

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Ocena jakości miazg kakaowych i czekolad na podstawie zawartości steroli

BARTOSZ KRUSZEWSKI, MIECZYŚLAW W. OBIEDZIŃSKI

SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI, KATEDRA BIOTECHNOLOGII, MIKROBIOLOGII I OCENY ŻYWNOSCI, ZAKŁAD OCENY JAKOSCI ŻYWNOSCI

Słowa kluczowe: czekolada, miazga kakaowa, sterole, jakość, dieta, GC-MS

STRESZCZENIE

Praca badawcza miała na celu ocenę jakości miazg kakaowych i wyprodukowanych z nich czekolad gorzkich pochodzących od siedmiu producentów z pięciu krajów świata, w oparciu o wyniki analizy ilościowej steroli. W materiale badanym stwierdzono obecność trzech fitosteroli: β -sitosterolu, stigmasterolu, kampesterolu. Wyniki pracy wykazały duże zróżnicowanie miazg kakaowych i czekolad gorzkich. Największą zawartością steroli ogółem cechowała się miazga CM-3 z Ghany (203,35 mg/100 g) oraz wykonana z niej czekolada (122,78 mg/100 g). Najmniejsze ilości steroli oznaczone w miazgach to 57,92 mg/100 g (CM-1), a w czekoladach 35,97 mg/100 g (CH-5). Najlepszą jakością cechowały się miazgi i czekolady oznaczone numerami 3, 6 i 7. Czekolady ze względu na niską własną zawartość steroli, ale wysoką tłuszczu, stanowią dobrą matrycę do wzbogacania w fitosterole.

Evaluation of chocolates and cocoa masses quality based on sterols composition

Keywords: chocolate, cocoa mass, sterols, quality, diet, GC-MS

ABSTRACT

The objective of this research was to assess the quality of cocoa masses and produced from them bitter chocolates, originating from seven manufacturers of five countries, based on the results of quantitative sterols analysis. Test material revealed the presence of three phytosterols: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol. Results showed a high diversity of cocoa masses and chocolates. The highest content of total sterols was in CM-3 cocoa mass from Ghana (203.35 mg/100 g) and made from it CH-3 chocolate (122.78 mg/100 g). The smallest quantity indicated in cocoa masses was 57.92 mg/100 g (CM-1), and chocolates 35.97 mg/100 g (CH-5). Cocoa masses and chocolates characterized by the best quality were marked with numbers 3, 6 and 7. Chocolate because of its low own sterols content but high in fat, are a good matrix for enrichment in phytosterols.

1. WPROWADZENIE

Fitosterole to bioaktywne składniki żywności znane przede wszystkim z właściwości obniżania poziomu cholesterolu we krwi człowieka. W literaturze światowej opisano dotychczas więcej niż 250 typów fitosteroli [1]. Najczęściej spożywane sterole w ramach diety przeciętnego konsumenta to sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brassikasterol, $\Delta 5$ -avenasterol i $\Delta 7$ -avenasterol. Sterole w żywności mogą występować nie tylko w formie wolnej, ale także w postaci estrów kwasów tłuszczowych, połączone z resztami cukrowymi (glikozydy) lub kwasami fenolowymi [2, 3]. Doskonałym źródłem fitosteroli są oleje roślinne i emulsje tłuszczowe takie jak majonez i margaryna. Należy pamiętać, że źródłem fitosteroli są także owoce i warzywa oraz przekąski typu nasiona, orzechy, czekolada [2, 4].

Tłuszcz kakaowy – kluczowy składnik czekolady – jest bardzo charakterystycznym tłuszczem roślinnym, nie tylko ze względu na właściwości organoleptyczne, ale i skład związków biologicznie czynnych. Tłuszcz kakaowy, nazywany również masłem kakaowym, zawiera około 98% triacylogliceroli, 1% wolnych kwasów tłuszczowych, 0,3-0,5% diacylogliceroli i 0,1% monoacylogliceroli. Oprócz acylowanych gliceroli, w tłuszczu kakaowym występują również sterole (0,2%), fosfolipidy (0,05-0,13%), tokoferole (150-250 mg/kg) oraz dużo związków lotnych kształtujących aromat [5]. Wśród steroli obecnych w tłuszczu kakaowym przeważający udział stanowią sterole w postaci wolnej, natomiast estry stanowią około 11,5% ogólnej zawartości [6, 3]. Literatura podaje, że w tłuszczu kakaowym dominują trzy sterole: β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol [2, 7-9]. Pozostałe wykrywane sterole to brassikasterol, $\Delta 5$ -avenasterol, cholesterol i stanole (sitostanol, kampestanol) [2, 6].

