-1215.
- Van Malssen, K., Van Langevelde, A., Peschar, R., Schenk, H. (1999): Phase Behavior and Extended Phase Scheme of Static Cocoa Butter Investigated with Real-Time X-Ray Powder Diffraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 6, 669-676.
- Verbeke, W. (2006): Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference* 17, 126-131.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., Subhasree, R. S. (2009): Encapsulation "The Future of Probiotics"-A Review, *Advances in Biological Research* 3, 3-4, 96-103.
- Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. (1998): Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods:Vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 9, 3630-3634.
- Vinson, J. A., Proch, J., Zubik, L. (1999): Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate and Milk Chocolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 12, 4821-4824.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. (2001): Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 11, 5315-5321.
- Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S., Taffera, P., Shuta, D., Samman, N., Agbor, G. A. (2006): Chocolate Is a Powerful ex Vivo and in Vivo Antioxidant, an Antiatherosclerotic Agent in an Animal Model, and a Significant Contributor to Antioxidants in the European and American Diets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 21, 8071-8076.
- Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S., Taffera, P., Shuta, D., Samman, N., Agbor, G. (2006): Chocolate Is a Powerful ex Vivo and in Vivo Antioxidant, an Antiatherosclerotic Agent in an Animal Model, and a Significant Contributor to Antioxidants in the European and American Diets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8071-8076.
- Voltz, M., Beckett, S.T. (1997): Sensory of Choacolate, *The Manufacturing Confectioner* 49, Presented at the ZDS Chocolate Technology Conference at Anuga FoodTec.
- Walter, P., Cornillon, P. (2001): Influence of thermal conditions and presence of additives on fat bloom in chocolate, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78, 9, 927-932.
- Werlein, H. D. (2001): Discrimination of chocolates and packaging materials by an electronic nose, *European Food Research and Technology* 212, 529-533.
- Wille, R. L., Lutton, E. S. (1966): Polymorphism of Cocoa Butter, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 43, 491-496.
- Windhab, E. J. (2006): What makes for smooth, creamy chocolate? *Physic today*, quick study 82-83.
- Wolf, B. (2011): Rheological properties of chocolate, *New Food* 14, 2, 15-20.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000a): Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food Research International* 33, 423-447.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000b): Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International* 33, 449-459.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B. L. (2001): Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer, *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 4515-4555.
- WGO (World Gastroenterology Organisation) (2008): Probiotics and Prebiotics, Practice Guideline [www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html](http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html).

[www.lightemittingdiodes.org](http://www.lightemittingdiodes.org)

[www.probiotic.org](http://www.probiotic.org)

[www.maramor.com](http://www.maramor.com)

- Yam, K.L., Papadakis, S.E. (2004): A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces, *Journal of Food Engineering* 61, 137 – 142.
- Zarić, D., Pajin, B., Rakin, M., Šereš, Z., Dokić, Lj., Tomić, J. (2011): Uticaj sojinog mleka na nutritivna, antioksidativna, reološka i teksturalna svojstva čokolade proizvedene u kugličnom mlinu, *Hemijska industrija On Line First Issue*, doi:10.2298/HEMIND110525045Z.
- Zhou, J. S., Rutherford, K. J., Gill, H. S. (2005): Inability of Probiotic Bacterial Strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 To Induce Human Platelet Aggregation In Vitro, *Journal of Food Protection* 68, 11, 2459-2464.
- Zhou, J. S., Gill, H. S. (2005): Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis, *International Journal of Food Microbiology* 103, 1, 97-104.
- Zuidam, N.J., Nedović, V.A. (2010): Encapsulation technologies for food active ingredients and food processing. Springer Dordrecht New York Heidelberg London.
- Zyzelewicz, D., Nebesny, E., Motyl, I., Libudzisz, Z. (2010): Effect of Milk Chocolate Supplementation with Lyophilised *Lactobacillus* Cells on its Attributes, *Czech Journal of Food Sciences* 28, 5, 392-406.

## PRILOG

Tabela P1. Rezultati Tukey-evog testa za ocenjivanje senzornih svojstava mlečnih čokolada sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana

| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) | I Z G L E D                 | T E K S T U R A                                |          |                   |          | A R O M A |       |
|--------|---------------------------|-----------------------------|--|----------|-------------------|----------|-----------|-------|
|        |                           | Boja, sjaj, oblik, površina | Tvrdoća, lomljivost, žvackljivost, adhezivnost | Zrnavost | Vlažnost, masnost | Topivost | Miris     | Ukus  |
| MLD    | 0-30                      | 5.00±                       | 4.75±  | 3.55±    | 4.90±             | 4.85±    | 5.00±     | 4.70± |
|        |                           | 0.00c                       | 0.18ab   | 0.21c    | 0.14a             | 0.22ac   | 0.00a     | 0.21a |
| MLB    | 0-30                      | 4.75±                       | 5.00±  | 4.75±    | 4.80±             | 4.90±    | 5.00±     | 4.60± |
|        |                           | 0.18abc                     | 0.00b  | 0.18ab   | 0.21ab            | 0.14a    | 0.00a     | 0.14a |
| ML L3  | 0-30                      | 5.00±                       | 5.00±  | 4.90±    | 4.90±             | 4.90±    | 5.00±     | 4.80± |
|        |                           | 0.00c                       | 0.00b  | 0.14b    | 0.14a             | 0.14a    | 0.00a     | 0.21a |
| MLD    | 90                        | 4.60±                       | 4.40±  | 4.45±    | 4.70±             | 4.55±    | 4.90±     | 4.60± |
|        |                           | 0.14ab                      | 0.38ac   | 0.27a    | 0.21ab            | 0.11abc  | 0.14ac    | 0.29a |
| MLB    | 90                        | 4.70±                       | 4.70±  | 4.75±    | 4.60±             | 4.75±    | 4.80±     | 4.50± |
|        |                           | 0.21ab                      | 0.21ab   | 0.18ab   | 0.14ab            | 0.25abc  | 0.11abc   | 0.18a |
| ML L3  | 90                        | 4.80±                       | 4.75±  | 4.85±    | 4.70±             | 4.65±    | 4.95±     | 4.70± |
|        |                           | 0.21bc                      | 0.18ab   | 0.14b    | 0.21ab            | 0.14abc  | 0.11a     | 0.21a |
| MLD    | 180                       | 4.50±                       | 4.25±  | 4.40±    | 4.60±             | 4.50±    | 4.65±     | 4.55± |
|        |                           | 0.00a                       | 0.25c  | 0.22a    | 0.14ab            | 0.00bc   | 0.14b     | 0.21a |
| MLB    | 180                       | 4.50±                       | 4.50±  | 4.75±    | 4.50±             | 4.60±    | 4.70±     | 4.40± |
|        |                           | 0.00a                       | 0.00ac   | 0.18ab   | 0.00b             | 0.22abc  | 0.11bc    | 0.22a |
| ML L3  | 180                       | 4.70±                       | 4.60±  | 4.75±    | 4.60±             | 4.40±    | 4.80±     | 4.70± |
|        |                           | 0.11ab                      | 0.14abc  | 0.00ab   | 0.14ab            | 0.22b    | 0.11abc   | 0.21a |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u ispitivanom senzornom svojstvu mlečnih čokolada sa dodatim različitim probioticima tokom skladištenja od 180 dana;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Tabela P2. Rezultati Tukey-evog testa za ocenjivanje senzornih svojstava crnih čokolada (44 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana

| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) | I Z G L E D                 | T E K S T U R A                               |                 |                   |                | A R O M A      |                 |
|--------|---------------------------|-----------------------------|---|-----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|
|        |                           | Boja, sjaj, oblik, površina | Tvrdoća, lomljivost, žvakljivost, adhezivnost | Zrnavost        | Vlažnost, masnost | Topivost       | Miris          | Ukus            |
| MD     | 0-30                      | 4.90±<br>0.14a              | 4.80±<br>0.21ab                               | 4.00±<br>0.18c  | 4.90±<br>0.14ab   | 4.55±<br>0.21a | 5.00±<br>0.00a | 4.95±<br>0.11a  |
| MB     | 0-30                      | 4.85±<br>0.14a              | 4.90±<br>0.14a                                | 4.60±<br>0.14a  | 4.95±<br>0.11a    | 4.60±<br>0.22a | 5.00±<br>0.00a | 4.60±<br>0.14bc |
| ML3    | 0-30                      | 4.80±<br>0.21ab             | 4.70±<br>0.27ab                               | 4.70±<br>0.21a  | 4.95±<br>0.11a    | 4.50±<br>0.35a | 5.00±<br>0.00a | 5.00±<br>0.00a  |
| MD     | 90                        | 4.60±<br>0.14ab             | 4.65±<br>0.14ab                               | 3.70±<br>0.21bc | 4.75±<br>0.25ab   | 4.40±<br>0.22a | 4.85±<br>0.22a | 4.90±<br>0.14a  |
| MB     | 90                        | 4.70±<br>0.21ab             | 4.75±<br>0.18 ab                              | 4.65±<br>0.22a  | 4.85±<br>0.22ab   | 4.60±<br>0.22a | 4.85±<br>0.22a | 4.60±<br>0.14bc |
| ML3    | 90                        | 4.75±<br>0.25ab             | 4.60±<br>0.29 ab                              | 4.60±<br>0.14a  | 4.85±<br>0.14ab   | 4.30±<br>0.27a | 4.95±<br>0.11a | 4.95±<br>0.11a  |
| MD     | 180                       | 4.45±<br>0.11b              | 4.50±<br>0.00 a                               | 3.55±<br>0.21 b | 4.60±<br>0.14b    | 4.20±<br>0.27a | 4.75±<br>0.25a | 4.80±<br>0.11ab |
| MB     | 180                       | 4.65±<br>0.14ab             | 4.70±<br>0.11 ab                              | 4.60±<br>0.14 a | 4.70±<br>0.21ab   | 4.55±<br>0.21a | 4.80±<br>0.21a | 4.50±<br>0.00c  |
| ML3    | 180                       | 4.70±<br>0.21ab             | 4.55±<br>0.21 ab                              | 4.55±<br>0.11 a | 4.80±<br>0.11ab   | 4.30±<br>0.27a | 4.85±<br>0.14a | 4.85±<br>0.22ab |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u ispitivanom senzornom svojstvu crnih čokolada sa 44 % kakao-delova sa dodatim različitim probioticima tokom skladištenja od 180 dana;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

