

Sastav masnih kiselina različitih vrsta čokolada određen metodom plinske kromatografije

Fišer, Dorotea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:221563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Dorotea Fišer

SASTAV MASNIH KISELINA RAZLIČITIH VRSTA ČOKOLADA ODREĐEN
METODOM PLINSKE KROMATOGRAFIJE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za ispitivanje hrane i prehrane

Katedra za kontrolu kakvoće hrane

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Instrumentalne metode I

Tema rada je prihvaćena na IX. izvandrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 13. rujna 2019.

Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*

Komentor: doc. dr. sc. *Ante Lončarić*

Pomoć pri izradi: dr. sc. *Blanka Bilić Rajs*

Sastav masnih kiselina različitih vrsta čokolada određen metodom plinske kromatografije

Dorotea Fišer, 0113139559

Sažetak:

Lipidi čine oko 30–35 % kemijskog sastava čokolade, a značajni su za senzorska i reološka svojstva te stalnost tijekom skladištenja. Udio lipida, kao i sastav masnih kiselina ovisi o vrsti čokolade (mliječna ili tamna), zatim da li je dodana zamjenska mast i vrsta dodane zamjenske masti. Zadatak diplomskog rada bio je odrediti sastav i udio masnih kiselina različitih vrsta čokolada metodom plinske kromatografije uz plameno-ionizacijski detektor. Analiza je provedena na 5 uzoraka tamne i 8 uzoraka mliječne čokolade s dodatkom različitih vrsta zamjenskih masti, emulgatora i komponenti mlijeka. Udio ukupnih lipida određen je metodom po Folch-u. Masne kiseline u lipidnoj frakciji transesterificirane su u metilne estere masnih kiselina sa hladnom otopinom KOH u metanolu. Rezultati su pokazali da tamne čokolade imaju veći udio ukupnih lipida od mliječnih čokolada što se može pripisati različitom udjelu dodane kakaove mase. Dominantne masne kiseline u svim uzorcima bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) i oleinska kiselina (C18:1), dok su za čokolade sa dodatkom kokosovog ulja karakteristični veći udjeli laurinske (C12:0) i miristinske kiseline (C14:0).

Ključne riječi: čokolada, lipidi, masne kiseline, GC

Rad sadrži: 42 stranice
13 slika
4 tablice
0 priloga
41 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

| | | |
|----|---|---------------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. <i>Đurđica Ačkar</i> | predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | član-mentor |
| 3. | doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i> | član-komentor |
| 4. | doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 9. srpanj 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Food and Nutrition Research

Subdepartment of Food Quality

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Science and Nutritionism

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Instrumental methods I

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on September 13, 2019.

Mentor: *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.

Co-Mentor: *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof.

Technical assistance: *Blanka Bilić Rajs*, PhD

Fatty Acid Composition of Different Chocolates as Determined by Gas Chromatography

Dorotea Fišer, 0113139559

Summary:

Lipids make about 30-35% of the chocolate chemical composition, and are important for sensory and rheological properties and stability during storage. The lipid content as well as the fatty acid composition depends on the type of chocolate (milk or dark), then whether the vegetable fat has been added and the type of added fat. The aim of this study was to determine the composition and content of fatty acids of different types of chocolates by gas chromatography with a flame-ionization detector. The analysis was performed on 5 samples of dark and 8 samples of milk chocolate with the addition of different types of cocoa butter equivalents, emulsifiers and milk components. The content of total lipids was determined by the Folch method. Fatty acids in the lipid fraction were transesterified into fatty acid methyl esters with a cold solution of KOH in methanol. The results showed that dark chocolates have a higher total lipid content than milk chocolates, which can be attributed to the different proportion of added cocoa mass. The dominant fatty acids in all samples were palmitic (C16:0), stearic (C18:0) and oleic acid (C18: 1), while chocolates with added coconut oil were characterized by higher content of lauric (C12: 0) and myristic acid (C14: 0).

Key words: chocolate, lipids, fatty acids, GC

Thesis contains: 42 pages
13 figures
4 tables
0 supplements
41 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|---------------|
| 1. <i>Đurđica Ačkar</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: July 9, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-8709.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na bezbrojnim odgovorenim pitanjima i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno studiranje i koji su mi bili podrška tijekom mog školovanja.

Zahvaljujem svojim prijateljima, ljudima koji su prepuni ljubavi i podrške za mene.

Sadržaj

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 2. | TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. | PROIZVODNJA ČOKOLADE | 4 |
| 2.2. | KEMIJSKI SASTAV ČOKOLADE..... | 6 |
| 2.2.1. | Ugljikohidrati | 6 |
| 2.2.2. | Proteini..... | 7 |
| 2.2.3. | Alkaloidi..... | 7 |
| 2.2.4. | Polifenoli | 8 |
| 2.2.5. | Hlapivi spojevi..... | 8 |
| 2.3. | LIPIDI I MASNE KISELINE U ČOKOLADI..... | 10 |
| 2.4. | KVALITETA ČOKOLADE | 14 |
| 2.4.1. | Nutricionistički aspekt..... | 14 |
| 2.4.2. | Senzorske karakteristike kvalitete | 15 |
| 2.4.3. | Reološki parametri..... | 16 |
| 2.5. | ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM..... | 17 |
| 2.5.1. | Priprema metilnih estera masnih kiselina | 18 |
| 3. | EKSPERIMENTALNI DIO | 22 |
| 3.1. | ZADATAK..... | 23 |
| 3.2. | MATERIJALI I METODE..... | 23 |
| 3.2.1. | Priprema čokolada | 23 |
| 3.2.3. | Ekstrakcija lipida..... | 24 |
| 3.2.4. | Određivanje sastava masnih kiselina..... | 25 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA..... | 27 |
| 4.1. | UKUPNI LIPIDI..... | 28 |
| 4.2. | SASTAV MASNIH KISELINA | 30 |
| 5. | ZAKLJUČCI..... | 36 |
| 6. | LITERATURA..... | 38 |

Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|-------|---|
| POP | 2-oleodipalmitat |
| POSt | 2-oleopalmitostearat |
| StOSt | 2-oleodistearat |
| POO | 2-oleopalmitooleat |
| StOO | 2-oleostearooleat |
| PUFA | polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>) |
| MUFA | mononezasićene masne kiseline (engl. <i>monosaturated fatty acids</i>) |
| SFA | zasićene masne kiseline (engl. <i>saturated fatty acids</i>) |
| UFA | nezasićene masne kiseline (engl. <i>unsaturated fatty acids</i>) |
| GC-MS | plinska kromatografija sa spektrometrom masa (engl. <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>) |
| PGPR | poliglicerol poliricinoleat |
| CBR | zamjena za kakao maslac (engl. <i>cocoa butter replacer</i>) |
| CBE's | kakao maslac ekvivalenti (engl. <i>cocoa butter equivalents</i>) |
| CBS's | kakao maslac nadomjesci (engl. <i>cocoa butter substitutes</i>) |
| CBI's | kakao maslac poboljšivači (engl. <i>cocoa butter improvers</i>) |

1. UVOD

Čokolade su suspenzije sitnih čestica ugljikohidrata i kakaa u čvrstom stanju u kontinuiranoj lipidnoj fazi. Unatoč visokom sadržaju lipida i ugljikohidrata, konzumacijom čokolade unosimo i antioksidanse koji imaju pozitivan utjecaj na organizam (Afoakwa i sur., 2007). Kvaliteta čokolade, među ostalim karakteristikama, ovisi i o reološkim svojstvima. Poznato je da reološka svojstva čokolade ovise o veličini čestica te njihovoj raspodjeli i o sastavu čokolade (Jahurul i sur., 2013). Čokolade se dijele u sljedeće kategorije: tamna čokolada, mliječna i bijela, a razlikuju se prema udjelu kakaove masti i mliječne masti čime se utječe na razlike u količini prisutnih makronutrijenata. Zasićene masne kiseline, stearinska (34 %) i palmitinska (27 %) kiselina i mononezasićena oleinska kiselina (34 %) čine najveći dio sastava triglicerida koji se nalazi u čokoladi (Afoakwa i sur., 2007). Kakaov maslac je mast dobivena iz kakaovih sjemenki (*Theobroma cacao L.*), a u većini slučajeva koristi se kao glavni sastojak čokolade zbog karakterističnih fizikalnih i kemijskih svojstava. Ekvivalenti kakaovog maslaca su nelaurinske masti koje mogu djelomično zamijeniti kakaov maslac u čokoladi i drugim konditorskim proizvodima. Njihov sastav je sličan kakaovom maslacu, a cijena im je puno manja te su isplativiji od kakaovog maslaca (Jahurul i sur., 2013). Ekvivalenti kakaovog maslaca su ilipe, palmino ulje, sal maslac, shea maslac i ulje mangovih koštica te kokosova mast za zamrznute proizvode. Ove masti ne smiju biti enzimski ni kemijski tretirane, za razliku od zamjena za kakaov maslac, koje se proizvode kemijskim ili enzimskim frakcioniranjem palminog ulja, kokosovog ulja, ulja sjemenki manga, sjemenki uljane repice, pamuka i orašastih plodova (Jahurul i sur., 2013).

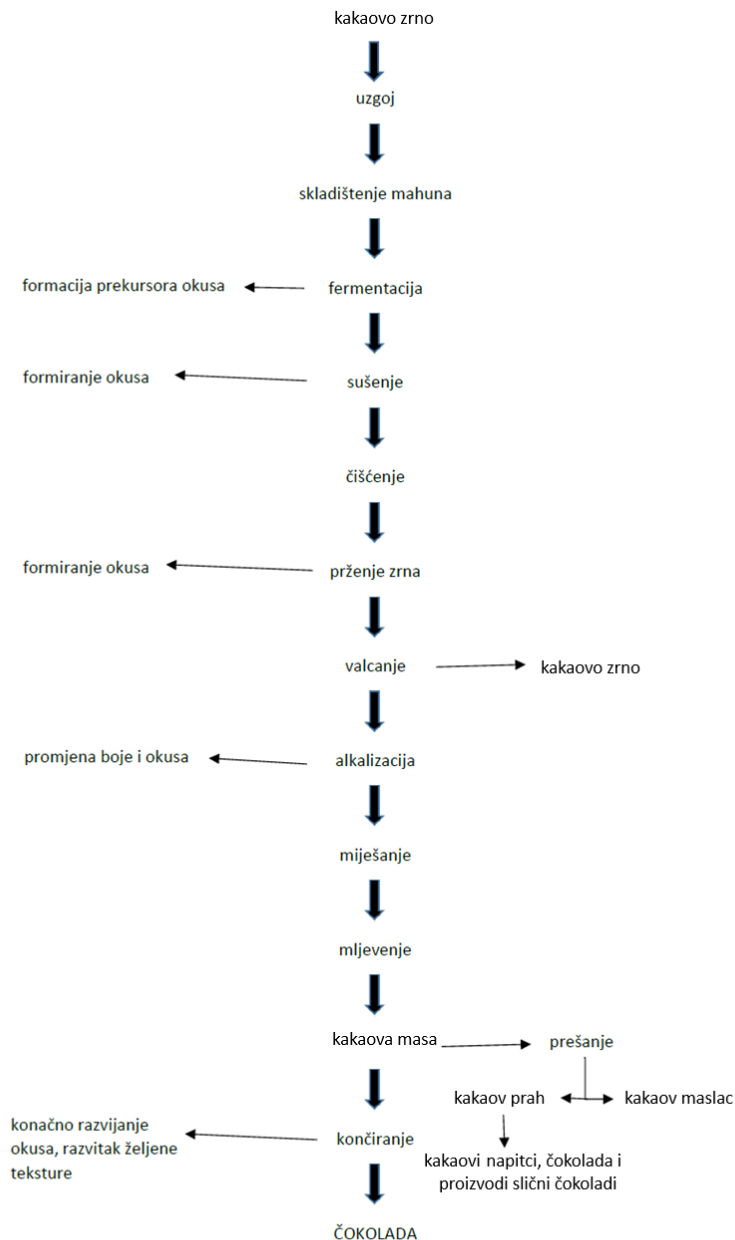
Sastav masnih kiselina se najčešće analizira primjenom plinske kromatografije. Navedena se tehnika koristi za širok raspon namirnica, od voća i povrća, ulja pa sve do životinjskih prerađevina i konditorskih proizvoda. Plameno-ionizacijski detektor je najčešće korišten detektor za navedenu vrstu analiza. Kako bi se mogao odrediti sastav i udio masnih kiselina u namirnicama, masne kiseline prevode se u hlapive metilne estere uz pomoć kiselih ili alkalnih katalizatora (Ichihara i Fukubayashi, 2010; Petrović i sur., 2010).

