

Prehrambena vlakna u dalmatinskom rogaču (*Ceratonía siliqua* L.)

Piršić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:876056>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Vedran Piršić

**Prehrambena vlakna u dalmatinskom rogaču
(*Ceratonia siliqua* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2015.

Diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom dr. sc. Lovorke Vujić.

Zahvaljujem dr. sc. Lovorki Vujić na stručnim savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada, kao i svim članovima Zavoda za kemiju prehrane na susretljivosti tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja. Hvala mojim prijateljima i kolegama koji su svojim postojanjem uljepšali moje studentske dane i učinili ih nezaboravnim dijelom mog života.

Najveće hvala mojim roditeljima i mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog života, pa tako i mog školovanja i studentskih dana. Bez vas ne bih bio to što jesam i ne bih danas pisao ove rečenice.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Taksonomija i zanimljivosti rogača.....	1
1.2. Botaničke karakteristike rogača.....	2
1.3. Kemijski sastav ploda rogača.....	4
1.3.1. Ugljikohidratni sastav.....	4
1.3.2. Mineralni sastav.....	5
1.3.3. Aminokiselinski sastav.....	6
1.4. Polifenolni spojevi: flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine.....	7
1.4.1. Flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine u plodu rogača.....	9
1.5. Farmakološki profil rogača (<i>Ceratonia siliqua</i> L.).....	10
1.6. Prehrambena vlakna.....	12
1.6.1. Topiva prehrambena vlakna.....	15
1.6.2. Netopiva prehrambena vlakna.....	16
1.7. Učinak prehrambenih vlakana na patološka i patofiziološka stanja.....	17
1.7.1. Kardiovaskularni sustav.....	17
1.7.1.1. Krvni tlak.....	17
1.7.1.2. Koronarna srčana bolest.....	18
1.7.1.3. Infarkt miokarda.....	18
1.7.1.4. Kolesterol.....	18
1.7.2. Dijabetes.....	18
1.7.3. Gastrointestinalni sustav.....	19
1.7.3.1. Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB).....	19
1.7.3.2. Sindrom iritabilnog kolona.....	20
1.7.3.3. Upalne bolesti crijeva (Chronova bolest i ulcerozni kolitis).....	20
1.7.3.4. Divertikuloza.....	20
1.7.3.5. Hemeroidi i konstipacija.....	20
1.7.4. Imunološki sustav.....	21
1.7.5. Fiziološki učinci prehrambenih vlakana kod djece.....	21
1.8. Prehrambena vlakna u rogaču (<i>Ceratonia siliqua</i> , L.).....	22
2. Obrazloženje teme.....	23
3. Materijali i metode.....	24

3.1. Materijali.....	24
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Određivanje ukupnih, topivih i netopivih prehrambenih vlakana koristeći MES/TRIS pufer. Metoda TDF 1.4 (AOAC 991.43)	24
3.2.1.1. Enzimaska digestija.....	27
3.2.1.2. Određivanje netopivih prehrambenih vlakana.....	27
3.2.1.3. Određivanje topivih prehrambenih vlakana.....	28
3.2.1.4. Određivanje pepelnog ostatka.....	29
3.2.1.5. Određivanje ukupnih prehrambenih vlakana.....	30
3.2.2. Određivanje udjela vode u uzorcima.....	31
3.2.3. Statistička obrada podataka.....	32
4. Rezultati i rasprava.....	33
4.1. Analiza vode u uzorcima.....	34
4.2. Analiza netopivih prehrambenih vlakana.....	35
4.3. Analiza topivih prehrambenih vlakana.....	40
4.4. Analiza ukupnih prehrambenih vlakana.....	46
4.5. Usporedba rezultata s preporučenim dnevnim unosom prehrambenih vlakana.....	52
4.6. Usporedba rezultata s literaturnim podacima.....	57
5. Zaključak.....	58
6. Literatura.....	59
7. Sažetak/Summary.....	67
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

1. Uvod

Stablo rogača (*Ceratonia siliqua*, L.) je zimzelena biljka uzgajana još od antičkih vremena u većini mediteranskih zemalja s umjerenom i suhom klimom.

Njegovu vrijednost prepoznali su drevni Grci, koji su donijeli rogač iz njegove pradomovine Srednjeg Istoka u današnju Grčku i Italiju, te Arapi koji su ga rasprostranili uzduž obala Sjeverne Afrike, Španjolske i Portugala.

Kroz stoljeća koja su uslijedila prepoznat je značajan farmakološki i nutritivni učinak rogača, o čemu svjedoči podatak od čak 310 000 tona rogačevog ploda proizvedenog godišnje, koji se danas koristi diljem svijeta (Makris i Kefalas, 2004.).

1.1. Taksonomija i zanimljivosti rogača

Znanstveni naziv rogača (*Ceratonia siliqua*, L.) dolazi od grčke riječi *keras*, što znači rog, aludirajući na oblik rogačevog ploda, i latinske riječi *siliqua*, što znači silicij, aludirajući na njegovu tvrdoću. Engleski naziv za rogač, *carob*, korijene vuče od hebrejskog naziva *kharuv*, iz kojeg je izveden arapski naziv *kharrub* i kasnije inačice: *carrubo* (talijanski), *caroubier* (francuski), *Karubenbaum* (njemački), *charaoupi* (grčki), *charnup* (turski) i *algarobbo/garrofero* (španjolski) (Hammer i sur., 1992.).

Rod *Ceratonia* spada u porodicu *Fabaceae* (*Leguminosae*), potporodicu *Caesalpinioideae*.

Rogač je poznat i pod nazivom kruh svetog Ivana, misleći na Sv. Ivana Krstitelja, koji ga je, prema predaji, koristio kao hranu. Odatle potječe i njemački sinonim za rogač: *Johannisbrotbaum*.

Zanimljivost rogača je i da su draguljari i zlatari koristili osušene sjemenke rogača kao jedinicu za vaganje zlata i dragog kamenja. Masa osušenih sjemenki rogača iznosi otprilike 200 mg, što su Arapi nazivali *karat*, odakle potječe i današnja oznaka: 1 metrički karat=200 mg (Batlle i Tous, 1997.).

1.2. Botaničke karakteristike rogača

Stablo rogača je sklerofilno, zimzeleno stablo visine do 10 metara, s polukružnom krošnjom, grubom korom i tvrdim smeđim granama. Naziv sklerofilno na grčkom znači „tvrdocijelno“ i karakteristika je biljaka tamnog lišća pokrivenog voštanim vanjskim slojem koji ima funkciju održavanja vlažnosti tijekom sušnih ljetnih mjeseci.



Listovi rogača sastoje se od tvrdog jednoslojnog gornjeg epidermisa, čije stanice sadrže fenolne spojeve unutar velikih vakuola, i donjeg epidermisa u kojem se nalaze puči.

Slika 1. List rogača (*Ceratoniae siliquae folium*, *Fabaceae*)

Na grančici se obično nalazi 4-10 parova nasuprotno raspoređenih listova, ovalnog ili eliptičnog oblika (Mitrakos, 1988.). Rogač ne pušta lišće u jesen, već samo u srpnju svake druge godine i samo djelomično obnavlja listove u proljeće, u travnju i u svibnju (Diamantoglou i Mitrakos, 1981.).

Rogač je dvodomna vrsta s nekim hermafroditnim oblicima, s tim da muški, ženski i hermafroditni cvjetovi obično rastu na odvojenim stablima. Cvjetovi su u početku dvospolni, no u kasnom razvoju funkcionalnih muških ili ženskih cvjetova jedan spol biva suprimiran (Tucker, 1992.). Dvodomnost nije česta pojava kod porodice *Fabaceae*. Gledajući evoluciju, jednospolnost se generalno smatra novijom karakteristikom, u odnosu na dvospolno naslijeđe.

Cvjetovi su mali i brojni, 6-12 mm dugi i spiralno raspoređeni oko cvatne osi u obliku resa te rastu iz izdanaka starog drva. Crvene su boje i pokazuju pentamernu simetriju s čaškom, ali ne i vjenčićem, smještenom na kratku peteljku. Čaška je crveno-zelene boje, u obliku diska, i sadrži nektarije.



Ženski cvjetovi sastoje se od tučka (6-8,5 mm) na disku s rudimentarnim prašnicima, dok se muški cvjetovi sastoje od 5 prašnika na nektarijskom disku, u sredini kojeg se nalazi rudimentarni tučak. Hermafroditni cvjetovi se sastoje od kombinacije navedena 2 tipa, sadržavajući i tučak i 5 funkcionalnih prašnika. (Linskens i Scholten, 1980.).

Slika 2. Cvijet rogača (*Ceratoniae siliquae flos*, *Fabaceae*)



Plod rogača je izdužena, komprimirana, ravna ili zakrivljena mahuna, 10-30 cm duga, 1.5-3.5 cm široka i otprilike 1 cm debela. Mahune se smeđe boje i imaju naboranu površinu, koja postaje kožasta kada plod sazrije. Pulpa se sastoji od vanjskog, kožastog sloja (perikarp) i mekšeg, unutarnjeg područja (mezokarp).

Slika 3. Plod rogača (*Ceratoniae siliquae fructus*, *Fabaceae*)

Unutar mahune nalaze se sjemenke koje su postavljene transverzalno, razdijeljene mezokarpom. Sjemenke su tvrde i brojne, 8-10 mm duge, 7-8 mm široke i 3-5 mm debele (Batlle i Tous., 1997.).

1.3. Kemijski sastav ploda rogača

Kemijski sastav ploda rogača uvelike ovisi o uvjetima kultiviranja, podrijetlu i vremenu berbe (Albanell i sur., 1991.). Navedenu činjenicu potvrđuju brojni znanstveni članci i istraživanja čiji su rezultati navedeni u sljedećim odlomcima.

1.3.1. Ugljikohidratni sastav

Ayaz i suradnici su 2007. godine proveli analizu ugljikohidratnog sastava plodova rogača iz Turske. Analizirani uzorci sadržavali su 437.3 mg saharoze po gramu suhog uzorka, 395.3 mg/g glukoze i 42.3 mg/g fruktoze. Ova 3 šećera zajedno su sačinjavala 87.54% suhe tvari uzorka. Važno je za naglasiti da udio šećera u uzorcima značajno ovisi o vrsti, varijetetu, fiziološkoj zrelosti, vremenu berbe, klimi i uvjetima skladištenja uzorka (Ayaz i sur., 2007.).

Prema Avallone i sur., pulpa mahune rogača sadrži: 34±3.6% saharoze, 4±1% glukoze i 6±2% fruktoze u 8 različitih plodova rogača s područja Sicilije. U istim uzorcima, udio ukupnih ugljikohidrata iznosio je otprilike 45% ukupne suhe tvari uzorka (Avallone i sur., 1997.).

Karkacier i Artik su analizom 22 uzorka ploda rogača iz Turske utvrdili da navedeni uzorci sadrže 34.22-42.35% saharoze i 52.7-62.3% ukupnih ugljikohidrata (Karkacier i Artik, 1995.).

Ozcan i suradnici su analizom uzoraka ploda rogača iz pokrajine Anatolije u Turskoj utvrdili da navedeni uzorci sadrže 48.35±0.52% ukupnih ugljikohidrata (Ozcan i sur., 2007.).

Ovako visok udio ugljikohidrata poslužio je znanstvenicima kao predmet istraživanja mogućnosti njegove primjene. Tako su Tagari i sur. još 1967. godine utvrdili korelaciju u antimikrobnom učinku između šećera i trjeslovina u rogačevom plodu. Proteolitički i antimikrobni učinak, za koji su zaslužne trjeslovine iz uzorka, poništava se povećanjem udjela šećera u istome. Kod koncentracija trjeslovina viših od 40 µg/mL, povećanjem udjela šećera ne poništavaju se učinci trjeslovina (Tagari i sur., 1967.).

Visok udio šećera u plodu rogača našao je svoju primjenu i u proizvodnji limunske kiseline, poznatom pojačivaču kiselosti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. T. Roukas istražio je dobivanje limunske kiseline fermentacijom šećera iz ploda rogača pomoću plijesni *Aspergillus niger* te ustanovio maksimalni udio od 176±4 g limunske kiseline na 1 kg suhog ploda rogača (Roukas, 1999.).

1.3.2. Mineralni sastav

Ayaz i suradnici su u 2 različite studije analizirali mineralni sastav plodova rogača iz Turske. Kalij (K) i natrij (Na) određeni su plamenom fotometrijom, fosfor (P) kolorimetrijom po molibden-vanadat metodi, dok su kalcij (Ca), magnezij (Mg) i elementi u tragovima: željezo (Fe), mangan (Mn), cink (Zn) i bakar (Cu) određeni atomsko-apsorpcijskom spektrofotometrijom (Ayaz i sur., 2007.; Ayaz i sur., 2009.).

Tablica 1. Mineralni sastav ploda rogača (*Ceratonia siliqua* L.)

*	Ayaz F.M. i sur. (2007.)	Ayaz F.M. i sur. (2009.)
Kalij (K)	9700±0	9070±82
Fosfor (P)	710±1	703±16
Kalcij (Ca)	3000±0	3040±121
Magnezij (Mg)	600±0	554±6
Željezo (Fe)	18.8±0.7	15.1±2.8
Mangan (Mn)	12.9±0.2	10.4±0.8
Cink (Zn)	7.5±0.5	6.6±0.7
Bakar (Cu)	8.5±0.6	5.2±1.3
Natrij (Na)	n.d.**	113±42

*sve veličine izražene su u µg/g suhe tvari uzorka

**n.d.=nije definirano

1.3.3. Aminokiselinski sastav

Ayaz i suradnici su 2007. godine proveli analizu aminokiselinskog sastava ploda rogača obrnuto-faznom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) te je ukupni udio proteina u uzorcima iznosio 4.45 ± 0.40 grama proteina na 100 g suhog uzorka, vrlo slično udjelu od 4.5 grama proteina na 100 g suhog uzorka ploda rogača koji je dobio Morton 1987. godine (Ayaz i sur., 2007.).

Tablica 2. Aminokiselinski sastav ploda rogača (*Ceratonia siliqua* L.)

