

# Određivanje ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti kakao praha obogaćenog medom i zobi tijekom određenog razdoblja skladištenja

---

**Smetiško, Anamaria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:376682>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Anamaria Smetiško

**ODREĐIVANJE UKUPNIH  
POLIFENOLA I  
ANTIOKSIDACIJSKE  
AKTIVNOSTI KAKAO PRAHA  
OBOGAĆENOG MEDOM I ZOBIM  
TIJEKOM ODREĐENOG  
RAZDOBLJA SKLADIŠTENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Valingera.

## ZAHVALA

*Posebna zahvala mentoru izv. prof. dr.sc. Davoru Valingeru na stručnim savjetima, velikoj pomoći i pristupačnosti te izdvojenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada. Također hvala i svim djelatnicima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, na uslužnosti i uloženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Hvala i svim dragim prijateljima, a najviše mojoj obitelji na podršci tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

## ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI KAKAO PRAHA OBOGAĆENOG MEDOM I ZOB I TIJEKOM ODREĐENOG RAZDOBLJA SKLADIŠTENJA

*Anamaria Smetiško*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058212925

**Sažetak:** Kakao, med i zob bogat su izvor biološki aktivnih spojeva, a posebice polifenola. U ovom radu određivana je koncentracija ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteu metode i antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH i FRAP metode na uzorcima kakao praha s dodatkom meda i zobi. Cilj ovog rada bio je istražiti kako različiti udjeli meda i zobi utječu na vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost kakao praha te njihovu stabilnost nakon tri mjeseca skladištenja. Rezultati su pokazali da med i zob pozitivno utječu na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost kakao praha; koncentracija ukupnih polifenola za većinu uzoraka pada s povećanjem vremena skladištenja, dok antioksidacijska aktivnost ostaje slična ili blago raste. Također, korištena je i blisko-infracrvena spektroskopija u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama za definiranje korelacije između predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti. Umjetne neuronske mreže bazirane na blisko-infracrvenoj spektroskopiji pokazale su se kao pouzdana metoda za kvantitativnu procjenu vremena skladištenja uzoraka.

**Ključne riječi:** *kakao, med, zob, ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost*

**Rad sadrži:** 44 stranica, 15 slika, 5 tablica, 44 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Davor Valinger

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (član)
4. izv. prof. dr. sc. Filip Dujmić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 11. prosinca 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Process engineering**  
**Laboratory for Measurement, Control and Automatisation**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COCOA POWDER ENRICHED WITH HONEY AND OATS DURING A SPECIFIC STORAGE PERIOD

*Anamaria Smetiško*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058212925

**Abstract:** Cocoa, honey and oats are a rich source of biologically active compounds, especially polyphenolic compounds. In this work, the concentration of total polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity was determined using the DPPH and FRAP methods. This study aimed to investigate how different proportions of honey and oats affect the values of total polyphenols and the antioxidant activity of cocoa powder and their stability after three months of storage. The results showed that honey and oats have a positive effect on total polyphenols and the antioxidant activity of cocoa powder. However, the concentration of total polyphenols for most samples decreases with increasing storage time, while the antioxidant activity remains similar or increases slightly. Artificial neural networks based on near-infrared spectroscopy have proven to be suitable method for quantitative evaluation of storage time.

**Keywords:** cocoa, honey, oats, total polyphenols, antioxidant activity

**Thesis contains:** 44 pages, 15 figures, 5 tables, 44 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Davor Valinger, PhD, Associate professor

### **Reviewers:**

1. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (president)
2. Davor Valinger, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja Benković, PhD, Associate professor (member)
4. Filip Dujmić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** December 11<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. KAKAO PRAH .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Kemijski sastav kakaa .....	3
2.1.2. Antioksidativna svojstva kakao praha.....	3
<b>2.2. POBOLJŠANJE SVOJSTAVA KAKAA DODATKOM BIOAKTIVNIH SASTOJAKA.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Med .....	5
2.2.2. Zob .....	6
2.2.3. Djelovanje zobi i meda kao dodatka kakao prahu .....	7
<b>2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I UKUPNIH POLIFENOLA .....</b>	<b>8</b>
2.3.1. DPPH metoda.....	8
2.3.2. FRAP metoda .....	10
2.3.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteu metode .....	10
<b>2.4. BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5. KEMOMETRIJA I ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE .....</b>	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Sirovina .....	17
3.1.2. Kemikalije .....	17
3.1.3. Pribor i Aparatura.....	18
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Priprema ekstrakata prahova .....	19
3.2.2. Kemijske analize .....	19
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	19
3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	20
3.2.2.3. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	21
3.2.2.4. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR) .....	22
3.2.3. Analiza glavnih komponenata i umjetne neuronske mreže.....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA .....</b>	<b>25</b>
4.1.1. Promjena koncentracija ukupnih polifenola nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja....	25
4.1.2. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom .....	27



4.1.3. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom .....	29
4.1.4. Korelacijske matrice.....	30
<b>4.5. NIR SPEKTROSKOPIJA I ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE ZA PREDVIĐANJE KEMIJSKIH I FIZIKALNIH SVOJSTAVA UZORAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>40</b>
<b>6.LITERATURA .....</b>	<b>41</b>

# 1. UVOD

Kakao i proizvodi od kakaa u posljednjih nekoliko godina dobili su veliku pozornost zbog značajnog sadržaja polifenola. Polifenoli uključuju više tisuća spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina s jednim ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova u svojim strukturama (Kurtagić, 2017). U posljednje vrijeme prehrambena industrija sve više ulaže u razvoj novih tehnologija kako bi proizvela funkcionalne proizvode. Jedan od načina proizvodnje funkcionalnih proizvoda je obogaćivanje postojećih proizvoda bioaktivnim spojevima, koji su prirodno prisutni u određenom proizvodu, ali i dodatak novih nutrijenata ili komponenti koji nisu normalno prisutni u određenoj hrani (Spence, 2006).

U ovom radu je kakao prah, koji je sam po sebi već bogat polifenolima, obogaćen s medom i zobi. Med je prirodno sladak proizvod, a pčele medarice putem nektara donose u košnicu polifenole koji su široko distribuirani u biljnom svijetu. Iako je sadržaj polifenola u medu relativno mali oni su veoma zaslužni za njegove ljekovite osobine. Pčela ih u med ugrađuje u formi u kakvoj su ih biljke proizvele, u slobodnoj formi ili formi glikozida, a osnovno djelovanje im se zasniva na sprječavanju nastajanja vrlo reaktivnih slobodnih radikala (Kurtagić, 2017). Zob se od davnina koristi u prehrani ljudi zbog bogatog nutritivnog sastava i pozitivnog djelovanja na probavni sustav. Zob sadrži visokovrijedne složene ugljikohidrate, vitamine B1, B6, E i K te brojne fenolne spojeve. Od minerala zob sadrži glavninu potrebnih makroelementa, od željeza do mangana i cink (Vukšić i sur., 2020). Utjecaj skladištenja na stabilnost polifenolnih spojeva još se istražuje, a u cilju je pronaći načine kako smanjiti kemijske promjene tijekom skladištenja kako bi se sačuvala nutritivna i antioksidativna svojsva namirnica.

Cilj ovog rada bio je istražiti kako različiti udjeli meda i zobi utječu na vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost kakao praha te kako se te vrijednosti mijenjaju tijekom produljenog skladištenja 4, 5 i 6 mjeseci na sobnoj temperaturi. Istraživanje se provodilo pomoću Folin-Ciocalteu metode za kvantificiranje ukupne koncentracije polifenola te pomoću DPPH i FRAP metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta kakao praha s dodatkom meda i zobi tijekom razdoblja skladištenja. Provedena je i blisko-infracrvena spektroskopija, kako bi se prikupili podaci za predviđanje svih izmjerenih vrijednosti, primjenom umjetnih neuronskih mreža.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KAKAO PRAH

Kakaovac je zreli plod drveta kakaovca (*Theobroma cacao*), koji se intenzivno uzgaja u tropskim regijama Afrike i Južne Amerike zbog sjemena koje je izvor kakaa, kakao maslaca i čokolade. Plod kakaovca dugačak je oko 20 cm i teži oko 0,5 kg, a sastoji se od kore i srži u kojoj je raspoređeno 20 do 50 kakao sjemenki (Komes, 2008). Kakao, kao sastojak hrane, brzo je postao vrlo popularan u prehrambenoj i konditorskoj industriji diljem svijeta. Dostupan je u raznim oblicima, bojama i okusima te ima veliko područje primjene (Borchers i sur., 2000). Zrno kakaovca sadrži brojne polifenolne spojeve i minerale kao što su magnezij, bakar, kalij i kalcij koji su potrebni za funkcioniranje krvožilnog sustava te smanjuju rizik od hipertenzije i ateroskleroze (Steinberg i sur. 2003).

Postoje tri glavne vrste kakaovca, a to su: Criollo, Forastero i Trinitario. Criollo stabla pružaju izrazito aromatična zrna kakaovca, ali su puno osjetljivija na klimatske promjene i upravo iz tog razloga mogu biti napadnuti bolestima i štetnicima te imati znatno niži prinos u usporedbi sa stablima Forastero. Otprilike 95 % svjetskih proizvoda od kakaovca potječe od Forastera, zahvaljujući njegovoj otpornosti na bolesti i visokom prinosu. Međutim, njegova organoleptička svojstva nisu tako visoko cijenjena kao kod sorte Criollo. Trinitario je križanac između Criollo i Forastero te pokazuje karakteristike obje sorte (Bertazzo i sur., 2012).

Kakao prah je proizvod dobiven od očišćenih, oljuštenih i prženih kakaovih zrna, koji sadrži najmanje 20 % kakaovog maslaca, računato na suhu tvar, i najviše 9 % vode (NN 73/2005). Kakaova zrna za proizvodnju kakaovog praha moraju biti visoke kvalitete, dobro fermentirana, bez nečistoća, plijesni, bakterija te stranih mirisa i okusa. Tijekom žetve otvara se potpuno zreli plod i uklanjaju se sjemenke s okolnom pulpom. Sjeme se obično podvrgava fermentaciji 2-8 dana nakon čega slijedi pečenje na 120-130 °C tijekom 10-35 minuta. Parametri pečenja ovise o sorti, sadržaju vlage, sazrijevanju i veličini zrna kakaovca (Bertazzo i sur., 2012). Pržena zrna se zatim drobe te se odvaja ljuska. Ljuska mora biti u potpunosti odstranjena od jezgre kakaovog zrna. Najveći dopušteni udio kakaove ljuske u očišćenom kakaovom zrnu može biti 1,75 %, računato na masu nealkaliziranog zrna. Gotov proizvod, odnosno kakao prah dobiven je mljevenjem kakao pogače, koja može biti proizvedena iz alkaliziranog kakao loma ili kakao mase. Zbog toga se razlikuju dvije vrste proizvoda nealkalizirani kakao prah i alkalizirani kakao prah.

### 2.1.1. Kemijski sastav kaka

Osnovni nutritivni sastojci kaka pra su lipidi, ugljikohidrati i proteini. Ukupni sadržaj masti cijelog zrna kakaovca na suhoj osnovi je približno 50 %. Od lipida najzastupljenije su oleinska (34 %) i stearinska kiselina (34 %), zatim palmitinska (27 %), a u manjoj mjeri prisutne su i linolna (3 %) i linolenska kiselina (0,3 %) (Torres-Moreno i sur., 2015).

Nakon masti, drugi najzastupljeniji sastojak kakaovog zrna su proteini koji čine 10-15 % kakaovog zrna. Proteini kakaovca mogu se podijeliti na albumine (topive u vodi), globuline (topive u soli), gluteline (topivi u razrijeđenim kiselinama i alkalijama) i prolamini (topivi u alkoholu).

Tijekom fermentacije dolazi do porasta koncentracije hidrofobnih slobodnih aminokiselina, kao što su leucin, alanin, fenilalanin i tirozin. Fermentacija, prženje i sušenje, kao i vrste tla, klime i uvjeta žetve, uvelike utječu na karakteristike kakaovca. Fermentacija uključuje mikrobiološke i enzimske reakcije koje dovode do opsežne razgradnje proteina kakaovca uz povećanje koncentracije slobodnih aminokiselina koje zajedno s oligopeptidima i reducirajućim šećerima, smatraju prekursorima arome kaka (Bertazzo i sur., 2012). Prženje kakaovog zrna utječe na albumine, sadržaj aminokiselina i njihove nutritivne vrijednosti. Globulini se također degradiraju već tijekom fermentacije, što dovodi do stvaranja hidrofobnih aminokiselina i peptida, koji se smatraju prekursorima arome specifične za kaka (Voigt i sur. 1994).

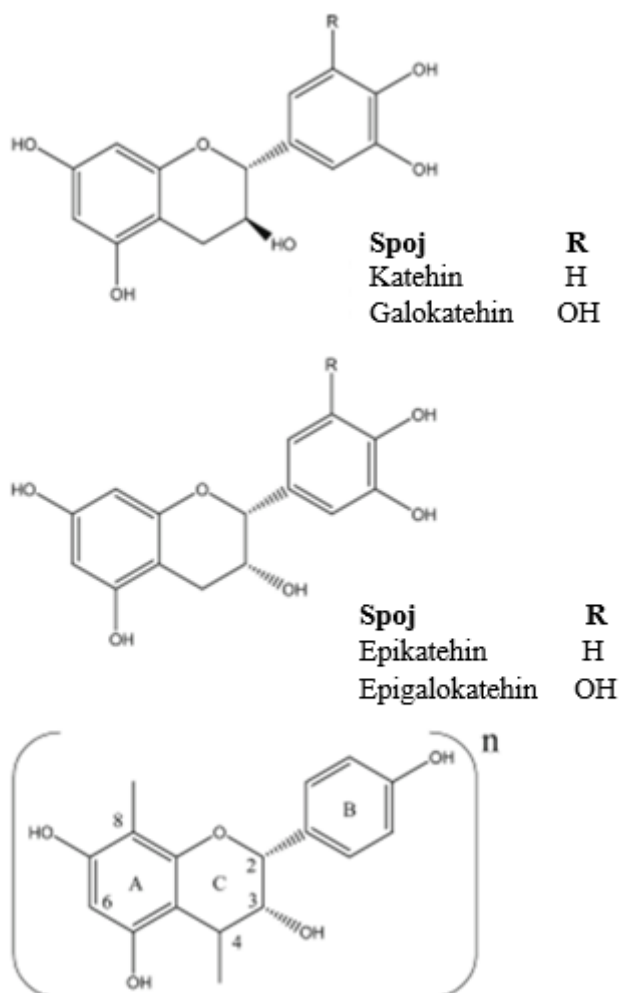
U zrnu kakaovca prisutni su mono-, oligo- i polisaharidi. Škrob je glavni probavljivi polisaharid te je prisutan u rasponu od 3 do 7 %, dok se oko 12 % celuloze nalazi u fermentiranim i sušenim zrnima kakaovca. Od topljivih ugljikohidrata u fermentiranom zrnu kakaovca najviše su prisutni saharoza i fruktoza, dok su u nekim manjim količinama prisutni glukoza i stahioza.

Kaka pra sadrži i čitav niz različitih biološki aktivnih sastojaka koji pokazuju pozitivan učinak na ljudski organizam, a neki od njih su metilksantini (teobromin i kofein), polifenolne strukture (flavonoidi i fenolne kiseline), biogeni amini, cijanidini te slobodne masne kiseline (Aprotosoie i sur., 2015).