Zadatak ovog rada je odrediti sastav i udio masnih kiselina različitih vrsta čokolada metodom plinske kromatografije uz plameno-ionizacijski detektor.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNJA ČOKOLADE

Generacijama konzumirana, bogata mastima, proteinima, ugljikohidratima, polifenolima i drugim bioaktivnim spojevima, čokolada je proizvod koji zadovoljava svačiji ukus. Proizvodnja čokolade započinje preradom kakaovog zrna koji je osnovna sirovina za proizvodnju čokolade (Barišić i sur., 2019). Kakaovo zrno je fermentirana osušena sjemenka kakaovca čiji je plod dužine od 15 do 25 centimetara. Plod težak do pola kilograma sadrži koru, srž i sjemenku (Jozinović, 2012). Prerada kakaovog zrna uključuje proces fermentacije kakaovog ploda podijeljene u tri faze, tijekom kojih dolazi do rasta broja kvasaca i bakterija te posljedičnog raspadanja šećera i pulpe. Prva faza okarakterizirana je niskim sadržajem kisika i niskim pH (< 4), a traje od 24 do 36 sati. Tijekom druge faze fermentacije, od 48 do 96 sati, dominantne su bakterije mliječne kiseline. Treća faza započinje povećanjem prozračivanja, a provode ju bakterije octene kiseline. Okarakterizirana je alkoholnom fermentacijom koja je egzotermna reakcija odgovorna za porast temperature (50 °C i više). Nakon fermentacije slijedi sušenje kakaovog zrna radi smanjenja sadržaja vlage čime završavaju oksidativni procesi izazvani fermentacijom. Nizak sadržaj vlage od 6 do 8 % nakon sušenja, sprječava rast plijesni te čini zrno stabilnijim za skladištenje i transport (Barišić i sur., 2019). Uobičajena prva faza proizvodnje čokolade je prženje zrna na visokim temperaturama od 120 do 140 °C čime se pokreću Maillardove reakcije. Prženjem zrna smanjuje se sadržaj nepoželjnih komponenti i dekontaminira zrno te se ostvaruje okolina pogodna za razvitak komponenti zaduženih za aromu i okus (Barišić i sur., 2019). Nakon prženja zrna se drobe, nakon čega se izdvajaju ljuska (10 do 15 % ukupnog ploda) i klica zrna (1 % ukupnog ploda). Klica se uklanja radi svoje gorčine, kvarljivih masti i tvrdoće, a ljuska radi negativnog utjecaja na boju i aromu proizvoda te poboljšanja učinkovitosti valcanja čokoladne mase. Nakon drobljenja slijedi valcanje, kojim se mehaničkom obradom usitnjavaju krute čestice bezmasne suhe tvari čokoladne mase (Jozinović, 2012).



Slika 1. Shema proizvodnje čokolade (prilagođeno iz: Aprotosoae i sur., 2016.)

Vlaccanjem je omogućen lakši daljnji postupak izrade čokoladne mase i čokoladnih proizvoda (**Slika 1**). Čokoladna je masa nakon valcanja praškaste strukture te sadrži aglomerate bezmasne suhe tvari. Končiranje predstavlja zadnji korak izrade čokoladne mase koji uključuje međusobno zavisne fizikalne i kemijske procese kojima se ostvaruje željena aroma. Nadalje, končiranjem se ostvaruje pretvorba praškastog valcanog proizvoda u tekuću suspenziju. Temperiranjem se preoblikuju kristali krute masti u stabilan kristalni oblik izlaganjem stupnjevitom hlađenju i zagrijavanju (Jozinović, 2012).

2.2. KEMIJSKI SASTAV ČOKOLADE

Čokolada je proizvod dobiven od dijelova kakao zrna, šećera i, kod nekih vrsta čokolada, brašna ili škroba od pšenice, riže ili kukuruza. Sadrži minimalno 35 % ukupne suhe tvari kakaovih dijelova, 18 % kakaovog maslaca te najmanje 14 % bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova uz najviše 8 % brašna ili škroba, gdje je primjenjivo. Osim mliječne i tamne čokolade, na tržištu se mogu naći i bijela čokolada, čokolada s dodacima, punjena čokolada te čokolada u prahu i čokoladni preljevi. Punjenja u čokoladama mogu uključivati marcipan, žele ili ledena punjenja. Dodaci koje je moguće pronaći u čokoladi uključuju orašaste plodove, kavu, sušeno voće ili ekspaniranu rižu, a moraju se obavezno naznačiti na pakiranju (MPŠVG, 2005).

2.2.1. Ugljikohidrati

Kakao zrno sadrži monosaharide i disaharide: fruktozu, glukozu, saharozu, galaktozu, sorbozu, ksilozu, arabinozu, manitol i inozitol u udjelu od 2 do 4 %, te oko 12 % polisaharida koji uključuju škrob, pektine, celulozu te pentozane. Prije fermentacije, saharoza čini 90 % ukupne količine ugljikohidrata u kakaovom zrnu dok je već primjetna promjena u zrelih sjemenkama čiji je sastav ugljikohidrata varijabilan. Fermentacijom se saharoza oksidira te se raspada na reducirajuće šećere fruktozu i glukozu. Tijekom prženja kakaovih zrna stvara se tipičan čokoladni okus te se smanjuje koncentracija šećera za što su zaslužne Maillardove reakcije (Aprotosoai i sur., 2016). Šećeri se najčešće čokoladi dodaju u obliku fine kristalne saharoze koja može činiti do 50 % ukupnog sastava čokolade, dok je u mliječnim čokoladama prisutna i laktoza zbog dodanog mlijeka. Laktoza sudjeluje u Maillardovim reakcijama te time ima utjecaj na aromu konačnog proizvoda. Monosaharidi, glukozu i fruktozu, rijetko se koriste kao dodaci zbog visokog udjela vlage čine bi utjecali na interakcije čestica čokolade. Međutim, glukozu i laktozu mogu zamijeniti dodatak saharoze u mliječnoj čokoladi (Afoawka i sur., 2007).

2.2.2. Proteini

Zrelo kakaovo zrno sadrži između 10 % i 16 % proteina. Enzimskom proteolizom globulina, stvaraju se specifični prekursori okusa poput oligopeptida i slobodnih kiselina koji zatim sudjeluju u Maillardovim reakcijama te tako doprinose razvoju karakterističnih sastojaka zaslužnih za okus kaka. Nakon prženja kakao zrna količina prisutnih aminokiselina smanjuje se i do 72 % (Aprotosoae i sur., 2016). Mliječni proteini se dodaju u kremastu mliječnu čokoladu većinom u omjeru 80 % kazeina i 20 % proteina sirutke. Proteini kazeina smanjuju viskoznost, a proteini sirutke ju povećavaju. Dodavanjem obranog mlijeka u prahu ili punomasnog mlijeka u prahu utječe se na aromu, teksturu i svojstva konačnog proizvoda (Afoawka i sur., 2007).

2.2.3. Alkaloidi

Metilksantini su aktivne molekule koje imaju psihosomatski utjecaj: stimulacija centralnog živčanog sustava, utjecaj na kardiovaskularni sustav i na metabolizam, širenje bronha dišnog sustava, izlučivanje urina, stimulacija koštanih mišića. Kofein poboljšava fizičku i intelektualnu aktivnost i izaziva osjećaj budnosti, kao i teobromin, no u većoj količini (Aprotosoae i Stanescu, 2010). Kakaovi proizvodi se obično ne konzumiraju u velikim količinama pa time ne mogu imati prevelik utjecaj na navedene organske sustave. Sirova zrna kaka sadrže metilksantine od kojih je najzastupljeniji teobromin. Prisutni alkaloidi zaslužni su za gorak okus kaka te se nalaze i u sastavu konačnog proizvoda – čokoladi. Tamna čokolada sadrži do 7 mg teobromina i 0,88 mg kofeina po gramu čokolade, dok je kod mliječne čokolade količina metilksantina manja i iznosi oko 1 mg teobromina i 0,056 mg kofeina po gramu čokolade. Omjer metilksantina i teobromina/kofeina ovisi o genotipu kaka. Nakon prvih 72 sata fermentacije, smanjuje se količina prisutnih alkaloida u kakaovom zrnu što uzrokuje i smanjenje gorkog okusa kojemu oni pridonose. Količina teobromina smanjuje se oko 40 %, a količina izgubljenog kofeina može biti i više od 50 %. Razlog tomu je alkalizacija zrna čija je progresija proporcionalna sa smanjenjem alkaloidnog sadržaja kaka te njihov prelazak iz kotiledona u ljusku (Aprotosoae i sur., 2016).

2.2.4. Polifenoli

Sastav i količina prisutnih polifenola ovisi o genotipu, podrijetlu, stupnju zrelosti i obradi kakaovog zrna. Obradom kakaovog zrna dolazi do značajnog gubitka flavanola zbog sudjelovanja u biokemijskim reakcijama zaslužnim za razvitak karakterističnog okusa i boje kaka. Polifenole kakaovog zrna dijelimo u tri glavne skupine: katehine, antocijanine i proantocijanidine koji se tijekom fermentacije kakaovog zrna ne ponašaju jednako. U većini slučajeva tijekom fermentacije udio polifenola opada ovisno o trajanju fermentacije i mikrobiološkoj aktivnosti. Kvasci, bakterije mliječne i octene kiseline imaju pozitivan utjecaj dok aerobne spore i plijesni imaju negativan utjecaj na sadržaj polifenola. Oni su termolabilni što je glavni razlog smanjenja njihovog sadržaja tijekom duže fermentacije također, veći stupanj alkalizacije zrna smanjuje njihov udio (Aprotosoae i sur., 2016).

2.2.5. Hlapivi spojevi

Alkoholi nastaju tijekom fermentacije kao rezultat mikrobne aktivnosti. Koncentracija im se smanjuje kemijskom razgradnjom ili isparavanjem tijekom sušenja i prženja kakaovog zrna. Alkoholi su zaslužni za voćnu, zelenu i cvjetnu aromu te su poželjni kod proizvoda koji zahtijevaju takve arome. Linalol i 2-feniletanol glavni su alkoholi u prženim kakaovim zrnima. Prženjem kakao zrna smanjuje se sadržaj linalola međutim, okus i kvaliteta kaka se ne mijenjaju (Aprotosoae i sur., 2016).

Aldehidi i ketoni zaslužni su za poželjan okus kaka, a njihova količina je direktno povezana s kvalitetom kaka. Nastaju Steckerovom razgradnjom slobodnih aminokiselina tijekom prženja kakaovog zrna. Aldehidi kao 2-butanal i 3-metilbutanal nastaju tijekom fermentacije te osiguravaju slatke i čokoladne note sirovom zrnu. Sadržaj im se smanjuje dugim prženjem na visokim temperaturama, a osim što su zaslužni za okus, reaktanti su u stvaranju heterocikličkih spojeva putem aldolne kondenzacije (Aprotosoae i sur., 2016).

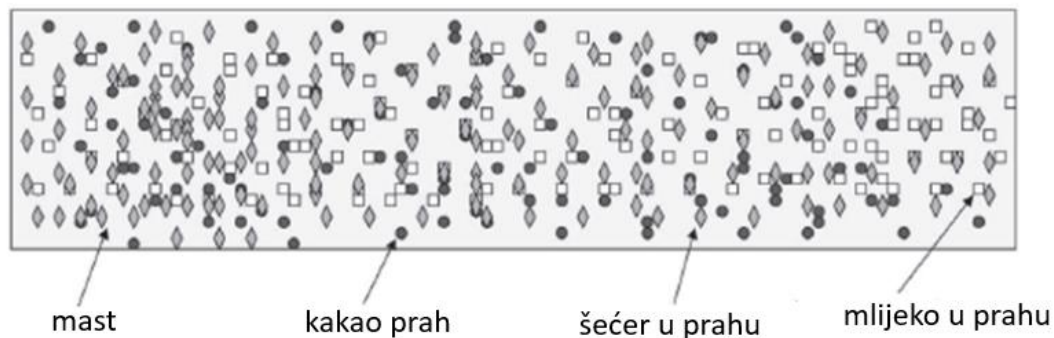
Esteri su hlapive tvari zaslužne za voćni okus i tipične kakao arome. Navedene arome proizlaze iz aminokiselina u neprženom kakaovom zrnu, a većina estera u kakaovom zrnu nalazi se u obliku etilestera, metilestera i acetata. Jedni od njih koji daju karakteristične note kakau su 2-

feniletilacetat i etil-2-metilbutanoat, a njihova količina, kao i količina ostalih estera, smanjuje se primjenom visokih temperatura tijekom prženja kakaovog zrna (Aprotosoae i sur., 2016).

Pirazini su heterociklički hlapivi sastojci kakaa zaslužni za njegov karakterističan miris. Karakterističan miris kakaa ovisan je o 80 različitih pirazina s naglaskom na tetrametilpirazin (izrazita aroma kaka) i trimetilpirazin. Pirazini se u kakaovom zrnu razvijaju tijekom prženja i sušenja kao produkti Maillardovih reakcija ili iz α -aminoketona Streckerovom razgradnjom (Aprotosoae i sur., 2016). Koncentracija pirazina usko je povezana s uvjetima prženja: povećavanjem temperature prženja kakaovog zrna povećava se količina prisutnih pirazina. Istovremeno povećanjem intenzivnosti kakaovog okusa, povećava se pH zrna, a za razvitak pirazina u zrnu potrebno je pržiti zrno pri visokim temperaturama ($>100\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Jozinović, 2012).

2.3. LIPIDI I MASNE KISELINE U ČOKOLADI

Struktura čokolade je definirana kao matrica kontinuirane masti s impregniranim česticama kakao praha i šećera, a ako se radi o mliječnoj čokoladi i mlijeka u prahu (**Slika 2**). Kakaov maslac je konstanta u tamnim i mliječnim čokoladama te je glavna prisutna masnoća. Izuzetak je dodatak određene količine mliječne masti radi povećanja otpornosti ili sprječavanja cvjetanja masti u skladu sa zakonskim regulativama. Lipidna faza čokolade osim kakaovog maslaca uključuje i dodane emulgatore.



