Antioksidativni potencijal i udio polifenola u napitcima na bazi rogača

Matak, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:511227

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Andrea Matak

Antioksidativni potencijal i udio polifenola u napitcima na bazi rogača

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Dubravki Vitali Čepo na predloženoj temi, stručnoj pomoći i svim korisnim savjetima koje mi je pružala tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na pomoći, strpljenju i potpori tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Puno hvala mojim roditeljima što su mi sve omogućili i uvijek bili oslonac i potpora.

Zahvaljujem se svim mojim kolegama s fakulteta koji su ove fakultetske dane učinili puno zanimljivijim, sretnijim i ispunjenijim.

Neizmjerno hvala Luki koji je u onim najtežim trenucima, ali i u onim lijepim, uvijek bio tu kraj mene.

SADRŽAJ

1.UVOD 1

1.1. Rogač 1

1.1.1. Građa i sastav ploda rogača 2

1.1.1.1.Sastav pulpe mahune rogača……...4

1.1.1.2.Sastav sjemenke rogača……6

1.1.2. Primjena rogača u prehrani 7

1.1.3. Farmaceutska primjena rogača 8

1.2.Kakao 9

1.2.1.Sastav kakaa 10

1.2.2.Primjena kakaa u prehrani 11

1.2.3. Farmaceutska primjena kakaa 11

3. OBRAZLOŽENJE TEME 13

3.MATERIJALI I METODE 14

3.1. Materijali 14

3.1.1. Ispitivani materijal 14

3.1.2. Kemikalije 16

3.1.3. Korištena oprema 17

3.2. Metode 17

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom 17

3.2.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom 20

3.2.3.Određivanje reduktivnog potencijala FRAP metodom 22

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. Rezultati 25

4.2.Rasprava 28
5. ZAKLJUČCI 34
6.LITERATURA 34
7.SAŽETAK/SUMMARY 40

1.UVOD

1.1. Rogač

Rogač (*Ceratonia siliqua, L*.) je biljka iz porodice mahunarki, *Fabaceae* (Biner i sur., 2007). Pripada podporodici *Caesalpinioidae.* Njegovu vrijednost prepoznali su još stari Grci, koji su ga donijeli sa Bliskog istoka u Grčku i Italiju, ali i Arapi koji su ga širili duž sjeverne obale Afrike, Španjolske i Portugala (Khatib i Vaya, 2010). To je višegodišnja zimzelena biljka koja raste u obliku grma ili stabla (**Slika 1.1.**), a može narasti do visine od 10 do 15 m (Wielinga, 2009). Danas je najvećim dijelom rasprostranjen na Sredozemlju, gdje predstavlja važnu ekonomsku i ekološku komponentu mediteranske vegetacije. Osim Mediterana nastanjuje i područja Kalifornije, Australije, Južne Amerike, Čilea te područje od Srednjeg Istoka do Zapadne Azije pa čak i Kanarske otoke (Lovrić, 2015).



Slika 1.1. Stablo rogača (*prilagođeno prema www. alamy.com*)

1.1.1. Građa i sastav ploda rogača

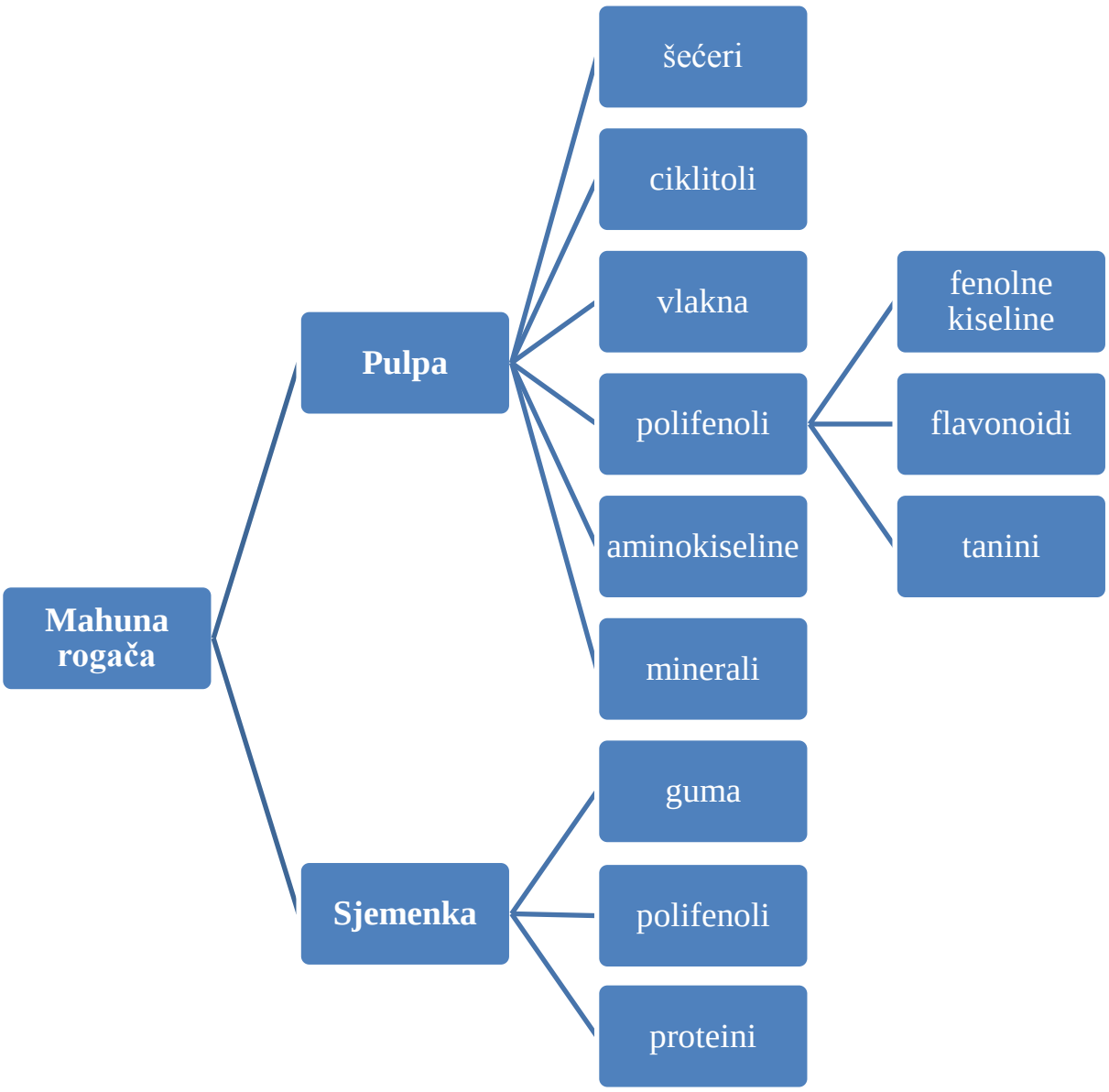
Plod rogača je mahuna (**Slika 1.2.**) koja je izdužena, komprimirana, ravna ili zakrivljena, dužine 10-30 cm i širine 1.5-3.5 cm. Mahuna je smeđe boje s naboranom površinom,a kad dozrije postane kožasta (Batlle i Tous, 1997).

Mahuna se sastoji od dva dijela: sjemenki (10%) i pulpe (90 %) koja ostane nakon uklanjanja sjemenki (engl. *kibble*). Pulpa je građena od vanjskog kožnatog sloja odnosno perikarpa i unutarnji mekšeg sloja ili mezokarpa koji okružuje i razdvaja sjemenke rogača (Naghmouchi, 2009). Kemijski sastav pulpe ovisi o sorti rogača, podrijetlu i vremenu berbe (Goulas i sur., 2016). Sjeme rogača sastoji se od ljuske (30-33 %), endosperma (42-46 %) i embrija ili klice (23-25 %) (Šaler, 2013).



Slika 1.2. Plod rogača (*prilagođeno prema www.exotic-king.com*)

Na **Slici 1.3.** shematski je prikazan sastav pulpe i sjemenke rogača. Naime, ove dva sastavna dijela ploda rogača se po svome sastavu uvelike razlikuju. S obzirom na različit sastav, pulpa i sjemenke rogača se također i koriste u različite svrhe.



Slika 1.3. Sastav ploda rogača

1.1.1.1. Sastav pulpe mahune rogača

U posljednje vrijeme brojna su istraživanja pokazala zanimljive rezultate vezane za bioaktivnost sastavnica pulpe rogača. Najveću pažnju u znanstvenim istraživanjima privukli su ciklitoli, vlakna, polifenoli i tanini. Ove skupine bioaktivnih komponenti zaslužne su za povoljne utjecaje rogača na zdravlje i njegovu upotrebu u različitim terapeutskim područjima (Goulas i sur., 2016).

Pulpa rogača sadrži visoki udio šećera koji su nositelji njegove nutritivne vrijednosti. Ukupni udio šećera kreće se u rasponu od 48 do 55 %. Najzastupljeniji šećer je saharoza (32-38%), zatim slijede glukoza (5-6%) i fruktoza (5-7%) (Batlle i Tous, 1997).

Kao i u svim leguminozama i u rogaču je dokazana prisutnost ciklitola kao spojeva sa iznimno pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka. Najzastupljeniji pripadnik ove skupine spojeva u pulpi rogača je D-pinitol (5-7%) (Goulas i sur., 2016). Dokazano je da divlje sorte rogača sadrže puno više D-pinitola nego kultivirane (Turhan, 2013).

Vlakna su heterogena skupina spojeva i mogu se podijeliti na topljiva i netopljiva. Udio ukupnih vlakana u pulpi rogača kreće se od 30 do 40 % (Haber, 2002). Netopljiva vlakna čine oko 70 % ukupnih vlakana pulpe, a najzastupljeniji predstavnici su celuloza, hemiceluloza, lignin i netopljivi polifenoli. S druge strane, udio topljivih vlakana je puno niži, a njih uglavnom čine jednostavni ugljikohidrati (Goulas i sur., 2016).

Heterogena skupina spojeva prisutna najvećim dijelom u pulpi rogača su polifenoli koji s zaslužni za visok antioksidacijski potencijal ploda ove biljke. Glavne kategorije polifenolnih spojeva prisutnih u pulpi rogača su jednostavne fenolne kiseline, flavonoidi i tanini. Koncentracija polifenola uvelike ovisi o genetskim i ekološkim čimbenicima, ali i o metodi ekstrakcije korištenoj pri izolaciji navedenih sastavnica (Papagiannopoulos i sur., 2004). U pulpi rogača fenolni spojevi se nalaze slobodni, vezani ili kao topljivi konjugirani oblici (Goulas i sur., 2016). Većina fenolnih spojeva prisutnih u rogaču nalaze se vezani za prehrambena vlakna. Fenolne kiseline, podijeljene na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, najbrojnija su skupina polifenolnih spojeva u pulpi rogača. Slobodna galna kiselina i derivati galne kiseline najzastupljeniji su predstavnici ove skupine spojeva u rogaču (Vitali i sur., 2007). Flavonoidi predstavljaju najrazličitiju skupinu fenola sa dva aromatska prstena povezana heterocikličnim piranskim prstenom. Flavonidi se mogu podijeliti u različite