### 2.1.2. Antioksidativna svojstva kaka pra

Kakaovac, kao i proizvodi od kaka, bogati su izvor fitonutrijenata kao što su katehini koji su bitni za normalno funkcioniranje organizma i pomažu pri sprječavanju bolesti. Ukupni sadržaj polifenola u zrnu kaka procjenjuje se na 6-8 % težine suhog zrna (Wollgast i Anklam, 2000). Polifenoli kakaovca su u mnogim istraživanjima dokazani kao bioaktivni spojevi s

antioksidativnim, antiradikalnim i antikarcinogenim svojstvima. Glavne skupine polifenola prisutne u kakaovcu (slika 1) su **katehini** (npr. epikatehin, katehin, galokatehin i epigalokatehin), **antocijanini** (npr. cijanidin-3- $\alpha$ -L-arabinozid i cijanidin-3- $\beta$ -D-galaktozid) i **proantocijanidini** (npr. flavan-3,4-dioli) (Bertazzo i sur., 2012). Polifenoli djeluju sinergistički s drugim nutrijentima, kao što su vitamin C i selen, kako bi povećali endogeni antioksidativni kapacitet.



**Slika 1.** Strukture glavnih polifenola prisutnih u kakaovcu (Bertazzo i sur., 2012)

Triciklička struktura flavonoida zaslužna je za antioksidativne učinke koji uklanjaju reaktivne oblike kisika, inhibiraju enzime i reguliraju antioksidacijsku obranu. Flavan-3-oli su najraširenija skupina flavonoida koji neutraliziraju slobodne radikale te smanjuju rizik od razvoja karcinoma. Epikatehin, predstavnik flavan-3-ola je inhibitor oksidacije lipida u plazmi zahvaljujući sposobnosti vezanja polifenola za lipoproteine niske gustoće te je pokazao povoljan učinak na vaskularni endotel, zato što regulira proizvodnju dušikovog oksida. Konzumacija kakaa s visokim udjelom procijanidina i epikatehina povećava antioksidacijski kapacitet plazme

te smanjuje sadržaj produkata oksidacije lipida u ljudskoj plazmi (Wang i sur., 2000). Antioksidativni učinci kakaa mogu pozitivno utjecati na inzulinsku rezistenciju te smanjiti rizik od dijabetesa. Kakao ima pozitivan utjecaj na živčani sustav te može zaštititi živce od ozljeda i upala te može zaštititi kožu od oksidativnog oštećenja UV zračenjem. Kakao također pozitivno utječe na kognitivnu funkciju i raspoloženje.

## **2.2. POBOLJŠANJE SVOJSTAVA KAKAA DODATKOM BIOAKTIVNIH SASTOJAKA**

### **2.2.1. Med**

Med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. Boja meda može varirati od gotovo bezbojne do tamnosmeđe te može biti tekuće ili viskozne konzistencije, djelomično ili potpuno kristaliziran (NN 53/2015).

Tri su glavne podjele meda i to prema podrijetlu i načinu proizvodnje te pekarski med. Prema podrijetlu razlikujemo cvjetni med, koji je dobiven iz nektara biljaka te medljikovac ili medun, koji je dobiven uglavnom od izlučevina kukaca. Nadalje, prema načinu proizvodnje razlikujemo: med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijedeni med, vrcani med, prešani med i filtrirani med. Pekarski med je med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se zatim prerađuje. Med se uglavnom sastoji od različitih šećera, pretežno fruktoze i glukoze, bjelančevina, minerala (kalij, natrij, kalcij, fosfor, sumpor, klor, magnezij, željezo i aluminij i dr.), vitamina (B skupine), kao i od drugih tvari kao što su organske kiseline i enzimi. Antioksidativno djelovanje meda općenito se pripisuje njegovim fenolnim spojevima i flavonoidima. Med je bogat flavonoidima koji imaju antioksidativni učinak, odnosno štite stanice od oksidacijskog utjecaja slobodnih radikala te djeluju antimikrobno, inhibiraju razne enzime, imaju citotoksični antitumorni učinak te djeluju kao estrogini. Glavni fenolni i flavonoidni spojevi u medu uključuju elaginsku kiselinu, galnu kiselinu, siringinsku kiselinu, benzojevu kiselinu, cimetnu kiselinu, ferulinsku kiselinu, miricetin, klorogensku kiselinu, kavenu kiselinu, hesperetin, kumarinsku kiselinu, izoramnetin, krizin, kvercetin, galangin, luteolin i kemferol (Meda i sur., 2005). Med ima mnoga korisna djelovanja kao što

suhipoglikemijsko, antioksidativno, antihipertenzivno, antibakterijsko, protugljivično i protuupalno djelovanje. Med može ublažiti oksidativni stres u gastrointestinalnom traktu, jetri, gušterači, bubrezima, testisima i plazmi. Primijenjen sam ili u kombinaciji s konvencionalnom terapijom, med bi mogao postati novi antioksidans u liječenju mnogih bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Erejuwa i sur.,2012).

### 2.2.2. Zob

Zob (lat. *Avena sativa*) je cjelovita žitarica koja se uglavnom uzgaja u Sjevernoj Americi i Europi, a koristi se u prehrani ljudi, ali i za stočnu hranu. Zob je bolje prilagođena promijenjenim tipovima tla za razliku od ostalih vrsta žitarica. Uzgaja se uglavnom u hladnim, vlažnim klimama, a osjetljivija je na vruće i suho vrijeme. Vrlo je dobar izvor proteina i vlakana, a bogata je i vitaminima, mineralima i antioksidansima.

Dijetalna vlakna bitan su dio ljudske prehrane, a nalaze se u staničnim stijenkama zrna. Sastoje se od mnogih tvari biljnog podrijetla koje se ne probavljaju u gornjem gastrointestinalnom traktu čovjeka. Uključuju polisaharide, oligosaharide, lignin, celulozu i srodne biljne tvari. Dijetalna vlakna reguliraju brzinu probave i apsorpcije hranjivih tvari i služe kao supstrat za mikrofloru crijeva. Cjelovita zob sadrži gotovo 11 % vlakana i to uglavnom topiva vlakna, u ovom slučaju beta glukan. Uz topiva vlakna, zob sadrži i ona netopiva - lignin, celulozu i hemicelulozu. Zbog visokog udjela topivih vlakana konzumacija zobi pogoduje povećanom osjećaju sitosti i smanjenju apetita. Beta glukan je polisaharid poželjan u ljudskoj prehrani, zato što pomaže smanjiti kolesterol u krvi, smanjuje rizik od bolesti srca te pomaže regulirati razinu šećera u krvi s čime smanjuje rizik od dijabetesa (Rasane i sur., 2013).

Zob se smatra jeftinim izvorom proteina s dobrom nutritivnom vrijednosti, a sadrži 11-15 % proteina. Proteine žitarica možemo podijeliti prema topljivosti na albumine (topljivi u vodi), globuline (topljivi u slanoj vodi), prolamine (topljivi u razrijeđenoj otopini alkohola) i gluteline (topivi u kiselinama ili bazama). Zob sadrži manju količinu prolamina (15 %) u odnosu na visoku količinu globulina (80 %). Prolamini imaju visok postotak glutamina i prolina te nizak sadržaj lizina u usporedbi s drugim proteinima. Zob je u usporedbi s drugim žitaricama bogata lizinom dok ima relativno manji sadržaj glutaminske kiseline i prolamina.

Zob je dobar izvor lipida. Za razliku od ostalih žitarica sadrži mnogo više lipida koje su izvrstan izvor energije i nezasićenih masnih kiselina. Većina lipida zobi nalazi se u endospermu. Udio masti u zobi kreće se od 5 do 9 % ukupnog sadržaja lipida.

Primarna komponenta zobi odgovorna za zdravstvene koristi smatra se  $\beta$ -glukanom, međutim fenolni spojevi zobi i drugi antioksidativni spojevi također doprinose zdravlju. Zob posjeduje antioksidativni kapacitet uglavnom zbog prisutnosti tokoferola, tokotrienola, fitinske kiseline i flavanoida. Zob je poznata po jedinstvenoj skupini antioksidansa zabilježenih među žitaricama poznatima kao avenantramidi (AVA), točnije 2c, 2p i 2f, gdje broj 2 označava 5-hidroksiantranilnu kiselinu, a slovo c, p i f označavaju vrstu hidroksicimetnih kiselina kao p-kumarinsku, kofeinsku i ferulinsku kiselinu. Dimberg i suradnici su u svojem radu izvijestili su da AVA imaju antioksidativno djelovanje 10-30 puta veći od ostalih fenolnih antioksidansa kao što su vanilin i kofeinska kiselina (Dimberg i sur., 1993). Preliminarne studije pokazale su da bi AVA mogle imati protuupalna i antiaterogena svojstva, budući da inhibiraju adheziju monocita na endotelne stanice ljudske aorte i pretpostavlja se da inhibiraju oslobađanje proupalnih spojeva iz makrofaga. AVA je također uključen u kontrolu krvnog tlaka jer proizvodi dušikov oksid koji širi krvne žile (Liu i sur., 2004).

Poznato je da antioksidansi poput vitamina E mogu zaštititi tijelo od štetnih slobodnih radikala i imati važnu ulogu u prevenciji bolesti poput raka, artritisa, ateroskleroze. Spojevi  $\alpha$ -tokotrienol i  $\alpha$ -tokoferoli zajedno čine 86 do 91 % ukupnih tokoferola. Utvrđeno je da su tokoli stabilni u neprerađenoj prekrupi više od 7 mjeseci skladištenja na sobnoj temperaturi, dok obrada zobi dovodi do razgradnje ovih spojeva unutar 1 do 2 mjeseca (Peterson, 2001).

Zob je dobar izvor fenolnih spojeva, koji pridonose nutritivnim i funkcionalnim svojstvima žitarice. Istraživanja su pokazala da fenolne kiseline u zobi posjeduju antioksidativna svojstva i *in vitro* i *in vivo*. Glavne fenolne kiseline u zob je ferulinska, p-kumarinska, kofeinska, vanilična, hidroksibenzojeva kiselina i njihovi derivati. Polifenoli se smatraju snažnim antioksidansima, nova istraživanja pokazuju da polifenoli mogu imati daleko važnije učinke *in vivo* kao što je poboljšavanje endotelne funkcije, stanične signalizacije i protuupalnih svojstva (Rasane i sur., 2013).

### 2.2.3. Djelovanje zobi i meda kao dodatka kakao prahu

Kao što je opisano u prethodnim poglavljima zob i med imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Kakao je izuzetno bogat antioksidansima, kao što su polifenoli i katehini, koji su zaslužni za cjelokupno zdravlje čovjeka. Antioksidansi su spojevi koji mogu odgoditi, inhibirati ili spriječiti oksidaciju na način da uklanjaju slobodne radikale i smanjuju oksidativni stres. Oksidativni stres je neuravnoteženo stanje gdje dolazi do nakupljanja reaktivnih vrsta kisika i/ili dušika (npr. vodikov peroksid, hidroksilni radikal, peroksinitrit) što nadmašuje endogeni



antioksidativni kapacitet i to dovodi do oksidacije niza biomakromolekula, kao što su enzimi, proteini, lipidi, DNA i lipidi (Ames i sur, 1993).

Dodatak meda i zobi kakao prahu utječe na povećanje antioksidativnih svojstva te se povećava ukupni sadržaj polifenola, što pozitivno utječe na zdravlje srca, regulaciju krvnog tlaka i smanjenje oksidativnog stresa. Kombinacija ta tri sastojka je vrlo bogat izvor fenolnih spojeva i antioksidansa, koji su izrazito važni za ljudsko zdravlje, zato što imaju antioksidativno, antibakterijsko, protugljivično i protuupalno djelovanje.

Zob kao dodatak kakau je dobar izvor fenolnih spojeva, ali isto tako i izvor vlakana posebno beta glukana, koji je koristan za prevenciju dijabetesa, smanjene kolesterola i očuvanje zdravlja srca i krvnih žila. Zbog visokog udjela topivih vlakana konzumacija zobi pogoduje povećanom osjećaju sitosti i smanjenju apetita. Osim svojih nutritivnih svojstava zob pridonosi i organoleptičkim svojstvima kakaa, poboljšavajući teksturu proizvoda, što pridonosi očuvanju zdravlja probavnog sustava.

Med djeluje sinergijski s kakaom, povećavajući udjel antioksidansa i flavonoida, a s time se povećavaju i antibakterijska, protuupalna i antioksidativna svojstva. Bogat je vitaminima (B1, B2, B3 ili pantotenska kiselina, B5, B6 ili H, B9) i mineralima kao što je krom, koji je neophodan u razgradnji ugljikohidrata, čime se smanjuju nepoželjni učinci uzimanja veće količine jednostavnih šećera i naglog porasta glukoze u krvi. Med kao dodatak kakau poboljšava nutritivna svojstva, ali i organoleptička svojstva, zbog visokog sadržaja šećera (fruktoze i glukoze) koja poboljšavaju okus kakaa. Med je i zdravija zamjena za bijeli šećer jer sadrži veći udio fruktoze, pa je za istu količinu šećera potrebno upola manje meda. Med je vrlo aromatičan proizvod te njegova aroma ovisi o vrsti meda (lipa, bagrem, kesten, kadulja). S toga med uvelike utječe i na miris i okus kakao praha, čineći ga ne samo zdravijim već i ukusnijim i aromatičnijim.

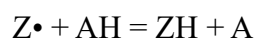
## **2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I UKUPNIH POLIFENOLA**

### **2.3.1. DPPH metoda**

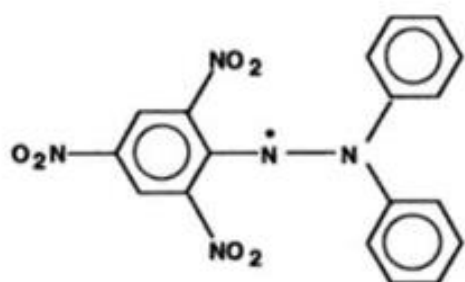
DPPH metoda koristi se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta već 50 godina, a otkrio ju je Marsden Bios na Sveučilištu Stanford. Molekula DPPH - 1,1-difenil-2-pikril- hidrazil ( $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil) se karakterizira kao stabilan slobodni radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona preko cijele molekule, tako da se molekule ne dimeriziraju, kao što je slučaj

s većinom drugih slobodnih radikala (slika 2). Delokalizacija također uzrokuje ljubičastu boju. Kada se otopina DPPH-a pomiješa s otopinom tvari koja može donirati atom vodika, dolazi do nastanka reducirane forme te dolazi do promjene boje iz ljubičaste u blijedožutu, što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese.

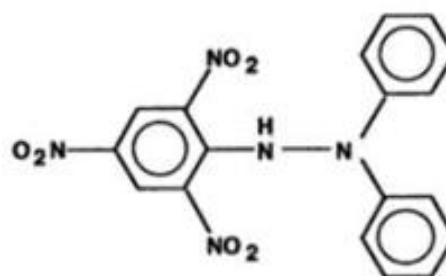
Predstavljajući DPPH radikal kao Z•, a donornu molekulu kao AH, primarna reakcija je slijedeća gdje je ZH reducirani oblik, a A je slobodni radikal:



Cilj ove reakcije je uspostaviti vezu s reakcijama koje se odvijaju u oksidacijskom sustavu, poput autooksidacije lipida. DPPH molekula (Z •) predstavlja slobodne radikale koji se formiraju u sustavu, a čija aktivnost treba biti suzbijena tvarima poput AH.



