Utjecaj sastava sirovine i veličine čestica na bioaktivna svojstva ekstrakata rogača (Ceratonia siliqua l.)

Golub, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:985667

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nikolina Golub

6422/PT

UTJECAJ SASTAVA SIROVINE I VELIČINE ČESTICA NA BIOAKTIVNA SVOJSTVA EKSTRAKATA ROGAČA (*Ceratonia siliqua L.)*

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

UTJECAJ SASTAVA SIROVINE I VELIČINE ČESTICA NA BIOAKTIVNA SVOJSTVA EKSTRAKATA ROGAČA (*Ceratonia siliqua L.)*

Nikolina Golub, 6422/PT

Sažetak: Premda je tradicionalna mediteranska kultura, uzgoj i uporaba rogača (*Ceratonia siliqua L.*) posljednjih se godina kontinuirano smanjuju, no, zbog svog jedinstvenog sastava, bogatog ugljikohidratima, prehrambenim vlaknima, ali i bioaktivnim spojevima, rogač se može primijeniti kao funkcionalni sastojak u proizvodnji prehrambenih proizvoda te je potrebno popularizirati njegovu uporabu. U ovom radu ispitan je utjecaj veličine čestica mahuna rogača te prisutnost sjemenki mahuna rogača na ekstrakcijsku učinkovitost ugljikohidrata i polifenolnih spojeva. Udjeli ukupnih i topljivih ugljikohidrata i polisaharida, polifenola, flavonoida, procijanidina, tanina te antioksidacijski kapacitet određeni su spektrofotometrijski, dok je udjel pojedinačnih ugljikohidrata određen primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Analitička karakterizacija proizvedenih ekstrakata pokazala je visok udjel ukupnih ugljikohidrata (do 60%) u sastavu mahune rogača, kojeg u najvećem udjelu čini saharoza, zatim fruktoza i glukoza, dok su polisaharidi prisutni u manjem udjelu. Veličina čestica i prisutnost sjemenki u mahunama rogača imaju značajan utjecaj na udjel ugljikohidrata, ali ne utječu na udjel topljivih polisaharida. Udjel ukupnih polifenola u uzorcima rogača iznosio je oko 17,5 mg GAE/g uzorka, pri čemu je najzastupljenija skupina polifenolnih spojeva rogača skupina procijanidina. Najveći prinos polifenola određen je u najsitnijoj frakciji (<0.5 mm) uzorka, a prisutnost sjemenki u mahunama rogača rezultirala je smanjenim udjelom polifenolnih spojeva u odnosu na mahune bez sjemenki.

Ključne riječi: *rogač, veličina čestica, ekstrakcija, polifenolni antioksidansi, ugljikohidrati*
Rad sadrži: 31 stranica, 8 slika, 4 tablice, 45 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *prof.dr.sc. Draženka Komes*
Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović*

Rad predan: rujan 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products

THE EFFECT OF COMPOSITION AND PARTICLE SIZE ON BIOACTIVE PROPERTIES OF CAROB (*Ceratonia siliqua L.)* EXTRACTS

Nikolina Golub, 6422/PT

Abstract: Although carob (*Ceratonia siliqua* L.) is a traditional mediterranean plant, its cultivation and use are continuously decreasing in the past years. However, due to its unique composition, abundance in carbohydrates, dietary fibers and bioactive compounds, carob has a great potential of being used as a functional ingredient in production of food products, making it necessary to popularize its use. The aim of this study was to determine the influence of particle size and the presence of carob pod seeds on the extraction efficiency of carbohydrates and polyphenolic compounds. The contents of total carbohydrates and soluble polysaccharides, polyphenols, flavonoids, procyanidins, tannins and antioxidant capacity were determined spectrophotometrically, while individual sugars were determined by means of high performance liquid chromatography. The analytical characterization of obtained extracts revealed a high carbohydrate content (60%) of carob pods, consisting in the largest part of sucrose, followed by glucose and fructose, while polysaccharides were present in a much smaller proportion. The particle size and presence of seeds in the carob pods have a significant impact on the content of carbohydrates, but do not affect the content of soluble polysaccharides. The total polyphenol content of carob samples amounted to 17,5 mg GAE/g sample, with procynidins constituting the most abundant group of polyphenolics. The highest yield of polyphenols was determined in the smallest fraction (<0.5 mm) od carob samples, while the presence of seeds resulted in a reduced content of polyphenols in comparison to pods without seeds.

Keywords: *carob, particle size, extraction, polyphenolic antioxidants, carbohydrates*
Thesis contains: 31 pages, 8 figures, 4 tables, 45 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *PhD Draženka Komes, Full professor*
Technical support and assistance: *PhD Ana Belščak-Cvitanović, Assistant Professor*

Thesis delivered: September 2016

Sadržaj

1. UVOD..... 1
2. TEORIJSKI DIO..... 2
2.1. Podrijetlo, rasprostranjenost i uzgoj rogača..... 2
2.2. Primjena rogača u prehrambenoj industriji..... 4
2.3. Kemijski sastav ploda rogača..... 6
2.4. Bioaktivni sastav rogača..... 7
2.4.1. Ekstrakcija polifenola i utjecaj veličine čestica na njihovu ekstrakcijsku učinkovitost..... 9
3. EKSPERIMENTALNI DIO..... 10
3.1. Materijal..... 10
3.1.1. Kemikalije..... 10
3.1.2. Aparatura i pribor..... 11
3.1.3. Priprema ekstrakata iz različitih prekrupa rogača..... 11
3.2. Metode..... 12
3.2.1. Određivanje ukupnih topljivih ugljikohidrata i polisaharida..... 12
3.2.2. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-RI) 13
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola..... 13
3.2.4. Određivanje ukupnih neflavonoida..... 14
3.2.5. Određivanje ukupnih procijanidina metodom po Bate-Smithu..... 15
3.2.6. Određivanje ukupnih tanina s kazeinom..... 16
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta..... 17
3.2.7.1. DPPH metoda..... 17
3.2.7.2. ABTS metoda..... 17
4. REZULTATI..... 19
4.1. Ugljikohodratni sastav uzoraka rogača..... 20
4.2. Polifenolni sastav i antioksidacijski kapacitet uzoraka rogača..... 21
5. RASPRAVA..... 23
5.1. Udjel ugljikohidrata i polisaharida u ekstraktima rogača..... 23
5.2. Udjel saharoze, fruktoze i glukoze u ekstraktima rogača..... 23
5.3. Udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida u ekstraktima rogača..... 23
5.4. Udjel ukupnih procijanidina i tanina u ekstraktima rogača..... 24
5.5. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodom u ekstraktima rogača... 24
5.6. Korelacije..... 25
6. ZAKLJUČAK..... 26
7. LITERATURA..... 27

1. UVOD

Posljednjih godina zabilježen je intenzivan porast zanimanja potrošača i prehrambene industrije za funkcionalnim sastojcima hrane i načinom na koji oni mogu pomoći u održavanju ljudskog zdravlja. Istraživanja su pokazala da je rogač (*Ceratonia siliqua* L.) kao sirovina učinkovit u prevenciji raka debelog crijeva, snižavanju kolesterola, te u smanjenju rizika od dijabetesa tipa 2 (Nasar-Abbas i sur., 2016). Te su znanstveno utvrđene spoznaje ukazale na velik potencijal rogača u proizvodnji funkcionalne hrane, što se može pripisati njegovom bogatom nutritivnom i bioaktivnom sastavu. Mahune rogača prirodno su slatkog okusa, zbog visokog udjela šećera (većinom saharoze), čak i do 60 %, te visokog udjela prehrambenih vlakana (do 40 %) i polifenola, a niskog udjela masti koji doprinosi dugoj trajnosti proizvoda. Rogač je tradicionalna mediteranska kultura koja se od davnina koristila u prehrani ljudi i životinja. Danas služi za dobivanje različitih prehrambenih proizvoda – brašna rogača, gume sjemenki rogača, sirupa, alkohola; može se koristiti kao zamjena za kakao i kavu, dodavati kao zgušnjivač, emulgator, sredstvo za želiranje i stabilizator. Osim što je sastav ploda dobre kvalitete, stablo rogača veoma je zahvalno za uzgoj i kultivaciju, u usporedbi s drugim vrstama voća, zbog otpornosti na sušu i sposobnosti rasta na nenavodnjavanim površinama. Iako ga navedene karakteristike čine idealnom kulturom za uzgoj na području čitave Dalmacije, osobito na otocima, potencijal uzgoja i prerade rogača nije prepoznat u Hrvatskoj, a tako ni u svijetu. Stoga je potrebno podignuti svijest o toj nepravedno zapostavljenoj kulturi, provesti istraživanja o njegovom bioaktivnom sastavu i načinu njegove ugradnje u funkcionalne proizvode. Trenutno je proveden mali broj istraživanja o bioaktivnom sastavu rogača, a posebice nedostaje znanstvenih istraživanja o utjecaju dijela sirovine (mahuna bez i sa sjemenkama) i veličine čestica na ekstrakciju nutritivnih i bioaktivnih sastojaka.

