

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

VSEBNOST POLIFENOLOV IN ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA RAZLIČNIH VRST TEMNIH ČOKOLAD Z RAZLIČNO VSEBNOSTJO KAKAVA

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje : Biotehnologija, gozdarstvo, kmetijstvo ali veterina

Sekundarno področje: Biotehnologija

Avtorji: Črt Čučko, Melani Koropec

Mentor: prof. Anita Mustać

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, april 2024

Kazalo vsebine:

POVZETEK.....	V
ZAHVALA.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Raziskovalna vprašanja.....	2
1.2 Hipoteze.....	2
1.3 Cilji raziskovalne naloge.....	3
2 TEORETIČNO OZADNJE.....	4
2.1 Čokolada.....	4
2.1.1 Kemijska sestava čokolade.....	4
2.1.2 Kako je narejena čokolada?.....	5
2.1.3 Kakav.....	6
2.1.4 Zgodovina čokolade in kakava.....	7
2.1.5 Črna čokolada.....	7
2.1.6 Hranilna vrednost in antioksidanti temne čokolade.....	8
2.1.7 Antioksidativna učinkovitost.....	10
2.1.8 Polifenoli.....	11
2.1.9 Fenolne spojine.....	11
2.1.10 Flavonoli in njihov učinek na zdravje.....	12
2.2 Vplivi na vsebnost polifenolov v čokoladi.....	13
2.2.1 Genotip.....	13
2.2.2 Geografska lokacija.....	13
2.3 Sprememba v koncentraciji polifenolov med procesiranjem.....	14
2.3.1 Fermentacija.....	14
2.3.2 Sušenje.....	15
2.3.3 Pečenje.....	15

2.3.4	Alkalizacija	16
2.3.5	Temperiranje	17
2.3.6	Povzetek	17
2.4	Metodologija dela	19
2.4.1	Spektrofotometrija	19
2.4.2	FC - metoda.....	19
2.4.3	DPPH metoda.....	20
2.5	Material	21
2.5.1	Vzorci:.....	21
2.5.2	Reagenti	22
2.5.3	Pripomočki:.....	23
2.5.4	Shematski prikaz dela v laboratoriju	24
3	EKSPERIMENTALNO DELO	25
3.1	Priprava ekstraktov	25
3.1.1	Odstranjevanje maščob	25
3.1.2	Priprava razredčenih ekstraktov.....	26
3.1.3	Priprava umeritvene krivulje z galno kislino	26
3.1.4	Priprava reagentov:	27
3.1.5	Umeritvena krivulja za galno kislino v 70 % acetonu:	27
3.2	Umeritvena krivulja z galno kislino.....	29
4	TEORETIČNI DEL	30
4.1	Računanje molske mase galne kisline po razredčevanju	30
5	ANALIZA VZORCEV	32
5.1	Izračun in umeritvena krivulja:	32
5.2	Določanje antioksidativne kapacitete z DPPH reagentom.....	34
5.3	Izračun inhibicije z DPPH	35
6	RAZPRAVA.....	37

6.1	Korelacija vsebnosti polifenolov in vsebnosti kakava.....	37
6.2	Korelacija vsebnosti kakava in antioksidativne kapacitete.....	37
6.3	Korelacija med vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto	38
6.4	Primerjava vsebnosti polifenolov glede na znamko čokolade.....	40
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST	42
8	ZAKLJUČEK IN SKLEPI.....	43
9	VIRI IN LITERATURA.....	44

Kazala:

Kazalo slik:

Slika 1: Uporabljene čokolade	21
Slika 2: Pipeta	23
Slika 3: Avtomatska pipeta	23
Slika 4: Centrifuga	23
Slika 5: Spektrofotometer	23
Slika 6: Priprava čokolade	25
Slika 7: Pripravljene raztopine za umeritveno krivuljo	28
Slika 8: Vzorci z ekstraktom in F-C reagentom.....	33
Slika 9: Vzorec z dodanim reagentom	34
Slika 10: Vzorec z dodanim reagentom po nekaj minutah	34

Kazalo grafov:

Graf 1: Umeritvena krivulja z galno kislino	29
Graf 2: Prikaz podatkov grafa umeritvene krivulje z galno kislino.....	29
Graf 3: Linearna regresija	39

Kazalo preglednic:

Preglednica 1: Prikaz podatkov uporabljenih čokolad.....	21
Preglednica 2: Uporabljeni reagenti.....	22
Preglednica 3: Uporabljeni pripomočki	23
Preglednica 4: Priprava raztopine za umeritveno krivuljo z galno kislino	28
Preglednica 5: Legenda za računanje koncentracije galne kisline.....	30
Preglednica 6: Koncentracija galne kisline po razredčevanju	31
Preglednica 7: Priprava vzorcev za analizo s F-C reagentom.....	32
Preglednica 8: Primerjava absorbance in koncentracije polifenolov	33
Preglednica 9: Priprava vzorcev z DPPH	35
Preglednica 10: Vrednosti inhibicije vzorcev čokolade.....	36
Preglednica 11: Primerjava koncentracije in inhibicije vzorcev.....	39

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali s tem, v kolikšni meri čokolada res vsebuje snovi, ki podpirajo naše zdravje, zato smo ugotavljali koncentracijo polifenolov in antioksidativno kapaciteto temne čokolade. Za naše delo smo izbrali čokolade različnih znamk in različnih vsebnosti kakava [%] (85%, 90% in 99%). Skupno vsebnost polifenolov smo merili z absorbanco svetlobe v spektrofotometru pri valovni dolžini 765 nm, antioksidativno kapaciteto pa pri valovni dolžini 517 nm. Za meritev skupne vsebnosti polifenolov smo uporabljali F-C reagent, za meritev antioksidativne kapacitete pa DPPH-reagent. Koncentracijo polifenolov smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje z galno kislino, antioksidativno kapaciteto pa z uporabo posebne formule. Analiza rezultatov je pokazala, da imajo čokolade z večjo vsebnostjo kakava v povprečju večjo antioksidativno kapaciteto. Vsebnost polifenolov pa v našem primeru ni rasla popolnoma enakomerno z rastjo vsebnosti kakava.

Ključne besede: Čokolada, polifenoli, antioksidanti, DPPH-reagent, F-C reagent

ZAHVALA

Zahvaljujemo se mentorici za pomoč in podporo pri načrtovanju in izvajanju eksperimentov ter za ves čas, ki ga je namenila za sprotno pregledovanje in svetovanje ob pisanju raziskovalne naloge. Zahvala gre tudi laborantki za pomoč pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge ter aktivu biologov za dovoljeno uporabo pripomočkov.

1 UVOD

Zgodba o čokoladi se pričinja pred nekaj tisoč leti v tropskih gozdovih Centralne in Južne Amerike. Beseda » xocoatl« (beseda za priljubljeni, grenak, čokoladni zvarek pri Majih) istočasno odseva tudi drame svojega časa, ki so povezane z špansko osvojitvijo Novega sveta. (Čokoladni atelje, 2019). Čeprav je Kolumb prva kakavova zrna v Evropi prinesel že leta 1502, so prvo tablico čokolade v Evropi izdelali šele leta 1848. Dandanes pa je čokolada kot sladka sladica priljubljena po vsem svetu, zadnje čase se temna čokolada uveljavlja tudi kot del zdrave prehrane.

Potrebno se je zavedati, da večina ljudi raje kot po črni, posega po mlečni čokoladi, ta pa v večini primerov vsebuje veliko kalorij, nezdravih maščob in sladkorja, zato naj bo le-ta na jedilniku čim redkeje. Minerali, flavanoli in druge zdravju koristne snovi se nahajajo v kakavu, zato delež teh v čokoladi upada z deležem kakava. Bela čokolada kakava v prahu sploh ne vsebuje, zato koristnih snovi iz kakava v njej ne najdemo. Prav tako je količina flavanolov odvisna od sorte in rastišča kakava, stvari pa se še dodatno zapletejo, če upoštevamo dejstvo, da se flavanoli lahko uničijo tudi v postopku obdelave. Britanska študija, v kateri so analizirali različne čokolade na tržišču, je pokazala, da črna čokolada vsebuje občutno večji delež flavanolov v primerjavi z mlečno čokolado, vendar delež le-teh ni bil odvisen od odstotka kakava v črni čokoladi. To pomeni, da je delež flavanolov v čokoladi izjemno variabilen in ga kupec ob nakupu čokolade ne more predvideti.

Kljub vsemu je temna čokolada z visokim deležem kakava še zmeraj najboljša izbira, saj v povprečju vsebuje največje količine flavanolov, njena močna aroma pa preprečuje, da bi je pojedli 100 g naenkrat, kot to marsikomu uspe z mlečno čokolado. Še bolje kot čokolado, je jedem dodajati čisti kakav v prahu, saj le-ta ne vsebuje sladkorjev in dodanih maščob. Najboljši nasvet za uživanje čokolade pa torej ostaja: Črna čokolada v zmernih količinah. (Hladnik, 2019)

Če bi čokolado res lahko uvrstili med zdravo prehrano, sva na podlagi petih izbranih čokolad priljubljenih znamk, testirala vsebnost antioksidantov in polifenolov, saj naj bi ti imeli pozitivne učinke na zdravje, kot tudi zmanjšano tveganje bolezni srca in znižanje krvnega tlaka ter

zmanjšanje vnetja. Hkrati pa se z uživanjem čokolade pridobijo vsi pozitivni učinki uživanja antioksidantov, saj naj bi jih čokolada vsebovala več kot nekatero sadje.

V raziskovalni nalogi smo zato natančneje primerjali in raziskali kako se vsebnosti teh zdravnih spojin kot so polifenoli in vsebnosti snovi, ki delujejo kot antioksidanti spreminja z višanjem vsebnosti kakava v čokoladi.

1.1 Raziskovalna vprašanja

Ob postavljanju hipotez in ciljev smo si zastavili nekaj raziskovalnih podvprašanj, na katera smo kasneje odgovarjali v zaključni razpravi. Ta vprašanja so:

1. Kakšna je vsebnost polifenolov v čokoladah z različno vsebnostjo kakava?
2. Kakšna je antioksidativna kapaciteta čokolad z višjo vsebnostjo kakava?
3. Ali obstaja korelacija med višjo vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto?
4. Kako znamka čokolade vpliva na vsebnost polifenolov in antioksidativno kapaciteto posamezne čokolade?

1.2 Hipoteze

Na podlagi predznanja in prebrane literature smo določili sledeče hipoteze:

1. Z višanjem koncentracije kakava se bo povečala vsebnost polifenolov.
2. Z višanjem vsebnosti kakava se bo povečala antioksidativna vrednost.
3. Z višanjem vsebnosti polifenolov se bo povečala tudi antioksidativna kapaciteta.
4. Lindt čokolada bo pri isti vrednosti vsebovala več polifenolov in višjo antioksidativno kapaciteto.