1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (slobodni radikal)



1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (neradikalan)

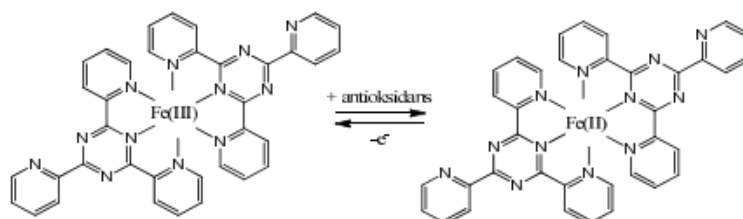
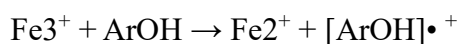
**Slika 2.** DPPH (slobodni radikal-lijevo) i reducirani oblik DPPH -desno (prema Shalaby i Shanab, 2013)

DPPH metoda je jednostvna, brza i široko primjenjivana metoda za mjerenje antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i doniranja vodikovih atoma (Shalaby i Shanab, 2013). Primjenjuje se za mjerenje antioksidativne aktivnosti u složenim biološkim sustavima, voćnim i povrtnim sokovima i drugim tvarima.

Prednost ove metode je da DPPH reagira s cijelim antioksidansom, a učinkovitost antioksidansa mjeri se na sobnoj temperaturi da se izbjegne njegova razgradnja. Reakcija se mora odvijati u mraku, jer se apsorbancija DPPH u metanolu i acetonu se smanjuje pod utjecajem svjetla.

### 2.3.2. FRAP metoda

FRAP metoda se temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona - TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) u  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ s antioksidansom. Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ioni u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ reagens) tvore stabilni kompleks, koji apsorbira pri 593 nm i nastaje plavo obojenje čiji intenzitet ovisi o količini antioksidansa u uzorku. Reakcija se odvija u kiselom mediju ( $\text{pH} = 3,6$ ). Redukcija se prati mjerenjem apsorpcije na 593 nm pomoću spektrofotometra. Mehanizam reakcije prikazan je na slici 3, a reakciju možemo opisati slijedećom jednačinom: (Moharram i Youssef, 2014)



**Slika 3.** Mehanizam djelovanja FRAP reakcije (Đulović, 2014)

Prednosti FRAP metode su brzina i jednostavnost analize, robusnost i pristupačnost. Samo provođenje testa nije skupo i ne zahtjeva nikakvu specijalnu opremu, osim spektrofotometra. Nedostatak FRAP metode je da će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-para ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ)/( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), dovesti do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka (Mandić, 2017).

### 2.3.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteu metode

Izvorno je ova metoda razvijena za kolorimetrijsko određivanje tirozina, fenolne neesencijalne aminokiseline. Ali danas se ova metoda koristi se za određivanje raznih spojeva uključujući biljne fenole, lijekove, vitamin C i druge sastojke u širokom rasponu uzoraka od biljnih ekstrakata do urina i pčelinjih proizvoda (Attard, 2013).

F-C analiza je kolorimetrijska metoda koja se temelji na reakcijama prijenosa elektrona između F–C reagensa i fenolnih spojeva. Folin-Ciocalteu metoda temelji se na redukciji kompleksa fosfovolframat-fosfomolibdat pomoću fenola u plavo obojane produkte reakcije, čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski pri  $\lambda = 765 \text{ nm}$  i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku. Ova analiza nije specifična za određivanje ukupnih fenola (TPC). Poznato je da druge vrste spojeva poput reducirajućih šećera i askorbinske kiseline mogu biti prisutne u visokim koncentracijama u ekstraktima biljnih namirnica te ometati reakciju i rezultate ukupnih fenolnih spojeva. Stoga su predložene slijedeće metode za poboljšanje specifičnosti F–C testa: djelomično pročišćavanje fenolnih ekstrakta pomoću SPE kolona prije F–C analize, izračun ispravljene vrijednosti TPC-a oduzimanjem reducirajuće aktivnosti askorbinske kiseline od koncentracije ukupnih fenola (TPC) kvantificiranih u uzorku te tretman fenolnih ekstrakata oksidativnim sredstvima kao što je vodikov peroksid na razinama koji oksidiraju interferirajuće spojeve i ne utječu na fenolne spojeve (Sánchez-Rangel i sur., 2013).

#### **2.4. BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA**

Blisko infracrvena spektroskopija (engl. *Near-infrared*, NIR) spektroskopija, počela se primjenjivati 1970-ih godina za analizu uzoraka poljoprivredne hrane. Danas se u prehrambenoj industriji koristi za analizu sastava, funkcionalnu i senzorsku analizu sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i finalnih proizvoda. Koristi se u mnogim drugim industrijama kao što su: farmaceutska, tekstilna i kozmetička industrija te u poljoprivredi i medicini (Blanco i Villarroya, 2002).

Infracrvena spektroskopija koristi se za istraživanje vibracijskih svojstava uzoraka. Molekularne vibracije dovode do pojave apsorpcijskih vrpca koje se nalaze u srednjem infracrvenom području između  $400$  i  $4000 \text{ cm}^{-1}$  gdje su najintenzivnije i najjednostavnije. (Siesler i sur, 2008).

NIR spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja pri valnim duljinama u rasponu  $780\text{-}2500 \text{ nm}$ . NIR se kao i svako zračenje ponaša kao val sa svojstvima jednostavnog harmonijskog gibanja, koje može biti opisano s valnom duljinom i frekvencijom vibracija. Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako se tijekom vibracije dogodi promjena u dipolnom momentu. Budući da je atom vodika najlakši on će pokazivati najveće vibracije i najveća odstupanja od harmonijskog gibanja. Zbog toga će glavne vrpce koje se obično opažaju u NIR spektru biti povezane s vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome, poput ugljika (C-

H), dušika (N-H), kisika (OH) i sumpora (S-H). Dok su vrpce za veze kao što su C-C, C=O i C-Cl mnogo slabije ili se uopće ne vide (Blanco i Villarroya, 2002).

Tipični NIR spektrometar sastoji se od izvora zračenja, uređaja za odabir valne duljine (npr. monokromatora), držača uzorka, fotoelektričnog detektora za mjerenje intenziteta detektirane svjetlosti i pretvaranje u električne signale te računalnog sustava za prikupljanje i obradu spektralnih podataka.

Prednost NIR spektroskopije u odnosu na druge instrumentalne tehnike je taj što može snimati spektre čvrstih i tekućih uzoraka bez prethodne obrade, primjenjivati kontinuirane metodologije, brzo snimati spektre i predviđati fizičke i kemijske parametre iz jednog spektra. Ova analiza je jednostavna i brza (15-90 sekundi), a sama metoda može se provesti i on-line. NIR analiza omogućuje istovremeno mjerenje nekoliko sastojaka, ne uništava uzorak te za analizu nisu potrebne kemikalije čime se štiti okoliš. Tehnika omogućuje određivanje ne samo kemijskih već i fizikalnih svojstava, kao što su gustoća, viskoznost ili veličina čestica.

Glavni nedostatak NIR spektroskopije u analizi hrane je njezina ovisnost o manje preciznim referentnim metodama. Za razliku od IR spektroskopije, vrpce u NIR-spektrima manje su informativne, a u mnogim slučajevima dolazi i do njihova preklapanja, odnosno mjerni signal je nepravilna krivulja bez pojedinih oštro izraženih apsorpcija (Jednačak i Novak, 2013) te zbog toga NIR spektroskopija zahtijeva kalibraciju te matematičke i statističke alate (kemometrije) za izdvajanje analitičkih informacija iz odgovarajućeg spektra.

## **2.5. KEMOMETRIJA I ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA**

Kemometrija se definira kao kemijska disciplina koja koristi matematičke, statističke i druge metode kako bi se dizajnirali ili odabrali optimalni procesi mjerenja i eksperimenti za dobivanje najrelevantnijih informacija za analizu kemijskih podataka (Héberger, 2008).

Dvije najčešće korištene kemometrijske metode su multivarijantna kalibracija i multivarijantna klasifikacija. Multivarijantna klasifikacija je kvalitativna analiza koja omogućuje grupiranje uzoraka sa sličnim karakteristikama, kako bi se uspostavile metode klasifikacije za nepoznate uzorke. Multivarijantna kalibracija je kvantitativna analiza koja omogućuje provedbu metoda kojima se utvrđuju svojstva nepoznatih uzoraka. Cilj multivarijantna kalibracije je pronalaženje kvantitativnih odnosa između dva skupa mjernih podataka. Primjer multivarijantne kalibracije su spektri snimljeni NIR spektroskopijom i rezultati dobiveni na konvencionalan način, koji zahtijeva skupe laboratorijske analize. Dobiveni kalibracijski model zamjenjuje klasične metode,

a koristi se za točno predviđanje željenih parametara u nepoznatim uzorcima na brz i jednostavan način (Porep i sur.,2005).

Kemometrija se rabi u svrhu planiranja i optimiranja procesa, za dobivanje korisnih informacija, počevši od dizajna eksperimenata i uzorkovanja, optimizacije analitičke metodologije, razvoja i uporabe metoda za detekciju i obradu signala, te obradu podataka analize (Massart, 1997). Primjenjuje u automatizaciji laboratorija, za upravljanje analitičkim i spektroskopskim bazama podataka i metodama umjetne inteligencije.

**Analiza glavnih komponenata-** (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) je kemometrijska metoda multivarijantnog modeliranja i analize tabličnih podataka koji sadrže međusobno zavisne varijable (Bendelja i sur., 2018).

PCA omogućava analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizikalnog ili kemijskog procesa (Jednačak, 2013). Također se koristi u istraživanju korelacija i varijabilnosti u skupu NIR spektara, te pomaže u identifikaciji značajnih uzoraka i njihovih karakteristika. Ova metoda omogućava jednostavnije analize, interpretaciju rezultata i lakše donošenje odluka temeljem smanjenog skupa informacija (Abdi i Williams, 2010). Ova statistička metoda najviše se koristi kod obrade podataka s više varijabli. Njezina svrha je analiza korelacija unutar jednog skupa varijabli i posljedične redukcije dimenzionalnosti prostora, kako bi se što veći broj varijabli objasnio pomoću što manjeg broja varijabli. PCA metoda se ne koristi ukoliko varijable nisu u korelaciji. Kod složenosti istraživanja PCA metoda se koristi da bi se pojednostavili signali i pripremili za obradu (Miller i Miller, 2000).

Ciljevi PCA su: izdvojiti najvažnije informacije iz tablica podataka, komprimirati veličinu skupa podataka zadržavajući samo važne informacije, pojednostaviti opis skupa podataka i analizirati strukturu opažanja i varijable. Kako bi se ti ciljevi postigli, PCA izračunava nove varijable koje se nazivaju glavne komponente, koje se dobivaju kao linerne kombinacije izvornih varijabli (Abdi i Williams,2010).





PCA izabire najvažnije podatke te ih uzima kao nove varijable (glavne komponente) prikazujući na grafu sličnosti i razlike među uzorcima u obliku točka, odnosno faktorskih bodova. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u n-dimenzijском prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu. Prva glavna komponenta opisuje najveću moguću varijaciju u podacima, dok se druga komponenta izračunava pod uvjetom da je ortogonalna prvoj komponenti, a tako se računaju i ostale komponente. Vrijednosti novih varijabli nazivaju se rezultati faktora, a mogu

se geometrijski interpretirati kao projekcije opažanja na glavne komponente (Abdi i Williams, 2010). Njihovo daljnje grupiranje omogućit će činjenica da ukoliko su spektri slični, vrijednosti faktorskih bodova nalazit će se blizu, a što su spektri različitiji vrijednosti faktorskih bodova bit će udaljeniji. (Jednačak, 2013).

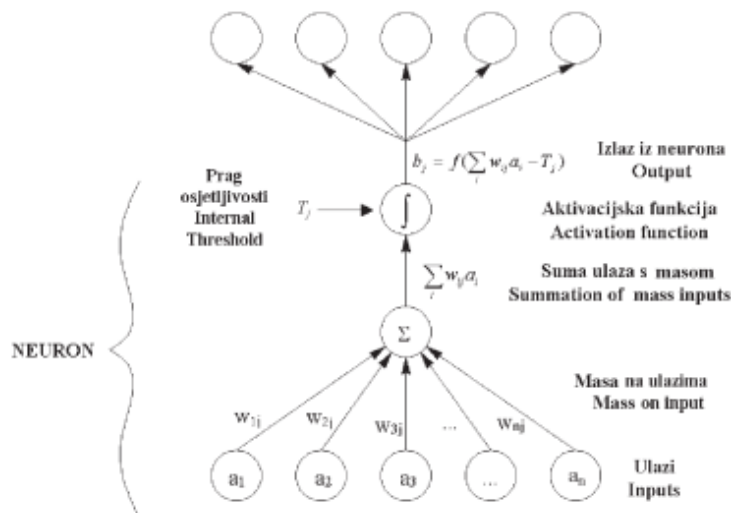
## 2.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Pojam umjetna neuronska mreža dolazi iz područja umjetne inteligencije, a definira se kao statistički model kojeg čini veliki broj jednostavnih, međusobno povezanih procesnih jedinica odnosno neurona (Ujević Andrijić, 2019). Spoznaja o građi neurona i načinu funkcioniranja ljudskog mozga potaknula je istraživanje i razvoj umjetnih neuronskih mreža. U tablici 1. možemo vidjeti usporedbu između biološkog i umjetnog neurona.

**Tablica 1.** Usporedba biološkog i umjetnog neurona (Ujević Andrijić, 2019)

	<b>Biološki neuron</b>	<b>Umjetni neuron</b>
	Prima ulazni signal putem dendrida (sinaptičke veze)	Prima ulaze ( $i$ ) koji su određeni težinskim koeficijentima ( $w$ )
	Obrada signala u somi	Obrada ulaza, unutarnji prag – bias ( $b$ )
	Pretvara obrađeni ulaz u izlaz putem aksona	Pretvara ulaze u izlaz (prijenosna funkcija)
	Šalje informacije putem sinapsi do svih neurona s kojima je neuron povezan	Šalje informaciju prema izlazu i sljedećim neuronima

McCulloch i Pitts objavili su prvi rad o umjetnim neuronskim mrežama 1943. godine. Koristili su vrlo jednostavan model neurona koji, kao i biološki neuron, obrađuje signale putem sinaptičke i somatske operacije (Ujević Andrijić, 2019). Taj vrlo jednostavan model neurona nazvan je perceptron i prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Prikaz perceptrona (Ujević Andrijić, 2019)

Sinaptička operacija razumijeva množenje svakog ulaznog signala  $a_i$  s masenim koeficijentom  $w_i$ . Tako otežani ulazni signali zbrajaju se, a njihov zbroj uspoređuje se s pragom osjetljivosti neurona  $T_i$ . Ukoliko je zbroj otežanih signala veći od praga osjetljivosti neurona ( $\sum a_i w_i > T_i$ ) nelinearna aktivacijska funkcija  $f$  generira izlazni signal neurona  $b_j$  (Bolf, 2006).