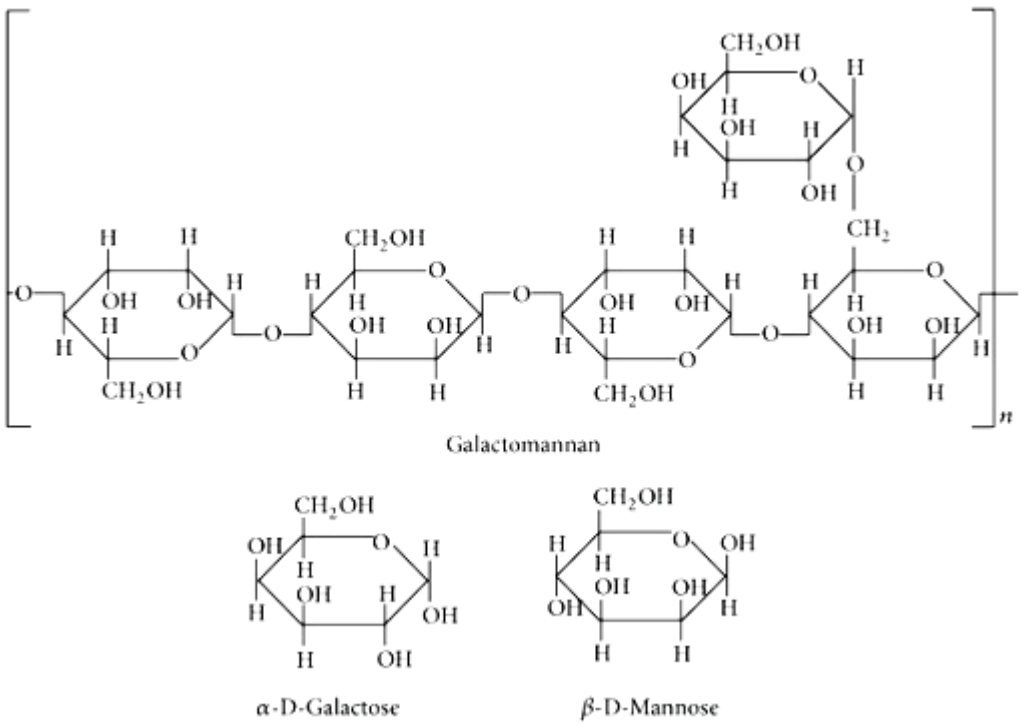
kategorije kao što su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavonoidii, antocijani . Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Pulpa rogača osobito je bogata flavonolima kao što su kvercetin, miricetin i kemferol te njihovim derivatima. Flavoni (apigenin, luteolin), flavanoni (naringenin) i izoflavonoidi (genistein, daidzein) prisutni su u puno manjoj količini (Goulas i sur., 2016). Tanini su još jedna skupina polifenola prisutna u pulpi mahune kojoj se pripisuju adstringentna svojstva rogača. Na osnovi građevnih jedinica i kemijske prirode, mogu se izdvojiti dvije osnovne vrste tanina: hidrolizirajući (pirogalni) i kondenzirani (katehinski) tanini. Rogač većim dijelom sadrži kondenzirane tanine (proantocijanidini). Zrela mahuna rogača u svom sastavu ima puno manje kondenziranih tanina nego nezrela mahuna. To se objašnjava činjenicom da kondenzirani tanini u mahuni rogača tijekom dozrijevanja ulaze u brojne reakcije polimerizacije i kondenzacije čime se smanjuje njihova koncentracija (Silanikove i sur., 2006).

U plodu rogača dokazana je prisutnost 17 aminokiselina: asparaginske kiseline, glutaminske kiseline, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, tirozina, valina, prolina, metionina, izoleucina, leucina, cisteina, fenilalanina i lizina. Asparaginska kiselina, asparagin, alanin, glutaminska kiselina, leucin i valin zajedno čine oko 57% ukupne količine aminokiselina. Općenito, rogač se može smatrati dobrim izvorom aminokiselina prema standardima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) za proteine. Točnije, sadrži svih sedam esencijalnih aminokiselina (treonin, metionin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin i lizin) u koncentracijama koje zadovoljavaju standarde WHO-a (Ayaz i sur., 2009).

Rogač je također dobar izvor brojnih minerala. Kalij je dominantan mineral u plodu rogača, a uz kalij su još prisutni i kalcij, natrij, magnezij i fosfor. Mikro-elementi prisutni u rogaču su željezo, bakar, mangan i cink, od kojih je najzastupljenije željezo (Loullis i Pinakoulaki, 2017).

1.1.1.2. Sastav sjemenke rogača

Različiti dijelovi sjemenke rogača (ljuska, endosperm i klica) sadrže različite skupine kemijskih spojeva. Ljuska sjemenke rogača sadrži antioksidanse. Endosperm, koji čini najveći dio sjemenke rogača, građen je od galaktomanana. Galaktomanani (**Slika 1.4.**) su polisaharidne molekule građene od manoze i galaktoze u omjeru 4:1 (Batlle i Tous, 1997). Udio galaktomanana u sjemenki rogača može dosegnuti 85 % (Goulas i sur., 2016).



Slika 1.4. Struktura galaktomanana *(prilagođeno prema openi.nlm.nih.gov)*

Glavno svojstvo ovog prirodnog polisaharida, koji se koristi za proizvodnju gume (engl. *carob bean gum*, skraćeno CBG), je velika viskoznost njegove vodene otopine unutar širokog raspona temperatura i pH. Također, CBG ima visok kapacitet vezanja vode formirajući pritom jako viskozne, stabilne otopine u visokim razrjeđenjima (Batlle i Tous, 1997).

1.1.2. Primjena rogača u prehrani

Rogač se u prehrambene svrhe koristio još za vrijeme Starih Grka i Egipćana koji su konzumirali pržene sjemenke i vodene ekstrakte rogača (Marakis, 1996).

Brašno rogača (koje se dobiva mljevenjem, sijanjem i tostiranjem mahune rogača bez sjemenki) danas je dosta prisutno u ljudskoj prehrani (Marakis, 2006). Nutritivna vrijednost mahuna rogača je usporediva s nutritivnom vrijednošću žitarica poput pšenice i ječma (Battle i Tous, 1997). Danas se brašno rogača najčešće koristi kao sastojak hrane, zamjena za kakao ili kao sirovina za proizvodnju dijetetskih proizvoda (Lovrić,2015).
U posljednje vrijeme rogač se koristi u brojnim funkcionalnim napitcima kao zamjena za kakao, a njegova se prednost pripisuje činjenici da sadrži puno manji udio kofeina i teobromina nego kakao. Također, rogač prženjem dobiva aromu jako sličnu aromi kakaa. Rogač također sadrži puno manje masti (maksimalno 2-3 %) (Biner i sur., 2007) nego kakao, a puno više prehrambenih vlakana (Yousif i Aghzawi, 2000). Niži sadržaj masti znači i nižu kalorijsku vrijednost, dok visok sadržaj prehrambenih vlakana sa sobom donosi mnoge pozitivne učinke na zdravlje (Loullis i Pinakoulaki, 2017). Visok udio šećera u rogaču smanjuje potrebu za dodatnim šećerima i zaslađivačima (Kumazawa i sur., 2002). Zbog svih ovih pozitivnih svojstava rogača, postoje brojni prehrambeni proizvodi kao što su mliječni proizvodi, instant napitci na bazi rogača, peciva i kolači (Gruendel i sur., 2007) koji idealno zamjenjuju slične čokoladne proizvode.
Rogač se danas u prehrambenoj industriji također koristi kao prirodni biljni zgušnjivač, sredstvo za želiranje, emulgator i stabilizator (E410), a za to je zaslužan galaktomanan iz endosperma sjemenki (Loullis i Pinakoulaki, 2017).

1.1.3. Farmaceutska primjena rogača

Brojne znanstvene studije pokazale su nekoliko fizioloških učinaka rogača koji mogu biti značajni u promicanju ljudskog zdravlja i prevenciji i liječenju nekih kroničnih bolesti.

Rogač je bogat kemijskim spojevima koji su u brojnim navodima iz literature prikazani kao antitumorske, antiproliferativne i proapoptotske komponente. Na primjer, kvercetin je smanjio veličinu tumora i inhibirao angiogenezu u ksenograft modelu karcinoma gušterače i karcinoma dojke (Zhao i sur., 2016).

Prehrana sa gumom dobivenom iz endosperma sjemenki rogača uzrokovala je smanjenu razinu glukoze u krvi štakora (Forestieri i sur., 1989). Prisutnost D-pinitola u rogaču može biti odgovorna za njegov antidijabetički učinak jer D-pinitol regulira razinu šećera u krvi u bolesnika sa dijabetesom tipa 2 povećanjem osjetljivosti na inzulin (Tetik i Yuksel, 2014).

Rogač je dobar stabilizator probave što ga čini upotrebljivim sredstvom protiv proljeva ili dijareje (kod dojenčadi i male djece), kod enteritisa ili upale intestinalne mukozne sluznice i dispepsije ili otežane probave. Također, danas se kod odraslih osoba koristi i za liječenje gastritisa te gastroenteritisa. Svoje povoljno djelovanje na probavu rogač posjeduje zahvaljujući taninima. Tanini su snažni adstringensi, a adstringentno djelovanje se javlja uslijed reakcije tanina s proteinima zbog čega dolazi do taloženja proteina i stvaranja zaštitnog polisaharidnog sloja na sluznici. Ovakav formirani zaštitni sloj smanjuje podražaj u crijevima, a upotrebom rogačevog pripravka nakon 2 dana dolazi do formacije stolice te nakon 6 do 8 dana do potpunog oporavka (Samaržija, 2013.).

Studije provedene na zdravim dobrovoljcima potvrdile su učinak polifenola i netopljvih vlakana rogača na sniženje razine lipida u krvi. Konzumiranjem 15 g rogača dnevno u razdoblju od 4 tjedna zabilježeno je sniženje od 7,1% ukupnog kolesterola i 10,6% LDL kolesterola (Živko, 2012).

1.2.Kakao

Kakao se dobiva iz biljke kakaovac (*Theobroma cacao*), koja pripada porodici Sterculiaceae. To je vazdazeleno drvo (**Slika 1.5.**) koje naraste do visine od 15 m, sa kožnatim i jajolikim listovima i crvenim peteročlanim cvjetovima koji se razvijaju izravno iz debla ili ogranaka. Plod kakaovca je mahuna (**Slika 1.6.**) koja u sebi sadrži 20-50 crvenkastosmeđih krupnih sjemenki iz kojih se dobiva kakao.



Slika 1.5. Stablo kakaovca *(prilagođeno prema http://www.dropdata.org)*



Slika 1.6. Plod kakaovca *(prilagođeno prema www.fruttaweb.com)*

Kakaovac potječe iz sjevernih područja Južne Amerike i obalnog područja Meksičkog zaljeva, a njegov uzgoj najprije su započeli Maje, narodi stare civilizacije, a oko 1500. g. pr. Kr. i Asteci. Danas se kakaovac uzgaja u mnogim tropskim i suptropskim područjima Afrike i Južne Amerike (www.enciklopedija.hr).

1.2.1.Sastav kakaa

Kakao masa (engl. *cocoa liquor*) dobiva se mljevenjem prženog i fermentiranog sjemena kakaovca. Sadrži nemasne kakao krutine i kakao maslac. Kakao prah se dobiva uklanjanjem dijela kakao maslaca iz kakao mase. Kakao maslac sadrži značajne količine masnih kiselina, dok nemasne kakao krutine sadrže vitamine, minerale, prehrambena vlakna i polifenole (Katz i sur., 2011).

Masti u kakau, koje zajedno čine kakao maslac, su smjesa mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Najzastupljenija mononezasićena masna kiselina u kakau je oleinska, dok među zasićenim masnim kiselinama dominiraju palmitinska i stearinska (Katz i sur., 2011).

Oko 15 % sjemenke kakaovca čine prehrambena vlakna. Topljiva vlakna čine pektin, pentozan i mucilage. Pektini u kakau sastoje se od heterogene smjese ramnogalakturonana s različitim stupnjem razgranatosti lanca. Netopljiva vlakna uglavnom čini celuloza. Škrob je također prisutan u manjoj količini, kao i hemiceluloza (Colombo i sur., 2012).

Kakao je također bogat mineralima među kojima dominira kalij. Nakon kalija slijede magnezij, fosfor, kalcij i natrij te mikroelementi željezo, bakar, mangan i cink među kojima dominira željezo (Loullis i Pinakoulaki, 2017).