*	Ayaz F.M. i sur. (2007.)
Asparaginska kiselina (Asp)**	18.25±0.21
Glutaminska kiselina (Glu)***	9.65±0.35
Serin (Ser)	6.80±0.57
Histidin (His)	2.80±0.00
Glicin (Gly)	3.55±0.07
Treonin (Thr)	5.10±0.14
Arginin (Arg)	3.20±0.42
Alanin (Ala)	10.55±0.07
Prolin (Pro)	5.80±0.42
Tirozin (Tyr)	1.70±0.00
Valin (Val)	9.05±0.35
Metionin (Met)	1.40±0.28
Cistein (Cys)	0.80±0.28
Izoleucin (Ile)	3.80±0.00
Leucin (Leu)	9.30±0.14
Fenilalanin (Phe)	3.10±0.14
Lizin (Lys)	4.20±0.00
Triptofan (Trp)	0.95±0.07

*sve veličine izražene su kao g/100g proteina uzorka

**Asparaginska kiselina+asparagin

***Glutaminska kiselina+glutamin

1.4. Polifenolni spojevi: flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine

Fenolni spojevi se definiraju kao kemijske strukture koje sadrže 1 ili više aromatskih prstenova na koji je vezana barem 1 hidroksilna skupina. Određene biljke sintetiziraju velik broj fenolnih spojeva kao produkte svog metabolizma, od kojih su mnogi znanstveno prepoznati kao farmakološki aktivne komponente. Fiziološki vrlo značajni polifenolni spojevi, kao sekundarni biljni metaboliti, su: flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine (Jaganath i Crozier, 2010.).

Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se sastoje od 15 ugljikovih atoma organiziranih u C₆-C₃-C₆ strukturni kostur sastavljen od 2 aromatska prstena povezana ugljikovim mostom s heterocikličkim prstenom koji sadrži kisikov atom. Većina flavonoida dolazi u obliku glikozida, koji mogu biti ili O- ili C-vezani, a ovisno o modifikacijama centralnog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti u 6 skupina: flavonole, flavone, flavan-3-ole, flavanone, izoflavone i antocijanidine (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011.).

Flavonoli su najraširenija skupina flavonoida. Najvažniji predstavnici su kvercetin, kemferol, miricetin i metilirani derivat izoramnetin. Flavonoli u biljnom tkivu uvijek dolaze u formi glikozida, od kojih su najznačajniji glikozidi kvercetina (Jaganath i Crozier, 2010.).

Flavan-3-oli su strukturno najkompleksnija skupina flavonoida, od jednostavnih monomera (+)-katehina i njegovog izomera (-)-epikatehina, do oligomernih i polimernih proantocijanidina, koji se još nazivaju i kondenziranim trjeslovinama (Crozier i sur., 2006.).

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline, zajedno s flavonoidima i trjeslovinama, čine važnu skupinu sekundarnih biljnih metabolita. Glavne skupine fenolnih kiselina su: C₆-C₁ hidroksibenzoati i C₆-C₃ hidroksicinamati, sa svojim konjugiranim derivatima.

Hidroksibenzoati su obično prisutni u vezanom obliku kao komponentne kompleksnijih struktura poput lignina i hidrolizirajućih trjeslovina. Najvažniji predstavnici su: galna kiselina, p-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina i siringična kiselina.

Hidroksicinamati su često prisutni u voću i povrću, a najznačajniji predstavnici su: p-kumarinska, kafena i ferulična kiselina (Jaganath i Crozier, 2010.).

Trjeslovine

Trjeslovine su fenolni spojevi dovoljno velike molekulske mase, koji sadrže dovoljno fenolnih i drugih odgovarajućih skupina (npr. karboksilnih), da mogu tvoriti čvrste komplekse s proteinima i drugim makromolekulama (Horvath, 1981.).

Dijele se na dvije skupine: hidrolizirajuće trjeslovine i proantocijanidine.

Hidrolizirajuće trjeslovine su esteri galne ili elagične kiseline i poliolne strukture (najčešće šećera) koja kasnije služi kao jezgra cijele molekule. Daljnja podjela ovisi o produktima hidrolize, pa su tako *galotanini* spojevi čijom hidrolizom nastaju galna kiselina i glukoza, dok su *elagitanini* spojevi čijom hidrolizom nastaju elagična kiselina i glukoza.

Proantocijanidini, poznati i pod nazivom *kondenzirane trjeslovine*, su polimeri flavonoida. Uslijed oksidativnog cijepanja proantocijanidinske strukture nastaju antocijanidinski pigmenti poput cijanidina, u slučaju kondenziranih (epi)katehinskih jedinica, i delfinidina, u slučaju (epi)galokatehinskih jedinica (Hagerman, 1998.).

Oksidativni stres i fiziološki učinak polifenolnih spojeva

Oksidativni stres se smatra vrlo značajnim, ako ne i ključnim faktorom u začetku i razvoju mnogih bolesti i stanja, uključujući: upalu, autoimune bolesti, karcinome, neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove bolesti i kronične bolesti poput arterioskleroze (Lukyanova i sur., 2007.).

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oštećenja uzorkovanih slobodnim radikalima, a neravnoteža između antioksidanasa i slobodnih radikala rezultira oksidativnim stresom, koji vodi ka staničnom oštećenju (Kukic i sur., 2006.).

Antioksidacijski učinak polifenolnih spojeva je posredovan sljedećim mehanizmima: (1) vezanje slobodnih radikala poput reaktivnih kisikov spojeva (ROS) i slobodnih dušikovih spojeva (RNS) i (2) suprimiranje stvaranja ROS/RNS inhibiranjem enzima ili kelatiranjem određenih metala uključenih u stvaranje slobodnih radikala (Cotelle, 2001.).

Antioksidansi u hrani su vrlo obećavajući inhibitori karcinoma zbog njihove visoke sigurnosti, male toksičnosti i opće prihvaćenosti (Ogasawara i sur., 2007.).

Izolirani polifenoli iz različitih biljaka, poput kemferola, kvercetina, antocijanina i elagične kiseline, pokazali su inhibitorni učinak na rast stanica tumorskih linija karcinoma dojke (MCF-7), kolona (HT-29, HT-116) i prostate (LNCaP, DU-145) (Zhang i sur., 2008.).

Kemferol je pokazao inhibiciju rasta tumorskih stanica karcinoma jajnika (91%) i A2780/CP70 (94%) u koncentracijama od 20 i 40 μM , kao i tumorskih stanica karcinoma dojke (Luo i sur., 2009.).

Epigalokatehin-3-galat je djelotvoran antiangiogenetski agens koji inhibira invaziju i proliferaciju tumorskih stanica (Tang i sur., 2007.), kao i rast tumorskih stanica karcinoma mokraćnog mjehura tipa NBT-II i tumorskih stanica karcinoma dojke (Chen, 2004.).

Kombinirana terapija kvercetina i ultrazvuka na kožu i karcinom prostate pokazala je 90%-tnu smrtnost tumorskih stanica, bez utjecaja na zdrave stanice (Paliwal i sur., 2005.).

Antioksidacijski potencijal trjeslovina potvrđen je, između ostalih, i utvrđivanjem antioksidacijske aktivnosti epikatehin-(4->8)-katehina (procijanidina). Pokazano je da navedeni polifenol može vezati radikale u gastrointestinalnom sustavu čak i u kompleksu s modelnim proteinom serumskog albumina (Riedl i Hagerman, 2001.).

1.4.1. Flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine u plodu rogača

Ayaz i suradnici su 2007. godine proveli analizu polifenolnog sastava ploda rogača. Galna kiselina je korištena kao kalibracijski standard za kvantificiranje ukupnih fenola i galotanina, a (\pm)-katehin kao kalibracijski standard za kvantificiranje ukupnih flavonoida i proantocijanidina. Podaci su izraženi su kao mg-ekvivalenti galne kiseline (GAE) i mg-ekvivalenti katehina (CE) po gramu suhog uzorka.

Analizom su utvrđena dva derivata hidroksibenzojeve kiseline (galna i siringična kiselina) i jedan derivat hidroksicimetne kiseline (sinapična kiselina). Hidroksibenzoati sačinjavali su 99% ukupnih fenolnih kiselina, naspram 0,1% hidroksicinamata.

Određen je udio ukupnih fenola od 13.51 mg-ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g suhog uzorka, 0.36 mg GAE galotanina/g suhog uzorka, 0.41 mg CE flavonoida/g suhog uzorka i 3.21 mg CE proantocijanidina/g suhog uzorka. Ukupni fenoli uključivali su i produkte razgradnje trjeslovina: epigalokatehin, epigalokatehingalat i epikatehingalat, zajedno s jednostavnijim fenolima (Ayaz i sur., 2007.).

Gotovo jednake količine proantocijanidina (3.21 mg CE/g suhog uzorka) i galotanina (0.36 mg GAE/g suhog uzorka) pronađene su uzorcima ploda rogača sa Sicilije: redom 2.75 ± 0.75 mg CE/g i 0.44 ± 0.12 mg GAE/g (Avallone i sur., 1997.).

Slična količina ukupnih flavonoida (0.41 mg CE/g suhog uzorka) pronađena je u uzorcima ploda rogača s Krete: 0.48 mg CE/g suhog uzorka (Ayaz i sur., 2007.).

Owen i suradnici su analizom ploda rogača utvrdili ukupno 24 polifenolna spoja, među kojima je dominirala galna kiselina. Flavonoidi su predstavljali 26% ukupnih polifenola, od kojih najviše glikozidi miricetin-3-*O*- α -L-ramnozid (9%) i kvercetin-3-*O*- α -L-ramnozid (10%). Na temelju navedenih rezultata zaključeno je da uključivanje rogača u prehranu može imati kemoprotektivni učinak (Owen i sur., 2003.).

1.5. Farmakološki profil rogača (*Ceratonia siliqua* L.)

Farmakološki profil rogača posljedica je njegovog bogatog kemijskog sastava koji je opisan u prethodnim poglavljima. Na temelju navedenog kemijskog sastava i poznavanja farmakoloških mehanizama djelovanja pojedinih sastavnica, brojni znanstvenici dokazali su ljekoviti i preventivni učinak rogača na mnoga patološka i patofiziološka stanja.

Citostatički učinak. U *in vitro* studiji koja je koristila stanične linije hepatocelularnog karcinoma kod miša (T1), 2 ekstrakta rogača pokazala su značajnu alternaciju u proliferaciji T1 staničnih linija. Učinak je bio ovisan o dozi, postižući maksimalni učinak kod doze od 1 mg/mL. Štoviše, ekstrakti lista i ploda su uspješno inducirali apoptozu T1 staničnih linija poslije 24 sata tretmana, posredujući direktnom aktivacijom staničnog puta kaspaze-3. Učinci se prepisuju galnoj kiselini, (-)-epigalokatehingalatu i epikatehin-3-galatu u ekstraktima lista i ploda rogača (u koncentracijama od 6.28 mg/g u ekstraktu lista rogača i 1.36 mg/g u ekstraktu ploda rogača) (Corsi i sur., 2002.).

U drugoj *in vitro* studiji, ekstrakt rogača je modulirao rast stanica ljudskog karcinoma kolona i ljudskog adenoma kolona, u ovisnosti o kinetici rasta staničnih linija. Visoko proliferirajuće stanice bile su podložnije inhibitornom učinku na rast, od stanica s malim stupnjem stanične diobe. Uzrok ovog učinka leži u mehanizmu hvatanja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva te u indukciji enzima ovisnih o stresu, što dovodi do indukcije staničnog obrambenog sustava (Klenow i sur., 2004.).

Antidijabetički učinak. U studiji na štakorima, dodatak 2.5% ekstrakta ploda rogača u otopinu oralnog testa tolerancije na glukozu značajno je smanjio nastanak povratne hipoglikemije (Tsai i sur., 1981.).

U kliničkom ispitivanju, ekstrakt ploda rogača značajno ($p < 0.05$) je smanjio koncentraciju glukoze u krvi u pacijenata s dijabetesom tipa 2, nakon konzumiranja hrane s visokim glikemijskim indexom. Navedeni ekstrakt nije imao značajniji učinak na smanjivanje koncentracije glukoze u krvi kod pacijenata s dijabetesom tipa 2 i BMI > 30 kg/m² (Feldman i sur., 1995.).

U drugoj studiji, otopina ksantina i ekstrakta ploda rogača (u omjerima 1:1) bila je djelotvornija u inhibiranju povećanja koncentracije glukoze od otopine samog ekstrakta ploda rogača. S druge strane, otopina nije bila djelotvornija kod pacijenata u smanjivanju postprandijalne glukoze u krvi i plazmatskog inzulina kada je bila ukomponirana u piće koje je sadržavalo 50 grama glukoze (Edwards i sur., 1987.).

Antidijaroični učinak. U *in vitro* studiji, 20 od 36 sojeva bakterija izoliranih iz dvanaesnika djece s dijarejom pokazalo je odgovor na tretiranje 2 %-tnom otopinom ekstrakta rogača. Navedena otopina blokirala je hemaglutinaciju i adherenciju bakterijske vrste *Escherichia coli* na izolirane epitelne stanice intestinuma, a aktivni blokirajući agens pronađen je u oligosaharidnoj frakciji otopine ekstrakta rogača (Guggenbichler i sur., 1983.).

Antioksidacijski učinak. U *in vitro* studiji, sirova polifenolna frakcija iz rogača pokazala je snažniji inhibitorni učinak na diskoloraciju beta-karotena od drugih polifenolnih struktura, poput katehina i procijanidina. Sirova polifenolna frakcija pokazala je slabiji antioksidacijski učinak u vezanju slobodnih DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala u mikrosomalnim sustavima od autentičnih polifenolnih struktura, poput katehina i procijanidina, pri istim koncentracijama (Kumazawa i sur., 2002.).

U drugoj *in vitro* studiji, koja je koristila lipidnu peroksidaciju induciranu UV-zračenjem, ekstrakt ploda rogača također je pokazao antioksidacijski učinak (Trommer i sur., 2005.).

Antiviralni učinak. U *in vitro* studiji, polisaharidi iz ekstrakta ploda rogača blokirali su korak u replikaciji virusa rubeole nakon vezanja virusa za stanicu. Korak je obuhvaćao faze internalizacije i otpuštanja virusne ovojnice. Polisaharidi nisu imali učinka na infekciju iniciranu transfekcijom stanica s rubeola virusnom RNA (Mastromarino i sur., 1997.).