Tabela P3. Rezultati Tukey-evog testa za ocenjivanje senzornih svojstava crnih čokolada (44 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana

| Uzorak | Vreme skladištenja (dani) | I Z G L E D                 | T E K S T U R A                               |                |                   |                  | A R O M A       |                |
|--------|---------------------------|-----------------------------|---|----------------|-------------------|------------------|-----------------|----------------|
|        |                           | Boja, sjaj, oblik, površina | Tvrdoća, lomljivost, žvakljivost, adhezivnost | Zrnavost       | Vlažnost, masnost | Topivost         | Miris           | Ukus           |
| CD     | 0-30                      | 4.85±<br>0.22bc             | 4.95±<br>0.11d                                | 4.85±<br>0.14a | 4.90±<br>0.14a    | 5.00±<br>0.00c   | 5.00±<br>0.00a  | 4.85±<br>0.22a |
| CB     | 0-30                      | 4.95±<br>0.11c              | 4.85±<br>0.14bcd                              | 4.90±<br>0.14a | 4.85±<br>0.14a    | 4.95±<br>0.11bc  | 5.00±<br>0.00a  | 4.90±<br>0.14a |
| CL3    | 0-30                      | 5.00±<br>0.00c              | 4.90±<br>0.14cd                               | 4.80±<br>0.21a | 4.80±<br>0.11a    | 5.00±<br>0.00c   | 5.00±<br>0.00a  | 4.80±<br>0.21a |
| CD     | 90                        | 4.25±<br>0.25ad             | 4.75±<br>0.18abcd                             | 4.80±<br>0.11a | 4.80±<br>0.21a    | 4.80±<br>0.21abc | 4.90±<br>0.14ab | 4.70±<br>0.33a |
| CB     | 90                        | 4.60±<br>0.22abc            | 4.65±<br>0.14abcd                             | 4.85±<br>0.14a | 4.75±<br>0.18a    | 4.70±<br>0.21ab  | 4.80±<br>0.11ab | 4.75±<br>0.18a |
| CL3    | 90                        | 4.60±<br>0.22abc            | 4.70±<br>0.21abcd                             | 4.80±<br>0.21a | 4.70±<br>0.21a    | 4.75±<br>0.18abc | 4.85±<br>0.14ab | 4.70±<br>0.21a |
| CD     | 180                       | 3.85±<br>0.34d              | 4.60±<br>0.14abc                              | 4.70±<br>0.11a | 4.65±<br>0.22a    | 4.70±<br>0.11ab  | 4.80±<br>0.21ab | 4.60±<br>0.22a |
| CB     | 180                       | 4.50±<br>0.18ab             | 4.55±<br>0.21ab                               | 4.75±<br>0.00a | 4.70±<br>0.11a    | 4.60±<br>0.14a   | 4.70±<br>0.11b  | 4.65±<br>0.14a |
| CL3    | 180                       | 4.50±<br>0.18ab             | 4.50±<br>0.18a                                | 4.80±<br>0.21a | 4.70±<br>0.21a    | 4.70±<br>0.11ab  | 4.80±<br>0.11ab | 4.60±<br>0.14a |

\*Vrednosti po koloni pokazuju razlike u ispitivanom senzornom svojstvu crnih čokolada sa 75 % kakao-delova sa dodatim različitim probioticima tokom skladištenja od 180 dana;

\*\*Vrednosti sa istovetnim slovima po koloni ne razlikuju se statistički značajno na nivou  $p < 0.05$ .