Najznačajnije sastavnice kakaa svakako su polifenoli koji su poznati kao jaki antioksidansi. Od svih skupina polifenola u kakau su najzastupljeniji flavonoidi i to najvećim dijelom flavanoli epikatehin i katehin te procijanidini. Procijanidini su glavni nositelji antioksidativne aktivnosti kakaa (Ramiro-Puig i Castell, 2009). Brojna istraživanja provedena na kakau ukazuju na to kako je on puno jači antioksidans od većine sastavnica ljudske prehrane. Od ostalih skupina flavonoida prisutni su i flavonoli (kvercetin), antocijanidini, flavoni (luteolin) i flavanoni (naringenin). Od neflavonoidnih skupina polifenola najzastupljenije su fenolne kiseline (klorogenska, vanilinska i kumarinska) (Katz i sur., 2011).

Kakao također sadrži metilksantine čiji udio u sjemenci kakaovca iznosi oko 3 %. Teobromin je najzastupljeniji metilksantin u kakau sa udjelom oko 2 %, dok je kofein prisutan u puno manjim količinama (oko 1 %), a teofilin samo u tragovima (Colombo i sur., 2012). Udio pojedinog metilksantina u kakau ovisi o genotipu i podrijetlu kakaa, stupnju zrelosti i korištenom postupku fermentacije (Matissek,1997; Ho i sur., 2014).

1.2.2.Primjena kakaa u prehrani

Kakao se danas uglavnom koristi u proizvodnji čokolade, kolača, pudinga, sladoleda, kao i u ostalim poslasticama i pićima.

Prešanjem se iz kakaove mase istiskuje ulje pa tako zaostaje kakao prah, od kojeg se uz dodatak mlijeka priređuju topli i hladni napitci. Kakaovo ulje, poznatije kao kakao maslac se također upotrebljava u slastičarstvu.

Gastronomska zanimanja za kakao se povećavaju zahvaljujući zanimljivim senzornim svojstvima kakaa, kao i tendencije čokoladne industrije prema visokokvalitetnim čokoladama i slasticama koje sadrže visoki udio kakaa.

1.2.3. Farmaceutska primjena kakaa

Jako antioksidativno djelovanje kakaa, odnosno velika sposobnost hvatanja slobodnih radikala i inhibicija lipidne peroksidaze, u posljednje je vrijeme privuklo veliku pozornost na području prehrane i zdravlja. Antioksidativno djelovanje kakaa povezano je sa njegovim protuupalnim i antiaterogenim učinkom, modulacijom krvnog tlaka i imunosnog sustava, kao i aktivacijom trombocita (Ramiro i sur., 2005, Katz i sur., 2011).

Polifenoli iz kakaa moduliraju aktivnost faktota NFκB koji je ključan faktor u nizu upalnih procesa. Aktiviranje NFκB u leukocitima dovodi do adhezije leukocita na endotel, invazije tkiva i sekrecije faktora koji dovode do ozljede tkiva. Polifenoli iz kakaa mogu smanjiti aktivnost NFκB, leukocita i konačno smanjiti proizvodnju medijatora upale i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Selmi i sur., 2006).

Dosadašnja istraživanja potvrđuju blagotvoran učinak kakaa na aktivaciju trombocita kao važan čimbenik u upali i trombozi koji dovodi do kardiovaskularne bolesti. Flavonoidi, naročito flavanoli, iz kakaa su povezani sa smanjenjem aktivacije trombocita. Iako točan mehanizam djelovanja još nije do kraja utvrđen, smatra se da flavanoli mogu utjecati na aktivnost trombocita mijenjanjem propusnosti membrane trombocita, djelovanjem na afinitet

za receptore prisutne na trombocitima te djelovanjem na unutarstanične signalne puteve (Holt i sur., 2006).

Postoje također dokazi da kakao smanjuje rezistenciju i povećava osjetljivost na inzulin. Dokazano je postojanje nekih mehanizama antioksidacijskih učinaka polifenola iz kakaa kojim utječu na inzulinsku rezistenciju i smanjuju rizik od dijabetesa. Kakao može inducirati regeneraciju β-stanica gušterače i tako stimulirati i lučenje inzulina, djelovati hipoglikemijski i poboljšati inzulinsku osjetljivost (Katz i sur., 2011). S druge strane, neka istraživanja kažu kako su zapravo prehrambena vlakna koja kakao sadrži odgovorna za antidijabetički učinak kakaa (Loullis i Pinakoulaki, 2017).

Najzastupljenji metilksantin iz kakaa, teobromin, djeluje kao blagi stimulans središnjeg živčanog sustava, blagi diuretik, vazodilatator i bronhodilatator. Za razliku od teobromina, kofein karakteriziraju brojne nuspojave koje uzrokuje. Najčešće su to gastrointestinalne nuspojave (konstipacija), kardiovaskularne (tahikardija, aritmija), dermatološke, hematološke (diseminirana intravaskularna koagulacija), bubrežna insuficijencija i hipoglikemija (www.drugs.com).

Najnovije studije ističu visok potencijal teobromina, koji može djelovati antitumorski, protuupalno i kardioprotektivno bez nepoželjnih nuspojava opisanih za kofein (Martinez-Pinilla i sur., 2013).

Kakao maslac topi se na temperaturi ljudskog tijela pa je idealan za rađenje maslaca za njegu tijela i masažu, balzame za usne i kožu. Njegova gustoća čini ga i tzv. koemulgatorom ili modifikatorom konzistencije, pa je rado viđen sastojak krema i mlijeka za tijelo jer pomaže nastanku i održava stabilnost emulzije. U nekim primitivnijim recepturama zna se koristiti za spravljanje pseudoemulzija tipa V-U, premda nije pravi emulgator. Stvara film na koži, daje glatkoću i sprječava isušivanje kože. Koristi se u kremama i uljima za sunčanje ne zato što štiti od UV zraka već upravo zbog ovog filmogenog svojstva koje štiti kožu od isušivanja.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Plod rogača (*Ceratonia siliqua*) poznat je po svom raznolikom sastavu. Najveću pozornost u istraživanjima brojnih znanstvenika privukli su svakako polifenoli kao spojevi sa jakom antioksidativnom aktivnošću. Upravo radi tog svojstva, ovi spojevi iz rogača slove kao komponente sa vrlo visokim potencijalom zdravstvene koristi kod ljudi.

U posljednje vrijeme sve se više razmatra rogač kao zdrava zamjena za kakao. Osim što prženjem dobiva aromu jako sličnu kakau, rogač ne sadrži teobromin i kofein što mu u zdravstvenom smislu daje veliku prednost. Također, rogač sadrži puno više prehrambenih vlakana nego kakao, a puno manje masti. Činjenica koja ne ide u korist rogaču glede njegove upotrebe kao zamjene za kakao je svakako puno manji udio polifenola u odnosu na kakao. Međutim, prilikom korištenja rogača u navedene svrhe, potrebno je sliku sagledati puno šire. Svakako je potrebno odrediti kolika je doista razlika u ukupnom antioksidativnom potencijalu obiju sastavnica smjese, ali isto tako je ključno uzeti u obzir i sve ostale potencijalne pozitivne učinke sastavnica ovih dviju biljaka na zdravlje čovjeka. CIlj ovog rada bio je istražiti utjecaj zamjene dijela kakaa rogačevim brašnom (onim bez sjemenki, kao i onim sa sjemenkama) u smjesi za pripremu napitka na udio polifenola i antioksidacijski potencijal.

Rezultati istraživanja provedenih u okviru ovog diplomskog rada bitno će doprinijeti dosadašnjim saznanjima o rogaču i njegovom sastavu, kao i o njegovoj potencijalno širokoj upotrebi u smislu zamjene za kakao u budućnosti.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani materijal

U ovom radu ispitivanja su se provodila na uzorcima dobivenim ekstrakcijom smjesa različitih udjela brašna rogača i kakaa. Uzorci su dobiveni dvjema uzastopnim ekstrakcijama uz aceton kao ekstrakcijsko otapalo. U prvoj ekstrakciji u 1g uzorka dodano je 12.5 mL 70% acetona i ekstrahirano 30 min/70 °C/150 rpm na vodenoj kupelji. Ekstrakt se zatim centrifugira 3 min/ 2500 rpm. Supernatant se prelije u tikvice za uparavanje preko gustog filter papira. U drugoj ekstrakciji se preko taloga na filter papiru doda 12,5 mL 80% acetona i dobiveni filtrat ekstrahira 30 min/70 °C/150 rpm na vodenoj kupelji. Nakon ekstrakcije, ostatak ekstrakcijskog otapala se ukloni uparavanjem na rotavaporu na 50 °C do približno 50 mbar. Ekstrakt se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljeni ekstrakti navode se dalje u tekstu kao "uzorak".

Tablica 3.1. Sastav uzoraka korištenih u istraživanju

UZORAK	SASTAV
Uzorci sa brašnom rogača koje sadrži sjemenke rogača	
S10-1-1	20 g rogač + 40 g kakao + 140 g saharoza
S10-1-2	20 g rogač + 40 g kakao + 140 g saharoza
S10-2-1	40 g rogač + 20 g kakao + 140 g saharoza
S10-2-2	40 g rogač + 20 g kakao + 140 g saharoza
S10-3-1	60 g rogač + 140 g saharoza
S10-3-2	60 g rogač + 140 g saharoza
S10-4-1	20 g rogač + 40 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
S10-4-2	20 g rogač + 40 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
S10-5-1	40 g rogač + 20 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
S10-5-2	40 g rogač + 20 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
S10-6-1	60 g rogač + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
S10-6-2	60 g rogač + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
Uzorci sa brašnom rogača koje ne sadrži sjemenke rogača	
B10-1-1 B10-1-2	20 g rogač + 40 g kakao + 140 g saharoza 20 g rogač + 40 g kakao + 140 g saharoza
B10-3-1 B10-3-2	60 g rogač + 140 g saharoza 60 g rogač + 140 g saharoza
B10-4-1 B10-4-2	20 g rogač + 40 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia 20 g rogač + 40 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
B10-5-1 B10-5-2	40 g rogač + 20 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia 40 g rogač + 20 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
B10-6-1 B10-6-2	60 g rogač + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia 60 g rogač + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia
Kontrole	
K1-1 K1-2	60 g kakao + 140 g saharoza 60 g kakao + 140 g saharoza
K2-1 K2-2	60 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia 60 g kakao + 139.4 g saharoza + 0.6 g stevia

3.1.2. Kemikalije

Tablica 3.2. Popis kemikalija korištenih u istraživanju

Ekstrakcija	Aceton (Gram-Mol P 100103)
Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom	Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich F9252)
	Bezvodni Na_2CO_3 (Lach-Ner 30217-APO)-za pripremu 6% otopine Na_2CO_3
Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom	ABTS (Sigma-A9941-50TAB) – za pripremu 7 mM otopine ABTS-a; tabletu od 10 mg ABTS-a otopiti u 2.6 mL destilirane vode
	Kalijev persulfat (Kemika-11241) – za pripremu 2.45 mM otopine $K_2S_2O_3$; 3.31 mg $K_2S_2O_3$ otopiti u 5 mL destilirane vode
	Otopina ABTS radikala- miješanjem otopine ABTS-a i kalijevog persulfata u jednakim omjerima
Određivanje reduktivnog potencijala FRAP metodom	2,6,4-tri-(2-piridil)-s-triazin (Fluka 93285)- za pripremu 20 mM otopine TPTZ-a; otopiti 124,9 mg TPTZ-a u 20 mL 40 mM HCl
	Kloridna kiselina (Lach-Ner 10033-A35)- za pripremu 40 mM HCl: razrjeđivanje 8 mL 0.1 M HCl sa 12 mL destilirane vode
	Željezov (III) klorid (Kemika, 7782-618) – za pripremu 20 mM otopine $FeCl_3$: otopiti 64.88 mg $FeCl_3$ u 20 mL destilirane vode
	Octena kiselina (Alkaloid-30320) – za pripremu 150 mL 0.3 M CH_3COOH pomiješali smo 19 mL 1.68 M i 131 mL 0.1 M CH_3COOH
	Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich 30620)-za pripremu 20 mL 0.3 M NaOH pomiješali smo 0.73 mL 8.25 M NaOH i 19.27 mL destilirane vode
	Acetatni pufer (0.3 M, pH=3,6)- miješanjem 50 mL 0.3M octene kiseline i otprilike 4 mL 0.3M NaOH
	FRAP reagens: miješanjem 25 mL acetatnog pufera (0.3M, pH=3.6), 2.5 mL 20 mM otopine $FeCl_3$ i 2.5 mL 20 mM TPTZ)

3.1.3. Korištena oprema

Analitička vaga - *Mettler Toledo-AB265-3*
Rotavapor - *Buchi Rotavapor R-20*
Vodena kupelj - *GFL- 1086*
Centrifuga - *Tehtnica-centric 322A*
Uv-Vis spektrofotometar - *Aquarius CECIL CE 7200*
Vortex- *Harmony - Mixer VTX-3000L*
pH-metar- Metrohm - *702 SM Titrino*
Uređaj za dobivanje ultračiste vode - *Ionenaustauscher S4 type P2-30*

3.2. Metode

Za određivanje ukupnih fenola u uzorcima korištena je Folin-Ciocalteu metoda.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka mjerena je njihova sposobnost vezanja radikala te reduktivni potencijal kao mjera sposobnosti redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+}. Sposobnost vezanja radikala određena je korištenjem 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikal kationa ($ABTS^{\cdot+}$), odnosno TEAC metodom (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), a reduktivni kapacitet je određen FRAP metodom (engl. *Ferric Reducing Power*).