Gastrointestinalni učinak. Plod rogača pokazao je učinak na modifikaciju strukture i viskoznosti hrane te stupanj razgradnje škroba tijekom probave (Brennan i sur., 2005.). U studiji provedenoj na štakorima, dodatak ekstrakta ploda rogača prehrani smanjio je stupanj gastričkog pražnjenja i time usporio prolaz hrane iz želuca u tanko crijevo (Tsai i sur., 1981.). U drugom provedenom ispitivanju, plod rogača je značajno smanjio koncentraciju dušika u urinu i povećao suhu tvar fecesa, kao i gubitak dušika putem fecesa, što ukazuje na značajno smanjenje probavljivosti proteina (Harmuth-Hoene i sur., 1979.).

Hipolipemijski učinak. Ekstrakt ploda rogača, sam i u kombinaciji s prehranbenim vlaknima, pokazao se kao djelotvoran i siguran agens u kontroli hiperlipidemije, smanjivanju plazmatskog kolesterola u odraslih (Haskell i sur., 1992.) i smanjivanju visokih koncentracija LDL kolesterola u djece i adolescenata (Kwiterovich, 1995.). Također, povišeni jetreni kolesterol i ukupni lipidi u jetri, inducirani prehranom bogatom kolesterolom, u velikoj su mjeri neutralizirani istovremenim uzimanjem ploda rogača (Ershoff i sur., 1962.).

Učinak na gubitak težine. U provedenoj kliničkoj studiji, plod rogača je smanjio postprandijalnu koncentraciju triglicerida i ne-esterificiranih masnih kiselina te respiratorni kvocijent, ukazujući na povećanu oksidaciju masnih kiselina (Gruendel i sur., 2006.).

Unos ploda rogača smanjio je akumulaciju glikogena u jetri štakora (Krantz i sur., 1948.).

1.6. Prehrambena vlakna

Kroz povijest, stvaranje definicije prehrambenih vlakana je bilo produkt ravnoteže između znanja o prehrani, mogućnosti analitičkih metoda i, na dokazima osnovanih, fizioloških učinaka navedenih tvari. Rezultat je doveo do izostanka korelacije između teorijskog i praktičnog, što je u studenom 1998. godine nagnalo predsjednika Američkog udruženja kemičara žitarica (American Association of Cereal Chemists, AACC) da sastavi znanstveni odbor za reviziju i nadopunu svih znanstvenih činjenica do tada sakupljenih na ovom području. Odbor se sastojao od članova Akademije, znanstvenika i sveučilišnih profesora, koji su nakon dugog i temeljitog rada stvorili danas prihvaćenu znanstvenu definiciju prehrambenih vlakana koja glasi:

Prehrambena vlakna su jestivi dijelovi biljaka ili analozi ugljikohidrata rezistentni na probavu i apsorpciju u tankom crijevu, uz djelomičnu ili potpunu fermentaciju crijevnom mikroflorom u debelom crijevu. Uključuju: polisaharide, oligosaharide, lignin i s njima povezane biljne strukture. Prehrambena vlakna imaju blagotvorne fiziološke učinke na ljudski organizam, uključujući: laksativni učinak i/ili smanjenje kolesterola u krvi i/ili smanjenje glukoze u krvi (DeVries i sur., 2001.).

Analiza definicije:

„*Prehrambena vlakna*“ -još od 1953. godine i stvaranja naziva, znanstvenici su bili suočeni s poteškoćama u točnom definiranju pojma.

„*su jestivi dio*“ -da bi nešto bilo sastavni dio prehrane, očito, isti mora biti jestiv. Ovaj dio definicije ukazuje na činjenicu da prehrambena vlakna predstavljaju samo dio hrane ili hranjivog sastojka.

„*biljaka*“ -prehrambena vlakna su tradicionalno smatrana sastavnim dijelom biljaka. Prijedlozi za analizu neprobavljive hrane životinjskog podrijetla i njihovo uvrštavanje u skupinu prehrambenih vlakana su sagledani i odbačeni od strane znanstvene zajednice.

„*ili analozi ugljikohidrata*“ -ugljikohidrati, sa strukturama sličnim onima koji se javljaju u prehrambenim vlaknima, su pokazali jednak fiziološki učinak kao i njima analogne strukture u prehrambenim vlaknima.

„*rezistentni na probavu u tankom crijevu,*“ -otpornost na probavu i apsorpciju je ključ djelovanja prehrambenih vlakana u ljudskom organizmu. Da bi bili biodostupni, nutrijenti se moraju razgraditi, metabolizirati, otopiti ili na drugi način modificirati te apsorbirati kroz stijenku tankog crijeva u krvotok.

Prehrambena vlakna su jedinstvena po tome što prolaze kroz tanko crijevo neprobavljiva i dolaze u debelo crijevo gdje nastavljaju svoj fiziološki put.

„uz djelomičnu ili potpunu fermentaciju crijevnom mikroflorom u debelom crijevu.“- Pozitivni zdravstveni učinci prehrambenih vlakana velikim su dijelom posljedica njihove fermentacije koja se odvija u debelom crijevu. Fermentacija ima pozitivan učinak na laksaciju i pH crijeva te je ključan korak u stvaranju produkata kojima se pripisuju fiziološki učinci.

„Uključuju: polisaharide, ...“ - polisaharidi poput celuloze i hemiceluloze glavni su predstavnici prehrambenih vlakana te su kod mnogih upravo velike molekule celuloze razlog „vlaknastog“ izgleda samih vlakana.

„...oligosaharide, ...“ - oligosaharidi, odnosno kratkolančani polisaharidi, koji po konvenciji imaju stupanj polimerizacije od 3 do 10, pokazuju neke fiziološke karakteristike kao i njihovi veći srodnici te su stoga uključeni u definiciju.

„...lignin...“ - iako lignin, sam po sebi, nije polisaharid, on je usko vezan uz polisaharide prehrambenih vlakana i povećava njihovu otpornost na probavu.

„...i s njima povezane biljne strukture.“ - voskovi, kutin i suberin su nezasićene masne kiseline čiji su derivati, kao i lignin, usko vezani uz polisaharide prehrambenih vlakana. Često služe kao kemijski prenosnici između raznih drugih komponenata i povećavaju njihovu otpornost na probavu.

„Prehrambena vlakna imaju blagotvorne fiziološke učinke na ljudski organizam, uključujući:“ - znanstvena istraživanja su dokazala pozitivne fiziološke učinke prehrambenih vlakana, a analogni ugljikohidrati, obuhvaćeni definicijom prehrambenih vlakana, pokazali su barem jedan pozitivan fiziološki učinak obuhvaćen ovom definicijom.

„laksativni učinak“ - laksativni učinak je vrlo važan fiziološki učinak prehrambenih vlakana zbog kojeg su ona svrstana kao obavezna terapija kod konstipacije i opstipacije.

„i/ili“ - i/ili je uključeno u definiciju prehrambenih vlakana zbog činjenice da ne uzrokuju sva prehrambena vlakna sve navedene pozitivne fiziološke učinke, ali se može očekivati da će uzrokovati barem jedan od njih.

„smanjenje kolesterola u krvi i/ili smanjenje glukoze u krvi“ - pojam „smanjiti“, u znanstvenom smislu, znači prilagoditi određeni parametar unutar prihvatljivih okvira ili ga prilagoditi na željenu razinu. Istraživanja u proteklim desetljećima su pokazala da povećani unos prehrambenih vlakana uzrokuje pozitivnu prilagodbu serumskog kolesterola kao biomarkera u nastanku i razvoju koronarne bolesti. Također, konzumiranje obroka bogatog prehrambenim vlaknima uzrokuje zapaženo smanjenje postprandijalnog porasta koncentracije glukoze u krvi (DeVries i sur., 2001.).

Tablica 3. Pregled sastavnica prehrambenih vlakana

Ne-škrobni polisaharidi i rezistentni oligosaharidi
Celuloza
Hemiceluloza: Arabinoksilani Arabinogalaktani
Polifruktoze: Inulin Oligofruktani
Galaktooligosaharidi
Gume
Mucilagozi
Pektini
Analozi ugljikohidrata
Neprobavljivi dekstrini*: Rezistentni maltodekstrini Rezistentni dekstrini krumpira
Sintetski ugljikohidratni spojevi: Polidekstroze Metil-celuloza Hidrokipropil-metil-celuloza Neprobavljivi (rezistentni) škrob**
Biljne strukture povezane s ne-škrornim polisaharidnim i ligninskim kompleksom
Voskovi
Fitati
Kutin
Saponini
Suberin
Trjeslovine
Lignin

*Neprobavljivi dekstrini nastaju kao produkti kiselinske ili termalne obrade hidrolizata škroba

**Odnosi se samo na onaj škrob koji je otporan na probavu kod ljudi i probavu u prikladno dizajniranim analitičkim metodama

S obzirom na velik broj sastavnica prehrambenih vlakana i njihovu kemijsku raznovrsnost i kompleksnost, uvriježena je podjela prehrambenih vlakana prema njihovoj topivosti u vodi.

S obzirom na topivost u vodi, prehrambena vlakna se dijele u dvije velike skupine: vlakna topiva u vodi i u vodi netopiva prehrambena vlakna.

1.6.1. Topiva prehrambena vlakna

Topiva prehrambena vlakna karakterizira mogućnost vezivanja vode i stvaranja viskoznih gelova tijekom probave, što dovodi do usporavanja pražnjenja želuca i crijeva, štiteći ugljikohidrate od enzimatske razgradnje. Ova pojava dovodi do odgađanja apsorpcije glukoze, što dovodi do snižavanja koncentracije glukoze u krvi te uzrokuje smanjenje LDL-kolesterola i ukupnog plazmatskog kolesterola, što posljedično smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti.

Topiva prehrambena vlakna obuhvaćaju: pektine, beta-glukane, sluzi, inulin i ostale oligofruktane te dio hemiceluloza. Voće, zob, ječam i mahunarke su prirodni izvor bogat topivim prehrambenim vlaknima (Šebečić, Vedrina Dragojević, 2007.).

Pektini su polimerizirani ugljikohidrati izgrađeni od D-galakturonske kiseline vezane 1,4-vezama i bočnim lancima šećera: galaktoze, ramnoze i arabinoze. Najviše pektina sadrže jabuke i kruške te kora limuna i naranče.

Inulin je oligofruktanski ugljikohidrat građen od 30 furanoznih jedinica D-glukoze povezanih beta-1,2-glikozidnom vezom i glukoznim ostatkom na kraju linearnog lanca. Neprobavljiv je u tankom crijevu, ali je podložan razgradnji amilazama bakterija u debelom crijevu. Inulin i njegovi derivati imaju brojne pozitivne fiziološke učinke, između ostalih: regulaciju lipida u plazmi, snižavanje glukoze u krvi, smanjenje rizika od karcinoma debelog crijeva i poboljšanje odgovora imunološkog sustava. Dolazi kao rezervni ugljikohidrat u raži, luku i mnogim biljnim vrstama porodice *Asteraceae*, poput čičoke i cikorije.

Gume predstavljaju najtopljivija prehrambena vlakna. One su u vodi topivi, viskozni, gusti polisaharidi. Sadrže 10 000-30 000 ugljikohidratnih jedinica i to: glukozu, galaktozu, manozu, arabinozu, ramnozu i njihove uronske kiseline. U ovu skupinu spadaju: alginati, arapska guma, agar-agar, karagenan, modificirana celuloza, guar brašno, tragakant, ksantan i gelan.

Neprobavljivi (rezistentni) škrob se sastoji od škroba i njegovih razgradnih produkata koji su neprobavljivi u tankom crijevu. Škrob može biti otporan na probavu iz više razloga: škrob koji je fizički nedostupan amilazama jer je uklopljen unutar drugih komponenata (npr. intracelularni škrob), škrob koji je zbog prirode svojih granula otporan na djelovanje enzima,

retrogradni škrob koji nastaje ponovnom djelomičnom kristalizacijom gelatiniziranog škroba ili škrob koji je modificiran na način da bude manje podložan djelovanju amilaza, a koristi se kao aditiv u proizvodnji nekih namirnica (Šoljić i Šustru, 2000.).

Sluzi su polimeri ugljikohidrata čiji je glavni sastojak galakturonska kiselina. Prirodni izvor sluzi su sjemenke i korijenje u kojima ih biljke koriste kao sredstvo protiv isušivanja. Najbogatiji prirodni izvor sluzi su alge i morske trave, a prehrambena i farmaceutska industrija ih koriste kao stabilizatore i ugušćivače (Živković, 2000.).

1.6.2. Netopiva prehrambena vlakna

Netopiva prehrambena vlakna ubrzavaju prolaz hrane kroz gastrointestinalni sustav i povećavaju količinu fecesa, što potpomaže fiziološku peristaltiku i defekaciju. Navedeni učinak je osobito koristan kod osoba koje pate od konstipacije, hemeroida i upalnih bolesti crijeva.

Netopiva prehrambena vlakna se najvećim dijelom sastoje od celuloze, lignina, nekih vrsta pektina (protopektina) te nekih hemiceluloza (Šebečić, Vedrina Dragojević, 2007.).

Celuloza je najrasprostranjenije biljno tkivo u prirodi i najmanje je topljiva među netopivim prehrambenim vlaknima. Strukturno je ugljikohidrat, polisaharid opće formule $(C_6H_{10}O_5)_n$. Sastoji se od jedinica D-glukoze koje su međusobno povezane beta-1,4-glikozidnim vezama u dugolančanu strukturu. Jedna molekula celuloze može imati čak do 10 000 jedinica glukoze, a sama celuloza predstavlja glavnu strukturnu komponentu biljne stanice, izgrađujući stanični zid i osiguravajući njegovu čvrstoću. Kemijski je vrlo reaktivna, a za čovjeka predstavlja neprobavljivi ugljikohidrat. Najzastupljenija je u mekinjama pšeničnog brašna, u cjelovitim žitaricama te u kori voća i povrća (Živković, 2000.).

Hemiceluloza je polisaharid koji čini lanac šećera: ksiloza, arabinoza, manoza, glukoza i galaktoza, s bočnim lancima glukoze, arabinoze i glukuronske kiseline. Kao i celuloza, predstavlja neprobavljive ugljikohidrate, koji iz ljudskog organizma uglavnom izlaze nepromijenjeni, osim ako fermentirajuće bakterije u debelom crijevu ne razgade njihov manji dio.