Naukowcy na całym świecie donoszą o wielu funkcjach i zaletach żywieniowych fitosteroli. Przede wszystkim jest to obniżanie wchłaniania cholesterolu z pożywienia, ale też działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, wzmagające odporność immunologiczną, obniżające ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej serca [10-12]. Aby zintensyfikować korzystne oddziaływanie fitosteroli na organizm przeciętnego konsumenta, podejmowane są liczne próby zaprojektowania żywności wzbogaconej w te związki. Dotyczy to również wyrobów czekoladowych, które w ten sposób po-

większają asortyment tzw. żywności funkcjonalnej [13-15].

Skład steroli obok kompozycji kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli jest wciąż jednym ze wskaźników wykorzystywanych do analizy jakościowo-ilościowej tłuszczów innych niż kakaowy zawartych w wyrobach czekoladowych [3, 8, 16-18]. Badana jest nie tylko zawartość dominujących steroli, ale także tych występujących w śladowych ilościach. Stanowią one swoiste markery obecności mieszanek tłuszczów roślinnych (np. brassikasterol, $\Delta 5$ -avenasterol, cholesterol) lub tłuszczu mlecznego (cholesterol). Klasyczna analiza ilościowa steroli często nie pozwala na pewną ocenę tłuszczu w wyrobach czekoladowych. Skład surowcowy oraz modyfikacje niektórych rodzajów alternatyw tłuszczu kakaowego (CBA) powodują istotne zmiany chemiczne m.in. zniszczenie struktury steroli. W wyniku przetwarzania CBA czyli poddania procesom dezodoryzacji i wybielania, wolne sterole oraz estry ulegają częściowej degradacji do sterenów [16]. Analiza ilościowa sterenów znalazła zastosowanie do skrininowej metody wykrywania obecności przetwarzanych tłuszczów roślinnych w czekoladach [16, 17]. Również oznaczanie jakościowo-ilościowe samych estrów fitosteroli można wykorzystać do oceny tłuszczu kakaowego [3].

Uwzględniając powyższe aspekty, celem niniejszej pracy była ocena jakości miążg kakaowych różnego pochodzenia geograficznego i wyprodukowanych z nich czekolad na podstawie zawartości steroli ogółem, oznaczonych z wykorzystaniem metody GC-MS. Podjęto próbę oceny możliwości wykorzystania badanych czekolad w diecie człowieka jako źródła steroli.

2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły próbki siedmiu miążg kakaowych, pochodzących z pięciu krajów świata oraz wyprodukowane na ich bazie czekolady naturalne gorzkie (Tab. 1). Tłuszcz z próbek ekstrahowano heksanem, odwirowywano w wirówce laboratoryjnej (5000 obr/min przez 10 min.), a następnie supernatant przesączało i odparowywano w strumieniu azotu. Do oznaczenia zawartości steroli wolnych i estrów pobierano 0,1 g próbki tłuszczu i rozpuszczano w 2 ml heksanu. Następnie dodawano standard wewnętrzny – betulinę (0,4 mg/ml, Sigma Aldrich) i dokładnie mieszano (Vorteks) przez 30 sekund.

Roztwór poddawano zasadowej transestryfikacji w obecności 0,5 ml 2N KOH w metanolu przez 30 min w łaźni ultradźwiękowej. W schłodzonych do temperatury pokojowej próbkach neutralizowano odczynnik metylujący 1% kwasem cytrynowym. Niezwłocznie po wyklarowaniu się faz, 1 ml frakcji heksanowej przenoszono do 1,5 ml wialki i odparowywano rozpuszczalnik w strumieniu azotu. Sililację próbki przeprowadzano poprzez dodanie 100 µl pirydyny oraz 100 µl BSTFA z 1% TCMS i szczelnie zakręcano wialkę. Próbkę wytrząsano przez 30 sekund i prowadzono reakcję derywatywacji w temperaturze 50°C przez okres 2 godzin. Następnie dodawano 1 ml heksanu, ponownie zakręcano wialkę i dokładnie mieszano [7-9].