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

U dobivenim uzorcima sadržaj fenolnih komponenti određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i Rossi, 1965).

3.2.1.1.Princip metode

Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijelazu elektrona u alkalnom mediju sa fenola i drugih tvari iz uzorka sa antioksidacijskim potencijalom na fosfovolframate i fosfomolibdate iz Folin- Ciocalteu reagensa koji je žute boje. Pritom nastaju plavo obojeni W (VI) i Mo (VI)

kompleksi nepoznate strukture. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 725 nm. Udio fenolnih komponenti u uzorku proporcionalan je intenzitetu nastalog obojenja.

3.2.1.2. Priprema uzorka

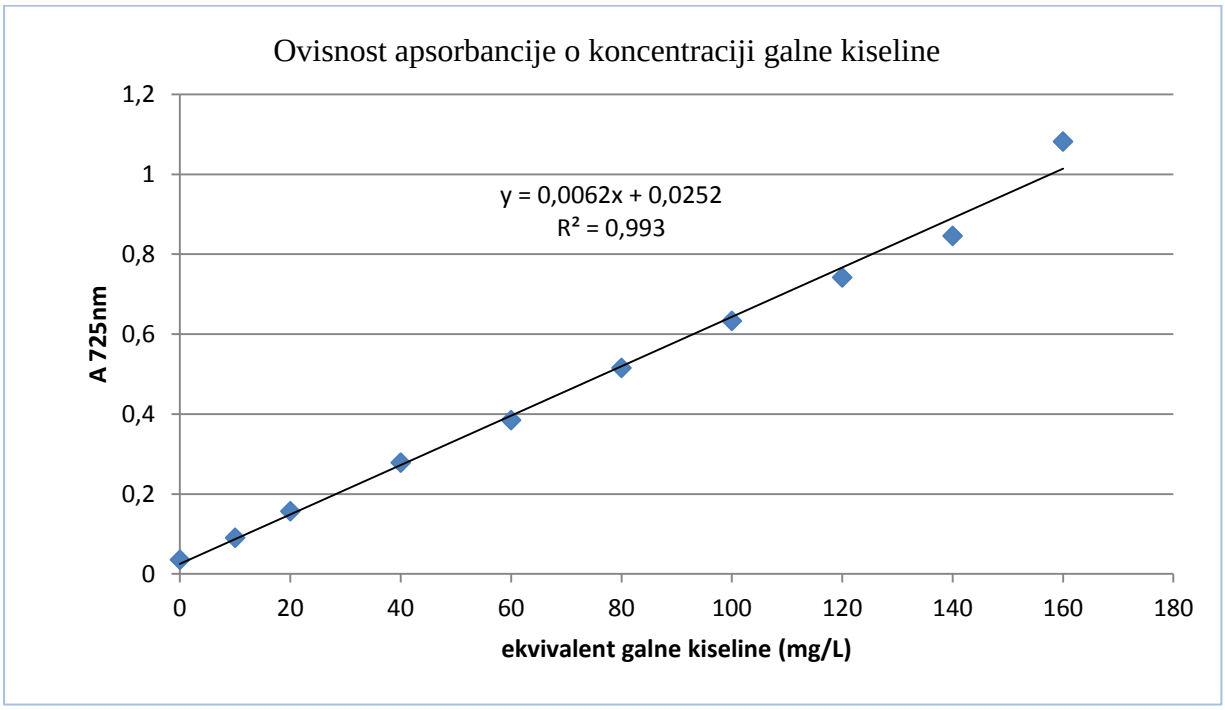
Uzorak je potrebno razrijediti 20 puta destiliranom vodom (u 100 μL uzorka doda se 1900 μL destilirane vode). Zatim se 200 μL 20 puta razrijeđenog uzorka otpipetira u Falcon kivetu (15 mL). U istu smjesu doda se 1.35 mL destilirane vode i 150 μL Folin-Ciocalteu ragensa i dobro promućka. Nakon 5 minuta doda se 1.5 mL 6 % (w/v) Na_2CO_3 i dobro promućka. Smjesa se inkubira 30 minuta na 50°C. Nakon toga uzorci se ohlade (pod mlazom hladne vode ili u zamrzivaču) i apsorbancija svake otopine se mjeri na 725 nm. Pomoću baždarnog dijagrama izračunaju se koncentracije polifenola u uzorcima i izraze kao ekvivalenti galne kiseline. Kao slijepa proba koristi se mjerna otopina pripremljena sa ekstrakcijskim sredstvom.

3.2.1.3.Izrada baždarnog dijagrama s galnom kiselinom

Za izradu baždarnog dijagrama napravljena je otopina galne kiseline koncentracije 4 mg/mL otapanjem 400 mg galne kiseline u 10 mL etanola i nadopunjavanjem do 100 mL sa destiliranom vodom. Zatim se u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira 10 mL tako priređene otopine i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od tako priređene radne otopine galne kiseline koncentracije 0.4 mg/mL napravi se koncentracijski niz otopina 0-160 μg/mL. Sa svakom otopinom poznate koncentracije galne kiseline postupa se kako je prethodno opisano za uzorak, mjeri se apsorbancija i izrađuje baždarni dijagram.

Tablica 3.3. Apsorbancija koncentracijskog niza standarda galne kiseline

Koncentracija mg/L	A	STD	RSD (%)
0	0.035333	0.00611	17.29274
10	0.090333	0.002887	3.195666
20	0.156667	0.00611	3.900064
40	0.278333	0.006506	2.337631
60	0.384667	0.005508	1.431777
80	0.515333	0.004509	0.875016
100	0.633	0.019079	3.014026
120	0.741667	0.003055	0.411917
140	0.845667	0.006658	0.787347
160	1.081667	0.006429	0.59437



Slika 3.1. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu

3.2.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

3.2.2.1. Princip metode

TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Re i sur., 1999) temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa iz uzorka da neutralizira ABTS (2.2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) radikal kation. ABTS radikal je plavo-zelene boje, a gašenje radikala rezultira obezbojenjem reakcijske otopine odnosno smanjenjem apsorbancije. Stabilna otopina ABTS radikal kationa se dobiva miješanjem 7 mM otopine ABTS-a i kalijevog persulfata kao oksidansa u jednakim omjerima. Pri tome se otopina trenutno oboji plavo-zeleno što znači da je počelo generiranje ABTS radikala. Reakcijska smjesa se inkubira 12 sati u mraku kako bi u potpunosti završila reakcija nastajanja radikala. Reakcijska smjesa ABTS radikala se razrijedi tako da njena apsorbancija izmjerena na 732 nm bude 0.700 ± 0.02 (1mL otopine radikala u 40-45mL vode). Baždarni dijagram izrađuje se s Troloxom (vodotopljivi oblik vitamina E), a antioksidativna aktivnost se izražava kao μg ekvivalenta antioksidativnog kapaciteta Trolox-a (TEAC).

3.2.2.2. Priprema uzorka

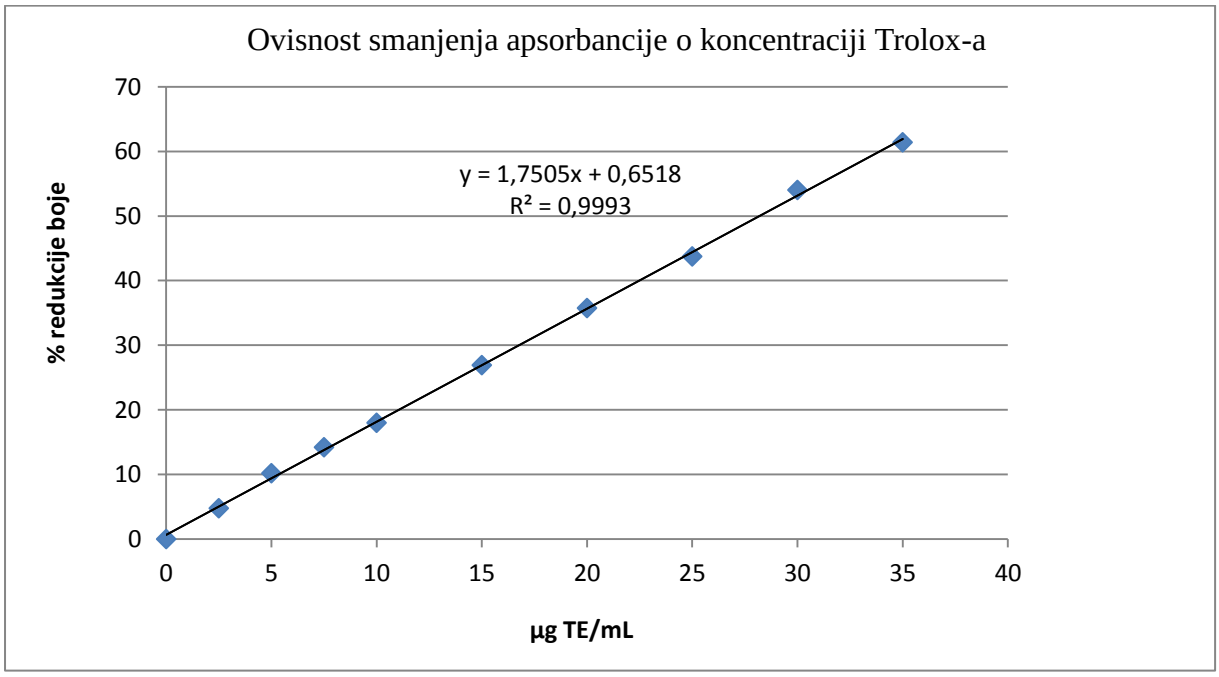
Reakcijska smjesa se pripremi u kiveti miješanjem 100 μL uzorka razrijeđenog 50 puta (2 μL uzorka i 98 μL vode) i 1167 μL otopine ABTS radikala. Apsorbancija se mjeri nakon 3 minute. Iz razlike početne apsorbancije (A_{0min}) i apsorbancije nakon 3 minute (A_{3min}) izračuna se postotak gašenja apsorbancije i iz baždarnog dijagrama se očita antioksidacijski potencijal izražen kao μg ekvivalenta Trolox-a u mL ekstrakta. Reakcija obezbojenja je jako brza pa je vrijednost A_{0min} nemoguće izmjeriti. Stoga se A_{0min} određuje mjerenjem apsorbancije reakcijske smjese u koju je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane vode (100 μL destilirane vode i 1167 μL otopine ABTS radikala).