Dokazano je da je perceptrone moguće učiti, a to podrazumijeva postojanje sustavnog postupka za ugađanje parametara mreže radi ostvarivanja određene funkcije, odnosno postupak optimiranja vrijednosti težinskih faktora na osnovu pogreške između modelom proračunate vrijednosti i stvarne vrijednosti mjerne veličine. Kad informacija jednom prođe kroz neuronsku mrežu generira se vrijednost, koja se zatim uspoređuje sa stvarnom vrijednošću i na temelju razlike između te dvije vrijednosti korigira se težinski faktor. Korekcija težinskih faktora jako je bitna jer se na taj način uči predviđati stvarna vrijednost i smanjuje se razlika između stvarnih i predviđenih vrijednosti izlaznih veličina (Ujević Andrijić, 2019).

Postoji velik broj različitih neuronskih mreža. Sa strukturnog gledišta neuronske mreže dijele se na statičke unaprijedne i dinamičke, ovisno o modelu neurona od kojeg su građene te po načinu prostiranja signala kroz mrežu. Neuroni se u neuronskoj mreži najčešće organiziraju u slojeve pa se razlikuju jednoslojne i višeslojne neuronske mreže. Za primjenu u identificiranju i vođenju nelinearnih dinamičkih procesa najčešće se rabe višeslojne statičke neuronske mreže s elementima zadržke, a kao zasebne strukture izdvajaju se neizrazite neuronske mreže (Bolf, 2006).

Tamo gdje standardnim metodama nije moguće uspješno modelirati procese i dobivene modele primijeniti za vođenje procesa koriste se umjetne neuronske mreže koje su vrlo korisne kod



složenih kemijskih i biokemijskih procesa. Primjena neuronskih mreža za vođenje procesa može se podijeliti na:

1. Prediktivne metode vođenja koje su stabilne, ali su računski zahtjevnije.
2. Vođenje pomoću inverznog modela procesa koje je jednostavnije za primjenu, ali nije toliko stabilno.
3. Metode prilagodljivog vođenja koje su prikladne za modele s promjenjivim parametrima, ali nisu stabilne.

Umjetne neuronske mreže koriste se i u industriji za nadgledanje i dijagnostiku procesa kao što su tlak, temperatura, regulacije pH. Pretpostavlja se da će se u budućnosti neuronske mreže sve više koristiti i to u kombinaciji s ostalim naprednim tehnikama.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Sirovina

Uzorci korišteni u radu bili su ekstrakti mješavina kakao praha (Nutrigold, Zagreb, Hrvatska) i zob (Nutrigold, Zagreb, Hrvatska) na bazi meda (Bagrem berba 2021., Krapina, Hrvatska) pri različitim omjerima koji su prikazani u tablici 2. Nakon toga uzorci su sušeni na 50 °C do postizanja vlage niže od 10 % te su zatim čuvani 4, 5 i 6 mjeseci pri sobnoj temperaturi u PE-HD posudama za prahove s poklopcem i navojem. Nakon toga napravljeni su ekstrakti prahova.

**Tablica 2.** Omjeri dodanih komponenti u smjesu

	med / g	zob / g	kakao / g
1	50	50	6,25
2	60	40	7,5
3	40	60	5
4	40	60	7,5
5	60	40	6,25
6	50	50	5
7	60	40	5
8	40	60	6,25
9	50	50	7,5

##### 3.1.2. Kemikalije

- Folin- Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Destilirana voda
- Galna kiselina (GAE), 98 % (AcrosOrganics, SAD)

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- Trolox (Fluka, Švicarska)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPZT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Acetatni pufer ( $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{CH}_3\text{COOH}$ )
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezo(III)-klorid-heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)

### 3.1.3. Pribor i Aparatura

Pribor:

- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete (5 mL i 10 mL)
- Mikropipete (100  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$ )
- Kiveta za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske čaše
- Falcon kivete
- Eppendorf kivete

- Štoperica
- Menzura
- PE-HD posude za prahove s poklopcem i navojem (Kartell, Italija)

Aparatura:

- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- Vorteks (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija)
- Analitička vaga (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu$ m Control Development inc., Philadelphia, SAD)
- Vodena/uljna kupelj (IKA,Staufen, Njemačka)
- Set za vakuum filtraciju (Rocker, Tajvan)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema ekstrakata prahova

Prije pripreme ekstrakta potrebno je pripremiti 70 %-tnu otopinu etanola kao ekstrakcijskog otapala. Izvaže se 3 g usitnjenog uzorka i doda u 90 mL ekstrakcijskog otapala prethodno temperiranog na 70 °C u vodenoj/uljnoj kupelji. Ekstrakcija se provodi 30 min pri brzini okretaja miješalice od 500 rpm u pokrivenim staklenim čašama, kako bi se spriječilo isparavanje otapala. Dobiveni ekstrakt se profiltrira na setu za vakuum filtraciju i spremi u Falcon kivete od 50 mL. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču do provođenja analiza.

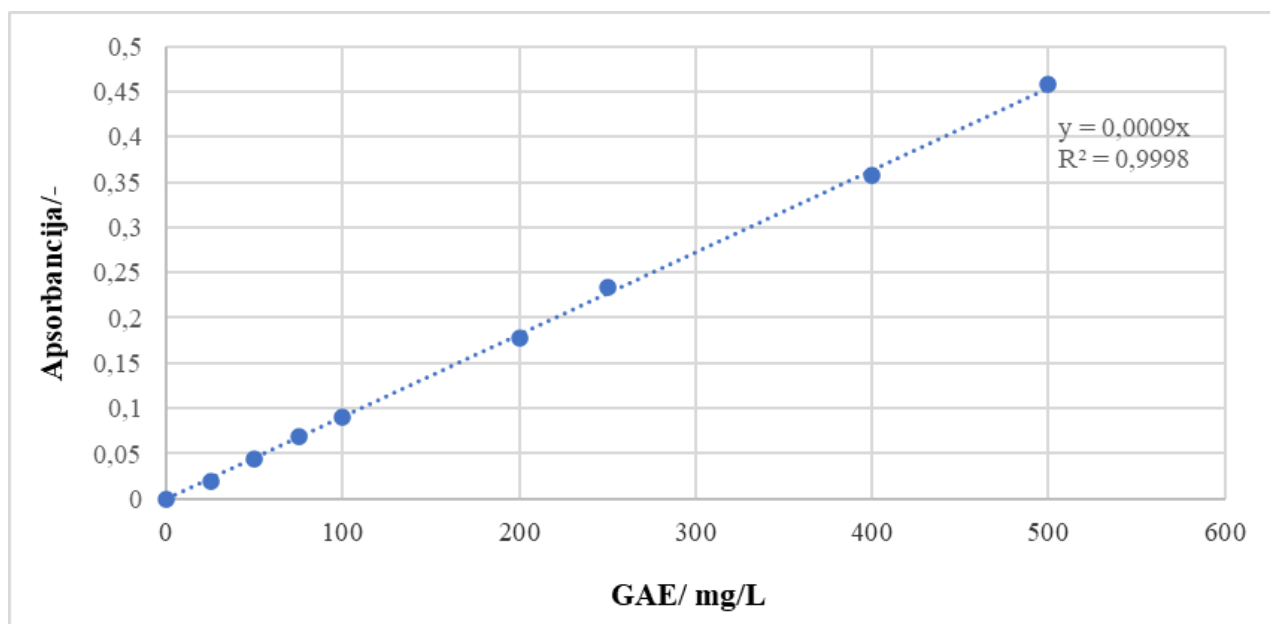
### 3.2.2. Kemijske analize

#### 3.2.2.1. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin- Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i

molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 765 \text{ nm}$  i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu se otpipetira  $V = 7,9 \text{ mL}$  destilirane vode,  $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka,  $V = 500 \text{ }\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i  $V = 1,5 \text{ mL}$  20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon dodatka 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na  $\lambda = 765 \text{ nm}$ . Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži  $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$  destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Sadržaj ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima određen je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ( $\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500 \text{ mg/L}$ ) (slika 5), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari uzorka.



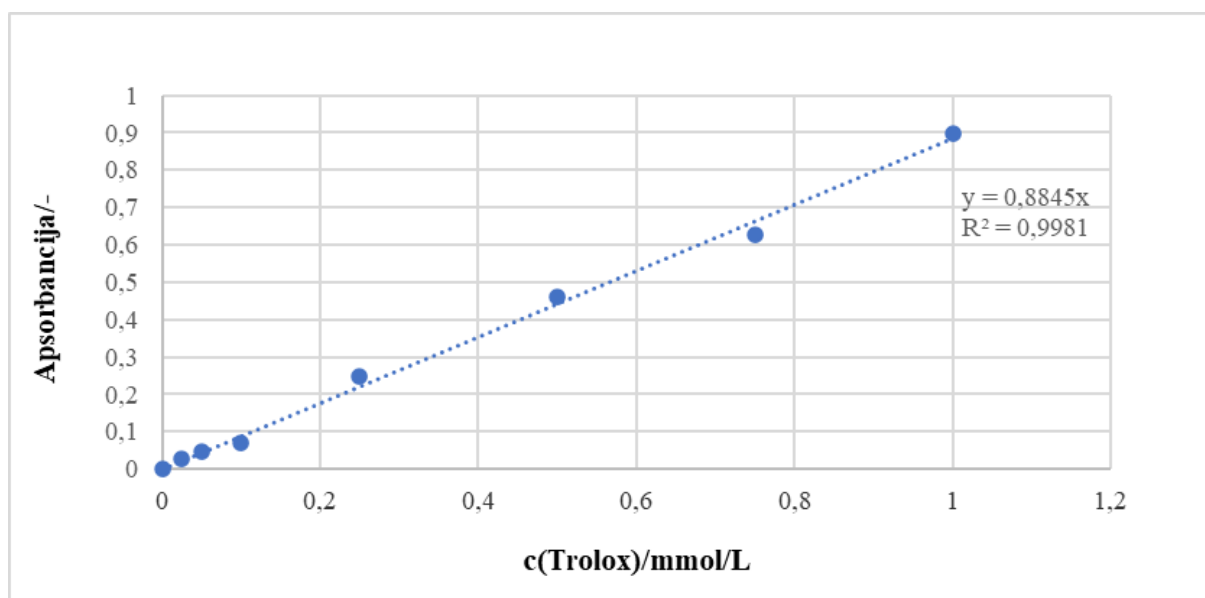
**Slika 5.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih polifenola

### 3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri

promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducentsom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

Pripremi se otopina DPPH radikala u metanolu koncentracije  $c = 0,094$  mmol/L. U epruvetu se otpipetira  $V = 100\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka te se zatim doda  $V = 3,9$  mL pripremljene otopine DPPH radikala u metanolu. Sve zajedno se dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri  $\lambda = 515$  nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija Trolox-a ( $c_{\text{Trolox}} = 0 - 1$  mmol/L), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka (slika 6). Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.



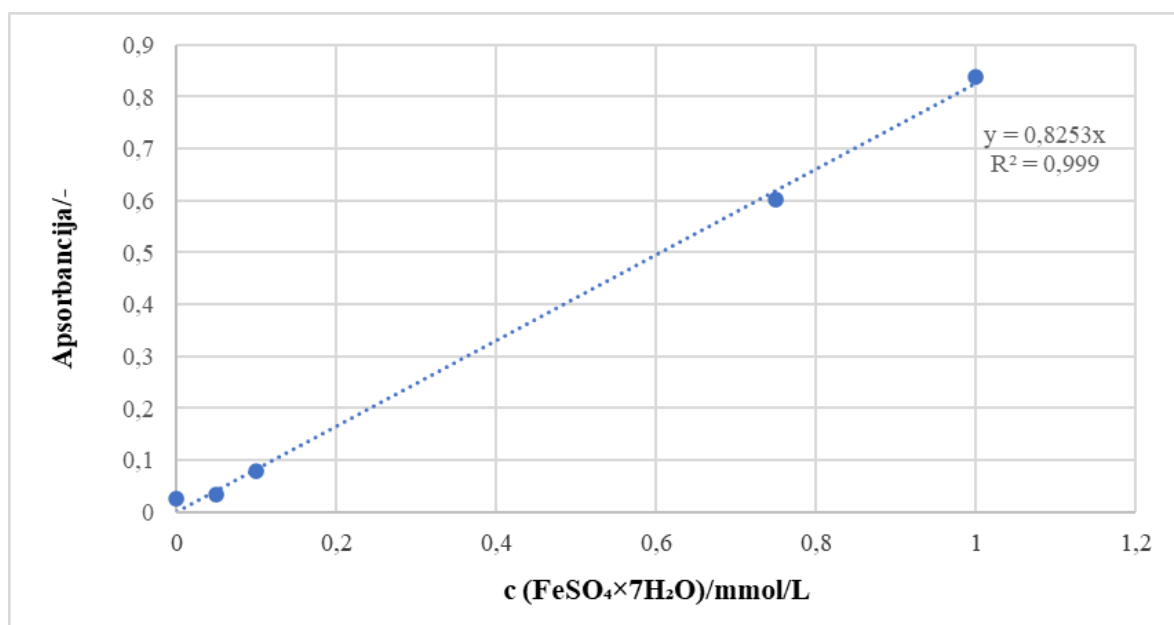
**Slika 6.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode

### 3.2.2.3. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) u fero formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri  $\lambda = 593$  nm.

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije  $c = 300$  mmol/L, otopinu TPTZ-akcentracije  $c = 10$  mmol/L te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata koncentracije  $c = 20$  mmol/L. FRAP reagens priprema se miješanjem  $V = 25$  mL acetatnog

pufera,  $V = 2,5$  mL TPTZ-a i  $V = 2,5$  mL željezo(III)-klorida-heksahidrata. U epruvetu se doda  $V = 50$   $\mu$ L ispitivanog uzorka i  $V = 950$   $\mu$ L FRAP reagensa te se izmjeri apsorbancija reakcijske smijese nakon  $t = 4$  minute. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaku količinu FRAP reagensa. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $c_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}} = 0 - 1$  mmol/L), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka (slika 7). Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode

#### 3.2.2.4. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)

NIR (eng. *Near-Infrared Spectroscopy* - bliskoinfracrvena spektroskopija) je metoda koja mjeri vrijednosti apsorbancije elektromagnetske energije uzorka u rasponu valnih duljina od 800 do 2500 nm. Za snimanje NIR spektara koristio se NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu$ m Control Development inc., Philadelphia, SAD). Sustav za snimanje NIR spektra sastoji se od računala sa instaliranim Control Development softverom Spec32, NIR-128-1.7- USB/6.25/50

µm spektrometra, monokromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i sonde koja se uroni u uzorak. Snimanje je provedeno s pripremljenim ekstraktima prahova uzoraka iz Tablice 2. Svaki uzorak najprije je homogeniziran te je zatim u njega uronjena sonda. Provedeno je 5 paralelnih mjerenja za svaki uzorak. Dobiveni spektralni podaci dalje su obrađeni pomoću PCA analize te umjetnih neuronskih mreža u programskom paketu Statistica 13 sa probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD).