Slika 2. Shematski prikaz strukture čokolade (prilagođeno iz: Talbot, 2012.)

Razlika između bijele i mliječne čokolade te tamne čokolade jest u sastavnicama koje doprinose udjelu masti čokolade. Udio masti tamne čokolade ovisi o kakaovoj masi (kakaov prah + kakaov maslac) dok je udio masti mliječne i bijele čokolade ovisan i o udjelu mlijeka u prahu i mliječnoj masti. One se mogu dodati u obliku punomasnog mlijeka, obranog mlijeka u prahu i mlijeka u prahu koje uobičajeno sadrži 25 % mliječne masti. Sastojak koji se većinom dodaje u zapadnim europskim zemljama, a pridonosi udjelu masti u čokoladi su mliječne ili čokoladne mrvice dobivene miješanjem punomasnog mlijeka, šećera, kakaa te sušenjem dobivene smjese (Talbot, 2012). Uz mliječne masti (12-15 %), mlijeko sadrži oko 5 % laktoze, 3,5 % bjelančevina i 0,7 % minerala. U mliječnoj masti dominiraju trigliceridi zasićenih masnih kiselina. Čokolade bi trebale biti u čvrstom stanju pri sobnim temperaturama od 20 do 25 °C te bi se trebale topiti u ustima na 37 °C. Time se ograničava sastav lipida čokolade jer je potrebno osigurati poželjne oblike lipidnih kristala (Afoakwa i sur., 2007).

Kakaov maslac većinski se sastoji od palmitinske kiseline (C16:0), stearinske kiseline (C18:0), oleinske kiseline (C18:1) te u manjem udjelu linolne kiseline (C18:2). Sastav masnih kiselina utječe i na sastav triglicerida 2-oleodipalmitata (POP), 2-oleopalmitostearata (POSt) i

2-oleodistearata (StOSt). Kakaov maslac koji potječe sa različitog zemljopisnog područja razlikuje se neznatno u sadržaju POP-a, dok je veći udio POST-a i StOSt-a karakterističan za kakaov maslac iz Azije i Afrike u usporedbi sa kakaovim maslacem iz Južne Amerike. Nasuprot tome, nezasićeni se trigliceridi 2-oleopalmitooleat (POO) i 2-oleostearooleat (StOO) nalaze u najmanjim količinama kod azijskih maslaca, a najvećim u južno-američkim maslacima (Talbot, 2012). Prisutni digliceridi u kakaovom maslacu su mjesta nukleiranja no u velikim količinama smatraju se ometačima kristalizacije. Istraživanja pokazuju da je otprilike 3 % diglicerida prihvatljivo u kakaovom maslacu. Razina fosfolipida nije definirana, a rezultati prethodnih provedenih istraživanja pokazuju da je udio fosfolipida u kakaovom maslacu od 0,006 % do 0,16 %. Maksimalni udio neosapunjivih tvari (viši alifatski alkoholi, steroli, pigmenti, ugljikovodici, itd.) u kakaovom maslacu iznosi 0,5 %, a ako se radi o prešanom kakaovom maslacu on iznosi 0,35 % (Talbot, 2012).

Prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (MPŠVG, 2005) dopušteno je dodati do 5 % zamjenskih masti u čokoladu koje su jeftinije od kakaovog maslaca, a njihovim dodatkom skraćuje se proizvodni proces i snižavaju troškovi proizvodnje čokolade (Ačkar, 2013). Zamjenske masti dijele se u dvije skupine: temperirajuće masti i netemperirajuće masti. Skupina temperirajućih masti karakteristična je po jednakom sastavu triglicerida kao i kakaov maslac, a uključuje kakaov maslac ekvivalente (CBE's) i kakaov maslac poboljšivače (CBI's). CBE's i CBI's pripadaju nelaurinskim biljnim mastima sa sličnim kemijskim i fizikalnim svojstvima u usporedbi s kakaovim maslacem te se tijekom proizvodnje mogu miješati u svim omjerima s kakaovim maslacem (De Clercq i sur., 2016). Temperirajuće masti nemaju utjecaj na promjenu otapanja čokolade u ustima ili izgled čokolade (Norazura i Noor, 2017). Kakaov maslac ekvivalenti (CBE's) uključuju kokosovo ulje, palmino ulje, sal maslac, illipe maslac, shea maslac i ulje sjemenki manga (Talbot, 2012), uz preduvjet rafinacije kokosove masti kako bi se mogla koristiti kao CBE's (Škrabal, 2009). Skupina CBI's slična je CBE's skupini biljnih masti, ali sadrži veliku količinu 2-oleodistearata čime povećavaju tvrdoću čokolade (De Clercq i sur., 2016). Netemperirajuće masti u koje ubrajamo zamjene za kakaov maslac (CBR's) i kakaov maslac nadomjeske (CBS's) imaju drugačiji sastav triglicerida od kakaovog maslaca, ali u čokoladi slični proizvodima pokazuju slična svojstva kao i kakaov maslac. Netemperirajuće masti kristaliziraju u najstabilnijem obliku te zato nije potrebno provoditi temperiranje (Škrabal, 2009) i nastaju mali kristali odgovorni za dobar sjaj proizvoda i stabilnost prilikom

skladištenja (Norberg, 2006). Izvori zamjena za kakaov maslac (CBR's) su: ulje sjemenki pamuka, repičino, sojino i palmino ulje. Zamjene se, uz proizvodnju proizvoda sličnih čokoladi, koriste kao punjenja i preljevi u konditorskim proizvodima (Norberg, 2006). Kakaov maslac nadomjesci (CBS's) sadrže laurinske biljne masti drugačijeg trigliceridnog sastava od kakaovog maslaca te se mogu koristiti jedino za potpunu zamjenu kakaovog maslaca (Jozinović, 2012), a oni uključuju ulje palminih koštica i kokosovo ulje. Nadomjesci osiguravaju dobar sjaj čokolade, otporni su na oksidacijske procese te im je kraće vrijeme kristalizacije (Norberg, 2006).

Palmino ulje većinski čine trigliceridi (95 %), a njezina karakteristična žuto-narančasta boja potječe od karotenoidnih pigmenata: 24 do 42 % α -karotena i 50 do 60 % β -karotena (Sambanthamurthi i sur., 2000; Ghazani i Marangoni, 2016). Palmino ulje sve se više koristi kao CBE's u konditorskoj industriji radi povoljnog sastava masnih kiselina te kristalizacije u obliku stabilnog β' kristala. Nadalje, prisutnost tokoferola osigurava sprječavanje oksidacije i kvarenje palminog ulja. Palmino ulje ima točku tališta 32 do 40 °C, a na sobnoj temperaturi je u polukrutom stanju (Gunstone, 2011).

Kokosovo ulje dobiva se iz osušene jezgre kokosa koja sadrži oko 60 % do 65 % ulja, a 92 % njezinog sastava čine zasićene masne kiseline. Zbog visokog stupnja zasićenosti i visoke stabilnosti nerijetko se koristi u prehrambenoj industriji (Amri, 2011). Kokosovo ulje je na nižim temperaturama u čvrstom stanju, a temperatura tališta mu je ispod 30 °C radi čega se koristi u proizvodnji različitih konditorskih proizvoda (O'Brien, 2004). Iako nije na popisu dozvoljenih zamjenskih masti u nacionalnoj niti međunarodnoj regulativi, dozvoljen je dodatak kokosovog ulja pri proizvodnji čokolade koja se koristi za proizvodnju sladoleda i sličnih smrznutih proizvoda. (MPŠVG, 2005; Talbot, 2012; Ačkar, 2013).

Uzgoj kakaovog zrna utječe na sastav masnih kiselina u čokoladnim proizvodima. Masne kiseline su u kakaovom maslacu prisutne kao trigliceridi navedenih u prethodnom potpoglavlju, a sama struktura triglicerida izravno utječe na proces proizvodnje i karakteristike konačnog proizvoda: teksturu, viskoznost, ponašanje tijekom topljenja, aromu i okus. Sastav masnih kiselina ima izravan utjecaj na ljudsko zdravlje. Veća količina nezasićenih masti poželjna je zbog svog pozitivnog učinka dok bi se zasićene masne kiseline trebale izbjegavati zbog rizika za povećanje razina kolesterola i lipoproteina niske gustoće u krvi (Torres-Moreno i sur., 2015).

Suzuki i suradnici (2010) proveli su istraživanje koje uključuje određivanje sastava sedam tamnih čokolada (5 regularnih i 2 dijetalne) brazilskih *brendova*. Zaključeno je da od zasićenih masnih kiselina prevladavaju palmitinska (C16:0) i stearinska kiselina (C18:0). Oleinska kiselina (C18:1n9c) pokazala se kao najbitniji predstavnik MUFA, a njezina količina iznosila je do maksimalnih 8,42 g/100 g čokolade. Količina PUFA iznosila je 0,45 - 0,82 g/100 g izraženih kao linolna kiselina (C18:2n6). *Trans*-masne kiseline određene su u količinama od 60 mg do 110 mg u 100 g čokolade kod regularnih tamnih čokolada. Usprkos vjerovanju da su dijetalne čokolade bolji odabir, provedeno istraživanje ukazuje na to da je količina zasićenih masnih kiselina u dijetalnim i regularnim tamnim čokoladama podjednaka, uz iznimku elaidične kiseline (C18:1n9t) koja je kod uzoraka dijetalnih tamnih čokolada bila prisutna u iznosu do 80 mg/100 g čokolade dok je kod uzoraka regularnih tamnih čokolada iznosila do 110 mg/100 g.

Biljne masnoće se dodaju pojedinačno ili u smjesi kao zamjena kakaovom maslacu. Karakteristike masnoća uključuju nelaurinske biljne masnoće bogate simetričnim mononezasićenim trigliceridima tipova POP, POSt i StOSt. Nadalje, moraju se moći miješati u bilo kojem omjeru s kakaovim maslacem te im svojstva trebaju biti sukladna s njegovim fizikalnim svojstvima (točka topljenja i temperatura kristalizacije, brzina topljenja, potreba za temperiranje) (MPŠVG, 2005). Palmino ulje bogat je izvor laurinske (C12:0), miristinske (C14:0) i oleinske kiseline (C18:1n9c). Laurinska (C12:0) i miristinska kiselina (C14:0) se u kakaovom maslacu nalaze u tragovima, dok je bogat palmitinskom (C16:0), oleinskom (C18:1n9c) i stearinskom kiselinom (C18:0). Istraživanja su pokazala da dodatak pročišćenog palminog ulja povećava sadržaj diglicerida koji inhibiraju nukleaciju i usporavaju brzinu kristalizacije te time utječu na reološka svojstva čokolade (Jahurul i sur., 2013). Kokosovo ulje sastoji se većinom od zasićenih masnih kiselina (do 93 %) međutim, ono sadrži i srednje lančane masne kiseline (do 60 %) s naglaskom na laurinsku kiselinu (C12:0) koja čini do 50 % srednje lančanih masnih kiselina. Laurinska kiselina (C12:0) i kaprinska kiselina (C10:0) jedne su od glavnih sastojaka kokosovog ulja koje imaju antibakterijska i antivirusna svojstva. Laurinska kiselina (C12:0) metabolizira se do 2-mono-laurina koji razgrađuje lipidnu ovojnica patogenih bakterija te time štiti gastro-intestinalni trakt (Bhatnagar i sur., 2009). Ukoliko se analizom sastava masnih kiselina čokolade utvrdi veći udio kaprinske (C10:0), laurinske (C12:0) i miristinske kiseline (C14:0) sa sigurnošću se može zaključiti da je čokoladi dodano palmino ulje ili kokosovo ulje.

2.4. KVALITETA ČOKOLADE

2.4.1. Nutricionistički aspekt

Lipidi u hrani predstavljaju izvor energije, komponente za izgradnju bioloških membrana, prekursore te transportere za vitamine topive u mastima. Transportna uloga hranjivih tvari u stanici i izvan nje uvelike ovisi o sastavu masnih kiselina koje utječu na fluidnost stanične membrane. Nadalje, esencijalne masne kiseline metaboliziraju se u skladu sa svojom strukturom, na primjer linolna kiselina (C18:2n6) se prevodi do arahidonske kiseline (C20:4n6). Arahidonska kiselina (C20:4n6) preteča je prostaglandina (prekursor hormona), a linoleinska kiselina (C18:3n3) produžuje se do eikozapentaenoične kiseline (C20:5n3) i dokozaheksaenske kiseline (C22:6n3). Zapadnjačka prehrana (*Western pattern diet*) povezuje prekomjeren unos masti uz sve veću prevalenciju kardiovaskularnih bolesti i karcinoma. Upravo povećanje prevalencija skreće pozornost stručnjaka na sastav lipida i masnih kiselina u pojedinim prehrambenim proizvodima (Petrović i sur., 2010). Kako bi se biljna mast koristila kao zamjena za kakaov maslac mora biti u skladu sa Zahtjevima kvalitete za ulja biljnog podrijetla i frakcije ulja biljnog podrijetla opisanima u Pravilniku o jestivim uljima i mastima (MPŠVG, 2005; MP, 2012).