1.3 Cilji raziskovalne naloge

Cilji naše raziskovalne naloge so bili predvsem ugotoviti če je korelacija med višjo vsebnostjo kakava in višjo vsebnostjo polifenolov in antioksidantov utemeljena in če zato čokolada spada med uravnoteženo in zdravo prehrano in če je njeno »promoviranje« upravičeno.

To da vsebuje polifenole in antioksidante je znano, nas pa je zanimalo to za čokolado z višjo vsebnostjo kakava če se te vsebnosti razlikujejo glede na znamko čokolade.

2 TEORETIČNO OZADNJE

2.1 Čokolada

Temna čokolada in čokolada je nasploh zelo cenjeno živilo, ki je pri ljudeh vzbudilo pozornost že 2000 let pred našim štetjem. Danes pa postaja vse popularnejša kot pomemben del zdrave prehrane.

Temna čokolada vsebuje veliko hranil, ki lahko pozitivno vplivajo na naše zdravje in kognitivne procese. Pripravljena je iz semena kakavovega drevesa in je eden izmed najboljših virov antioksidantov na planetu. Kakavova semena pridobivajo iz ploda, nato jih fermentirajo, posušijo in pražijo. Lupine kakavovih semen se ločijo od "mesa". Kakavova zrna so zmleta v tekočino, ki jo imenujemo čokoladna tekočina in ločena od maščobnega dela oz. Kakavovega masla. Čokoladna tekočina je nato obdelana do oblike ki jo poznamo kot čokolada. (Hladnik, 2019)

Temna čokolada vsebuje 50 - 90% suhe snovi kakaovih delov, kakavovo maslo in sladkor, medtem ko mlečna čokolada vsebuje od 10 - 50% suhe snovi kakaovih delov, kakavovo maslo, mleko v kakršnikoli obliki in sladkor. Bela čokolada ne vsebuje kakaovih trdnih snovi in je narejena iz kakavovega masla, sladkorja in mleka. (Hladnik, 2019)

2.1.1 Kemijska sestava čokolade

Čokolada je sestavljena iz 400 različnih kemijskih spojin. Med najpomembnejše sodijo ogljikovi hidrati, beljakovine, proste aminokisliline, maščobe, minerali (natrij, kalij, fosfor, železo, cink, fluor, krom, selen, magnezij, baker, itd.) voda, vitamini, balastne snovi, psihoaktivne snovi (teofilin, triptofan...), kofein, antioksidanti, barvila, encimi in aromatične snovi. (Verbič, 2016)

Najpomembnejša sestavina, ki kasneje postane ena izmed glavnih sestavin v čokoladi. Je maščoba pridobljena iz zrn kakavovca, kakavovo maslo (*Theobroma cocoa*). Vsebuje antioksidant vitamin E, ki varuje celice pred oksidativnim stresom. (Verbič, 2016)

2.1.2 Kako je narejena čokolada?

Čokolada je narejena iz jedrc fermentiranih in praženih kakavovih zrn. Jedrca se zmeljejo, da nastane pasta, tekoča čokoladna pijača, ki se lahko strdi v kalupih, da se oblikuje grenka čokolada (peka), stisnejo, da se zmanjša vsebnost kakavovega masla, in nato zdrobijo, da se naredi kakav v prahu, ali pa se zmeša s sladkorjem in dodatnim kakavovim maslom, da narediti sladko (jedo) čokolado. Z dodajanjem suhega ali zgoščenega mleka sladki čokoladi nastane mlečna čokolada. Bela čokolada, cenjena zaradi svoje bogate teksture in nežnega okusa, tehnično ni čokolada. Bela čokolada je narejena iz kakavovega masla z dodanimi mlečnimi izdelki, sladkorjem in aromami, kot je vanilija. (Hladnik, 2019)

Postopek priprave čokolade se začne s pobiranjem strokov. Potem iz njih vzamejo kakavova zrna. Izpostavijo jih soncu in zrna spremenijo svojo barvo iz kremaste v vijoličasto. Nato semena razporedijo na bananine liste. Vse skupaj pustijo 5-6 dni počivati, da semena fermentirajo. S tem postopkom ustavijo nadaljnjo rast semen. Ko encimi in vse ostale sestavine med seboj reagirajo že ustvarijo prve čokoladne okuse in barva semen je že bolj podobna končnemu izdelku-čokoladi. Po fermentaciji so semena pripravljena za sušenje in sicer jih sušijo na lesenih ali bambusovih tleh. Ta proces poteka od 10-20 dni. Seveda pa ta zrna tudi obračajo, da ne bi prišlo do plesnitve. Zrna po sušenju pošljejo v tovarne, kjer jih očistijo in odstranijo koščice. Pečenje poteka pri temperaturi nad 100 stopinj. Potem pa jih ohladijo, da se ne bi pražila še naprej. Semena dajo v drobilnico, da se ločijo koščice od semen. Koščice potem stisnejo in potem iz njih dobijo kakavovo maso. Na koncu ostane samo še kakavov prah. Naslednji del postopka je conching. Ta priprava je delo švicarja Rodolfa Lindta. In sicer stroj nežno treso čokoladno zmes, da se zmešča in postane gladka. Čokoladno zmes prelijejo v posode za temperiranje, kjer jo ohladijo do te mere, da je še vedno v tekočem stanju. Ker se zmes hitro ohlaja se maščobe enakomerno porazdelijo. (Verbič, 2016)

2.1.3 Kakav

Sestava kakava je izjemno zapletena, saj zrna, sestavlja več kot 300 različnih kemijskih komponent. Glavna sestavina zrn je kakavovo maslo, ki ga sestavljajo nasičeni stearinska in palmitinska maščobna kislina ter enkrat nenasičena oleinska maščobna kislina. Preostanek zrn, ki ostane po ekstrahiranju olja, poznamo pod imenom kakav v prahu. Kakav v prahu je izjemno bogat z minerali: manganom, magnezijem, železom, fosforjem in cinkom. 100 g kakava v prahu vsebuje tudi okoli 230 mg kofeina in 2057 mg teobromina, dveh alkaloidov, ki imata zaradi vpliva na centralni živčni sistem poživilen učinek. Med pomembnejše bioaktivne sestavine kakavovih zrn prištevamo še flavanole (antioksidante iz družine polifenolov), ki so v zadnjih letih postali predmet številnih znanstvenih raziskav. (Prehrana.si, 2021) Temna čokolada vsebuje veliko organskih spojin, ki so biološko aktivne in delujejo kot antioksidanti. Med njimi so polifenoli, flavonoidi in katehini. Ena izmed študij je pokazala da sta kakav in temna čokolada vsebovala več antioksidantov, polifenolov in flavonoidov kot sadje, ki so ga testirali. (Jakopin, 2017)

Kakav je bogat z rastlinskimi kemikalijami, imenovanimi flavonoli, ki lahko pomagata zaščititi srce. Temna čokolada vsebuje do 2-3 krat več trdnih kakavovih delcev, bogatih s flavanoli, kot mlečna čokolada. Kakav je včasih obdelan z alkalijami da bi izboljšali okus in videz. Vendar to povzroča znatno izgubo flavanolov. Naravni kakav, ki se v trgovinah nahaja na policah s sestavinami za peko slaščic, ima ohranjenih največ flavonoidov.

2.1.3.1 Uživanje kakava

Uživanje kakava se je začelo v Ameriki in sredi 16. stoletja se je hitro razširilo v Evropo. Poleg tega, da je čokolada veljala za prijetno navado zaradi bogatega sladkega dolgotrajnega okusa, je veljala za dobro hranilo in celo zdravilo. Tradicionalno so bile zdravstvene koristi kakava povezane z visoko vsebnostjo antioksidantov v kakavovih zrnih Theobroma. Vendar pa je neposreden psihoaktivni učinek zaradi metilksantinov v kakavu opazen. Teobromin in kofein v razmerjih, kot jih najdemo v kakavu, sta odgovorna za všečnost hrane/pijače. Te spojine pozitivno vplivajo na naše razpoloženje in stanje budnosti. Zdi se, da je teobromin, ki ga najdemo v večjih količinah kot kofein, v ozadju več učinkov, ki jih pripisujemo uživanju kakava. Glavni mehanizmi delovanja so zaviranje fosfodiesteraz in blokada adenozijskih

receptorjev. Raziskujejo se nadaljnji mehanizmi za boljše razumevanje zdravstvenih koristi, povezanih z uživanjem teobromina. Za razliko od tega, kar se dogaja pri drugih sesalcih, vključno s hišnimi ljubljenci, je teobromin varen za ljudi in ima manj neželenih učinkov kot kofein. Zato si teobromin zasluži pozornost kot ena najbolj privlačnih molekul v kakavu. Fiziološki učinki kakavovih sestavin in zlasti teobromina si zaslužijo natančno preučitev, da bi bolje razumeli lastnosti uživanja čokolade. Razlike med kofeinom in teobrominom, ki jih zaznavajo potrošniki, so predvsem posledica njunih najpogostejših molekul: kofeina v kavi in teobromina v kakavu. Poleg tega je lahko visoka vsebnost ogljikovih hidratov v kakavovih izdelkih dodaten dejavnik, ki ga je treba upoštevati. (Eva Martínez-Pinilla, 2015)

2.1.4 Zgodovina čokolade in kakava

Uporaba kakava sega daleč v zgodovino, v čas zgodnjih južno-ameriških civilizacij, kjer so kakav uporabljali v obrednih napitkih in na poročnih ceremonijah. Kakav so začeli uporabljati že Olmeki, prva znana civilizacija na območju današnje Mehike, skoraj 2000 let pr.n.št., gojiti pa nedolgo zatem. Kmalu so uspešne metode gojenja razvili tudi Maji in Azteki, ki so verjeli, da je kakav darilo bogov, zato je napitek iz kakava, vode, čilija in začimb, imenovan xocolatl ostal privilegij višjih slojev in vojščakov. Beseda kakav tako izvira iz majevske besede kakawa, kar v dobesednem prevodu pomeni »hrana bogov«. Kakav in čokolada sta bila Evropi popolna neznanka vse do 16. stoletja, ko je Krištof Kolumb s svoje četrte plovbe v Ameriko prinesel zrna kakava. Španski dvor je napitek iz kakava sicer vzljubil šele po tem, ko so originalnemu azteškemu napitku dodali žlico sladkorja, v naslednjih stotih letih pa se je zanimanje zanj razširilo po vsej Evropi. Danes ljudje v prehrani kakav uporabljamo na številne različne načine – letno po vsem svetu zaužijemo kar 3 milijone ton kakava, največ v obliki čokolade in kakavovih napitkov. (Prehrana.si, 2021)

2.1.5 Črna čokolada

Temna oz. črna čokolada ima zelo pozitiven vpliv na naše telo in je ena izmed najbolj zdravih čokolad. Zmerne količine temne čokolade pomagajo pri preprečevanju bolezni srca in ožilja.