### 3.2.3. Analiza glavnih komponenata i umjetne neuronske mreže

U svrhu statističke obrade podataka iz NIR spektara korištena je kemometrijska metoda analize glavnih komponenti (*engl.* principal component analysis, PCA), dobiveni podaci korišteni su za kreiranje umjetne neuronske mreže. Za obradu podataka korištena je probna verzija softvera Statistica 13 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD). PCA, odnosno analiza glavnih komponenti korištena je kako bi se izdvojile najznačajnije informacije iz opsežnog NIR spektra. Cilj PCA je konstrukcija novog koordinatnog sustava s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glavne uzroke varijacija podataka, a na taj način su podaci spektra pretvoreni u skup novih varijabli koje zovemo glavne komponente ili faktori. U ovom istraživanju cilj je bio svesti brojne podatke o fizikalnim i kemijskim svojstvima na deset glavnih komponenti. Rezultati PCA analize prikazuju se pomoću omjera dobivenih faktora. Prvi faktor uvijek objašnjava najveći dio varijance, a ostali faktori sve manji dio. U ovom slučaju prvih 10 faktora PCA analize koji objašnjavaju 99,99 % varijabilnosti u podacima korišteni su kao ulazi za umjetne neuronske mreže, a izlazni podaci neuronskih mreža bile su izmjerene vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP i DPPH metodama, ukupne polifenole te vrijeme skladištenja. Eksperimentalni podaci za treniranje, testiranje i validaciju ANN modela bili su podijeljeni u omjeru 70:15:15. Kao algoritam učenja upotrijebljen je algoritam povratnog prostiranja izlazne pogreške (*eng.* Back - Propagation Algorithm) implementiran u korištenom programskom paketu Statistica 13. Odabir optimalne neuronske mreže proveden je na temelju korijena srednje kvadratne pogreške (RMSE) i koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) određenih između eksperimentom izmjerenih vrijednosti te modelom predviđenih vrijednosti. Modeli ANN imali su zadatak predvidjeti fizikalna svojstva uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi, kao što antioksidacijske aktivnosti određene metodama FRAP i DPPH, ukupni polifenoli i vremensko razdoblje skladištenja. Za obradu podataka također je korištena probna verzija softvera Statistica 13 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD).



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog rada bio je istražiti kako dodatak različitih omjera meda i zobu utječe na vrijednost ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost kakao praha tijekom četiri, pet i šest mjeseci čuvanja na sobnoj temperaturi.

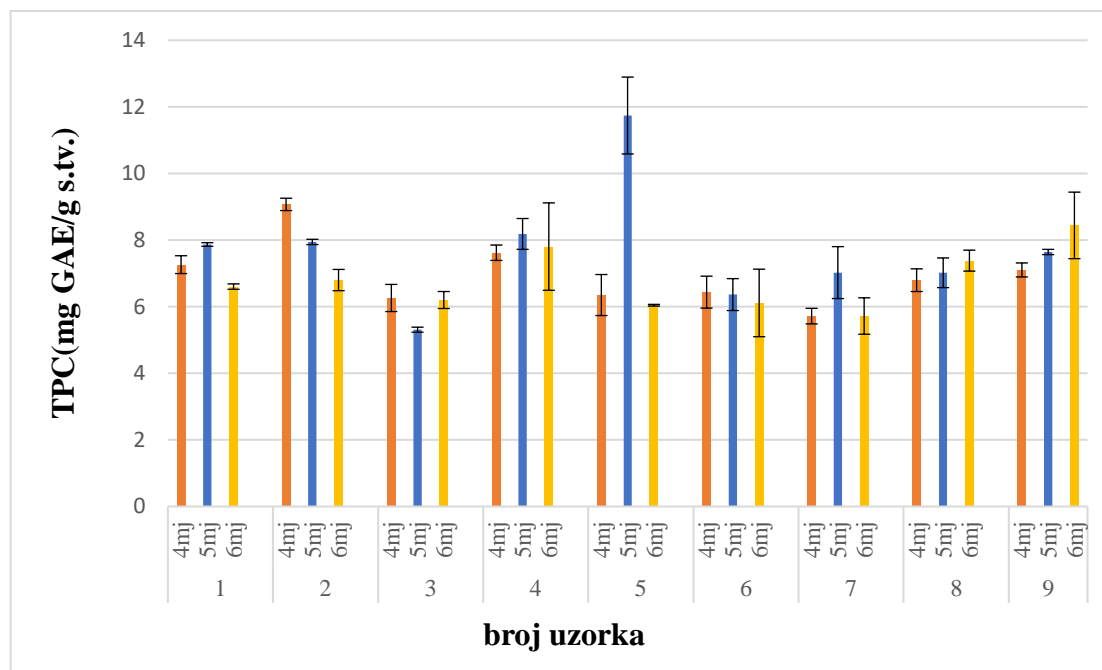
U ovom poglavlju prikazani su rezultati devet uzoraka ekstrakta kakao praha s dodatkom meda i zobu (prema omjerima u tablici 2) dobivenih sušenjem na 50 °C i ekstrakcijom na 70 °C te čuvanih 4, 5 i 6 mjeseci.

Određivana je vrijednost ukupnih polifenola te antioksidacijska aktivnosti pomoću dvije metode- DPPH i FRAP i rezultati su prikazani grafički, gdje je na slici 8 prikazana vrijednost ukupnih polifenola svih 9 uzoraka dok je na slici 9 prikazana antioksidativna aktivnost svih 9 uzoraka izmjerenih DPPH metodom, a na slici 10 antioksidativna aktivnost svih 9 uzoraka izmjerenih FRAP metodom. Sva tri grafa prikazuju 9 uzoraka nakon četiri, pet i šest mjeseci čuvanja na sobnoj temperaturi.

## 4.1. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA

### 4.1.1. Promjena koncentracija ukupnih polifenola nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja

Vrijednosti ukupnih polifenola tijekom 4, 5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka prikazani su na slici 8. Svaki uzorak ima različite omjere kakaa, zobi i meda, koji su prikazani u tablici 2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=2$ )  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 8.** Grafički prikaz koncentracija ukupnih polifenola tijekom 4, 5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka

Uzorci 2, 4, 9 sadrže jednak, a ujedno i najveći udio kakaa te iz slike 8 možemo uočiti da imaju najveću vrijednost ukupnih polifenola nakon 4 mjeseca. Od ta tri uzorka za uzorak 2 vidljivo je da ima najveću vrijednost polifenola nakon 4 mjeseca. Kod uzorka 2 koji ima najviše meda, a najmanje zobi vidljivo je da se čuvanjem tijekom 5 i 6 mjeseci vrijednost ukupnih polifenola blago smanjuje, dok za uzorak 9 možemo primijetiti da vrijednost ukupnih polifenola blago raste čuvanjem tijekom 4, 5 i 6 mjeseci. Uzorak 9 sadrži jednake omjere zobi i meda, a u odnosu na uzorak 2 sadrži manje meda, a više zobi. Iz ovog možemo zaključiti da zob pozitivno utječe na očuvanje vrijednosti polifenola kakaa praha tijekom čuvanja na sobnoj temperaturi.

Uzorci 3, 6 i 7 imaju najmanji udio kakaa, a iz slike 8 vidljivo je da imaju i najmanju vrijednost ukupnih polifenola nakon 4, 5 i 6 mjeseci čuvanja na sobnoj temperaturi. Sva tri uzorka s različitim omjerom meda i zobi pokazuju slične vrijednosti ukupnih polifenola. Uzorak 6, koji

ima jednake omjere zobi i meda, ima najveću vrijednost ukupnih polifenola tijekom 4 mjeseca, a daljnjim čuvanjem te vrijednosti blago padaju. Uzorak 7 ima najmanju vrijednost polifenola tijekom 4 i 6 mjeseci, dok nakon 5 mjeseci vidimo porast vrijednosti ukupnih polifenola. Uzorak 7 sadrži više meda te manje zobi od uzorka 6, iz čega možemo zaključiti da svojstva meda i zobi pozitivno utječu na polifenole kakao praha, ali uzorci s više meda na početku pokazuju veći porast ukupnih polifenola, ali oni čuvanjem opadaju.

Uzorci 1, 5 i 8 imaju vrijednost kakaa 6,25 g te stoga pokazuju i vrijednosti ukupnih polifenola između uzoraka s najvećim i najmanjim udjelom kakaa. Uzorci 1 i 8 pokazuju sličnu vrijednost ukupnih polifenola nakon 4 mjeseca, tijekom 5 mjeseci vrijednosti blago rastu za oba uzorka. Promjenu primjećujemo nakon 6 mjeseci gdje kod uzorka 1 (s jednakim udjelom meda i zobi) uočavamo blagi pad, a kod uzorka 8 (s većim udjelom zobi i manjim meda) uočavamo blagi porast vrijednosti ukupnih polifenola. Za uzorak 5 primjećujemo odstupanje, odnosno neočekivani porast vrijednosti nakon 5 mjeseci u odnosu na 4 i 6 mjeseci. Uzrok tako visoke koncentracije može biti kontaminacija uzoraka ili greška pri mjerenju na spektrofotometru ili greška prilikom pripreme uzoraka.

Na kraju možemo zaključiti da kakao najviše utječe na vrijednost ukupnih polifenola. Uzorci s najvećim udjelom kakaa pokazuju najveće vrijednosti, dok uzorci s najmanje kakaa pokazuju najmanje vrijednosti ukupnih polifenola. Dodatak meda i zobi pozitivno utječe na očuvanje ukupnih polifenola u uzorcima. Uzorci s većim udjelom meda pokazuju blagi pad vrijednosti tijekom čuvanja što je i očekivano, ali ta vrijednost je i dalje poprilično visoka nakon 6 mjeseci. U usporedbi s uzorcima s više meda uzorci s većim udjelom zobi pokazuju malo bolje očuvanje vrijednosti polifenola tijekom 4,5, i 6 mjeseci, ali razlike u tim vrijednostima nisu velike.

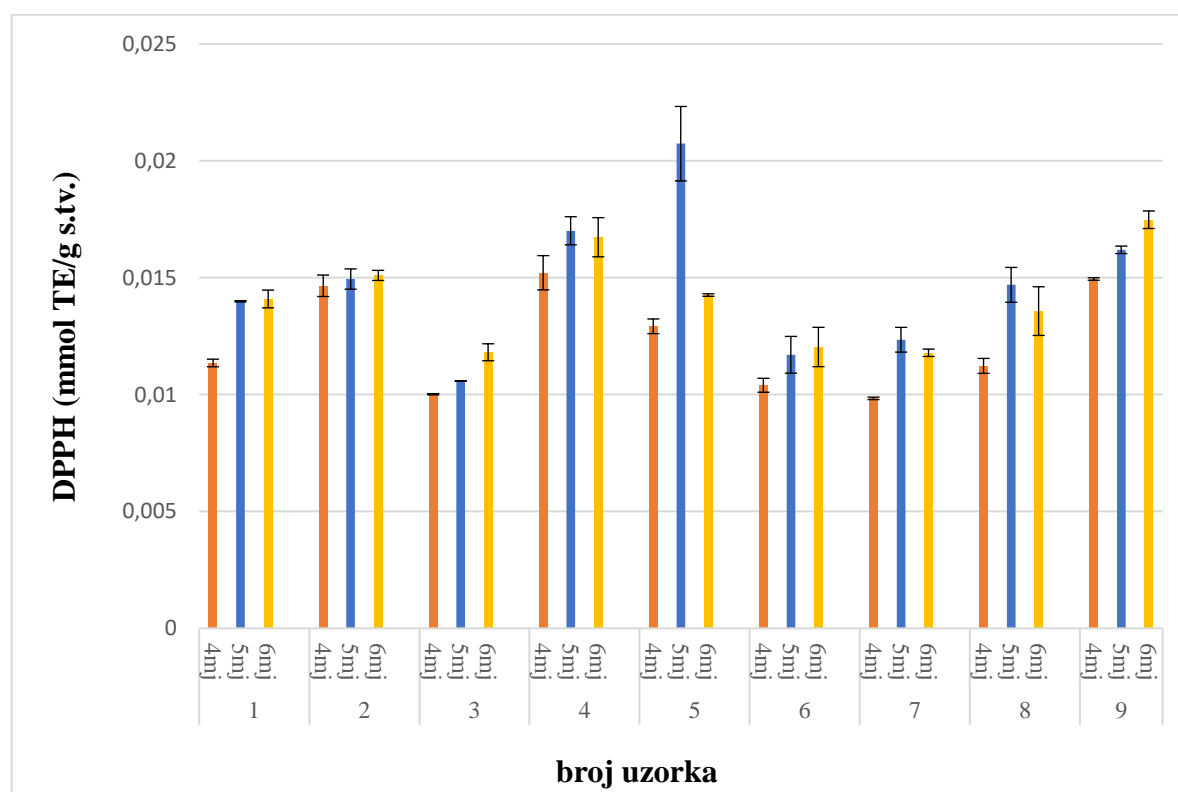
U radu Brčanovića (2013) određivala se vrijednost ukupnih polifenola 5 uzorka kakao praha. Ukupni polifenoli izmjereni su spektrofotometrijski na 760 nm nakon reakcije s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, a kao standard korištena je galna kiselina, a rezultati su izraženi u miligramima galne kiseline (GAE) po gramu uzorka. Rezultati su varirali od 3,82 do 36,87 mg GAE /g iz čega je zaključeno da vrsta kakao praha najviše utječe na sadržaj ukupnih polifenola.

Obogaćivanje kakao praha je postupak dodatka novih nutrijenata ili komponenti koji nisu normalno prisutni u proizvodu. Provela su se razna istraživanja obogaćivanja instant kakao proizvoda s raznim biljnim ekstraktima (menta, industrijska konoplja, lavanda). Talan (2019)

provodio je istraživanje obogaćivanja kakao praha s industrijskom konopljom. Udjel ukupnih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a dobiveni rezultati udjela ukupnih polifenola izraženi su u miligramima galne kiseline po gramu ekstrakta (mg GAE/ g ekstrakta) s različitim koncentracijama i obliku dodanog ekstrakta (tekući, mikroinkapsulirani) te čistim ekstraktima. Rezultati su varirali od 3,676 do 1,732 mg GAE/ g ekstrakta. Usporedbom s našim rezultatima primijećujemo da je sadržaj ukupnih polifenola znatno veći za uzorke kakaa s dodatkom meda i zobi. Jedan od razloga je taj što su kod uzoraka s industrijskom konopljom dodavali bjelanjci s velikim udjelom vode što je znatno smanjilo udio ukupnih polifenola. Zaključeno je da što je više kakao praha to će sadržaj ukupnih polifenola, ali i antioksidacijske aktivnosti biti veći.

#### 4.1.2. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tijekom 4,5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka prikazani su na slici 9. Svaki uzorak ima različite omjere kakaa, zobi i meda, koji su prikazani u tablici 2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=2$ )  $\pm$  standardna devijacija



**Slika 9.** Grafički prikaz vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tijekom 4, 5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka.

Uzorci 2, 4 i 9 sadrže najveći udio kakaa i očekivano pokazuju i najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti koje s vremenom ostaju slične ili blago rastu. Početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti je za sva 3 uzorka slična, a kod uzorka 2 je najmanja, dok je kod uzorka 4 najveća. Uzorak 2, koji ima manji udio zobi, a veći meda pokazuje najmanju antioksidacijsku aktivnost za sve mjesece, ali ta vrijednost blago raste čuvanjem. Za uzorak 9 koji sadrži jednake omjere meda i zobi možemo primijetiti da antioksidacijska aktivnost jednoliko raste tijekom čuvanja 4, 5 i 6 mjeseca te je nakon 6 mjeseci ta vrijednost najveća u usporedbi s uzorcima 2 i 4.