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj veličine čestica na udjel ugljikohidrata i bioaktivnih spojeva rogača te utvrditi kako prisutnost sjemenki mahune rogača utječe na njihovu ekstrakcijsku učinkovitost. U tu svrhu, udjeli ukupnih ugljikohidrata, polisaharida, polifenola, neflavonoida, tanina i procijanidina određeni su primjenom spektrofotometrijskih metoda (ukupni polifenoli i neflavonoidi s Folin – Ciocalteu reagensom, udjel procijanidina metodom po Bate-Smithu i udjel tanina uz pomoć kazeina). Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su udjeli saharoze, glukoze i fruktoze. Antioksidacijski kapacitet svih dobivenih ekstrakata određeni su ABTS i DPPH metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Podrijetlo, rasprostranjenost i uzgoj rogača

Rogač (*Ceratonia siliqua L.*) je zimzeleni grm ili drvo, koje pripada porodici mahunarki (*Fabaceae*). Stablo je visine do 10 m, razgranato, širokog debla, grube smeđe kore i guste krošnje te razvija veoma snažan i razgranat korijenov sustav, koji doseže do dubljih slojeva tla u potrazi za vodom i tako produljuje aktivni period rasta tokom sušnih perioda (Rhizopoulou i Davies, 1991). Rogač se ubraja u kserofite te je kao takav dobro prilagođen na sušna područja sa siromašnim tlima (Iipumbu, 2008). Uz to rogač ne zahtijeva navodnjavanje, upotrebu gnojiva ili godišnje obrezivanje pa se često preporučuje za pošumljavanje degradiranih obalnih područja kojima prijeti erozija tla (Orwa i sur., 2009). Stablo rogača je prilagodljivo i uspijeva na različitim tipovima tla, od kamenitih do dubokih pjeskovitih, dok je idealna klima za razvoj rogača mediteranska i subtropska klima s prosječnim temperaturama od 30 – 45 °C. Međutim, stablo rogača jako je osjetljivo na mraz i temperature ispod -4 °C, stoga se ne bi trebao saditi na nadmorskoj visini većoj od 500 m ili na mjestima gdje je opasnost od mraza visoka (Battle i Tous, 1997). Prilagodljivost, lakoća uzgoja i estetska privlačnost rogača te dug životni vijek (više od 200 godina), čine ga poželjnom biljkom prilikom uređivanja javnih gradskih površina.

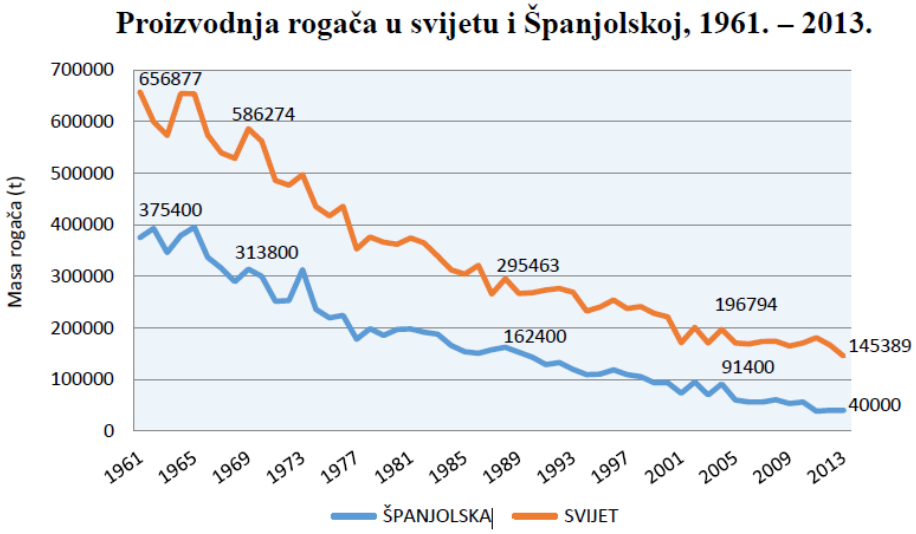
Slika 1. Mahuna rogača kroz faze rasta i sjemenke rogača (Larsen, 2007)

Smatra se da rogač potječe iz Male Azije (De Candolle, 1898), odakle su ga stari Grci doveli u Grčku i Italiju, a njegovu vrijednost prepoznali su i Arapi, koji su ga rasprostranili duž obala Sjeverne Afrike, Španjolske, Portugala i Francuske. Španjolski misionari donose rogač

u Meksiko i južnu Kaliforniju, a od sredine 19. st. počinje se uzgajati u brojnim državama na jugu SAD-a i ostalim područjima u svijetu koja imaju klimu sličnoj mediteranskoj (Battle i Tous, 1997). U Hrvatskoj je uzgoj rogača ograničen na manja područja, a najrašireniji je na području Dubrovačkog primorja, Pelješca te otoka Šipana, Lopuda i Mljeta. Osim u južnoj Dalmaciji rogač se uzgaja i na Korčuli, Lastovu, Braču,Visu, Šolti i Drveniku (Strikić i sur., 2006). U literaturi je opisano 26 svjetskih sorti rogača (Batle i Tous, 1997) dok je domaći sortiment slabo poznat; u literaturi se spominju Šipanski dugi, Komiški krupni, Moliški, Koštunac, Komiški veliki, Šipanski, Puljiški i Mekiš (Strikić i sur., 2006).

Plod rogača je 10-30 cm duga mahuna, ravnog ili zakrivljenog oblika te široka 1.5 do 3.5 cm i debela otprilike 1 cm. Mahuna rogača sastoji se od pulpe i 5-15 sjemenki poredanih u nizu (NAS, 1979). Pulpa se sastoji od vanjskog kožastog dijela (perikarpa) i mekšeg unutarnjeg sloja (mezokarpa). Na pulpu otpada 90 % ukupne mase, dok ostatak od 10 % čine sjemenke ploda rogača. Mahunu rogača karakterizira slatki okus i specifična aroma te se u prehrani stanovništva mediteranskog podneblja koristi od davnina. U prošlosti su se sjemenke rogača koristile kao jedinica za vaganje dijamanata i dragog kamenja. Smatralo se da sjemenke imaju konstantnu veličinu i masu od 200 mg, što je kasnije uzeto kao osnova za mjernu jedinicu karat: jedna sjemenka = 1 karat (zrno rogača, grč. = *keration*).

Prema službenim podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO), 2013. godine svjetska proizvodnja rogača iznosila je 145389 tona. U usporedbi s proizvodnjom masline, čija godišnja proizvodnja iznosi oko 15,5 milijuna tona ili s kakaovim zrnom i njegovom godišnjom proizvodnjom od 4,5 milijuna tona, uočava se da je rogač nepravedno zapostavljen.



Slika 2. Proizvodnja rogača u svijetu i Španjolskoj, 1961. – 2013. (FAO, 2013)

Glavni proizvođači i izvoznici rogača u svijetu su Španjolska (40000 tona godišnje), Portugal (23000 tona godišnje), Grčka (22000 tona godišnje), Maroko (20500 tona godišnje), Turska (14261 tona godišnje), Italija (9445 tona godišnje) i Cipar (9120 tona godišnje). Hrvatska se nalazi na 11. mjestu sa udjelom od 0,3 % u ukupnoj proizvodnji (500 tona godišnje) (FAO, 2013.). Vrhunac proizvodnje bio je 60-tih godina prošlog stoljeća kada je Španjolska proizvodila više od 350 tisuća tona mahuna rogača godišnje, od tada je zabilježen drastični pad proizvodnje i to za čak 22 % (slika 2). Rogač je kultura tradicionalno uzgajana i korištena u prehrani, no njezin je uzgoj zanemaren posljednjih stotinjak godina i kontinuirano se smanjuje, što se pripisuje povećanoj proizvodnji drugih poljoprivrednih usjeva i to agruma, krumpira i grožđa (Davies, 1970) i niskim otkupnim cijenama plodova (Battle i Touse, 1997).

2.2. Primjena rogača u prehrambenoj industriji

Jedan od najranijih zapisa o rogaču je biblijska priča o sv. Ivanu Krstitelju, prema kojoj je preživio 40 dana u pustinji hraneći se plodom rogača, te se zato rogač još popularno naziva „kruh sv. Ivana“. Podaci o rogaču kao sastavnom dijelu prehrane potječu još iz antičkih vremena, točnije iz 4000. godine pr.Kr. kada je bio popularna namirnica osobito među siromašnim stanovništvom (Šebečić i Vitali, 2010) i hrana za životinje. Uglavnom je konzumiran sirov, kao voće, ili pečen, kao slastica. Visok udjel šećera i niski udjel masti omogućuje dugo čuvanje osušenih mahuna rogača, što je bilo osobito važno u razdobljima različitih prirodnih i društvenih nepogoda kao što su ratovi, suše itd. Iz istog razloga bio je i prikladna namirnica pomorcima na dugim putovanjima.

Danas rogač ima vrlo široku primjenu u prehrambenoj industriji te se nalazi u velikom broju proizvedenih namirnica kao što su konditorski proizvodi, energetske pločice, bezalkoholni napitci, pekarski proizvodi, alkoholna pića i sl. U većini tih proizvoda rogač ima ulogu zaslađivača, arome, uguščivača ili stabilizatora.