3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama ekvivalenta Trolox-a

Za izradu baždarnog dijagrama napravljen je niz radnih otopina Trolox-a poznate koncentracije u rasponu 0-40 μg/mL. Reakcijska otopina radi se miješanjem otopine poznate koncentracije Trolox-a i otopine ABTS radikala na isti način kako je opisano za uzorak. Apsorbancija tako priređenih otopina mjeri se na 732 nm nakon 3 minute. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

Tablica 3.4. Apsorbancija koncentracijskog niza radne otopine Trolox-a (ekvivalent Trolox-a, TE)

Koncentracija TE (μg/mL)	A1	A2	A3	% redukcije boje	STD	RSD (%)
0	0.713	0.713	0.713	0	0	0
2.5	0.679	0.677	0.681	4.768583	0.280505	5.882353
5	0.64	0.643	0.638	10.19168	0.352961	3.463227
7.5	0.615	0.609	0.611	14.21225	0.428478	3.014852
10	0.587	0.585	0.582	17.99906	0.352961	1.960996
15	0.52	0.52	0.523	26.92847	0.242924	0.90211
20	0.459	0.458	0.457	35.76438	0.140252	0.392157
25	0.4	0.402	0.401	43.75877	0.140252	0.320513
30	0.33	0.324	0.329	54.04395	0.450849	0.834226
35	0.273	0.277	0.275	61.43058	0.280505	0.456621



Slika 3.2. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za ekvivalent Trolox-a

3.2.3.Određivanje reduktivnog potencijala FRAP metodom

3.2.3.1.Princip metode

Reduktivni potencijal uzoraka određen je FRAP metodom (Benzie i Strain, 1996) koja se temelji na redukciji žuto obojenog Fe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazin (Fe^{3+}-TPTZ) kompleksa u plavo obojeni Fe(II) produkt u prisutnosti reducirajućih tvari (Fe^{3+}-TPTZ $\rightarrow$ Fe^{2+}-TPTZ). Ova reakcija je ovisna o pH, pri čemu je optimalan pH 3.6. Apsorbancija se mjeri na 540 nm, a smanjenje apsorbancije je proporcionalno količini reducirajućih tvari u uzorku.

3.2.3.2.Priprema uzorka

FRAP reagens priređen je miješanjem 25 mL 0.3M acetatnog pufera (pH=3.6), 2.5 mL 20 mM otopine $FeCl_3$ i 2.5 mL 20 mM otopine TPTZ-a. FRAP reagens mora biti bistar. Reakcijska smjesa izrađena je miješanjem 2.7 mL FRAP reagensa, 270 µL destilirane vode i

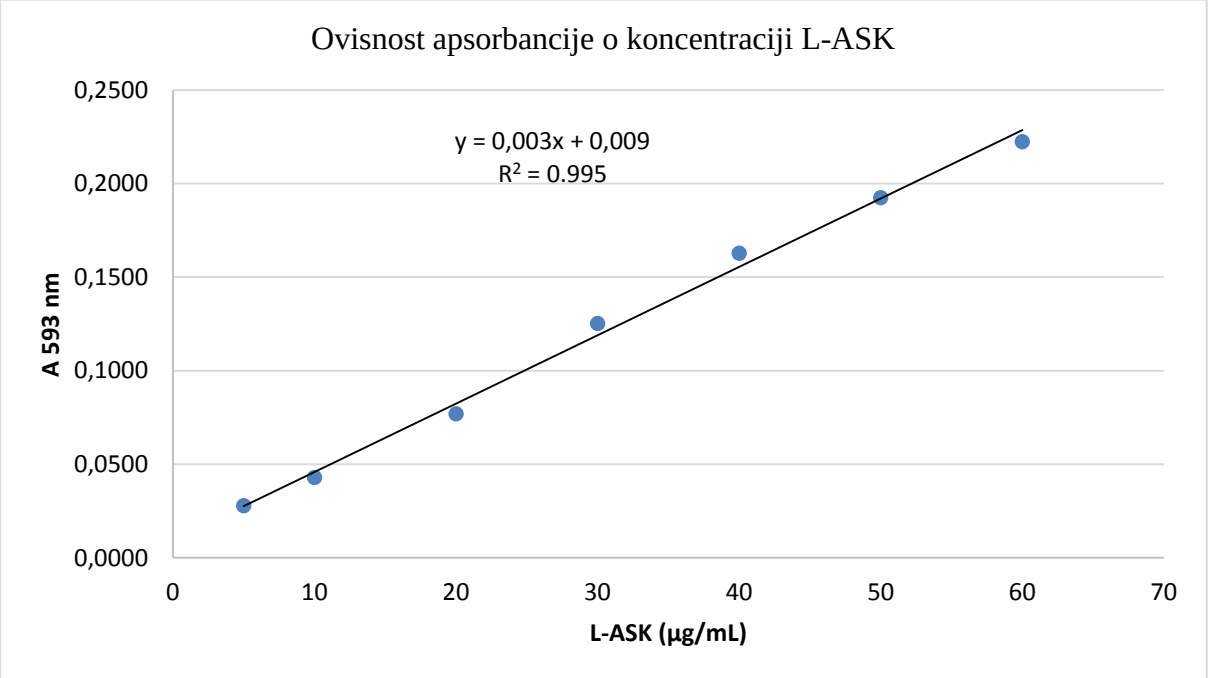
150 μL uzorka koji je prethodno razrijeđen 20 odnosno 60 puta. Tako priređena smjesa inkubira se na 37°C, a apsorbancija se mjeri nakon točno 40 minuta na 540 nm. Kao slijepa proba koristi se reakcijska smjesa u koju je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane vode.

3.2.3.3.Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama napravljen je koncentracijski niz otopina L-askorbinske kiseline poznate koncentracije s kojima se postupa kako je ranije opisano za uzorak te se mjeri apsorbancija na 540 nm. Sva mjerenja rađena su u duplikatu.

Tablica 3.6. Apsorbancija koncentracijskog niza otopina L-askorbinske kiseline

Koncentracija L-askorbinske kiseline (μg/mL)	A	STD	RSD(%)
5	0,0279	0,0031	11,15
10	0,0430	0,001273	2,959982
20	0,0770	0,002546	3,305954
30	0,125250	0,001909	1,524302
40	0,16280	0,007375	4,530072
50	0,19250	0,033353	17.326136
60	0,22240	0,003818	1,716896



Slika 3.3. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za L- askorbinsku kiselinu

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sva mjerenja rađena su u duplikatu (n=2) , a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Za računanje srednje vrijednosti, standardne devijacije, relativne standardne devijacije, kao i za izradu baždarnih dijagrama korišten je programski paket Microsoft Excell. Za statističku obradu podataka korišten je GraphPad Prism 3.02. programski paket (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Tablica 4.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola dobiven Folin-Ciocalteu metodom

uzorak	masa uzorka (g)	Razrjeđenje	A1	A2	mg GAE / g uzorka	STD	RSD (%)
S10-1-1	1.0254	20	0.492	0.485	7.14	0.07	1.04
S10-1-2	1.0036	20	0.471	0.477			
S10-2-1	1.0174	20	0.323	0.331	4.94	4.94	6.32
S10-2-2	1.0124	20	0.358	0.360			
S10-3-1	1.0592	20	0.119	0.119	1.46	1.46	11.43
S10-3-2	1.0184	20	0.137	0.129			
S10-4-1	1.0164	20	0.392	0.392	6.48	6.48	16.26
S10-4-2	1.0405	20	0.544	0.538			
S10-5-1	1.0404	20	0.334	0.335	4.63	4.63	2.62
S10-5-2	1.0178	20	0.313	0.329			
S10-6-1	1.0447	20	0.147	0.148	1.72	1.72	4.03
S10-6-2	1.0127	20	0.137	0.136			
B10-1-1	1.0004	20	0.536	0.551	8.67	8.67	5.93
B10-1-2	1.0184	20	0.596	0.616			
B10-2-1	1.0795	20	0.587	0.587	7.89	7.89	5.91
B10-2-2	1.0191	20	0.507	0.503			
B10-3-1	1.0764	20	0.438	0.406	5.21	5.21	9.58
B10-3-2	1.0158	20	0.346	0.357			
B10-4-1	1.0041	20	0.700	0.699	10.49	10.49	3.34
B10-4-2	1.0032	20	0.653	0.689			
B10-5-1	1.0452	20	0.573	0.584	8.33	8.33	1.60
B10-5-2	1.0385	20	0.561	0.564			
B10-6-1	1.0169	20	0.465	0.477	6.40	6.40	10.24
B10-6-2	1.0087	20	0.396	0.398			
K1-1	1.0239	20	0.690	0.710	11.51	11.51	9.98
K1-2	1.0033	20	0.810	0.809			
K2-1	1.0142	20	0.832	0.875	12.14	12.14	9.13
K2-2	1.0110	20	0.743	0.727			

Udio ukupnih fenola u uzorcima, izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline po g uzorka (mg GAE/g), kreće se od 1.46 do 10.49 (**Tablica 4.1.**). Najmanji udio polifenola ima uzorak koji sadrži 60 g brašna rogača bez sjemenki i 140 g saharoze, a najveći udio (izuzevši uzorke koji služe kao kontrole) ima uzorak koji sadrži 20 g brašna rogača sa sjemenkama, 40 g kakaa, 139.4 g saharoze i 0.6 g stevie.

Tablica 4.2. Sposobnost ispitivanih uzoraka za vezanje radikala određena TEAC metodom

uzorak	masa uzorka (g)	Razrjeđenje	A1	A2	Asp	ΔA (%)	mg TE/g uzorka	STD	RSD (%)
S10-1-1	1.0254	50	0.319	0.304	0.703	55.69	8.51	0.99	11.59
S10-1-2	1.0036	50	0.234	0.238	0.703	66.43			
S10-2-1	1.0174	50	0.395	0.389	0.703	44.24	6.29	0.22	3.47
S10-2-2	1.0124	50	0.380	0.372	0.703	46.51			
S10-3-1	1.0592	50	0.625	0.617	0.703	11.66	1.79	0.36	20.28
S10-3-2	1.0184	50	0.595	0.591	0.703	15.65			
S10-4-1	1.0164	50	0.373	0.353	0.719	49.51	7.24	0.46	6.40
S10-4-2	1.0405	50	0.319	0.312	0.719	56.12			
S10-5-1	1.0404	50	0.427	0.434	0.702	38.68	5.33	0.15	2.73
S10-5-2	1.0178	50	0.427	0.423	0.702	39.46			
S10-6-1	1.0447	50	0.572	0.585	0.702	17.59	2.27	0.13	5.63
S10-6-2	1.0127	50	0.584	0.590	0.702	16.38			
B10-1-1	1.0004	50	0.229	0.181	0.700	70.71	9.76	0.57	5.82
B10-1-2	1.0184	50	0.238	0.202	0.700	68.57			
B10-2-1	1.0795	50	0.199	0.166	0.700	73.93	9.28	0.57	6.12
B10-2-2	1.0191	50	0.263	0.242	0.700	63.93			
B10-3-1	1.0764	50	0.302	0.311	0.65	52.85	6.80	0.17	2.45
B10-3-2	1.0158	50	0.337	0.338	0.65	48.08			
B10-4-1	1.0041	50	0.143	0.212	0.700	74.64	10.86	0.70	6.43
B10-4-2	1.0032	50	0.149	0.140	0.700	79.36			
B10-5-1	1.0452	50	0.203	0.188	0.692	71.75	9.01	0.84	9.30
B10-5-2	1.0385	50	0.278	0.262	0.692	60.98			
B10-6-1	1.0169	50	0.306	0.295	0.719	58.21	7.92	0.24	2.98
B10-6-2	1.0087	50	0.315	0.302	0.692	55.42			
K1-1	1.0239	50	0.123	0.109	0.692	83.24	11.94	0.50	4.17
K1-2	1.0033	50	0.09	0.084	0.692	87.43			
K2-1	1.0142	50	0.06	0.046	0.692	92.34	12.78	0.27	2.10
K2-2	1.0110	50	0.079	0.056	0.692	90.25			

Sposobnost vezanja radikala određena TEAC metodom izražena je kao mg ekvivalenta Trolox-a po g uzorka (mg TE/g). Vrijednosti se kreću od 1.79 do 10.86 (**Tablica 4.2.**). Najmanju sposobnost za vezanje radikala ima uzorak koji sadrži 60 g brašna rogača sa sjemenkama i 140 g saharoze, a najveću sposobnost vezanja radikala ima uzorak koji sadrži 20 g brašna rogača bez sjemenki, 40 g kakaa, 139.4 g saharoze i 0.6 g stevie (izuzevši uzorke koji služe kao kontrole). Istim ovim uzorcima je metodom Folin-Ciocalteu određen najmanji, odnosno najveći udio ukupnih fenola.