## LISTA SKRAĆENICA

|                |   |
|----------------|---|
| AO             | Antioksidativni/antioksidativna   |
| $a_w$          | Aktivnost vode  |
| BIFIDO ili B   | Probiotska kultura <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019  |
| BMK            | Bakterije mlečne kiseline   |
| C              | Crna čokolada sa 75% kakao-delova   |
| CB             | Crna čokolada sa 75% kakao-delova koja sadrži probiotsku kulturu <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019                |
| CD             | Crna čokolada sa 75% kakao-delova koja sadrži probiotsku kulturu <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <sup>®</sup> |
| CFU            | “Colony-forming units”, ćelije mikroorganizama iz kojih nastaju kolonije  |
| CIE            | Internacionalna komisija za osvetljenje   |
| CL3            | Crna čokolada sa 75% kakao-delova koja sadrži mešavinu probiotskih kultura DUOLAC MIX L3                            |
| DC             | Jednosmerna struja  |
| DNK            | Dezoksiribonukleinska kiselina  |
| DOPHILUS ili D | Probiotska kultura <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <sup>®</sup>   |
| DSC            | Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija  |
| DTA            | Diferencijalna termalna analiza   |
| EFSA           | Evropska stručna komisija za bezbednost   |
| EU             | Evropska Unija  |
| FAO            | Organizacija za hranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim nacijama  |
| FDA            | Američka asocijacija za hranu   |
| F6PPK          | Fruktozo-6-fosfat-fosfoketolaza   |
| GRAS           | Generalno priznati kao bezbedni   |
| HDL            | Lipoproteini visoke gustine   |
| ICA            | Internacionalna asocijacija za konditorske proizvode  |
| KV             | Koeficijent važnosti  |
| KŽE            | Kapajuća živina elektroda   |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| L3                         | Mešavina probiotskih kultura DUOLAC MIX L3 ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> i <i>Bifidobacterium breve</i> ) |
| LDL                        | Lipoproteini niske gustine   |
| M                          | Crna čokolada sa 44 % kakao-delova   |
| MB                         | Crna čokolada sa 44% kakao-delova koja sadrži probiotsku kulturu <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019   |
| MD                         | Crna čokolada sa 44% kakao-delova koja sadrži probiotsku kulturu <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <sup>®</sup>                                |
| ML                         | Mlečna čokolada sa visokim sadržajem mleka sa 27 % kakao-delova  |
| M L3                       | Crna čokolada sa 44% kakao-delova koja sadrži mešavinu probiotskih kultura DUOLAC MIX L3   |
| ML B                       | Mlečna čokolada sa visokim sadržajem mleka koja sadrži probiotsku kulturu <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019                                      |
| ML D                       | Mlečna čokolada sa visokim sadržajem mleka koja sadrži probiotsku kulturu <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <sup>®</sup>                       |
| ML L3                      | Mlečna čokolada sa visokim sadržajem mleka koja sadrži mešavinu probiotskih kultura DUOLAC MIX L3  |
| NADH                       | Nikotinamid adenin dinukleotid   |
| NO                         | Azot monoskid  |
| OHS                        | Osnovni hemijski sastav  |
| OIT                        | Indukciono vreme oksidacije  |
| OOT                        | Temperatura početka oksidacije   |
| ORAC                       | Kapacitet apsorbovanja radikala kiseonika  |
| <i>p</i> -DAC              | <i>p</i> -dimetilamino-cinamaldehyd  |
| PET/LDPE                   | Polietilen tereftalat/polietilen niske gustine   |
| PET-SiO <sub>x</sub> /LDPE | Polietilen tereftalat obložen silicijum oksidom/polietilen niske gustine   |
| PGPR                       | Poliglicerol poliricinoleat  |
| QPS                        | Kvalifikovana pretpostavka bezbednosti   |
| SHIME                      | Model sistem za simulaciju uslova u gastrointestinalnom traktu čoveka  |
| SOO                        | Monozasićeni trigliceridi  |
| SOS                        | Dizasićeni trigliceridi  |
| SSS                        | Trizasićeni trigliceridi   |
| SČF                        | Sadržaj čvrste faze  |



|     |  |
|-----|--|
| WGO | Svetska organizacija gastroenterologa    |
| WHO | Svetska zdravstvena organizacija         |
| XRD | Difrakcija X-zracima                     |
| ZKE | Referentne zasićene kalomelske elektrode |