Nakon berbe odabiru se zdravi i neoštećeni plodovi koje je potrebno osušiti (prirodno ili mehanički) tako da sadrže manje od 10 % vlage kako bi se spriječilo truljenje tijekom prerade i skladištenja. Zatim se plodovi usitnjavaju radi odvajanja pulpe od sjemenki. Sjemenke se smatraju najvrjednijim dijelom ploda i koriste se za daljnje dobivanje gume rogača, a komadići plodova prerađuju se u brašno. Dobiveno brašno rogača, poznatije pod nazivom rogač u prahu ili mljeveni rogač, može se koristi izravno, kao sastojak drugih namirnica ili se prerađivati u svrhu ekstrakcije specifičnih sastojaka, kao što su npr. saharoza, prehrambena vlakana, antioksidansi (Iipumbu, 2008). Prije mljevenja, plodovi se mogu

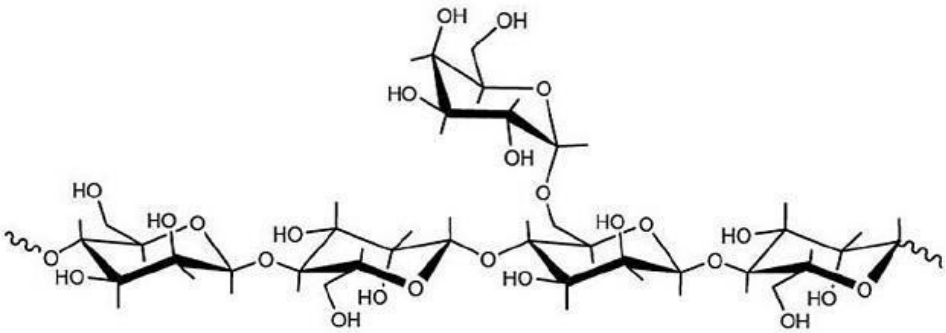
pržiti. Prženje nije nužno potrebno, pa se na tržištu može naći i sirovo brašno rogača, ali obično se provodi zato što se tako postiže veća trajnost i željene arome proizvoda. Prilikom prženja dolazi do smanjenja udjela šećera i proteina što se pripisuje Maillardovim reakcijama i procesu karamelizacije, no, upravo su te reakcije ključne za stvaranje karakteristične boje, arome i okusa sličnih čokoladi (Yousif i Alghzawi, 2000). Zato se brašno rogača koristi kao zamjena za kakao, te može zamijeniti do 30 % kakaovog praha bez potrebe za izmjenama recepture i s minimalnom promjenom okusa čokolade, teksture i boje finalnog proizvoda (Considine, 1982). Zbog navedenih promjena tokom prženja i njegovog sastava, plod rogača može se koristiti i kao zamjena za kavu.

Slika 3. Proizvodi dobiveni od mahune rogača – sirup, prženo i neprženo brašno rogača, sjemenke i komadići plodova (Anonymous 1)

Guma rogača se još naziva karuba guma, LBG (locust bean gum) ili guma sjemenki rogača, a koristi se kao prehrambeni aditiv E410. Sjemenke se sastoje od ovojnice (30-33 %), endosperma (42-46 %) te klice (23-25 %) (Battle i Tous, 1997). Odvajanje komponenti sjemenke je proces koji zahtijeva pažljivo kondicioniranje sjemenke prije frakcioniranja (Coppen, 1995). Sjemena ovojnica je veoma tvrda i otporna, zbog čega su sjemenke neprobavljive u ljudskom i životinjskom organizmu i teško se obrađuju. Uklanjanje ovojnice može se provesti tretiranjem sjemenke sumpornom kiselinom pri povišenoj temperaturi (ljuska se karbonizira i odvaja pranjem i četkanjem) ili prženjem (u rotirajućoj peći da bi se oljuštila ovojnica) (Battle i Tous, 1997; Kawamura, 2008). Oguljene sjemenke se zatim drobe pri čemu se krhka klica lako razmrvi u fini prah, a neslomljene polovice endosperma se odvoje prosijavanjem. Dobiveni endosperm usitnjava se na mlinskim valjcima do bijelog praha željene veličine čestica i predstavlja završni produkt- gumu sjemenki rogača. Tako dobivena sirova guma može se još dodatno pročistiti kako bi se povećao udio galaktomanana

(slika 3), koji je odgovoran za svojstva gume i čini 80 % sjemenke (Dionisio i Grenha, 2012).

Guma sjemenki rogača koristi se kao prirodni biljni zgušnjivač, sredstvo za želiranje, emulgator i stabilizator (Coppen, 1995; Dionisio i Grenha, 2012).



Slika 4. Struktura karuba gume (Dionisio i Grenha, 2012)

U prehrambenoj industriji koristi se u proizvodnji velikog broja proizvoda: sladoleda, dječje hrane, juha, hrane za kućne ljubimce, marmelada, pekarskih i konditorskih proizvoda, konzerviranog voća i povrća, umaka, sireva itd. Također se primjenjuje u farmaceutskoj industriji, kozmetici, proizvodnji papira i tekstila. Nusproizvodi iz proizvodnje gume sjemenki rogača također imaju svoju primjenu; brašno klice rogača koristi se u dijetetskoj hrani ili kao sastojak u proizvodima koji su namijenjeni oboljelima od celijakije (Durazzo i sur., 2014; Youssef i sur, 2013), a prirodni antioksidansi koji se nalaze u sjemenoj ovojnici su potencijalne nove sirovine (Battle i Tous, 1997).

2.3. Kemijski sastav ploda rogača

Literaturno dostupni rezultati istraživanja kemijskog sastava ploda rogača uvelike se razlikuju zbog činjenice da sastav pojedinog ploda ovisi o sorti, porijeklu i vremenu dozrijevanja, temperaturi, klimatskim uvjetima, atmosferskoj vlažnosti, stupnju zrelosti te načinu prerade (Iliumbu, 2008; Strikić i sur., 2006; Nasar-Abbas i sur., 2016). Drugi uzrok varijabilnosti rezultata su primijenjene metode analize i uvjeti ekstrakcije (tablica 1).

Mahuna rogača iznimno je bogat izvor ugljikohidrata; ovisno o sorti i uvjetima uzgoja udjel ugljikohidrata doseže i 89 g/100g. U rogaču 30 do 60 % ugljikohidrata čine jednostavni šećeri, među kojima su najzastupljeniji saharoza (65 % do 75 % od ukupnih šećera), glukoza i

fruktoza (15 % do 25 % od ukupnih šećera) (Nasar-Abbas i sur., 2016), a zabilježene su i vrijednosti od 95 % saharoze (od ukupnih šećera) (Bravo i sur., 1994). Rogač se može smatrati poželjnom sirovinom u proizvodnji zdrave hrane zbog niskog udjela masti, te povoljnog omjera i sastava masnih kiselina (Iipumbu, 2008). Prema Youssefu i sur. (2013) lipidi u rogaču sastoje se od 17 različitih masnih kiselina od kojih su najzastupljenije oleinska (40.45 %), linolenska (23.19 %), palmitinska (11.01%) i stearinska (3.08%) masna kiselina. Nasuprot visokom udjelu ugljikohidratnih sastojaka, udio proteina u rogaču je nizak; od 1,0 do najviše 7,6 %, ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Prema Battleu i Tousu (1997) proteini rogača su izgrađeni od sedam različitih aminokiselina (alanin, glicin, leucin, prolin, valin, tirozin i fenilalanin), od kojih su tri esencijalne – leucin, glicin i valin.

Tablica 1. Kemijski sastav mahune rogača (Iipumbu, 2008, Battle i Tous, 1997; Marakis, 1996;Yousif i Alghzawi, 2000; Avallone i sur., 1997; Calixto i Canellas, 1982)

Sastojci	Maseni udjel (g/100 g)
Voda	3,6 – 18,0
Anorganski ostatak	1,0– 6,0
Masti	0,2– 2,3
Proteini	1,0– 7,6
Ugljikohidrati	48,0– 88,9
Šećeri	32,0– 60,0
Vlakna	2,6 – 39,8
Polifenoli	0,5– 20,0

2.4. Bioaktivni sastav rogača

Osim bogatog osnovnog kemijskog sastava odn. sastava nutrijenata, rogač sadrži i vrlo bogat i raznovrstan bioaktivni sastav. Od mineralnih tvari rogač sadrži makroelemente: kalij (852.33 – 1091.33 mg/100 g), kalcij (135.67 – 302.67 mg/100 g), fosfor (44.00 – 92.33 mg/100 g), magnezij (55.00 – 99.00 mg/100 g) te elemente u tragovima željezo, mangan, cink i bakar. (Iipumbu, 2008; Khlifa i sur., 2013; Ayaz i sur., 2009). Uzimajući u obzir smjernice da se prehrambeni proizvod smatra dobrim izvorom određenog minerala ako je njegov postotak veći od 30 % (NN 29/09, Iimpubu), rogač je dobar izvor kalcija i sadrži značajnije količine kalija i magnezija. Istraživanje koje je provelo američko Ministarstvo poljoprivrede (USDA, 2016) pokazuje da rogač sadrži vitamine: A, B6, C, E, folat (B9), tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3) i pantotensku kiselinu (B5).