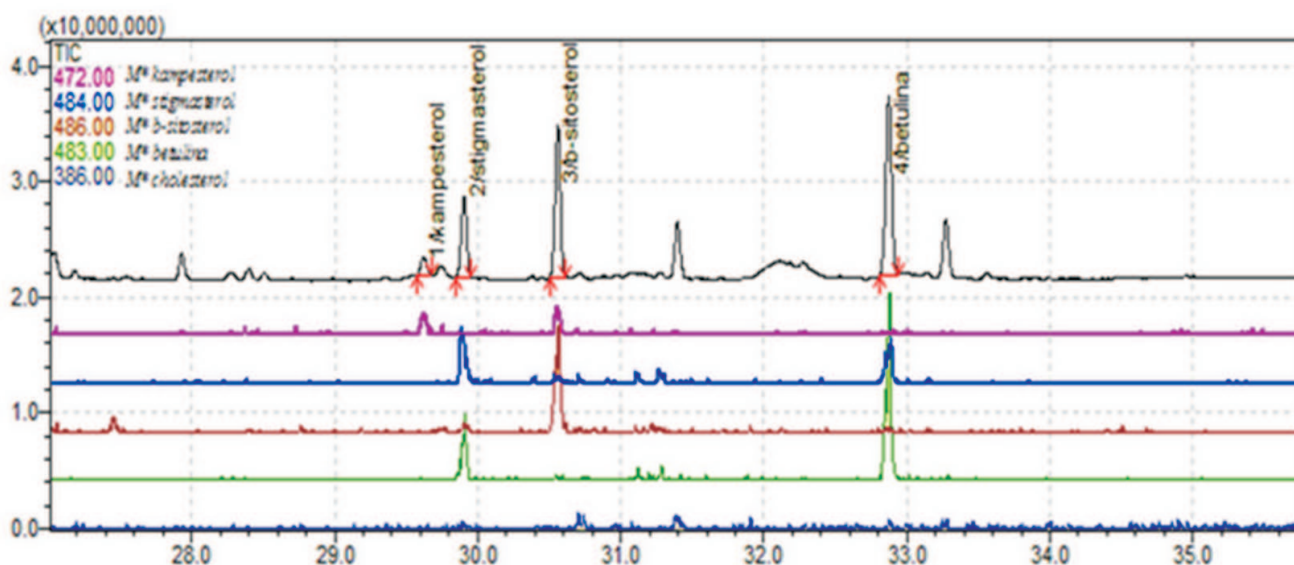
Tabela 1 Pochodzenie miążg kakaowych i czekolad gorzkich

Table 1 Cocoa mass and chocolates geographical origin

Miązgi kakaowe	Pochodzenie	Czekolady gorzkie
CM-1	Ekwador	CH-1
CM-2	Dominikana	CH-2
CM-3	Ghana	CH-3
CM-4	Wybrzeże Kości Słoniowej	CH-4
CM-5	Ghana	CH-5
CM-6	Peru	CH-6
CM-7	Ghana	CH-7

Analizę ilościową wykonano z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym Shimadzu GCMS-QP 2010S. Chromatograf wyposażono w kolumnę kapilarną arylenową ZB-5MS (5%-fenyl-95%-dimetylopolisiloksan) o wymiarach 20 m x 0.18 mm x 0.18 µm (Phenomenex). Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 230°C. Nastrzyki wykonano w trybie bezdzielnikowym. Temperatura pracy kolumny: początkowa 50°C przez 2 min, następnie wzrost temperatury z szybkością 15°C/min do 250°C, utrzymywanie izotermi przez 1 min. Ponowny wzrost temp. z szybkością 3°C/min do 310°C i utrzymywanie izotermi końcowej przez 10 min. Gazem nośnym był hel, a jego przepływ wynosił 1,00 ml/min. Temperatura linii łączącej GC/MS wynosiła 300°C, temperatura źródła jonów – 240°C, widma masowe przemiatane w zakresie 100-600 m/z przy zastosowaniu energii jonizacji wynoszącej 70 eV.

Analizy każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach, w trybie monitorowania wybranych jonów selektywnych (SIM), charakterystycznych dla poszczególnych steroli (Rys. 1). Identyfikacji steroli dokonano na podstawie porównania czasu ich retencji z dostępnymi standardami oraz na podstawie jonów charakterystycznych. Do obliczeń ilościowych zastosowano technikę dodatku standardu wewnętrznego (betulina). Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu STATGRAPHICS Centurion 15.1. Wykonano analizę wariancji (one-way-ANOVA) z użyciem testu Tukeya HSD przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.