Iz slike 9 primjećujemo da uzorci 3, 6 i 7 koji sadrže najmanji udio kakaa pokazuju najmanju antioksidacijsku aktivnost. Uzorak 6, koji sadrži jednake omjere meda i zobi, pokazuje najveću vrijednost na početku nakon 4 i na kraju nakon 6 mjeseci iz čega možemo zaključiti da kombinacija zobi i meda utječe na povećanje i očuvanje antioksidativnih svojstava kakao praha. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzorka 7, koji sadrži više meda, a manje zobi, nakon 4 i nakon 6 mjeseci su najmanje u usporedbi s druga dva uzorka. Tijekom pet mjeseci primjećujemo blagi porast tih vrijednosti, međutim ta vrijednost se smanjuje tijekom šestog mjeseca. Iz ovog možemo zaključiti da veći omjer meda, a manji zobi, utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti, ali očuvanje tih vrijednosti je nešto lošije nego kod uzorka s jednakim omjerom meda i zobi i uzorkom s većim omjerom zobi, a manjim meda.

Uzorci 1, 5 i 8 sa srednjom vrijednosti kakao praha očekivano pokazuju vrijednosti antioksidacijske aktivnosti između uzoraka s većim i manjim udjelom kakaa. Svi uzorci pokazuju porast vrijednosti nakon pet mjeseci, ali tijekom šest mjeseci pokazuju jednake ili manje vrijednosti, ali te vrijednosti su i dalje visoke. Kod uzorka 5 primjećujemo neočekivano veliku vrijednost, a uzrok takvom odstupanju bi mogla biti kontaminacija uzorka, pogreške pri izvođenju eksperimenta ili odstupanja mjernih uređaja.

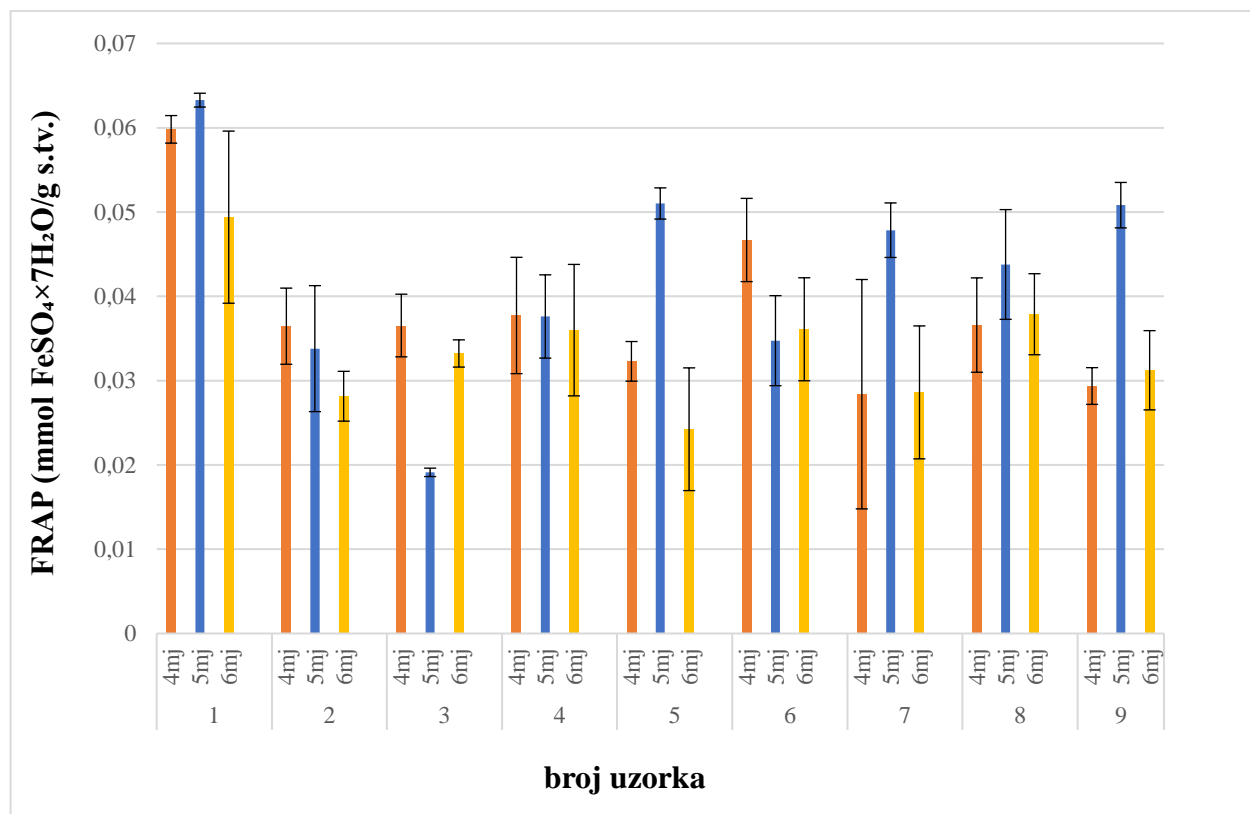
Brcanović (2013) ju u svojem radu pomoću DPPH metode određivala antioksidacijsku aktivnost 5 različitih uzoraka kakaa s tržišta i uspoređivala s mliječnom i tamnom čokoladom. Rezultati se izražavaju kao  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka te su varijanti za kakao prahove varirali između 11,65 i 32,01  $\mu\text{mol}$  (0,01165-0,03201 mmol). U usporedbi s našim rezultatima samo dva uzorka kakao praha pokazala dosta veće vrijednost antioksidacijske aktivnosti, što znači da bi promjenom vrste kakao praha mogli dobiti još bolje rezultate.

Antioksidacijska aktivnosti kakao praha pokazala se nešto boljom od tamne čokolade, dok se znatno razlikuje od vrijednosti za mliječnu čokoladu.

Kao što je rečeno u prethodnom poglavlju Talan (2019) provodio je istraživanje obogaćivanja kakao praha s industrijskom konopljom. Određivao je antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom, a rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol}$  ekvivalent Trolox-a po gramu ekstrakta te su varirali između 5,690 i 12,542  $\mu\text{mol}$  Trolox/g ekstrakta. Kao i kod ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost kod kakaa s dodatkom meda i zobi pokazala se znatno većom zbog istih razloga.

#### 4.1.3. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom tijekom 4, 5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka prikazani su na slici 10. Svaki uzorak ima različite omjere kakaa, zobi i meda, koji su prikazani u tablici 2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=2$ )  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 10.** Grafički prikaz vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom tijekom 4, 5 i 6 mjeseci za svih 9 uzoraka

Za razliku od prethodne dvije metode gdje uzorci s najviše kakaa pokazuju najveću koncentraciju polifenola te najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ovi rezultati pokazuju velika odstupanja. U ovom slučaju najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti nakon sva tri mjeseca pokazuje uzorak sa srednjom vrijednosti kakaa te jednakim udjelima meda i zobi. Dok najmanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon 4 i 6 mjeseci pokazuje uzorak broj 7 s najmanjim udjelom kakaa te većim udjelom zobi te manjim kakaa, što se poklapa s vrijednostima antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom. Kod nekoliko uzoraka tijekom 5 mjeseci primijećujemo neočekivano velike vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, a uzrok bi mogla biti kontaminacija uzorka, pogreške pri izvođenju eksperimenta ili odstupanja mjernih uređaja, ali i nedostaci same FRAP metode. Pulido i sur. (2000) izvijestili su da rezultati FRAP-a mogu varirati ovisno o promatranom vremenu analize za reakciju između antioksidansa i  $\text{Fe}^{3+}$ , koje može biti u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati. Stoga krajnji rezultat možda neće predstavljati potpunu reakciju, jer različiti antioksidansi zahtijevaju različita vremena reakcije za detekciju. Metoda ima svoja ograničenja, posebice u mjerenjima pod nefiziološkim pH vrijednostima. Bitno je da se FRAP test provodi u kiselim pH uvjetima ( $\text{pH} = 3,6$ ) kako bi se održala topljivost željeza. Reakcija pri niskom pH smanjuje ionizacijski potencijal koji pokreće prijenos elektrona i povećava redoks potencijal. Što znači da je zbog male promjene u pH moglo doći do odstupanja u rezultatima.

Pomoću FRAP metode u svojem radu Brčanović (2013) je mjerila antioksidacijsku aktivnost 5 različitih vrsta kakaa. FRAP vrijednosti su izražene kao mikromol ekvivalenta  $\text{Fe}^{2+}$  po gramu uzorka. Analizirani uzorci imali su visok antioksidativni kapacitet, koji je jako varirao, najmanji je iznosio 22,45 dok su svi ostali bili između 78,34 i 137,54  $\mu\text{mol/g}$ . U usporedbi s ovim rezultatima svi naši uzorci pokazivali su veće vrijednosti od 22,45  $\mu\text{mol/g}$ , ali manje od 137,54  $\mu\text{mol/g}$ , što znači da bi se na tržištu mogao pronaći i bolji kakao s kojim bi se moglo dobiti bolje rezultate.

#### 4.1.4. Korelacijske matrice

Korelacijske matrice upotrebljavaju se zbog lakšeg razmatranja povezanosti fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi. U tablici 3 prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije između udjela kakaa, zobi, meda, koncentracije ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom te antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Iz tablice 3 možemo uočiti da udio kakaa pozitivno

korelira sa svim karakteristikama osim s koncentracijama antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom nakon 4 i 6 mjeseci skladištenja. Za razliku od udjela kakaa, udio zobi negativno korelira s koncentracijom ukupnih polifenola i koncentracijama antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom nakon 4 i 5 mjeseci skladištenja. Negativnu korelaciju udjela meda primijećujemo nakon 6 mjeseci kod koncentracija antioksidacijske aktivnosti određenih FRAP i DPPH metodama i koncentracija ukupnih polifenola.

Isto tako možemo vidjeti da koncentracija antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom nakon 5 mjeseci pozitivno korelira sa svim karakteristikama osim s udjelom zobi i s koncentracijom ukupnih polifenola nakon 4 mjeseci skladištenja. Nadalje, koncentracije antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom nakon 4 i 6 mjeseci negativno koreliraju s većinom karakteristika, kao što su udio meda i kakaa te koncentracija antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tijekom svih mjeseci te s koncentracijom ukupnih polifenola nakon 6 mjeseci.

Koncentracija ukupnih polifenola nakon 4 mjeseci skladištenja također pozitivno korelira sa svim karakteristikama osim s udjelom zobi i koncentracijom antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom nakon 5 mjeseci skladištenja.

Kod svih koncentracija antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tijekom 4, 5 i 6 mjeseci primijećujemo pozitivnu korelaciju, osim s udjelom zobi i kod koncentracija antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom tijekom 4 i 6 mjeseci. U tablici 3 su podebljani svi statistički signifikantni koeficijenti korelacije.

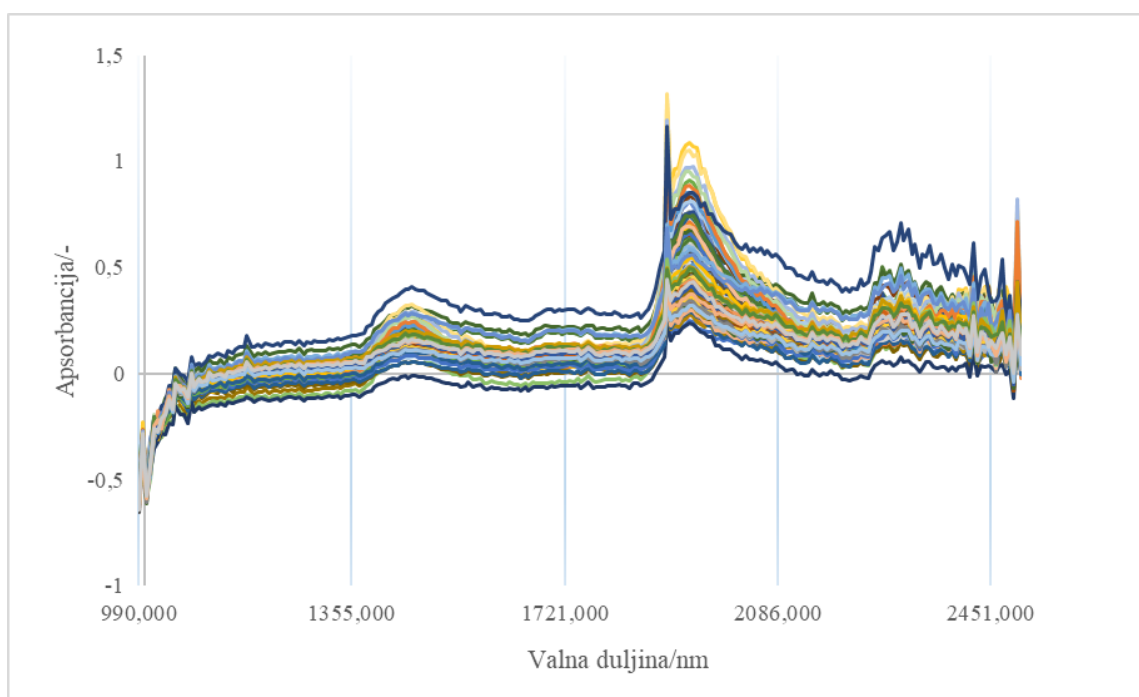


**Tablica 3.** Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika uzoraka kakao praha s dodatkom zobi i meda

	Med	Zob	Kakao	UF 50°C - 4. mj.	UF 50°C - 5. mj.	UF 50°C - 6. mj.	DPPH 50°C - 4. mj.	DPPH 50°C - 5. mj.	DPPH 50°C - 6. mj.	FRAP 50°C - 4. mj.	FRAP 50°C - 5. mj.	FRAP 50°C - 6. mj.
Med	1,00000	-1,00000	0,00000	0,06767	0,50525	-0,44711	0,06342	0,26874	-0,06742	-0,20354	0,36262	-0,51556
Zob	-1,00000	1,00000	0,00000	-0,06767	-0,50525	0,44711	-0,06342	-0,26874	0,06742	0,20354	-0,36262	0,51556
Kakao	0,00000	0,00000	1,00000	0,79067	0,41377	0,79349	0,95988	0,63273	0,95056	-0,11961	0,23142	-0,05032
UF 50°C - 4. mj.	0,06767	-0,06767	0,79067	1,00000	0,12468	0,46400	0,72316	0,23626	0,60500	0,18441	-0,05784	0,08197
UF 50°C - 5. mj.	0,50525	-0,50525	0,41377	0,12468	1,00000	-0,00102	0,47034	0,93454	0,41183	-0,14536	0,52242	-0,35897
UF 50°C - 6. mj.	-0,44711	0,44711	0,79349	0,46400	-0,00102	1,00000	0,73196	0,32977	0,86175	-0,14021	0,13412	0,16710
DPPH 50°C	0,06342	-0,06342	0,95988	0,72316	0,47034	0,73196	1,00000	0,67734	0,94777	-0,23135	0,11828	-0,22690
4. mj.	0,26874	-0,26874	0,63273	0,23626	0,93454	0,32977	0,67734	1,00000	0,65175	-0,25524	0,45179	-0,33998
5. mj.	-0,06742	0,06742	0,95056	0,60500	0,41183	0,86175	0,94777	0,65175	1,00000	-0,14951	0,30197	-0,03099
6. mj.	-0,20354	0,20354	-0,11961	0,18441	-0,14536	-0,14021	-0,23135	-0,25524	-0,14951	1,00000	0,26232	0,86150
FRAP 50°C	0,36262	-0,36262	0,23142	-0,05784	0,52242	0,13412	0,11828	0,45179	0,30197	0,26232	1,00000	0,31118
4. mj.	-0,51556	0,51556	-0,05032	0,08197	-0,35897	0,16710	-0,22690	-0,33998	-0,03099	0,86150	0,31118	1,00000
5. mj.	-0,51556	0,51556	-0,05032	0,08197	-0,35897	0,16710	-0,22690	-0,33998	-0,03099	0,86150	0,31118	1,00000
FRAP 50°C	-0,51556	0,51556	-0,05032	0,08197	-0,35897	0,16710	-0,22690	-0,33998	-0,03099	0,86150	0,31118	1,00000
6. mj.												