U bioaktivni sastav rogača, osim vitamina i minerala, spada i skupina sekundarnih biljnih metabolita - polifenolnih spojeva. Velika popularnost polifenolnih spojeva posljednjih godina, kako kod potrošača tako i kod istraživačke zajednice, posljedica je njihovog iznimnog antioksidacijskog djelovanja zahvaljujući kojem pokazuju raznovrsne biološke učinke na ljudski organizam.

Pregled dosadašnjih istraživanja udjela i sastava polifenolnih spojeva iz plodova rogača prikazana su u Tablici 2. Polifenolni sastav mahune rogača čine u najvećem udjelu elagitanini (0.51±0.125 mg/g suhe tvari) i galotanini (0.44±0.122 mg/g suhe tvari) (Avallone i sur., 1997). Benchikh i sur. (2014) analizirali su vodene ekstrakte mahune rogača kroz tri faze rasta te odredili da udjel polifenolnih spojeva ovisi o zrelosti samog ploda te da je najveći udio ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida u prvoj, nezreloj fazi rasta, pri čemu nezrela mahuna ima 17-24 puta veći antioksidacijski kapacitet od zrele mahune. Osim o zrelosti ploda, istraživanja su pokazala da udjel polifenola ovisi i o procesu prerade mahune rogača (Papagiannopoulos i sur., 2004) te prženju (Şahin i sur., 2009).

Tablica 2. Pregled znanstvenih istraživanja o karakterizaciji polifenolnih spojeva rogača

	Ukupni polifenoli	**Ukupni flavonoidi**	**Kondenzirani tanini ili proantocijanidini**	**Hidrolizirani tanini**	**Referenca**
Nezreli plod	19.82 g GAE/100g	320.24 mg QE/100g			Benchikh i sur.,2014
Zreli plod	1.35 g GAE/100g	181.0 mg QE/100g			
Mahune$_{spektrf.}$	8.31 g GAE/kg		1.00 g ekv. katehina/kg		Papagiannopoulos i sur., 2004
Mahune $_{HPLC}$	448.2 mg/kg		14.8 mg/kg	26.3 mg/kg	
Prženo brašno $_{spektrf.}$	20.93 g GAE/kg		2.05 g ekv. katehina/kg		
Prženo brašno$_{HPLC}$	1207.8 mg/kg		18.7 mg/kg	330.3 mg/kg	
Mahune	19 mg GAE/g			2.75 mg ekv. katehina/g	Avallone i sur., 1997
Mahune	13.51 mg GAE/g			3.21 mg ekv. katehina/g	Ayaz i sur., 2007
Mahune	19.2 g/100g		4.37 g/100 g	1.36 g/100 g	Kumazawa i sur., 2002

2.4.1. Ekstrakcija polifenola i utjecaj veličine čestica na njihovu ekstrakcijsku učinkovitost

Kako bi se postigao unos što veće količine polifenola, a time i njihovo intenzivnije antioksidacijsko djelovanje u organizmu, takve polifenolne antioksidanse potrebno je ekstrahirati i proizvesti ekstrakte koji će omogućiti njihovu implementaciju u drugi prehrambeni proizvod. Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Ekstrakcija polifenolnih spojeva zahtjevna je zbog njihove kemijske strukture i njihovih interakcija s drugim spojevima. Sastav i struktura (jednostavna i/ili složena) polifenolnih spojeva koji se izdvajaju određuju uvjete ekstrakcije. Najvažniji čimbenici koji utječu na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala su: otapalo, temperatura, vrijeme kontakta, omjer otapala – otopljene tvari, veličina čestica i pH (Takeuchi i sur., 2009).

Na udjel polifenola ekstrahiranog iz biljnog materijala bitno utječe i različita veličina čestica uzorka. Prijenos tvari iz biljaka može se poboljšati korištenjem manjih čestica radi poboljšanja prodiranja otapala u biljni materijal te povećanja brzine ekstrakcije polifenola i učinka ekstrakcije. Međutim, veličina čestica mora biti ograničena jer zbog izuzetno malih čestica, koje obično imaju tendenciju spojiti se u aglomerate, dolazi do smanjenja prodiranja otapala u biljni materijal, što negativno utječe na postupak prijenosa tvari (Takeuchi i sur., 2009).

Petit i Pinilla (1995) proveli su analizu mahuna rogača s ciljem poboljšanja ekstrakcije šećera i dobivanja sirupa rogača veće čistoće. Između ostalog, istražen je utjecaj veličine čestica na ekstrakciju tanina i šećera. Maksimalna ekstrakcija šećera i minimalna ekstrakcija topljivih tanina dobivena je iz uzorka s najvećom veličinom čestica. S druge strane, tanini otpušteni cijepanjem granula tanina kod male veličine čestica, stvaraju aglomerate sa šećerima, posebno sa glukozom i tako otežavaju identifikaciju šećera.

Gião i sur. (2007) analizirali su ljekovite biljke turicu, kadulju i primorski vrisak i utjecaj veličine čestica na ekstrakciju antioksidansa. Utvrdili su da je manja veličina čestica dovela do većeg stupnja ekstrakcije, te se antioksidacijski kapacitet povećao sa duljim vremenom ekstrakcije i smanjivanjem veličine čestica. To znači da se povećanjem dostupne površine za molekularni transport doprinosi ekstenzivnijem prijenosu tvari između faza – što je u skladu sa općim načelima na kojima se temelji Fickov zakon.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovom radu korištene su suhe mahune rogača, porijeklom iz dalmatinskih krajeva hrvatskog priobalja te ubrane 2015. godine. Za potrebe istraživanja osigurana je veća količina uzoraka (5 kg) kako bi se osigurala homogenost i reprezentativnost uzorka. Mahune su usitnjene na drobilici Foss (Eik-Henger, Norveška) te su odvojene sjemenke iz pred-usitnjenog uzorka kako bi se dobio uzorak bez i sa sjemenkama. Daljnjim usitnjavanjem proizvedene su 3 frakcije uzorka bez sjemenki (brašno – 250 µm; 1BS – 126 µm; 0.5BS – 80 µm) i sa sjemenkama (prekrupa – 400 µm; 1SS – 175 µm; 0.5SS – 77 µm).

3.1.1. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće (p.a.).

Određivanje udjela ukupnih polifenola:
Folin-Ciocalteau reagens (Merck, KgaA, Njemačka)
Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Galna kiselina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta:
DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)
Metanol
Trolox
ABTS
Etanol
Kalijev peroksodisulfat

Određivanje ukupnih neflavonoida:
Folin-Ciocalteau reagens (Merck, KgaA, Njemačka)
Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Formaldehid

Određivanje ukupnih procijanidina (metoda po Bate Smithu):
n-butanol
Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
2 %-tna otopina amonij-željezo(III)-sulfat-dodekahidrata ($NH_4Fe(SO_4)_2 \times 12\ H_2O$)
u 2M kloridnoj kiselini

Određivanje ukupnih tanina s kazeinom:
Kazein
Folin-Ciocalteau reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Natrijev karbonat dekahidrat (Na_2CO_3 x $10H_2O$) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Natrijev acetat trihidrat (Merck, KgaA, Njemačka)
Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Određivanje ukupnih topljivih i pojedinačnih ugljikohidrata i polisaharida:
6 % otopina fenola (Merck, KgaA, Njemačka)
Sulfatna kiselina 96 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Acetonitril, HPLC grade (Panreac, Barcelona, Španjolska)

3.1.2. Aparatura i pribor

Laboratorijsko posuđe (staklene čaše, odmjerne tikvice, pipete, mikropipete, menzure, epruvete, plastične epruvete, vijale)

Spektrofotometar (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometar, Thermo scientific, US)

Analitička vaga (Denver Instrumental GmbH, Göttingen, Njemačka)

Magnetna miješalica (Cimarecmultipoint; VELP scientifica; IKA C-MAG HS 7)

Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

Laboratorijska centrifuga Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32

Vodena kupelj Vamlab Limited, tip SUB 14

Tekućinski kromatograf Agilent 1100/1200 Series (Stuttgart, Njemačka) s RI detektorom

3.1.3. Priprema ekstrakata iz različitih uzoraka rogača

U svrhu dobivanja ekstrakata polifenolnih spojeva 2 g uzorka rogača odvagano je u staklenu čašu i homogenizirano sa 20 mL otapala za ekstrakciju (70 % aceton). Ekstrakcija je provedena miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom 30 min na brzini od 500 rpm i temperaturi od 70 °C. Nakon ekstrakcije suspenzija se vruća filtrira vakuum filtracijom uz Whatman filter papir br. 1. Krutom ostatku nakon filtracije ponovno se dodaje 20 mL 70 % acetona te se ponavlja postupak ekstrakcije i filtracije. Nakon filtracije, filtrati su spojeni te nadopunjeni do poznatog volumena (50 mL filtrata), dok je prisutnost organskog otapala (acetona) uklonjena koncentriranjem na rotacijskom otparivaču na temperaturi vrelišta acetona (56 °C). Dobiveni vodeni ekstrakt nadopunjen je do 10 mL vodom te korišten za daljnje analize.