Glavni utjecaj na probavljivost čokolade ima njezin sastav koji uključuje masti, emulgator i laktozu. Istraživanje koje su proveli Paz-Yépez i suradnici (2019) naglašava da je tamna čokolada bogata polifenolima te da suplementacija pankreatina povećava koncentraciju žuči tijekom procesa probavljanja čime se omogućilo povećano oslobađanje polifenola čokolade kao dodatni benefit suplementacije pankreatinom. Sastav lipida čokolade ima izravan utjecaj na lipolizu, to jest prisutnost emulgatora u bijeloj čokoladi i antioksidansa u tamnoj čokoladi smanjuje stupanj lipolize te samu probavljivost čokolade kao proizvoda. Međutim, uz sastav čokolade zaključeno je da i fiziološki parametri poput crijevnog pH i koncentracije žuči imaju utjecaj na biodostupnost hranjivih tvari čokolade.

Čokolada i kakao prah bogati su flavonoidima i mineralima koji mogu imati antioksidativno i protuupalno djelovanje povezano sa zdravljem kostiju. Međutim, njihov pozitivan učinak je nadjačan oksalatima i metilksantinima. Oni su prisutni u kakaovom maslacu i šećeru, a imaju suprotan utjecaj od flavonoida i minerala. Istraživanja pokazuju povezanost konzumacije čokolade i zdravlja kostiju uz naglasak da utjecaj ovisi o vrsti čokolade koju konzumiramo.

Temeljem sastava, nezaslađeni kakao prah bogat flavonoidima i mineralima pokazao se kao najbolji izbor, zatim slijedi tamna čokolada s većim udjelom kakaa (Seem i sur., 2019).

Istraživanje provedeno u Turskoj daje podatke o prosječnom sadržaju ispitivanih turskih uzoraka čokolade. Prosječni sadržaj kolesterola u ispitivanim uzorcima iznosi $1,14 \pm 0,14$ mg/kg čime je zaključeno da zbog niskog sadržaja kolesterola u čokoladi konzumacija čokolade i kakaa nemaju negativan utjecaj na razine kolesterola u krvi. Nadalje, zaključeno je da kakaov maslac ne podiže razine kolesterola u krvi zbog čega se čokoladica od 25 g može sigurno uključiti u dijetu kojoj je cilj smanjenje krvne razine kolesterola kod pacijenta (Ergönül i sur., 2010).

2.4.2. Senzorske karakteristike kvalitete

Senzorska je analiza znanstvena disciplina koja se koristi ljudskim osjetilima vida, mirisa, okusa, opipa i sluha. Koristi se kako bi pobudila, izmjerila, analizirala i interpretirala reakcije na karakteristike hrane. Senzorska obilježja (svojstva) uključuju izgled, miris, konzistenciju i teksturu te okus. Senzorska analiza čokolade temelji se na ispitivanju izgleda s naglaskom na boju i teksturu. Čokolada kao gotov prehrambeni proizvod uvelike je okarakteriziran tvrdoćom i teksturom dok se tijekom proizvodnje čokolade naglasak stavlja na viskoznost čokoladne mase. Nadalje, okus čokolade najčešće je glavna senzorska karakteristika kvalitete čokolade. Okus čokolade ovisi o viskoznosti i topljivosti zbog teksture koja ovisi o njezinom sastavu. Čokolada bogata alkaloidima imat će gorči okus, što je vidljivo kod tamne čokolade, a ovisno o dodatcima okus gotovog proizvoda će se mijenjati i percipirati u skladu sa sastavom dodatka, na primjer: chili- ljutkasto, cvijet soli-slankasto (Primorac, 2018).

Torbica i suradnici (2015) ispitali su, među ostalim, senzorske karakteristike čokolade koja sadrži kakaov maslac i one koje sadrže zamjene za kakaov maslac. Trenirani panel ispitivao je izgled, strukturu, miris te okus čokolade kojem su pridodali poseban značaj. Opće ocjene kvalitete su za sve čokolade bile zadovoljavajuće, a rezultati senzorske kvalitete čokolada koje sadrže kakaov maslac i zamjenu za njega nisu se razlikovali. Panel nije pronašao negativan utjecaj na osjetilnu kvalitetu. Čokolada koja je u svom sastavu uključivala zamjene za kakaov maslac ocijenjena je izvrsnom i vrlo dobrom. Uporaba viših koncentracija zamjenskih masti od dopuštenih (5 %), nije bila dopuštena međutim, zaključeno je da bi čokolada proizvedena i s većom koncentracijom također bila senzorski zadovoljavajuća.

2.4.3. Reološki parametri

Reologija je definirana kao grana fizike koja proučava znanost tečenja, u slučaju čokolade proučava viskoznost. Porastom brzine smicanja čokolade dolazi do pada viskoznosti, dok konstantnu viskoznost ostvarujemo pri visokim brzinama smicanja (Binghamovski plastični sustav). Čokolade poželjnih karakteristika odlikuju se relativno niskim vrijednostima viskoznosti koja pri konzumaciji osigurava dobro otapanje i laganu konzistenciju. Kako bi se postigla željena viskoznost povećava se udio masti dodatkom kakaovog maslaca, mliječne masti, biljne masti i emulgatora (Jozinović, 2012). Mliječne masti se dodaju mliječnoj čokoladi u udjelu do 30 % od ukupnih prisutnih masnoća u sastavu čokolade. Pri sobnoj su temperaturi u tekućem stanju te omekšavaju čokoladu i imaju utjecaj na njezinu teksturu. Sklone su oksidaciji i lako se miješaju sa kakaovim maslacem. Dodatak obranog mlijeka u prahu čini kakaov maslac mekšim što se smatra poželjnim u nekim europskim zemljama. Manipulacija viskoznosti omogućena je zbog povećanja pokretljivosti slobodnih masti čime se smanjuje plastična viskoznost čokolade. Utjecaj šećera je zanemariv zbog njegove inertnosti (Afoawka i sur., 2007). Najbolja tekstura i senzorske karakteristike ostvaruju se končiranjem čokolade koja je potrebna zbog trigliceridnog sastava kakaovog maslaca. Zbog promjenjivosti količine proizvedenog kakaovog maslaca prehrambena industrija traži alternativne izvore masti u proizvodnji čokolade (Torbica i sur., 2015). Miješanje čokoladne mase, rafiniranje i končiranje imaju velik utjecaj na kvalitetu završnog proizvoda. Senzorske karakteristike su vrlo bitne jer je čokolada prehrambeni proizvod koji se konzumira radi užitka te senzorska percepcija čokolade mora biti jedan od čimbenika kvalitete tijekom čitavog procesa proizvodnje čokolade (Toker i sur., 2019). Ekvivalenti kakaovom maslacu jesu biljne masti od kojih se najčešće koriste palmino ulje i kokosovo ulje. Upotreba ekvivalenata kakaovog maslaca ne smije mijenjati fizikalno-kemijske karakteristike čokolade koju pruža kakaov maslac. Industrijski proizvedene biljne masti bogate su POP i StOS, jeftinije su i stabilnije od kakaovog maslaca. Potrebno im je končiranje kako bi osigurale željene karakteristike. Opisane biljne masti mogu se uklopiti u kakaov maslac u bilo kojem omjeru, no zakon Europske unije nalaže da proizvod koji se deklarira kao čokolada ne smije sadržavati više od 5 % dodanih biljnih masti. Količina triglicerida koji sadržavaju biljne masti imaju utjecaja na njezina fizička svojstva te na temperaturu pri kojoj se čokolada koja ih sadrži topi (Torbica i sur., 2015).

2.5. ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Biljna ulja i namirnice životinjskog podrijetla su primarni izvor masti u našoj prehrani. Sastav i izvornost biljnog ulja ispitivana je preko 50 godina kako bi se utvrdila kvaliteta ulja koja određuje zadovoljstvo i sigurnost konzumacije za potrošača te financijsku dobit za proizvođača. Omjer omega masnih kiselina u zapadnjačkoj prehrani razlog je mnogih zdravstvenih poremećaja. Temeljom omjera omega masnih kiselina može se utvrditi jesu li životinje hranjene obogaćenom stočnom hranom ili klasičnom prehranom. Zatim, analizom sastava masnih kiselina moguće je utvrditi autentičnost analiziranih prehrambenih proizvoda čime se osigurava zaštita potrošača (Petrović i sur., 2010).

Plinska se kromatografija najčešće koristi za analizu sastava masnih kiselina. Analiza se provodi na širokom rasponu proizvoda od povrća do ulja i prehrambenih proizvoda životinjskog podrijetla te na širokom rasponu konditorskih proizvoda. U većini slučajeva dovoljan je plameno-ionizacijski detektor, dok se GC/MS analiza koristi za identifikaciju masnih kiselina u tragovima kada standardi nisu dostupni (Petrović i sur., 2010). Veći dio masnih kiselina kovalentno je vezan esterskim vezama na alkohol (triacilgliceroli, fosfolipidi i sterolni esteri), a mogu biti vezani i amidnim vezama (sfingolipidi). Složeni oblici lipida koji se nalaze u hrani tijekom analize sastava masnih kiselina pojedinih prehrambenih proizvoda, moraju se prethodno obraditi. Obradom (derivatizacijom) složenih lipida dobivaju se njihovi odgovarajući metilni esteri koji su hlapivi i time prikladni za GC analizu (Li i Watkins, 2001).

Plin nosioc može utjecati na efikasnost kolone svojom prirodom i brzinom. Najčešće korišteni plinovi su helij, dušik i vodik. Vodik je bolji odabir kao plin nosilac radi manjeg utjecaja na učinkovitost kolone, ali zbog eksplozivnosti treba voditi računa o sigurnosti tijekom rada. Za kolone za plinsku kromatografiju koriste se kapilare (kolone otvorenog tipa s obloženim stjenkama) i punjene kolone. Punjene kolone su neprikladnije od kapilara radi male sposobnosti razdvajanja i velike količine uzorka koje su potrebne za analizu što nije uvijek dostupno. Kapilare su bolje sposobnosti razlučivanja te zahtijevaju manje količine uzorka zbog čega im se danas daje prednost u GC analizama. Za analizu metilnih estera poželjne su polarne kolone zbog prisutnosti nezasićenih masnih kiselina. Injektiranje može biti *split/splitless* i direktno, a *split/splitless* je najčešće korištena tehnika. Kod analize metilnih estera masnih kiselina (FAME) potrebno je postaviti temperaturu kolone na nižu (od 10 do 30 °C) od točke vrelišta uzorka te zatim temperaturu povećavati kako bi se isparavanje počelo odvijati od

trenutka injektiranja. Temperatura se može povećavati i tijekom analize (režim porasta temperature) kako bi se osiguralo razdvajanje svih prisutnih komponenti. Sve masne kiseline imaju različito talište koje ovisi o duljini i strukturi lanca masne kiseline, stupnju zasićenosti i položaju nezasićene veze u lancu, a dužina lanca zasićenih masnih kiselina proporcionalna je s porastom tališta. Kako bi se masne kiseline uzorka mogle identificirati potrebno je provesti prethodnu analizu sa standardima masnih kiselina radi usporedbe vremena zadržavanja (Li i Watkins, 2001). Najčešće se koristi plameno-ionizacijski detektor (FID) koji bilježi broj ugljikovih atoma u jedinici vremena te daje odziv koji je proporcionalan masi detektirane komponente. Plameno-ionizacijski detektor registrira elektricitet iona i elektrona nastalih sagorijevanjem organskih komponenti na određenim temperaturama. Neosjetljiv je na vodu pa je moguće analizirati i organske komponente u razrijeđenim vodenim otopinama (Flanjak, 2019). Potrebno je voditi brigu o oksidaciji uzoraka i zbog toga bi se analize trebale provoditi pri minimalnom utjecaju zraka, svjetlosti i metala. Također, posuđe koje se koristi za skladištenje organskih otapala ne treba biti plastično kako plastifikatori ne bi kontaminirali uzorak radi razgradnje organskim otapalom (Li i Watkins, 2001).

2.5.1. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Postoje dva osnovna mehanizma za pretvorbu masnih kiselina u metilne estere (FAME). Prvi mehanizam uključuje metilaciju nakon hidrolize masnih kiselina iz lipida. On uključuje alkalnu hidrolizu (saponifikaciju) čime se kida veza masne kiseline i glicerola uz toplinu i prisutnost lužine (NaOH) te metilaciju uz prisutnost kiselog katalizatora u metanolu (Li i Watkins, 2001). Saponifikacija koju slijedi metilacija je najčešće korištena metoda dobivanja FAME-ova iz glicerolipida i estera sterola (Ichihara i Fukubayashi, 2010). Drugi mehanizam je izravna transesterifikacija, odnosno reakcija u jednom koraku uz prisutnost alkalnih ili kiselih katalizatora (Li i Watkins, 2001).