Da pa je temna čokolada tako zdrava so krivi flavanoidi, ki se nahajajo v njej. Flavanoidi tudi preprečujejo tudi razvoj rakavih celic in širjenje tumorja po našem telesu. Črna čokolada ima tudi vlogo zniževanja pritiska v našem telesu. Seveda pa čokolada sama ne more spremeniti našega zdravja, zraven sodi še veliko drugih dejavnikov, ki vplivajo nanj. Čokolada je le nekakšna pomoč za boljše počutje in za zdravje. Na dan strokovnjaki priporočajo, da pojemo največ dve rebri temne čokolade, prevelike količine pa nam lahko škodujejo in nam pridobivajo odvečne kilograme. (Verbič, 2016)

Temna čokolada je precej hranljiva, saj vsebuje precej topnih vlaknin in mineralov, kot so železo, baker, mangan, magnezij, prav tako ima veliko kalija fosforja cinka in selena. Čeprav ima veliko hranil, jo je vseeno potrebno uživati zmerno, namreč vsa ta hranila vsebujejo tudi okoli 600 kcal, prav tako pa je v čokoladi prisoten tudi sladkor in maščobe. Profil maščobnih kislin temne čokolade je sicer odličen. Maščobe so večinoma nasičene in mononenasičene z majhnimi količinami polinenasičenih maščob, vendar jih je vseeno potrebno uživati zmerno. (Jakopin, 2017) Vsebuje tudi zmerno količino nasičenih maščob, ki lahko negativno vplivajo na ravni lipidov v krvi, čeprav se zdi, da zaščitni učinki flavanolov na srce prevladajo nad tveganjem. Izbira kakovostne temne čokolade in uživanje skromne količine lahko nudi največje koristi za zdravje. (Nathan Mahyrvold, 2023)

Študije kažejo, da lahko temna čokolada izboljša zdravje in zmanjša tveganje za bolezni srca. (Nathan Mahyrvold, 2023)

2.1.6 Hranilna vrednost in antioksidanti temne čokolade

Temna čokolada je vir antioksidantov. Temna čokolada namreč vsebuje veliko organskih spojin, ki so biološko aktivne in delujejo kot antioksidanti, med njimi so polifenoli, flavanoli in katehini. Ena študija je pokazala da sta kakav in temna čokolada vsebovala več antioksidantov, polifenolov in flavanolov kot sadje, ki so ga testirali, med katerimi so bile tudi borovnice in jagode Acai. (Jakopin, 2017) Za antioksidante zdravniki trdijo, da varujejo vaše telo in učinkujejo dobrodejno na vaše telo. Dejstvo je, da imata temna čokolada in kakav več antioksidantov kot npr. Borovnice, pravi čaj ali rdeče vino. (Čokoladni atelje, 2019)

Glavna sestavina v čokoladi je kakavovo zrno, seme iz ploda drevesa kakavovca. Zaradi moderne predelave in oblike čokoladne tablice mnogi čokolade ne povezujejo z naravno pridelavo, vendar je čokolada produkt, ki raste iz zemlje.

Znanstveniki trdijo, da rastline proizvajajo antioksidante zato, da jim pomagajo pri rasti in borbi proti trdemu naravnemu okolju. Te sestavine lahko pomagajo tudi človeku. Zdravilni učinki hrane z veliko antioksidanti so v zadnjem času tema znanstvenih razprav in zanimiva tema v različnih medijih. Zadnje študije kažejo, da lahko antioksidanti v hrani zmanjšujejo možnost različnih bolezni, od bolezni srca do rakavih obolenj. Temna čokolada in kakav vsebujeta visoko raven antioksidantov. Dve žlički pravega kakava imata več antioksidantov kot npr. Štiri skodelice pravega čaja ali kozarec in pol rdečega vina. Raziskave kažejo da že po 30 minutah po zaužitju 40 gramov črne čokolade raven dveh glavnih antioksidantov, epikatekina in katekina naraste. Vrhunec dosežeta po dveh urah po zaužitju čokolade, po šestih urah pa ju ni zaslediti več v telesu. (Čokoladni atelje, 2019)

2.1.7 Antioksidativna učinkovitost

Antioksidanti so snovi, ki s svojo prisotnostjo zavirajo oksidacijske procese, torej procese, v katerih kot stranski produkt nastajajo prosti radikali. V človeškem telesu le-ti nastajajo predvsem kot stranski produkti metabolizma kisika (t.i. celičnega dihanja). Čeprav je kisik za nas življenjskega pomena, se lahko hkrati v telesu obnaša kot zelo reaktivna molekula, zato ima naše telo precej mehanizmov, ki preprečujejo, da bi v telesu nastalo preveč prostih radikalov. Ti namreč zaradi svoje reaktivnosti sprožajo številne neželene kemijske reakcije in s tem poškodujejo celice - to pa je lahko eden izmed vzrokov za nastanek številnih bolezni, kot so rakaste tvorbe, infarkt, diabetes in vnetne bolezni (npr. artritis), hkrati pa pospešujejo samo staranje organizma. Povečano število prostih radikalov nastaja predvsem takrat, ko je naše telo pod stresom. To je lahko bodisi psihični ali fizični stres. Poleg omenjene lastne obrambe, v telesu antioksidativno delujejo tudi številne spojine, ki jih lahko zaužijemo s prehrano.

Kot antioksidanta tako v telesu delujeta vitamina C (askorbinska kislina) in E ter karoteni (oranžna rastlinska barvila), ki jih naše telo samo pretvori v vitamin A. Vlogo antioksidantov pri preprečevanju bolezni je težko ovrednotiti, saj je v epidemioloških študijah njihovo vlogo skorajda nemogoče ločiti od vitaminov in ostalih koristnih spojin, prisotnih v sadju in zelenjavi. A nekatere intervencijske študije, še pred njimi pa številne laboratorijske raziskave, so pokazale, da redno uživanje rastlinskih antioksidantov zmanjšuje možnost za oksidativne poškodbe celic in s tem za nastanek nekaterih bolezni. (Prehrana.si, 2021)

Antioksidanti varujejo celice pred škodljivimi molekulami, ki jih imenujemo prosti radikali. To so nestabilne kisikove molekule, ki lahko povzročijo spremembe v sicer zdravih celicah. Te spremembe naj bi bile vzrok mnogih kroničnih bolezni. Najboljši način za obnovitev zaloge antioksidantov je pravilna prehrana.

2.1.8 Polifenoli

Polifenoli spadajo v skupino fenolov, ti pa so spojine, ki imajo hidroksilno skupino vezano neposredno na aromatski obroč. Polifenoli specifično so spojine z več hidroksilnimi skupinami in več aromatskimi obroči. Pojavljajo se v rastlinskih tkivih ter te ščitijo pred škodljivimi vplivi reaktivnih kisikovih zvrsti. Zato jih uvrščamo med oksidante, saj med te uvrščamo snovi, ki zavirajo nezaželene oksidacijske procese v živih organizmih in v snoveh. (Dolenc, 2019)

Polifenoli so v naravi najbolj zastopana oblika antioksidantov in pogosto del našega jedilnika, saj se v velikih količinah nahajajo v sadju in zelenjavi, pa tudi v zelenem in črnem čaju, kavi, čokoladi, rdečem vinu, olivah in olivnem olju ter nekaterih oreščkih in začimbah. Večina dosedanjih raziskav učinek polifenolov dokazala na laboratorijskih živalih, vpliv polifenolov pri ljudeh še ni dovolj raziskan, da bi Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) polifenole uvrstila med živila, ki zmanjšujejo tveganja za razvoj omenjenih bolezni (varovalni učinek pred nevrodegenerativnimi boleznimi) (Prehrana.si, 2021). Razlog, da je prava čokolada polna antioksidantov je v tem, da kar 10% teže suhega kakavovega zrna vsebuje polifenole.

2.1.9 Fenolne spojine

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in so prisotne v vseh rastlinah. Imajo najmanj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi skupinami direktno vezanimi na obroč. Njihova struktura variira od enostavnih fenolnih molekul do kompleksnih polimerov z visoko molsko maso. Običajno so glikolizirani kar poveča njihovo topnost v vodi. Struktura fenolnih spojin določa njihov antioksidativni potencial. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti nastali iz primarnih metabolitov. Te spojine imajo pomembno vlogo pri rasti in razmnoževanju celic, omogočajo zaščito pred patogenimi mikroorganizmi in škodljivci. (Bauman & Petrovič, 2020) Fenoli so aromatski sorodniki alkoholov, vendar so bolj kisli, ker so njihovi ustrezniki fenoksidnih anionov resonančno stabilizirani z delokalizacijo negativnega naboja v aromatskem obroču. Substitucija aromatskega obroča z elektrondonosno skupino zmanjšajo kislost. Fenoli se lahko oksidirajo v kinone, kinoni pa se lahko reducirajo nazaj v hidrokinone. (McMurry, 2015, str. 564)

Pri oksidaciji fenolov nastanejo kinonu. Kinoni so pomembni zaradi njihovih redoks lastnosti. Zlahka se reducirajo v hidrokinone z reagenti kot so NaBH_4 in SnCl_2 , in hidrokinoni so lahko ponovno oksidirani v kinone z $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ali natrijevim dikromatom. Redoks lastnosti so pomembni pri funkcioniranju živih celic, kjer spojine imenovane ubikinoni delujejo kot biokemični oksidacijska sredstva za posredovanje pri procesih prenosa elektronov, vključenih v proizvodnjo energije. Ubikinoni imenovani koencimi Q so sestavni deli celic vseh areobnih organizmov, od najenostavnejših bakterij do ljudi. Tako se imenujejo zaradi njihove razširjenosti v naravi. Ubikinoni funkcionirajo znotraj mitohondrija v celicah, kjer sodelujejo v procesih, kjer so elektroni transportirani od biološkega reducenta NADH na molekulo kisika. Preko kompleksnih postopkov se ta oksidira v NAD^+ , O_2 pa je zreduciran v vodo, in nastane energija. Ubikonone deluje le kot neke vrtse katalizator in se sam ne spreminja pri postopku. (McMurry, 2015, str. 558)

Fenoli kažejo značilno široko absorbcijo v infrardečem spektru pri 3500cm^{-1} zaradi OH skupine, kot tudi običajne 1500 in 1600 cm^{-1} aromatske pasove. v samem fenolu so vrhovi monosubstituiranega aromatskega obroča vidni pri $690\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ (McMurry, 2015, str. 559) Zato jih je možno določiti s pomočjo spektroskopije.