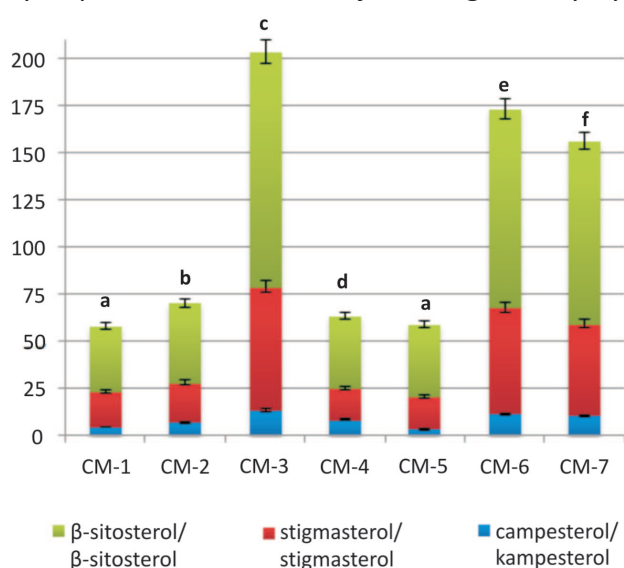
Rysunek 1 Rozdział poszczególnych steroli i standardu wewnętrznego w trybie SIM
Figure 1 Separation of individual sterols and internal standard in SIM mode

Do obliczeń wykorzystano zawartości tłuszczu w miążgach i czekoladach podane przez producentów w specyfikacji lub na opakowaniu. Wszystkie badane próby znajdowały się w okresie przydatności do spożycia określonym datą umieszczoną na etykiecie. Żadna z badanych czekolad nie posiadała adnotacji o użyciu tłuszczów innych niż kakaowy.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

3.1 Sterole w miążgach kakaowych

Zawartość fitosteroli zidentyfikowanych w miążgach kakaowych przedstawiono na Rysunku 2. Zgodnie z literaturą [2, 6-9] sterole obecne w wyekstrahowanym tłuszczu pod względem ilościowym występowały w następującej kolejności: β -sitosterol > stigmasterol > kampesterol. β -sitosterol stanowił średnio $61,4 \pm 1,7\%$ udziałów steroli ogółem, stigmasterol $30,5 \pm 2,4\%$, a kampesterol $8,1 \pm 2,8\%$. Jest to bardzo charakterystyczna dla tłuszczu kakaowego kompozycja steroli, gdyż znakomita większość olejów roślinnych oraz orzechów, które mogą znaleźć zastosowanie do produkcji czekolad, posiada odmienną ich proporcję. Pod względem udziałów β -sitosterol dominuje, lecz drugi w kolejności zamiast stigmasterolu jest kampesterol [2, 6, 19]. Jakikolwiek dodatek wspomnianych produktów do tłuszczu kakaowego powoduje zaburzenie równowagi udziałów steroli, co wykorzystywane jest do wykrywania ewentualnych zafałszowań gotowych produktów. W żadnej z miążg nie wykry-



Rysunek 2 Zawartość steroli w miążgach kakaowych [mg/100 g]

Figure 2 Sterols content in cocoa masses [mg/100 g]

to cholesterolu oraz nasyconych steroli. Również w pracach innych badaczy obserwuje się naturalne występowanie tych związków w bardzo małych ilościach [2, 6].

Największą zawartością steroli ogółem cechowała się miążga CM-3 z Ghany ($203,35 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 9,41 \text{ mg}$). Stanowiły one $0,2\%$ masy miążgi. Kolejne co do wielkości zawartości fitosteroli występowały w miążgach CM-6 ($172,83 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 8,10 \text{ mg}$) i CM-7 ($156,06 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 7,34 \text{ mg}$) pochodzących odpowiednio z Peru i Ghany. Tu zawartość steroli stanowiła $0,17\%$ i $0,16\%$ całkowitej masy. Pozostałe miążgi oznaczone jako CM-1, CM-2, CM-4 i CM-5 zawierały średnio $62,53 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 5,63 \text{ mg}$ steroli (śr. $0,06\%$ masy).