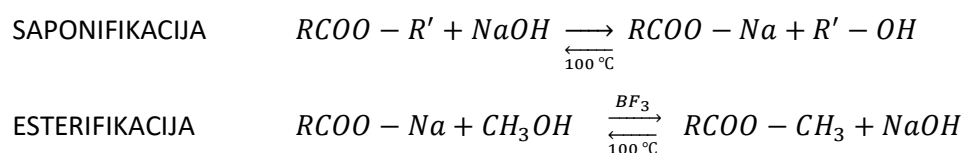
2.5.1.1. Esterifikacija i transesterifikacija katalizirana kiselim katalizatorima

Karboksilne kiseline mogu se esterificirati alkoholima uz prisutnost kiselih katalizatora. Prvi korak je protoniranje kiseline u kojem nastaje kation. Kation se veže na alkohol, a zatim gubi proton čime nastaje ester. Svi koraci su reverzibilni međutim, prisutnošću velike količine alkohola ravnotežna točka reakcije se pomiče te se esterifikacija završava. S druge strane,

prisustvo viška vode uzrokuje davanje elektrona jače od alifatskih alkohola čime je nastanak međuprodukata izbjegnut i destilacija se ne nastavlja u potpunosti. Nadalje, dolazi do transesterifikacije, to jest nakon početnog protoniranja estera, slijedi izmjena alkohola čime nastaju međuprodukti koji se onda mogu dalje mijenjati sve do nastanka estera. Svaki korak je reverzibilan, a uvjeti koji su poželjni za ovakav tip reakcija je velik suvišak odgovarajućeg alkohola i odsutnost vode koja se može postići dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata ili nekog drugog alkohola koji se može ukloniti uz izbjegavanje nastajanja nepoželjnih međuprodukata. Kiseli katalizatori koji se najčešće koriste za transesterifikaciju masnih kiselina su BF_3 i AlCl_3 . Katalizatori koji se koriste kod esterifikacije su *p*-toluensulfonska kiselina, 10 do 14% (v/v) BF_3 u 10 % (v/v) BCl_3 u metanolu, 5 % (v/v) bezvodni HCl u metanolu i 1 do 2 % (v/v) koncentrirana sumporna kiselina u metanolu (Christie, 1993).

Priprema FAME uz katalizator bor-3-fluorid (BF_3) u metanolu

Metoda započinje alkalnom hidrolizom uzoraka s viškom NaOH u metanolu što omogućuje oslobađanje masnih kiselina i njihovu metilaciju u prisustvu BF_3 u metanolu (**Slika 3**). Esterifikacijom se metilni esteri masnih kiselina ekstrahiraju sa organskim otapalom (najčešće heksan). Kisela sredina i visoka temperatura uzrokuju izomerizaciju konjugiranih masnih kiselina, na primjer konjugirane linolne kiseline ($\text{C}_{18:2n6}$) u mliječnim proizvodima (Li i Watkins, 2001).



Slika 3. Priprema metilnih estera masnih kiselina uz metanolni BF_3 kao katalizator

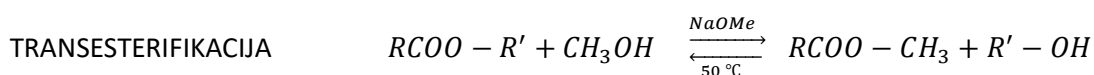
(prilagođeno iz Li i Watkins, 2001)

Prednost metode je brza metilacija slobodnih masnih kiselina u kombinaciji s alkalnom hidrolizom. Nadalje, katalizator je dugog roka trajanja međutim nakon isteka roka moguće su greške u rezultatima. Upotreba drugih kiselih katalizatora usporava reakciju te su manje dugotrajni. S druge strane, BF_3 promijenit će dvostruke veze masnih kiselina koje sadrže

konjugiranje diene, no pravilno provedenom analizom sprječavaju se moguće greške tijekom metilacije (Li i Watkins, 2001).

Priprema FAME uz katalizator natrijev metoksid u metanolu

Ova metoda zahtijeva otapanje uzoraka u suhom toluenu nakon čega se uzorci tretiraju natrijevim metoksidom čime je omogućeno kidanje veza masnih kiselina s ostatkom glicerola i nastanak FAME-a (**Slika 4**). Tijekom ove reakcije ne dolazi do izomerizacije konjugiranih diena, jer katalizator ne metilira slobodne masne kiseline i njihove amidne veze u sfingolipidima. Budući da slobodne masne kiseline nisu metilirane, kao kod metode za BF_3 , analiza je duža i zahtjevnija (Li i Watkins, 2001).



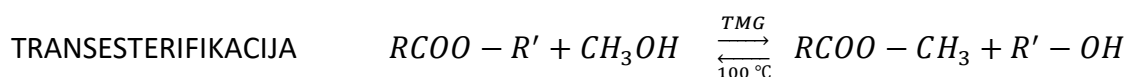
Slika 4. Priprema metilnih estera masnih kiselina uz metanolni natrijev metoksid kao katalizator (prilagođeno iz Li i Watkins, 2001)

2.5.1.2. Esterifikacija i transesterifikacija katalizirana alkalnim katalizatorima

Esteri u prisutstvu baze tvore anione i međuproducte, a mogu disocirati natrag u početni ili u novi ester. Prisutnost velikog viška alkohola (izvor aniona) u reakciji pomiče ravnotežnu točku tako da je moguć nastanak samo novog estera. Neesterificirane masne kiseline pretvaraju se u karboksilatne ione koji, zbog vlastitog negativnog naboja, nisu izloženi nukleofilnom napadu alkohola ili baza. Posljedica toga je transesterifikacija, kao jedina moguća reakcija, za koju je potrebno imati velik višak bezvodnog alkohola za reakcijski medij (Christie, 1993). Prisutnost alkalnih katalizatora zahtijeva niže temperaturne uvjete kako bi se reakcija odvijala što brže uz nedostatak esterifikacije slobodnih masnih kiselina koju ne mogu katalizirati (Ichihara i Fukubayashi, 2010). Prisutnost hidroksilne skupine kod alkalnih katalizatora rezultira nepovratnom saponifikacijom. Saponifikacija može pospješiti emulgiranje i odgoditi odvajanje organskog i vodenog sloja. Oslobođanje masnih kiselina prije metilacije moguće je i bez hidrolize lipida jer većina lipida može izravno transmetilirati. Ukoliko se koristi metilirajući reagens, potrebno je provesti alkalnu hidrolizu kako bi se oslobođene masne kiseline mogle esterificirati (Liu, 1994.).

Priprema FAME uz katalizator tetrametil-guanidin

Tetrametil-guanidin (TMG) je alkalni katalizator zbog kojega je moguće provesti metilaciju u jednom koraku. Nakon metilacije slijedi ekstrakcija i izolacija FAME-a (**Slika 5**). Istraživanja su pokazala da tetrametil-guanidin djeluje i na esterificirane i na slobodne masne kiseline, no postoje istraživanja koja pokazuju da TMG određene slobodne masne kiseline ne pretvara u odgovarajuće metilne estere što ga čini nepogodnim za analizu tvari niskog pH (Li i Watkins, 2001).



Slika 5. Priprema metil estera masnih kiselina uz tetrametil-guanidin kao katalizator
(prilagođeno iz Li i Watkins, 2001)

Priprema FAME uz katalizator KOH/NaOH

Ichihara i suradnici (2010) su izolirali lipide esterifikacijom kataliziranom kloroformnim metanolom te su iz njih FAME-ove pripremili metanolizom uz alkalni katalizator KOH. Alkalni katalizatori zahtijevaju strogu odsutnost vode pri esterifikaciji masnih kiselina. Transesterifikacija s KOH započinje reakcijom karbonilnih ugljikovih atoma s metoksidnim ionima triglicerida. Otapanje KOH u metanolu stvara metoksid, a budući da je KOH snažna baza njegova konstanta disocijacije je velika, to jest što je veća koncentracija KOH katalizatora to je veća koncentracija nastalog metoksida. Analizom kinetike reakcije, uočeno je da je u početnoj fazi reakcija nastala velika koncentracija FAME-ova neovisno o količini metanola. Međutim, budući da je metanol potreban kako bi KOH disocirao, količina metanola je proporcionalna s količinom nastalog metoksida pa tako i FAME-ova (Thanh i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

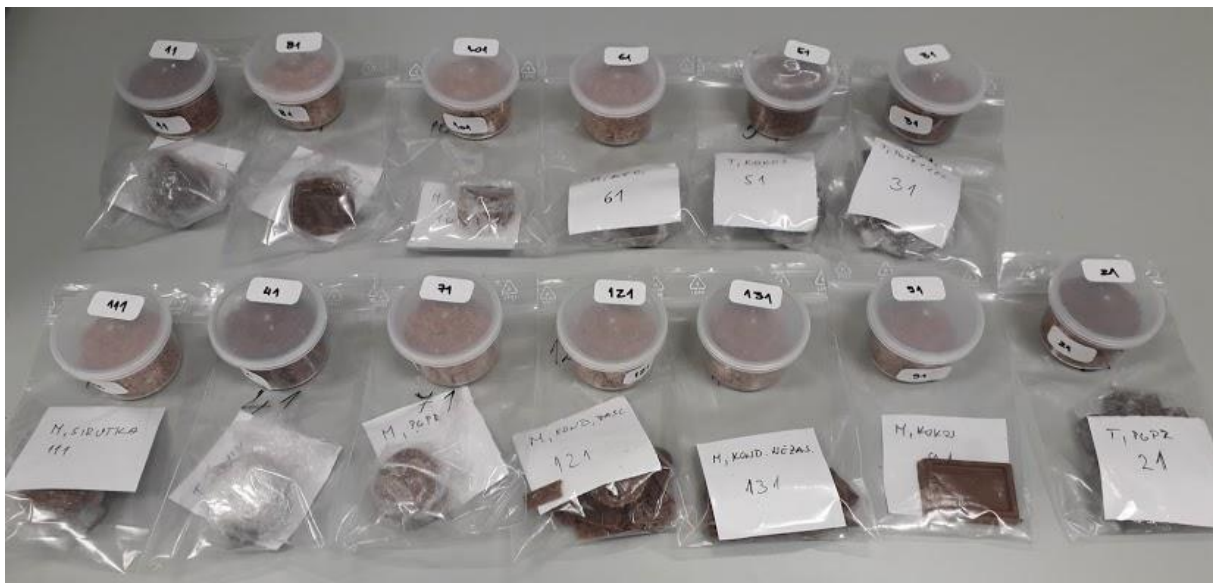
Zadatak ovog diplomskog rada je odrediti sastav i udio masnih kiselina različitih vrsta čokolada kako bi se utvrdile specifičnosti s obzirom na profil masnih kiselina.

3.2. MATERIJALI I METODE

Ukupno 13 različitih uzoraka čokolade (**Slika 6.**) karakterizirano je s aspekta sastava masnih kiselina. Lipidna frakcija ekstrahirana je metodom po Folch-u te je nakon toga sastav masnih kiselina određen plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom.

3.2.1. Priprema čokolada

Čokolade su pripravljene u laboratorijskom kugličnom mlinu. Za sve recepture temperatura vodene kupelji je bila 55 °C, a brzina okretaja laboratorijskog kugličnog mlina 60 o/min. Za tamne čokolade je korišteno 2,5 kg kuglica, a za mliječne 3 kg kuglica. Sve sirovine su dodane na početku, osim kakaovog maslaca i vanilina. U **Tablici 1.** navedene su recepture uzoraka tamnih i mliječnih čokolada. Sve čokolade su temperirane u rasponu temperindeksa od 4 - 7. Nakon temperiranja čokolade su ukalupljene i stavljene na hlađenje 30 minuta na 8 °C.



Slika 6. Uzorci čokolade pripremljeni za analizu (Fišer, 2019)

Tablica 1. Recepture analiziranih uzoraka čokolada

| OZNAKA UZORKA | KAKAOVA MASA (%) | KAKAOV MASLAC (%) | ŠEĆER U PRAHU (%) | LECITIN (%) | PGPR** (%) | DODATCI (%) |
|---------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------|------------|--|
| 11 | 36,00 | 21,47 | 42,00 | 0,50 | - | - |
| 21 | 36,00 | 21,47 | 42,00 | - | 0,50 | - |
| 31 | 36,00 | 21,47 | 42,00 | 0,25 | 0,25 | - |
| 41 | 36,00 | 16,47 | 42,00 | 0,50 | - | Palmino ulje: 5,00 |
| 51 | 36,00 | 16,47 | 42,00 | 0,50 | - | Kokosovo ulje: 5,00 |
| 61 | 12,00 | 22,00 | 45,00 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 20,47 |
| 71 | 12,00 | 22,00 | 45,00 | - | 0,50 | Mlijeko u prahu: 20,47 |
| 81 | 12,00 | 22,00 | 45,00 | 0,25 | 0,25 | Mlijeko u prahu: 20,47 |
| 91 | 12,00 | 17,00 | 45,00 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 20,47 Kokosovo ulje: 5,00 |
| 101 | 12,00 | 17,00 | 45,00 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 20,47 Palmino ulje: 5,00 |
| 111 | 12,00 | 22,00 | 41,25 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 19,22 Sirutka: 5,00 |
| 121 | 12,00 | 22,00 | 41,85 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 18,62 Kondenzirano zaslađeno mlijeko: 5,00 |
| 131 | 12,00 | 22,00 | 44,47 | 0,50 | - | Mlijeko u prahu: 16,00 Kondenzirano nezaslađeno mlijeko: 5,00 |

* Vanilin je dodan u iznosu 0,03 %; **PGPR- poliglicerol poliricinoleat

3.2.3. Ekstrakcija lipida

Ukupni lipidi u uzorcima čokolade određeni su metodom po Folch-u (Folch i sur., 1957). Uzorci čokolade su vagani (1,00 g) u plastične epruvete s čepom volumena 50 mL u kojima se provodila homogenizacija uzorka sa smjesom otapala. Smjesa otapala za ekstrakciju sastojala se od kloroforma (p.a. čistoće, Carlo Erba Reagents, Francuska) i metanola HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska) u omjeru 2:1, a potreban volumen smjese otapala mora biti 20 puta veći od mase uzorka. Smjesa je miješana 20 minuta pri 400 o/min (IKA, KS 260 Basic, Njemačka) pri sobnoj temperaturi nakon čega je filtrirana kroz filter papir kako bi se dobila tekuća faza. Nadalje, tekuća faza se ispiri s 4 mL 0,9 % otopine NaCl (Merck, Njemačka) te se pusti da odstoji kako bi se faze razdvojile.