2.1.10 Flavonoli in njihov učinek na zdravje

Kakav je bogat z rastlinskimi kemikalijami, imenovanimi flavanoli, ki lahko pomagajo zaščititi srce. Temna čokolada vsebuje do 2-3 krat več trdnih kakavovih delcev, bogatih s flavanoli, kot mlečna čokolada. Za flavanole je bilo dokazano, da podpirajo proizvodnjo dušikovega oksida (NO) v endoteliju (notranja celična obloga krvnih žil), ki pomaga sprostiti krvne žile in izboljšati pretok krvi, s čimer znižuje krvni tlak. Flavonoidi v čokoladi so v kratkoročnih študijah povečali občutljivost za inzulin; na dolgi rok bi to lahko zmanjšalo tveganje za sladkorno bolezen. (Hladnik, 2019)

Opazovalne študije podpirajo koristi kakavovih flavanolov. Povezava med krvnim tlakom in visokim vnosom kakava je bila opisana v študiji ljudstva Kuni, ameriških staroselcev oz. Indijancev. Kuni so izolirano pleme, ki živi na karibski obali Paname. Hipertenzija (visok krvni tlak) je bila v tej populaciji izjemno redka, celo med starejšimi in celo s prehranskim vnosom soli, ki je večji od vnosa soli večine zahodne populacije. (Nathan Mahyrvold, 2023)

2.2 Vplivi na vsebnost polifenolov v čokoladi

Kakav je zimzelena rastlina iz tropskih predelov Centralne in Južne Amerike, na kateri v ovalnih oranžnih strokih dozori kakavova semena. Zrela kakavova zrna so vijolične do rjavovijolične barve in morajo nato še fermentirati, da postanejo značilno temno rjave barve. Temu sledi še sušenje in odstranitev semenske ovojnice, nato pa so semena pripravljena za transport in predelavo. Ta kakav pa potem ob predelavi izgubi nekatere značilnosti in vsebnosti. (Prehrana.si, brez datuma)

2.2.1 Genotip

Drevo kakavovca (*Theobroma cacao*) in njegovi plodovi (zrna) so značilni po pomembni genetski raznolikosti, ki določa lastnosti izdelkov iz njih. Poznanih je več kot 14.000 sort kakavovca, pri čemer so najbolj pogoste: sorte Forastero, Criollo in Trinitario.

Pomembno je omeniti, da so senzorične lastnosti, kot so okus, barva in aroma kakavovih zrn, med drugim odvisne od vsebnosti in sestave polifenolov, ki so v njih vsebovani. Še toliko bolj je potrebno analizirati spremembe v vsebnosti fenolnih spojin z vidika tako zdravja kot tudi sprejemanja potrošnika, ki izhajajo predvsem iz senzoričnih lastnosti izdelka. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.2.2 Geografska lokacija

Kemična sestava kakavovih zrn in izdelkov, narejenih iz njih, se razlikuje in je odvisna od vrste zrn, geografske lokacije plantaž, zrelosti zrn ter metod, uporabljenih pri obdelavi, fermentaciji in sušenju zrn. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na vsebnost biološko aktivnih spojin, so tudi pogoji tal in podnebja ter stresne razmere. Učinek geografskega izvora kakavovih zrn je potrdila študija Macedo in sodelavcev, ki je pokazala, da aktivnost encimov kakava je odvisna od genotipa zrn in geografskega izvora ter uporabljenih parametrov fermentacijskega procesa. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

Študija, ki so jo izvedli Carrillo in sodelavci, o vplivu geografskega izvora na vsebnost polifenolov, metilksantina in antioksidativne ravni kakavovih zrn iz različnih regij Kolumbije,

je pokazala pomembne ($p < 0,05$) razlike v vsebnosti skupnih polifenolov (TPC) in vsebnosti flavan-3-olov, katehin epikatehin, teobromina in kofeina ter antioksidativni sposobnosti. Ugotovitve kažejo, da nižja kot je nadmorska višina, višja je vsebnost polifenolov, epikatehina in flavan-3-olov v plodovih kakavovca. Rezultati analize glavnih sestavin (PCA) nakazujejo, da lahko razmerje teobromin/kofein uporabimo kot parameter za razvrščanje kakavovih zrn glede na njihov izvor. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3 Sprememba v koncentraciji polifenolov med procesiranjem

2.3.1 Fermentacija

Ključen proces, ki določa kakovostne in fizikalno-kemijske lastnosti kakavovih izdelkov, je fermentacija. Ta se izvaja na plantažah, običajno pod naravnimi okoljskimi pogoji.

Kot kaže študija Giacometii in sodelavcev, kvasovke, bakterije mlečne kisline in bakterije očetne kisline imajo zaščitne učinke na ravni polifenolov, medtem ko aerobne spore in plesni izvajajo negativne učinke. Daljša fermentacija povzroča večje zmanjšanje vsebnosti flavanolov. Trognitz in sodelavci poročajo, da se zmanjšanje vsebnosti polifenolov med fermentacijo lahko pripisuje posebnim genetskim in anatomskim lastnostim zrn.

Med fermentacijo encimi kakavovih zrn obdelujejo predhodnike okusa čokolade. Proces fermentacije vodi predvsem v znižanje pH, kar poveča encimsko aktivnost. Med fermentacijo se prevleka kakavovih zrn razgradi s pomočjo mikroorganizmov (kvasovke, bakterije očetne kisline in bakterije mlečne kisline), ki so naravno prisotni v okolju, in temperatura naraste na približno 50 °C. Macedo in sodelavci so izvedli študijo za razlago aktivnosti polifenolne oksidaze v mesu in zrnih dveh vrst kakava. Rezultati te študije so pokazali specifičnost in razlike med dvema analiziranima sortama ter med mesom in zrnjem vsake vrste. Avtorji so predlagali, da bi se za vsako sorto morale sprejeti posebne ocene na osnovi optimalnih parametrov, da bi se podaljšal čas maksimalne aktivnosti polifenolne oksidaze med procesom fermentacije, kar bi prispevalo k izboljšanju kakovosti kakavovih zrn in posledično kakovosti čokolade. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3.2 Sušenje

Med sušenjem se vsebnost polifenolov bistveno zmanjša kot posledica visoke temperature, difuzije komponent iz zrn z izparevanjem vode ter encimskega rjavenja. Stopnja sušenja igra pomembno vlogo pri zmanjšanju adstringentnosti, grenkobe in kislosti ter pri razvoju značilnega okusa in rjave barve. Oksidacijski proces, ki se začne med fermentacijo, se nadaljuje v fazi sušenja. Še vedno aktivne polifenolne oksidaze katalizirajo preoblikovanje polifenolov v kinone, ki so podvrženi nadaljnjemu kondenzaciji s prostimi aminskimi in sulfhidrilnimi skupinami, kar vodi v sintezo rjavih polimerov. Čeprav so sušilniki za sušenje vse bolj priljubljeni, se naravno sončno sušenje še vedno pogosto uporablja. Številne raziskave, izvedene za primerjavo naravnih in umetnih metod sušenja zrn, kažejo, da naravno sončno sušenje daje veliko boljše učinke, medtem ko lahko sušenje v posebnih napravah privede do nastanka nespecifičnih in neželenih arom, kot so vonj po gumi ali po bencinu. Analiza profila sprememb vsebnosti vode pri različnih temperaturah in optimizacija časa sušenja se lahko izvedemo z uporabo modelov, ki so jih razvili, na primer Garcia-Alamilla in sodelavci ali Hii in sodelavci. Na ta način je mogoče standardizirati kakovostne parametre suhih kakavovih zrn, medtem ko so lahko serije kakavovih zrn, dobavljenih proizvajalcem čokolade, bolj enotne.

V študiji, ki so jo izvedli de Brito in sodelavci [67], se je vsebnost fenolnih spojin zmanjšala za 32% v suhem vzorcu v primerjavi s fermentiranim vzorcem. Običajna praksa je, da proizvajalci čokolade združujejo nekaj serij kakavovih zrn, da dosežejo enotno in stabilno mešanico ter postanejo neodvisni od države izvora ali dobavitelja kakavovih zrn. Grenak okus kakava izvira predvsem iz vsebnosti teobromina, kofeina in fenolnih spojin v kakavovih zrnih. Čeprav se alkaloidi med fermentacijo in sušenjem ne podvržejo kemičnim preobrazbam, približno 30% teh spojin izgubi zaradi difuzije in migracije znotraj zrn. Raziskava, ki so jo izvedli Peláez in sodelavci, je pokazala, da se vsebnost teobromina in kofeina zmanjša za približno 21% oziroma 60% med fermentacijo in sušenjem kakavovih zrn. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3.3 Pečenje

Zaradi visokih temperatur, ki se uporabljajo med pečenjem, je to ena najpomembnejših osnovnih procesov, ki vplivajo na kakovost in senzorične lastnosti kakavovih zrn ter izdelkov

iz njih. Na splošno naj bi okus bil pozitivno povezan z visoko stopnjo pečenja, vendar le do točke prekomernega pečenja. Pečenje običajno traja od 5 do 120 minut (običajno od 10 do 35 minut) pri temperaturah od 110 do 160 °C. Polifenoli so termolabilne molekulske strukture, in njihova vsebnost se zmanjšuje pri visokih temperaturah in podaljšanem času pečenja. Verjeten razlog za ta pojav je polimerizacija nizkomolekulskih spojin. Nizke temperature in kratko pečenje naj bi bolje ohranili vsebnost polifenolov. Običajno se priporočajo temperature pod 140 °C. Učinek pečenja na antioksidativne lastnosti kakavovih zrn je odvisen od primerjalnih količin termične razgradnje naravno prisotnih fenolnih spojin in uvedbe novih antioksidantov, kot so produkti Maillardove reakcije in polimerni pigmenti. Oracz in Nebesny sta dokazala, da se lahko nizkotemperaturna toplotna obdelava z vlažnim zrakom uporablja za povečanje vsebnosti fenolov in antioksidativne aktivnosti pečenih kakavovih zrn. Rezultati študije dokazujejo, da so kakavova zrna pozitivni vir antioksidantov po pečenju. Eden od načinov izboljšanja biološke vrednosti čokolade in drugih izdelkov iz kakavovih zrn je uporaba nizkih temperatur pečenja in drugih faz, kar je bilo uporabljeno pri proizvodnji čokolade, imenovane "surova". (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3.4 Alkalizacija

Kakavova zrna, kaša ali kakav v prahu so alkalizirani z obdelavo z kislim natrijevim ali kalijevim karbonatom. Številne študije so pokazale, da povečanje pH-vrednosti od 5,7 do 7,5 negativno vpliva na sprejemljivost okusa. To lahko povzroči izluževanje elementov, kar lahko prispeva k nižjim vsebnostim mineralnih komponent v končnem izdelku. Raziskava, ki so jo izvedli Miller in sodelavci, je pokazala, da sprememba pH-ja, ki jo povzroči dodatek alkalnih sredstev, vpliva na skupno vsebnost polifenolov v pridobljenem kakavovem prahu. Izkazalo se je, da naravni kakavovi praški (pH 5,39–5,76) kažejo višje ravni antioksidativne sposobnosti in skupne vsebnosti polifenolov. Alkalizacija povzroča visoke izgube polifenolov (več kot 60% izgube skupne vsebnosti polifenolov) in spreminja njihovo sestavo. Največje izgube opazimo pri epikatehinu in katehinu (do približno 98% in 80% izgube, oziroma), kot tudi pri kvercetinu (približno 80%). Nadaljnje stopnje alkalizacije vodijo v opazno zmanjšanje vsebnosti polifenolov. Te spremembe je mogoče pripisati oksidaciji in polimerizaciji polifenolov pod alkalnimi pogoji. Proces alkalizacije ima negativen vpliv na vsebnost metilksantinov, katerih vsebnost se zmanjšuje s povečanjem stopnje alkalizacije, pri čemer so največje izgube opazili

pri teobrominu (več kot 20%). V študiji, ki jo je izvedel Stanley [84], je zdravljenje kakavovega prahu z NaOH povečalo vsebnost katehina za 40%, vendar zmanjšalo epikatehin in proantocianidine za 23–66%. V svojem delu so pokazali prvo uporabo proantocianidinov in začetni prognozni model učinka alkalnega zdravljenja na polifenole kakava.