Lignin (lat. lignum=drvo) je drvenasto biljno vlakno koje se ne može razgraditi enzimima probavnog sustava niti enzimima crijevne mikroflore. Po kemijskom je sastavu polimer aromatskih alkohola i formira se tijekom razvoja biljke. Lignin se nalazi u vanjskim tkivima zrna žitarica, u cijelom zrnu kao biljno vlakno i u brašnu koje se industrijski ekstrahira iz zrnja (Šebečić, Vedrina Dragojević, 2007.).

1.7. Učinak prehrambenih vlakana na patološka i patofiziološka stanja

Unos visokih količina prehrambenih vlakana ima dokazano blagotvoran fiziološki učinak i smanjuje rizik od nastanka: koronarne srčane bolesti, infarkta miokarda, hipertenzije, dijabetesa, patoloških gastrointestinalnih stanja poput: gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB), hemeroida, divertikuloze, peptičkog ulkusa, konstipacije i karcinoma kolona. Povećani unos prehrambenih vlakana smanjuje razinu serumskih lipida, smanjuje krvni tlak, poboljšava kontrolu glukoze u krvi, potiče peristaltiku i gubitak tjelesne težine te ima pozitivan utjecaj na imunološki sustav (Anderson i sur., 2009.).

1.7.1. Kardiovaskularni sustav

Kardiovaskularne bolesti, uključujući: koronarnu srčanu bolest, infarkt miokarda i hipertenziju, vodeći su uzrok smrtnosti u svijetu, s koronarnom srčanom bolesti kao vodećim uzrokom, a infarktom kao trećim vodećim uzrokom smrti na svijetu.

Visoke razine unosa prehrambenih vlakana značajno smanjuju prevalenciju i rizik od nastanka koronarne srčane bolesti, perifernih vaskularnih bolesti, infarkta miokada i važnih rizičnih faktora, poput: hipertenzije, dijabetesa, visoke tjelesne težine i dislipidemije.

Mehanizam djelovanja. Topiva i viskozna prehrambena vlakna smanjuju serumsku koncentraciju LDL-kolesterola vežući žučne kiseline u tankom crijevu i povećavajući njihovo izlučivanje putem fecesa. Fermentacija vlakana u debelom crijevu i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina, poput propionata, doprinosi hipokolesterolemiji smanjujući sintezu kolesterola (Anderson i sur., 2009.).

1.7.1.1. Krvni tlak

Konzumacija prehrambenih vlakana praćena je smanjenjem sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka. Meta-analiza učinaka prehrambenih vlakana na smanjenje krvnog tlaka u dvostruko randomiziranim kliničkim pokusima pokazala je da unos 11.5 g/dan prehrambenih vlakana dovodi do smanjenja sistoličkog krvnog tlaka od 1.1 mmHg i dijastoličkog krvnog tlaka od 1.3 mmHg. Smanjenje je bilo značajnije u hipertenzivnih i starijih pacijenata (Streppel i sur., 2005.).

Meta-analiza 25 randomiziranih kliničkih pokusa pokazala je značajno smanjenje sistoličkog (6.0 mmHg) i dijastoličkog (4.0 mmHg) krvnog tlaka u pacijenata koji su bili pod terapijom u periodu od 8 i više tjedana (Whelton i sur., 2005.).

1.7.1.2. Koronarna srčana bolest

Sedam kohortnih studija, koje su proučavale više od 158 000 pacijenata, utvrdile su značajno nižu prevalenciju koronarne srčane bolesti (30%) kod pacijenata s najvišim relativnim unosom prehrambenih vlakana (Anderson i sur., 2009.).

1.7.1.3. Infarkt miokarda

Epidemiološke studije su pokazale da je visok unos prehrambenih vlakana u korelaciji s 26 %-tnim smanjenjem rizika od nastanka ishemičnog infarkta miokarda.

Rezultati četiriju studija provedenih na preko 134 000 pacijenata pokazali su značajno manji relativni rizik od pojave infarkta miokarda u pacijenata s visokim unosom prehrambenih vlakana, u usporedbi s pacijentima s najmanjim unosom istih (Steffen i sur., 2003.).

1.7.1.4. Kolesterol

Ekstenzivne studije pokazale su izravnu korelaciju između visokog unosa topljivih i viskozničkih prehrambenih vlakana i hipokolesterolemičnog učinka. U svrhu dobivanja što preciznijih rezultata, provedeni su dvostruko randomizirani klinički pokusi, čiji su rezultati potvrdili već poznatu činjenicu. Unos guar-gume u količini 9-30 g/dan doveo je do 10.6 %-tnog smanjenja koncentracije plazmatskog LDL-kolesterola u muškaraca. Za pektine, unos od 12-24 g/dan doveo je do 13 %-tnog smanjenje istog rizičnog faktora. Unos beta-glukana u količini od samo 5 g/dan doveo je do 11.1 %-tnog smanjenja plazmatskog LDL-kolesterola, dok unos 5 g/dan hidrokispropil-metil-celuloze smanjuje koncentraciju navedenog lipoproteina za 8.5 % (Brown i sur., 1999.).

1.7.2. Dijabetes

Prospektivne kohortne studije su pokazale da je unos visokih količina prehrambenih vlakana povezan sa značajnim smanjenjem prevalencije dijabetesa. Rezultati pet epidemioloških studija, koje su provedene na više od 230 000 ispitanika, pokazali su 30 %-tno smanjenje rizika od nastanka dijabetesa u slučaju unosa visokih količina prehrambenih vlakana (Anderson, 2008.).

Finska udruga za prevenciju dijabetesa provela je dvostruko randomizirani klinički pokus kojim se utvrdilo 62 %-tno smanjenje prijelaza pre-dijabetesa u dijabetes, u periodu od četiri godine, kod ispitanika s najvišim relativnim unosom prehrambenih vlakana. Istraživanja su pokazala da unos prehrambenih vlakana smanjuje postprandijalnu hiperglikemiju i inzulinemiju te povećava inzulinsku osjetljivost (Lindstrom i sur., 2006.).

Tri randomizirane kliničke studije ispitivale su učinak unosa 6-20 g/dan prehrambenih vlakana na 71 ne-dijabetičnom ispitaniku. Poslije 10 tjedana terapije, uočeno je 8.7 %-tno smanjenje plazmatske koncentracije glukoze, 8.5 %-tno smanjenje plazmatske koncentracije inzulina i značajno poboljšanje inzulinske osjetljivosti (Pereira i sur., 2002.).

Četiri randomizirane kliničke studije ispitivale su učinak unosa 10-15 g/dan prehrambenih vlakana u obliku psilijuma i 30 g/dan prehrambenih vlakana u obliku guar-gume na 116 dijabetičnih ispitanika. Psilijum je uvriježeni naziv za nekoliko vrsta iz porodice *Plantago* (*Trputci*), čije se sjemenke koriste u terapijske svrhe kao bogat izvor polisaharidnih sluzi. Poslije 10 tjedana terapije, uočeno je 12.5 %-tno smanjenje plazmatske koncentracije glukoze, 4.2 %-tno smanjenje postprandijalne koncentracije glukoze i 5.3 %-tno smanjenje glikiranog hemoglobina HbA_{1c} (Rodriguez-Moran i sur., 1998.).

1.7.3. Gastrointestinalni sustav

Znanstvene studije su dokazale korelaciju između konzumiranja visokih količina prehrambenih vlakana i smanjenja prevalencije gastrointestinalnih patoloških stanja, poput: gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB), karcinoma jednjaka, peptičkog ulkusa, karcinoma želuca, divertikuloze, kolorektalnog karcinoma, konstipacije i hemeroida.

Mehanizam djelovanja. Topiva prehrambena vlakna odgađaju pražnjenje želuca i usporavaju prolaz hrane kroz tanko crijevo, dok netopiva vlakna potiču peristaltiku gastrointestinalnog sustava. U tankom crijevu, prehrambena vlakna potiču djelovanje raznih gastrointestinalnih hormona koji služe kao inkretini i stimuliraju oslobađanje inzulina. Neka vlakna vežu žučne kiseline i potiču stvaranje micelarnih struktura, time povećavajući izlučivanje žučnih kiselina i kolesterola putem fecesa. U debelom crijevu, fermentirajuća vlakna potiču razvoj fiziološki korisnih bakterijskih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, djelujući kao prebiotici. Netopljiva vlakna su osobito korisna u stimuliranju fiziološke peristaltike probavnog sustava (Cummings, 2001.).

1.7.3.1. Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB)

Epidemiološke studije, potpomognute kliničkim pokusima, pokazale su korelaciju između unosa većih količina topivih prehrambenih vlakana, osobito guar-gume, i niske sekrecije želučane kiseline. Navedena činjenica ima za posljedicu smanjenu prevalenciju GERB-a i ulkusa dvanaesnika, u odnosu na ispitanike koji su unosili male količine prehrambenih vlakana (El-Serag i sur., 2005.).

1.7.3.2. Sindrom iritabilnog kolona

Sindrom iritabilnog kolona jedan je od najčešćih gastrointestinalnih poremećaja na svijetu. To je kompleksan poremećaj s nizom patogenetskih faktora i uključuje simptome poput: abdominalne boli i neugode, nadutosti, proljeva i konstipacije.

Kliničke studije su pokazale da prehrambena vlakna poput metil-celuloze, djelomično hidrolizirane guar-gume i psilijuma dramatično i statistički značajno uklanjaju navedene simptome kod kontrolne grupe, u usporedbi s grupom ispitanika koja prima placebo (Giannini i sur., 2006.).

1.7.3.3. Upalne bolesti crijeva (Chronova bolest i ulcerozni kolitis)

Navedene kronične upalne bolesti crijeva postaju simptomatske tijekom adolescencije i karakterizira ih intermitentna pojava simptoma. Na temelju eksperimenata na životinjskim modelima i preliminarnim kliničkim ispitivanjima na ljudima, topiva prehrambena vlakna su pokazala pozitivan fiziološki učinak na navedena patološka stanja (Ewaschuk i sur., 2006.).

1.7.3.4. Divertikuloza

Divertikuloza je peti najčešći gastrointestinalni poremećaj u zapadnim zemljama i tradicionalno je povezana s prehranom deficitarnom vlaknima. Topiva vlakna inulinskog tipa, zbog svog potuupalnog učinka, imaju protektivni učinak na upalne procese u divertikulumima crijeva i smanjuju rekurentne upalne epizode u istima (Guarner, 2007.).

1.7.3.5. Hemeroidi i konstipacija

Visok unos prehrambenih vlakana standardan je dodatak terapiji i prevenciji hemeroida i konstipacije, što je produkt rezultata niza znanstvenih studija. Topiva vlakna, osobito inulin, djelomično hidrolizirana guar-guma i psilijum, dokazano imaju laksativni učinak i povećavaju količinu stolice, što dovodi do smanjenja simptoma navedenih bolesti (Schaefer i sur., 1998.).

1.7.4. Imunološki sustav

Gastrointestinalni sustav najveća je imunološka struktura u ljudskom organizmu. Limfoidno tkivo crijeva sadržava 60 % svih limfocita u organizmu. Optimalna funkcija crijevnog imunološkog sustava ovisi o sastavnicama prehrane, osobito prebioticima (supstancije koje stimuliraju rast fiziološki korisnih bakterija u crijevima). Većina prebiotika su neprobavljivi ugljikohidrati koji se fermentiraju u crijevima. Inulin i ostali oligofruktani su pokazali najveći stimulativni učinak na rast bakterijskih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji, fermentirajući navedene ugljikohidrate, stvaraju kratkolančane masne kiseline i stimuliraju imunološki sustav (Vos i sur., 2007.).

Pretpostavljeni fiziološki učinci bifidobakterija su: zaštita od intestinalnih infekcija, smanjenje broja potencijalno opasnih bakterija, sinteza vitamina i antioksidanasa, pomoć u probavljanju i apsorpciji hrane (osobito kalcija), povećanje količine stolice i prevencija konstipacije, stimuliranje imunološkog sustava i smanjenje rizika od kolorektalnog karcinoma (Roberfroid, 2007.).

Osim oligofruktana, topiva vlakna poput beta-glukana i arapske gume također su pokazala slične fiziološki korisne učinke (Vos i sur., 2007.).

1.7.5. Fiziološki učinci prehrambenih vlakana kod djece

Unos većih količina prehrambenih vlakana u djetinjstvu za posljedicu ima mnoge pozitivne fiziološke učinke, poput: poticanja normalne funkcije gastrointestinalnog sustava, prevencija visoke tjelesne težine kod djece, održavanje normalnih vrijednosti glukoze i lipida u krvi, kao i krvnog tlaka, smanjenje rizika od kasnijeg razvoja kroničnih bolesti, poput: kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa II i određenih karcinoma (Nicklas i sur., 2000.).

Studija provedena na 52 djece s kroničnom konstipacijom je pokazala da je njihov unos prehrambenih vlakana bio znatno niži u odnosu na djecu koja su unosila preporučene količine prehrambenih vlakana (Morais i sur., 1999.).

Longitudinalna studija provedena na djeci 2-5 godina starosti pokazala je da je visok unos prehrambenih vlakana u dobi 2-5 godina imao za posljedicu smanjenu prevalenciju povišenih razina kolesterola kod iste djece u dobi 7-10 godina, u odnosu na djecu koja su unosila male količine prehrambenih vlakana (Williams i Strobino, 2008.).

Istraživanja su pokazala da među djecom u dobi 13-18 godina, djeca s niskim unosom prehrambenih vlakana su imala 3-4 puta veće izgleda da imaju prekomjernu tjelesnu težinu, u odnosu na njihove vršnjake koji su konzumirali visoke količine prehrambenih vlakana (Nicklas i sur., 2000.).

1.8. Prehrambena vlakna u rogaču (*Ceratonia siliqua*, L.)

S obzirom na značaj prehrambenih vlakana, znanstvenici su kroz godine utvrđivali njihov udio u pojedinim prirodnim izvorima. Plod rogača prepoznat je kao bogat izvor topivih, netopivih i ukupnih prehrambenih vlakana, što dokazuju rezultati brojnih znanstvenih studija.

Saura-Calixto je koristeći preporučenu AOAC 991.43 enzimsko-gravimetrijsku metodu za utvrđivanje udjela prehrambenih vlakana utvrdio sljedeće rezultate za uzorke španjolskog rogača: preračunato na suhu tvar uzorka, udio netopivih prehrambenih vlakana iznosio je 32.6%, dok je udio topivih prehrambenih vlakana iznosio 6.8%. Udio ukupnih prehrambenih vlakana iznosio je 39.4% suhe tvari uzorka (Saura-Calixto, 1988.).