Nakon razdvajanja faza, gornja faza je uklonjena mikropipetom. Donja kloroformska faza koja sadrži lipide je uparena u rotacijskom isparivaču (Laborota 4010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) na 60 °C. Ostatak je osušen u sušioniku (BINDER FED 53, SAD) pri 105 °C do konstantne mase nakon čega su izračunati ukupni lipidi prema **formuli (1)**. Ekstrakcija je izvedena u tri ponavljanja.

$$\text{udio ukupnih lipida (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{\text{masa uzorka}} \times 100 \quad (1)$$

gdje je : m_1 – masa tikvice nakon sušenja (g)
 m_2 – masa prazne tikvice (g)

3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina

Metilni esteri masnih kiselina (FAME) pripremljeni su sa hladnom metanolnom otopinom kalijevog hidroksida u skladu s postupkom opisanom u Prilogu X.B Uredbe 796/2002. Metilni esteri formiraju se transesterifikacijom s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija (EZ, 2002).

Ekstrahirani lipidi (0,05 g) su vagani u epruvetu, dodano je 4 mL n-heptana čistoće 99 % (Carlo Erba Reagents, Francuska) te se smjesa vorteksirala 30 sekundi. Nakon vorteksiranja, dodano je 0,4 mL 2 mol/L metanolne otopine KOH te je uzorak ponovo vorteksiran čime je provedena transesterifikacija masnih kiselina. Nakon razdvajanja slojeva, gornji sloj koji sadrži metilne estere masnih kiselina, prebačen je u vialu za GC analizu. Metilni esteri masnih kiselina odijeljeni su na Shimadzu GC-2010 Plus plinskom kromatografu opremljenim plameno-ionizacijskim detektorom (FID) i kapilarnom kolonom SH-Rtx-Wax (duljina kolone 30 m, promjer kolone 0,25 mm i debljina filma stacionarne faze 0,25 μm). Kao plin nosilac korišten je dušik. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, omjer razdvajanja 1:10, a volumen injektiranja 2 μL. Početna temperatura kolone postavljena je na 110 °C i održavana 2 minute, zatim se postupno povećavala brzinom 10 °C/min do temperature od 175 °C koja se zadržala 8 minuta, nakon čega je uslijedilo postupno povećanje brzinom 5 °C/min do 210 °C, zadržavanje 5 minuta i porast temperature do krajnje temperature od 230 °C brzinom od 5

°C/min. Konačna temperatura zadržana je 7 minuta. Ukupno vrijeme analize bilo je 42,5 minute. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora bila je 300 °C. Brzina protoka vodika bila je 40 mL/min, zraka 400 mL/min, a brzina protoka *make-up* plina (dušika) 30 mL/min. Identifikacija odijeljenih metilnih estera masnih kiselina postignuta je na osnovi usporedbe vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja certificiranog referentnog standarda (Supelco FAME Mix, C4-C24, St. Louis, USA) analiziranim u istim uvjetima. Rezultati su izraženi kao postotak identificirane masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama (%).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prema zadatku rada određen je udio ukupnih lipida i sastav masnih kiselina u 13 uzoraka čokolada različitog sastava.

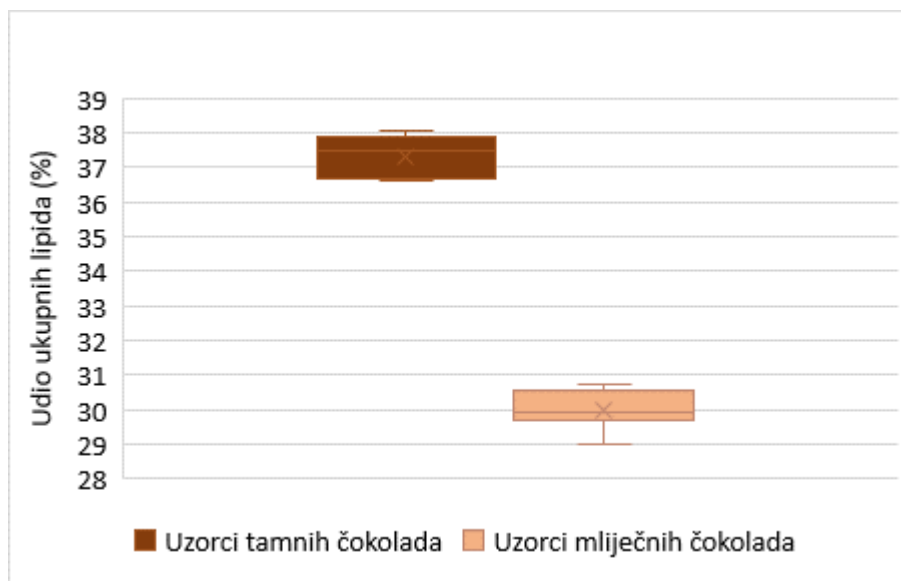
4.1. UKUPNI LIPIDI

Ukupni lipidi iz uzoraka čokolada su ekstrahirani metodom po Folch-u. Uzorci su analizirani u tri paralele, izračunata je srednja vrijednost i standardno odstupanje za svaki uzorak.

Tablica 2. Udio ukupnih lipida u uzorcima tamnih čokolada

| UZORAK | UDIO UKUPNIH LIPIDA (%) | | | SREDNJA VRIJEDNOST (%) | STANDARDNO ODSUPANJE (%) |
|------------|-------------------------|-------|-------|------------------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 11 | 36,38 | 36,96 | 36,78 | 36,71 | 0,30 |
| 21 | 36,81 | 36,31 | 36,72 | 36,61 | 0,27 |
| 31 | 37,36 | 38,06 | 37,73 | 37,72 | 0,35 |
| 41 | 38,35 | 38,29 | 37,57 | 38,07 | 0,43 |
| 51 | 37,07 | 37,75 | 37,57 | 37,46 | 0,35 |
| 61 | 30,07 | 30,40 | 30,44 | 30,30 | 0,20 |
| 71 | 30,04 | 30,91 | 30,96 | 30,64 | 0,52 |
| 81 | 29,67 | 30,09 | 29,29 | 29,68 | 0,40 |
| 91 | 29,41 | 30,21 | 29,83 | 29,82 | 0,40 |
| 101 | 29,55 | 29,18 | 28,26 | 29,00 | 0,66 |
| 111 | 29,75 | 29,95 | 29,58 | 29,74 | 0,22 |
| 121 | 30,10 | 30,15 | 29,85 | 30,03 | 0,16 |
| 131 | 30,27 | 30,79 | 31,14 | 30,73 | 0,44 |

Udio ukupnih lipida kod uzoraka tamne čokolade nalazi se u intervalu od 36 do 38 % (**Tablica 2**). Najveći udio ukupnih lipida ima tamna čokolada s dodatkom palminog ulja (uzorak 41) koji iznosi $38,07 \pm 0,35$ % dok je najmanji udio ukupnih lipida utvrđen u tamnoj čokoladi u kojoj nije dodana zamjena za kakaov maslac (uzorak 21). Analiza uzoraka mliječne čokolade pokazuje podjednake udjele ukupnih lipida koji su većinom u intervalu 29 - 31 %. Uzorci koji sadrže veći postotak ukupnih lipida od 30 % su: mliječna čokolada s dodatkom lecitina (uzorak 61), PGPR-a (uzorak 71), kondenziranog zaslađenog mlijeka (uzorak 121) te kondenziranog nezaslađenog mlijeka (uzorak 131).



Slika 7. Udio ukupnih lipida u analiziranim uzorcima čokolada

Uspoređujući rezultate udjela ukupnih lipida tamnih i mliječnih čokolada (**Slika 7.**), vidljivo je da je postotak ukupnih lipida veći kod uzoraka tamnih čokolada jer u recepturi kakaova masa čini 36,00 % sastava tamnih čokolada, dok postotak kod uzoraka mliječnih čokolada iznosi 12,00 %. Čokolada i ostali konditorski proizvodi okarakterizirani su kao visoko energetske proizvodi visoke prehrambene gustoće. Prosječna kalorijska vrijednost čokolade je 300 kcal/100 g, a tomu pridonosi visok sadržaj ugljikohidrata (45 %) i masti (30 %). Čokolada u svom nutritivnom sastavu sadrži i minerale: kalij, magnezij, bakar i željezo. Na sadržaj hranjivih tvari utječe postotak kakaovog maslaca, ako je on veći, smanjuje se udio ugljikohidrata i povećava udio masti. Tamna čokolada je pravi primjer toga čime su one uslijed većeg udjela kaka, manje slatke te masnije i time visoko kaloričan prehrambeni proizvod (Torres –Moreno i sur., 2015). Suzuki i suradnici (2011) analizirali su ukupne udjele makronutrijenata i sastav masnih kiselina brazilskih *brendova* tamnih čokolada. Analiza je pokazala da je količina ukupnih lipida prisutna u regularnim tamnim čokoladama u intervalu od 23 do 30 %, dok je interval rezultata analize dijetalnih tamnih čokolada iznosio: 33 - 36,5 %. Rezultati udjela ukupnih lipida dobiveni u navedenom istraživanju u skladu su rezultatima udjela ukupnih lipida analiziranih uzoraka tamnih čokolada (**Tablica 2.**). Istraživanje koje su proveli Susin i suradnici (2015) uključivalo je analizu ukupnih lipida u različitim *brendovima* mliječnih čokolada. Rezultati dobiveni analizom pokazuju da ukupna količina lipida u analiziranim uzorcima mliječnih čokolada nalazi se u intervalu od 22 do 37 % što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (**Tablica 2.**).

4.2. SASTAV MASNIH KISELINA

Masne kiseline esterificirane su u metilne estere masnih kiselina kako bi se prevele u hlapivi oblik i mogle odrediti metodom plinske kromatografije. U **Tablici 3.** naveden je udio zasićenih masnih kiselina u analiziranim uzorcima čokolada.

Tablica 3. Udio zasićenih masnih kiselina u analiziranim uzorcima čokolada

| UZO RAK | UDIO MASNE KISELINE (%) | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | C4:0 | C6:0 | C8:0 | C10:0 | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C20:0 | C22:0 | C24:0 |
| 11 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,09± 0,00 | 24,07 ±0,50 | 34,53 ±0,67 | 0,94± 0,01 | 0,88± 0,22 | 0,60± 0,26 |
| 21 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,10± 0,01 | 21,59 ±1,59 | 31,33 ±2,46 | 0,88± 0,10 | 1,66± 0,23 | 1,64± 0,15 |
| 31 | 0,17± 0,02 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,09± 0,01 | 24,22 ±0,24 | 34,80 ±1,54 | 0,99± 0,05 | 0,74± 0,17 | 0,50± 0,25 |
| 41 | 0,11± 0,04 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,06± 0,01 | 0,18± 0,00 | 26,85 ±0,24 | 30,97 ±0,96 | 0,90± 0,02 | 0,62± 0,12 | 0,31± 0,18 |
| 51 | 0,09± 0,01 | 0,06± 0,00 | 0,84± 0,01 | 0,65± 0,01 | 5,43± 0,16 | 1,92± 0,05 | 22,30 ±0,91 | 30,69 ±1,62 | 0,90± 0,02 | 0,58± 0,12 | 0,22± 0,15 |
| 61 | 0,08± 0,01 | 0,20± 0,01 | 0,14± 0,01 | 0,35± 0,01 | 0,44± 0,00 | 1,57± 0,02 | 26,19 ±0,21 | 32,40 ±0,64 | 0,88± 0,02 | 0,47± 0,08 | 0,17± 0,12 |
| 71 | 0,23± 0,02 | 0,19± 0,03 | 0,12± 0,00 | 0,31± 0,04 | 0,43± 0,08 | 1,43± 0,20 | 24,63 ±1,83 | 29,90 ±3,50 | 0,82± 0,08 | 0,92± 0,11 | 0,66± 0,14 |
| 81 | 0,07± 0,04 | 0,22± 0,01 | 0,14± 0,01 | 0,35± 0,01 | 0,46± 0,01 | 1,60± 0,02 | 26,03 ±0,03 | 31,66 ±0,33 | 0,85± 0,02 | 0,67± 0,05 | 0,44± 0,05 |
| 91 | 0,07± 0,02 | 0,30± 0,01 | 1,15± 0,07 | 1,16± 0,08 | 7,01± 0,53 | 3,95± 0,25 | 22,44 ±1,18 | 25,04 ±1,49 | 0,70± 0,04 | 0,95± 0,44 | 0,89± 0,54 |
| 101 | 0,02± 0,03 | 0,27± 0,00 | 0,18± 0,01 | 0,44± 0,01 | 0,61± 0,01 | 2,08± 0,03 | 29,13 ±0,04 | 26,52 ±0,05 | 0,73± 0,01 | 0,51± 0,06 | 0,21± 0,02 |
| 111 | 0,00± 0,00 | 0,21± 0,01 | 0,14± 0,01 | 0,34± 0,01 | 0,44± 0,02 | 1,54± 0,03 | 25,71 ±0,33 | 30,82 ±0,42 | 0,86± 0,01 | 0,76± 0,09 | 0,44± 0,13 |
| 121 | 0,14± 0,12 | 0,17± 0,05 | 0,14± 0,00 | 0,35± 0,01 | 0,45± 0,01 | 1,59± 0,06 | 25,38 ±1,20 | 29,98 ±1,81 | 0,82± 0,03 | 1,03± 0,58 | 0,80± 0,68 |
| 131 | 0,00± 0,00 | 0,16± 0,01 | 0,12± 0,02 | 0,29± 0,01 | 0,38± 0,01 | 1,27± 0,02 | 24,74 ±0,16 | 30,29 ±0,23 | 0,82± 0,02 | 1,13± 0,21 | 0,91± 0,26 |