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje ukupnih topljivih ugljikohidrata i polisaharida

Princip metode:

Metoda se temelji na sposobnosti ugljikohidrata da u prisutnosti kiseline i topline stvaraju derivat furfurala, nakon čega slijedi reakcija s fenolom, čime se dobije karakteristično crveno-smeđe obojenje, čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski (Laurentin i Edwards, 2003).

Postupak rada:

Na dan analize potrebno je pripremiti svježu otopinu 6 % fenola. 2 mL uzorka ekstrakta rogača (u određenom razrijeđenju) pomiješa se sa 1 mL 6 % otopine fenola. Nakon toga, u epruvetu se dodaje 5 mL sulfatne kiseline te se dobro homogenizira. Zbog razvoja topline, uzorak se hladi te mu se nakon 20 minuta očita apsorbancija na 490 nm. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, dobivenog iz ovisnosti apsorbancije o koncentracijama glukoze, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata glukoze/g uzorka.

$$y = 15{,}743x - 0{,}03878$$

gdje su:

x – udjel glukoze (mg/mL)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 720 nm

Za određivanje udjela topljivih polisaharida provodi se taloženje ekstrakata rogača etanolom (96 %) uslijed čega dolazi do precipitacije topljivih polisaharida. U tu svrhu u plastične epruvete se otpipetira 400 µL originalnog uzorka i 1,6 mL etanola, uzorci se promućkaju i ostave na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon precipitacije, uzorci se centrifugiraju, supernatant se baci, a talog otopi u vodi do maksimalno 5 mL te mu se izmjeri udjel polisaharida prema gore opisanom postupku određivanja udjela ukupnih ugljikohidrata.

3.2.2. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-RI)

Princip metode:

Razrađena je metoda koja je pomoću izokratne eluacije otapala omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju pojedinačnih ugljikohidratnih spojeva.

Postupak rada:

Za pripremu ekstrakata za određivanje udjela šećera odvagano je 0,1-1,0 g uzorka (ovisno o sirovini) te je dodano 10 mL 70%-tne otopine acetonitrila (v/v). Uzorci su miješani 30 min na magnetskoj miješalici (na sobnoj temperaturi), nakon čega su procijeđeni kroz cjedilo i profiltrirani kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,45 μm prije injektiranja. U kromatografski sustav injektirano je 20 μL tako profiltriranog ekstrakta te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

Kromatografski uvjeti:

Kromatografska kolona: *Luna* Amino-3 CP, 5μm Col 150x1mm

Mobilna faza: Acetonitril **:** voda = 70 % : 30 %

Protok: 1 mL/min

Eluiranje: izokratno

Detekcija: RI

Temperatura kolone: 30 ˚C

Vrijeme trajanja analize: 17 min

Identifikacija i kvantifikacija ugljikohidratih spojeva:

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću RI detektora. Usporedbom vremena zadržavanja (R_t) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda identificirani su spojevi na pojedinim kromatogramima. Kvantitativno određivanje spojeva omogućeno je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda.

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Određivanje ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteau reagensom. Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i

fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 3,95 ml destilirane vode, 50 µL razrijeđenog uzorka, 250 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 750 µL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo što se umjesto uzorka dodaje jednaka količina destilirane vode. Svaki uzorak pripremljen je u dvije paralelne probe (n=2), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, dobivenog iz ovisnosti apsorbancija o koncentracijama galne kiseline, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g uzorka.

$$y = 0{,}0010x - 0{,}0001 \qquad R^2 = 1{,}000$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

3.2.4. Određivanje ukupnih neflavonoida

Princip metode:

Za taloženje flavonoidnih spojeva primjenjuje se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojem također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih fenola određuje se prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

U epice od 2 mL otpipetira se 1 mL uzorka, 500 µL formaldehida i 500 µL otopine klorovodične kiseline (razrijeđena vodom u omjeru 1:4) te se ostavi stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu. Nakon toga se u tako pripremljenoj otopini odredi udjel ukupnih neflavonoida prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnih fenola s Folin-Ciocalteau reagensom. Svaki uzorak pripremljen je u dvije paralelne probe (n=2), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Udjel neflavonoida izračunava se prema istoj formuli kao i udjel ukupnih fenola, a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g uzorka.

Udjel ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udjela prethodno određenih fenola i neflavonoida prema formuli:

ukupni flavonoidi = ukupni fenoli – ukupni neflavonoidi

3.2.5. Određivanje ukupnih procijanidina metodom po Bate-Smithu

Princip metode:

Ova metoda razvijena je modifikacijom metode po Bate–Smithu (1973), a temelji se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula procijanidina s kloridnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Reakcija je popraćena nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Porter i sur. 1986).

Postupak rada:

Pripreme se otopine n-butanol/HCl (95:5, v/v) i 2 % $NH_4Fe(SO_4)_2 \times 12\ H_2O$ u 2 M klorovodičnoj kiselini. 1 mL uzorka razrijeđenog u acetonu otpipetira se u odmjernu tikvicu i doda 2 mL otopine butanol/HCl i 100 µL 2% $NH_4Fe(SO_4)_2 \times 12\ H_2O$ u 2 M HCl. Suspenzija se dobro izmiješa i zagrijava 45 minuta na 95 °C u začepljenim tikvicama. Nakon zagrijavanja, smjesa se ohladi i profiltrira te se očita apsorbancija na 550 nm. Slijepa proba priprema se po istom postupku, ali umjesto uzorka sadrži aceton. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata cijanidin klorida (CyE)/g uzorka, a dobivaju se iz jednadžbe pravca:

$$y = 0{,}0321x + 0{,}0574 \qquad R^2 = 0{,}9901$$

gdje su:

x – poznata koncentracija otopine cijanidin klorida (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 550 nm

3.2.6. Određivanje ukupnih tanina s kazeinom

Princip metode:

Tanini su polifenolni spojevi koji tvore netopive komplekse s proteinima (Hagerman i Butler, 1978). U ovoj metodi za adsorpciju tanina koristi se protein kazein, nakon čega se takva otopina filtrira i odredi se udio preostalih, neadsorbiranih polifenolnih spojeva. Udjel ukupnih tanina izračunava se iz razlike udjela ukupnih polifenola i udjela preostalih, neadsorbiranih polifenolnih spojeva.

Postupak rada:

Za potrebe mjerenja, priprema se otopina 1 (O1), miješanjem određene količine acetatnog pufera (pH=3,0), uzorka i vode. U posebno pripremljene epruvete odvaže se 50 mg kazeina i doda 10 mL otopine O1 te se tako dobivena otopina 2 (O2) miješa 60 min, kako bi došlo do adsorpcije tanina na kazein. Nakon 60 min, O2 se profiltirira te se alikvotu od 1 mL doda 0,5 mL Folin-Ciocalteau reagensa i nadopuni sa 33 % $Na_2CO_3x10\ H_2O$ do 10 mL, dobro homogenizira i odmah izmjeri apsorbancija plavog obojenja na 720 nm. Isti postupak ponovi se sa otopinom O1. Slijepa proba priprema se na isti način, sa svim reagensima, ali se umjesto uzorka dodaje otapalo u kojem je otopljen uzorak (voda).

Apsorbancija uzorka O1 odgovara udjelu ukupnih fenola, dok razlika apsorbancija uzoraka O1 i O2 odgovara udjelu tanina (koji su vezani na kazein). Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, dobivenog iz ovisnosti apsorbancija o koncentracijama taninske kiseline, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata taninske kiseline/g uzorka.

$$y = 0{,}004x + 0{,}0294$$

gdje su:

x – udjel taninske kiseline (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 720 nm

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.7.1. DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora – AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što je popraćeno opadanjem vrijednosti apsorbancije (Brand-Williams i sur. 1995).

Postupak rada:

Pripremi se otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) u metanolu. U staklene epruvete otpipetira se 100 µL razrijeđenog uzorka i 3,9 mL metanolne otopine DPPH. Odmah po dodatku otopine DPPH mjeri se apsorbancija pri 515 nm u razmaku od 1 minute sve do uspostavljanja konstantne vrijednosti apsorbancije (ravnotežno stanje). U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka dodaje se 100 µL metanola. Svaki uzorak pripremljen je u dvije paralelne probe (n=2), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Vrijednost ΔA za nepoznati uzorak dobiva se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Rezultati ΔA preračunavaju se prema baždarnoj krivulji u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenata – analog vitamina E):

$$y = 0{,}603x + 0{,}0068$$

gdje su:

x –koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

3.2.7.2 ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za

oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog uzoraka priprema se otopina $ABTS^+$ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi 0,70 ± 0,02. Za provođenje mjerenja, u staklene epruvete doda se 40 µL uzorka i 4 mL $ABTS^+$ radikala, otopina se dobro promiješa te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2). Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA, koja se prema jednadžbi baždarne krivulje preračunava u koncentraciju, a rezultati se izražavaju u mM Troloxa/g uzorka. Izračunata vrijednost antioksidacijskog kapaciteta razrijeđenih uzoraka mora se pomnožiti faktorom razrijeđenja.