Tablica 4.3. Reduktivni potencijal ispitivanih uzoraka određen FRAP metodom

Uzorak	masa uzorka (g)	razrjeđenje	A1	A2	Asp	mg (L-ASK) / g uzorka	STD	RSD (%)
S10-1-1	1.0254	20	0.2925	0.2955	0.0582	6.13	0.19	3.08
S10-1-2	1.0036	20	0.3003	0.3019	0.0582			
S10-2-1	1.0174	20	0.2456	0.2456	0.0582	4.85	0.14	2.90
S10-2-2	1.0124	20	0.2539	0.2538	0.0582			
S10-3-1	1.0592	20	0.1399	0.1434	0.0582	1.94	0.07	3.54
S10-3-2	1.0184	20	0.1419	0.1431	0.0582			
S10-4-1	1.0164	20	0.2700	0.2737	0.0582	5.89	0.54	9.08
S10-4-2	1.0405	20	0.3258	0.3303	0.0741			
S10-5-1	1.0404	20	0.2589	0.2630	0.0741	4.65	0.13	2.75
S10-5-2	1.0178	20	0.2652	0.2549	0.0741			
S10-6-1	1.0447	20	0.1877	0.1851	0.0741	2.43	0.28	11.59
S10-6-2	1.0127	20	0.1627	0.1683	0.0741			
B10-1-1	1.0004	60	0.2017	0.2057	0.0741	9.90	0.25	2.49
B10-1-2	1.0184	60	0.2077	0.2114	0.0741			
B10-2-1	1.0795	60	0.2135	0.2146	0.0741	9.90	0.11	1.13
B10-2-2	1.0191	60	0.2094	0.2086	0.0741			
B10-3-1	1.0764	60	0.1874	0.1852	0.0741	7.67	0.13	1.68
B10-3-2	1.0158	60	0.1776	0.1793	0.0741			
B10-4-1	1.0041	60	0.2214	0.2251	0.0704	11.57	0.15	1.29
B10-4-2	1.0032	60	0.2214	0.2239	0.0704			
B10-5-1	1.0452	60	0.2096	0.2080	0.0704	9.84	0.25	2.52
B10-5-2	1.0385	60	0.2014	0.2054	0.0704			
B10-6-1	1.0169	60	0.2102	0.209	0.0704	9.58	0.93	9.69
B10-6-2	1.0087	60	0.1857	0.1927	0.0704			
K1-1	1.0239	60	0.2104	0.2121	0.0704	11.00	0.69	6.28
K1-2	1.0033	60	0.2211	0.2251	0.0704			
K2-1	1.0142	60	0.2363	0.2298	0.0704	11.71	0.74	6.29
K2-2	1.0110	60	0.2238	0.2141	0.0704			

Ukupni reduktivni potencijal određen FRAP metodom izražen je kao mg L-askorbinske kiseline po g uzorka (mg L-ASK/g), a vrijednosti se kreću u rasponu od 9.71 do 30.65 (**Tablica 4.3.**). Najmanji reduktivni potencijal ima uzorak koji sadrži 60 g brašna rogača sa sjemenkama i 140 g saharoze, a najveću reduktivni potencijal ima uzorak koji sadrži 20 g brašna rogača bez sjemenki, 40 g kakaa, 139.4 g saharoze i 0.6 g stevie (izuzevši uzorke koji služe kao kontrole). Rezultati dobiveni FRAP metodom dodatno potvrđuju rezultate dobivene prethodnim dvjema metodama.

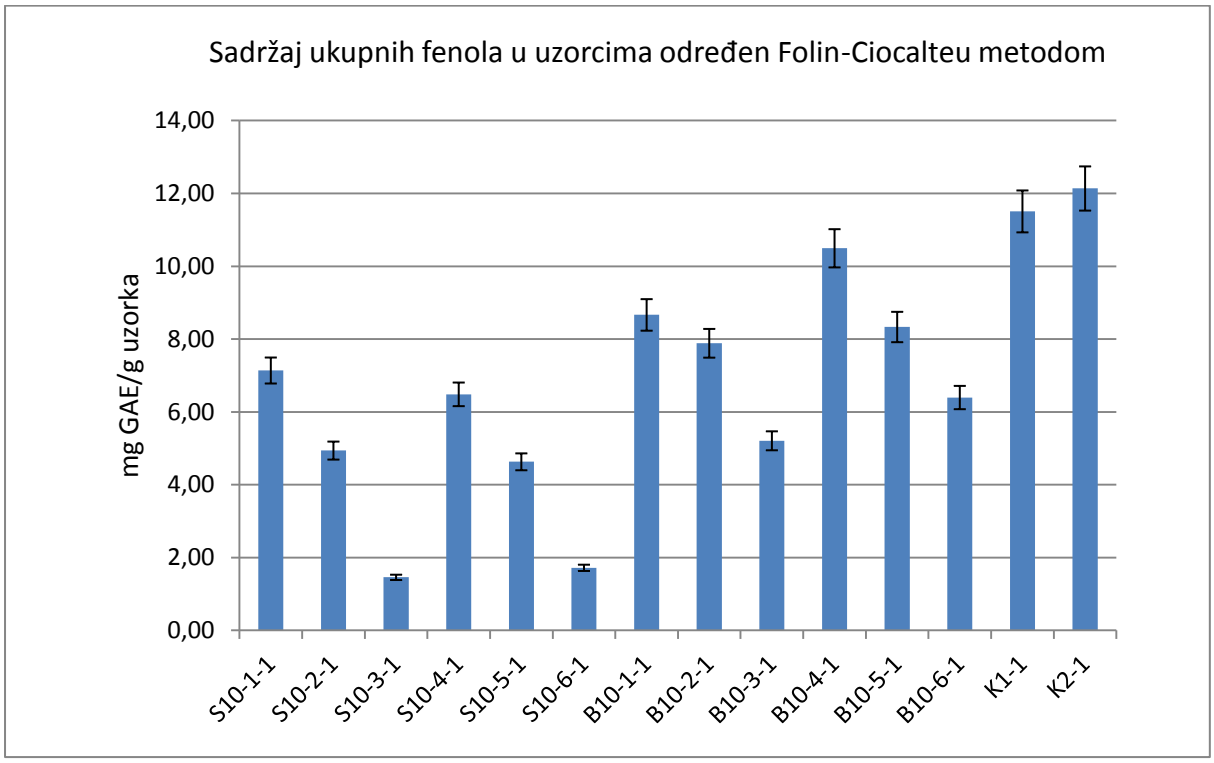
4.2.Rasprava

Ovaj rad dio je šire studije o istraživanjima učinka zamjene različitih udjela kakaa u smjesi za pripravu slatkog napitka sa dvije vrste rogačevog brašna (sa odnosno bez sjemenki) te zamjene dijela saharoze steviom. Cilj studije je istražiti utjecaj promjena recepture na nutritivna, funkcionalna i senzorna svojstva smjese te ponašanje smjese tijekom tehnološkog procesa prerade.

U okviru spomenute studije, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaje promjena recepture na udio ukupnih fenola, antiradikalnu učinkovitost i reduktivnu sposobnost. Obzirom da su najviše vrijednosti udjela polifenola i antioksidacijske aktivnosti dobivene za uzorke K1 i K2 (kontrole) koje sadrže čisti kakao, može se zaključiti da je glavni nositelj antioksidativne aktivnosti u navedenim uzorcima kakao, zahvaljujući visokom udjelu ukupnih fenola koje sadrži. To je u skladu sa istraživanjima Crozierea i suradnika (2011), gdje je utvrđeno da kakao sadrži značajno viši udio ukupnih fenola u usporedbi sa drugim voćem korištenim u ispitivanju.

Obzirom na podjednake vrijednosti promatranih parametara u "paralelnim" uzorcima koii se po sastavu razlikuju samo obzirom na sastav zaslađivača može se zaključiti da vrsta zaslađivača u smjesi nema značajan učinak na promatrane parametre.

Nadalje, analizom rezultata dobivenih ovim istraživanjem utvrđeno je da je antioksidacijski potencijal uzoraka obrnuto proporcionalan udjelu rogača u pojedinom uzorku. Također, uočena je razlika u antioksidacijskom potencijalu uzoraka koji sadrže, u odnosu na one koji ne sadrže sjemenke rogača.

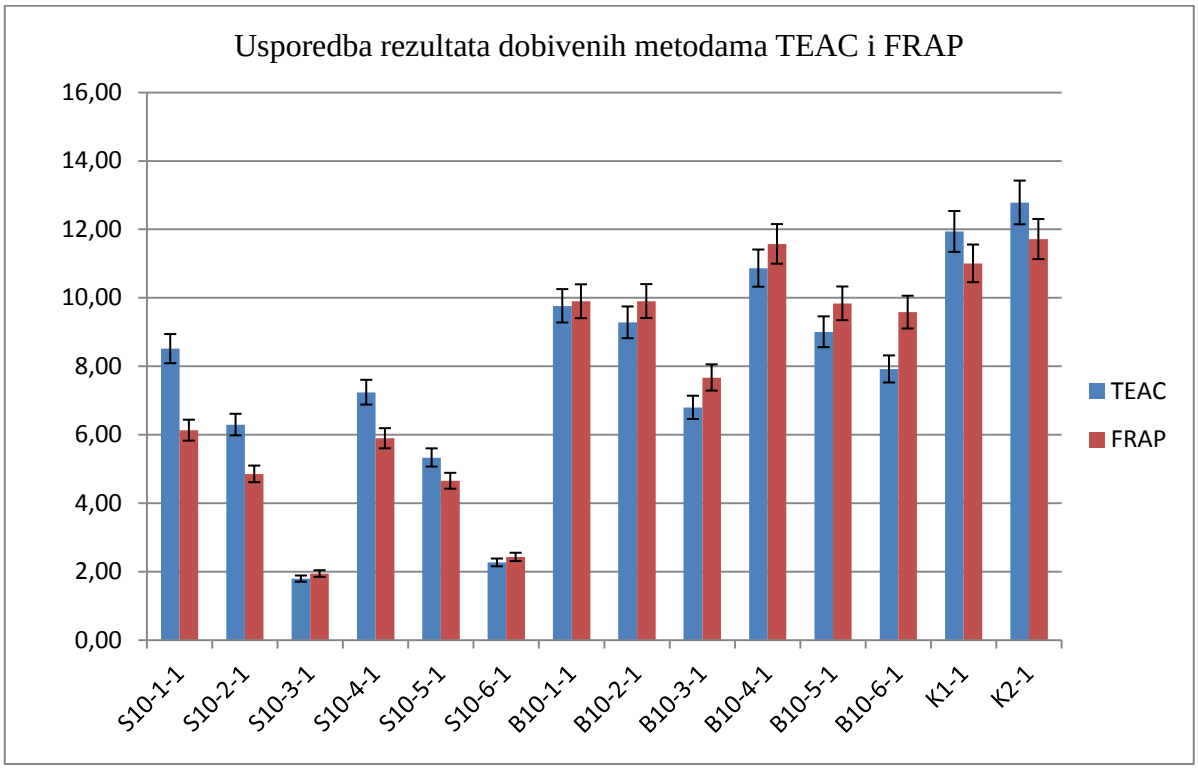


Slika 4.1. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Analizom rezultata dobivenih određivanjem ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom (**Slika 4.1.**), očekivano je utvrđen najviši sadržaj fenola u kontrolnim uzorcima K1-1 i K2-1 koji sadrže najveći udio kakaa (60g). Najniži udio ukupnih fenola pokazali su uzorci koji u svom sastavu nemaju kakao, već 60 g rogača i saharozu (140 g). Ovi rezultati usporedivi su sa rezultatima drugih autora. Lee i sur. (2003) utvrdili su kako kakao ima viši antioksidacijski kapacitet od zelenog čaja, crnog čaja i crnog vina koji su inače vrlo jaki antioksidansi. Naime, vrijednosti ekvivalenata galne kiseline određeni za kakao pokazale su se za 1.8, 3.7 i 4.9 višim nego vrijednosti za prethodno navedene jake antioksidanse.