Analizom sastava masnih kiselina uzoraka tamnih i mliječnih čokolada plinskom kromatografijom vidljive su prisutne velike količine zasićenih masnih kiselina: palmitinske kiseline (C16:0) u udjelu od 21,59±1,59 % do 26,85±0,24 % i stearinske kiseline (C18:0) u udjelu od 25,04±1,49 % do 34,80±1,54 % (**Tablica 3**). Kod uzoraka s dodatkom kokosovog ulja (uzorci

51 i 91) utvrđen je višestruko veći udio laurinske kiseline (C12:0) u udjelu $5,43 \pm 0,16$ % odnosno $7,01 \pm 0,53$ % u odnosu na ostale analizirane uzorke. Kokosovo ulje bogato je zasićenim masnim kiselinama s naglaskom na laurinsku kiselinu (C12:0) čiji je udio u ulju između 45,1 % - 53,2 %, također vidljiva je i veća količina miristinske kiseline (C14:0), 16,8 % - 21,0 % koja je prirodan sastojak kokosovog ulja (MP, 2012). Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti da je povećan udio laurinske (C12:0) i miristinske kiseline (C14:0) karakterističan za čokolade u koje je dodano kokosovo ulje kao djelomična zamjena za kakaov maslac te se udio navedenih masnih kiselina može koristiti kao pokazatelj dodatka kokosovog ulja u čokolade. Obzirom da se kokosovo ulje ne nalazi na popisu dozvoljenih zamjena za kakaov maslac (MPŠVG, 2005) u proizvodnji čokolade (osim čokolade koja se koristi za proizvodnju sladoleda i sličnih smrznutih proizvoda), udio laurinske (C12:0) i miristinske kiseline (C14:0) može se koristiti kao pokazatelj kvalitete i sukladnosti sa zakonskom regulativom.

Svi analizirani uzorci mliječnih čokolada imaju veće količine miristinske kiseline (C14:0) od uzoraka tamne čokolade (**Tablica 3.**). Miristinska kiselina (C14:0) karakteristična je masna kiselina mliječne masti (Lloyd, 2020) te je bilo za očekivati da uzorci mliječne čokolade imaju veći udio miristinske kiseline u odnosu na uzroke tamnih čokolada, a najveći udio određen je u uzorku mliječne čokolade u kojoj je dio kakaovog maslaca zamijenjen kokosovim uljem (uzorak 91) gdje je udio miristinske kiseline (C14:0) iznosio $3,95 \pm 0,25$ %.

Uzorak mliječne čokolade s dodatkom palminog ulja (uzorak 101) sadrži veću količinu palmitinske kiseline (C16:0) nego stearinske kiseline (C18:0) (**Tablica 3.**), za razliku od svih drugih uzoraka u kojima je odnos palmitinske i stearinske kiseline obrnut. Bhatnagar i suradnici (2009) analizom sastava palminog ulja su također utvrdili da je palmitinska kiselina dominantna masna kiselina palminog ulja. Dominantne masne kiseline u mliječnim (Susin i sur., 2015) i tamnim čokoladama (Suzuki i sur., 2010) su stearinska (C18:0) i palmitinska kiselina (C16:0) što je potvrđeno i u ovom istraživanju (**Tablica 3.**).

Tablica 4. Udio nezasićenih masnih kiselina u uzorcima analiziranih čokolada

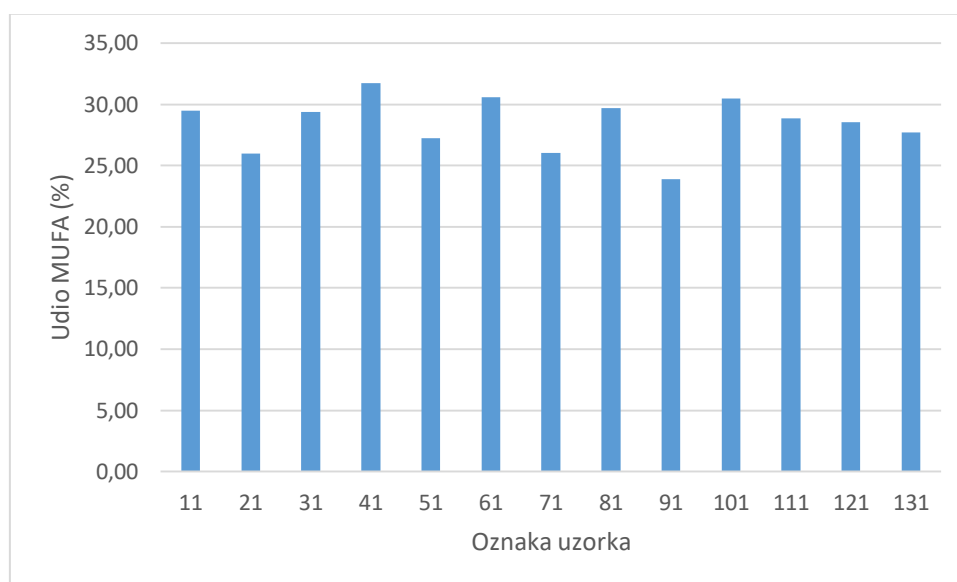
| UZORAK | UDIO MASNE KISELINE (%) | | | | |
|--------|-------------------------|-------------|-----------|-----------|------------|
| | C16:1 | C18:1n9 | C18:2n6c | C18:3n3 | C22:2 |
| 11 | 0,17 ±0,01 | 29,30 ±0,94 | 3,30±0,11 | 0,25±0,01 | 1,30 ±0,21 |
| 21 | 0,17±0,02 | 25,82±2,08 | 2,24±0,17 | 0,13±0,01 | 3,91±2,40 |
| 31 | 0,17±0,02 | 29,21±0,75 | 2,93±0,09 | 0,22±0,00 | 1,07±0,28 |
| 41 | 0,18±0,00 | 31,57±0,50 | 4,37±0,16 | 0,27±0,02 | 0,79±0,10 |
| 51 | 0,16±0,00 | 27,05±1,40 | 2,84±0,07 | 0,20±0,01 | 1,23±1,09 |
| 61 | 0,35±0,00 | 30,04±0,37 | 3,03±0,04 | 0,25±0,01 | 0,45±0,04 |
| 71 | 0,31±0,04 | 25,60±3,53 | 2,19±0,26 | 0,16±0,01 | 3,19±3,09 |
| 81 | 0,35±0,01 | 29,21±1,05 | 2,76±0,16 | 0,23±0,03 | 0,86±0,38 |
| 91 | 0,31±0,01 | 23,43±1,64 | 2,74±0,11 | 0,24±0,01 | 1,92±1,52 |
| 101 | 0,38±0,02 | 29,92±0,52 | 4,48±0,11 | 0,32±0,01 | 0,94±0,11 |
| 111 | 0,35±0,03 | 28,38±0,41 | 3,37±0,19 | 0,31±0,03 | 1,13±0,31 |
| 121 | 0,35±0,03 | 28,08±1,57 | 3,18±0,35 | 0,29±0,05 | 1,32±0,75 |
| 131 | 0,29±0,01 | 27,29±0,12 | 3,61±0,41 | 0,35±0,05 | 1,92±0,61 |

Analizom sastava identificiranih nezasićenih masnih kiselina uzoraka tamnih čokolada vidljivo je da je oleinska kiselina (C18:1n9) dominantna nezasićena masna kiselina kod svih analiziranih uzoraka (**Tablica 4.**). Suzuki i suradnici (2010) kao i Susin i suradnici (2015) analizom uzoraka tamnih i mliječnih čokolada pokazali su da je od nezasićenih masnih kiselina u uzorcima najzastupljenija oleinska kiselina (C18:1n9) što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Tamna čokolada s dodatkom palminog ulja (uzorak 41) te mliječna čokolada s dodatkom palminog ulja (uzorak 101) ističu se većom količinom linolne kiseline (C18:2n6), 4,37±0,16 % odnosno 4,48±0,11 % (**Tablica 4.**), te se, prema dobivenim rezultatima, udio linolne kiseline može koristiti kao jedan od pokazatelja dodanog palminog ulja u čokolade. Zambiasi i suradnici (2007) ispitali su sastav masnih kiselina 20 biljnih ulja i masti, a rezultati su pokazali da je palmino ulje bogato linolnom kiselinom (C18:2n6c), prosječno 11 %, što se može povezati sa rezultatima analize sastava masnih kiselina u čokoladama u kojima je dodano palmino ulje.

Uzorci analiziranih čokolada u kojima je kao emulgator dodan PGPR imaju veći udio dokozadienoične kiseline (C22:2) $3,91 \pm 2,40$ % (uzorak 21) i $3,19 \pm 3,09$ % (uzorak 71) u odnosu na udio iste masne kiseline u ostalim analiziranim uzorcima čokolada (**Tablica 4.**).

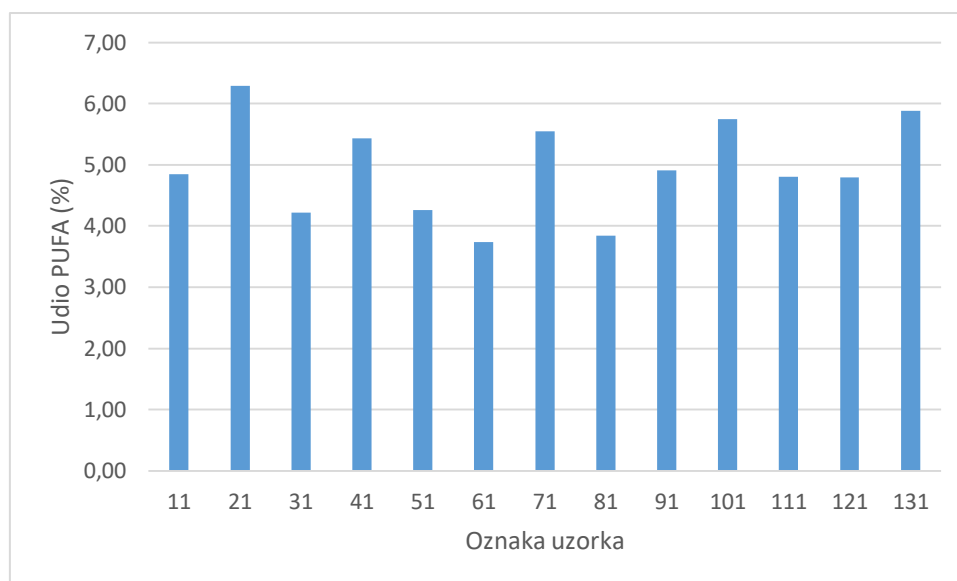
Udio identificiranih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) u uzorcima tamnih čokolada kreće se od 26 % do 32 %, a u mliječnim čokoladama udio MUFA je od 24 % do 31 % (**Slika 9.**).



Slika 9. Udio mononezasićenih masnih kiselina analiziranih uzoraka čokolada

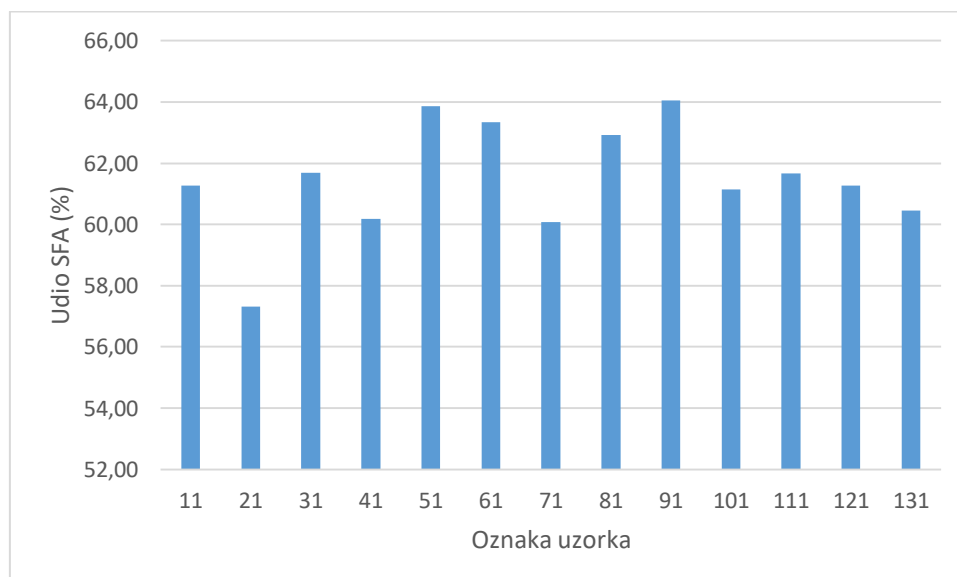
Najveći udio MUFA imaju uzorci čokolada sa dodatkom 5 % palminog ulja (uzorci 41 i 101) što je bilo za očekivati jer je u tim uzorcima utvrđen i visok udio oleinske kiseline (**Tablica 4.**) koja se pokazala kao dominantna MUFA u analiziranim uzorcima. U navedenim uzorcima oleinska kiselina (C18:1n9) nalazi se u većem udjelu i od zasićenih masnih kiselina, palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0) (**Tablice 3. i 4.**). S druge strane, čokolade sa dodatkom 5 % kokosovog ulja imaju nizak udio MUFA ($27,22 \pm 1,41$ % i $23,89 \pm 1,66$ %) što je u skladu sa rezultatima analize sastava masnih kiselina palminog i kokosovog ulja koje su proveli Bhatnagar i suradnici (2009), a koji su dobili da je udio MUFA kokosovog ulja $6,1 \pm 0,3$ %, a postotak MUFA palminog ulja višestruko veći i iznosi $42,4 \pm 1,1$ %.