#### 4.5. NIR SPEKTROSKOPIJA I ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

NIR spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja na valnim duljinama u rasponu od 780 do 2500 nm. Kvalitativne i kvantitativne informacije koje nastaju posljedica su interakcije elektromagnetskih valova u blizini infracrvenog spektra sa sastavnicama uzorka. (Blanco i Villarroya, 2002). Analize snimljenih NIR spektara provele su se pomoću multivarijatne analize, odnosno kemometrija i umjetnih neuronskih mreža. Dobiveni spektri iz NIR spektroskopije za sve ispitivane uzorke prikazani su na slici 11. Na slici 11 možemo uočiti da spektri pokazuju značajno preklapanje i veliku sličnost u obliku i intenzitetu. Najviše preklapajućih spektara nalazi se u području između 990 i 1100 nm te oni pokazuju da postoji područje u kojem spektri ne razlikuju. Glavna razlika u spektrima može se pronaći u području između 1355 i 2451 nm. Analiza glavnih komponenti koristi se kako bi se mogle pronaći sličnosti i razlike između uzoraka u ovom dijelu spektra, bez prethodne obrade NIR-a spektra pomoću PCA metode.



**Slika 11.** NIR spektri svih uzoraka kakao praha s dodatkom zobi i meda

Analiza glavnih komponenti (PCA) je matematički algoritam koji smanjuje dimenzionalnost podataka zadržavajući većinu varijacija u skupu podataka. To smanjenje postiže se identificiranjem smjerova, koji se nazivaju glavne komponente, duž kojih je varijacija u podacima najveća. Korištenjem nekoliko komponenti, svaki uzorak može biti predstavljen s

relativno malim brojem vrijednosti umjesto vrijednostima za tisuće varijable (Ringnér, 2008). Iz glavnih komponenti računaju se „faktori“ za svaki uzorak, koji je linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka te je od relativne važnosti za model. Uzorci koji su prema određenim komponentama slični, biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju, bit će udaljeniji (Valinger i sur., 2017). Uzorci se zatim mogu grafički prikazati, što omogućuje vizualnu procjenu sličnosti i razlika između uzoraka te se može utvrditi mogu li uzorci grupirati (Ringnér, 2008).

Na slikama 12, 13, 14 i 15 prikazan je grafički 3D prikaz PCA analize prva tri faktora dobivenih snimanjem NIR spektara. S obzirom da je u dvodimenzionalnom prikazu dolazilo do poklapanja podataka, sva četiri grafa prikazali smo u trodimenzionalnom prikazu, kako bi se rezultati mogli bolje vidjeti.

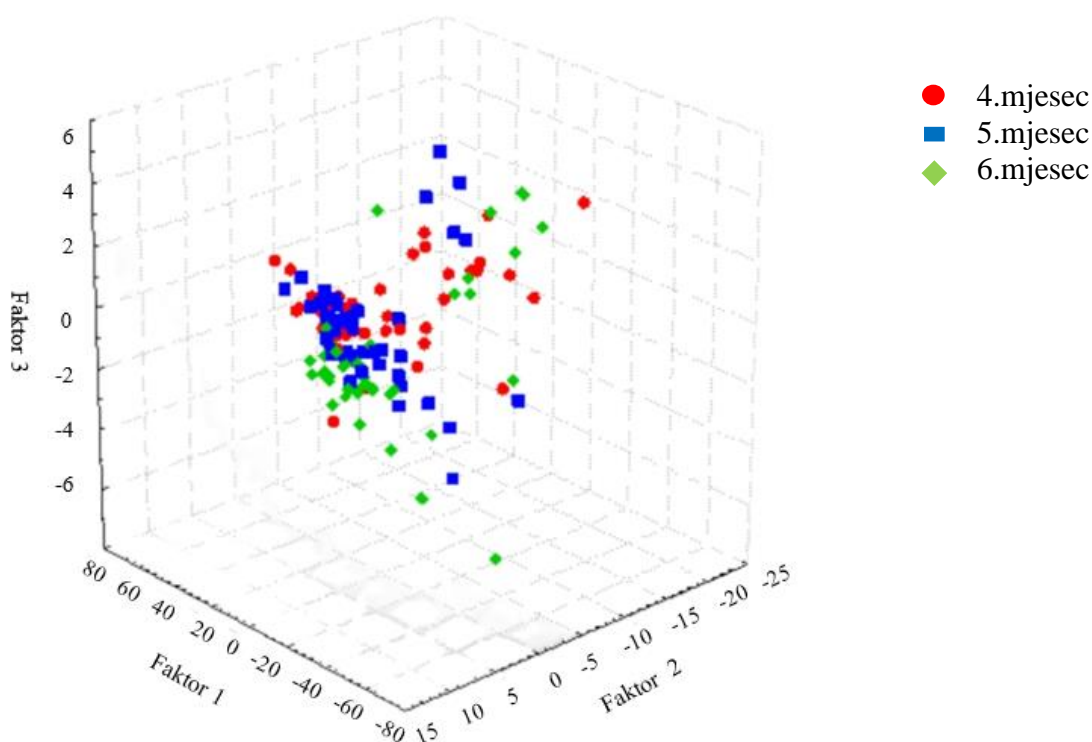
Na slici 12 prikazane su vrijednosti uzoraka nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja. Vrijednosti nakon 4 mjeseca skladištenja prikazane su crvenom bojom, nakon 5 mjeseci plavom i nakon 6 mjeseci zelenom bojom. Iako rezultati nisu idealni i dolazi do poklapanja vrijednosti tijekom svih mjeseci, ako zanemarimo točke koje jako odstupaju, ipak možemo vidjeti da se većina točaka grupira ovisno o vremenskom razdoblju skladištenja. Uzorci tijekom 4 mjeseci, koji su prikazani crvenom bojom pretežno popunjavaju sredinu grafikona. Vrijednosti tijekom 5 mjeseci, označeni plavom bojom uglavnom se nalaze relativno blizu ili ispod uzoraka tijekom 4 mjeseca. Iz toga možemo zaključiti da nije došlo do značajne promjene u svojstvima smjese tijekom 4 i 5 mjeseci skladištenja. Dok se uzorci tijekom 6 mjeseci skladištenja većinom nalaze ispod svih, što bi značilo da je došlo do značajnijih promjena nego što je bilo u prethodna dva mjeseca. Iz ovakvog prostornog rasporeda na grafikonu možemo zaključiti da dolazi do različitih kemijskih promjena uzoraka kakao praha s dodatkom meda i zobi tijekom razdoblja skladištenja, odnosno što je duže vrijeme skladištenja to su promjene smjese značajnije.

Kako bi bolje predočili rezultate, zbog dosta preklapanja rezultata i odstupanja, napravljeni su 3D prikazi PCA analize prva 3 faktora uzoraka skladištenih tijekom dva mjeseca, dobiveni snimanjem NIR spektara. Na slici 13 prikazan je trodimenzionalni prikaz tijekom 4 i 6 mjeseci čuvanja, gdje su crvenom bojom prikazani rezultati nakon 4 mjeseca, a zelenom rezultati nakon 6 mjeseci. Vidimo da je došlo do grupacije većine uzoraka, dok neki uzorci pokazuju odstupanja, koja su bila vidljiva i kod određivanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti pomoću FRAP i DPPH metoda. Većina vrijednosti tijekom 6 mjeseci skladištenja nalazi se ispod vrijednosti za 4 mjeseca, iz čega možemo zaključiti da je smjesa bila najstabilnija tijekom 4

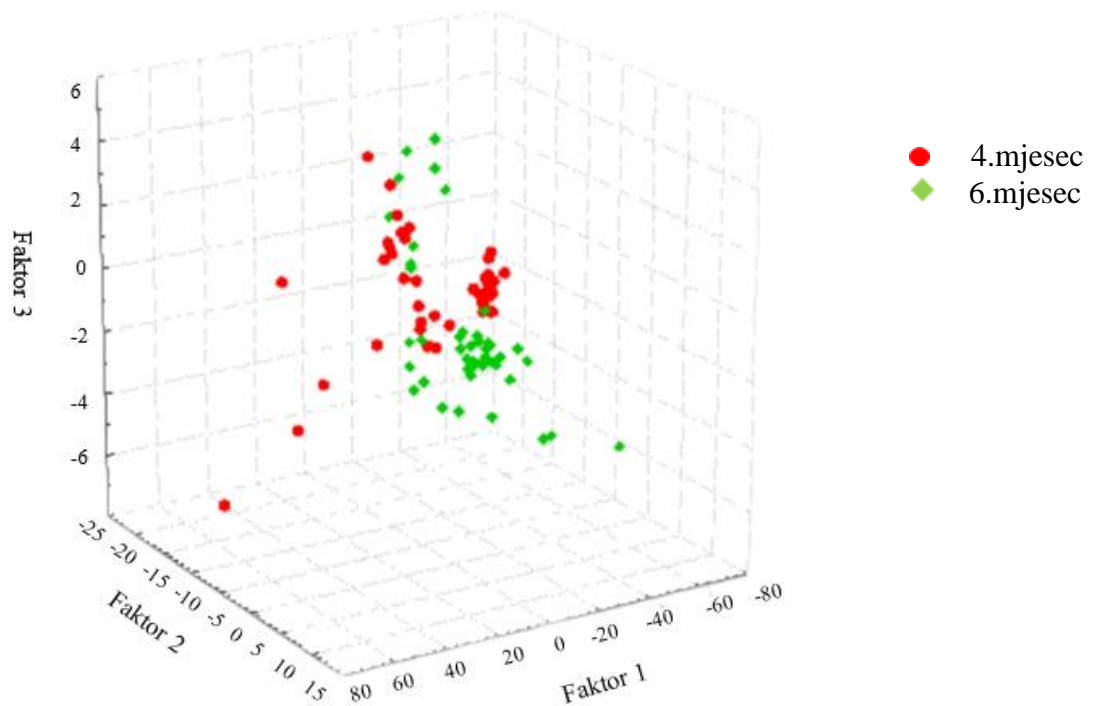
mjeseca i da su nakon toga započele promjene, koje su uočljive nakon 6 mjeseci.

Na slici 14 prikazan je trodimenzionalni prikaz tijekom 4 i 5 mjeseci, gdje su crvenom bojom prikazani rezultati za 4 mjeseca skladištenja, a plavom rezultati za 5 mjeseci. Možemo uočiti da nije došlo do potpune grupacije uzoraka, posebno za uzorke tijekom 4 mjeseca skladištenja, ali možemo vidjeti da su vrijednosti jako slične ili se poklapaju, što znači da su promjene u sastavu između ta dva mjeseca minimalne.

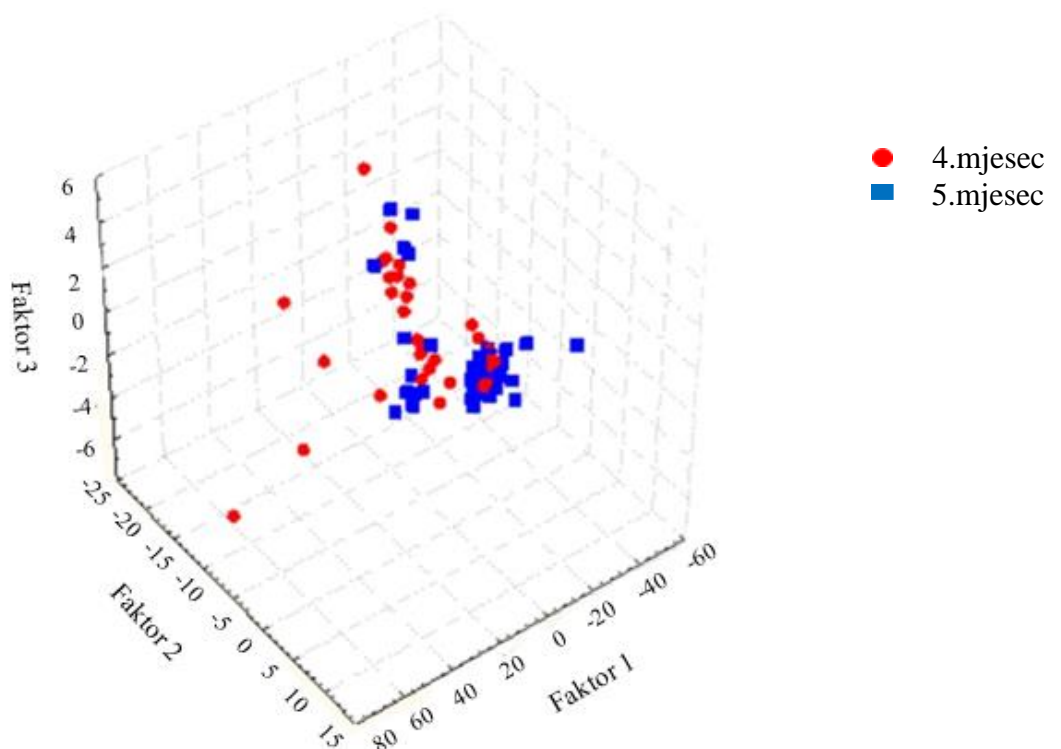
Na slici 15 prikazan je trodimenzionalni prikaz uzoraka za 5 i 6 mjeseci skladištenja, gdje je plavom bojom prikazan 5. mjesec, a zelenom bojom 6. mjesec. Ovdje vidimo malo bolje grupirane uzorke u usporedbi sa slikom 14, ali i dalje nisu u potpunosti grupirani uzorci za svaki mjesec. Možemo uočiti da se većina grupiranih uzoraka nakon 5 mjeseci skladištenja nalazi iznad uzoraka od 6 mjeseci, iz čega možemo zaključiti da do većih promjena u svojstvima dolazi tijekom dužeg razdoblja skladištenja.