## SPISAK TABELA

| Br. tabele | Naziv   | Br. strane |
|------------|---|------------|
| Tabela 1.  | Nutritivni sastav čokolade  | 8          |
| Tabela 2.  | Pregled polimorfni oblika kakao-maslaca, njihovih tačaka topljenja (°C) i struktura pakovanja triglicerida  | 18         |
| Tabela 3.  | Mikroorganizmi sa probiotskim svojstvima  | 97         |
| Tabela 4.  | Zahtevi za selekciju probiotskih sojeva   | 106        |
| Tabela 5.  | Nazivi, oznake i sastav različitih vrsta čokolada   | 125        |
| Tabela 6.  | Nazivi, skraćenice, sastav probiotika i koncentracija ćelija u probiotskom preparatu  | 126        |
| Tabela 7.  | Količine probiotika dodate u različite čokoladne mase tokom preliminarnog ogleđa  | 127        |
| Tabela 8.  | Senzorno ocenjivanje kvaliteta čokolade   | 137        |
| Tabela 9.  | Raspon ocena i kategorije kvaliteta pri senzornom ocenjivanju   | 138        |
| Tabela 10. | Broj vijabilnih ćelija utvrđen nakon dodatka različitih probiotika u tri koncentracije u čokoladne mase različitog sastava tokom preliminarnog ogleđa         | 156        |
| Tabela 11. | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>L. acidophilus</i> NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C | 157        |
| Tabela 12. | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>B. lactis</i> HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C      | 160        |
| Tabela 13. | Promene broja probiotskih ćelija L3 (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturama od 4°C i 20°C                                   | 165        |
| Tabela 14. | Osnovni hemijski sastav različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika   | 172        |
| Tabela 15. | Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)                                       | 182        |
| Tabela 16. | Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima nakon skladištenja od 90 dana   | 183        |
| Tabela 17. | Rezultati senzornog ocenjivanja kvaliteta različitih vrsta čokolada sa probioticima nakon skladištenja od 180 dana  | 184        |
| Tabela 18. | Termodinamički parametri topljenja različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika dobijeni obradom DSC krivih tokom skladištenja od 180 dana                   | 214        |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Tabela 19. | Termodinamički parametri kristalizacije različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika dobijeni obradom DSC krivih tokom skladištenja od 180 dana   | 217 |
| Tabela 20. | Udeli ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika neposredno posle proizvodnje (0-30 dana)  | 219 |
| Tabela 21. | Udeli ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika posle 90 dana skladištenja  | 220 |
| Tabela 22. | Udeli ukupnih polifenola i pojedinih grupa polifenola u uzorcima različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika posle 180 dana skladištenja   | 221 |
| Tabela 23. | Antioksidativni kapacitet uzoraka čokolada sa i bez probiotika određen FRAP i ABTS metodama tokom skladištenja od 180 dana   | 226 |
| Tabela 24. | Antioksidativna aktivnost ekstrakta različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika neposredno nakon proizvodnje i posle skladištenja od 90 i 180 dana izražena kako nagib linernog dela zavisnosti procenta smanjenja polarografske anodne struje vodonik peroksida od zapremine uzorka (B) | 234 |
| Tabela 25. | Vrednosti indukcionog vremena oksidacije (OIT) i temperature početka oksidacije (OOT) masti ekstrahovanih iz uzoraka različitih vrsta čokolada sa i bez probiotika tokom skladištenja od 180 dana  | 236 |
| Tabela 26. | Korelacije između sadržaja fenolnih jedinjenja (ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina određenih metodom po Folin – Ciocalteu i metodom po Bate-Smith-u), antioksidativne aktivnosti određene FRAP, ABTS i HPS metodom, i oksidativne stabilnosti određene DSC-om    | 240 |
| Tabela 27. | Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)   | 242 |
| Tabela 28. | Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika posle skladištenja od 90 dana   | 246 |
| Tabela 29. | Numeričke vrednosti parametara jednačine proticanja uzoraka čokolada sa i bez probiotika posle skladištenja od 180 dana  | 248 |
| Tabela 30. | Izmerene debljine primarnog ambalažnog materijala štampane lakirane aluminijumske folije ( $\mu\text{m}$ )   | 254 |
| Tabela 31. | Masa po jedinici površine ambalažnog materijala ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) za uzorak 1  | 255 |
| Tabela 32. | Masa po jedinici površine ambalažnog materijala ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) za uzorak 2  | 255 |
| Tabela 33. | Zatezna jačina i izduženje pri kidanju za uzorak 1   | 256 |
| Tabela 34. | Zatezna jačina i izduženje pri kidanju za uzorak 2   | 256 |
| Tabela 35. | Propustljivost gasova kod analiziranih uzoraka [ $\text{ml}/(\text{m}^2/24\text{h})$ ]   | 256 |