Udio identificiranih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) analiziranih uzoraka čokolada kreće se od 4 % do 6 % (**Slika 10.**). Visoki udio polinezasićenih kiselina imaju uzorci čokolada s dodatkom palminog ulja uzorak 41 ($5,43 \pm 0,28$ %) i uzorak 101 ($5,74 \pm 0,24$ %) što je rezultat prisutnosti većeg udjela linolne kiseline (C18:2n6) u uzorcima čokolada te uzorci 21 i 71 gdje je kao emulgator dodan PGPR.



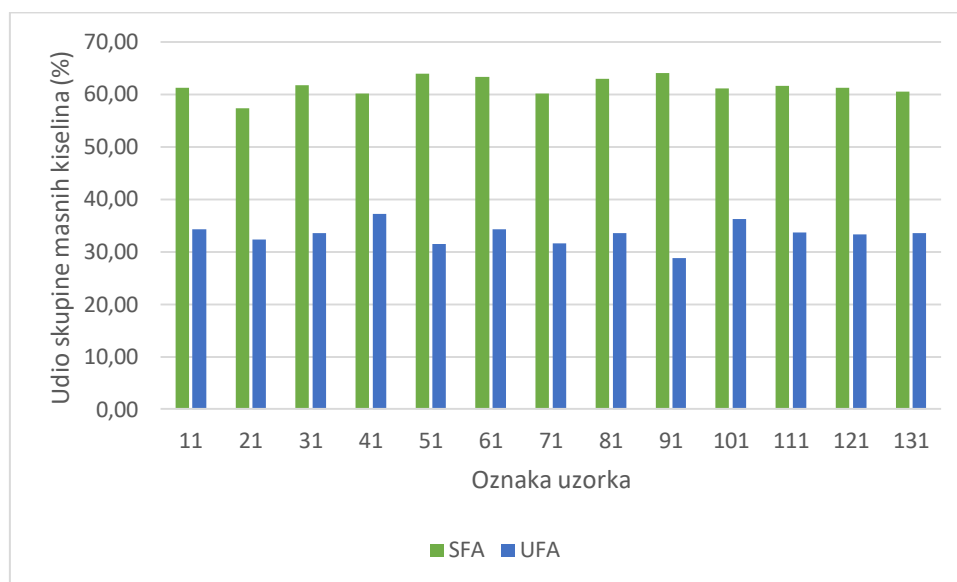
Slika 10. Udio polinezasićenih masnih kiselina analiziranih uzoraka čokolada

Na **Slici 11** prikazan je udio zasićenih masnih kiselina (SFA) u analiziranim uzorcima čokolada. Vidljivo je da se udio SFA u uzorcima tamnih čokolada kreće od 57 % do 64 %, dok je udio SFA u mliječnim čokoladama između 60 % i 64 %. Najveći udio SFA određen je u uzorcima čokolada u kojima je dodano kokosovo ulje (uzorak 51 $63,86 \pm 3,12$ % i uzorak 91 $64,05 \pm 4,70$ %) što se može pripisati visokom udjelu srednje lančanim masnim kiselinama, laurinskoj i miristinskoj koje su karakteristične za kokosovo ulje (Bhatnagar i sur., 2009; MP, 2012).



Slika 11. Udio zasićenih masnih kiselina svih analiziranih uzoraka

Analiza zasićenih (SFA) i ukupnih nezasićenih masnih kiselina (UFA) pokazala je da nema značajnijih razlika u udjelima istih obzirom na vrstu čokolada (**Slika 13.**). Udio UFA u tamnim čokoladama iznosi 28,80 – 36,20 % dok se u mliječnim čokoladama UFA nalaze u udjelu od 31,48 – 37,18 %. Nadalje, udio SFA su također podjednaki za obje vrste čokolada, tamne čokolade (57,32 – 63,86 %), mliječne (60,08 – 64,05 %).



Slika 13. Udjeli SFA i UFA analiziranih uzoraka

Epidemiološka istraživanja pokazuju direktnu povezanost zdravlja i sastava masnih kiselina u hrani. Prihvaćeno je da nezasićene masne kiseline (UFA) imaju učinak smanjivanja količine ukupnog kolesterola u krvi dok je za SFA učinak obrnut. SFA povećavaju ukupnu razinu kolesterola i lipoproteina niske gustoće. Najnovije prehrambene preporuke kažu da ukupan unos masti treba činiti 20 – 35% ukupnog energetskeg unosa s tendencijom na što manji unos SFA i što veći unos MUFA (Torres-Moreno i sur., 2015.).

Budući da je poželjno da namirnica ima veći udio UFA od SFA kako ne bi imao štetan utjecaj na zdravlje, rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da čokolade ne pripadaju skupini namirnica sa povoljnim omjerom masnih kiselina. Uspoređujući navedene udjele može se reći da čokolade koje imaju najpovoljniji udio su uzorci 41 i 101 (objema je dodano palmino ulje) što je vidljivo i u prijašnjim grafičkim prikazima u kojima je prikazano da upravo ti uzorci imaju najveće udjele nezasićenih masnih kiselina. Nepovoljan omjer udjela UFA i SFA u čokoladama dokazan je i u istraživanju provedenom u Turskoj u kojem rezultati pokazuju da u prosjeku uzorci sadrže oko 70 % SFA i 30 % UFA (Ergönül i sur, 2017).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Udio ukupnih lipida u tamnim čokoladama značajnije je veći od udjela ukupnih lipida u mliječnim čokoladama što se može pripisati razlici u recepturama odnosno udjelu kakaove mase koja se dodaje u pripremi tamnih čokolada.
2. Najznačajnije masne kiseline u svim analiziranim uzorcima čokolada su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) i oleinska kiselina (C18:1n9).
3. Kod uzoraka čokolada s dodatkom kokosovog ulja utvrđen je višestruko veći udio laurinske kiseline (C12:0) te veći udio miristinske kiseline (C14:0) u odnosu na ostale analizirane uzorke što se može koristiti kao pokazatelj dodatka kokosovog ulja u čokolade i pokazatelj sukladnosti sa zakonskom regulativom budući da se kokosovo ulje ne nalazi na popisu dozvoljenih zamjena za kakaov maslac pri proizvodnji čokolade (izuzev čokoladnih masa za zamrznute proizvode).
4. Tamna čokolada s dodatkom palminog ulja te mliječna čokolada s dodatkom palminog ulja ističu se većom količinom linolne kiseline (C18:2n6) u odnosu na udio iste u ostalim analiziranim uzorcima čokolada, te se udio linolne kiseline može koristiti kao jedan od pokazatelja dodanog palminog ulja u čokolade.
5. Gledajući s nutricionističkog stajališta, tamna čokolada je bolji izbor uvođenja čokolade u prehranu zbog nešto nižeg udjela SFA i veće nutritivne gustoće.

6. LITERATURA

Afoakwa EO, Paterson A i Fowler M: Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends in Food Science & Technology* 18:290-298, 2007.

Ačkar Đ: *Materijali s predavanja na kolegiju „Tehnologija konditorskih i srodnih proizvoda“*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.

Amri IN: The lauric (coconut and palm kernel) oils. U *Vegetable oils in food technology*, str. 169-198. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2011.

Aprotosoia AC, Vlad Luca S i Miron A: Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15:73-91, 2016.

Aprotosoia AC, Stanescu U: *Alkaloids-biogene compounds with therapeutic use*. Iasi: Gr.T.Popa Publishing House, 2010.

Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, Šubarić D, Jokić S i Babić J: The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules* 24:3163, 2019.

Bhatnagar AS, Prasanth Kumar PK, Hemavathy J i Gopala Krishna AG: Fatty Acid Composition, Oxidative Stability, and Radical Scavenging Activity of Vegetable Oil Blends with Coconut Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86:991–999, 2009.

Christie WW: Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. U *Advances in Lipid Methodology-Two*, str. 69-111, P.J. Barnes & Associates, The Oily Press, 1993.

De Clercq N, Kadivar S, Van de Walle D, De Pelsmaeker S, Ghelleyck X i Dewettinck K: Functionality of cocoa butter equivalents in chocolate products. *European Food Research and Technology* 243:309-321, 2016.

Ergönül PG, Ergönül B i Seçkin AK: Cholesterol content and fatty acid profile of chocolates mostly consumed in Turkey. *CyTA-Journal of Food* 8:73-78, 2010.

EZ, Komisija Europskih zajednica: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002.

Folch J, Lees M i Sloane Stanely GH: Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1):497-509, 1957.

Flanjak I: *Materijali s predavanja na kolegiju „Instrumentalne metode I“*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2019.

Ghazani SM i Marangoni AG: Healthy fats and oils. U *Encyclopedia of food grains*, str- 257-267. Elsevier Ltd, Oxford, UK, 2016.

Gunstone F: Production and trade of vegetable oils. U *Vegetable oils in food technology*, str. 1-25. Wiley - Blackwell, Chichester, UK, 2011.

Ichihara K i Fukubayashi Y: Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research* 51(3):635-640, 2010.

Ichihara K, Yamaguchi C, Araya Y, Sakamoto A i Yoneda K: Preparation of Fatty Acid Methyl Esters by Selective Methanolysis of Polar Glycerolipids. *Lipids* 45:367-374, 2010.

Jahurul MHA, Zaidul ISM, Norulaini NAN, Sahena F, Jinap S, Azmir J, Sharif KM i Mohd Omar AK : Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering*, 117(4):467-476, 2013.

Jozinović A: *Materijali s predavanja na kolegiju „Tehnologija konditorskih i srodnih proizvoda“*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2012.

Li Y i Watkins BL: Analysis of Fatty Acids in Food Lipids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, D1.2.1-D1.2.15, 2001.

Liu KS: Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71:1179-1187, 1994.

Lloyd J: *CHEBI:28875 - tetradecanoic acid*. ChemicalBook:CB1104862, 2020.
<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28875> [19.1.2020.]

MP, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*. Narodne novine 41/12, 2012.

MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva RH: *Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima*. Narodne novine 73/05, 2005.

Norazura AMH i Noor LHMD: Usage of palm oil, palm kernel oil and their fractions as confectionery fats. *Journal of oil palm research* 29:301-310, 2017.

Norberg S: Chocolate and confectionery fats. U *Modifying lipids for use in food*, str. 488-516. Woodhead publishing, Cambridge, UK, 2006.

O'Brien R: *Fats and oils: Formulating and processing for applications*. CRC Press LLC, Boca Raton, SAD, 2004.

Paz-Yépez C, Peinado I, Heredia A i Andrés A: Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of Functional Foods* 52:196-203, 2019.

Petrović M, Kezić N i Bolanča V: Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry* 122: 285-291, 2010.

Primorac LJ: *Materijali s predavanja na kolegiju „Senzorske analize“*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2018.

Sambanthamurthi R, Sundram K i Tan Y: Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research* 39:507-558, 2000.

Seem SA, Yuan YV i Tou JC: Chocolate and chocolate constituents influence bone health and osteoporosis risk. *Nutrition* 65:74-84, 2015.

Susin RC, Mior R i Dias VM: Fatty acid and sodium contents of commercial milk chocolate – analytical aspects and nutritional information. *Campinas* 18:121-127, 2015.

Suzuki RM, Montanher PF, Visentainer JV i De Souza NE: Proximate composition and quantification of fatty acids in five major Brazilian chocolate brands. *Tecnologia de Alimentos'internationalizes, Campinas* 31:541-546, 2011.

Škrabal S: Utjecaj sastojaka na reološko ponašanje čokoladnih masa i stabilnost čokolada. *Doktorski rad*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Talbot G: Chocolate and Cocoa Butter-Structure and Composition. U *Cocoa Butter and Related Compounds*, str. 1-33, Academic Press and AOCS Press., USA, 2012.

Thanh LT, Okitsu K, Maeda Y, Bandow H: Ultrasound assisted production of fatty acid methyl esters from transesterification of triglycerides with methanol in the presence of KOH catalyst: Optimization, mechanism and kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry* 21:467-471, 2014.

Toker OS, Palabiyikb I, Konarc N: Chocolate quality and conching. *Trends in Food Science & Technology* 91:446-453, 2019.

Torbica A, Jambrec D, Tomić J, Pajin B, Petrović J, Kravić S i Lončarević I: Solid Fat Content, Pre-Crystallization Conditions, and Sensory Quality of Chocolate with Addition of Cocoa Butter Analogues. *International Journal of Food Properties* 19:1029-1043, 2016.

Torres-Moreno M, Torrescasana E, Salas-Salvadó J i Blanch C: Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, 2014.

Zambiasi RC, Przybylski R, Zambiasi MW i Mendonça CB: Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba* 25:111-120, 2007.