Iipumbu je koristeći preporučenu AOAC 991.43 enzimsko-gravimetrijsku metodu za utvrđivanje udjela prehrambenih vlakana utvrdio udio ukupnih prehrambenih vlakana u plodu južnoafričkog rogača te je navedeni iznosio 29.88-36.07% (Iipumbu, 2008.).

Shawakfeh i Ereifej su istom metodom pokazali da je plod rogača bogat prirodni izvor prehrambenih vlakana te da udio prehrambenih vlakana u plodu jordanskog rogača iznosi 4.2-39.8%, ovisno o vrsti prehrambenih vlakana (netopiva, topiva ili ukupna) koja se ispituju (Shawakfeh i Ereifej, 2005.).

Makris i Kefalas su 2004. godine utvrdili da udio ukupnih prehrambenih vlakana u plodu grčkog rogača može činiti čak do 40% suhe tvari uzorka (Makris i Kefalas, 2004.).

2. Obrazloženje teme

Rogač (*Ceratonia siliqua*, L.) je biljka velikog nutritivnog i farmakološkog značaja, osobito u mediteranskom podneblju gdje se koristi još od antičkih vremena. Antidijabetički, antidijaroični, antioksidacijski i fiziološki poželjni gastrointestinalni učinci samo su neke od karakteristika ploda rogača, koje proizlaze iz njegovog bogatog kemijskog sastava.

Plod rogača bogat je prehranbenim vlaknima koja imaju dokazano blagotvoran fiziološki učinak i smanjuju rizik od nastanka mnogih patoloških i patofizioloških stanja, uključujući: koronarnu srčanu bolest, infarkt miokarda, dijabetes, upalne bolesti crijeva, hemeroide i konstipaciju, što ukazuje na mogućnost korištenja ploda rogača u prevenciji i tretiranju istih.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada određivanje udjela netopivih, topivih i ukupnih prehranbenih vlakana u uzorcima ploda rogača prikupljenima na 15 lokaliteta, koji obuhvaćaju otoke i priobalje srednje i južne Dalmacije.

Do danas provedena istraživanja na dalmatinskom rogaču su vrlo oskudna i obuhvaćaju prvenstveno analizu njegovih morfoloških i fenoloških osobina. S obzirom na nepostojanje znanstveno relevantnih podataka o sastavu prehranbenih vlakana u plodu dalmatinskog rogača, ovaj će rad obogatiti znanstvenu literaturu u navedenom području.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Uzorkovanje za ovaj rad provedeno je na otocima i priobalju srednje i južne Dalmacije u Republici Hrvatskoj.

Udio netopivih, topivih i ukupnih prehrambenih vlakana određivao se u 15 uzoraka homogeniziranog brašna dalmatinskog rogača (*Ceratoniae siliquae farina*, *Fabaceae*), nastalog mljevenjem mahuna prikupljenih na navedenim lokacijama.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje ukupnih, topivih i netopivih prehrambenih vlakana koristeći MES/TRIS pufer. Metoda TDF 1.4 (AOAC 991.43)

Princip metode

Fino usitnjeni i osušeni uzorci se uzastopno tretiraju s termostabilnom amilazom, proteazom i amiloglukozidazom u svrhu razgradnje škroba i proteina.

Za mjerenje netopivih prehrambenih vlakana (eng. Insoluble dietary fiber, IDF), enzimima tretirani uzorci se filtriraju bez dodatka etanola, a ostatak na filteru predstavljaju netopiva prehrambena vlakna koja se zatim ispiru, suše i važu.

Filtrat i isprani dio netopivih vlakana se spajaju i predstavljaju topiva prehrambena vlakna (eng. Soluble dietary fiber, SDF), koja se zatim talože s etanolom. Slijedi filtriranje, ispiranje, sušenje i vaganje topivih prehrambenih vlakana.

Ukupna prehrambena vlakna (eng. Total dietary fiber, TDF) se određuju kao suma topivih i netopivih prehrambenih vlakana za svaki pojedini uzorak.

Aparatura i pribor:

1. Sinter lijevci poroziteta No 2. (Schott Duran, 120 mL)

Lijeवci su termostabilni i ostaju nepromijenjeni tijekom termalne obrade koju procedura zahtijeva. Žare se u mufolnoj peći preko noći na 525 °C te ostaju u peći dok temperatura ne padne na 130 °C da se spriječi temperaturni šok. Lijeвci se zatim natapaju sat vremena u otopini za čišćenje. Slijedi ispiranje s destiliranom vodom, deioniziranom vodom i 15 mL acetona, nakon čega se lijeвci suše na zraku.

Dodaje se otprilike 1.5 g Celita u lijeвke osušene na zraku te se lijeвci suše na 130 °C do konstantne mase. Lijeвci se zatim hlade u eksikatoru 1 sat i važu s točnošću od 0.1 mg

2. Termostat sposoban održavati temperaturu na 105 °C i 130°C

3. Vodena kupelj s mućkalicom sposobna održavati temperaturu na $98\pm 2^\circ\text{C}$ i konstantnu temperaturu na 60 °C

4. Eksikatori sa silikagelom

5. Mufolna peć podešena na $525\pm 25^\circ\text{C}$

6. Analitička vaga s točnošću vaganja od 0.1 mg

7. pH-metar kalibriran s puferima pH 4, 7 i 10

8. Plamenik

9. Azbestna mrežica

10. Odmjerne tikvice od 250, 500 i 1000 mL

11. Erlenmayerove tikvice od 250 i 500 mL

12. Laboratorijske čaše od 100, 200 i 500 mL

13. Menzure od 100 i 250 mL

14. Trbušaste pipete od 10 i 25 mL

15. Graduirane pipete od 10 i 25 mL

16. Mikropipete od 200 i 1000 μL

Reagensi:

1. Enzimski kit:

-termostabilna α -amilaza (*heat-stable α -amylase*, No. A-3306, Sigma Chemical Co.)

Skladišti se na 0-5°C.

-proteaza (*protease*, P-3910, Sigma Chemical Co.)

Priprema se 50 mg/mL otopina u MES/TRIS puferu svježe svaki dan.

-amiloglukozidaza (*amyloglucosidase*, No. A-9913, Sigma Chemical Co.)

Skladišti se na 0-5 °C.

2. Celit (C-545 AW, Sigma Chemical Co.)

3. Etanol 95 % V/V

4. Etanol 78 % V/V (pripremljen razrjeđivanjem 821 mL 95 %-tnog etanola destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 1000 mL)

5. Aceton

6. 0.561 M HCl (pripremljena razrjeđivanjem 23.25 mL koncentrirane HCl destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 500 mL)

7. 1 M HCl (pripremljena razrjeđivanjem 41.43 mL koncentrirane HCl destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 500 mL)

8. 1 M NaOH (pripremljen otapanjem 20 g NaOH u odmjernoj tikvici od 500 mL)

9. 6 M NaOH (pripremljen otapanjem 120 g NaOH u odmjernoj tikvici od 500 mL)

10. MES/TRIS pufer, 0.05 M, pH 8.2 na 24°C (Pripremljen otapanjem 9.76 g MES i 6.1 g TRIS u 0.85 L destilirane vode. pH se namjesti na 8.2 pomoću 6 M NaOH i nadopuni do 1 L destiliranom vodom. Temperatura znatno utječe na pH: na 20°C pH se namjesti na 8.3, dok se na 28 °C pH namjesti na 8.1, odnosno vrši se interpolacija između tih temperatura)

Postupak:

U šest Erlenmayerovih tikvica od 250 mL širokog grla se odvažuje u duplikatu po 1 ± 0.0001 g homogeniziranog uzorka.

3.2.1.1. Enzimski digestija

U tikvicu s uzorkom dodaje se 40 mL MES/TRIS pufera te pažljivo promiješa dok se uzorak potpuno ne dispergira. Dodaje se 50 μ L termostabilne α -amilaze lagano miješajući. Tikvica se pokrije aluminijskom folijom i inkubira 30 minuta u vodenoj kupelji s mućkalicom zagrijanom na 98 °C uz frekvenciju mućkanja od 100 okretaja u minuti.

Tikvice se izvade iz mućkalice i ohlade na 60°C te se uz pomoć špatulice spuste zaostale čestice uzorka sa stijenki tikvice u otopinu. Stijenke tikvice i špatulica isperu se pomoću 10 mL destilirane vode te se otopina promiješa.

Zatim se u otopinu uzorka dodaje 100 μ L otopine proteaze (svježe pripremljena 50 mg/mL otopina proteaze u MES/TRIS puferu) te se tikvica ponovno prekrije aluminijskom folijom i inkubira 40 minuta u vodenoj kupelji s mućkalicom na temperaturi od 60°C.

Potom se, ne prekidajući mućkanje, u tikvicu dodaje 5 mL 0.561 M HCl te se u tikvici podešava pH između 4.0 i 4.7 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl pri 60 °C.

Sljedeći korak je dodavanje 300 μ L amiloglukozidaze te se zatim tikvica pokriva aluminijskom folijom i inkubira 30 minuta u vodenoj kupelji s mućkalicom na 60 °C.

3.2.1.2. Određivanje netopivih prehrambenih vlakana (eng. IDF-insoluble dietary fibers)

Celit se u sinter lijevcima navlaži koristeći otprilike 6 mL destilirane vode (bez vakuuma) i pusti da se pravilno rasporedi po površini uključenjem vakuuma. Enzimski digest se kvantitativno prenese u lijevak, a tikvica se ispere s 2 puta po 10 mL destilirane vode zagrijane na 70 °C. Dobiveni filtrat se ukloni, a gumeni čep s lijevkom se stavi na novu vakuum sisaljku i talog se ispere bez odgađanja s 2 puta po 15 mL 78%-tnog etanola, 2 puta po 15 mL 95%-tnog etanola i 2 puta po 15 mL acetona.

Lijevci se suše u termostatu preko noći na 105 °C, hlade u eksikatoru i važu s točnošću ± 0.0001 g.

Razlika masa praznih lijevaka i lijevaka s vlaknima predstavlja masu sirovih netopivih vlakana. S obzirom da navedena masa vlakana obuhvaća i masu ostalih proteina koje proteaza nije razgradila te masu ostatnog pepela koji predstavlja zaostalu anorgansku materiju, ova vlakna se nazivaju sirovim vlaknima.

S obzirom da prilikom izrade ovog rada nije rađeno odmašćivanje uzoraka (jer udio masti u uzorcima nije iznosio više od 10 %) i nisu korištene mase ostalih proteina (jer je njihova masa bila ispod razine kvantifikacije), formula za izračunavanje mase sirovih netopivih vlakana jest:

$$mIDF=m2-m1$$

mIDF=masa sirovih netopivih vlakana

m1=masa lijevaka s Celitom

m2=masa lijevaka s vlaknima

Udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u uzorku se izražava kao g/100g originalnog uzorka te se izračunava prema formuli:

$$g/100g IDF=(mIDF*100)/mU$$

mIDF=masa sirovih netopivih vlakana

mU=masa originalnog uzorka

3.2.1.3. Određivanje topivih prehrambenih vlakana (eng. SDF-soluble dietary fibers)

Vodeni filtrat se prebaci u menzuru od 100 mL da se odredi njegov točan volumen te se potom prenese u Erlenmayerovu tikvicu od 500 mL. Zatim se filtratu dodaju 4 volumena 95%-tnog etanola prethodno zagrijanog na 60°C te se tikvica promiješa.

Vlakna se ostave taložiti točno sat vremena na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi filtriranje. Prije filtriranja, Celit u lijevcima se navlaži s 15 mL 78%-tnog etanola te se potom uključi vakuum da se Celit ravnomjerno rasporedi. Nakon filtriranja kvantitativno prenesene etanolno-enzimske otopine, tikvica i talog se ispiru s 2 puta po 15 mL 78%-tnog etanola, 2 puta po 15 mL 95%-tnog etanola i 2 puta po 15 mL acetona. Lijeenci se suše u termostatu preko noći na 105 °C, hlade u eksikatoru i važu s točnošću ± 0.0001 g.

Masa sirovih topivih prehrambenih vlakana, kao i udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku dobivaju se analognim postupkom kao i za sirova netopiva prehrambena vlakna.

$$\mathbf{mSDF=m2-m1}$$

mSDF=masa sirovih topivih vlakana

m1=masa lijevaka s Celitom

m2=masa lijevaka s vlaknima

$$\mathbf{g/100g\ SDF=(mSDF*100)/mU}$$

mSDF=masa sirovih topivih vlakana

mU=masa originalnog uzorka

3.2.1.4. Određivanje pepelnog ostatka

Pepelni ostatak je anorganski ostatak zaostao uklanjanjem vode i organske tvari iz uzorka u prisutnosti oksidirajućih agenasa.

Nakon sušenja i vaganja, lijevci se žare u mufolnoj peći 5 sati na 525 °C i ostaju u peći dok temperatura ne padne na 130 °C da se spriječi temperaturni šok. Lijeवci se zatim hlade u eksikatoru 1 sat i važu s točnošću od 0.1 mg.

Masa pepelnog ostatka je vrijednost pomoću koje dobivamo udio čistih prehrambenih vlakana u uzorku, i netopivih i topivih, prema formuli:

$$\mathbf{g/100g\ IDF=[(mIDF-mP)*100]/mU}$$

g/100g IDF=udio čistih netopivih prehrambenih vlakana

mIDF=masa sirovih netopivih vlakana

mP=masa pepelnog ostatka

mU=masa originalnog uzorka

$$\mathbf{g/100g\ SDF=[(mSDF-mP)*100]/mU}$$

g/100g SDF=udio čistih topivih prehrambenih vlakana

mSDF=masa sirovih topivih vlakana

mP=masa pepelnog ostatka

mU=masa originalnog uzorka

3.2.1.5. Određivanje ukupnih prehrambenih vlakana (eng. TDF-total dietary fibers)

Udio ukupnih prehrambenih vlakana se dobiva zbrajanjem udjela netopivih i topivih prehrambenih vlakana.

$$\mathbf{g/100g\ TDF=g/100g\ IDF + g/100g\ SDF}$$

g/100g TDF=udio ukupnih sirovih/čistih prehrambenih vlakana u uzorku

g/100g IDF=udio netopivih sirovih/čistih prehrambenih vlakana u uzorku

g/100g SDF=udio topivih sirovih/čistih prehrambenih vlakana u uzorku

3.2.2. Određivanje udjela vode u uzorcima

Postupak:

Posuda za sušenje s odgovarajućim poklopcem suši se najmanje 1 sat na temperaturi od 105 °C, ohladi se u eksikatoru i izvaži s točnošću ± 0.0001 g.