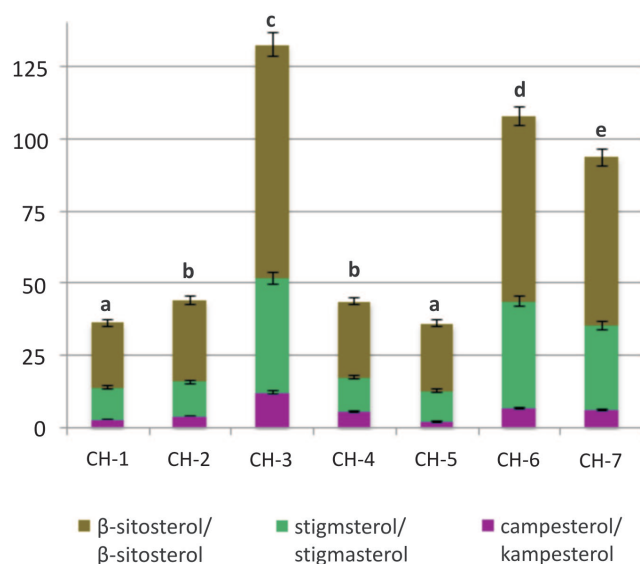
Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w zawartościach steroli przebadanych próbek miążg kakaowych (dla $p \leq 0,05$). Jedynie miążgi pochodzące od jednego z producentów z Ghany oraz z Ekwadoru nie różniły się między sobą statystycznie istotnie. Poszczególne miążgi zostały sklasyfikowane następująco: Ghana (CM-3) > Peru > Ghana (CM-7) > Dominikana > Wybrzeże Kości Słoniowej > Ghana (CM-5) = Ekwador. Wśród badanego materiału znalazły się próbki od trzech różnych plantatorów Republiki Ghany (Tab. 1). Przy maksymalnej 4% różnicy w zawartości tłuszczu między analizowanymi próbkami, pomimo zbliżonego pochodzenia geograficznego odnotowano między nimi statystycznie istotne różnice pod względem zawartości steroli. Zarówno dane literaturowe [2, 3, 6, 17], jak i powyższe wyniki wskazują, że na zawartość steroli w miążgach kakaowych mogą mieć wpływ następujące czynniki:

- odmiana kakaowca,
- pochodzenie geograficzne (kontynent, region) i warunki środowiskowe,
- sezon uprawy i zbiorów (mogą być dwa, a w sprzyjających warunkach nawet trzy sezony),
- rodzaje i parametry procesów zastosowanych do obróbki surowego ziarna kakaowego,
- sposób magazynowania ziarna oraz warunki i sposób transportu,
- rodzaje i parametry procesów zastosowanych do wytworzenia miążgi kakaowej.

3.2 Sterole w czekoladach

Zawartość fitosteroli zidentyfikowanych w czekoladach przedstawiono na Rysunku 3. Zgodnie z literaturą [2, 6-9] oraz wynikami uzyskanymi dla

miazg kakaowych, sterole obecne w wyekstrahowanym tłuszczu pod względem ilościowym występowały w następującej kolejności: β -sitosterol > stigmasterol > kampesterol. β -sitosterol stanowił średnio $61,9 \pm 1,9\%$ udziałów steroli ogółem, stigmasterol $30,0 \pm 2,7\%$, a kampesterol $8,0 \pm 2,5\%$. W żadnej z czekolad nie wykryto cholesterolu oraz nasyconych steroli. Podobnie jak w przypadku miazg doniesienia naukowe potwierdzają ich obecność w niewielkiej ilości do 5 mg/100 g [2, 6].



Rysunek 3 Zawartość steroli w czekoladach [mg/100 g]
Figure 3 Sterols content in chocolates [mg/100 g]

Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji badane próbki czekolad sklasyfikowano pod względem zawartości steroli do pięciu homogenicznych grup. Tak jak w przypadku miazg najwięcej tych związków posiadały czekolady z Peru

i z Ghany, oznaczone jako CH-3 ($122,78 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 5,15 \text{ mg}$), CH-6 ($108,03 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 4,19 \text{ mg}$), i CH-7 ($93,60 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 3,84 \text{ mg}$). Tu zawartość steroli stanowiła odpowiednio 0,12%, 0,11% i 0,09% całkowitej masy. Natomiast pozostałe dwie grupy: CH-2 i CH-4 oraz CH-1 i CH-5 zawierały fitosterole poniżej 50 mg/100 g, co stanowiło 0,04% całkowitej masy. Badane czekolady różniły się zawartością tłuszczu maksymalnie o 3%. Uwzględniając ten czynnik oraz zbliżoną do siebie zawartość tłuszczu w badanych miazgach, zaobserwowano dość regularny spadek zawartości fitosteroli (śr. 37,2%) w czekoladach w porównaniu do miazg, z których powstały (Tab. 2). Również proporcje poszczególnych steroli zostały zachowane (Tab. 3). Uzyskane wyniki nie dają więc żadnych przesłanek o możliwości zastosowania w badanych czekoladach tłuszczu innych niż kakaowy.