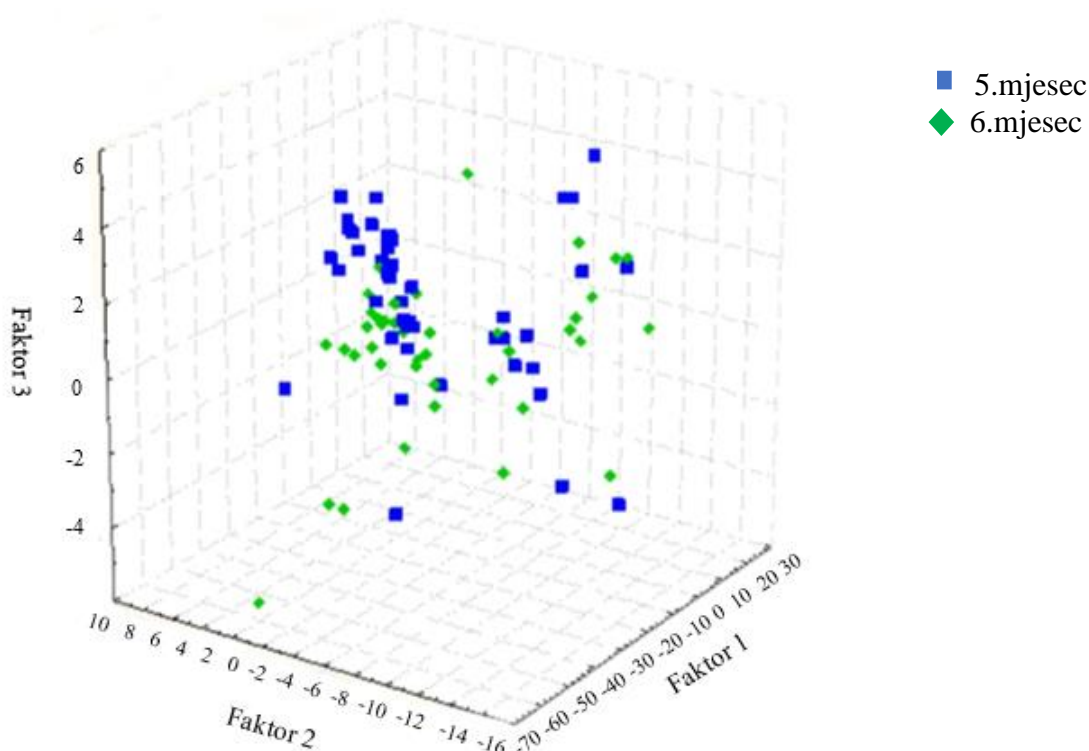
**Slika 12.** 3D prikaz PCA analize prva 3 faktora uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi skladištenih 4, 5 i 6 mjeseci iz snimljenih NIR spektara



**Slika 13.** 3D prikaz PCA analize prva 3 faktora uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi skladištenih 4 i 6 mjeseci iz snimljenih NIR spektara



**Slika 14.** 3D prikaz PCA analize prva 3 faktora uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi skladištenih 4 i 5 mjeseci iz snimljenih NIR spektara



**Slika 15.** 3D prikaz PCA analize prva 3 faktora uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi skladištenih 5 i 6 mjeseci iz snimanjenih NIR spektara

#### **4.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE ZA PREDVIĐANJE KEMIJSKIH I FIZIKALNIH SVOJSTAVA UZORAKA**

Kod neuronskih mreža potrebno je specificirati strukturu mreže, a ta specifikacija obuhvaća broj neurona u ulaznom, skrivenom i izlaznom sloju mreže. Broj neurona u ulaznom i izlaznom sloju određuje se prema broju bitnih ulaznih i izlaznih varijabli u procesu. U svrhu modeliranja, obrađeni eksperimentalni podaci dijele se u tri skupa, a to su skup za učenje, skup za testiranje i skup za validaciju. Podaci iz skupa za učenje stavljaju se u mrežu, a težinski koeficijenti kontinuirano se računaju. Za provjeru dobivenog modela služi skup za validaciju, koji je nezavisan od podatka primjenjenih pri učenju i testiranju (Bolf i Jerbić, 2006).

U svrhu predviđanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te vremena skladištenja razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža. U tablici 4 prikazane su karakteristike razvijениh mreža za simultano predviđanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te vremena skladištenja kod uzoraka kakaa s dodatkom zobi i meda. Mreža je strukturirana na principu ulaz,

neuroni u skrivenom sloju te izlaz. Za ulaz je korišteno deset glavnih komponenti dobivenih PCA analizom koje sadrže 99,9 % fizikalnih i kemijskih svojstava, dok su za izlaze neuronskih mreža korišene 4 varijable: ukupni polifenoli, antioksidativna aktivnost dobivena pomoću DPPH i FRAP metode i vrijeme skladištenja. Najbolje su se pokazale neuronske mreže koje imaju omjer podataka 70:15:15 gdje je 70 % podataka korišteno za učenje, 15 % za testiranje i 15% za validaciju. Program je u tim omjerina nasumično odabrao koji podaci će biti korišteni za učenje, testiranje i validaciju.

**Tablica 4.** Karakteristike neuronskih mreža za predviđanje vremena skladištenja, udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom kod uzoraka kakaa s dodatkom zobi i meda

Struktura mreže	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
10-12-4	0,6716	0,5555	0,5120	0,0705	0,1040	0,0887	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
10-5-4	0,6434	0,6623	0,5308	0,0726	0,0813	0,0768	Tangens hiperbolni	Logistička funkcija
10-8-4	0,7115	0,6601	0,5130	0,0647	0,0927	0,0955	Tangens hiperbolni	Eksponencijalna funkcija
10-10-4	0,7055	0,5990	0,4926	0,0660	0,0865	0,1097	Tangens hiperbolni	Tangens hiperbolni
10-11-4	0,7749	0,6282	0,5151	0,0540	0,0975	0,1417	Eksponencijalna funkcija	Funkcija identiteta

Od 200 razvijenih neuronskih mreža odabrano je 5 najboljih prikazanih u tablici 4 na temelju najviših vrijednosti za preciznost učenja, testiranja i validacije, uz najmanje pogreške. U tablici 4 crvenom bojom prikazana je neuronska mreža 10-5-4 sa skrivenom tangens hiperbolnom funkcijom i izlaznom logističkom funkcijom. Ova neuronska mreža je odabrana kao najbolja od svih 5 na temelju najmanjih pogrešaka te najvećih  $R^2$  vrijednosti za učenje, testiranje i validaciju koje su iznosile 0,6434, 0,6623 i 0,5308. Može se zaključiti da je odabrana mreža najpouzdanija i najpreciznija od svih 5 za predviđanje kemijskih fizikalnih svojstava uzoraka kakao praha s dodatkom meda i zobi. Kada promatramo arhitekturu mreže možemo uočiti da odabrana mreža ima najmanji broj skrivenih neurona, koji iznosi 5, što pokazuje stabilnost mreže jer je poželjno imati što manje neurona u skrivenom sloju da bi se povezali podaci ulaza s izlazom i predvidjeli rezultati.

**Tablica 5.** Analiza rezultata predviđanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te vremena skladištenja uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi na osnovu neuronske mreže 10-5-4

<b>ANN-10-5-4</b>			
<b>VARIJABLA</b>	<b>PRECIZNOST UČENJA</b>	<b>PRECIZNOST TESTIRANJA</b>	<b>PRECIZNOST VALIDACIJE</b>
<b>POLIFENOLI</b>	0,6323	0,8016	0,5183
<b>DPPH</b>	0,6416	0,6914	0,4937
<b>FRAP</b>	0,4293	0,3410	0,2462
<b>MJESEC SKLADIŠTENJA</b>	0,8703	0,8154	0,8649

U tablici 5 prikazan je detaljniji prikaz rezultata predviđanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te vremena skladištenja uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi na osnovu neuronske mreže 10-5-4, koja se pokazala najboljom. Na ovaj način možemo vidjeti koliko dobro odabrana neuronska mreža može predvidjeti vrijednosti ukupnih polifenola, antioksidativnu aktivnost i vrijeme skladištenja. Na temelju najvećeg koeficijenta determinacije možemo zaključiti da korištena neuronska mreža najbolje predviđa vrijeme skladištenja. Varijabla koju je vrlo teško predvidjeti (pomoću ANN 10-5-4), zbog jako malog koeficijenta determinacije je vrijednost antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom.

Model koji ima  $R^2$  vrijednost veću od 0,90 dobro opisuje podatke te se može koristiti za kvantifikaciju. Vrijednosti između 0,70 i 0,90 ukazuju na to da se modeli mogu smatrati prilično preciznima za kvantifikaciju, a vrijednosti ispod 0,70 ukazuju na to da model može samo kvalitativno razlikovati uzorke bez mogućnosti korištenja u kvantitativnom predviđanju (Mustafa i Turner, 2011). Što bi u našem slučaju značilo da se NIR spektroskopija uz korištenje PCA analize pokazala vrlo efikasnom za kreiranje dobrog modela umjetnih neuronskih mreža koji se može koristiti za poprilično precizno predviđanje vremena skladištenja.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. Koncentracija ukupnih polifenola i antioksidajska aktivnost određena DPPH i FRAP metodama raste s povećanjem udjela kakaa u uzorku.
2. Udiol meda i zobi u uzorku ne pokazuje toliki utjecaj na antioksidacijsku aktivnost i ukupne polifenole kao kakao.
3. Koncentracija ukupnih polifenola za većinu uzoraka pada s povećanjem vremena skladištenja.
5. Tijekom 4 i 6 mjeseci skladištenja vidljivo je da antioksidacijska aktivnost određena FRAP i DPPH metodom ima tendenciju laganog pada.
6. Analiza glavnih komponenti NIR spektara uzoraka nije uspjela u potpunosti razdvojiti uzorke ekstrakta kakao praha s dodatkom meda i zobi nakon 4,5 i 6. mjeseci skladištenja na sobnoj temperaturi.
7. Prilikom predviđanja fizikalnih i kemijskih svojstava pomoću umjetnih neuronskih mreža, najveća preciznost uočena je za predviđanje vremena skladištenja uzoraka, stoga bi se ova metoda mogla upotrijebiti za poprilično precizno predviđanje vremena skladištenja uzoraka kakaa s dodatkom meda i zobi.

## 6.LITERATURA

Abdi H, Williams LJ, (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip Rev ComputStat* **2**, 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7915-7922. doi:10.1073/pnas.90.17.7915

Aprotosoai AC, Luca SV, Miron A (2015) Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products- An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **15**, 73-91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>Citations: 263

Attard E (2013) A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sci* **8**, 48-53. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0107-3>

Bendelja I, Valinger D, Jurina T, Jurinjak Tušek A, Gajdoš Kljusurić J, Benković M (2019) Influence of Particle Size on UV-VIS and NIR Spectra of Aqueous Extracts of Plants from Lamiaceae Family. *J Hyg Eng Des* **27**, 61-68.

Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292

Bertazzo A, Comai S, Mangiarini F, Chen S (2012) Composition of Cacao Beans. *Chocolate in Health and Nutrition*, 7.izd., Humana Press, Totowa, str. 105–117.

Blanco M, Villarroya I (2002) NIR Spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends Analyt Chem* **21**, 240-250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)

Borchers AT, Keen CL, Hannum SM, Gershwin ME (2000) Cocoa and chocolate: composition, bioavailability, and health implications. *J Med Food* **3**, 77-103. <https://doi.org/10.1089/109662000416285>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt -Food Sci Technol* **28**, 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Dimberg LH, Theander O, Lingnert H (1993) Avenanthramides da group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chem* **70**, 637–641.

Đulović A (2014) Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze (diplomski rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS (2012) Honey: A Novel Antioxidant. *Mol* **17**, 4400-4423. <https://doi.org/10.3390/molecules17044400>

Héberger K (2008) Chemoinformatics–multivariate mathematical–statistical methods for data evaluation. U: Vekey K, Telekes A, Vertes A.(ured.) Medical Application of Mass Spectrometry. 1. izd, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, str. 141-169.

Jednačak T, Novak P (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem Ind* **62**, 71-80. <https://hrcak.srce.hr/98107>

Komes D (2008) Tehnologija konditorskih proizvoda. Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Zagreb.

Liu L, Zubik L, Collins FW, Marko M, Meydani M (2004) The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis* **175**, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.044>

Mandić V (2017) Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jono S, Leqy PJ, Smeyers-Verbeke J (1997) Handbook of chemometrics and qualimetrics, A i B, Amsterdam

Meda A, Lamien CE, Millogo J, Romito M, Nacoulma OG (2005) Physicochemical analyses of Burkina Fasan honey. *Acta Vet Brno* **74**, 147-152. <https://doi.org/10.2754/avb200574010147>

Miller JN, Miller JC (2000) Statistic and chemometric for analytical chemistry, 4.izd, Pearson Education Limited, Harlow.

Moharram H A, Youssef MM (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Food Sci Technol* **11**, 31-42. doi:10.12816/0025348

Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn J Sci Technol* **26**, 211-219.

Osborne BG (2006) Near-infrared spectroscopy in food analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. BRI Australia Ltd, North Ryde, Australia

Peterson DM (2001) Oat antioxidants. *J Cereal Sci* **33**, 115–129. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0349>

Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ (2005) Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J Agric Food Chem* **53**, 2111–2117. <https://doi:10.1021/jf0488110>

Porep JU, Kammerer DR, Carle R (2015) On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends Food Sci Technol* **46**, 211-230. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.002>

Pravilnik (2005) Pravilnik o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima. *Narodne novine* 73, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_06\\_73\\_1442.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1442.html) Pristupljeno 26. kolovoza 2023.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* **48**, 3396-3402. doi:10.1021/jf9913458

Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A, Unnikrishnan VS (2013) Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J Food Sci Technol* **52**, 662–675. doi:10.1007/s13197-013-1072-1

Ringnér M (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* **26**, 303–304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>

Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA (2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* **5**, 5990. doi:10.1039/c3ay41125g

Shalaby E A, Shanab SMM (2013) Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr J Pharm Pharmacol* **7**, 529-538. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3474>

Siesler HW, Kawata S, Heise HM, Ozaki Y (2008) Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. John Wiley & Sons, Weinheim, str.636-638.

Spence JT (2006) Challenges Related to the composition of functional foods. *J Food Compos Anal* **19**, 4-6. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9_12)

Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL (2003) Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc* **103**, 215–223. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50028>

Torres-Moreno M, Torrecasana E, Sarria B, Blanch C (2015) Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem* **166**, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>

Ujević Andrijić Ž (2019) OSVJEŽIMO ZNANJE: Umjetne neuronske mreže. *Kem ind* **68**, 219-220. <https://hrcak.srce.hr/file/322233>

Ujević Andrijić Ž, Bolf N (2019) Umjetne neuronske mreže. *Kem Ind* **68**, 219-220. <https://hrcak.srce.hr/file/322233>

Valinger D, Benković M, Jurina T, Jurinjak Tušek A, Belščak-Cvitanović A, Gajdoš Kljusurić J, Bauman I (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *J process energy agric* **21**, 17-22. <https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=1821-44871701017V>

Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Marsoner GG, Hugi A (1994) In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem* **49**, 173–80. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90155-4)

Vukšić K, Maleš Ž, Verbanac D (2020) Nutritivna i ljekovita svojstva zobi (*Avena sativa* L.) s posebnim osvrtom na njene  $\beta$ -glukane. *Farm glas* **76**, 281-294. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:642325>

Wang J F, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL (2000) A dose response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* **130**, 2115–2119. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2115S>

Wollgast J, Anklam E (2000) Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health.? *Int Food Res J* **33**, 449-459. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00069-7)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANAMARIA SMETIŠKO izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis