

Utjecaj uvjeta maceracije na ukupne fenole i antioksidativnu aktivnost macerata rogača

Kantoci, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:196224>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij

Biotehnologija

Helena Kantoci

6739/BT

**UTJECAJ UVJETA MACERACIJE NA UKUPNE FENOLE
I ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST MACERATA
ROGAČA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić*

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ UVJETA MACERACIJE NA UKUPNE FENOLE I ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST MACERATA ROGAČA

Helena Kantoci, 0058203256

Sažetak: Liker od rogača je jako alkoholno piće s minimalno 15 % v/v alkohola i 100 g L⁻¹ šećera koje se proizvodi maceracijom mahuna rogača u vodeno-alkoholnoj bazi. Maceracija je najstariji i najkorišteniji postupak ekstrahiranja aromatskih i bioaktivnih tvari iz biljaka i voća. Rogač je bogat bioaktivnim polifenolnim spojevima koji imaju učinak na ljudsko zdravlje jer neutraliziraju štetne slobodne radikale. Cilj ovoga rada bio je odrediti kako uvjeti maceracije utječu na količinu ukupnih fenola, antioksidativnu aktivnost i kromatske karakteristike macerata rogača. Ispitani uvjeti su vrijeme maceracije, volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi, omjer mase rogača i vodeno-alkoholne baze te izloženost svjetlu odnosno tami. Količina ukupnih fenola određena je spektrofometrijski pomoću Folin-Cioaltea reagensa, antioksidativna aktivnost FRAP i DPPH metodom dok su kromatske karakteristike određene kolorimetrom (CIELab sustav).

Ključne riječi: *antioksidativna aktivnost, kromatske karakteristike, maceracija, polifenoli, rogač*

Rad sadrži: 38 stranica, 22 slike, 7 tablica, 49 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Pomoć pri izradi: Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

Datum obrane: rujan, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology or Biotechnology or Nutrition**

INFLUENCE OF MACERATION CONDITIONS ON THE TOTAL POLYPHENOLIC CONTENT AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY ON THE CAROB MACERATES

Helena Kantoci, 0058203256

Abstract: Carob liqueur is a strong alcoholic beverage with a minimum of 15 % v/v alcohol and 100 g L⁻¹ sugar produced by maceration of carob pods in a hydro-alcohol base. Maceration is the oldest and most widely used process for extracting aromatic and bioactive substances from plants and fruits. Carob is rich in bioactive polyphenolic compounds that have an effect on human health because they neutralize harmful free radicals. The aim of this study was determine the influence of maceration conditions on the total polyphenolic content, the antioxidant activity and chromatic characteristics of the carob macerates. The examined conditions are the maceration time, the ethanol content in the hydro-alcohol base, the ratio of the mass of carob and the hydro-alcohol base, and the exposure to light or darkness. The total polyphenol content was determined spectrophotometrically by Folin-Ciocalteu reagent, antioxidant activity was determined using FRAP and DPPH methods and chromatic characteristics by colorimeter (CIELab system).

Keywords: antioxidant activity, carob, chromatic characteristics, maceration, polyphenols,

Thesis contains: 38 pages, 22 figures, 7 tables, 49 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Technical support and assistance: Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

Defence date: september, 2020.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Jaka alkoholna pića	2
2.2. Proizvodnja jakih alkoholnih pića maceracijom	4
2.2.1. Maceracija	4
2.2.2. Uvjeti maceracije	6
2.2.3. Likeri	7
2.2.4. Travarica	8
2.3. Rogač	9
2.3.1. Botaničke karakteristike rogača	9
2.3.2. Kemijski sastav ploda rogača	10
2.3.3. Polifenolni spojevi	11
2.3.3.1. Fenoli i flavonidi	12
2.3.3.2. Tanini ili trjeslovine	12
2.3.4. Važnost rogača	14
2.3.5. Upotreba i proizvodi od rogača	14
3. MATERIJALI I METODE RADA	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Biljni materijal	15
3.1.2. Maceracija ploda rogača	15
3.1.3. Uzorci macerata rogača	16
3.1.4. Kemikalije i reagensi	16
3.1.5. Uređaji	17
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa	17
3.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	19
3.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	22
3.2.4. Određivanje kromatskih karakteristika	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa	26
4.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	28

4.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	30
4.4. Kromatske karakteristike	32
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Jaka alkoholna pića se tradicionalno upotrebljavaju kao sastavni dio ljudske prehrane diljem svijeta od najranijih civilizacija pa sve do danas. Već u 9. stoljeću Arapi destilacijom aromatskog i ljekovitog bilja započinju proizvodnja destilata u zdravstvene svrhe. Ovisno o vrsti i načinu proizvodnje, jaka alkohola pića koja su prema Pravilniku namjenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva i sadrže 15 % vol. alkohola, mogu se podijeliti u nekoliko skupina. Čisti destilati odnosno rakije proizvode se destilacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog porijekla koje sadrže šećer, dok se likeri proizvode maceriranjem bilja ili voća u etilnom alkoholu. U industriji jakih alkoholnih pića maceracija je najstarija i najkorištenija metoda ekstrahiranja aromatskih i bioaktivnih tvari te tvari boje bilja ili voća u vodeno-alkoholnoj bazi pri sobnoj temperaturi. Količina bioaktivnih komponenti u dobivenom maceratu te sama kvaliteta macerata, ovisiti će o vrsti i količini upotrebene sirovine, udjelu alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi, temperaturi i vremenu maceracije. Polifenoli kao najzanimljiviji biološki aktivni spojevi odgovorni su za aromu te antioksidativno i ljekovito djelovanje biljnih likera i travarica. Zahvaljujući sposobnosti prelaska u fenoksil-radikale, polifenoli neutraliziraju štetne slobodne radikale koji oštećuju proteine i DNA molekule pa imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (štite kardiovaskularni sustav, usporavaju starenje, smanjuju upale, normaliziraju krvni tlak i dr.). Rogač je dugoživuća biljka koja je karakteristična za podneblja s mediteranskom klimom. Plod rogača, mahuna rogača se sastoji od sjemenki i pulpe koja je bogata složenim polifenolnim spojevima odnosno taninima. Zbog velikog postotka tanina, ostalih polifenolnih spojeva, vitamina, minerala, ugljikohidrata i prehrambenih vlakana, a malog postotka masti, rogač se ubraja u zdrave namirnice sa sve većom primjenom u ljudskoj prehrani i prehrambenoj industriji.

Cilj ovoga rada bio je odrediti kako uvjeti maceracije: vrijeme, omjer rogača i vodeno-alkoholne baze, volumni udio alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi te izloženost svjetlu odnosno tami utječu na konačnu koncentraciju ukupnih fenola, antioksidativnu aktivnost i kromatske karakteristike macerata rogača. Ujedno su istraženi i uvjeti koji će biti optimalni za dobivanje kvalitetnog macerata obogaćenog fenolnim spojevima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jaka alkoholna pića

Jaka alkoholna pića su prehrambeni proizvodi koji imaju bitnu ulogu u prehrambenoj industriji širom svijeta. Njihova važnost je rezultat kvalitete okusa i ugleda koji su ti proizvodi stekli na svjetskom tržištu tijekom stoljeća. Dostupne su razne nacionalne i internacionalne odredbe, specifikacije i standardi prema kojima se definiraju i opisuju razne kategorije alkoholnih pića (Christop i Bauer-Christoph, 2007.). U jaka alkoholna pića ubrajamo voćne rakije, rakije od grožđa, vinski destilat, žitne i druge rakije. Na našim prostorima je prisutna stogodišnja tradicija proizvodnje voćnih rakija koje su traženo i cijenjeno jako alkoholno piće kako u Hrvatskoj tako i u Europi. Zahtjevi kakvoće koje trebaju zadovoljiti jaka alkoholna pića i alkoholna pića koja se stavljaju na tržište definirani su Pravilnikom (NN 61/2019) o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (Pravilnik RH, NN 61/2009).

Prema Pravilniku (NN 61/2009) pod pojmom jaka alkoholna pića podrazumijevaju se pića koja sadrže minimalno 15 % vol. alkohola te su predviđena za ljudsku konzumaciju. Jaka alkoholna pića se mogu proizvesti na dva načina:

1.) Izravni način se odnosi na:

- a) destilaciju prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog porijekla
- b) maceraciju bilja u etilnom alkoholu, destilatima poljoprivrednog porijekla i jakim alkoholnim pićima
- c) dodavanjem aroma, šećera, sladila te drugih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu ili destilatima poljoprivrednog podrijetla ili jakim alkoholnim pićima

2.) Miješanje jakog alkoholnog pića s jednim ili više:

- a) drugim jakim alkoholnim pićem
- b) etilnim alkoholom poljoprivrednog porijekla
- c) drugim alkoholnim pićima ili pićima.

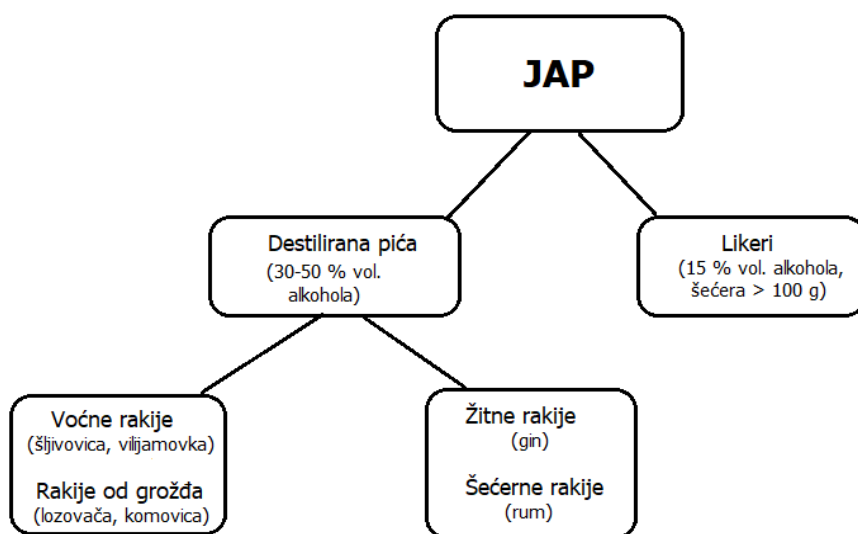
Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića i svih njihovih sastojaka mora biti poljoprivrednog porijekla. Njegov okus i miris ne smije odstupati od onoga u ishodno upotrebnoj sirovini te mora imati minimalno 96 % vol. alkohola (Pravilnik RH, NN 61/2009).

S obzirom na tehnološki postupak proizvodnje, vrstu sirovine, količinu alkohola i šećera u pićima te kvalitetu istih, jaka alkoholna pića se mogu podijeliti na prirodna jaka alkoholna pića, umjetna jaka alkoholna pića i aromatizirana vina.

- Proizvodnja prirodnih jakih alkoholnih pića provodi se destilacijom iz prevrelih šećernih komina, a specifična aroma potječe od sirovine iz koje je proizvedeno piće. U proizvodnji ovih pića nije dozvoljena upotreba dodatnih alkohola, aroma, boja i šećera. Podjela prirodnih jakih alkoholnih pića se temelji na sirovini iz koje se proizvode te tako razlikujemo: voćne rakije (šljivovica, višnja), žitne rakije (viski, vodka) i šećerne rakije (rum).
- Proizvodnja umjetnih jakih alkoholnih pića provodi se maceracijom biljnih sirovina u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i destilacijom macerata. Dobiveni destilat macerata se nakon toga miješa s etilnim alkoholom i aromatskim spojevima. Umjetna jaka alkoholna pića sadrže prirodnu aromu biljke korištene u maceraciji te ne sadrže gorke i štetne tvari koje se ne destiliraju. Primjeri umjetnog jakog alkoholnog pića su likeri i travarice te Maraschino koji se dobiva destilacijom macerata višnje.
- Proizvodnja aromatiziranih vina provodi se maceracijom prevrelih voćnih sokova tj. vina s aromama i mirodijama poput limuna, naranče, pelina i gorušćice. U ovu kategoriju spadaju vermut i bermet.

Prirodna jaka alkoholna pića su cjenjenija nego umjetno jaka alkoholna pića i aromatizirana vina. Razlog tome je što prirodna jaka alkoholna pića imaju sve aromatske komponente sirovine iz koje su dobiveni (Grba i Stehlik Tomas, 2010).

Ovisno o vrsti i načinu proizvodnje, Mrvčić i sur. (2012) navode podjelu jakih alkoholnih pića na čiste destilate i likere (slika 1). Čisti destilati, poznatiji kao rakije, proizvode se destilacijom iz predfermentirane voćne, žitne ili šećerne komine, bez ikakvih dodataka i sadrže 30-50 % vol. alkohola. Likeri s druge strane sadrže minimalno 15 % vol. alkohola, a proizvode se maceracijom aromatskog i ljekovitog bilja ili voća u vodeno-alkoholnoj bazi, sa ili bez dodatka šećera.