## SPISAK SLIKA

| Br. slike | Naziv  | Br. strane |
|-----------|--|------------|
| Slika 1.  | Prikaz molekula triglicerida (a), polimorfizma i tri načina pakovanja triglicerida (b), jedinične strukture SSS triglicerida u $\beta$ obliku (c) načina pakovanja lanaca (d)  | 14         |
| Slika 2.  | Kristalne forme kakao-maslaca  | 15         |
| Slika 3.  | Karakteristični profil topljenja različitih polimorfnih oblika kakao-maslaca dobijen pomoću DCS  | 17         |
| Slika 4.  | Šema tehnološkog postupka proizvodnje čokolade   | 19         |
| Slika 5.  | Dijagram temperiranja čokoladne mase   | 25         |
| Slika 6.  | Mehanizam formiranja arome čokolade i proces njenog razvoja  | 41         |
| Slika 7.  | Standardne CIE krive za smeše boja   | 56         |
| Slika 8.  | Skala sivog za određivanje osećaja sjajnosti   | 58         |
| Slika 9.  | Prikaz boje u prostoru   | 60         |
| Slika 10. | Osnovna struktura i numeracija flavonoida  | 65         |
| Slika 11. | Hemijska struktura polifenola kakao-zrna   | 70         |
| Slika 12. | Sadržaj flavonoida i antioksidativni kapacitet (ORAC) mlečne i crne čokolade nasuprot ostalih namirnica bogatih flavonoidima   | 72         |
| Slika 13. | Izgled upotrebljenih preparata sa probiotskim bakterijama  | 126        |
| Slika 14. | Mešanje  | 129        |
| Slika 15. | Usitnjavanje   | 129        |
| Slika 16. | Končiranje   | 130        |
| Slika 17. | Temperiranje   | 130        |
| Slika 18. | Izlivanje u kalupe   | 131        |
| Slika 19. | Trešenje   | 131        |
| Slika 20. | Hlađenje   | 131        |
| Slika 21. | Pakovanje  | 132        |
| Slika 22. | CIE Dijagram hromatičnosti – Određivanje dominantne talasne dužine i čistoće boje  | 139        |
| Slika 23. | Dijagram hromatičnosti po CIE sistemu sa prikazom boja koje obuhvata spektralna kriva  | 139        |
| Slika 24. | a) Šema polarografskog uređaja: KŽE-kapljuća živina elektroda; PE pomoćna elektroda; Ref E referentna elektroda, b) Polarografske i-E krive: A-osnovni elektrolit 0.1 M KCl; B-redukcija jona kadmijuma iz osnovnog elektrolita ( $E_{1/2}$ -polutaladni potencijal, $i_d$ -granična difuziona struja) | 148        |