Uporaba alkalizacije se razpravlja med znanstveniki in podjetniki. Povečanje pH-vrednosti, bolj izrazita barva, boljša topnost kakavovega prahu so argumenti, ki vodijo k uporabi alkalizacije. Kljub temu pa sama delovanje kemičnih spojin, še posebej z vidika zdravja, ter raziskave, ki potrjujejo pomembno zmanjšanje vsebnosti biološko aktivnih spojin, vodijo proizvajalce "surove" čokolade k opustitvi uporabe alkalizacije. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3.5 Temperiranje

Temperiranje je postopek mešanja kakavove mase nekaj ur, kombiniran z zniževanjem in dvigovanjem temperature. Cilj tega postopka je pridobiti stabilno obliko kristalne maščobe, tako da je čokolada stabilna in se ne topi v prstih. Nadzor tega procesa je pomemben za kakovost izdelka, saj je temperirana čokolada sijoča, hrustljava, enakomerno obarvana in gladkega okusa, medtem ko je slabo temperirana čokolada žvečljiva, zrnata in apnena, v obliki neprivlačne, dolgočasne rjave mase zaradi cvetenja maščob. Postopek temperiranja ne uporablja visokih temperatur (največ 45 °C); zato izguba polifenolov v tem stadiju ni bila dokazana. (Urbańska, Derewiaka, Lenart, & Kowalska, 2019)

2.3.6 Povzetek

Procesi fermentacije, sušenja, peke in alkalizacije so ena najpomembnejših stopenj predelave kakavovih zrn, saj prispevajo k razvoju številnih koristnih lastnosti čokolade. Te pozitivne spremembe pa lahko spremljajo reakcije, ki bistveno zmanjšajo količine polifenolnih spojin. Te nezaželene rezultate je mogoče zmanjšati z standardizacijo kmetijskih praks na začetku dobavne verige in z izboljšanjem proizvodnega procesa na ključnih točkah predobdelave kakavovih zrn.

Antioksidativne lastnosti izdelkov predelave kakavovih zrn se prav tako spreminjajo med proizvodnjo čokolade. Pomembno je tudi, da so zagotovljeni ustrezni pogoji shranjevanja kakava in čokoladnih izdelkov, vključno z optimalno temperaturo (za ohranjanje polifenolov pod 50 °C, iz kakovostnih razlogov pod 20 °C), vlažnostjo (na suhem mestu - pod 75%) in časom (v skladu z datumom, določenim s strani proizvajalca).

Vzroki za polifenole: kakavova vsebnost, vrsta zrn, stopnja praženja, postopki obdelave

Vzroki za antioksidativno kapaciteto: vsebnost polifenolov, vsebnost drugih antioksidantov, reakcije med sestavinami, skladiščenje

2.4 Metodologija dela

2.4.1 Spektrofotometrija

Spektrometrija spada med optične metode. Je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod v analitiki. Med spektrofotometrične metode štejemo vse metode, kjer izkoriščamo svetlobo za določanje koncentracije snovi. Spektrofotometrične meritve lahko izvajamo v infrardečem, vidnem in ultravijoličnem spektru svetlobe. (Grobiša, 2017)

2.4.2 FC - metoda

Ena najbolj uporabljenih metod za določanje fenolnih spojin je spektrofotometrična določitev s Folin-Ciocalteu (F-C) reagentom. To je metoda, ki temelji na reakciji pri kateri pride do prenosa elektronov. Med F-C reagentom in elektroni antioksidantov pride do oksidacije, kar se pokaže kot sprememba barve. F-C reagent se obarva modro, zato je možno izmeriti absorbanco in s pomočjo umeritvene krivulje določiti koncentracijo fenolnih spojin. F-C metoda se uporablja že vrsto let za določanje skupnih fenolov v naravnih produktih. Analize narejene s F-C reagentom so priročne, enostavne, saj zahtevajo samo osnovno opremo, ter dajejo primerljive podatke ostalim metodam. Čeprav je metoda zelo ekonomična, ima pomanjkljivosti kot so nizka specifičnost reagenta za fenolne spojine in dejstvo, da s pomočjo te metode ni možno zagotoviti informacij o vrsti fenolnih spojin. Zaradi nespecifičnosti lahko pride do tega, da se med rezultate o vsebnosti fenolnih spojin pomešajo tudi ostale spojine, kot so na primer sladkorji, in so zato potrebne korekcije in uporaba pravega referenčnega standarda. (Grobiša, 2017)

2.4.3 DPPH metoda

DPPH test je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za prvo oceno antioksidativne aktivnosti spojine. DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil je eden redkih stabilnih organskih dušikovih radikalov, ki v alkoholu tvori vijolično obarvano raztopino in je komercialno dostopen. Prosti elektron v DPPH je delokaliziran preko celotne molekule, zaradi česar molekula ne dimerizira. Ko je radikal izpostavljen antioksidantu, ki je zmožen donirati elektron ali vodikov atom se obarvanost raztopine spremeni iz vijolične v rumenkasto. Sprva poteče reakcija prenosa elektrona in nato abstrakcija vodikovega atoma. Med redukcijo se DPPH transformira v reducirano obliko DPPH-H z absorpcijskim maksimumom pri 517nm. Stopnja razbarvanja je odvisna od antioksidativne kapacitete testirane spojine, kar pomeni, da višja kot je antioksidativna kapaciteta, večje je razbarvanje osnovne vijolične raztopine. S spektrofotometrično analizo spremljamo upad absorbance do stantne vrednosti. DPPH metoda velja za enostavno, a občutljivo metodo. Pri izvedbi moramo upoštevati številne faktorje, ki lahko vplivajo na rezultate. Mednje spadajo vrsta in količina topila, ter prisotnost in koncentracija vodikovega ali kovinskih ionov. Ena izmed večjih omejitev metode je prekrivanje spektrov DPPH in spojin, ki absorbirajo pri enaki valovni dolžini. Omejeno omejitev moramo upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Saj na primer v čokoladi so lahko prisotne snovi ki absorbirajo v enakem spektru. Na primer, maksimalna absorpcijska valovna dolžina antocianidov se nahaja med 500 in 550 nm, kar je v območju valovne dolžine DPPH (517 nm). (Nekrep, 2023)

2.5 Material

2.5.1 Vzorci:

Pri svojem delu smo uporabili temne čokolade z različnimi vsebnostimi kakava, odločili smo se za tiste z najvišjimi vrednostimi kakava na voljo. Izbrali smo različne proizvajalce izbranih čokolad

- 85% črna čokolada Spar premium
- 85% črna čokolada Lindt
- 90% črna čokolada Domori
- 90% črna čokolada Lindt
- 99% črna čokolada Lindt



Slika 1: Uporabljene čokolade

Tabela 1: Prikaz podatkov uporabljenih čokolad

Vzorec	Proizvajalec	Rok uporabe	Ime	%čokolade	Država proizvodnje- poreklo	Masa (g)
1	SPAR	30.9.2024	Spar premium	85	Švica	100
2	Lindt	13.3.2024	Lindt	85	Švica	100
3	Domori srl, Italija	30.4.2024	Domori	90	Italija	75
4	Lindt	31. 10. 2024	Lindt	90	Švica	100
5	Lindt	x.12.2024	Lindt	99	Švica	50

Preglednica 1: Prikaz podatkov uporabljenih čokolad

2.5.2 Reagenti





Tabela 2: Uporabljeni reagenti

Reagenti	Proizvajalec	Varnostne oznake	Država proizvodnje
Etanojska kislina	Honeywell, Fluka	Jedko, vnetljivo	Nemčija
Galna kislina	Sigma	Nevarno	Nemčija
Aceton	Honeywell	Vnetljivo, nevarno	Nemčija
DPPH	Aldrick	Škodljivo za dihala	Nemčija
FC-reagent	Merck	Jedko	Nemčija
Natrijev karbonat	Honeywell, fluka	nevarno	Nemčija

Preglednica 2: Uporabljeni reagenti

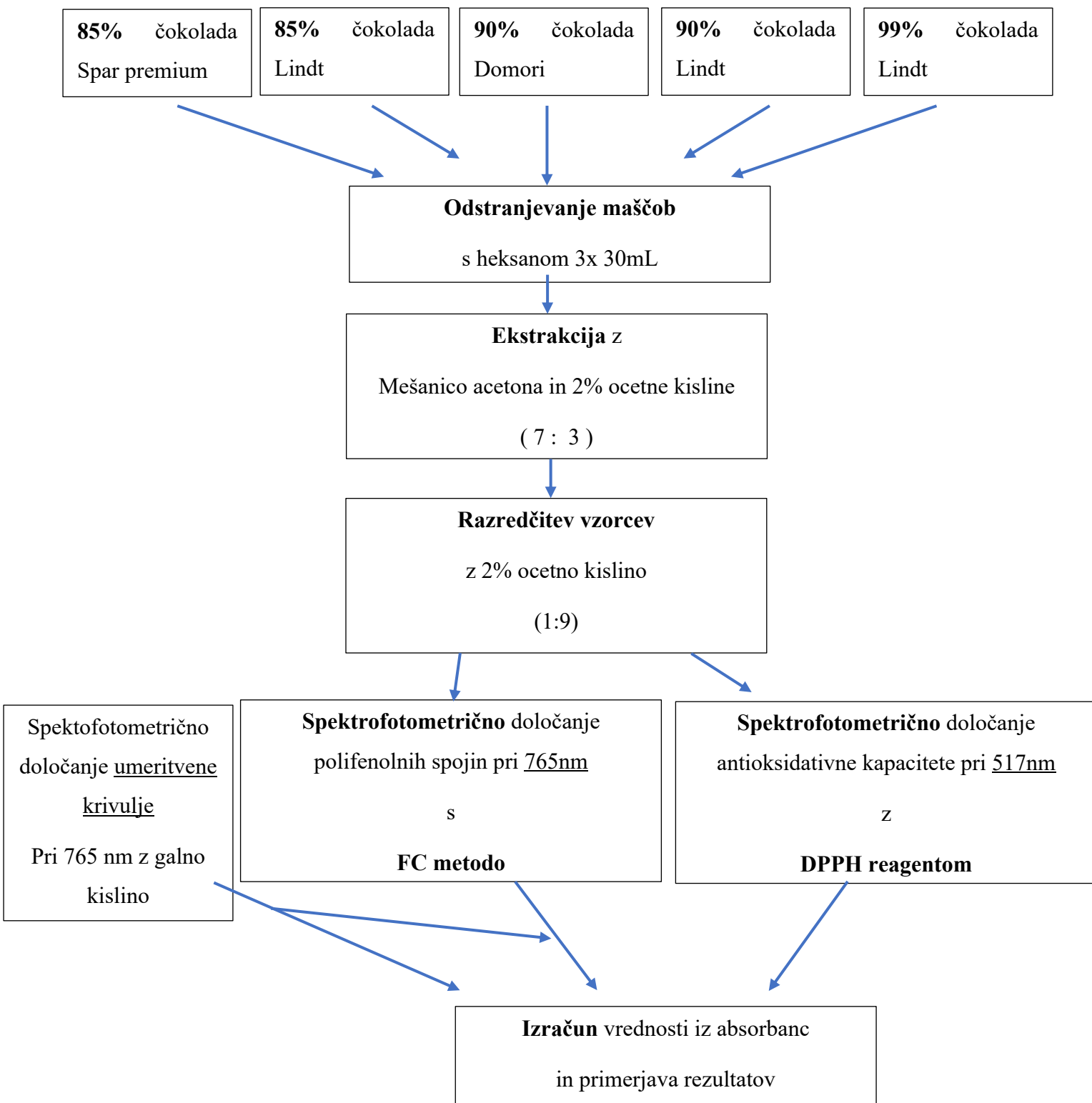
Pri našem delu smo uporabljali analitsko čiste reagente podjetij Honeywell, Sigma, Merck. Reagenti, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu so navedeni pri opisu posamezne eksperimentalne metode.