Slika 1. Podjela jakih alkoholnih pića (Mrvčić, 2016)

2.2. Proizvodnja jakih alkoholnih pića maceracijom

2.2.1. Maceracija

Maceracija je tehnološki postupak izdvajanja ili ekstrahiranja različitih spojeva iz aromatskog i ljekovitog bilja, voća ili plodova u vodeno-alkoholnoj bazi (destilatu ili etilnom alkoholu) čime konačan proizvod dobiva karakterističnu aromu bilja, ugodnijeg je okusa te se ne kviri zbog pristutstva alkohola. Postupak se provodi pri sobnoj temperaturi u spremnicima s mješalima gdje se bilje stavlja zajedno s vodeno-alkoholnom bazom. Povremenim miješanjem osigurava se stalni kontakt bilja s otapalom što poboljšava ekstrakciju.

Ljekovito i aromatsko bilje sadrži biološki aktivne spojeve koji se tijekom postupka maceracije otapaju i difundiraju u vodeno-alkoholnu bazu prateći gradijent koncentracije. Eterična ulja i polifenolni spojevi su biološki aktivni spojevi ljekovitog i aromatskog bilja te voća, dok su tanini, gorke tvari i saponini prisutni samo kod bilja. Bioaktivni sastojci imaju jaku antioksidativnu aktivnost i štite stanice od oksidativnog stresa pa aromatsko i ljekovito bilje djeluje antimikrobno, antikancerogeno i protuupalno na organizam zbog čega ima široku i značajnu primjenu u proizvodnji jakih alkoholnih pića (Buyel, 2018; Martinović 2015).

Ljekovito i aromatsko bilje koje se može koristiti za maceraciju dijeli se u 4 skupine:

1. Pikantno (začini) – cimet, muškatni oraščić, klinčić
2. Gorko – pelin, gorka kvasija ili surinamsko gorko drv, smole aloe, artičoka
3. Aromatično i gorko – gorka naranča, kamilica, stolisnik, maslačak, čičak, rabarbara, jelenska trava, kamilica, gorka naranča
4. Izrazito aromatične – menta, kadulja, zvjezdasti anis, anđelika (Tonutti i Liddle, 2010).

U tablici 1 je navedeno ljekovito i aromatično bilje koje se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj (Fiket, 2013; Lukin, 2019).

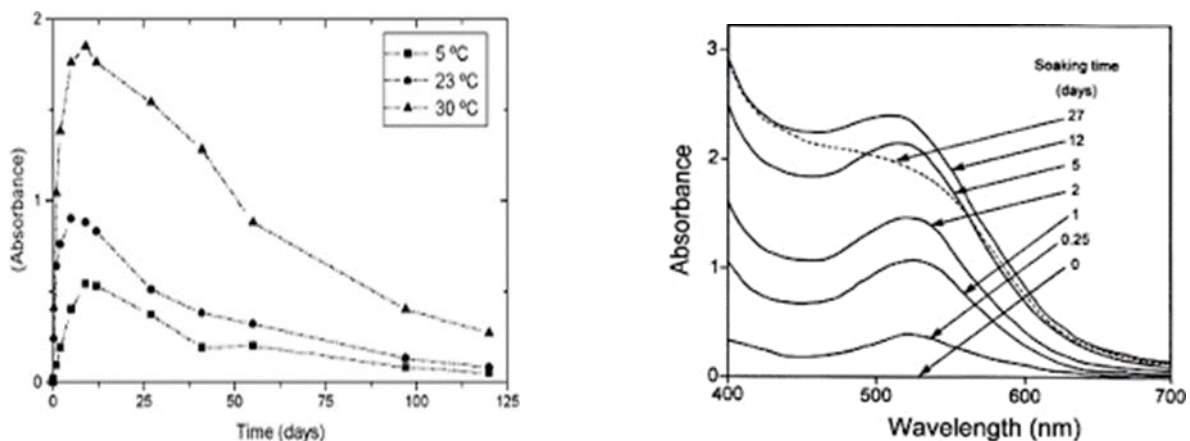
Tablica 1. Bilje u proizvodnji jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj

IME	DIO BILJKE KOJI SE KORISTI	JAP
Anđelika	Korijen, eterično ulje, macerati	Rakije, gin, aromatizirana JAP, likeri
Anis	Sjeme, eterično ulje, macerati, korijen	Rakije, aromatizirana JAP, likeri
Korijander	Sjeme, eterično ulje, macerati	Rakije, gin, likeri aromatizirana JAP,
Komorač	Sjeme, eterično ulje, macerati	Aromatizirana JAP, likeri
Kleka	Plodovi (bobice) eterično ulje	Rakije, gin, Steinher, borovička
Kadulja	Listovi	Aromatizirana JAP, likeri
Lavanda	Cvjetovi, eterično ulje	Likeri
Mirta	Listovi, eterična ulja	Likeri, aromatizirana JAP
Paprena metvica	Listovi, eterično ulje, macerati	Aromatizirana JAP, likeri
Pelin	Nadzemni dijelovi, macerati, perklorati	Gorke rakije, likeri aromatizirana JAP
Rogač	Plodovi	Rakije, likeri aromatizirana JAP
Smokva	Plod, list	Aromatizirana JAP, rakije

2.2.2. Uvjeti maceracije

Količinu i vrstu aromatskog i ljekovitog bilja koje ulazi u sastav macerata odabiru sami proizvođači koji ih kombiniraju prema uglavnom tajnim recepturama. Macerirati se mogu cijele biljke (svježe ili osušene) ili njihovi određeni dijelovi (cvijet, plod, list, kora, korijen) koji se najčešće koriste osušeni. Nakon maceracije bilja u vodeno-alkoholnoj bazi, dobiveni macerati najčešće imaju alkoholnu jakost oko 60 % vol. Naknadnom destilacijom macerata kojoj prethodi filtracija, dobivaju se destilati macerata obogaćeni hlapivim spojevima bilja i voća (Martinović, 2015).

Na konačnu koncentraciju bioaktivnih spojeva u maceratu te na kvalitetu samog macerata, uz vrstu i kvalitetu bilja utječe još 4 parametra: temperatura i vrijeme maceracije, postotak alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi te uvjeti svjetla odnosno tame (Hanousek Čiča i sur., 2020). Paz i sur. (2014) su u svojim istraživanjima pokazali da je s ekonomskog gledišta, najbolje provoditi maceraciju višanja pri sobnoj temperaturi, dok će se pri višim temperaturama ekstrahirati puno veća koncentracija polifenola. Vrijeme je u korelaciji s parametrom temperature pa će se u vremenskom periodu od 2 tjedna pri višim temperaturama od sobne ekstrahirati znatno veća koncentracija polifenola. Pri nižim temperaturama od sobne i pri samoj sobnoj temperaturi u istom periodu boja macerata višnje će se tek stabilizirati (slika 2).



Slika 2. Utjecaj temperature i vremena na maceraciju (Paz i sur., 2014)

Maceracijom u vodeno-alkoholnoj bazi, iz bilja i voća dolazi do ekstrakcije polifenola, aromatskih tvari, aminokiselina, šećera, alkaloida, eteričnih ulja, fitosterola te ostalih topljivih

sastojaka u vodeno-alkoholnu bazu koja ih apsorbira (Hanousek Čiča i sur., 2018). Tvari koje su topljive u vodi poput šećera, organskih kiselina te gorkih tvari otapati će se u niže postotnom alkoholu. S druge strane, eterična ulja, smole i masti će biti topljive u više postotnom alkoholu. Postotak alkohola koji će se koristiti u pripremi vodeno-alkoholne baze ovisi o udjelu vode u materijalu koji se macerira. Za suho bilje je to 40-60 % vol/vol etanola, dok je za svježije bilje postotak veći, 80-96 % vol/vol etanola (Martinović, 2015; Hanousek Čiča i sur., 2020). Hanousek Čiča i sur., (2020) u svojim istraživanjima navode da je vremensko razdoblje maceracije od 6 do 8 tjedana, u 50 % vol/vol vodeno-alkoholnoj bazi pri sobnoj temperaturi optimalno za dobivanje aromama obogaćenog macerata rogača.

U Republici Hrvatskoj se uz travarice postupkom maceracije proizvode voćni likeri i to najčešće od crvenog voća (liker od višanja) i zelenih oraha (orahovac).

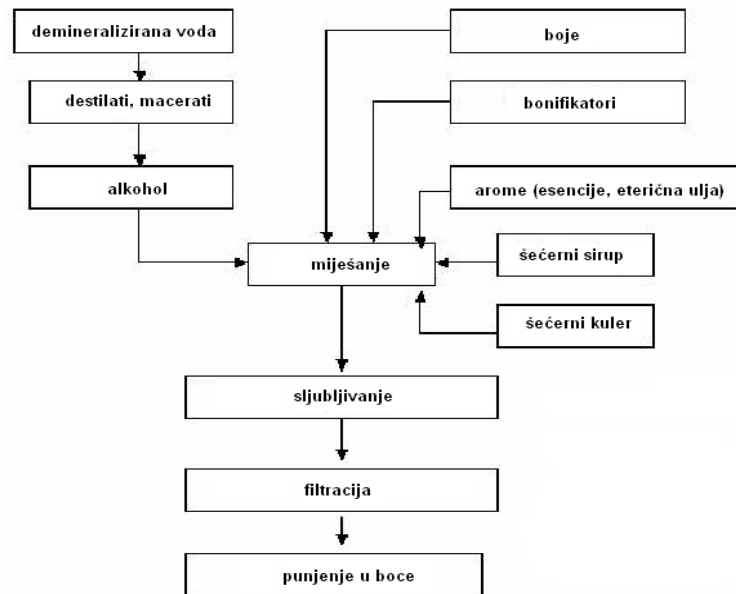
2.2.3. Likeri

Likeri su obojana ili bezbojna jaka alkoholna pića koja sadrže minimalni udio etanola od 15 % v/v i minimalni udio šećera od 100 g L⁻¹ (Christoph i Bauer-Christop, 2007). Konzumacija likera kao biljnih lijekova započinje još u 13. stoljeću, u Italiji gdje su ih pripremali redovnici. Danas se proizvode diljem svijeta i mogu se konzumirati sami, u kombinaciji s kavom te mogu biti dodatak različitim koktelima (Heffernan, 2016).

- **Proizvodnja likera**

Likeri se proizvode od destilata jakih alkoholnih pića koji se aromatiziraju s voćem, biljnim maceratima, začinima, cvjetovima ili orašistim plodovima uz dodatak šećera ili zaslađivača (poput visoko fruktuznog kukuruznog sirupa). Tipični proces proizvodnje (slika 3) uključuje rezanje i odležavanje biljaka u alkoholu te sazrijevanje dobivenog ekstrakta što u konačnici rezultira vrlo aromatičnim alkoholnim pićem (Heffernan, 2016). Ovisno o vrsti likera, dobiveni okus likera potječe od bilja, voća, voćnoga soka, različitih prehrambenih proizvoda poput vina, čokolade i vrhnja ili prirodnih i umjetnih ekstrakata aroma spojeva. Likeri od crvenog voća, ananasa ili citrusa proizvode se maceracijom navedenog voća u vodeno-alkoholnoj bazi, dodavanjem sokova istoimenog voća i prirodnih aroma, dok se gorki likeri proizvode dodatkom začina i začinskog bilja (Christoph i Bauer-Christop, 2007). Jakopić i sur. (2007) ističu voćne likere, posebice liker od oraha zbog bogatog polifenolonog sastava. Liker od oraha je tamno smeđe boje i gorkog okusa, a proizvodi se od oraha sa zelenom ljuskom. S druge

strane, liker od višanja se proizvodi od višanja koje su ubrane u fazi tehnološke zrelosti (Mrvčić i sur., 2012).



Slika 3. Opća shema proizvodnje likera

▪ Liker od rogača

Liker od rogača se tradicionalno proizvodi u mediteranskim zemljama, drobljenjem ploda odnosno mahuna rogača i njihovom maceracijom u vodeno-alkoholnoj bazi uz dodatak šećera. Dobiveni macerat rogača može se koristiti kao baza za liker ili destilirati pa će se dobiveni destilat macerata koristiti kao baza za liker od rogača. Količina galne kiseline i ukupnih fenola u liker u ovisiti će o karakteristikama sorte rogača te uvjetima procesa maceracije (Hanousek Čiča i sur., 2020).

2.2.4. Travarica

Travarica se ubraja u jaka alholna pića koja se proizvode u Hrvatskoj, posebice u Istri i Dalmaciji. Osim Hrvatske, tradicionalno je alkoholno piće mediteranskih država, Italije i Grčke.