## SPISAK GRAFIKA

| Br. grafika | Naziv  | Br. strane |
|-------------|--|------------|
| Grafika 1.  | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>L. acidophilus</i> NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C                                     | 158        |
| Grafik 2.   | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>L. acidophilus</i> NCFM® (D) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C                                    | 158        |
| Grafik 3.   | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>B. lactis</i> HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C  | 161        |
| Grafik 4.   | Promene broja probiotskih ćelija soja <i>B. lactis</i> HN019 (B) (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C   | 161        |
| Grafik 5.   | Promene broja probiotskih ćelija L3 (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 4°C   | 166        |
| Grafik 6.   | Promene broja probiotskih ćelija L3 (cfu/g) u različitim vrstama čokolada tokom skladištenja na temperaturi od 20°C  | 167        |
| Grafik 7.   | Senzorna ocena kvaliteta mlečnih čokolada sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana   | 185        |
| Grafik 8.   | Senzorna ocena kvaliteta crnih čokolada (44 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana   | 186        |
| Grafik 9.   | Senzorna ocena kvaliteta crnih čokolada (75 % kakao-delova) sa probioticima tokom skladištenja od 180 dana   | 187        |
| Grafik 10.  | Vrednosti srednje reflektance Y (%) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                                   | 191        |
| Grafik 11.  | Vrednosti za dominantnu talasnu dužinu $\lambda$ (nm) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (jednoboje tačke) i donjoj površini (dvoboje tačke) tokom skladištenja od 180 dana | 191        |
| Grafik 12.  | Vrednosti za čistoću boje Č (%) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (jednoboje tačke) i donjoj površini (dvoboje tačke) tokom skladištenja od 180 dana                       | 192        |
| Grafik 13.  | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu ( $L^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana     | 192        |
| Grafik 14.  | Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu ( $a^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana          | 193        |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Grafik 15. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu ( $b^*$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                              | 193 |
| Grafik 16. | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{Hu}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                     | 194 |
| Grafik 17. | Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{Hu}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                          | 194 |
| Grafik 18. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) mlečnih čokolada sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                        | 195 |
| Grafik 19. | Vrednosti srednje reflektance Y (%) crnih čokolada (sa 44 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                                    | 196 |
| Grafik 20. | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu ( $L^*$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana       | 196 |
| Grafik 21. | Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu ( $a^*$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana            | 197 |
| Grafik 22. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu ( $b^*$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana          | 197 |
| Grafik 23. | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana | 198 |
| Grafik 24. | Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 44 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana     | 198 |
| Grafik 25. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 44% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana    | 199 |
| Grafik 26. | Vrednosti srednje reflektance Y (%) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana                                    | 200 |
| Grafik 27. | Vrednosti za dominantnu talasnu dužinu $\lambda$ (nm) crnih čokolada (sa 75% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke) tokom skladištenja od 180 dana | 201 |
| Grafik 28. | Vrednosti za čistoću boje Č (%) crnih čokolada (sa 75% kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (jednobojne tačke) i donjoj površini (dvobojne tačke)  |     |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
|            | tokom skladištenja od 180 dana  | 201 |
| Grafik 29. | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po CIE Lab sistemu ( $L^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana       | 202 |
| Grafik 30. | Vrednosti za psihometrijski ton po CIE Lab sistemu ( $a^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana            | 202 |
| Grafik 31. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po CIE Lab sistemu ( $b^*$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana          | 203 |
| Grafik 32. | Vrednosti za psihometrijsku svetlost po Hunter Lab sistemu ( $L_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana | 203 |
| Grafik 33. | Vrednosti za psihometrijski ton po Hunter Lab sistemu ( $a_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana      | 204 |
| Grafik 34. | Vrednosti za psihometrijsku hromu po Hunter Lab sistemu ( $b_{Hu}$ ) crnih čokolada (sa 75 % kakao-delova) sa i bez probiotika na gornjoj (stubići) i donjoj površini (tačke) tokom skladištenja od 180 dana    | 204 |
| Grafik 35. | DSC termogrami za a) mlečnu čokoladu, b) crnu čokoladu sa 44 % kakao-delova i c) crnu čokoladu sa 75 % kakao-delova sa karakterizacijom svojstava topljenja snimljeni odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)       | 208 |
| Grafik 36. | DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44 % kakao-delova (zeleno) i crnih sa 75 % kakao-delova (plavo) neposredno nakon proizvodnje (0-30 dana)               | 211 |
| Grafik 37. | DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44% kakao- delova (zeleno) i crnih sa 75% kakao-delova (plavo) posle 90 dana skladištenja                              | 212 |
| Grafik 38. | DSC krive topljenja uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (ljubičasto), crnih sa 44 % kakao- delova (zeleno) i crnih sa 75 % kakao-delova (plavo) posle 180 dana skladištenja                           | 212 |
| Grafik 39. | DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4) crnih sa 44% kakao- delova (5-6) i crnih sa 75% kakao-delova (9-12) neposredno nakon, proizvodnje (0-30 dana)                      | 215 |
| Grafik 40. | DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4), crnih sa 44 % kakao- delova (5-8) i crnih sa 75 % kakao-delova (9-12) posle 90 dana skladištenja                                  | 216 |
| Grafik 41. | DSC krive kristalizacije uzoraka čokolada sa i bez probiotika: mlečnih (1-4), crnih sa 44 % kakao- delova (5-8) i crnih sa 75 % kakao-delova (9-12) posle 180 dana skladištenja                                 | 216 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Grafik 42. | Antioksidativni kapacitet uzoraka čokolada sa i bez probiotika određen FRAP i ABTS metodama tokom skladištenja od 180 dana   | 227 |
| Grafik 43. | Polarogrami osnovne struje vodonik peroksida ( $i_{H_2O_2}$ ), pre (0) i po dodatku 5 alikvota od po 100 $\mu$ L (1,2,3,4,5) ekstrakta mlečnih čokolada (A), crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (B) i crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (C) | 231 |
| Grafik 44. | Procenat smanjenja polarografske struje vodonik peroksida u zavisnosti od dodate zapremine ekstrakta mlečnih čokolada (A), crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (B) i crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (C)                                   | 232 |
| Grafik 45. | Termogrami indukcionog vremena oksidacije (a) i temperature početka oksidacije (b) za uzorak mlečne čokolade sa probioticima (MLB), određen DSC-om (0-30 dana)   | 238 |
| Grafik 46. | Termogrami indukcionog vremena oksidacije (a) i temperature početka oksidacije (b) za uzorak crne čokolade sa 75 % kakao-delova sa probioticima (CD), određen DSC-om (0-30 dana)   | 239 |
| Grafik 47. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)   | 243 |
| Grafik 48. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)  | 243 |
| Grafik 49. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) odmah nakon proizvodnje (0-30 dana)  | 244 |
| Grafik 50. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja  | 246 |
| Grafik 51. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja   | 247 |
| Grafik 52. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 90 dana skladištenja   | 248 |
| Grafik 53. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka mlečnih čokolada (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja   | 249 |
| Grafik 54. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 44 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja  | 249 |
| Grafik 55. | Krive proticanja i viskoziteta uzoraka crnih čokolada sa 75 % kakao-delova (kontrolnih i sa probioticima) nakon 180 dana skladištenja  | 250 |