$$y = 0{,}303x + 0{,}0006$$

gdje su:

x –koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

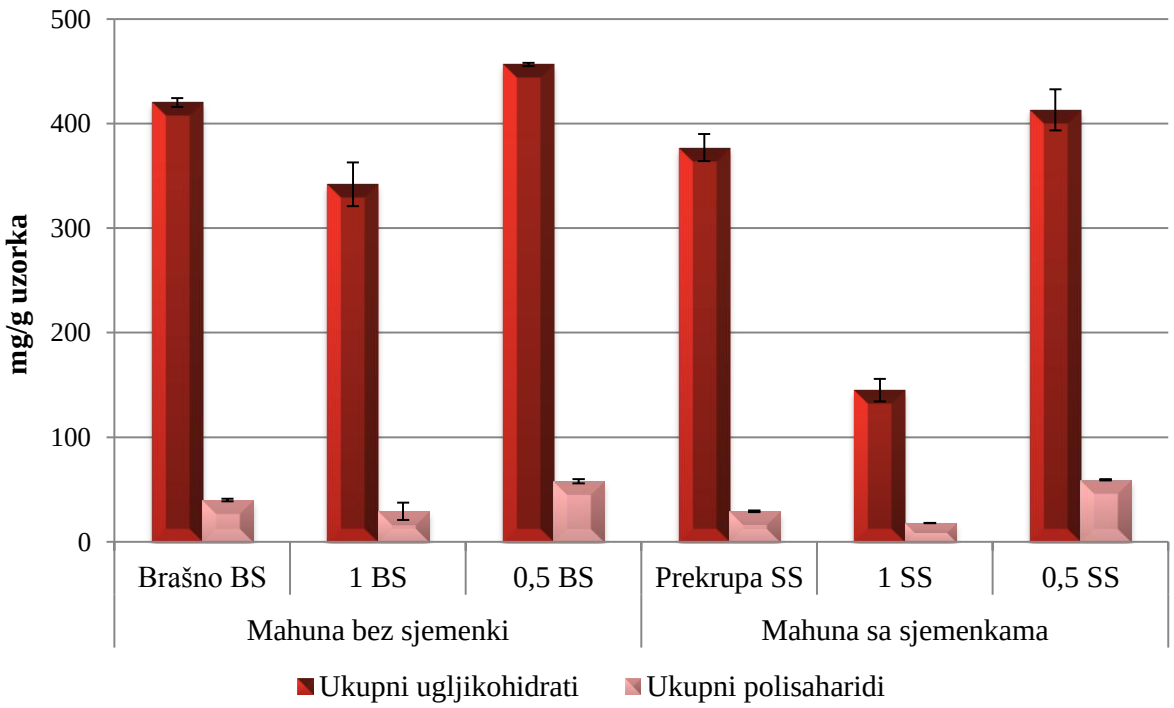
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm

4. REZULTATI

U ovom radu ispitan je utjecaj veličine čestica uzoraka rogača u ovisnosti o prisutnosti sjemenki mahune rogača (mahune bez i mahune sa sjemenkama) na udjel ugljikohidrata i bioaktivnih spojeva u proizvedenim ekstraktima. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih ugljikohidrata i polisaharida prikazani su na slici 5. U tablici 3 nalaze su rezultati određivanja udjela saharoze, fruktoze i glukoze primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Na slici 6 prikazani su rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola i ukupnih neflavonoida, određenih primjenom Folin – Ciocalteau metode, te ukupnih flavonoida dobivenih njihovom razlikom. Slika 7 prikazuje rezultate određivanja ukupnih procijanidina metodom po Bate-Smithu i tanina s kazeinom. Antioksidacijski kapacitet svih dobivenih ekstrakata određeni ABTS i DPPH metodom, prikazani su na slici 8. Tablica 4 prikazuje korelacijske koeficijente dobivene uspostavljanjem linearne korelacije između svih prethodno navedenih rezultata.

4.1. Ugljikohidratni sastav uzoraka rogača

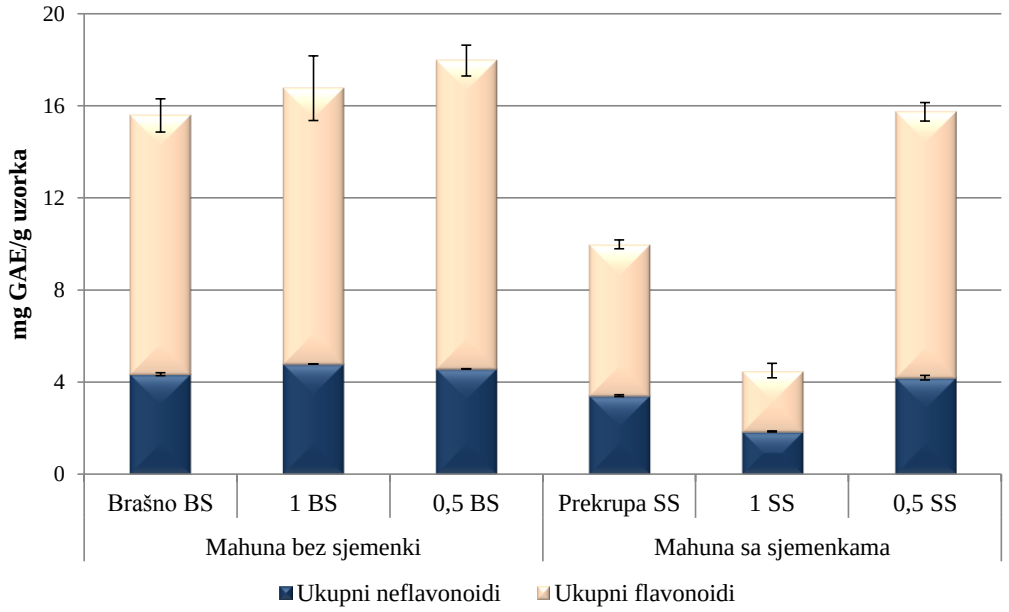


Slika 5. Udjel ukupnih ugljikohidrata i topljivih polisaharida (mg/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama

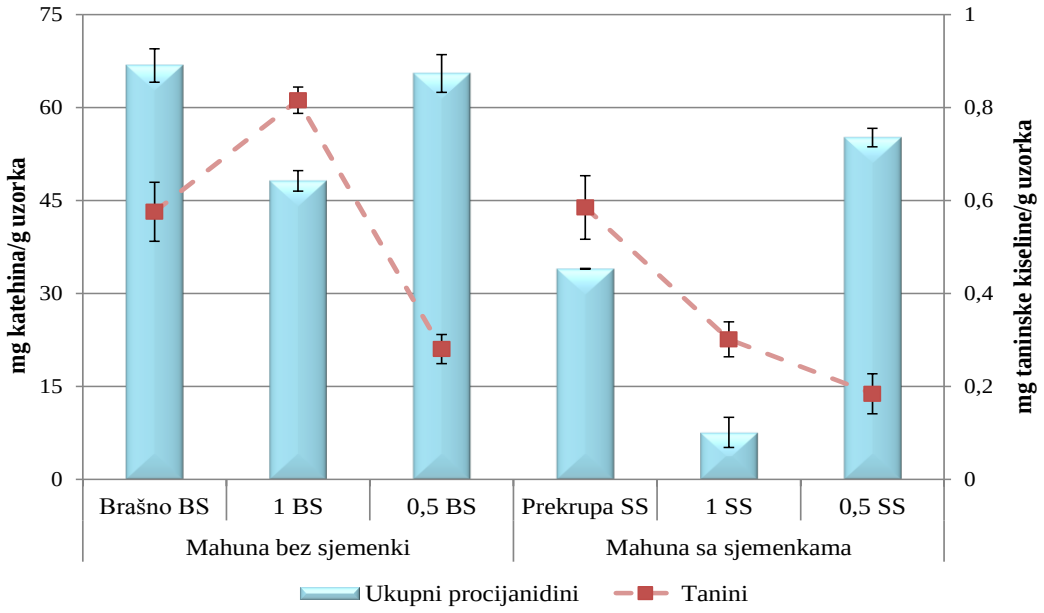
Tablica 3. Udjel saharoze, fruktoze i glukoze (g/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama

Uzorak	Saharoza	Fruktoza	Glukoza	∑
Brašno BS	0,35 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,70
1 BS	0,35 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,74
0,5 BS	0,38 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,80
Prekrupa SS	0,37 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,73
1 SS	0,38 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,45
0,5 SS	0,38 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,77