▪ Proizvodnja travarice

Travarice su specijalne rakije koje se proizvode slično kao i gorke likeri, maceracijom ljekovitog i aromatskog bilja u vodeno-alkoholnoj bazi, ali za razliku od likera u njih se nikada ne dodaje šećer. Za alkoholnu bazu se najčešće upotrebljava rakija komovica koja se proizvodi destilacijom fermentirane groždane komine pa će o njezinoj kvaliteti ovisiti i kvaliteta travarice. Za proizvodnju travarice kombinira se veći broj bilja koje

može biti svježe ili sušeno. Korištenjem svježeg bilja dobiva se kvalitetniji destilat pa samim time i kvalitetnija travarica (Lučić, 1986.).

Kao i kod biljnih likera, i kod travarice su bioaktivni spojevi aromatskog i ljekovitog bilja (polifenolni spojevi i eterična ulje) odgovorni za njenu aromu te antioksidativno i ljekovito djelovanje (Lukin, 2019).

2.3. Rogač

Stablo rogača (*Ceratonia siliqua* L.) je zimzelena biljka koja pripada potporodici *Caesalpinaceae* iz obitelji *Leguminosae*. Već godinama se uzgaja na područjima s mediteranskom klimom čija tla su suha i siromašna. Podrijetlom je iz Sirije i Palestine, gdje se uz Portugal, Cipar, Grčku i Italiju danas najviše uzgaja (Batlle i Tous, 1997). U Hrvatskoj je uzgoj ograničen na uski obalni pojas pa ga najviše ima na otocima Korčuli, Visu i Šolti, kao i na području Dubrovačkog primorja, na poluotoku Pelješcu te otocima Lopudu, Mljetu i Šipanu (Dragojević Müller, 2017).

2.3.1. Botaničke karakteristike rogača

Rogač je dugoživuća biljka s prosječnom visinom do 10 metara i promjerom debla od 0,5-0,7 metra. Krošnja je gusta i razgranata s čvrstim granama, a kora je debela i smeđe boje.

Mlađe grane su uspravne i rastu unutar krošnje, za razliku od starijih čija je unutrašnjost šuplja te se pružaju do razine tla (slika 4).



Slika 4. Stablo rogača (*Ceratonia siliqua* L.) (Matak, 2018)

Listovi rogača (slika 5) su perasto sastavljeni s liskama u obliku elipse (Batlle i Tous, 1997). Sastoje se od tvrdog jednoslojnog gorenjeg epidermisa sa stanicama u čijim vakuolama se nalaze fenolni spojevi, dok se u nižim slojevima nalaze puči u nakupinama (Mitrakos, 1988). Gornja strana im je tamnozeleno boje i sjajna, dok je donja blijedo zelena. Rogač svoje listove odbacuje ljeti i to svake druge godine u lipnju ili srpnju, a obnavlja ih u proljeće (Diamantoglou i Mitrakos, 1981). Zbog svoje anatomije i sklerofilnih listova, rogač dobro podnosi visoke temperature i otporan je na sušu, dok je s druge strane vrlo osjetljiv na niske temperature koje mogu oštetiti stablo i uništiti plod.

Plod rogača (slika 6) je izdužena, ravna ili zakrivljena mahuna tamno smeđe do crvenkaste boje čija dužina može biti od 10 do 30 cm. Mahuna rogača se sastoji od pulpe na koju opada 90% ukupne mase rogača te od sjemenki na koje opad preostalih 10%. Pulpa se sastoji od vanjskog kožastog dijela ili perikarpa i mekše unutarnje regije odnosno mezokarpa koji omeđuje sjemenke u poprečnom presjeku (Batlle i Tous, 1997).



Slika 5. Listovi rogača



Slika 6. Plod (mahuna) rogača

2.3.2. Kemijski sastav ploda rogača

Kemijski sastav mahune rogača je varijabilan jer ovisi o uvjetima uzgoja, sorti, podrijetlu i vremenu berbe (Albanell i sur., 1991.). Glavne kemijske komponente (tablica 2) koje ulaze u sastav ploda rogača su ugljikohidrati, topiva i netopiva prehrambena vlakna, lipidi, masne kiseline, proteini, vitamini, minerali, polifenoli i voda (Yousif i Alghzawi, 2000). Kao što je već prethodno rečeno, mahuna rogača većinom se sastoji od pulpe (90 %) koja je bogata šećerima

(48–56 %) (Markis i Kefalas, 2004), polifenolima (taninima, fenolnim kiselinama i flavonidima) i mineralima (K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn) (Papaefstathiou i sur., 2018), a siromašna proteinima (3-4 %) i mastima (0,4-0,8 %) (Marakis, 1996). Od jednostavnih šećera najzastupljeniji su glukoza, fruktoza i saharoza dok celuloza i hemiceluloza zauzimaju svoj postotak u pulpi kao predstavnici složenih šećera (Goulas i sur., 2016). Najviše zastupljene masne kiseline u rogaču su oleinska (40,45 %), linolenska (23,19 %), palmitinska (11,01 %) i stearinska kiselina (3,08 %). Za razliku od pulpe, sjemenke i klice rogača imaju više masti, a manje ugljikohidratnih komponenti u svom sastavu (El Hajaji i sur., 2010) te su također bogate prehrambenim vlaknima (Papaefstathiou i sur., 2018). S obzirom da je udio masnih kiselina u ukupnom sastavu rogača nizak, može se ubrojiti u zdrave namirnice (Youssef i sur., 2013).

Tablica 2. Sastav ploda rogača (Youssef i sur., 2013, Dragojević Müller, 2017)

KEMIJSKA KOMPONENTA	Ugljikohidrati	Ukupni šećeri	Prehrambena vlakna	Lipidi	Proteini	Polifenoli	Voda
UDIO (g/100 g)	48,0 – 88,9	32,0 – 60,0	2,6 – 39,8	0,2 – 2,3	1,0 – 7,6	0,5 – 20,0	3,6 – 18,0

2.3.3. Polifenolni spojevi

Polifenoli su spojevi koji predstavljaju jednu od najčešćih i najrsprostranjenijih skupina biljnih sekundarnih metabolita koji djeluju kao antioksidansi. Biljke ih sintetiziraju u velikom broju tijekom svog normalnog razvoja kao odgovor na stresne uvjete (Belščak-Cvitanović, 2018; Würsh 1984). Razna biokativna svojstva proizlaze iz njihove strukturne različitosti, budući da sadrže jedan ili više aromatskih prestenova koji se razlikuju po stupnju hidroksilacije, metilacije i glikolizacije. Glavne skupine polifenolnih spojeva u rogaču su fenolna kiselina, galotanini i flavonoidi (Goulas i sur., 2016), od kojih Marakis i sur. (1993) navode katehine i proantocijanidine kao njihove glavne predstavnike. Istraživanja pokazuju da bi se rogač mogao okarakterizirati kao funkcionalna hrana ako uzmemo u obzir prisutnost mnogih antioksidativnih komponenata (npr. flavonoida) (Papaefstathiou i sur., 2018).

2.3.3.1. Fenoli i flavonidi

Fenoli su najzastupljeniji razred polifenola u plodovima rogača, s najvećim postotkom galne kiseline i njezinih derivata. Sa sadržajem između 23,7 mg 100 g⁻¹ and 164,7 mg 100 g⁻¹ galne kiseline, plod rogača je uz kesten i klinčić jedan od najbogatijih izvora galne kiseline. Flavonoidi su s druge strane najrazličitija skupina polifenolnih spojeva koji se na osnovu oksidacijskog stanja središnjeg prstena dijele na antocijane, flavonole, flavanale, flavone, flavanone i izoflavonoide. Plodovi rogača iznimno su bogati flavanolima koji su ujedno i najzastupljeniji flavonoidi u rogaču (Goulas i sur, 2016).

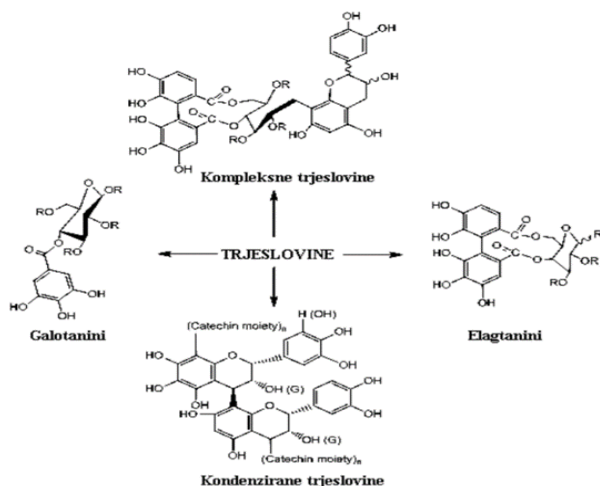
2.3.3.2. Tanini ili trjeslovine

Tanini se razlikuju od ostalih polifenolnih spojeva zbog svoje sposobnosti da se vežu na baze, proteine, pigmente, velike molekule i metalne ione. Ove karakteristike se koriste za kvantitativno i kvalitativno razlikovanje tanina pri analizi polifenola.

- **Struktura**

Prema strukturi, tanini se mogu podijeliti u na tanine koji hidroliziraju i na kondenzirane tanine (slika 7).

1. Tanini koji hidoliziraju u svojoj centralnoj strukturi imaju glukozu na koju se vežu molekule fenolnih kiselina (galna, heksahidrodifenolna ili elaginska kiselina) esterskim vezama. Djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima tanina, tanini postaju topljivi u vodi. Otapanjem nastaju fenolne kiseline koje su kriterij podijele tanina na galotanine koji su sastavljeni od galne kiseline i elaginotanina čija heksahidrodifenolna kiselina intraesterifikacijom daje elaginsku kiselinu.
2. Kondenzirani tanini ne hidroliziraju na jednostavnije molekule. U svojoj strukturi mogu imati preko 50 jedinica pa se ubrajaju u polimerne flavonoide. Predstavnicima ove skupine tanina su proantocijanidini koji daju antocijanidinske pigmente nakon oksidativnog cijepanja u vrućem alkoholu. Kada ih se ne tretira kiselinama ili enzimima, polimeriziraju i daju netopljive crvene produkte koji se nazivaju flobafeni (Hagerman, 2002; Vukičević, 2016).



Slika 7. Podjela trjeslovina odnosno tanina

▪ Tanini u rogaču

Tanini predstavljaju karakterističnu skupinu složenih polifenolnih spojeva rogača te doprinose njegovoj trpkosti (Miličević 2018; Goulas i sur. 2016). Pulpa rogača bogata je taninima od kojih su najzastupljeniji visoko kondenzirajući tanini s udjelom 16-20 %, dok je u listovima određena vrijednost od 0,7 % po suhoj tvari rogača (Markis i Kefalas, 2004; Marakis, 1996). Netopivi su i pojavljuju se u neporoznoj granularnoj formi, a s obzirom na visoki stupanj polimeriziranosti molekulska masa im može biti i do 32000 (Würsh, 1984). Nishira i Joslyn (1968) su u svojim istraživanjima izolirali čak devet vrsta hidrolizirajućih tanina iz mahune rogača čija struktura kod većine nije u potpunosti definirana. U soku rogača koncentracija tanina je deset puta veća nego u soku grožđa, a sazrijevanjem ploda rogača smanjuje se koncentracija tanina (Goulas i sur., 2016).

▪ Djelovanje i važnost

Tanini imaju snažnu antioksidativnu aktivnost zahvaljujući velikom broju hidroksilnih skupina u svojoj strukturi. Hidroksilne skupine veće molekulske mase imaju i veće antioksidacijsko djelovanje jer jače hvataju štetne slobodne radikale. Mnoge degenerativne bolesti poput multipla skleroze, raka, ateroskleroze povezane su s visokom koncentracijom slobodnih radikala između stanica koji se mogu neutralizirati taninima pa se oni smatraju najperspektivnijim spojevima za njihovo liječenje. Osim što su sami po sebi djelatne tvar, tanini također mogu sinergistički djelovati drugim aktivnim tvarima, pri čemu će imati utjecaja na terapijski učinak glavne aktivne komponente (Hagerman, 2002).

2.3.4. Važnost rogača

Owen i sur. (2003) su istraživanjima utvrdili da su vlakna rogača u odnosu na ostale mediteranske plodove, kao što su npr. masline, bogata fenolnim spojevima koji imaju snažnu antioksidativnu aktivnost. Unosom polifenola prehranom ima izuzetno pozitivan učinak na prevenciju dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, nekih vrst raka, ateroskleroze te degenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest i Alzheimer. Zbog brojnih zdravstvenih benefita, preporuča se prehrana bogata prirodnim antioksidansima, odnosno biljnim namirnicama bogatim polifenolima, a osobito flavonoidima. Kao jedna od takvih protektivnih namirnica mogao bi se koristiti rogač koji nije skupa sirovina, a nutritivno je bogat iskoristivim i značajnim komponentama (prehrambenim vlaknima i polifenolima). Nekoliko istraživanja pokazuju da pravilna i kontinuirana konzumacija rogača u prehrani može utjecati na sniženje ukupnog i LDL kolesterola kod pacijenata sa hiperkolesterolemijom (Makris i Kefalas; 2004, Dragojević Müller, 2017).