Iako se glavnim nositeljem antioksidativne aktivnosti u uzorcima korištenim u istraživanju smatra kakao, doprinos rogača ukupnom rezultatu je neminovan što potvrđuju brojni podaci iz literature (Seçzyk i sur., 2016; Durazzo i sur., 2014). Primjerice, Racolta i sur., (2014) u svom su radu utvrdili kako se dodatkom 8% rogača u uzorak koji ne sadrži ni rogač ni kakao antioksidacijski potencijal povećao za 0.942 mg GAE/g , dok se dodatkom 8% kakaa istom uzorku antioksidacijski potencijal povećao za 1.792 mg GAE/g uzorka. Slično tome, u radu Seçzyk i suradnika (2015) uočena je pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i

postotka brašna rogača prilikom izrade smjese za tjesteninu. Najviše vrijednosti određene su u smjesi sa dodatkom 5% brašna rogača (12.12 mg GAE/g suhog ostatka), što je ujedno bila i smjesa sa najvišim udjelom rogača. U usporedbi sa kontrolom, suplementirane smjese su pokazale 0.5-2 puta višu koncentraciju ukupnih fenola. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da se povećanjem udjela rogača u smjesi povećala i razina ukupnih fenola, a time i ukupna antioksidativna aktivnost (Seczyk i sur., 2015).



Slika 4.2. Grafički prikaz rezultata određivanja reduktivnog potencijala FRAP metodom i sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

Schinella i sur. (2010) proučavali su antioksidacijsku aktivnost različitih ekstrakata kakaa i pokazali njihove učinke na različite *in vitro* eksperimentalne modele, dokazujući da antioksidacijski učinci ne mogu biti u potpunosti karakterizirani jednom metodom. Antioksidativna aktivnost uzoraka u ovom radu određena je dvjema metodama: FRAP i TEAC. Obje metode pokazuju da najmanju antioksidativnu učinkovitost ima uzorak S10-3-1,

odnosno uzorak koji sadrži samo rogač (60 g) i saharozu (140g), a najveću uzorak B10-4-1 koji sadrži samo kakao (60g) i 140g saharoze (**Slika 4.2.**). Rezultati dobiveni ovim dvjema metodama odgovaraju udjelu ukupnih fenola dobivenim metodom Folin-Ciocalteu, što potvrđuje pretpostavku da su navedene komponente nositelji antioksidativne aktivnosti (Hajaji i sur., 2010; Chanda i Dave, 2009; Liu i sur.,2009).

Analizom rezultata dobivenih TEAC i FRAP metodom uočeno je da se navedene metode međusobno razlikuju prema poretku antioksidativne aktivnosti. Takav rezultat može se objasniti činjenicom da antioksidativne komponente imaju različiti mehanizam antioksidativne učinkovitosti (Tachakittirungrod i sur., 2007) te da se metode TEAC i FRAP temelje na različitim mehanizmima (Re i sur.,1999; Benzie i Strain, 1996). Naime, bilo koja komponenta (čak i bez antioksidativnog djelovanja) koja ima redoks potencijal niži od onog koji ima redoks par Fe(III)/Fe(II), teoretski može reducirati Fe(III) i uzrokovati lažno povišene vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP metodom (Magalhaes i sur., 2008).S druge strane, ne reduciraju svi antioksidansi Fe(III) dovoljno brzo da bi bilo izmjereno unutar intervala mjerenja (Šaler, 2013).

Tablica 4.4. Korelacija između rezultata dobivenih metodama FC, TEAC i FRAP

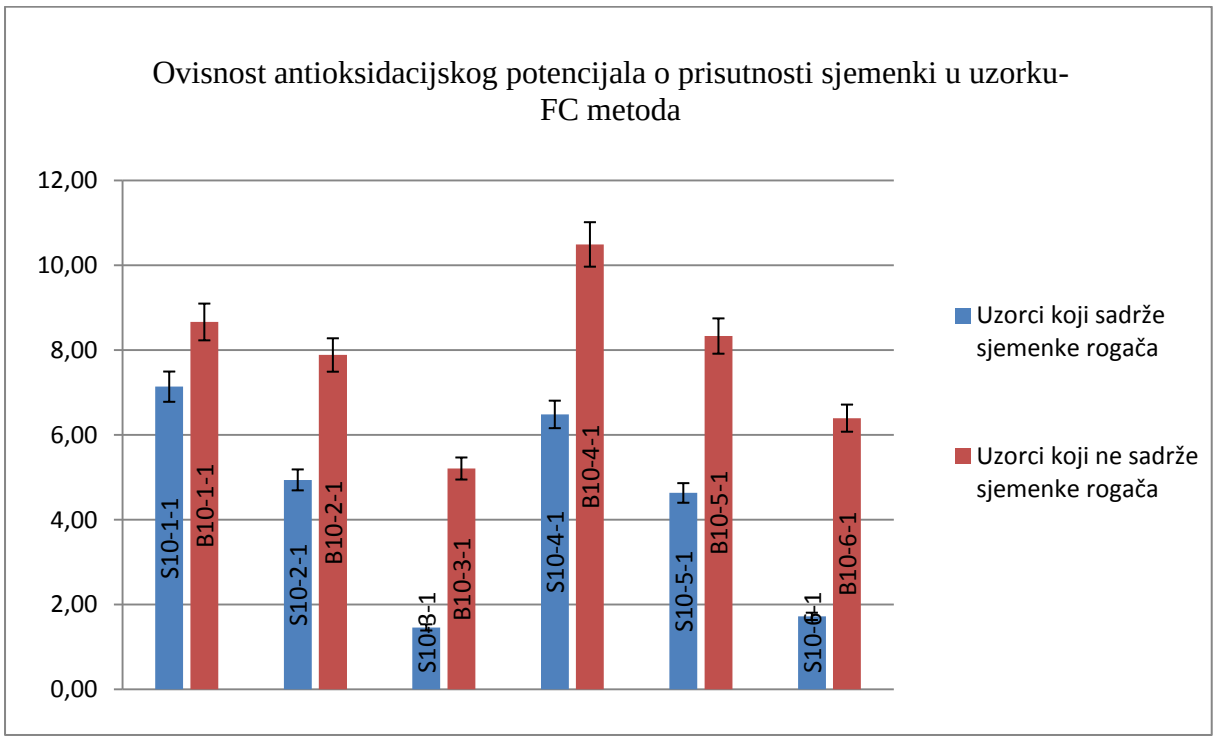
	R^2	**P** vrijednost
FC-TEAC	0,9804	<0,05
FC-FRAP	0,8850	<0,05
TEAC-FRAP	0,8596	<0,05

U **Tablici 4.4.** prikazana je korelacija između rezultata dobivenih metodama Folin-Ciocalteu, TEAC i FRAP. Koeficijent korelacije između rezultata dobivenih FC i TEAC metodom jako je visok (R^2=0,9804), a $P < 0,05$ čime se potvrđuje značajna korelacija između ovih dviju metoda. Koeficijenti korelacije između FC-FRAP i TEAC-FRAP metoda su nešto niži (R^2=0,8850 i R^2=0,8596) te se iz njihovih vrijednosti ne može potvrditi značajna korelacija

među ovim metodama. Međutim, P vrijednost je također manja od 0,05, čime je utvrđeno da također postoji korelacija između rezultata dobivenih navedenim metodama.

Na **slici 4.3.** grafički je prikazana usporedba rezultata određivanja ukupnih fenola u uzorcima sa i bez sjemenki rogača. Uočava se značajno viši udio ukupnih fenola u uzorcima koji ne sadrže sjemenke rogača.

Smanjenje udjela ukupnih fenola u uzorcima koji sadrže sjemenke rogača može se pripisati nižem sadržaju fenola u samim sjemenkama, za razliku od njihovog sadržaja u ostatku ploda rogača (Benković i sur., 2017). Naime, poznato je da se sjemenke rogača uglavnom sastoje od ugljikohidrata, najvećim dijelom galaktomanana (Makris i Kefalas, 2004).



Slika 4.3. Grafički prikaz ovisnosti antioksidacijskog potencijala o prisutnosti sjemenki rogača u uzorku

Razlog smanjene antioksidativne aktivnosti uzoraka sa sjemenkama mogu biti i neke reakcije koje su se odvile i u samom postupku ekstrakcije. Naime, hidrokoloidna svojstva nekih sastavnica sjemenki rogača mogla su u vodenom mediju pokrenuti proces geliranja i time uzrokovati povećanje viskoznosti ekstrakcijske smjese. Time se značajno smanjuje i mogućnost difuzije polifenolnih sastavnica, što na kraju rezultira sniženom ekstrakcijom samih polifenola (Benković i sur. 2017). Istraživanja na svojstvima geliranja škroba u prisutnosti vode pokazala su kako dodatak fenolnih komponenti uvelike utječe na navedena svojstva škroba, što se može objasniti činjenicom da fenolne komponente sadrže hidroksilne i karboksilne skupine koje su u kompeticiji sa škrobom za vodom (Guzari i sur., 2012).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih određivanjem antioksidacijskog potencijala smjesa sa različitim udjelom kakaa odnosno rogača sa i bez sjemenki uz dodatak određenih zaslađivača može se zaključiti:

- Najveća koncentracija antioksidansa dokazana je u smjesama koje sadrže samo kakao, čime se potvrđuje da kakaovac sadrži puno više polifenola nego rogač

- Povećanjem udjela rogača u smjesi smanjuje se antioksidacijski potencijal i udio polifenola, međutim uzorci sa najvišim udjelom brašna rogača zadržavaju značajan udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost

- Uzorci koji sadrže brašno rogača bez sjemenki vredniji su izvor polifenola, što se objašnjava činjenicom da sjemenka rogača sadrži puno niže vrijednosti polifenola nego pulpa rogača

- Vrsta zaslađivača koja je dodana u uzorke korištene u ispitivanju ne utječe na vrijednosti antioksidacijskog potencijala i količinu polifenola

- Rezultati određivanja sposobnosti hvatanja radikala TEAC metodom i reduktivne sposobnosti FRAP metodom su u međusobnoj korelaciji

6.LITERATURA

Angst E, Park JL, Moro A, Lu QY, Lu X, Li G, King J, Chen M, Reber HA, Go VL. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Br J Nutr*, 2013, 42, 223-229.

Ayaz FA, Torun H, Glew RH, Bak ZD, Chuang LT, Presley JM, Andrews R. Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) flour prepared commercially and domestically. Plant Foods Hum Nutr. 2009, 64, 286-292.

Battle i, Tous J. Promoting the conservation and use of underutilized crops (*Ceratonia siliqua L.)* Rim, International Plant Genetics Resources Institute (IPGI), 1997, 20-29.

Benković MA, Belščak-Cvitanović I, Bauman, Komes, Srečec S. 2017. Flow properties and chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flours as related to particle size and seed presence. *Food Research International*,2017, 8, 1362-1383.

Benzie I, Strain J. The feric reducing ability of plasma as the measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Annal Biochem*, 1996, 239, 70-76.

Biner B, Gubbuk H, Karhan M, Aksu M, Pekmezci M. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (Ceratonia siliqua L.) in Turkey. *Food Chem*,2007, 100, 1453–1455.

Chanda S, Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res*, 2009, 3, 981-996.