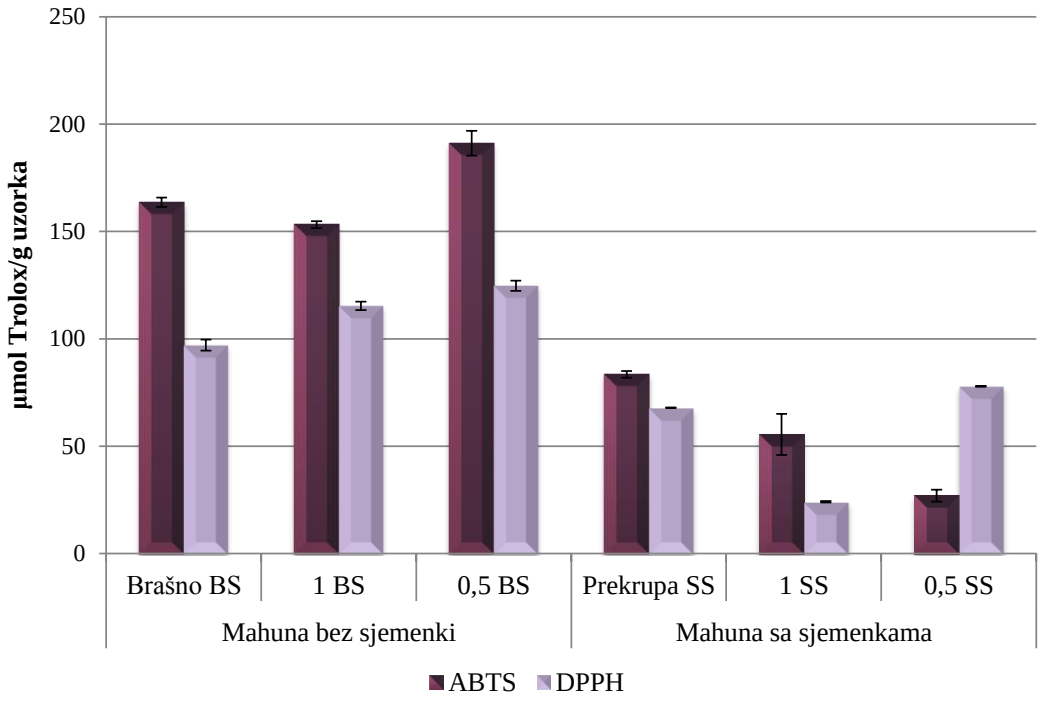
4.2 Polifenolni sastav i antioksidacijski kapacitet uzoraka rogača



Slika 6. Udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida (mg GAE/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama



Slika 7. Udjel ukupnih procijanidina(mg ekvivalenata katehina /g uzorka) i tanina (mg ekvivalenata taninske kiseline/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodom (µmol Trolox/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama

Tablica 4. Korelacijski koeficijenti između izlaznih parametara ekstrakcije ispitivanih uzoraka rogača

	Uk. polifenoli	**ABTS**	**DPPH**	**Procijanidini**	**Tanini**	**Uk. flavonoidi**
Uk. polifenoli	1,000	0,594	0,946	0,942	0,156	0,999
ABTS	0,594	1,000	0,789	0,598	0,444	0,588
DPPH	0,946	0,789	1,000	0,870	0,330	0,939
Procijanidini	0,942	0,598	0,870	1,000	0,065	0,944
Tanini	0,156	0,444	0,330	0,065	1,000	0,111
Uk. flavonoidi	0,999	0,588	0,939	0,944	0,111	1,000

5. RASPRAVA

5.1. Udjel ukupnih ugljikohidrata i topljivih polisaharida u ekstraktima rogača

Slika 5 prikazuje udjele ukupnih ugljikohidrata i polisaharida u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama. Prema prikazanim rezultatima najveći udjel ukupnih ugljikohidrata određen je u uzorku 0,5 BS i iznosio je 456,47 ± 57,87 mg/g uzorka, a najveći udjel topljivih polisaharida u uzorku 0,5 SS (412,99 ± 59,27 mg/g uzorka). Najmanji udjel ugljikohidrata i polisaharida određen je u uzorku rogača sa sjemenkama- 1 SS, te iznosi 144,99 ± 10,67 mg/g uzorka za ugljikohidrate i 17,92 ± 0,06 mg/g uzorka za polisaharide. Premda su frakcije uzoraka veličine čestica 0,5 BS i SS sadržavale najveće udjele ugljikohidrata i polisaharida, dobiveni rezultati pokazali su da veličina čestica pojedinih frakcija uzoraka mahune rogača nije značajno utjecala na ekstrakciju ugljikohidrata, zbog toga što se i u uzorcima bez i sa sjemenkama udjel ugljikohidrata i polisaharida nije značajno razlikovao između najveće (brašno, prekrupa) i najmanje (0,5 BS, SS) frakcije. Neznatno veći udjel ovih nutrijenata u najmanjoj frakciji može se objasniti time što se smanjivanjem veličine čestica omogućuje bolje prodiranje otapala i veći prinos ekstrakcije.

5.2. Udjel saharoze, fruktoze i glukoze u ekstraktima rogača

Tablica 3 prikazuje udjel saharoze, fruktoze i glukoze (mg/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama. Od identificiranih šećera u najvećem udjelu određena je saharoza, neovisno o prisustvu sjemenki, u rasponu od 0,35 do 0,38 g/g uzorka. Udjel fruktoze iznosio je u prosjeku polovinu udjela saharoze, od 0,17 do 0,19 g/g, dok je udjel glukoze bio približno jednak ili neznatno veći od fruktoze (od 0,18 do 0,22 g/g uzorka). Uzorak 1 SS odstupa od ovih rezultata sa udjelima od 0,05 ± 0,02 fruktoze i 0,02 ± 0,01 glukoze te se može pretpostaviti da je manja veličina čestica uzoraka dovela do aglomeracije čestica i stvaranja nepropusnih agregata krutog materijala kroz koji nije bila omogućeno strujanje otapala te je rezultiralo iznimno malim udjelom pojedinačnih šećera. Prisutnost sjemenki mahune rogača nije imala značajan utjecaj na udjel pojedinačnih šećera u dobivenim ekstraktima, osim prethodno navedenog uzorka 1 SS, u kojem je iznimno malom udjelu šećera mogla doprinijeti i činjenica da prisutnost sjemenki rogača, poznatih po svojoj iznimno hidrokoloidnoj prirodi mogla doprinijeti geliranju uzorka i onemogućenoj ekstrakciji topljivih spojeva. Ayaz i sur. (2007) proveli su analizu mahuna rogača bez sjemenki pomoću HPLC metode i utvrdili da su glavni šećeri detektirani u plodu mahune rogača saharoza,

glukoza i fruktoza, pri čemu glukoza i fruktoza imaju približno jednake udjele što se podudara s dobivenim rezultatima ovog istraživanja.

5.3. Udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida u ekstraktima rogača

Slika 6 prikazuje udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida (mg GAE/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama. Prema prikazanim rezultatima najveći udjel ukupnih polifenola određen je u uzorku 0,5 BS (17,96 ± 0,47 mg GAE/g uzorka), dok je najmanji udjel ukupnih polifenola određen u uzorku 1 SS (4,51 ± 0,20 mg GAE/g uzorka). Sukladno udjelu ukupnih polifenola istu tendenciju pokazuju udjeli ukupnih flavonoida. U slučaju frakcija rogača bez sjemenki puno su manje razlike u udjelima ukupnih polifenola s obzirom na veličinu čestica nego kod uzoraka mahuna sa sjemenkama gdje su vidljive značajne razlike između uzoraka sa različitom veličinom čestica. Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da veličina čestica ima velik utjecaj na udjel polifenola u uzorcima mahune sa sjemenkama. Prema dobivenim rezultatima, postizanju maksimalnog udjela ukupnih polifenola u brašnu rogača pogoduje najmanja veličina čestica, neovisno o prisustvu sjemenki u mahunama rogača. Dobiveni rezultat u skladu je sa istraživanjem Avallone i sur. (1997) koji su odredili udjel od 19 ± 3 mg GAE/g u mahunama bez sjemenki. U drugim istraživanjima, zabilježeni su i niži udjeli polifenola, što se može objasniti korištenjem drugačijih otapala za ekstrakciju (voda, metanol, etanol) i različitoj veličini čestica.

5.4. Udjel ukupnih procijanidina i tanina u ekstraktima rogača

Slika 7 prikazuje udjel ukupnih procijanidina i tanina (mg GAE/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama. Kao i u prethodnim istraživanjima potvrđena je prisutnost tanina i procijanidina u polifenolnom sastavu mahuna rogača. Mahune bez sjemenki pokazale su veći udio procijanidina i tanina od mahuna sa sjemenkama. Tako je najveći udjel ukupnih tanina određen u uzorku 1 BS (0,82 ± 0,03 mg taninske kiseline/g uzorka), a najveći udio procijanidina u uzorku Brašno BS (66,77 ± 2,70 mg katehina/g uzorka). Namanji udjel tanina pokazao je uzorak 0,5 SS (0,18 ± 0,07 mg taninske kiseline/g uzorka), a najmanji udjel procijanidina određen je u uzorku 1 SS (7,58 ± 2,43 mg katehina/g uzorka) što je daleko manje od udjela u ostalim uzorcima. Zabilježene su

izražene fluktuacije i varijacije u udjelima tanina sa smanjenjem veličine čestica i u mahuni bez sjemenki i u mahuni sa sjemenkama. U ranijim istraživanjima pokazalo se da manje veličine čestica mogu dovesti do većeg prinosa ekstrakcije, zbog povećavanja aktivne površine za prijenos tvari. Međutim, iako finije mljevenje nudi veću površinu za prijenos tvari, u slučaju prisustva velikog udjela ugljikohidratnih i polisaharidnih tvari, posebice hidrokoloidne prirode, to može negativno utjecati na ekstrakcijsku učinkovitost manjih sekundarnih biljnih metabolita. Takve sitnije čestice su sklone aglomeraciji koja može ometati proces ekstrakcije što je vidljivo u manjem prinosu u uzorcima 0,5 BS i 1 SS.

