

Ekstrakty ziarna kakaowego różnych odmian i pochodzenia geograficznego – charakterystyka i zastosowanie

STRESZCZENIE

mgr inż. Małgorzata Bojczuk

Czynniki takie jak zanieczyszczenie powietrza, niewłaściwy styl życia, złe nawyki żywieniowe, brak ruchu, czy nadmierny stres prowadzą do rozwoju ciężkich zespołów chorobowych, nazywanych chorobami cywilizacyjnymi. Należą do nich cukrzyca, otyłość, nadciśnienie, miażdżyca czy nowotwory. Badania naukowe dowodzą, iż w patogenezie tych chorób, a także wielu innych, istotną rolę odgrywają wolne rodniki. Kluczem do ochrony naszego organizmu przed skutkami stresu antyoksydacyjnego są przeciwutleniacze (antyoksydanty), dostarczane również jako element diety. Bogatym źródłem antyoksydantów, takich jak polifenole, karotenoidy, czy witaminy A, C i E, są owoce i warzywa. przeciwutleniacze występują również w niektórych zbożach, nasionach roślin (szczególnie strączkowych), przyprawach i ziołach, a także w czerwonym winie czy zielonej herbacie.

Innym przykładem niezwykle bogatego w antyoksydanty surowca są ziarna kakaowe, wykorzystywane głównie do produkcji czekolad i kakao. Ich cenne właściwości znane były już w czasach starożytnych cywilizacji, natomiast stosunkowo niedawno zyskały uznanie w branży spożywczej, kosmetycznej czy farmaceutycznej. Związki bioaktywne, obecne w znacznych stężeniach w ziarnach kakaowych odpowiadają za właściwości przeciwutleniające, przeciwrodnikowe, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwakrzepowe, przeciwnowotworowe, kardioprotekcyjne czy antyneurodegeneracyjne nie tylko samych ziaren ale także produktów jego przerobu.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie właściwości biologicznych, w tym antyoksydacyjnych, otrzymanych i utrwalonych metodą liofilizacji wodnych ekstraktów oraz wybranych frakcji związków bioaktywnych zawartych w surowych i prażonych ziarnach kakaowych różnych odmian i pochodzenia geograficznego oraz wybranych produktów żywnościowych, suplementowanych tymi ekstraktami. Następnie określono wpływ wybranych utrwalonych ekstraktów z surowych i prażonych ziaren kakaowych, frakcji monomerycznych flawan-3-oli oraz pieczywa chlebowego, wzbogaconego tymi preparatami na podstawowe parametry fizjologiczne szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową i niskobłonnikową, a także zbadano zależności pomiędzy spożyciem otrzymanych utrwalonych ekstraktów z surowych i prażonych ziaren kakaowych a stopniem eksperymentalnie wywołanego zwłóknienia wątroby i reakcji zapalnej u szczurów.

Zakres badawczy w pierwszym etapie obejmował otrzymanie preparatów polifenolowych w postaci utrwalonych sublimacyjnie wodnych wyciągów z surowych i prażonych ziaren kakaowych odmian *Forastero* (pochodzenie geograficzne: Wybrzeże Kości Słoniowej, Togo, São Tomé, Peru) oraz *Criollo* (pochodzenie geograficzne: Republika Dominikańska), uzyskanych z zastosowaniem różnych metod ekstrakcji, tj. ekstrakcji w łaźni wodnej wspomaganą wytrząsaniem (SWE), ekstrakcji w warunkach podwyższonego ciśnienia i temperatury (HPTE), ekstrakcji wspomaganą działaniem ultradźwięków (UAE), oraz ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE).

Następnie przeprowadzono rozdział związków bioaktywnych surowego oraz prażonego ziarna kakaowego za pomocą odśrodkowej chromatografii podziałowej (CPC). Dokonano podziału na następujące frakcje: związków barwnych (ziarna surowego i prażonego), katechin oraz procyanidyn.

Kolejny etap to otrzymanie pieczywa chlebowego suplementowanego ww. ekstraktami surowych i prażonych ziaren kakaowych oraz otrzymanymi z zastosowaniem techniki CPC frakcjami związków bioaktywnych (suplementacja: 1, 0,75 i 0,5%). Niższe stężenia stosowanych preparatów sprzyjały wyższej ocenie organoleptycznej chlebów. Dodatek frakcji katechin powodował ściemnienie produktu końcowego, natomiast dodatek ekstraktu ziarna prażonego obniżył walorów smakowych (pojawienie się goryczy).

Zakres badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej obejmował określenie techniką UHPLC UV/DAD stężenia związków fenolowych zawartych w wodnych ekstraktach surowego i prażonego ziarna kakaowego, otrzymanych z ziaren różnych odmian i pochodzenia geograficznego, frakcjach związków bioaktywnych, otrzymanych techniką CPC oraz suplementowanym pieczywie chlebowym. Zarówno metoda ekstrakcji jak i pochodzenie

geograficzne analizowanych ziaren kakaowych miały wpływ na skład jakościowo-ilościowy związków polifenolowych w materiale badawczym. Proces obróbki termicznej jakim jest prażenie ziaren czy wypiek (chleba) powodował częściową degradację polifenoli. Wyższa suplementacja chleba otrzymanymi w toku badań preparatami pozwoliła na zachowanie większej ilości polifenoli w wyrobie gotowym.