Tabela 2 Procentowy spadek zawartości fitosteroli CH/CM
Table 2 Percentage decrease of phytosterol content CH/CM

	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
CH-1/ CM-1	35,7	39,8	35,8
CH-2/ CM-2	40,3	44,1	32,8
CH-3/ CM-3	39,4	40,5	39,2
CH-4/ CM-4	32,8	28,4	31,1
CH-5/ CM-5	34,9	39,0	38,9
CH-6/ CM-6	37,9	34,9	38,9
CH-7/ CM-7	38,4	40,6	39,9
Średnia	37,1	38,2	36,7

Tabela 3 Udziały procentowe zidentyfikowanych fitosteroli
Table 3 Identified phytosterols percentage shares

Materiał badany	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol	Materiał badany	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
CH-1	8,11	31,87	60,01	CM-1	8,29	30,48	61,23
CH-2	9,82	30,20	59,98	CM-2	9,28	26,77	63,95
CH-3	6,57	32,21	61,22	CM-3	6,60	31,74	61,66
CH-4	13,44	25,71	60,85	CM-4	13,03	26,55	60,42
CH-5	5,47	29,57	64,96	CM-5	5,81	29,44	64,75
CH-6	6,49	32,82	60,69	CM-6	6,45	34,18	59,36
CH-7	6,64	31,25	62,10	CM-7	6,83	30,95	62,22
Średnia	8,08	30,52	61,40	Średnia	8,04	30,02	61,94

3.2 Czekolada jako źródło fitosteroli

W świetle badań wykonanych w ramach niniejszej pracy za zasadną uznano próbę oceny czekolady jako źródła fitosteroli. Liczni autorzy są zgodni, że fitosterole ze względu na podobną budowę chemiczną, konkurują w przewodzie pokarmowym z cholesterolem, obniżając tym samym jego poziom we krwi człowieka. Według wyników badań klinicznych podaż fitosteroli z przeciętną dietą konsumenta może się wahać od 150 do 450 mg/dzień i jest silnie zależna od kultury żywieniowej danej populacji [20-22]. Spożycie cholesterolu plasuje się poniżej 300 mg na dzień i jest nadal za wysokie wobec zalecanej wartości 200 mg/dzień [20]. Należy podkreślić, że poziom wchłaniania fitosteroli z diety jest niższy niż 5%, podczas gdy cholesterolu wynosi około 56% [20-21]. Dlatego czynione są starania, aby opracowywać diety bogate w fitosterole, wzbogacone w nie produkty lub suplementy diety [13-15]. Program opracowany przez amerykańskich naukowców USNCE (United States National Cholesterol Education) rekomenduje spożywanie fitosteroli w dawce 2 gramów dziennie, w celu efektywnej redukcji cholesterolu LDL na poziomie 10% [20, 21]. Największa zawartość fitosteroli oznaczona w niniejszej pracy w czekoladach to 122,78 mg/100 g \pm 5,15 mg (CM-3, Ghana). W porównaniu do innych produktów żywnościowych spożywanych przez przeciętnego Europejczyka jest to zatem ubogie źródło fitosteroli, zwłaszcza jeśli weźmie się pod

uwagę częstotliwość spożywania [2-4, 13-15]. Należy pamiętać o wysokiej kaloryczności czekolady. Projektowane są obecnie wyroby czekoladowe wzbogacane w fitosterole, np. praliny, batony, dostarczające w całej masie około 2 gramów tych związków [13-15].