2.3.5. Upotreba i proizvodi od rogača

Posljednjih nekoliko godina povećava se zanimanje za rogač kao jeftina sirovina za proizvodnju različitih proizvoda pa se iz ekonomskih i ekoloških razloga svrstava u veoma važan dio vegetacije. U svijetu se na površini od 200 000 hektara proizvede oko 310 000 tona ploda rogača godišnje, a ostvareni prinosi su vrlo promjenjivi što ovisi o sorti, regiji i poljoprivrednim praksama. Iako je njihova priroda i važnost još uvijek slabo istražena, neka istraživanja su pokazala da se mahune rogača zbog svoje lake dostupnosti i niske cijene mogu koristiti u proizvodnji bioetanola ili kao supstrata u proizvodnji limunske kiseline (Markis i Kefalas, 2004).

Rogač je na tržištu dostupan u svježem i suhom obliku. Osim u proizvodnji jakih alkoholnih pića, plodovi i sjemenke rogača se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, a mljevene sjemenke u proizvodnji papira i za štavljenje kože (Papagiannopoulos i sur., 2004). Također, sjemenke se mogu iskoristiti u proizvodnji gume od rogača odnosno karauba guma koje sadrže polisaharid galaktomanan te se može dodati u različite proizvode kao prirodni zgušnjivač ili stabilizator (Markis i Kefalas, 2004). Rogač ima veliki značaj u prehrambenoj industriji gdje se koristi pri proizvodnji specijalnih vrsta kruha, slastica, kao zamjena za čokoladu, u pripremi brojnih napitaka, te u proizvodnji krmiva za prehranu stoke. Novija istraživanja upućuju na značajan antioksidativni potencijal ekstrakta mahune rogača koji je posljedica visokog udjela polifenolnih komponenti među kojima prevladavaju flavonolni glikozidi i hidrolizabilni tanini (Papagiannopoulos i sur., 2004).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Korištena sirovina u ovom radu su plodovi rogača (lat. *Ceratonia siliqua*) odnosno mahune koje su prikupljene na području Srednje Dalmacije (slika 8).



Slika 8. Plod rogača

3.1.2. Maceracija ploda rogača

Prije samog postupka maceracije sirovinu je potrebno pripremiti na način da se mahune rogača izlome na približno podjednake dijelove, dužine 5 cm. Izlomljene mahune rogača je potrebno izvagati da se dobije 6 odvaga čija masa iznosi približno 100 g i 6 odvaga čija masa iznosi približno 50 g. U velike staklene boce stavljaju se odvagane mase ploda rogača te se preliju s 500 mL prethodno pripremljenih vodeno-alkoholnih baza (30 %, 50 % i 70 % v/v etanolom). U vremenskom razdoblju od 4 tjedna, 6 uzoraka je macerirano u uvjetima bez prisutnosti svjetla, dok je preostalih 6 uzoraka macerata bilo izloženo izvoru danje svjetlosti (slika 9).



Slika 9. Maceracija na svjetlu (vlastita fotografija)

3.1.3. Uzorci macerata rogača

Tijekom 4 tjedna maceracije uzorcima macerata rogača (tablica 3) na tjednoj bazi određeni su ukupni fenoli (TPC), antioksidativna aktivnost te kromatske karakteristike.

Tablica 3. Karakteristike uzoraka macerata rogača

BROJ UZORKA	MASA MAHUNE ROGAČA [g]	VOLUMNI UDIO 96 % - TNOG ALKOHOLA	OMJER MASE ROGAČA I VOLUMENA VODENO-ALKOHOLNE BAZE	SVJETLO/TAMA
1	100,71	70%	1:5	TAMA
2	100,02	70%	1:5	SVJETLO
3	100,00	50%	1:5	TAMA
4	100,47	50%	1:5	SVJETLO
5	100,35	30%	1:5	TAMA
6	100,40	30%	1:5	SVJETLO
7	50,53	70%	1:10	TAMA
8	50,10	70%	1:10	SVJETLO
9	50,10	50%	1:10	TAMA
10	50,02	50%	1:10	SVJETLO
11	50,36	30%	1:10	TAMA
12	50,42	30%	1:10	SVJETLO

3.1.4. Kemikalije i reagensi

Za eksperimentalni dio rada korištene su slijedeće kemikalije i reagensi:

- Destilirana voda
- 96 %-tni etanol
- Folin – Ciocalteu reagens
- Bezvodni natrijev karbonat
- Kristali natrijeva karbonata
- Galna kiselina
- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ)
- Željezo (III) klorid
- Bezvodni natrijev acetat

- Ledena octena kiselina
- Trolox
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)

3.1.5. Uređaji

Za eksperimentalni dio rada korišteni su uređaji:

- UV/Vis spektrofotometar

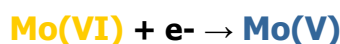
3.2. Metode rada

Nakon svakog tjedna maceracije (1.-4. tjedna), maceratima su određene slijedeći parametri: sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, antioksidacijska aktivnost FRAP i DPPH metodom te kromatske karakteristike prema CIE*Lab* sustavu.

3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa

- **Princip metode**

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa dvije kiseline, fosfomolibdene i fosfowolframove. U blago alkalnim uvjetima dolazi do oksidacije fenolnih tvari pri čemu se ove kiseline reduciraju u molibdenov oksid i wolframov oksid koji su plavo obojani.



Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 760 nm. O koncentraciji polifenola u uzorcima ovisi intenzitet nastalog plavog obojenja koji je direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Za prikazivanje rezultata koriste se određeni spojevi kao standardi od kojih je najčešće korištena galna kiselina (Singleton i sur., 1999).

- **Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola**

Ukupni fenoli u uzorcima macerata rogača određuju se na način da se u odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira 300 μ L uzorka (uzorci od 1., 2. i 3. tjedna su razrijeđeni 5 puta, uzorci od 4. tjedna su razrijeđeni 10 puta), 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Dodani sastojci u odmjernoj tikvici se dobro promiješaju i nakon 5 minuta se dodaje 1,5 mL natrijevog karbonata te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina natrijeva karbonata priprema se otapanjem 200 g bezvodnog natrijevog karbonata kuhanjem u 1 L destilrane vode nakon čega se otopina hladi. U ohlađenu otopinu se zatim dodaje nekoliko kristala natrijeva karbonata te se otopina profiltrira.

- **Postupak određivanja ukupnih fenola**

Na prethodno naveden način, za svaki uzorak se pripreme dvije paralele (ukupno 24 uzoraka) te jedna slijepa proba koja se priprema jednako kao i uzorci, ali umjesto 300 μ L uzorka se doda isti volumen destilirane vode (slika 10). Odmjerne tikvice se čuvaju na tamnom mjestu, na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 2 sata. Nakon 2 sata, uzorci se analiziraju spektrofotometrijski mjerenjem apsorbanacije pri 760 nm.

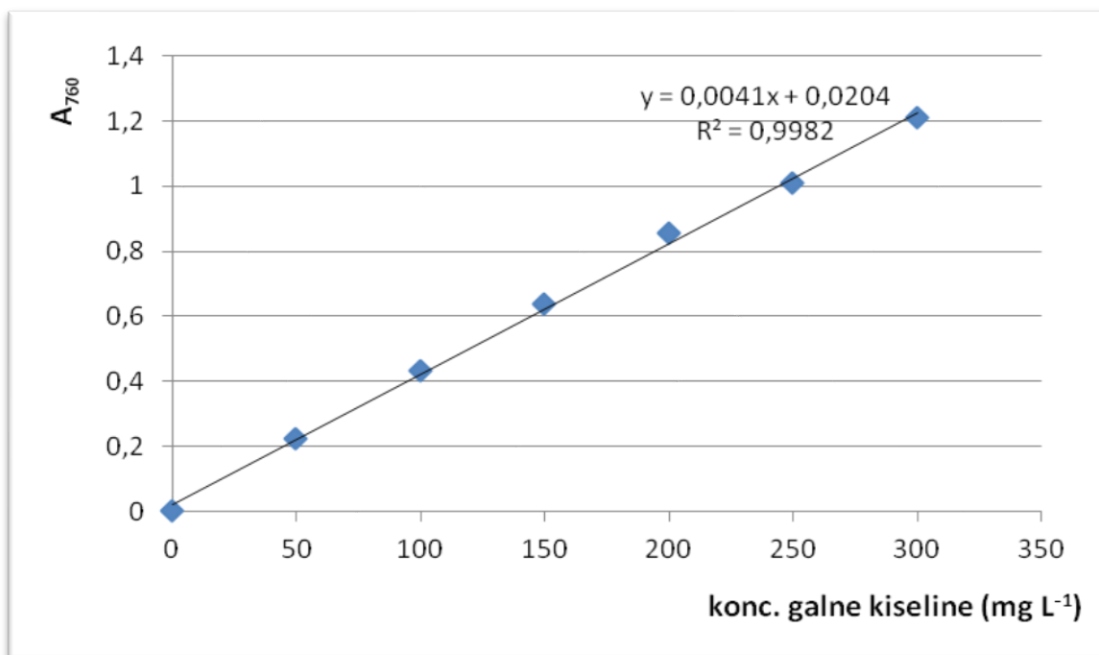


Slika 10. Pripremljene otopine za analizu (vlastita fotografija)

- **Izrada baždarnog dijagrama za određivanje ukupnih fenola**

Da bi se konstruirao baždarni dijagram potrebno je izvagati 0,5 g standarda, galne kiseline u tikvici od 50 mL. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom i od tako pripremljene otopine galne kiseline, rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 50 mL koncentracija 100, 150, 200, 250 i 300 mg L⁻¹ galne kiseline. U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 300 μ L od svake koncentracije, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode te se sadržaj tikvice dobro promiješa. Nakon 5 minuta nadodaje se 1,5 mL natrijevog karbonata te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom. Pripremljeni uzorci se također čuvaju 2 sata na tamnom mjestu i

pri sobnoj temperaturi, nakon čega se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija pri 760 nm. Na temelju izmjerenih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}) o apsorbanciji (slika 11).

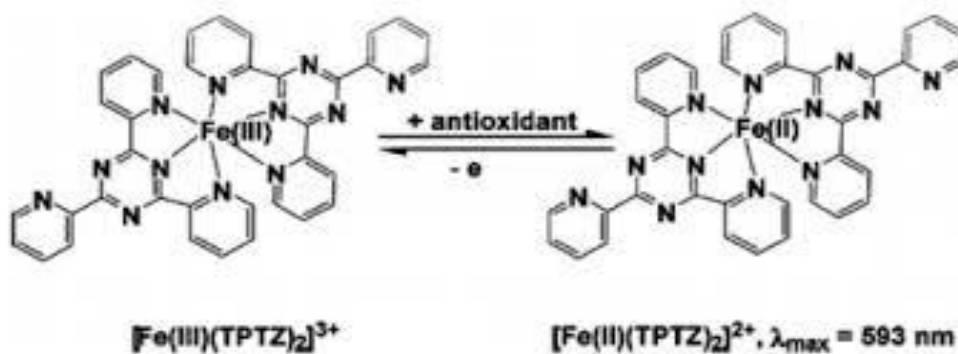


Slika 11. Baždarni dijagram za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva pomoću Folin-Ciocalteu reagensa

3.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

- **Princip metode**

FRAP je kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti koja se temelji na reakciji redukcije žuto obojanog kompleksa željzo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (slika 12). Fe^{3+} ioni iz Fe(III) (TPTZ)_2 kompleksa reduciraju se u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina dajući plavo obojani produkt koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie i Strain, 1999).



Slika 12. Redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)

FRAP analiza se treba provoditi u kiselom području pH, pri pH = 3,6, kako bi se održala dobra topivost željeza i ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a istodobno se povećava redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Štoler, 2017). U FRAP metodi nije potrebno prethodno tretirati uzorak, a rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ ekvivalenta (Fe)/mL uzorka (Benzie i Strain, 1996).