2.5.3 Pripomočki:

			
<p>Slika 2: Pipeta Pipeta</p>	<p>Slika 3: Avtomatska pipeta Avtomatska pipeta</p>	<p>Slika 4: Centrifuga Centrifuga</p>	<p>Slika 5: Spektrofotometer Spektrofotometer</p>

Preglednica 3: Uporabljeni pripomočki

2.5.4 Shematski prikaz dela v laboratoriju



3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 Priprava ekstraktov

3.1.1 Odstranjevanje maščob

Začeli smo z ribanjem vseh štirih čokolad. Potem, ko smo naribali del vsake čokolade smo zatehtali natančno 4,00 g posamičnega vzorca, jih razporedili v erlenmajerice ter jih poimenovali s števili od 1 do 5. Vzorcem smo dodali po 30 mL heksana (Honeywell, Nemčija), ter s pomočjo steklene palčke 30 minut dobro mešali, dokler se niso vsi opazni delci čokolade raztopili. Vsak raztopljen vzorec čokolade smo prelili v 3 epruvete in nato 10 minut centrifugirali pri 6000 RPM. Nastali supernatant smo odlili ter preparat še enkrat centrifugirali (skupaj dvakrat). Po končanem centrifugiranju smo vzorce čez noč pustili v laboratoriju, na sobni temperaturi, da je odvečen heksan izhlapel. Naslednji dan smo zjutraj najprej izmerili maso preostalih vzorcev za izračun vsebnosti maščob.



Slika 6: Priprava čokolade

3.1.2 Priprava razredčenih ekstraktov

Pripravili smo 50 mL mešanice acetona in 2 % raztopine očetne kisline v razmerju 7:3. Vsakemu vzorcu čokolade smo dodali skupaj 5 mL mešanice (1.7 mL na posamično epruveto z vzorcem), ter s spatulo dobro premešali. Nastalo mešanico smo za 10 minut centrifugirali na 6000 RPM in nato nastali supernatant iz vseh epruvet, ki so vsebovale enak vzorec združili (dobili smo pet epruvet različnih supernatantov). Vsakega izmed vzorcev smo potem razredčili, tako da smo v mikrocentrifugirke s pomočjo mikropipete odpipetirali 100 μ L vzorca ter temu z 1 mL pipeto dodali 900 μ L 2 % raztopine očetne kisline. To smo ponovili še enkrat, tako da smo za vsak supernatant dobili dva razredčena vzorca. Vse skupaj smo premešali in nato centrifugirali na 10000 RPM za 4 minute. Tako smo imeli pripravljene vzorce za nadaljnjo analizo.

3.1.3 Priprava umeritvene krivulje z galno kislino

Da bi lahko izmerili vsebnost polifenolov v naših vzorih čokolade s pomočjo spektrofotometra, smo najprej morali izrisati umeritveno krivuljo, kar smo naredili s pripravo vzorca z različnimi vsebnostimi galne kisline, da smo lahko s pomočjo naklona umeritvene krivulje izvedli iz absorbance naših vzorcev izračunali koncentracijo.

Določitev koncentracije skupnih vsebnosti fenolnih spojin po Folin Ciocalteurjevi metodi:

Reagenti:

- Galna Kislina (Sigma, Aldrich, Kitajska)
- 2% raztopina očetne kisline
- Folin – Ciocalteu reagent (Merck, Nemčija)
- 20% raztopina Na₂CO₃ – natrijev karbonat (Honeywell, Fluka, Nemčija)

Aparature:

- Spektrofotometer
- Avtomatske pipete
- Centrifuga

Pribor:

- Stekljeni pribor:
- Čaše, merilni valja, steklene palčke, epruvete, pipete, merilna bučka

- Ostalo: rokavice, spatule, aluminijasta folija, nastavki za pipetiranje, merilec za čas, kapalke

3.1.4 Priprava reagentov:

- Priprava 0,48mM standardno raztopino galne kisline
- 2% raztopino očetne kisline smo pripravili tako da smo 2mL očetne kisline odpipetirali v 100mL merilno bučko, ter razredčili z destilirano vodo do oznake.
- Raztopino Folin – Ciocalteujev reagenta smo pripravili tako, da smo reagent razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:2 (v/v). Raztopina FC je občutljiva na svetlobo, zato se mora vsak dan pripravljati sveža.
- 20 % raztopino Na₂CO₃ smo pripravili tako, da smo zatehtali 10 g Na₂CO₃ v 50 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.
- 70 % mešanico acetona smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilni valj dolili 70 mL acetona in 30 mL 2 % raztopino očetne kisline in vse skupaj prelili v čašo ter pokrili z aluminijško folijo. (3:7)

3.1.5 Umeritvena krivulja za galno kislino v 70 % acetonu:

Kot standardno raztopino pri pripravi umeritvene krivulje za SFS po Folin–Ciocalteujevi metodi smo uporabili galno kislino. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali od 25 µL do 150 µL 0,48 mM standardne raztopine galne kisline in dodali od 475 µL do 600 µL 2 % raztopine očetne kisline in 100 µL 70 % mešanice acetona do končne prostornine 725 µL. V tako pripravljeno raztopino smo dodali 125 µL raztopine F-C reagenta in po 5-ih minutah še 125 µL 20 % raztopine Na₂CO₃. Tako pripravljene raztopine smo dali v temo za 60 minut, nakar smo izmerili absorbanco pri 765 nm. Slepí vzorec smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 625 µL 2 % raztopine očetne kisline in 100 µL 70 % mešanice acetona ter dodali 125 µL F-C reagenta. Po 5-ih minutah še 125 µL 20 % raztopine Na₂CO₃ ter nato postopali kot pri preostalih vzorcih. Vse meritve smo izvedli v dveh ponovitvah.

Tabela 4: Priprava raztopine za umeritveno krivuljo z galno kislino

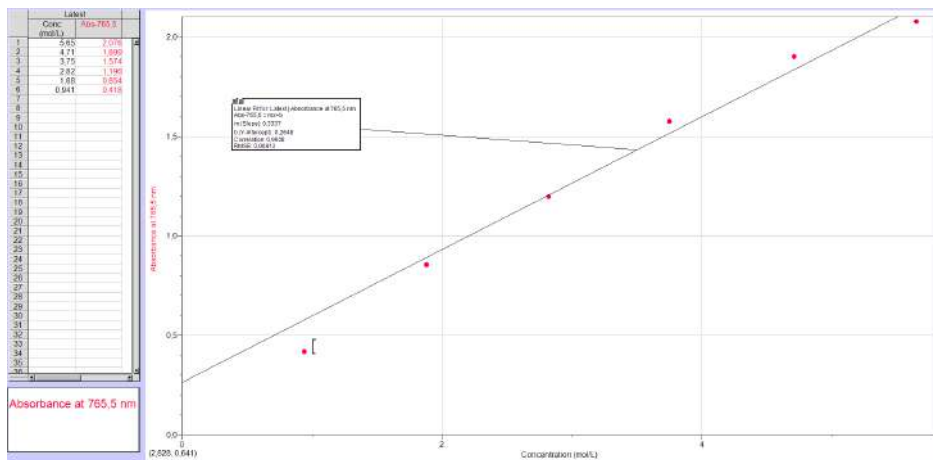
Galna kislina v (μL)	Raztopina očetne kisline (μL)	70% mešanica acetona (μL)	FC reagent (μL)	Na_2CO_3 (μL)	Skupaj (μL)	Dodatna razredčitev z mešanico acetona (μL)
25	600	100	125	125	975	300
50	575	100	125	125	975	300
75	550	100	125	125	975	300
100	525	100	125	125	975	300
125	500	100	125	125	975	300
150	475	100	125	125	975	300
0	625	100	125	125	975	300

Preglednica 4: Priprava raztopine za umeritveno krivuljo z galno kislino



Slika 7: Pripravljene raztopine za umeritveno krivuljo

3.2 Umeritvena krivulja z galno kislino



Graf 1: Umeritvena krivulja z galno kislino



Graf 2: Prikaz podatkov grafa umeritvene krivulje z galno kislino

4 TEORETIČNI DEL

4.1 Računanje molske mase galne kisline po razredčevanju

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2}$$

Tabela 5: Legenda za izračun galne kisline

Znak	Pomen	Vrednost
C ₁	Koncentracija pripravljene galne kisline	0,48 × 10 ⁻³ mol
C ₂	Koncentracija galne kisline po razredčitvi	Se spreminja
V ₁	Volumen galne kisline pred razredčitvijo	Se spreminja
V ₂	Volumen galne kisline po razredčitvi	1275 μL

Preglednica 5: Legenda za računanje koncentracije galne kisline

Primer izračuna:

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2}$$

$$C_2 = \frac{0.48 \text{ mmol} \times 25 \text{ } \mu\text{L}}{1275 \text{ } \mu\text{L}}$$

$$C_2 = 9.41 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Tabela 6: Koncentracija galne kisline po razredčevanju:

VOLUMEN V μL	KONCENTRACIJA (C_2)	ABSORBANCA V nm
25	$9,41 \times 10^{-6} \text{ mol}$	0.418
50	$1,88 \times 10^{-5} \text{ mol}$	0.854
75	$2,82 \times 10^{-5} \text{ mol}$	1.196
100	$3,76 \times 10^{-5} \text{ mol}$	1.574
125	$4,71 \times 10^{-5} \text{ mol}$	1.899
150	$5,65 \times 10^{-5} \text{ mol}$	2.076

Preglednica 6: Koncentracija galne kisline po razredčevanju

5 ANALIZA VZORCEV

Pri vzorcih temnih čokolad smo v mikrocentrifugirke odpipetirali po 15 μL razredčenega ekstrakta in 710 μL 2 % raztopine očetne kisline (s pipeto). Tako pripravljenim raztopinam smo dodali 125 μL raztopine F-C reagenta in po 5-ih minutah še 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 . Tako pripravljene raztopine smo dali v temo za 60 minut, nakar smo izmerili absorbanco pri 765 nm. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 725 μL 2 % raztopine očetne kisline ter dodali 125 μL F-C reagenta in po 5-ih minutah še 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 ter nato postopali kot pri preostalih vzorcih. Vse meritve smo izvedli v dveh ponovitvah.