5.5. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodom u ekstraktima rogača

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodom (µmol Trolox/g uzorka) u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama prikazan je na slici 8.

Najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom pokazao je uzorak 0,5 BS (191,10 ± 5,81 µmol Trolox/g uzorka). Isti uzorak imao je i najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom (124,74 ± 2,37 µmol Trolox/g uzorka). Uzorak 0,5 SS pokazao je najmanji antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (27,03 ± 2,81 µmol Trolox/g uzorka), dok je najmanji antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode izmjeren u uzorku 1 SS (24,18 ±0,33 µmol Trolox/g uzorka). Također, uzorci mahune bez sjemenki pokazali su jednak trend rasta antioksidacijskog kapaciteta sa smanjenjem veličine čestica i primjenom DPPH i ABTS metode, dok su kod uzoraka 1 SS i 0,5 SS mahuna sa sjemenkama vidljiva odstupanja u rezultatima. Uočene razlike u rezultatima antioksidacijskog kapaciteta posljedica su različitosti primijenjenih metoda budući da se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste različiti slobodni radikali te dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidansa u uzorcima, što ovisi o strukturi odnosno vrsti polifenola (Singleton i Rossi, 1965). Şahin i sur. (2009) izmjerili su antioksidacijski kapacitet u brašnu rogača metodom po ABTS-u i dobili vrijednost od 70.7 ± 1.4 µmol Trolox/g. Takav rezultat niži je od onog dobivenog u ovom istraživanju i može se smatrati posljedicom korištenja vode kao otapala za ekstrakciju što je rezultiralo manjim prinosom ukupnih polifenola, a time i manjim antioksidacijskim kapacitetom.

5.6. Korelacije

Tablica 4. prikazuje tablicu korelacija između udjela ukupnih polifenola, flavonoida, tanina, procijanidina i antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog ABTS i DPPH metodama u ekstraktima mahune rogača različitih veličina čestica te bez i sa sjemenkama. Prema prikazanim korelacijama, postignute su vrlo visoke linearne korelacije između udjela ukupnih polifenola i flavonoida (r=0,999) te ukupnih polifenola i procijanidina (r=0,942). Dobiveni rezultati ukazuju da su ove podskupine (flavonoidi te procijanidini) najzastupljenije podskupine polifenolnih spojeva u rogaču, dok tanini koji u vrlo malom iznosu (r=0,156) koreliraju s ukupnim polifenolima ne doprinose značajno polifenolnim spojevima rogača. Također, utvrđena je veća korelacija udjela ukupnih polifenola s antioksidacijskim kapacitetom određenim DPPH metodom, nego ABTS metodom što se može objasniti prethodno utvrđenim razlikama u mehanizmima djelovanja pojedinih metoda.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata ovog završnog rada doneseni su sljedeći zaključci:

1. Mahuna rogača iznimno je bogata ugljikohidratima, koji čine do 70 % njegovog sastava.

2. Ugljikohidratni sastav mahune rogača najvećim dijelom čine jednostavni šećeri, u najvećem udjelu saharoza, zatim fruktoza i glukoza, dok su polisaharidi prisutni u puno manjem udjelu.

3. Veličina čestica kao i prisutnost sjemenki u mahunama rogača imaju značajan utjecaj na udjel ugljikohidrata, ali ne utječu na udjel topljivih polisaharida.

4. U polifenolnom sastavu mahune rogača prevladavaju flavonoidi, posebice podskupina procijanidina.

5. Visoka korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i procijanidina te antioksidacijskog kapaciteta dokazuje da su te skupine spojeva odgovorne za visoki antioksidacijski kapacitet ekstrakata rogača.

6. Najveći prinos polifenola postiže se primjenom materijala usitnjenog na najmanju veličinu čestica (<0.5 mm).

7. Prisutnost sjemenki u mahunama rogača rezultira smanjenim udjelom polifenolnih spojeva u odnosu na mahune bez sjemenki, vjerojatno zbog prisustva polisaharidnih tvari hidrokoloidne prirode koji umanjuju ekstrakcijsku učinkovitost bioaktivnih spojeva.

7. LITERATURA

Anonymous 1, <http://www.australiancarobs.com/gallery.php>. Pristupljeno 21. srpnja 2016.

Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, A. (1997) Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.* **10**, 166-172.

Ayaz, F.A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P.J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J., Strnad, M. (2007) Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *J. Food Qual.* **30**, 1040-1055.

Ayaz, F.A., Torun, H., Glew, R.H., Bak, Z.D., Chuang, L.T., Presley, J.M, Andrews, R. (2009) Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) flour prepared commercially and domestically. *Plant. Food. Hum. Nutr*. **64**, 286-292.

Bate-Smith, E. C. (1954) Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J*. **58**, 122–125.

Battle, I., Tous, J. (1997) Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Benchikh, Y., Louaileche, H., George, B., Merlin, A. (2014) Changes in bioactive phytochemical content and in vitro antioxidant activity of carob (Ceratonia siliqua L.) as influenced by fruit ripening. *Ind. Crop. Prod*. **60**, 298-303.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*. **28**, 25-30.

Bravo, L., Grados, N., Saura-Calixto, F. (1994) Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L): comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L). *J. Sci. Food Agr*. **65**, 303-306.

Calixto, F. S., Cañellas, J. (1982) Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric*. **33**, 1319–1323.

Considine, D.M. (1982). Foods and Food Production Encyclopedia, 1. izd., Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York.

Coppen, J.J.W (1995) Gums, resins and latexes of plant origin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Davies, W.N. (1970) The carob tree and its importance in the agricultural economy of Cyprus. *Econ. Bot*. **24**, 460-470.

De Candolle, A. (1898) The origin of cultivated plants. D. Appleton, New York.

Dionísio, M., Grenha, A. (2012) Locust bean gum: exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J. Pharm. Bioallied Sci*. **4**, 175.

Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M. (2014) Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chem.* **153**, 109-113.

FAO (2013) FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat3.fao.org/compare/E>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.

Gião, M. S., González-Sanjosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2007) Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenolic content on extraction features. *J. Sci. Food Agr*. **87**, 2638–2647.

Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1978) Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agr. Food Chem*. **26**, 809-812.

Iipumbu, L. (2008) Compositional analysis of locally cultivated carob (*Ceratonia siliqua*) cultivars and development of nutritional food products for a range market sectors. Master of Science in Food Science, Department od Food Science, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University.

Kawamura, Y. (2008) Carob bean gum. Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA, <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Carob_bean_gum.pdf>. Pristupljeno 18. srpnja 2016.

Khlifa, M., Bahloul, A., Kitane, S. (2013) Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L) and its morphological study. *J. Mater. Env. Sci*. **4**, 348-353.

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M., Nakayama, T. (2002) Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 373–377.

Larsen, S.E. (2007) <https://www.flickr.com/photos/sveineriklarsen/7203166122/>. Pristupljeno 21. srpnja 2016.

Laurentin, A., Edwards, C.A. (2003) A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Anal. Biochem*. **315**, 143 – 145.

Marakis, S. (1996) Carob bean in food and feed: current status and future potentials – a critical appraisal. *J. Food Sci. Tech*. **33**, 365–383.

NAS. (1979) Tropical Legumes: Resources for the Future, 109-116. National Academy of Sciences, Washington DC, USA.

Nasar-Abbas, S. M., Vu, T. H., Khan, M. K., Esbenshade, H., Jayasena, V. (2016) Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 63-72.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. (2009) Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya.

Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.

Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R. (2004) Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (Ceratonia siliqua L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS n. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 3784-3791.

Petit, M.D., Pinilla, J.M. (1995) Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lwt-Food Sci. Technol*. **28**, 145-152.

Porter, L. J., Hrstich, L., Chan, B. G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. **25**, 223-230.

Pravilniku o navođenju hranjivih vrijednosti hrane (2009) *Narodne novine* **29**, Zagreb (NN 29/09).

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Sci. Dir*. **26**, 1231-1237.

Rhizopoulou S., Davies W.J. (1991) Influence of soil drying on root development, water relations and leaf growth of *Ceratonia siliqua* L. *Oecologia*, **88**, 41–47.

Şahin, H., Topuz, A., Pischetsrieder, M., Özdemir, F. (2009) Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 155-161.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R.M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol*. **299**, 152.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144-158.

Strikić, F., Čmelik, Z., Perica, S. (2006) Morfološke osobine dva perspektivna tipa rogača (*Ceratonia siliqua* L.) s otoka Visa. *Pomologia Croatica*, **12**, 245-253.

Šebečić, B., Vitali, D. (2010) Rogač-zaboravljena hrana budućnosti. *Hrvatski prirodoslovci*, **19**, 75-92.

Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M.A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid – liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: Extracting bioactive compounds for food products, (Meireles, M.A.A., ured.), Crc press, Taylor & Francis group, New York, str.137-218.

USDA (2016) United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, National nutrient database, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/> Pristupljeno 16. kolovoza 2016.

Yousif, A.K., Alghzawi, H.M. (2000) Processing and characterization of carob powder. *Food chem.* **69**, 283-287.

Youssef, M.K.E., El-Manfaloty, M.M., Ali, H.M. (2013) Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Food and Public Health*. **3**, 304-308.