▪ **Priprema otopina za određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom**

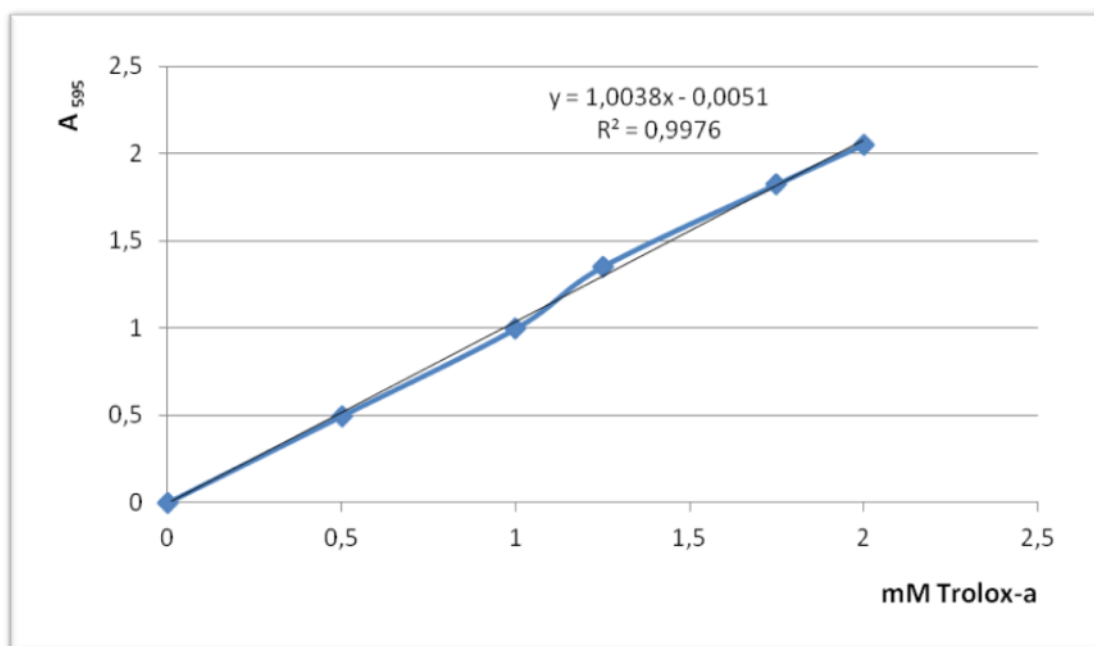
Ispitivanje antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u uzorcima macerata rogača započinje pripremom FRAP reagensa koji se dobiva miješanjem 50 mL acetatnog pufera, 5 mL 10mM otopine TPTZ reagensa i 5 mL 20 mM otopine željezovog (III)-klorida. Acetatni pufer se dobije otapanjem 0,93 grama bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata u 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL. Nakon otapanja tikvica se do oznake nadopuni s destiliranom vodom. 10 mM TPTZ reagens priprema se vaganjem 0,0312 grama TPTZ-a u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se potom nadopuni do oznake s 40 mM HCl. Otopina željezovog (III)-klorida priprema se vaganjem 0,0541 grama željezovog (III) klorida u odmjernu tikvicu od 10 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

- **Postupak određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom**

Nakon što su sve komponente FRAP reagensa pripremljene, u odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 2080 μL FRAP reagensa, 80 μL uzorka (uzorci od 1. tjedna su razrijeđeni 5 puta, uzorci od 2. i 3. tjedna su razrijeđeni 10 puta, a uzorci od 4. tjedna su razrijeđeni 20 puta) i 240 μL destilirane vode. Na ovaj način se za svaki uzorak pripreme dvije paralele (ukupno 24 uzoraka) te jedna slijepa proba koja se priprema jednako kao i uzorci, ali umjesto uzorka dodaje se 80 μL etanola. Sadržaji tikvica se dobro promiješaju te se stavljaju u termostat na 37 °C. Nakon 5 minuta termostatiranja, uzorci se analiziraju spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 595 nm.

- **Izrada baždarnog dijagrama**

Postupak izrade baždarnog dijagrama identičan je protokolu za pripremu uzoraka kojima se određuje antioksidativna aktivnost, ali razlika je u tome što se umjesto uzorka dodaju pripremljene otopine standarda Trolox-a različitih koncentracija. Prvo je potrebno pripremiti 2,5 mM otopinu Trolox-a u etanolu. Iz tako pripremljene otopine Trolox-a, rade se razrijeđenja koncentracija 0,5; 1,0; 1,25; 1,75; 2,0 mM kojima se potom mjeri apsorbancija pri 595 nm. Iz izmjerenih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram na način da se na os apcisu nanesu koncentracije standardne otopine Trolox-a (mM), a na os ordinatu izmjerene apsorbancije pri 595 nm (slika 13).

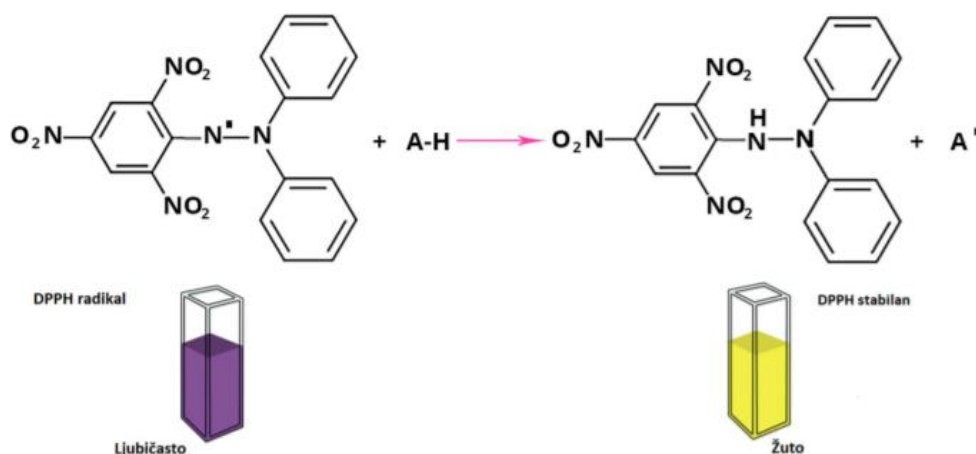


Slika 13. Baždarni dijagram za određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

3.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

- **Princip metode**

DPPH metoda je kao i FRAP metoda, kolorimetrijska metoda kojom se određuje antioksidativni kapacitet određenog spoja praćenjem reakcije između stabilnog DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazila) i uzorka kojemu se mjeri antioksidativna aktivnost. Reakcija se temelji na redukciji stabilnog DPPH radikala iz DPPH• u DPPH₂ u metanolnoj otopini prilikom primanje protona od strane antioksidansa pri čemu ljubičasto obojenje prelazi i žuto (slika 14). Stabilni DPPH radikal pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm) zbog nesparenog elektrona (Kazazić, 2004). U prisutnosti elektron donora, antioksidansa koji hvata slobodne radikale dolazi do sparivanja DPPH radikala i protona što je popraćeno smanjenjem apsorbcije pri 517 nm (Blois, 1958; Brand – Williams i sur., 1995).



Slika 14. Reakcija redukcije DPPH radikala

Postotak inhibicije DPPH radikala u uzorcima macerata rogača računa se prema jednadžbi (1):

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

A_0 – apsorbanacija otopine DPPH radikala

A_t – apsorbanacija reakcijske smjese

▪ **Priprema otopina za određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom**

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u uzorcima macerata rogača DPPH metodom potrebno je pripremiti DPPH reagens otapanjem 0,0394 grama DPPH s 96 % etanolom u tikvici od 10 mL. Od ove ishodne otopine, svaki novi dan analize tokom rada se pripremi svježa 0,2 mM otopina DPPH reagensa tako da se u odmjernu odpipetira 1 mL originalne otopine, a tikvica se nadopuni do oznake s 96 % etanolom. Postupak pripreme uzoraka za analizu je prikazan niže u tablici (tablica 4).

Tablica 4. Postupak pripreme uzoraka za analizu DPPH metodom

UZORCI	PRIPREMA UZORKA	PRIPREMA A0	PRIPREMA TROLOX-A	TROLOX
1. tjedan razrijeđeni 10 puta	2 mL etanola	2 mL etanola	2 mL etanola	0,05 mM
	200 μ L uzorka	200 μ L etanola	200 μ L Trolox-a	
	2 mL DPPH reagensa	2 mL DPPH reagensa	2 mL DPPH reagensa	
<hr/>				
2., 3. i 4. tjedan razrijeđeni 20 puta	2 mL etanola	2 mL etanola	2 mL etanola	0,05 mM
	200 μ L uzorka	200 μ L etanola	200 μ L Trolox-a	
	2 mL DPPH reagensa	2 mL DPPH reagensa	2 mL DPPH reagensa	

▪ **Postupak određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom**

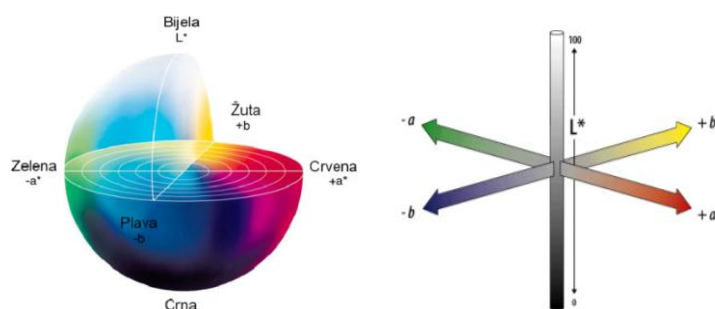
Za svaki uzorak se pripreme dvije paralele postupkom prikazanim u tablici 4. Nakon 30 minuta, pripremljenim uzorcima (slika 15) se spektrofotometrijski određuje antioksidativna aktivnost mjerenjem apsorbanicije pri 517 nm, a postotak inhibicije se računa prema jednadžbi (1).



Slika 15. Pripremljene otopine za analizu (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje kromatskih karakteristika

Spektrofotometrijskom metodom pomoću *CIELab* susutava određeni su kromatski parametri u uzorcima macerata rogača. *CIELab* susutav se temelji na stvarnom vrednovanju boju dajući uvid u trodimenzionalan prostorni raspored boja (slika 16) koji je najbliži vizualnoj percepciji ljudskoga oka. Boja vina ili nekog drugog pića opisuje se sa 3 specifična parametra-tonalitet, kromatičnost i svjetlina. Tonalitet odnosno sama boja je najkarakterističnija osobina i može biti crvena, žuta, zelena ili plava. Razina obojenja odnosno kromatičnost je u korelaciji s intenzitetom boje dok je svjetlina parametar kojim se određuje je li piće više ili manje blistavo (OIV, 2006). *CIELab* sustav sadrži tri koordinate x , y , z . Osi x i y su kromatske i prikazuju raspon između zelene i crvene boje ($-a^*$ do a^*) te između plave i žute boje ($-b^*$ do b^*). Os z je akromatska i prikazuje vrijednost svjetline L^* (luminance) od 0 % do 100 %, pri čemu se 0 % odnosi na crnu, a 100% na bijelu. U tablici 5 su prikazani kromatski parametri koji su određeni na temelju dobivenih vrijednosti pri čemu C i h određuju ton boje. Brojčane vrijednosti dobivene ovi kolornim sustavom prikazuju sve boje koje ljudsko oko može vizualno percipirati (Petrović i sur., 2013).



Slika 16. CIE*Lab* sustav

Tablica 5. Prikaz kromatskih karakteristika

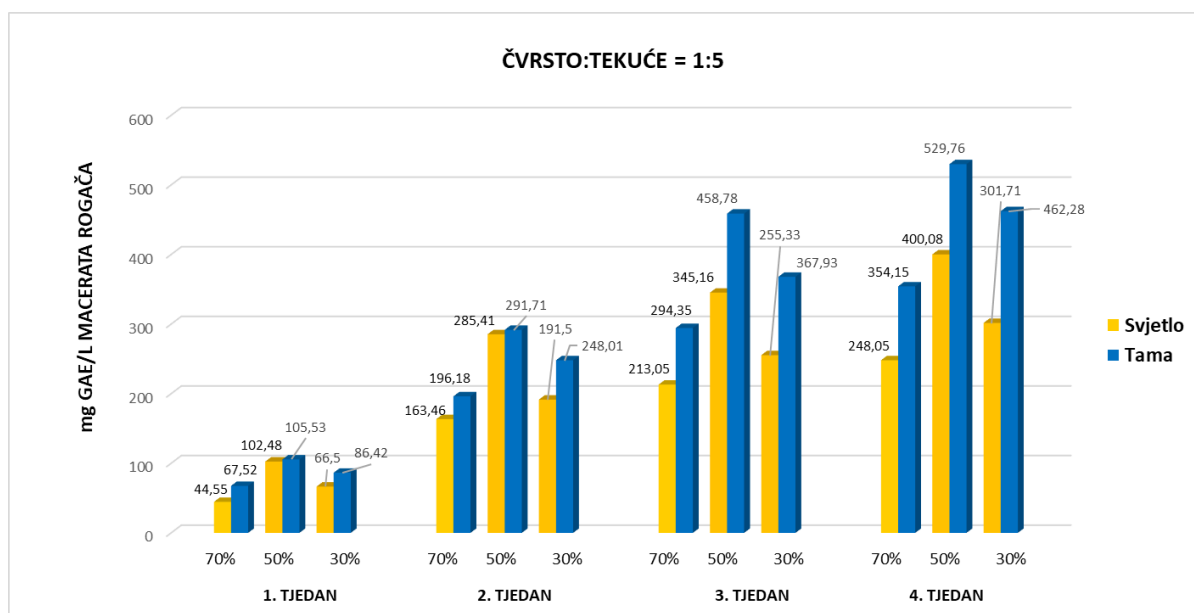
KROMATSKA KARAKTERISTIKA	OZNAKA	INTERVAL I ZNAČENJE
Svjetlina	L	0-100, 0-crno, 100-prozirno
Komponenta crvene/zelene boje	a	nema intervala, >0 crvena boja <0 zelena boja
Komponenta plave/žute boje	b	nema intervala, >0 žuta boja <0 plava boja
Zasićenje boje	C	
Kut boje	h	0 – 360°