Colombo ML, Pinorini-Godly MT, Conti A. (2012) Botany and pharmacognosy of the cacao tree. U: Chocolate and health. Conti A, Paoletti R, Poli A, Visioli F, urednici, Milan, 2012, str. 41-62.

Craig WJ, Nguyen TT (1984). Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J Food Sci*, 1984, 49, 302-306.

Crozier SJ, Preston AG, Hurst W, Payne MJ, Mann J, Hainly L, Miller DL. Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chem Cent J*, 2011, 5, 1186-1752.

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

Forestieri AM, Galati EM, Trovato A, Tumino G. Effects of guar and carob gums on glucose, insulin and cholesterol plasma levels in the rat. *Phytother Re*s, 1989, 3, 1-4.

Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients,*2013, 5, 4159–4170.

Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou MV, Mavromoustakos T, Tzakos AG. Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int J Mol Sci*, 2016, 1462-1469.

Gruendel S, Otto B, Garcia AL, Wagner K, Mueller C, Weickert MO, Heldwein W, Koebnick C. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans. *Br J Nutr*, 2007, 98, 101-105.

Haber, B. Carob fibersBenefits and applications. *Cereal Foods World* 2002, *47*, 365-369.

Hajaji HE, Lachkar N, Alaoui K, Cherrah Y, Farah A, Ennabili A, Bali B, Lachkar M. Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of carob tree leaves from Morocco. *Rec Nat Prod*, 2010, 4, 193-204.

Ho VTT, Zhao J, Fleet G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol*, 2014, 174, 72-87.

Holt RR, Actis-Goretta L, Momma TY, Keen CL. Dietary flavanols and platelet reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47, 187–196.

Ioannone F, Di Mattia CD, De Gregorio M, Sergi M, Serafini M, Sacchetti G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (Theobroma cacao L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chem*, 2015, 174, 256-262.

Katz, D.L. *et al.* (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15, 2779-2811.

Khatib S, Vaya J. Fig, Carob, Pistachio, and Health, Bioactive foods in promoting health, 2010, 17, 245-263.

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon MS, Nakayama T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J Agric. Food Chem*, 2002, *50*, 373-377.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 7292-7295.

Liu L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H, Zeng X. Determination of polyphenolic content andantioxidant activity of kudingcha made from Ilex kudingcha C.J. Tseng. *Food Chem*, 2009, 112, 35-41.

Loullis A, Pinakoulaki E. Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications. *Eur Food Res Technol*, 2017, 21, 1438-2377.

Lovrić M. Udio flavonoida u ekstraktima lišća rogača (Ceratonia siliqua, L.): utjecaj lokaliteta i spola biljke. Sveučilište u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Diplomski rad. 2015.

Magalha LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*, 2008, 613, 1-19.

Makris DP, Kefalas P. Carob pods (Ceratonia siliqua L.) as a source of polyphenolic antioxidants, *Food Technol Biotechnol*, 2004, 42, 105-108.

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

Matissek R. (1997) Evaluation of xanthine derivatives in chocolate-nutritional and chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung,* 1997, 205, 175-184.

Naghmouchi S, Khouja ML, Romero A, Tous J, Boussaid M. Tunisian carob (Ceratonia siliqua L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Sci Hortic*, 2009, 121, 125-130.

Papagiannopoulos M, Wollseifen HR, Mellenthin A, Haber B, Galensa R. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits /Ceratonia siliqua L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *J Agric Food Chem*, 2004, 3784-3791.

Racolta E, Muste S, Muresan AE, Muresan C, Bota M, Muresan V. Characterization of Confectionery Spreadable Creams Based on Roasted Sunflower Kernels and Cocoa or Carob Powder. *J. Food Sci. Technol,* 2014, 71, 2344-5300.

Ramiro E, Franch A, Castellote C, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Effect of Theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr*, 2005, 93, 859-866.

Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr*, 2009, 101, 931-940.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*, 1999, 26,1231-1237.

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

Samaržija I, Nutritivna i ljekovita svojstva rogača, *Farmaceutski glasnik*, 2013, 69, 454-461.

Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 2010, 1614-1623.

Seczyk L, Swieca M, Gawlik-Dziki U. Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta. *Food Chem,* 2016, 194, 637-642.

Selmi C, Mao TK, Keen CL, Schmitz HH, Eric Gershwin M. The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006, 47, 163-171.

Silanikove N, Landau S, Or D, Kababya D, Bruckental I, Nitsan Z. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (Ceratonia siliqua) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science* 2006, 99, 29-38.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungistic acid reagent. Am J Enol Vitic, 1965, 16, 144-158.

Šaler I. Utjecaj procesuiranja brašna rogača na antioksidacijsku učinkovitost liofiliziranog ekstrakta. Sveučilište u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Diplomski rad. 2013.

Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chem*, 2007, 103, 381-388.

Tetik N, Yüksel E. Ultrasound-assisted extraction of d-pinitol from carob pods using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21, 860-865.

Turhan I. Relationship between sugar profile and D-pinitol content of pods of wild and cultivated types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) *Int J Food Prop* 2013, 17, 363-370.

Vitali D, Šebečić B, Dragojević IV, Hečimović M, Dragičević I. Raw materials in fibre enriched biscuits production as source of total phenols. *Poljopr Znanst Smotra*, 2007, 72, 265-270.

Wielinga WC, Maehall AG. Galactomannans. U: Handbook of Hydrocolloids. Phillips GO, Williams PA, urednici, North and South American, 2009, 228-251.

Yousif AK, Alghzawi HM. Processing and characterization of carob powder. *Food Chem*, 200, 69, 283-287.

Zhao X, Wang Q, Yang S, Chen C, Li X, Liu J, Zou Z, Cai D. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur J Pharmacol*, 2016, 781, 60-68.

7.SAŽETAK/SUMMARY

Rogač (*Ceratonia siliqua, Fabaceae*) je višegodišnja zimzelena biljka koja u današnje vrijeme najvećim dijelom raste na području Sredozemlja. Zahvaljujući visokom udjelu polifenola, poznatih po svom jakom antioksidativnom učinku, plod rogača je danas tema brojnih znanstvenih istraživanja. Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj zamjene dijela kakaa rogačevim brašnom (onim bez sjemenki, kao i onim sa sjemenkama) u smjesi za pripremu napitka, na udio polifenola i antioksidacijski potencijal. Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativna učinkovitost je ispitana FRAP odnosno TEAC metodom. Rezultati istraživanja pokazali su da kakaovac sadrži više polifenola nego plod rogača te ima višu antioksidativnu učinkovitost. Uzorci sa povećanim udjelom brašna rogača pokazali su niži antioksidacijski potencijal i udio polifenola, međutim oni uzorci sa najvišim udjelom brašna rogača zadržali su značajan udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost. Uočena je značajna razlika u sadržaju polifenola između uzoraka koji sadrže brašno rogača sa sjemenkama u odnosu na uzorke sa brašnom bez sjemenki rogača. Naime, uzorci sa brašnom rogača iz kojeg su uklonjene sjemenke pokazali su se kao puno vredniji izvor polifenola. Vrsta zaslađivača koja je dodana u uzorke korištene u ispitivanju nije bitno utjecala na sadržaj polifenola i ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Rogač je bogat izvor brojnih bioaktivnih produkata koji su u posljednje vrijeme pokazali širok potencijal u terapiji i prevenciji različitih bolesti, čime se opravdava uloga rogača kao sve zastupljenije namirnice u prehrani čovjeka.

Carob (*Ceratonia siliqua, Fabaceae*) is an evergreen plant that nowadays grows mostly in Mediterranean. Due to the high content of polyphenols, known by their strong antioxidant activity, carob fruit has become the subject of numerous scientific researches. The purpose of this thesis was to explore the effect of replacing a part of cocoa powder with carob flour (those without seeds as well as those with seeds) in a mixture for the preparation of a beverage, on the content of polyphenols and antioxidant potential. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method and antioxidant effectiveness was examined by FRAP and TEAC method. Results of the research showed that cocoa contains more polyphenols than carob fruit and has higher antioxidant effect. Samples with higher share of carob flour showed lower antioxidant potential and lower polyphenolic content, but those samples with the highest amount of carob flour kept a significant share of polyphenols and antioxidant activity. There was a significant difference in polyphenolic content in samples that contain carob flour with seeds compared to those containing carob flour without seeds. Namely, samples containing deseeded carob flour are shown to be a more valuable source of polyphenols. The type of sweetener added to the samples used in the research did not have a significant influence on polyphenolic content and antioxidant activity. Carob is a source of numerous bioactive products which have recently shown wide potential in therapy and prevention of various diseases, thus justifying the increasing role of carob in human nutrition.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Antioksidativni potencijal i udio polifenola u napitcima na bazi rogača

Andrea Matak

SAŽETAK

Rogač (*Ceratonia siliqua, Fabaceae*) je višegodišnja zimzelena biljka koja u današnje vrijeme najvećim dijelom raste na području Sredozemlja. Zahvaljujući visokom udjelu polifenola, poznatih po svom jakom antioksidativnom učinku, plod rogača je danas tema brojnih znanstvenih istraživanja. Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj zamjene dijela kakaa rogačevim brašnom (onim bez sjemenki, kao i onim sa sjemenkama) u smjesi za pripremu napitka na udio polifenola i antioksidacijski potencijal. Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativna učinkovitost je ispitana FRAP odnosno TEAC metodom. Rezultati istraživanja pokazali su da kakaovac sadrži više polifenola nego plod rogača te ima višu antioksidativnu učinkovitost. Uzorci sa povećanim udjelom brašna rogača pokazali su niži antioksidacijski potencijal i udio polifenola, međutim oni uzorci sa najvišim udjelom brašna rogača zadržali su značajan udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost. Uočena je značajna razlika u sadržaju polifenola između uzoraka koji sadrže brašno rogača sa sjemenkama u odnosu na uzorke sa brašnom bez sjemenki rogača. Naime, uzorci sa brašnom rogača iz kojeg su uklonjene sjemenke pokazali su se kao puno vredniji izvor polifenola. Vrsta zaslađivača koja je dodana u uzorke korištene u ispitivanju nije bitno utjecala na sadržaj polifenola i ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Rogač je bogat izvor brojnih bioaktivnih produkata koji su u posljednje vrijeme pokazali širok potencijal u terapiji i prevenciji različitih bolesti, čime se opravdava uloga rogača kao sve zastupljenije namirnice u prehrani čovjeka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranica, 12 grafičkih prikaza, 10 tablica i 52 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rogač, kakao, kakaovac, polifenoli, antioksidansi

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of nutritional chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Antioxidant potential and polyphenolic share in carob based beverages

Andrea Matak

SUMMARY

Carob (Ceratonia siliqua, Fabaceae) is an evergreen plant that nowadays grows mostly in Mediterranean. Due to the high content of polyphenols, known by their strong antioxidant activity, carob fruit has become the subject of numerous scientific researches. The purpose of this thesis was to explore the effect of replacing a part of cocoa powder with carob flour (those without seeds as well as those with seeds) in a mixture for the preparation of a beverage, on the content of polyphenols and antioxidant potential. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method and antioxidant effectiveness was examined by FRAP and TEAC method. Results of the research showed that cocoa contains more polyphenols than carob fruit and has higher antioxidant effect. Samples with higher share of carob flour showed lower antioxidant potential and lower polyphenolic content, but those samples with the highest amount of carob flour kept a significant share of polyphenols and antioxidant activity. There was a significant difference in polyphenolic content in samples that contain carob flour with seeds compared to those containing carob flour without seeds. Namely, samples containing deseeded carob flour are shown to be a more valuable source of polyphenols. The type of sweetener added to the samples used in the research did not have a significant influence on polyphenolic content and antioxidant activity. Carob is a source of numerous bioactive products which have recently shown wide potential in therapy and prevention of various diseases, thus justifying the increasing role of carob in human nutrition.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 12 figures, 10 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: carob, cocoa, cocoa tree, polyphenols, antioxidants

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Reviewers: **Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr.sc. Lovorka Vujić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr.sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

The thesis was accepted: March, 2018.