U posudu se stavi oko 3 g uzorka, pokrije poklopcem i izvaži s točnošću ± 0.001 g.

Posuda za sušenje s uzorkom stavi se u sušionik s koso postavljenim poklopcem i suši se 3 sata. Prilikom vađenja iz sušionika, posuda sa sušenjem s uzorkom se zatvori i brzo prenese u eksikator gdje se hladi pola sata. Nakon hlađenja, posuda za sušenje se izvaži zajedno s uzorkom i poklopcem i ponovo se stavi u sušionik. Proces se ponavlja sve dok se ne postigne konstantna masa.

Iz razlike mase originalnog uzorka i mase suhog uzorka izračuna se masa vode, a dijeljenjem s masom uzorka dobije se postotak vode u uzorku.

$$\text{g/100g vode} = [(m1 - m2) * 100] / mU$$

g/100g vode = udio vode u originalnom uzorku

mU = masa originalnog uzorka

m1 = masa posude za sušenje s originalnim uzorkom

m2 = masa posude za sušenje s uzorkom osušenim do konstantne mase

Udio vlage u uzorcima korišten je za izračunavanje udjela prehrambenih vlakana u suhoj tvari uzorka prema formuli:

$$\text{g/100g DF}_{\text{suha tvar}} = (\text{g/100g DF} * 100) / [100 - \text{g/100g vode}]$$

g/100g DF_{suha tvar} = udio prehrambenih vlakana u suhoj tvari uzorka

g/100g DF = udio prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

g/100g vode = udio vode u originalnom uzorku

3.2.3. Statistička obrada podataka

Prilikom izrade ovog rada korišteni su statistički parametri: aritmetička sredina (\bar{X}), standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD), koji su izračunati prema formulama:

Aritmetička sredina:

$$\bar{X} = (\mathbf{x}_1 + \mathbf{x}_2 + \dots + \mathbf{x}_n) / \mathbf{n}$$

Standardna devijacija:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Relativna standardna devijacija:

$$RSD = (SD / \bar{X}) * 100$$

4. Rezultati i rasprava

Analiza uzoraka homogeniziranog brašna dalmatinskog rogača (*Ceratoniae siliquae farina, Fabaceae*), prikupljenih na 15 lokaliteta, koji obuhvaćaju otoke i priobalje srednje i južne Dalmacije, provedena je enzimsko-gravimetrijskom TDF 1.4 (AOAC 991.43) metodom te je utvrđen udio netopivih, topivih i ukupnih prehrambenih vlakana u istima. U svrhu dobivanja statistički vjerodostojnih podataka, sve analize su rađene u duplikatu, a rezultati su obrađeni prikladnim statističkim metodama.

Podatci dobiveni analiziranjem uzoraka prikazani su u tablicama 4-10 i slikama 4-9.

Rezultati određivanja vode u originalnim uzorcima prikazani su u tablici 4.

Udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 5.

Udio čistih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 6.

Udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 7.

Udio čistih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 8.

Udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 9.

Udio ukupnih čistih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prikazan je u tablici 10.

Odnos udjela sirovih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu sirovih netopivih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 4 na stranici 38.

Odnos udjela čistih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu čistih netopivih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 5 na stranici 39.

Odnos udjela sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu sirovih topivih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 6 na stranici 44.

Odnos udjela čistih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu čistih topivih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 7 na stranici 45.

Odnos udjela ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 8 na stranici 50.

Odnos udjela ukupnih čistih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku prema udjelu ukupnih čistih prehrambenih vlakana u suhoj tvari prikazan je slikom 9 na stranici 51.

4.1. Analiza vode u uzorcima

Udio vode u analiziranim brašnima (Tablica 4) kreće se od 7.028 g/100 g do 12.065 g/100 g originalnog uzorka, sa srednjom vrijednošću od 8.001 g/100 g.

Tablica 4. Udio vode u originalnom uzorku

	UZORAK	voda (g/100 g)	X (g/100 g)	SD (g/100 g)	RSD (%)
1	1a	7.949	7.977	0.028	0.357
	1b	8.006			
2	2a	8.196	8.191	0.005	0.058
	2b	8.186			
3	3a	7.607	7.674	0.067	0.877
	3b	7.741			
4	4a	7.085	7.124	0.039	0.548
	4b	7.163			
5	5a	7.772	7.800	0.028	0.364
	5b	7.828			
6	6a	8.068	8.002	0.066	0.824
	6b	7.936			
7	7a	7.535	7.570	0.035	0.468
	7b	7.606			
8	8a	7.980	8.007	0.027	0.335
	8b	8.033			
9	9a	7.505	7.484	0.021	0.275
	9b	7.464			
10	10a	6.933	7.028	0.095	1.351
	10b	7.123			
11	11a	10.849	10.836	0.013	0.123
	11b	10.823			
12	12a	8.110	8.100	0.010	0.127
	12b	8.089			
13	13a	7.702	7.737	0.035	0.449
	13b	7.772			
14	14a	8.533	8.486	0.046	0.548
	14b	8.440			
15	15a	12.088	12.065	0.023	0.190
	15b	12.042			

Najmanji udio vode sadrži uzorak s lokaliteta 10 (7.028 g/100 g), a najveći uzorak s lokaliteta 15 (12.065 g/100 g).

Relativna standardna devijacija (RSD) kreće se u rasponu od 0.058 % do 1.351 %, što ukazuje na dobru ponovljivost rezultata.

4.2. Analiza netopivih prehrambenih vlakana

Udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima (Tablica 5) kreće se od 24.955 g/100 g do 28.622 g/100 g originalnog uzorka, sa srednjom vrijednošću od 27.288 g/100 g.

Tablica 5. Udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka (g)</i>	<i>m IDF (g)</i>	<i>IDF (g/100 g)</i>	<i>X (g/100 g)</i>	<i>SD (g/100 g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1.	1a	0.9992	0.2474	24.760	24.955	0.275	1.104
	1b	1.0048	0.2527	25.149			
2.	2a	1.0011	0.2835	28.319	28.512	0.272	0.956
	2b	1.0009	0.2873	28.704			
3.	3a	1.0014	0.2788	27.841	27.684	0.223	0.804
	3b	1.0005	0.2754	27.526			
4.	4a	0.9939	0.2601	26.170	26.246	0.109	0.414
	4b	0.9976	0.2626	26.323			
5.	5a	0.9936	0.2718	27.355	27.225	0.184	0.675
	5b	0.9987	0.2706	27.095			
6.	6a	0.9960	0.2804	28.153	28.191	0.054	0.192
	6b	0.9979	0.2817	28.229			
7.	7a	1.0026	0.2737	27.299	27.488	0.267	0.971
	7b	1.0023	0.2774	27.676			
8.	8a	1.0025	0.2851	28.439	28.347	0.130	0.459
	8b	1.0023	0.2832	28.255			
9.	9a	1.0009	0.2751	27.485	27.310	0.247	0.905
	9b	1.0020	0.2719	27.136			
10.	10a	1.0013	0.2563	25.597	25.345	0.357	1.407
	10b	1.0007	0.2511	25.092			
11.	11a	0.9998	0.2799	27.996	27.945	0.071	0.254
	11b	1.0016	0.2794	27.895			
12.	12a	1.0010	0.2736	27.333	27.083	0.353	1.304
	12b	1.0010	0.2686	26.833			
13.	13a	0.9997	0.2801	28.018	27.681	0.477	1.724
	13b	1.0017	0.2739	27.344			
14.	14a	1.0022	0.2707	27.011	26.684	0.462	1.730
	14b	1.0016	0.2640	26.358			
15.	15a	1.0004	0.2853	28.519	28.622	0.146	0.512
	15b	1.0005	0.2874	28.726			

Najmanji udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku sadrži uzorak s lokaliteta 1 (24.955 g/100 g), a najveći udio sadrže uzorci s lokaliteta 15 (28.622 g/100 g) i lokaliteta 2 (28.512 g/100 g).

Brašno najbogatije čistim netopivim prehrambenim vlaknima je brašno s lokaliteta 7, koje sadrži 22.951 g čistih netopivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka (tablica 6).

Tablica 6. Udio čistih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka (g)</i>	<i>m IDF (g)</i>	<i>m pepela (g)</i>	<i>IDF (g/100 g)</i>	<i>X (g/100 g)</i>	<i>SD (g/100 g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1.	1a	0.9992	0.2474	0.0588	18.875	19.221	0.489	2.542
	1b	1.0048	0.2527	0.0561	19.566			
2.	2a	1.0011	0.2835	0.0585	22.475	22.557	0.116	0.515
	2b	1.0009	0.2873	0.0607	22.640			
3.	3a	1.0014	0.2788	0.0538	22.469	22.489	0.028	0.126
	3b	1.0005	0.2754	0.0502	22.509			
4.	4a	0.9939	0.2601	0.0581	20.324	20.382	0.081	0.399
	4b	0.9976	0.2626	0.0587	20.439			
5.	5a	0.9936	0.2718	0.0577	21.548	21.493	0.078	0.362
	5b	0.9987	0.2706	0.0565	21.438			
6.	6a	0.9960	0.2804	0.0529	22.841	22.619	0.314	1.389
	6b	0.9979	0.2817	0.0582	22.397			
7.	7a	1.0026	0.2737	0.0432	22.995	22.951	0.062	0.271
	7b	1.0023	0.2774	0.0478	22.907			
8.	8a	1.0025	0.2851	0.0563	22.823	22.825	0.003	0.014
	8b	1.0023	0.2832	0.0544	22.827			
9.	9a	1.0009	0.2751	0.0504	22.450	22.083	0.518	2.348
	9b	1.0020	0.2719	0.0543	21.717			
10.	10a	1.0013	0.2563	0.0511	20.493	20.275	0.309	1.525
	10b	1.0007	0.2511	0.0504	20.056			
11.	11a	0.9998	0.2799	0.0553	22.464	22.634	0.240	1.059
	11b	1.0016	0.2794	0.0510	22.804			
12.	12a	1.0010	0.2736	0.0588	21.459	21.159	0.424	2.003
	12b	1.0010	0.2686	0.0598	20.859			
13.	13a	0.9997	0.2801	0.0532	22.697	22.415	0.399	1.781
	13b	1.0017	0.2739	0.0522	22.132			
14.	14a	1.0022	0.2707	0.0491	22.111	21.734	0.534	2.458
	14b	1.0016	0.2640	0.0501	21.356			
15.	15a	1.0004	0.2853	0.0598	22.541	22.700	0.225	0.989
	15b	1.0005	0.2874	0.0587	22.859			

Brašno najsiromašnije čistim netopivim prehrambenim vlaknima je brašno s lokaliteta 1, koje sadrži 19.221 g čistih netopivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka.

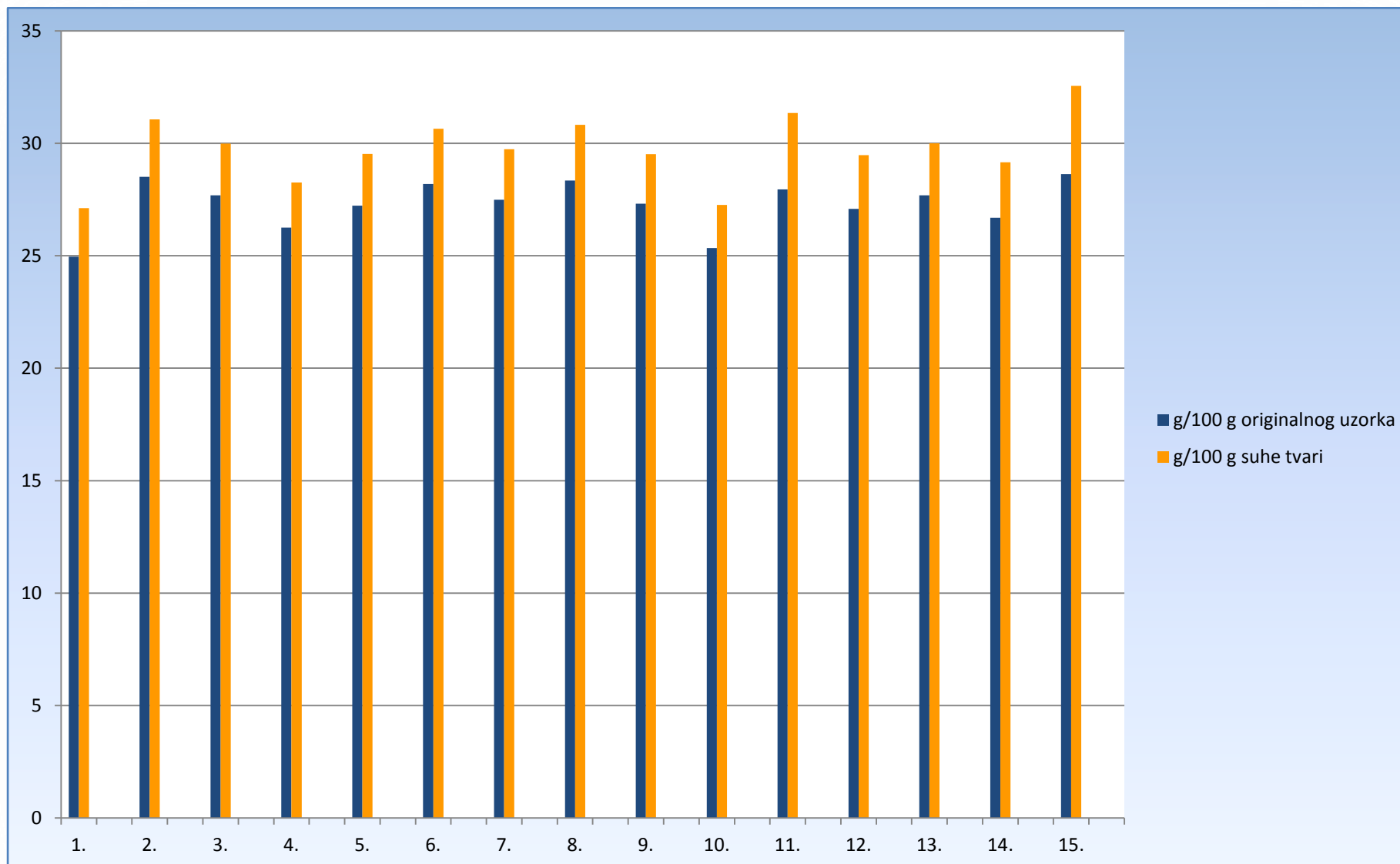
Relativna standardna devijacija kreće se u rasponu od 0.014 % (lokalitet 8) do 2.542 % (lokalitet 1).