## ***Biografija autora***

Mr Jovanka Laličić-Petronijević rođena je 05.07.1971. god. u Zemunu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Zemunu. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odeak za prehrambenu tehnologiju, Grupa za tehnologiju biljnih proizvoda upisala je školske 1992/93.god., a diplomirala je 1997.god. sa prosečnom ocenom tokom studija 9.03 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Poslediplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Grupa za tehnologiju ratarskih proizvoda, završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 10, odbranivši magistarsku tezu pod naslovom *«Uticaj sastava i vremena skladištenja na odabrana svojstva kvaliteta različitih vrsta čokolada»*.

Od marta 1998. godine zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je do maja 2000. godine bila angažovana kao stručni saradnik na predmetu Tehnologija ulja.

Od maja 2000. bila je u zvanju asistenta pripravnika na predmetu Tehnologija konditorskih proizvoda. Za asistenta na istom predmetu izabrana je u februaru 2008. godine. Takođe, od početka 2008. godine angažovana je i na predmetu Tehnologija šećera i skroba. Prema novom nastavnom programu izvodi vežbe na predmetima Osnovi proizvodnje konditorskih proizvoda, Tehnologija konditorskih proizvoda, Tehnologija šećera i skroba, kao i Tehnologija i kvalitet kafe i proizvoda srodnih kafi.

Pored laboratorijskih i pogonskih vežbi iz navedenih predmeta učestvovala je u izradi preko 30 diplomskih i 5 specijalističkih radova. U oblasti kontrole kvaliteta prehrambenih proizvoda bila je angažovana u obavljanju hemijskih analiza i pisanju izveštaja o ispravnosti kvaliteta. S tim u vezi stekla je diplomu za odabrane ocenjivače konditorskih proizvoda (Beograd, 2004) i bila je član Komisije za ocenu senzornih svojstava konditorskih proizvoda na Poljoprivrednom sajmu u Novom Sadu. Takođe,

zajedno sa predmetnim nastavnikom, učestvovala je u organizaciji i realizaciji seminara „Opšta uputstva za izbor, obuku i proveru ocenjivača“ prema zahtevima standarda *ISO 8586-1:1993* tj. *SRPS ISO 8586-1:2002* u kompanijama „Bambi-Banat“ a.d. (2008. god.), „Dijamant“ a.d. (2010. god.), „Jaffa“ a.d. (2012. god.), kao i seminara „Praktična primena standarda *SRPS ISO 5492:2000* tj. Senzorne analize-Rečnik, uz ukazivanje na kriterijume-metodologiju rada i senzorno ocenjivanje konditorskih proizvoda“ u kompaniji „Bambi-Banat“ a.d. (2010. god.).

Učestvovala je u pripremi i mogućnosti realizacije uslova za akreditaciju laboratorije Tehnologije ratarskih proizvoda.

Tokom 2011. god. boravila je na stručnom usavršavanju u SAD-u u okviru Norman E. Borlaug International Agricultural Science and Technology Program, na Iowa State University of Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Department of Food Science and Human Nutrition, Ames, Iowa.

Do sada je samostalno ili kao koautor objavila preko 30 naučnih radova, od kojih su 6 na SCI listi. Kao istraživač, učestvovala je na dva završena i dva tekuća projekta finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а

Јованка Г. Лаличић-Петронијевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 333/12-3.4 од 24.11.2010. године

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

«Сензорна, антиоксидативна и реолошка својства различитих врста чоколада са пробиотицима»

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кришио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.10.2012.

Jovanka Laličić-Petronijević

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора      Јованка Г. Лаличић-Петронијевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 333/12-3.4 од 24.11.2010. године

Студијски програм    Прехрамбена технологија

Наслов докторске дисертације «Сензорна, антиоксидативна и реолошка својства  
различитих врста чоколада са пробиотицима»

Ментор    Проф. др Јованка Попов-Раљић, редовни професор

Потписани/а    Јованка Г. Лаличић-Петронијевић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.10.2012.

*Jovanka Lalić-Petronjević*

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

«Сензорна, антиоксидативна и реолошка својства различитих врста чоколада са пробиотицима»

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

Потпис докторанда

У Београду, 04.10.2012.

Jovanka Lalčić-Petrović