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono w materiale badanym obecność trzech fitosteroli: β -sitosterolu, stigmasterolu i kampesterolu, w proporcji charakterystycznej dla tłuszczu kakaowego. Wyniki pracy wykazały głębokie zróżnicowanie miazg kakaowych i czekolad gorzkich pod kątem zawartości steroli. Na przyjętym poziomie istotności $p \leq 0,05$ wszystkich próbek miazg tylko dwie nie różniły się statystycznie istotnie w tym aspekcie. W przypadku czekolad można mówić o dużym wpływie procesu produkcji i zastosowanej receptury na zawartość steroli. Badanie wykazało, że miazgi i czekolady pochodzące od trzech różnych plantatorów z tego samego regionu geograficznego, można rozróżnić na podstawie zawartości steroli, co jednak wymaga potwierdzenia analizami z udziałem znacznie większej ilości prób. W świetle wyników badań, a także danych literaturowych, z uwagi na niski potencjał pokrywania dziennego zapotrzebowania człowieka na fitosterole, rekomendowane jest spożywanie funkcjonalnych wyrobów czekoladowych wzbogacanych w te związki.

LITERATURA

- [1] Piironen V., Lindsay D., Miettinen T., Toivo T., Lampi A.-M., Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agr.*, 80, 2000, 939-966.
- [2] Normén L., Ellegård L., Brants H., Dutta P., Andersson H., A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 2007, 193-201.
- [3] Kamm W., Dionisi F., Fay L.-B., Hischenhuber C., Schmarr H.-G., Engel K.-H., Analysis of sterol esters in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 918, 2001, 341-349.
- [4] Piironen V., Toivo J., Lampi A.-M., Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food Compos. Anal.*, 13, 2000, 619-624.

- [5] Krygier K., Ratusz K., Alternatywy tłuszczu kakaowego w produkcji cukierniczej, cz. I. Ekwiwalenty i polepszacze tłuszczu kakaowego. *Przegl. Piek. Cuk.*, 8 (44), 1996, 30-31.
- [6] Staphylakis K., Gegiou D., Sterols in cocoa butter. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 87, 1985, 150-155.
- [7] Kruszewski B., Markiewicz E., Obiedziński M. W., Wybrane prozdrowotne składniki czekolady. *Zesz. Probl. Postępów Nauk Rol.*, z. 569, 2011, 173-181.
- [8] Kowalska J., Bzducha A., Derewiaka D., Kopańska K., Nitek A., Ocena autentyczności wybranych czekolad. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (59), 2008, 74-79.
- [9] Kowalska J., Łata A., Charakterystyka zamienników tłuszczu kakaowego i wyrobów z nich otrzymanych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 3 (XLII), 2009, 257-262.
- [10] Fernandes P., Cabral J. M. S., Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.*, 98, 2007, 2335-2350.
- [11] Patel D. M., Thompson P. D., Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*, 186, 2006, 12-19.
- [12] Shimamura M., Immunological functions of steryl glycosides. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 60, 2012, 351-359.
- [13] Polagruto J. A., Wang-Polagruto J. F., Braun M. M., Lee L., Kwik-Urbe C., Keen C. L., Cocoa flavanol-enriched snack bars containing phytosterols effectively lower total and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J. Am. Diet. Assoc.*, 11 (106), 2006, 1804-1813.
- [14] Botelho P. B., Galasso M., Dias V., Mandrioli M., Lobato L. P., Rodriguez-Estrada M. T., Castro I. A., Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. *LWT-Food Sci. Technol.*, 55, 2014, 444-451.
- [15] Garcia-Llatas G., Rodriguez-Estrada M. T., Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem. Phys. Lipids*, 164, 607-624.
- [16] Crews C., Calvet-Sarrett R., Brereton P., The analysis of sterol degradation products to detect vegetable fats in chocolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 10 (74), 1997, 1273-1280.
- [17] Lipp M., Simoneau C., Ulberth F., Anklam E., Crews C., Brereton P., de Greyt W., Schwack W., Wiedmaier C., Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *J. Food Compos. Anal.*, 14, 2001, 399-408.
- [18] Kruszewski B., Obiedziński M., Charakterystyka i ocena jakości tłuszczu kakaowego i jego zamienników. *ABID*, 2 (XVIII), 2013, 107-114.
- [19] Phillips K. M., Ruggio D. M., Toivo J. I., Swank M. A., Simpkins A. H., Free and estrified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.*, 15, 2002, 123-142.
- [20] Ostlund R. E. Jr, Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids*, 42, 2007, 41-45.
- [21] Ling W. H., Jones P. J. H., Minireview Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.*, 57, 1995, 195-206.
- [22] MacKay D. S., Jones P. J. H., Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113, 2011, 1427-1432.