4. REZULTATI I RASPRAVA

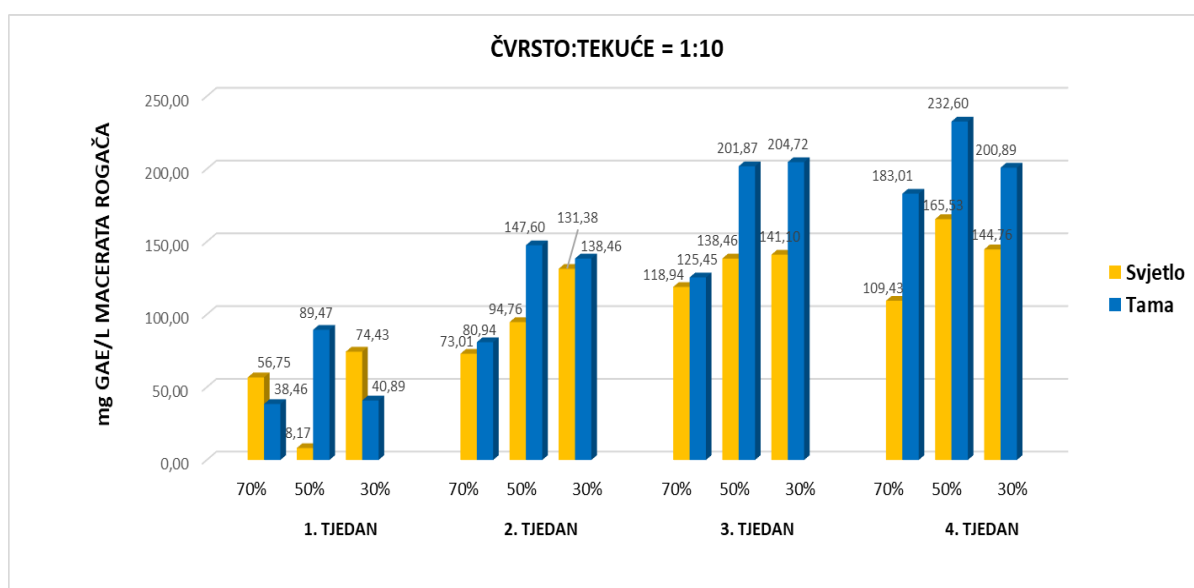
Liker od rogača je jako alkoholno piće koje se proizvodi maceracijom plodova, mahuna rogača u vodeno-alkoholnoj bazi. U ovom radu istraženo je kako uvjeti u kojima se provodi postupak maceracije utječu na ukupne fenole i antioksidativnu aktivnost te kromatske karakteristike macerata rogača koji se koristi kao baza u proizvodnji likera od rogača. Proučavani parametri su vrijeme maceracije u periodu od 4 tjedna, volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi (30 %, 50 % i 70 % v/v etanola), omjer rogača i vodeno-alkoholne baze (1:5 i 1:10) te izloženost svjetlu odnosno tami. U 12 uzoraka macerata rogača s različitim masom rogača (50 g i 100 g rogača u 500 mL vodeno-alkoholne baze) i različitim vodeno-alkoholnom bazom (30 %, 50 % i 70 % - tnm v/v etanolom), spektrofotometrijskim metodama određeni su ukupni fenoli pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, antioksidativna aktivnost (FRAP i DPPH metodom) te kromatske karakteristike.

4.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima određen je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Dodatkom reagensa mijenja se obojenje otopine iz žuto u plavo, a intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 760 nm. Dobivene apsorbancije se zatim preračunaju na koncentracije ukupnih fenola koje se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline u mg po litri macerata rogača. Slike 17 i 18 prikazuju koncentracije ukupnih fenola u uzorcima s obzirom na prethodno navedene uvjete maceracije.



Slika 17. Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:5



Slika 18. Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:10

Jedan od parametara koji utječe na koncentraciju ukupnih fenola je vremenski period trajanja procesa maceracije. U svih 12 uzoraka tijekom prva dva tjedna maceracije dolazi do značajnog povećanja ukupnih fenola, dok se u trećem i četvrtom tjednu bilježi blagi porast. Nakon trećeg tjedna maceracije, koncentracija fenola se ustaljuje u gotovo svim uzorcima, a u samo dva uzorka s omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:10, s volumnim udjelom alkohola 70 % i izloženim svjetlu te volumnim udjelom alkohola 30 % i bez prisutnosti svjetla dolazi do laganog opadanja koncentracije.

Količina bilja koja se koristi za maceraciju, također utječe na koncentraciju ukupnih fenola u uzorcima macerata rogača. Uzorci s većom masom rogača (1:5 omjer čvrsto:tekuće) pokazuju i veći porast koncentracije ukupnih fenola kroz 4 tjedna maceracije u odnosu na uzorke s manjom masom rogača (1:10 omjer čvrsto:tekuće).

Različita koncentracija etanola u vodeno-alkoholnoj bazi je treći parametar maceracije koji utječe na različitu koncentraciju ukupnih fenola uzoraka. Omjer alkohola i vode 1:1 najbolje odgovara ekstrakciji fenola, budući da se pri tom omjeru najbolje ekstrahiraju komponente koje su manje topive od vode, a jače topive od alkohola, u ovom slučaju fenolni spojevi (Stanciu i sur., 2019). Iz tog razloga u gotovo svim uzorcima s 50 % etanola su izmjerene najveće apsorbancije odnosno najveće koncentracije ukupnih fenola. Dobivene rezultate potvrđuju Stancia i sur. (2019) koji su maceracijom lavande u dvije različite vodeno-alkoholne baze dobili najveću koncentraciju fenolnih spojeva u onoj s volumnim udjelom metanola od 50 % .

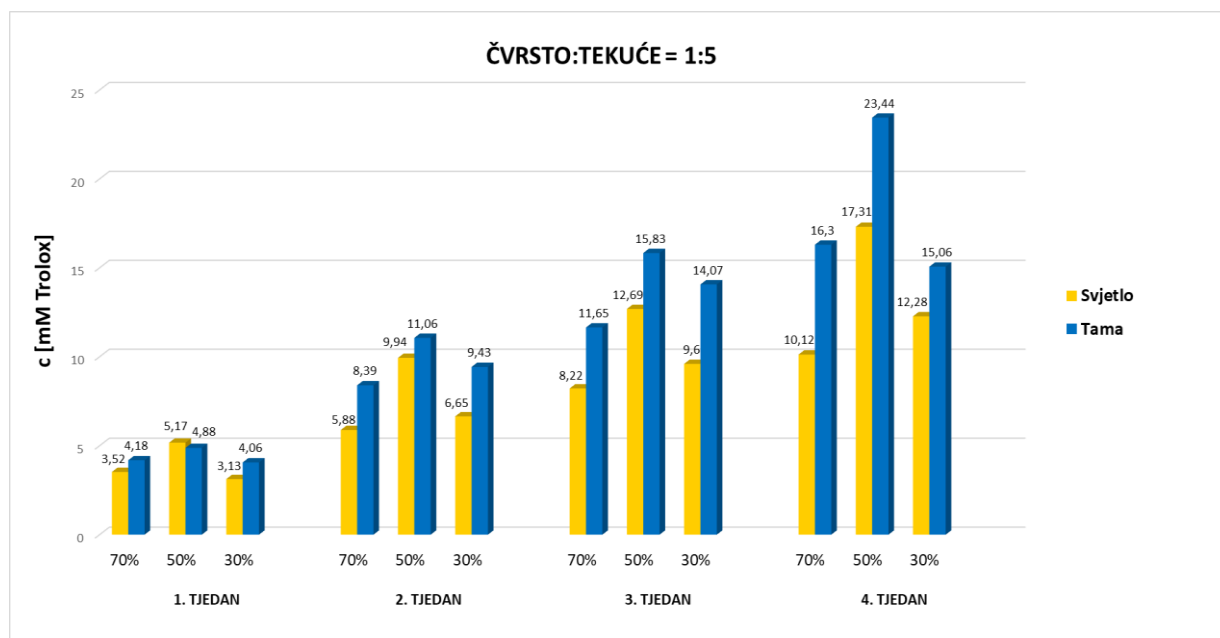
Macerati rogača kod kojih je proces maceracije proveden u tami, pokazuju veću koncentraciju ukupnih fenola tijekom sva 4 tjedna maceracije u odnosu na macerate koji su bili izloženi danjem svjetlu s istim udjelom alkohola i omjerom čvrsto:tekuće. Maceriranjem u tami sprječavaju se neželjene reakcije razgradnje fenolnih spojeva kako bi njihova koncentracija bila što veća na kraju postupka.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da u svih 12 uzoraka dolazi do povećanja koncentracije ukupnih fenola tijekom 4 tjedna maceracije što je i očekivano, budući da s produljenjem vremena maceracije dolazi do ekstrahiranja i veće količine tvari aroma i bioaktivnih tvari u koje se ubrajaju fenoli. U uzorcima s omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5, najmanju koncentraciju ukupnih fenola ima uzorak maceriran u svjetlosnim uvjetima s volumnim udjelom alkohola 70 % i ona iznosi 248,05 mg GAL L⁻¹, dok najveću koncentraciju ukupnih fenola od 529,76 mg GAL L⁻¹ ima uzorak maceriran u tami, s 50 %-tnim volumnim udjelom etanola u vodeno-alkoholnoj bazi. Isti trend vrijedi i za uzorke s omjerom 1:10 (čvrsto:tekuće). Dobiveni

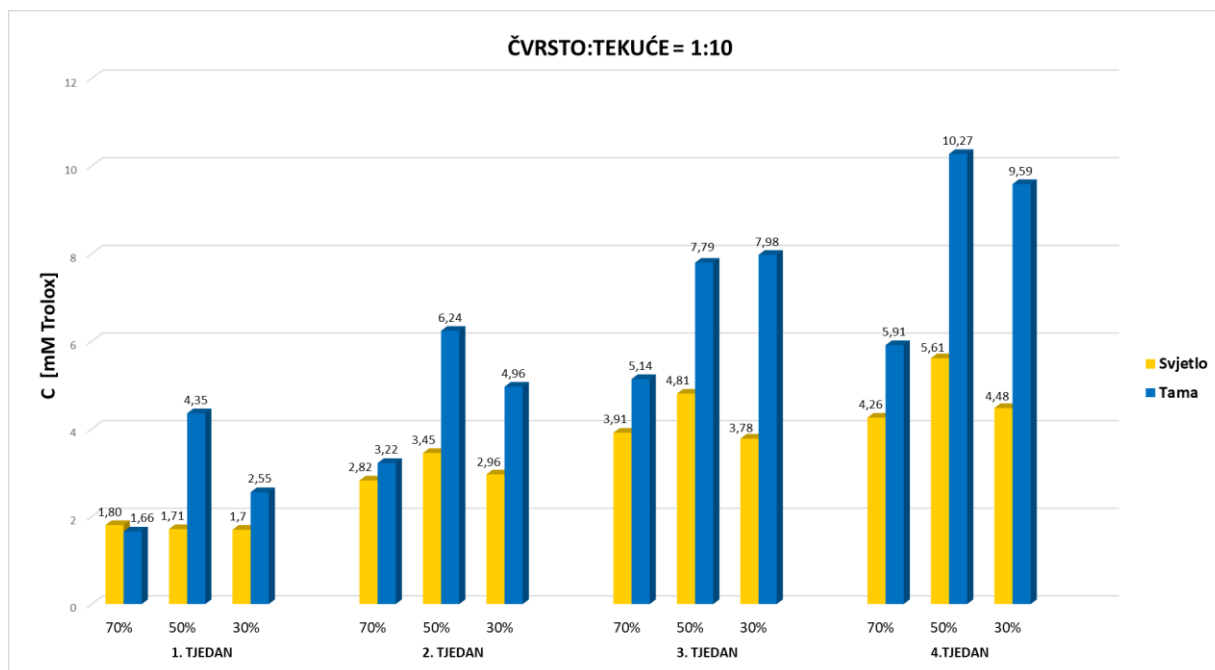
rezultati su u skladu s istraživanjem kojega su proveli Hanousek Čiča i sur. (2020) koji su određivali optimalne uvjete maceracije za dobivanje senzorski i nutritivno vrijednog macerata. Utvrđeno je da su uvjeti maceracije 6-8 tjedana pri sobnoj temperaturi, bez prisutnosti svjetla, s vodeno-alkoholnom bazom koja sadrži 50 % etanola i omjerom 1:5 (čvrsto:tekuće) optimalni za dobivanje kvalitetnog macerata rogača (Hanousek Čiča i sur., 2020). S druge strane, Paz i sur. (2014) naglašavaju maceraciju voća, višanja u svjetlosnim uvjetima također pri sobnoj temperaturi.