Rezultati prikazani tablicama 5 i 6 ukazuju na činjenicu da uzorak koji je najbogatiji sirovim prehrambenim vlaknima može, ali i ne mora, istovremeno biti najbogatiji i čistim prehrambenim vlaknima. Tako je brašno najbogatije sirovim netopivim prehrambenim vlaknima brašno s lokaliteta 15, dok je brašno najbogatije čistim netopivim prehrambenim vlaknima brašno s lokaliteta 7. Brašno s lokaliteta 1 istovremeno je najsiromašnije i sirovim i čistim netopivim prehrambenim vlaknima.

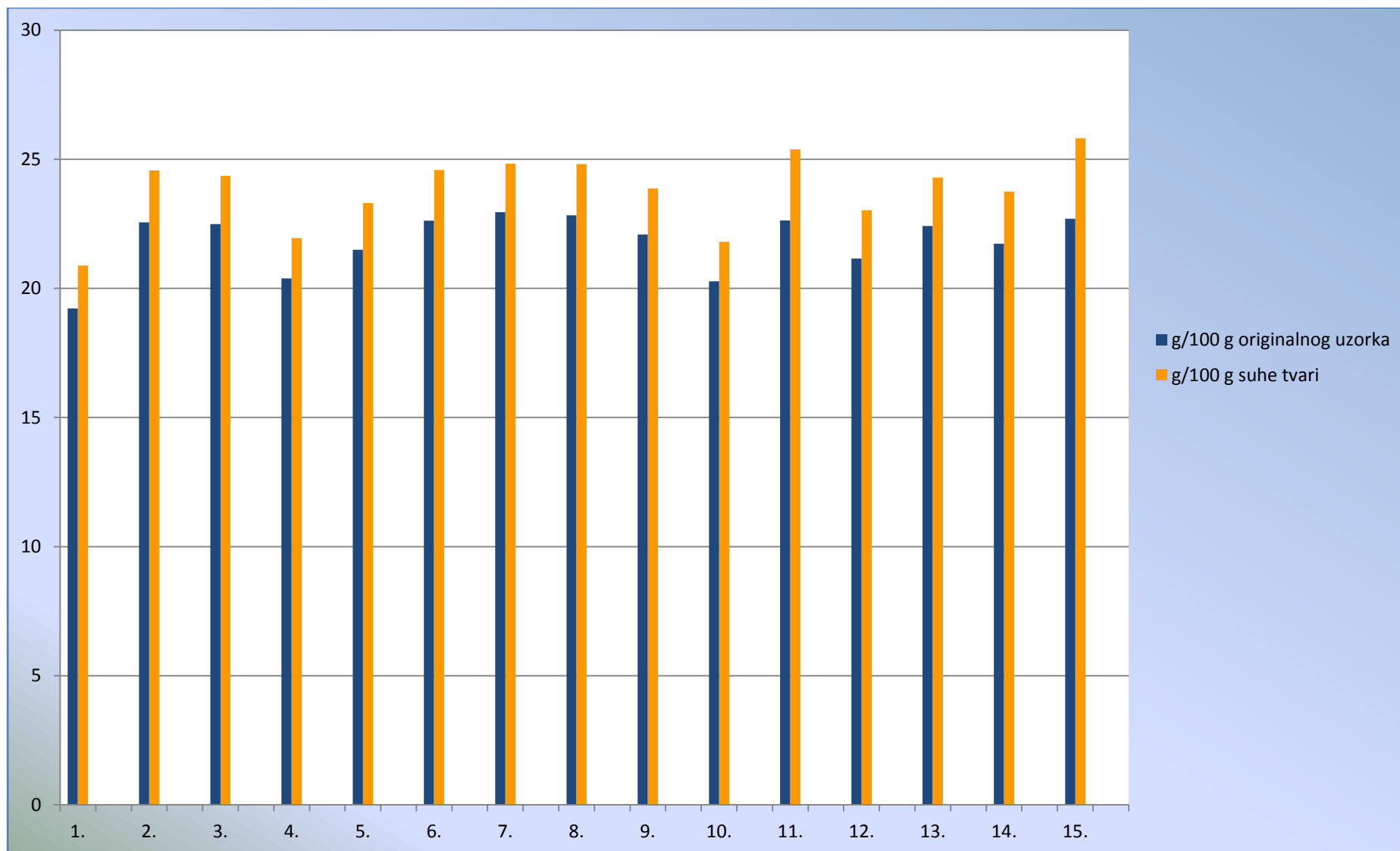
Preračunato na suhu tvar uzorka, udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 27.118 g/100 g do 32.549 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 29.763 g/100 g (slika 4). Najmanji udio sirovih netopivih prehrambenih vlakana sadrži brašno s lokaliteta 1 (27.118 g/100 g suhe tvari uzorka), a najveći udio brašno s lokaliteta 15 (32.549 g/100 g suhe tvari uzorka). Relativna standardna devijacija kretala se u rasponu od 0.192 % (lokalitet 6) do 1.730 % (lokalitet 14).

Preračunato na suhu tvar uzorka, udio čistih netopivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 20.887 g/100 g do 25.814 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 23.816 g/100 g (slika 5). Najviši udio čistih netopivih prehrambenih vlakana određen je u uzorku brašna s lokaliteta 15 i iznosi 25.814 g na 100 g suhe tvari uzorka, dok je najniži udio određen u uzorku brašna s lokaliteta 1 i iznosi 20.877 g/100 g suhe tvari uzorka.

Navedeni rezultati pokazuju da postoji određena korelacija između rezultata dobivenih za prehrambena vlakna u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Brašno s lokaliteta 15 najbogatije je sirovim netopivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Analogno, brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije je sirovim netopivim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Kod analize čistih netopivih vlakana, također je brašno s lokaliteta 15 najbogatije netopivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka, dok je brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije u oba slučaja.



Slika 4. Odnos udjela sirovih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka



Slika 5. Odnos udjela čistih netopivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka

4.3. Analiza topivih prehrambenih vlakana

Udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima (Tablica 7) kreće se od 3.499 g/100 g do 5.269 g/100 g originalnog uzorka, sa srednjom vrijednošću od 4.235 g/100 g.

Tablica 7. Udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka (g)</i>	<i>m SDF (g)</i>	<i>SDF (g/100 g)</i>	<i>X (g/100 g)</i>	<i>SD (g/100 g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1.	1a	0.9992	0.0523	5.234	5.269	0.050	0.944
	1b	1.0048	0.0533	5.305			
2.	2a	1.0011	0.0416	4.155	4.011	0.204	5.093
	2b	1.0009	0.0387	3.867			
3.	3a	1.0014	0.0384	3.835	3.971	0.193	4.866
	3b	1.0005	0.0411	4.108			
4.	4a	0.9939	0.0432	4.347	4.213	0.189	4.476
	4b	0.9976	0.0407	4.080			
5.	5a	0.9936	0.0452	4.549	4.387	0.229	5.216
	5b	0.9987	0.0422	4.225			
6.	6a	0.9960	0.0401	4.026	3.942	0.119	3.014
	6b	0.9979	0.0385	3.858			
7.	7a	1.0026	0.0400	3.990	4.170	0.255	6.111
	7b	1.0023	0.0436	4.350			
8.	8a	1.0025	0.0343	3.421	3.499	0.110	3.139
	8b	1.0037	0.0359	3.577			
9.	9a	1.0009	0.0446	4.456	4.259	0.279	6.543
	9b	1.0020	0.0407	4.062			
10.	10a	1.0013	0.0460	4.594	4.755	0.228	4.796
	10b	1.0007	0.0492	4.917			
11.	11a	0.9998	0.0403	4.031	4.172	0.200	4.785
	11b	1.0016	0.0432	4.313			
12.	12a	1.0010	0.0444	4.436	4.256	0.254	5.976
	12b	1.0010	0.0408	4.076			
13.	13a	0.9997	0.0429	4.291	4.467	0.248	5.554
	13b	1.0017	0.0465	4.642			
14.	14a	1.0022	0.0442	4.410	4.506	0.136	3.018
	14b	1.0016	0.0461	4.603			
15.	15a	1.0004	0.0376	3.758	3.643	0.163	4.469
	15b	1.0005	0.0353	3.528			

Najmanji udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku sadrži uzorak s lokaliteta 8 (3.499 g/100 g), a najveći udio sadrže uzorci s lokaliteta 1 (5.269 g/100 g) i lokaliteta 10 (4.755 g/100 g).

Brašno najbogatije čistim topivim prehranbenim vlaknima je brašno s lokaliteta 14, koje sadrži 1.557 g čistih topivih prehranbenih vlakana na 100 g originalnog uzorka (tablica 8).

Tablica 8. Udio čistih topivih prehranbenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka</i> (g)	<i>m SDF</i> (g)	<i>m pepela</i> (g)	<i>SDF</i> (g/100 g)	<i>X</i> (g/100 g)	<i>SD</i> (g/100 g)	<i>RSD</i> (%)
1.	1a	0.9992	0.0523	0.0421	1.021	1.167	0.207	17.742
	1b	1.0048	0.0533	0.0401	1.314			
2.	2a	1.0011	0.0416	0.0315	1.009	1.019	0.014	1.401
	2b	1.0009	0.0387	0.0284	1.029			
3.	3a	1.0014	0.0384	0.0278	1.059	1.034	0.035	3.352
	3b	1.0005	0.0411	0.0310	1.009			
4.	4a	0.9939	0.0432	0.0321	1.117	1.090	0.038	3.521
	4b	0.9976	0.0407	0.0301	1.063			
5.	5a	0.9936	0.0452	0.0311	1.419	1.330	0.125	9.433
	5b	0.9987	0.0422	0.0298	1.242			
6.	6a	0.9960	0.0401	0.0296	1.054	1.113	0.084	7.510
	6b	0.9979	0.0385	0.0268	1.172			
7.	7a	1.0026	0.0400	0.0288	1.117	1.217	0.141	11.613
	7b	1.0023	0.0436	0.0304	1.317			
8.	8a	1.0025	0.0343	0.0221	1.217	1.216	0.001	0.085
	8b	1.0037	0.0359	0.0237	1.216			
9.	9a	1.0009	0.0446	0.0329	1.169	1.113	0.079	7.053
	9b	1.0020	0.0407	0.0301	1.058			
10.	10a	1.0013	0.0460	0.0331	1.288	1.204	0.120	9.934
	10b	1.0007	0.0492	0.0380	1.119			
11.	11a	0.9998	0.0403	0.0304	0.990	1.014	0.034	3.356
	11b	1.0016	0.0432	0.0328	1.038			
12.	12a	1.0010	0.0444	0.0312	1.319	1.189	0.184	15.449
	12b	1.0010	0.0408	0.0302	1.059			
13.	13a	0.9997	0.0429	0.0311	1.180	1.289	0.154	11.919
	13b	1.0017	0.0465	0.0325	1.398			
14.	14a	1.0022	0.0442	0.0300	1.417	1.557	0.198	12.734
	14b	1.0016	0.0461	0.0291	1.697			
15.	15a	1.0004	0.0376	0.0256	1.200	1.169	0.042	3.633
	15b	1.0005	0.0353	0.0239	1.139			

Brašno najsiromašnije čistim topivim prehranbenim vlaknima je brašno s lokaliteta 11, koje sadrži 1.014 g čistih topivih prehranbenih vlakana na 100 g originalnog uzorka.

Srednja vrijednost udjela čistih topivih prehranbenih vlakana u analiziranim brašnima iznosi 1.182 g/100 g originalnog uzorka.

Usporedba rezultata prikazanih tablicama 5 i 6 s rezultatima prikazanim tablicama 7 i 8 ukazuje na sličnosti između rezultata dobivenih za netopiva i topiva prehrambena vlakna. Kod topivih prehrambenih vlakana, kao i kod netopivih, uzorak koji je najbogatiji sirovim prehrambenim vlaknima može, ali i ne mora, istovremeno biti najbogatiji i čistim prehrambenim vlaknima. Tako je brašno najbogatije sirovim topivim prehrambenim vlaknima brašno s lokaliteta 1, dok je brašno najbogatije čistim topivim prehrambenim vlaknima brašno s lokaliteta 14. Brašno s lokaliteta 8 najsiromašnije je sirovim topivim prehrambenim vlaknima, dok je brašno s lokaliteta 11 najsiromašnije čistim topivim prehrambenim vlaknima.