Dokonano także oceny aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwrodnikowej badanych ekstraktów oraz frakcji związków bioaktywnych. W tym celu zbadano zawartość polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu, zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH•, rodnika OH• i kationorodnika ABTS•+ oraz dokonano pomiaru zdolności redukcji jonów żelaza metodą FRAP. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwalają stwierdzić, że najkorzystniejszą metodą ekstrakcji ze względu na aktywność antyoksydacyjną uzyskanych preparatów jest metoda z udziałem fal o wysokiej częstotliwości oraz ultradźwięków. Natomiast najwyższą zdolność zmiatania wolnych rodników oznaczono w preparatach otrzymanych metodą z udziałem fal o wysokiej częstotliwości oraz w warunkach wytrząsania w łaźni wodnej w podwyższonej temperaturze.

Przeprowadzono także laboratoryjne badania na zwierzętach doświadczalnych (szczury). Określono wskaźniki fizjologicznej reakcji na zastosowanie w dietach szczurów ekstraktów polifenoli, otrzymanych z ziaren kakaowych. Analizowano między innymi wpływ związków antyoksydacyjnych w diecie na wzrost szczurów, aktywność wybranych enzymów kału jako wskaźników adaptacji mikroflory przewodu pokarmowego, podstawowe parametry jelita cienkiego, czy rozwój i funkcjonowanie jelita ślepego. Zasygnalizowane zmiany wskaźników funkcjonowania przewodu pokarmowego oraz wskaźniki metabolizmu, oznaczone w próbach krwi i narządów wewnętrznych szczurów wskazują na aktywność biologiczną ekstraktów polifenoli jako składników diet zwierząt. Przykładowo, obecność ekstraktu prażonego ziarna kakaowego w diecie szczurów zwiększyła całkowitą produkcję lotnych kwasów tłuszczowych. Ekstrakt z surowego ziarna korzystnie wpłynął natomiast na procentowy udział kwasu masłowego. Z drugiej strony, wyniki niektórych doświadczeń wskazują, że po stosunkowo krótkim okresie podawania diet doświadczalnych reakcja fizjologiczna zwierząt nie była dostatecznie wyraźna do statystycznego potwierdzenia różnic.

Dodatkowym aspektem prowadzonych badań było określenie wpływu ekstraktów z surowych i prażonych ziaren kakaowych na stopień zwłóknienia wątroby szczurów indukowany tioacetamidem. Marskość wątroby jest końcowym stadium bardzo wielu przewlekłych chorób tego narządu. Ich przyczyny są różne, najczęściej jest to nadużywanie alkoholu, czy przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B lub C. Marskość wątroby może

być jednak spowodowana również niektórymi nabytymi chorobami metabolicznymi, takimi jak cukrzyca czy otyłość. Dlatego też, celem prowadzonych badań jest ocena potencjalnego ochronnego działania ekstraktów ziarna kakaowego na wątrobę. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż badane ekstrakty z surowych i prażonych ziaren kakaowych odmiany *Forastero* pochodzących z Peru obecne w dietach szczurów doświadczalnych nie wykazały aktywności przeciwzwłóknieniowych ani przeciwzapalnych w przedstawionym modelu doświadczalnego zwłóknienia wątroby indukowanego przez TAA.

Ostatnim etapem pracy doktorskiej było zbadanie wpływu utrwalonych ekstraktów z surowych i prażonych ziaren kakaowych oraz frakcji monomerycznych flawan-3-oli i procyjanidyn na funkcjonowanie komórek ludzkiej hepatomy HepG2 i mysich komórek insulinomy β -TC3 jako czynników cytoochronnych przeciwko stresowi oksydacyjnemu, aktywność białkowej fosfatazy tyrozynowej PTP1B, sygnalizację wydzielania insuliny przez komórki β -tszustki i wątroby oraz akumulację lipidów w hepatocytach powodujących uszkodzenie wątroby przez tworzenie kropelek tłuszczu w tkance wątrobowej. Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakty i frakcje otrzymane z surowych i prażonych ziaren kakaowych wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną zależną od stężenia oraz struktury związków bioaktywnych występujących w tych preparatach. Zaobserwowano, że ekstrakty oraz frakcje związków barwnych z prażonych ziaren kakaowych dzięki obecności produktów reakcji Maillarda, w tym melanoidyn, wpływają korzystnie na zmniejszenie tkanki tłuszczowej, inhibicję aktywności PTP1B, zmniejszenie stłuszczenia wątroby oraz ochronę przed stresem oksydacyjnym. Stwierdzono również, że frakcja monomerycznych flawan-3-oli korzystnie wpływa na profil lipidów w surowicy oraz stosunek zredukowanego glutationu do jego utlenionej formy.