4.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je spektrofotometrijski pomoću FRAP reagensa koji sadrži TPTZ kompleks. U uzorcima macerata rogača prisutni su antioksidansi koji reduciraju ione željeza iz žuto obojanog Fe(III) (TPTZ)₂ kompleksa pri čemu nastaje plavo obojani produkt. Intenzitet nastalog plavog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm. Izmjerene apsorbancije se zatim preračunaju na koncentracije mM Trolox-a koji se koristi kao standard. Dobiveni rezultati su izraženi kao mM Trolox-a i prikazani su na slikama 19 i 20.



Slika 19. Antioksidativna aktivnost (mM Trolox) u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:5



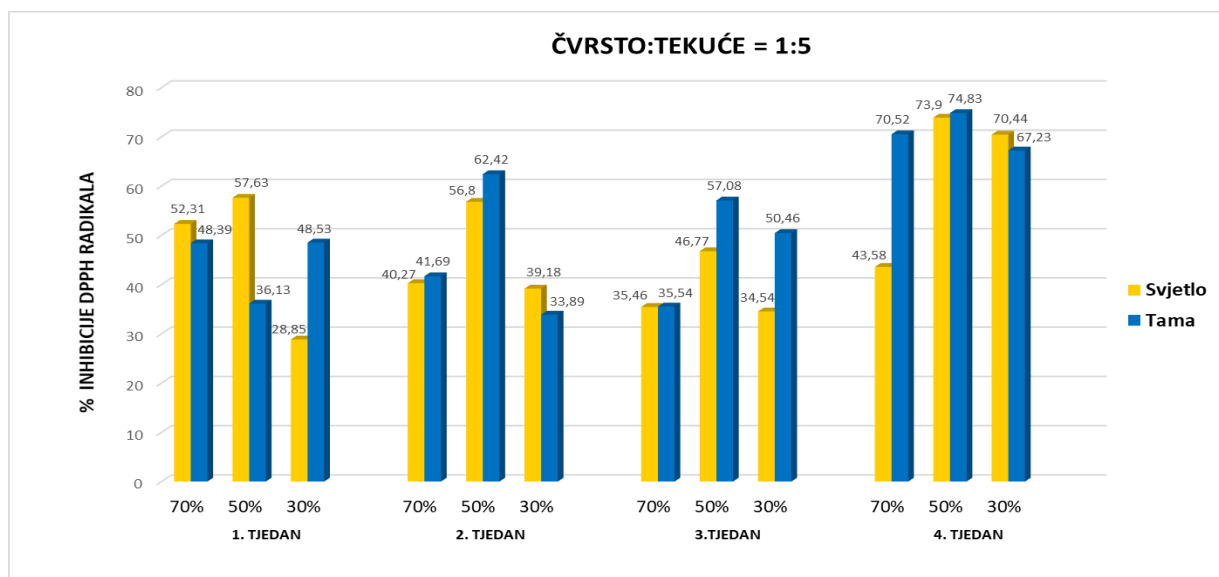
Slika 20. Antioksidativna aktivnost (mM Trolox) u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:10

Uzorci s omjerom mase rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5 sadrže više ukupnih fenola pa pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke s omjerom 1:10. Ovakvi rezultati su očekivani budući da uzorci s većom masom rogača imaju i veću koncentraciju ukupnih fenola koji su jaki antioksidansi. U prilog tome ide i istraživanje kojime su Hanousek Čiča i sur. (2020) ustanovili da jednaki omjer vode i alkohola pospješuje ekstrakciju fenola iz rogača.

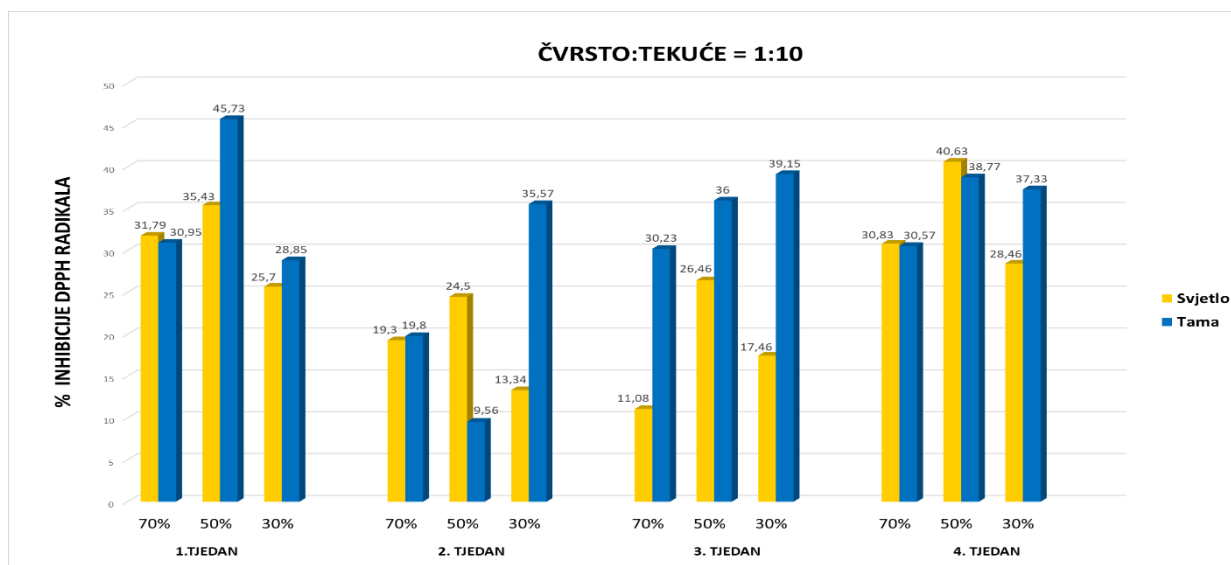
Fenoli kao jaki antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale i štite stanice od oksidativnog stresa. Svi macerati rogača s volumnim udjelom alkohola od 50 % tijekom 4 tjedna maceracije pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke s 30 % i 70 % v/v etanola. Uzorak čija koncentracija ukupnih fenola iznosi 529,76 mg GAL L⁻¹ u uvjetima maceracije bez svjetla, s 50 %-tnim volumnim udjelom etanola u vodeno-alkoholnoj bazi i omjerom 1:5 pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost nakon 4 tjedna maceracije i iznosi 23,44 mM Trolox-a. Dobivena antioksidativna aktivnost je približno jednaka vrijednosti dobivenoj istraživanjem Hanousek Čiča i sur. (2020), koja iznosi 25,32 ± 0,48 mM Trolox-a. Tijekom istraživanja napravljena je korelacijska analiza ukupnih fenola u maceratima rogača i antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom te je izračunat faktor R (0,915) koji pokazuje pozitivnu korelaciju ta dva parametra. Tijekom 4 tjedna maceracije, svim uzorcima je zabilježen porast antioksidacijske aktivnosti s porstom koncentracije ukupnih fenola koja je maksimalna nakon četvrtog tjedna kada je u uzorcima i prisutna najveća koncentracija ukupnih fenola.

4.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

DPPH metodom je također spektrofotometrijski određena antioksidativna aktivnost u uzorcima macerata rogača. U prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije stabilnog DPPH radikala pri čemu nestaje ljubičasto obojenje otopine. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm. 0,05 mM Trolox se koristi kao standard čiji postotak inhibicije DPPH radikala iznosi 48,34 %. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije DPPH radikala (slika 21 i 22) koji se računa prema formuli (1).



Slika 21. Antioksidativna aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:5



Slika 22. Antioksidativna aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) u uzorcima s omjerom čvrsto:tekuće = 1:10

Kao i kod FRAP metode, uzorci s omjerom mase rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5 pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke s omjerom 1:10. Većina macerata rogača s volumnim udjelom alkohola od 50 % tijekom 4 tjedna pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke s 30 % i 70 % v/v etanola.

Nakon četvrtog tjedna maceracije, svi uzorci imaju veći postotak inhibicije u odnosu na prethodne tjedne. Takav rezultat je i očekivan, budući da je koncentracija ukupnih fenola u svim uzorcima najveća upravo nakon četvrtog tjedna. Tijekom prvih 3 tjedna maceracije, stupanj inhibicije varira kod svih uzoraka osim kod uzorka koji je maceriran u tami s 50%-tnim volumnim udjelom etanola u vodeno-alkoholnoj bazi i omjerom 1:5. Taj uzorak sadrži najveću koncentraciju ukupnih fenola i pokazuje porast antioksidativne aktivnosti kroz sva 4 tjedna maceracije i ovom metodom. Najveću antioksidativnu aktivnost postiže nakon 4 tjedna kada stupanj inhibicije iznosi 74,83 %. Rodríguez-Solana i sur. (2014) istražili su antioksidativnu aktivnost likera rogača proizvedenih s različitim sortama mahuna rogača koje nisu pržene i mahune pržene pri 150 °C i 120 °C kako bi se povećao sadržaj ukupnih fenola i antioksidativnost likera. Likeri s mahunama koje su pržene pri nižoj temperaturi (120 °C), nakon 3 tjedna maceracije pokazuju veći stupanj inhibicije DPPH radikala u rasponu od $74,69 \pm 0,93$ do $84,63 \pm 0,39$ % inhibicije od likera čije su mahune pržene pri višoj temperaturi. Iako su dobiveni postoci inhibicije relativno visoki, još uvijek su niži od vrijednosti u likerima s neprženim mahunama čiji je postotak inhibicije bio veoma visok ($90,55 \pm 0,33$ % inhibicije).

Koncentracija ukupnih fenola određena spektrofotometrijski u uzorcima macerata rogača, može se usporediti s antioksidacijskom aktivnošću koja je također određena spektrofotometrijski, FRAP i DPPH metodom. Antioksidativna aktivnost trebala bi ovisiti o koncentraciji ukupnih fenola, budući da su to spojevi nosioci antioksidativne aktivnosti. Porast koncentracije ukupnih fenola u uzorcima, u korelaciji je s porastom antioksidativne aktivnosti kod FRAP metode. Nakon četvrtog tjedna maceracije, uzorak (karakteristike uzorka: omjer 1:5, 50 % v/v etanola, tama) s najvećom koncentracijom ukupnih fenola koja iznosi $529,76 \text{ mg GAL L}^{-1}$, FRAP metodom izmjerena je i najveća antioksidativna aktivnost od 23,44 mM Trolox-a. Kod DPPH metode dolazi do odstupanja rezultata u nekim uzorcima, ali uzorak s najvećom koncentracijom ukupnih fenola i ovdje pokazuje najveći antioksidativni kapacitet sa 74,83 %-tnim stupnjem inhibicije DPPH radikala. Kao razlog odstupanja rezultata Rodríguez-Solana i sur. (2014) kao mogući uzrok navode fenolnu oksidaciju do koje dolazi s vremenom maceracije i izloženosti svjetlu. Nakon 4 tjedna maceracije, uzorak s najmanjom koncentracijom ukupnih fenola, $109,43 \text{ mg GAL L}^{-1}$ pokazuje i najmanju antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom (4,26 mM Trolox-a). Dobiveni rezultati su veoma slični rezultatima Hanousek Čiča i

sur. (2020) koji su istražili uvjete za maceraciju rogača u svrhu dobivanja macerata rogača sa što više tvari arome i bioaktivnih tvari u koje se ubrajaju i fenoli. Uzorak koji se izdvaja u svim provedenim analizama kako ovdje tako i kod Hanousek Čiča i sur. (2020) maceriran je u uvjetima bez svjetla s 50 %-tnim v/v etanola te omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5. Kroz sva 4 tjedna maceracije pri sobnoj temperaturi pokazan je porast koncentracije ukupnih fenola te najveća koncentracija ukupnih fenola koja je u korelaciji s najjačom antioksidativnom aktivnošću izmjerenom i FRAP i DPPH metodom. Prethodno navedeni uvjeti maceracije pokazani su optimalnima za dobivanje kvalitetnog macerata rogača koji se može koristiti za proizvodnju likera od rogača.

4.4. Kromatske karakteristike

Kolorimetrom su prema CIELab sustavu izmjerene kromatske karakteristike macerata rogača tijekom 4 tjedna maceracije. Dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 6 i 7.

Tablica 6. Dobivene kromatske karakteristike uzoraka na svjetlu

VRIJEME MACERACIJE	OPIS UZORKA	KROMATSKE KARAKTERISTIKE				
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>h</i>
1. TJEDAN	70% 1:5	-1,35	10,31	97,13	10,4	-1,44
	70% 1:10	-0,97	5,57	100,54	5,66	-1,40
	50% 1:5	-1,33	19,34	94,75	19,39	-1,50
	50% 1:10	-0,94	8,69	97,74	8,74	-1,46
	30% 1:5	-1,03	9,20	97,59	9,26	-1,46
	30% 1:10	-1,26	16,52	95,09	16,57	-1,49
2. TJEDAN	70% 1:5	-1,91	16,87	96,31	16,98	-1,46
	70% 1:10	-1,31	10,18	97,44	10,26	-1,44
	50% 1:5	-0,54	30,04	91,27	30,05	-1,55
	50% 1:10	-1,12	14,27	96,11	14,31	-1,49
	30% 1:5	-1,23	15,57	95,67	15,61	-1,49
	30% 1:10	-1,22	24,57	93,52	24,6	-1,52
3. TJEDAN	70% 1:5	-1,73	22,47	94,43	22,54	-1,49
	70% 1:10	-1,61	13,79	96,68	13,88	-1,45
	50% 1:5	1,46	37,89	89,00	37,92	1,53
	50% 1:10	-0,99	19,80	94,72	19,83	-1,52
	30% 1:5	-1,08	20,99	94,04	21,02	-1,52
	30% 1:10	0,10	32,08	90,68	32,08	1,57
4. TJEDAN	70% 1:5	-1,25	25,78	93,65	25,81	-1,52
	70% 1:10	-1,27	15,76	95,82	15,81	-1,49
	50% 1:5	3,71	42,63	86,42	42,79	1,48
	50% 1:10	-0,49	23,76	93,32	23,76	-1,55
	30% 1:5	-0,66	26,09	92,39	26,10	-1,55
	30% 1:10	1,88	37,43	88,38	37,48	1,52

Tablica 7. Dobivene kromatske karakteristike uzoraka u tami

VRIJEME MACERACIJE	OPIS UZORKA	KROMATSKE KARAKTERISTIKE				
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>h</i>
1. TJEDAN	70% 1:5	-2,36	13,80	97,57	14,00	-1,40
	70% 1:10	-1,06	7,09	98,26	7,17	-1,42
	50% 1:5	-1,56	21,01	95,08	21,06	-1,50
	50% 1:10	-1,61	20,82	94,89	20,88	-1,49
	30% 1:5	-1,61	20,73	95,16	20,79	-1,49
	30% 1:10	-1,08	13,75	95,44	13,79	-1,49
2. TJEDAN	70% 1:5	-3,21	22,82	96,02	23,04	-1,43
	70% 1:10	-1,79	12,05	97,77	12,19	-1,42
	50% 1:5	-0,09	35,57	90,76	35,57	-1,57
	50% 1:10	-1,55	21,31	94,59	21,37	-1,50
	30% 1:5	-0,71	33,05	91,55	33,06	-1,55
	30% 1:10	-0,91	21,43	94,56	21,45	-1,53
3. TJEDAN	70% 1:5	-2,70	31,87	93,13	31,99	-1,49
	70% 1:10	-2,09	17,40	96,56	17,53	-1,45
	50% 1:5	3,80	49,54	85,59	49,69	1,49
	50% 1:10	-0,50	28,76	92,61	28,77	-1,55
	30% 1:5	2,11	43,31	86,03	43,36	1,52
	30% 1:10	0,31	29,04	90,80	29,04	1,56
4. TJEDAN	70% 1:5	-2,05	36,91	91,07	36,97	-1,51
	70% 1:10	-2,13	21,07	95,29	21,17	-1,47
	50% 1:5	6,34	54,18	83,36	54,55	1,45
	50% 1:10	0,07	32,19	91,54	32,19	1,57
	30% 1:5	4,56	49,27	84,36	49,48	1,48
	30% 1:10	1,36	33,39	90,14	33,42	1,53

L-vrijednost je parametar svjetline koji se kreće u rasponu od 100,54 na početku maceracije do 84,36 na kraju procesa maceracije. Na svjetlinu uzorka utječe količina maceriranog bilja pa u uzorcima s većom masom rogača (omjer 1:5) svjetlina opada. *a* i *b* parametri daju informaciju o boji uzoraka. Gotovo sve *a* vrijednosti su negativne i tek nakon četvrtog tjedna maceracije postaju pozitivne za neke od uzoraka što ukazuje na promjenu boje iz područja zelene u crvenu. *b* vrijednosti su pozitivne i rastu tijekom cijelog perioda trajanja maceracije u rasponu od 7,09 do 54,18 pa uzorci s vremnom poprimaju žuto-narančastu boju. Najveću *a* i *b* vrijednost imaju uzorci s volumnim udjelom etanola 50 % i 30 % , omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5 sa i bez prisutnosti svjetla. Nakon 4 tjedna maceracije, svi uzorci poprimaju narančasto do smeđu boju. Dobivene vrijednosti kromatskih parametara slične su vrijednostima koje su dobili Hanousek Čiča i sur. (2020) u čijim uzorcima također prevladavaju žute nijanse. Parametri *C* i *h* određuju ton boje te kao i za *b* vrijednosti, najveće su u uzorcima s volumnim udjelom etanola 50 % i 30 % i omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5.

5. ZAKLJUČAK

- Koncentracija ukupnih fenola raste u svim uzorcima kroz 4 tjedna maceracije, a najveća koncentracija se postiže nakon 4 tjedna maceracije. Uzorak koji je maceriran u tami, s omjerom rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5 te s 50 %-tnim v/v etanola u vodeno-alkoholnoj bazi ima najveću koncentraciju ukupnih fenola, 529,76 mg GAL L⁻¹.
- Mahuna rogača je bogata fenolima koji kao jaki antioksidansi hvataju slobodne radikale i smanjuju oksidativni stres stanica. Uzorak s najvećom koncentracijom ukupnih fenola čije su karakteristike maceracija u tami, omjer rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5 te 50 %-tni volumen alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi, pokazuje najjaču antioksidativnu aktivnost izmjerenu FRAP i DPPH metodom.
- Uzorci macerirani u tami sadrže veću koncentraciju ukupnih fenola, a samim time imaju i jaču antioksidativnu aktivnost jer ne dolazi do razgradnje biološki aktivnih molekula u koje se ubrajaju i fenolni spojevi.
- Jednaki omjer vode i alkohola u vodeno-alkoholnoj omogućiti će bolju ekstrakciju tvari arome i bioaktivnih tvari iz macerata rogača u vodeno-alkoholnu bazu jer su one manje topive od vode, a jače topive od etanola, stoga uzorci s volumnim udjelom etanola od 50 % imaju veću koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na uzorke s 30 i 70 %-tnim v/v etanola.
- Vrijeme maceracije od 4 tjedna, omjer rogača i vodeno-alkoholne baze 1:5, vodeno-alkoholna baza s volumnim udjelom etanola 50 %, te odsutnost svjetla pokazani su kao uvjeti maceracije kojima se postiže najveća koncentracija fenola i antioksidativna aktivnost.
- Maceracijom se ekstrahiraju i tvari boje iz rogača i svi uzroci nakon 4 tjedna maceracije poprimaju smeđu boju. Kromatski parametri pokazuju da je većina uzoraka na zelenom i žutom dijelu spektra od kojih uzorci s omjerom čvrsto:tekuće 1:5 s vremenom poprimaju jače nijanse boja pa su u konačnici i tamniji.
- Dobiveni kvalitetan macerat rogača može se koristiti kao baza za proizvodnju jakog alkoholnog pića poput likera od rogača.

6. LITERATURA

- Albanell E., Caja G., Plaixats J. (1991) Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes* **16**: 135-136.
- Batlle I., Tous J. (1997) Carob Tree: *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute.
- Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. str. 3-28.
- Benzie I. F., Strain J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239**: 70-76.
- Benzie I. F., Strain J. J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* **299**: 15-27.
- Blois M. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181**: 1199.
- Brand – Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT Food, Science and Technology* **28**: 25-30.
- Buyel J. F. (2018) Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv* **36** (2): 506–520.
- Christoph N., Bauer-Christoph C. (2007) Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. U: Berger R.G. (eds) Flavours and Fragrances, Springer, Berlin, Heidelbergstr. str. 219-239.
- Diamantoglou S., Mitrakos K. (1981) Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. *Tasks for vegetation science* **4**: 17-19.
- Dragojević Müller, I. (2017) Morfološke, genetske i fitokemijske značajke populacije rogača (*Ceratonia siliqua* L.) u Hrvatskoj (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- El Hajaji H., Lachkar N., Alaoui K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., El Bali B., Lachkar M. (2010) Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Records of Natural Products* **4** (4): 193-204.
- Fiket M. (2013) Aromatično i ljekovito bilje u proizvodnji jakih alkoholnih pića (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M., Mavromoustakos T., Tzakos A. (2016) Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *International Journal of Molecular Sciences* **17** (11): 1875.
- Grba S., Stehlik Tomas V. (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Plejda d.o.o., Zagreb. str. 228-264.
- Hagerman A.E. (2002) The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins, Miami University, Oxford, Ohio, USA.
- Hanousek Čiča K., Rupert M., Koczoń P., Derewiaka D., Gajdoš-Kljusurić J., Petravić-Tominac V., Mrvčić J., Stanzer D. (2018) Characterisation of Flavour Compounds in Biska - a Herbal Spirit Produced with Mistletoe. *Journal of the Institute of Brewing* **125**: 143–154.
- Hanousek Čiča K., Mrvčić J., Srećec S., Filipan K., Blažić M., Stanzer D. (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Science & Nutrition* **8**: 942–954.
- Heffernan S. P., Mulvihill D. M., Kelly A. L. (2016) Liqueurs: Cream Liqueurs. Encyclopedia of Food and Health. str. 550–555.
- Jakopić J., Colaric M., Veberic R., Hudina M., Solar A., Stampar F. (2007) How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chem* **104**: 100-105.
- Kazazić S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279 – 290.
- Lučić R. (1986) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, 1. izd., Nolit, Beograd. str. 424-423.
- Lukin P. (2019) Fizikalno-kemijska karakterizacija macerata imele za proizvodnju rakije biske (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Marakis S., Lambrakis M., Diamantoglou S. (1993) Tannin chemistry of nine cretan carob varieties. *Chimica Chronica* **22**: 213-224.
- Marakis S. (1996) Carob bean in food and feed: current status and future potentials - a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology* **33**: 365-383.
- Makris D. P., Kefalas P. (2004) Carob Pod Polyphenolic Antioxidants. *Food Technology Biotechnology* **42** (2): 105–108.
- Martinović T. (2015) Maceracija u proizvodnji jakih alkoholnih pića (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Matak A., (2018) Antioksidativni potencijal i udio polifenola u napitcima na bazi rogača (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Miličević B., Ačkar Đ., Babić J., Jozinović A., Miličević R., Petošić E., Kujundžić T., Šubarić D. (2018) Impact of the fermentation process with immobilized yeast cells on the aroma profile and sensory quality of distillates produced from carob pods (*Ceratania siliqua* L.). *Tehnologica Acta* **11**: 5-9.
- Mitrakos K. (1988) The botany of Ceratonia. U: Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.), Valencia, Spain. str. 209-218.
- Mrvčić J., Posavec S., Kazazić S, Stanzer D., Peša A., Stehlik-Tomas V. (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **4** (2): 102-111.
- Mrvčić J. (2016) Voćne, žitne i šećerne rakije, <<https://moodle.srce.hr/2016-2017/my/>> Pristupljeno 22. rujna 2020.
- Nishira H., Joslyn M. A. (1968) The galloyl glucose compounds in green carob pods (*Ceratania siliqua* L.). *Phytochemistry* **7**: 2147-2156.
- OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin (2014) Determination of chromatic characteristics (OIV-MA-BS-27). OIV - International Organisation of Vine and Wine, Pariz.
- Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 703 – 717.
- Papagiannopoulos M., Wollseifen H. R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R. (2004) Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratania siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3784 – 3791.
- Papaefstathiou E., Agapiou A., Giannopoulos S., Kokkinofa R. (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Science & Nutrition* **6**: 2151-2161.
- Paz I., Fernández A., Matías C., Pinto G. (2014) Effect of temperature on the evolution of colour during the maceration of fruits in liquor. *Czech J. Food Sci* **32**: 90–95.
- Petrović V., Milković M., Valdec D. (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solventnim i UV bojilima. *Tehnickal journal* **7** (2): 191-197.
- Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (2009) Narodne novine **61** (NN 61/2009).

- Rodríguez-Solana R., Dantas M., & Romano A. (2018). Influence of Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) Variety and Processing on the Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Carob Liquors. *INCREEASE*. str. 216–226.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152–178.
- Stanciu G., Aonofriesei F., Lupsor S., Popescu A., Sirbu R. (2019) Study of Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* L. Flowers Macerates. *Revista de Chime* **70** (5): 1800-1804.
- Štoler I. (2017) Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske sktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Tonutti I., Liddle P. (2010) Aromatic plants in alcoholic beverages. A review. *Flavour Fragr J* **25** (5): 341–350.
- Vukičević I., (2016) Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta *Stachys iva* Griseb. i *Stachys horvaticii* Micevski, Lamiaceae (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Würsh P., Del Vedovo S., Rosset J., Smiley M. (1984) The tannin granules from ripe carob pod, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **17**: 351-354.
- Yousif A. K., Alghzawi H. M. (2000) Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry* **69** (3): 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** (6): 304-308.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Helena Kantoci

ime i prezime studenta