Tabela 7: Priprava vzorcev za analizo s F-C reagentom

Razredčen ekstrakt	2 % očetna kislina	F-C reagent	Natrijev karbonat	Skupaj	Dodatna razredčitev
15	710	125	125	975	300
0	725	125	125	975	300

Preglednica 7: Priprava vzorcev za analizo s F-C reagentom

5.1 Izračun in umeritvena krivulja:

Ker smo za izračun koncentracije skupnih fenolnih spojin potrebovali umeritveno krivuljo, smo najprej izračunali njen naklon s pomočjo programa Logger pro in spektrofotometra.

To smo naredili z galno kislino, ki je ekvivalent polifenolom. Izračunali smo koncentracijo galne kisline v posameznem vzorcu, saj nam je ta bila znana in je razvidna iz tabele.

Izračun:

$$y = kx + n$$

$$x = (y-n)/k$$

x... koncentracija

y...absorbanca

k...naklon umeritvene krivulje

Tabela 8: Primerjava absorbance in koncentracije polifenolov

št vzorca	Absorbanca(pri 765,5 nm)	Koncentracija (10^{-5} mol/L)	Povprečje (10^{-5} mol/L)
1	1,682	4,247	4,123
	1,599	3,998	
2	1,687	4,262	3,982
	1,500	3,702	
3	2,027	5,281	5,112
	1,914	4,942	
4	1,618	4,055	3,998
	1,580	3,941	
5	2,088	5,464	5,382
	2,033	5,299	

Preglednica 8: Primerjava absorbance in koncentracije polifenolov



Slika 8: Vzorci z ekstraktom in F-C reagentom

5.2 Določanje antioksidativne kapacitete z DPPH reagentom

Za analizo vzorca pa smo prav tako uporabili spektrofotometer, le da smo sedaj merili absorbanco pri 517nm. Pri vzorcu temnih čokolad smo v kivete odpipetirali 10 mikroL razredčenega ekstrakta in 40 mikroLitrov 2 % oetne kisline. Tako pripravljeni raztopini smo dodali 1mL raztopine DPPH. Ko smo to storil smo 1h inkubirali vzorce da je potekla reakcija pri kateri smo opazili, da se je iz vijolicne preobrazilo v rumeno barvo. Za slepi vzorec smo uporabili 5o mikroL oetne kisline in 1 mL DPPH, pri slepem vzorcu ni bilo vidne razlike v barvi.

Reagenti:

- 2% raztopina oetne kisline
- Metanol
- DPPH

Aparature:

- Spektrofotometer
- Avtomatske pipete

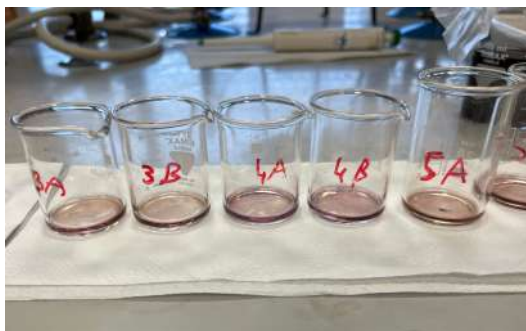
Pribor:

- Stekleni pribor: pipeta, čašaa,
- Ostali pribor: rokavice, aluminijasta folija, nastavki za pipetiranje, kapalka

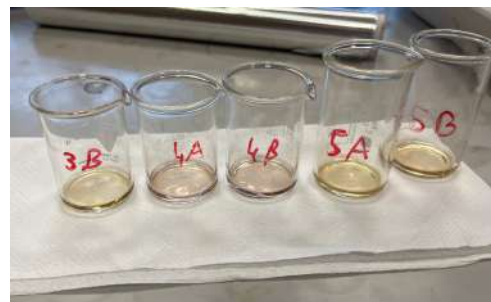
Priprava raztopin:

- 0,11mikroM raztopina DPPH, smo pripravili tako, da smo 0,0012g DPPH dali v 0,05L 8% etanola.

Vzorci ekstrakta z DPPH:



Slika 9: Vzorec z dodanim reagentom



Slika 10: Vzorec z dodanim reagentom po nekaj minutah

Tabela 9: Priprava vzorcev z DPPH

Razredčen ekstrakt	2 % očetna kislina	DPPH reagent (mL)	Skupaj	Dodatna razredčitev z očetno+aceton	Skupaj
10	40	1	1,05	200	1,250
0	50	1	1,05	200	1,250

Preglednica 9: Priprava vzorcev z DPPH

5.3 Izračun inhibicije z DPPH

$$\text{Račun: \% inhibicije} = \left(\frac{\text{Absorbanca kontrole} - \text{absorbanca vzorca}}{\text{Absorbanca kontrole}} \right) \times 100$$

Antioksidativno učinkovitost smo analizirali z uporabo 2,2-difenil-1-pikrilhidraliza (DPPH).

Metoda antioksidante aktivnosti temelji na reakciji med antioksidativno komponento, ki je donor vodika in stabilnim prostim radikalom DPPH. Zanj je značilen absorpcijski maksimum pri 517 nm. (Bauman & Petrovič, 2020) Koncentracijo DPPH v reakcijski zmesi smo določili s spektrofotometrom z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 517 nm

Inhibicijo [%], ki nam pove sposobnost antioksidantov za radikalno iskanje (sposobnost spojin, da nevtralizirajo proste radikale v telesu) (Jaćimović, in drugi, 2022) smo izračunali s uporabo sledeče formule (Bauman & Petrovič, 2020):

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{\text{Absorbanca kontrole} - \text{povprečje absorbance vzorca}}{\text{Absorbanca kontrole}} \right) \times 100$$

Vzorčni izračun Inhibicije [%]:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{2,242 - 0,257}{2,242} \right) \times 100 = 88,5\%$$

Tabela 10: Vrednosti inhibicije vzorcev čokolade

Št. vzorca	Povprečna absorbanca pri 517nm	Inhibicija [%]	Povprečje čokolad z enako vsebnostjo kakava
0	2,242	0	0
1	0,257	88,5	72,8
2	0,963	57,0	
3	0,542	75,8	73,4
4	0,650	71,0	
5	0,407	81,8	81,8

Preglednica 10: Vrednosti inhibicije vzorcev čokolade

6 RAZPRAVA

6.1 Korelacija vsebnosti polifenolov in vsebnosti kakava

V sklopu raziskovalne naloge nas je zanimalo, če se z večanjem vsebnosti kakava poveča tudi vsebnost polifenolov, zato smo med samo primerjali vzorec 2 (Lindt 85%), vzorec 4 (Lindt 90%) in vzorec 5 (Lindt 99%). Primerjali smo vzorce iste znamke čokolade, da se izognemo različnim vrednostim, ki bi se pojavile zaradi različnega kraja ali procesa pridelave, in tako torej lažje primerjamo vsebnost kakava z vsebnostjo polifenolov. Hipotezo 1 (Z večanjem koncentracije kakava se bo povečala vsebnost polifenolov) lahko glede na dobljene rezultate: Lindt 85% (3.982) < Lindt 90% (9.998) < Lindt 99% (5.382) (mol/L); delno potrdimo. Iz rezultatov je opazno da ima Lindt 85% najmanjšo vsebnost polifenolov, toda Lindt 90% ima večjo vsebnost polifenolov kot Lindt 99%, kar nasprotuje zastavljeni hipotezi.

1. *Hipoteza:* Z večanjem koncentracije kakava se bo povečala vsebnost polifenolov.

Prvo hipotezo lahko torej potrdimo.

6.2 Korelacija vsebnosti kakava in antioksidativne kapacitete

Drugi večji sklop naše raziskovalne naloge se osredotoča na korelacijo med vsebnostjo kakava in antioksidativno kapaciteto. Tukaj smo za analizo uporabili povprečne vrednosti izračunane inhibicije [%] obeh znamk čokolade. Glede na dobljene rezultate:

$$85\% \text{ čokolada (72,8\%)} < 90\% \text{ čokolada (73,4\%)} < 99\% \text{ čokolada (81,8\%)}$$

lahko potrdimo hipotezo 1.1 (z večanjem koncentracije kakava se bo povečala antioksidativna kapaciteta). Izražena inhibicija nam tako pove sposobnost antioksidantov za radikalno iskanje (sposobnost spojnin, da nevtralizirajo proste radikale v telesu) (Jaćimović, in drugi, 2022). Ne glede na linearno korelacijo, so pa naše vrednosti približno dvakrat višje kot vrednosti v literaturi. National Library of Medicine, je objavil članek, kjer so dobili maksimalno vrednost inhibicije 48,34% za čokolado z 99% vsebnostjo kakava (Jaćimović, in drugi, 2022). V

primerjavi z našo dobljeno vrednostjo inhibicije (81,8%) za čokolado z enako vsebnostjo kakava lahko tako povemo, da so naše vrednosti približno 1.7 krat višje.

Razlogi, da smo dobili drugačne rezultate bi lahko bili ti, da smo uporabljali šolske aparature in pripomočke, ki morda niso tako natančni kot laboratorijski. Lahko bi prišlo tudi do napake pri postopku, namreč vse vrednosti odstopajo za približno enako vrednost. Med uporabo spektrofotometra smo namreč imeli težavo, ker so vrednosti absorbanc bile previsoke, zato smo morali pripravljene raztopine dodatno redčiti (kar smo tudi prikazali v preglednici in upoštevali pri izračunu). Kar pomeni, da bi naše rezultate lahko verjetno izboljšali in približali tistim v literaturi, če bi prilagodili svoje postopke in pripravljene vzorce še bolj razredčili in tako dobili bolj natančne podatke s pomočjo spektrofotometra.

2. *Hipoteza:* Z večanjem vsebnosti kakava se bo višala antioksidativna vrednost.

Čprav smo naleteli na nekaj težav in vrednosti ne naraščajo popolnoma linearno z vsebnostjo kakava, lahko vseeno trdimo, da se je z večanjem vsebnosti kakava višala tudi antioksidativna kapaciteta (če gledamo samo glede na vsebnost kakava v čokoladi in dobljenimi rezultati).

6.3 Korelacija med vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto

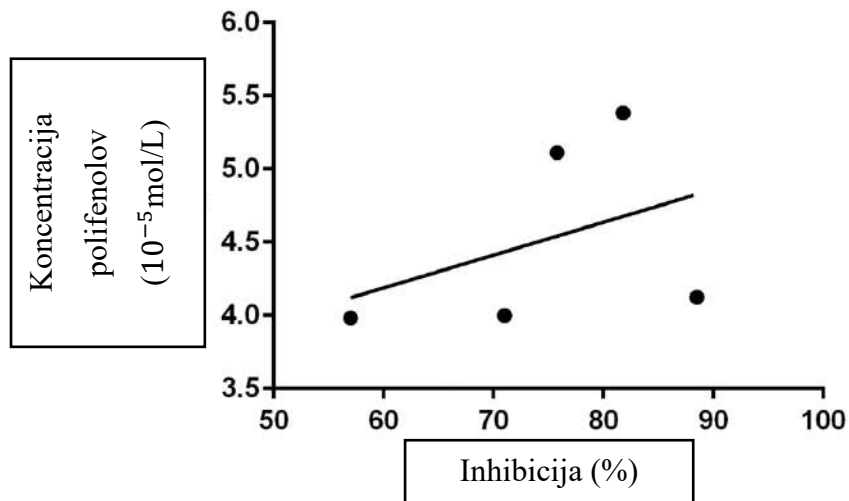
Kar se tiče hipoteze o korelaciji med vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto smo uporabljali spodaj v tabeli podane podatke in z njihovo pomočjo izračunali linearno regresijo oz. korelacijo med obema vrednostima.

Tabela 11: Primerjava koncentracije polifenolov in inhibicije vzorcev

Št. vzorca	Koncentracija polifenolov (10^{-5} mol/L)	Inhibicija [%]
0	0	0
1	4,123	88,5
2	3,982	57,0
3	5,112	75,8
4	3,998	71,0
5	5,382	81,8

Preglednica 11: Primerjava koncentracije in inhibicije vzorcev

Graf 3: Primerjava koncentracije polifenolov in inhibicije



Graf 3: Linearna regresija

R = 0,40

Korelacija je bila 0,40 iz česar je razvidno, da povezava obstaja in je pozitivna. Lahko bi rekli, da sta vrednosti zmerni povezani. To pomeni, da z naraščanjem ene narašča tudi druga, kar se sklada z našo hipotezo in zanjem, saj naj bi polifenoli delovali kot antioksidanti. Da korelacija

ni višja, pa je lahko krivo dejstvo, da so v čokoladi poleg polifenolov prisotne tudi druge biološko aktivne snovi, ki delujejo kot antioksidanti.

3. *Hipoteza:* Z višanjem vsebnosti polifenolov se bo povečala tudi antioksidativna kapaciteta.

Ker je pozitivna korelacija med točkami razvidna lahko potrdimo hipotezo, saj se z višanjem vsebnosti polifenolov viša tudi antioksidativna kapaciteta.

6.4 Primerjava vsebnosti polifenolov glede na znamko čokolade

Iz tabele z izračunanimi koncentracijami lahko razberemo in sklepamo od česa je odvisna dobljena koncentracija, ki je izražena v enoti mol/L. Imeli smo 5 čokolad in dva vzorca za vsako čokolado, zato smo na koncu izračunali povprečje teh dveh vzorcev, da smo dobili povprečno koncentracijo polifenolov v vsaki posamezni čokoladi. Če primerjamo vzorca 1 (Spar čokolada) in vzorec 2 (Lindt čokolada), opazimo, da se koncentracija polifenolov med njima razlikuje, čeprav obe čokoladi vsebujeta 85% kakava. Nasprotno od naših pričakovanj je v tem primeru imela Lindt čokolada nižjo koncentracijo polifenolov in bi jo zato lahko ovrednotili kot manj zdravo, oz. kot tisto z manjšim potencialom, da ugodno vpliva na naše zdravje. Spar čokolada je namreč imela pri 85% kakava 3,41% višjo koncentracijo polifenolov. Zato je hipoteza 3 lahko ovržena. To lahko razložimo z vplivi procesiranja čokolade. Proizvod obeh se namreč nahaja v Švici, vendar je postopek pridelave najverjetneje drugačen kar lahko vpliva na vsebnost polifenolov. Možni vzroki za to so navedeni pri teoretičnem delu naloge pod poglavjem kaj vpliva na vsebnost polifenolov.

Potem smo enako naredili tudi za čokoladi z 90% kakava, kjer je bila vzorec 3 (Domori čokolada) in vzorec 4 (lindt čokolada). Tudi tukaj smo prišli do enake ugotovitve, in sicer te, da je tudi v tem primeru čokolada Lindt vsebovala manjšo vsebnost polifenolov, kot čokolada Domori pri enaki vsebnosti kakava, in sicer 21,8% več. Kar pomeni da je razlika precej večja. Tu se od postopka proizvodnje razlikuje tudi kraj proizvodnje, kar lahko še dodatno vpliva na vsebnost polifenolov, in tako lahko pojasnimo višjo razliko v koncentraciji.

4. *Hipoteza:* Lindt čokolada bo pri isti vrednosti vsebovala več polifenolov in višjo antioksidativno kapaciteto.

Hipotezo lahko ovržemo, saj smo v obeh primerih, ko smo primerjali čokolado Lindt s čokolado druge znamke z enako vsebnostjo kakava ugotovili, da vsebuje manjšo koncentracijo polifenolov. Hipotezo smo ovrgli in hkrati ugotovili, da je vsebnost polifenolov in posledično antioksidativna kapaciteta odvisna tudi od znamke čokolade oz. načina proizvodnje.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

V moderni družbi postaja skrb za naše zdravje vse bolj pomembna, z njo pa raste tudi zanimanje po zdravi in uravnoteženi prehrani, med katero spada tudi čokolada. Strokovnjaki že več časa promovirajo dobre učinke uživanja čokolade kot je naprimer stimulacija kognitivnih sposobnosti. Manjkrat omenjan dober učinek temne čokolade pa je tudi njena antioksidativna kapaciteta. Ta ima številne pozitivne učinke saj iz telesa odstranjuje ali pa stabilizira proste radikale, ki aktivno škodijo našim zdravim celicam. V naši raziskovalni nalogi smo med drugim preučevali korelacijo med vsebnostjo kakava v temni čokoladi in vsebnostjo antioksidativne kapacitete. Pri tem smo primerjali rast vsebnosti kakava in povprečje antioksidativne vrednosti (izračunali smo povprečno vrednosti za obe znamki čokolade), kjer smo ugotovili, da ta linearno narašča. Naši rezultati nam torej pokažejo, da ima čokolada z višjo vsebnostjo kakava v osnovi tudi večjo antioksidativno kapaciteto. Glede na pretekle raziskave o vplivih antioksidantov lahko tako povemo, da bi zaradi dobrega učinka na naše zdravje bilo pametno v našo prehrano vključiti čokolado s čim večjo vsebnostjo kakava.

8 ZAKLJUČEK IN SKLEPI

V raziskovalno nalogo smo vključili 5 različnih čokolad. Z dodajanjem različnih reagentov k razredčenim ekstraktom in s pomočjo spektrofotometra smo vzorcem vsake čokolade določili vsebnost polifenolov, ki smo jo izrazili v koncentraciji mol/L in antioksidativno kapaciteto kot procent inhibicije. Namen naloge je bil ugotoviti korelacijo med tema vrednostima in jo povezati z vsebnostjo kakava v čokoladi. Ugotovili smo da povezava oz. korelacija obstaja, čeprav naši rezultati kažejo le na zmerno pozitivno korelacijo. Ugotovili smo, da na vsebnost polifenolov in antioksidativno kapaciteto vpliva tudi proizvodnja oziroma znamka čokolade.

Ne glede na to so bile izmerjene vrednosti v vseh čokoladah visoke, zato bi lahko trdili da temna čokolado lahko uvrščamo kot del uravnotežene in zdrave prehrane.

9 VIRI IN LITERATURA

- Verbič, S. (6.. september 2016). *Čokolada*. Pridobljeno iz <https://sandraverbic.splet.arnes.si/https://sandraverbic.splet.arnes.si/kemijska-sestava/>
- Nathan Mahyrvold, N. B. (11. . November 2023). *Britannica*. Pridobljeno iz Britannca: Chocolate: <https://www.britannica.com/topic/chocolate>
- Eva Martínez-Pinilla, A. O.-A. (30.. Junij 2015). *National Library of Medicine*. Pridobljeno iz National Library of Medicine: The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335269/>
- Bogumiła Urbańska, D. D. (brez datuma).
- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., & Kowalska, J. (31. 7 2019). *Springer link*. Pridobljeno iz Springer link: Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-019-03333-w>
- Grobiša, A. (08 2017). Fenolne spojine v oljki in oljčnem olju . Koper, Slovenija, Slovenija.
- Nekrep, Ž. (2023). Fenolne spojine v oljki in oljčnem olju . Maribor, Slovenija, Slovenija.
- Prehrana.si*. (2021). Pridobljeno iz Prehrana.si: vse o kakavu in čokoladi: <https://www.prehrana.si/clanek/244-vse-o-kakavu-in-cokoladi>
- Prehrana.si*. (2021). Pridobljeno iz Prehrana.si: Antioksidanti: <https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>
- Čokoladni atelje*. (2019). Pridobljeno iz Čokoladni atelje: o čokoladi: <https://www.cokoladniatelje.si/o-cokoladi/>
- Prehrana.si*. (2021). Pridobljeno iz Prehrana.si: antioksidanti: <https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>
- Prehrana.si*. (brez datuma). Pridobljeno iz Prehrana.si: Antioksidanti: <https://www.prehrana.si/clanek/181-antioksidanti>
- Bauman, U., & Petrovič, a. (2020). *ZPM MB*. Pridobljeno iz ZPM MB: Mladi za napredek Maribora: https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2020/07/SŠ_INTER-BIO_KE_Primerjava_vsebnosti_antioksidantov_in_fenolnih_spojnin_v_medu.pdf

- Dolenc, D. (2019). Organska kemija. V D. Dolenc, *Organska kemija: univerzitetni učbenik* (str. 230-232). Ljubljana: Nonparel d.o.o.
- McMurry, J. (2015). Organic chemistry. V J. McMurry, *Organic chemistry: ninth edition* (str. 558-564). CENGAGE Learning.
- Jaćimović, S., Popović-Djordjević, J., Sarić, B., Krstić, A., Mickovski-Stefanović, V., & Đ. Pantelić, N. (17. maj 2022). *National Library of Medicine*. Pridobljeno iz National library of medicine: Antioxidant Activity and Multi-Elemental Analysis of Dark Chocolate: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9141620/>
- Hladnik, N. (9. Januar 2019). *Nutriholis.si*. Pridobljeno iz Temna čokolada - prednosti in koristi: <https://nutriholis.si/temna-cokolada-koristi-za-zdravje>
- Jakopin, J. (28. November 2017). *Nutriholis*. Pridobljeno iz Nutriholis: Temna čokolada je vir antioksidantov: <https://nutriholis.si/temna-cokolada-vir-antioksidantov>
- (brez datuma).