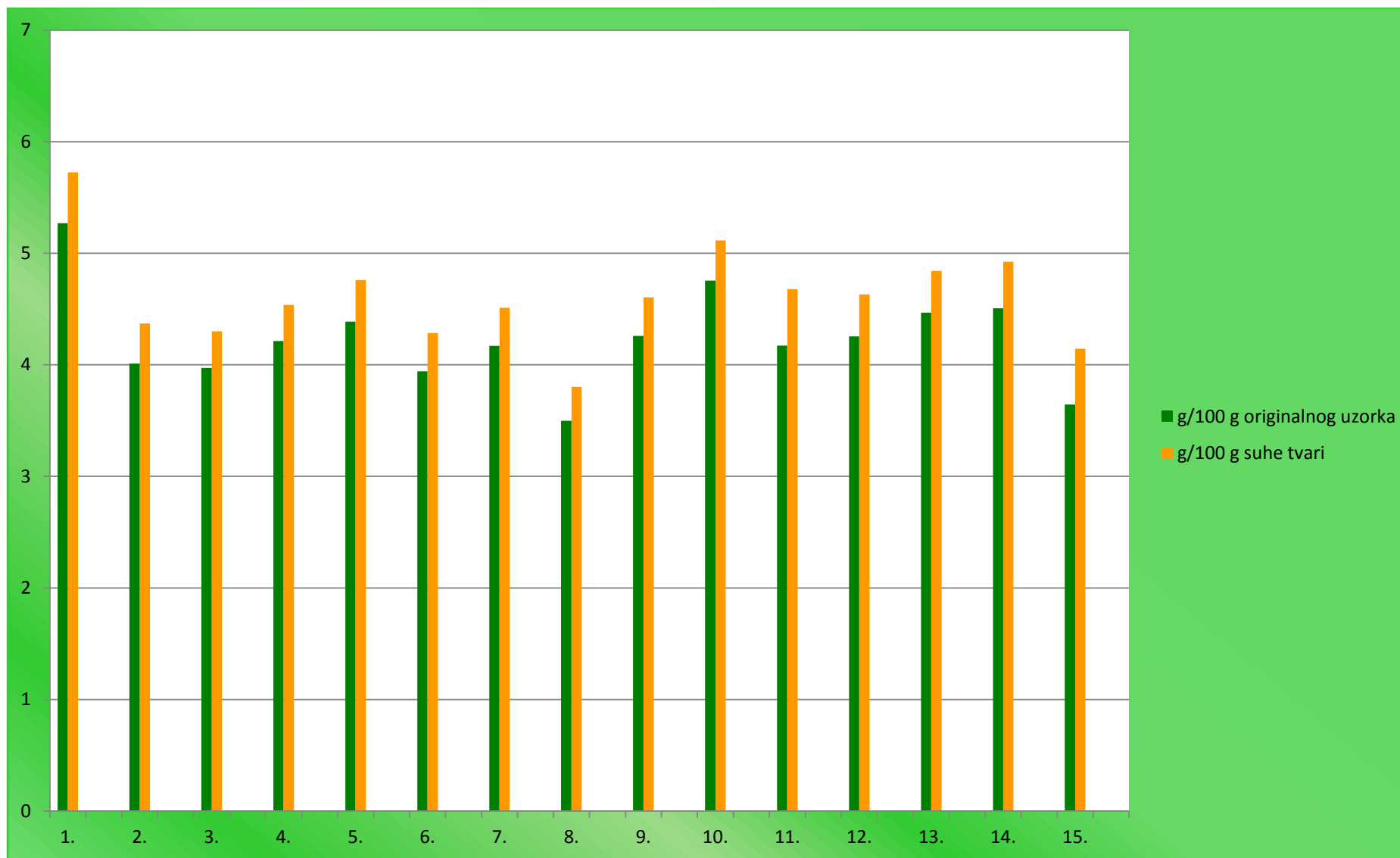
Ovi rezultati ukazuju i na činjenicu da isti uzorak ne mora biti jednako bogat i netopivim i topivim prehrambenim vlaknima. Brašno najsiromašnije sirovim netopivim vlaknima je brašno s lokaliteta 1, a upravo je to isto brašno (lokalitet 1) najbogatije sirovim topivim prehrambenim vlaknima. No, to ne mora uvijek biti slučaj. Brašno najbogatije čistim netopivim vlaknima je brašno s lokaliteta 7, a brašno najsiromašnije čistim topivim vlaknima je brašno s lokaliteta 8.

Preračunato na suhu tvar uzorka, udio sirovih topivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 3.804 g/100 g do 5.726 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 4.615 g/100 g (slika 6). Najmanji udio sirovih topivih prehrambenih vlakana sadrži brašno s lokaliteta 8 (3.804 g/100 g suhe tvari uzorka), a najveći udio brašno s lokaliteta 1 (5.726 g/100 g suhe tvari uzorka). Relativna standardna devijacija kretala se u rasponu od 0.944 % (lokalitet 1) do 6.543 % (lokalitet 9).

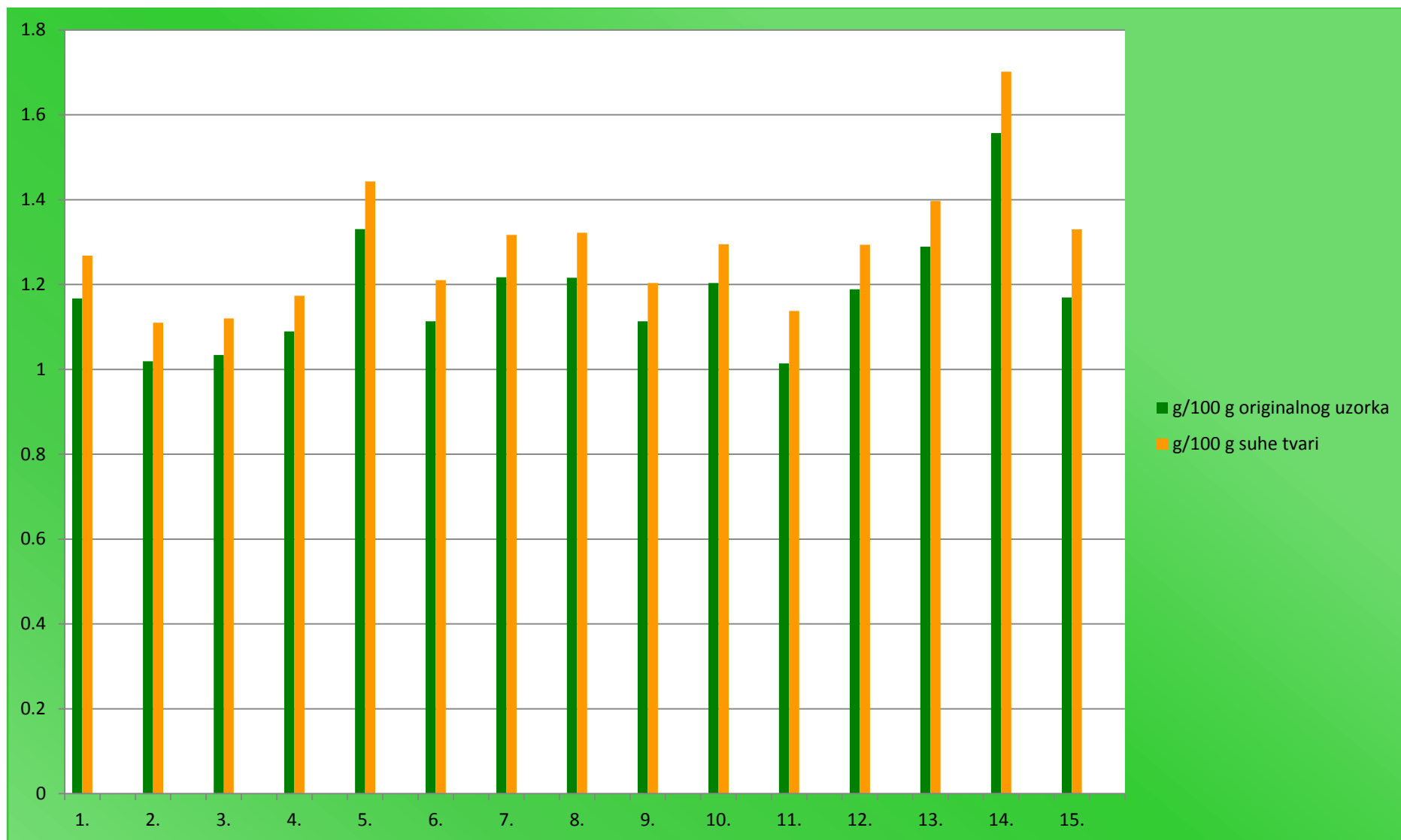
Preračunato na suhu tvar uzorka, udio čistih topivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 1.110 g/100 g do 1.701 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 1.288 g/100 g (slika 7). Najviši udio čistih topivih prehrambenih vlakana određen je u uzorku brašna s lokaliteta 14 i iznosi 1.701 g na 100 g suhe tvari uzorka, dok je najniži udio određen u uzorku brašna s lokaliteta 2 i iznosi 1.110 g/100 g suhe tvari uzorka.

Navedeni podatci pokazuju da postoji određena analogija između rezultata dobivenih za netopiva i topiva prehrambena vlakna u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Tako je brašno s lokaliteta 1 najbogatije sirovim topivim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Analogno, brašno s lokaliteta 8 najsiromašnije je sirovim topivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Kod analize čistih topivih vlakana, prisutna je djelomična analogija s rezultatima za topiva sirova vlakna. Brašno s lokaliteta 14 najbogatije je čistim topivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka, što nije slučaj kod brašna najsiromašnijih istim vlaknima. Brašno s lokaliteta 11 najsiromašnije je čistim topivim prehrambenim vlaknima u originalnom uzorku, dok je brašno s lokaliteta 2 najsiromašnije čistim topivim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka.

Uspoređujući rezultate za topiva i netopiva vlakna preračunato na suhu tvar uzorka, potvrđuje se već navedena činjenica da isti uzorak ne mora istovremeno biti jednako bogat i netopivim i topivim prehrambenim vlaknima. Tako je u slučaju netopivih vlakana, brašno s lokaliteta 15 najbogatije čistim netopivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka, dok je kod topivih vlakana to slučaj s brašnom s lokaliteta 14. Brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije je čistim netopivim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka, dok je kod topivih vlakana brašno s lokaliteta 11 najsiromašnije čistim topivim prehrambenim vlaknima u originalnom uzorku, a brašno s lokaliteta 2 najsiromašnije je čistim netopivim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka.



Slika 6. Odnos udjela sirovih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka



Slika 7. Odnos udjela čistih topivih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka

4.4. Analiza ukupnih prehrambenih vlakana

Udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima (Tablica 9) kreće se od 30.100 g/100 g do 32.522 g/100 g originalnog uzorka, sa srednjom vrijednošću od 31.511 g/100 g.

Tablica 9. Udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka (g)</i>	<i>IDF (g/100 g)</i>	<i>SDF (g/100 g)</i>	<i>TDF (g/100 g)</i>	<i>X (g/100 g)</i>	<i>SD (g/100 g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1.	1a	0.9992	24.760	5.234	29.994	30.224	0.325	1.076
	1b	1.0048	25.149	5.305	30.454			
2.	2a	1.0011	28.319	4.155	32.474	32.522	0.068	0.210
	2b	1.0009	28.704	3.867	32.571			
3.	3a	1.0014	27.841	3.835	31.676	31.655	0.029	0.093
	3b	1.0005	27.526	4.108	31.634			
4.	4a	0.9939	26.170	4.347	30.516	30.460	0.080	0.263
	4b	0.9976	26.323	4.080	30.403			
5.	5a	0.9936	27.355	4.549	31.904	31.612	0.413	1.305
	5b	0.9987	27.095	4.225	31.321			
6.	6a	0.9960	28.153	4.026	32.179	32.133	0.065	0.201
	6b	0.9979	28.229	3.858	32.087			
7.	7a	1.0026	27.299	3.990	31.289	31.657	0.522	1.648
	7b	1.0023	27.676	4.350	32.026			
8.	8a	1.0025	28.439	3.421	31.860	31.846	0.020	0.063
	8b	1.0037	28.255	3.577	31.832			
9.	9a	1.0009	27.485	4.456	31.941	31.569	0.526	1.666
	9b	1.0020	27.136	4.062	31.198			
10.	10a	1.0013	25.597	4.594	30.191	30.100	0.129	0.427
	10b	1.0007	25.092	4.917	30.009			
11.	11a	0.9998	27.996	4.031	32.026	32.117	0.129	0.401
	11b	1.0016	27.895	4.313	32.208			
12.	12a	1.0010	27.333	4.436	31.768	31.339	0.608	1.939
	12b	1.0010	26.833	4.076	30.909			
13.	13a	0.9997	28.018	4.291	32.310	32.148	0.229	0.713
	13b	1.0017	27.344	4.642	31.986			
14.	14a	1.0022	27.011	4.410	31.421	31.191	0.326	1.044
	14b	1.0016	26.358	4.603	30.960			
15.	15a	1.0004	28.519	3.758	32.277	32.265	0.016	0.051
	15b	1.0005	28.726	3.528	32.254			

Najmanji udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku sadrži uzorak s lokaliteta 10 (30.100 g/100 g), a najveći udio sadrži uzorak s lokaliteta 2 (32.522 g/100 g)

Brašno najbogatije ukupnim čistim prehrambenim vlaknima je brašno s lokaliteta 7, koje sadrži 24.168 g vlakana na 100 g originalnog uzorka (tablica 10).

Tablica 10. Udio ukupnih čistih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku

	<i>UZORAK</i>	<i>m uzorka (g)</i>	<i>IDF (g/100 g)</i>	<i>SDF (g/100 g)</i>	<i>TDF (g/100 g)</i>	<i>X (g/100 g)</i>	<i>SD (g/100 g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1.	1a	0.9992	18.875	1.021	19.896	20.388	0.696	3.412
	1b	1.0048	19.566	1.314	20.880			
2.	2a	1.0011	22.475	1.009	23.484	23.576	0.130	0.553
	2b	1.0009	22.640	1.029	23.669			
3.	3a	1.0014	22.469	1.059	23.527	23.523	0.006	0.027
	3b	1.0005	22.509	1.009	23.518			
4.	4a	0.9939	20.324	1.117	21.441	21.471	0.043	0.200
	4b	0.9976	20.439	1.063	21.502			
5.	5a	0.9936	21.548	1.419	22.967	22.823	0.203	0.891
	5b	0.9987	21.438	1.242	22.679			
6.	6a	0.9960	22.841	1.054	23.896	23.733	0.231	0.972
	6b	0.9979	22.397	1.172	23.569			
7.	7a	1.0026	22.995	1.117	24.112	24.168	0.079	0.328
	7b	1.0023	22.907	1.317	24.224			
8.	8a	1.0025	22.823	1.217	24.040	24.041	0.002	0.009
	8b	1.0023	22.827	1.216	24.043			
9.	9a	1.0009	22.450	1.169	23.619	23.197	0.597	2.574
	9b	1.0020	21.717	1.058	22.774			
10.	10a	1.0013	20.493	1.288	21.782	21.478	0.429	1.997
	10b	1.0007	20.056	1.119	21.175			
11.	11a	0.9998	22.464	0.990	23.455	23.648	0.274	1.158
	11b	1.0016	22.804	1.038	23.842			
12.	12a	1.0010	21.459	1.319	22.777	22.348	0.608	2.718
	12b	1.0010	20.859	1.059	21.918			
13.	13a	0.9997	22.697	1.180	23.877	23.704	0.245	1.036
	13b	1.0017	22.132	1.398	23.530			
14.	14a	1.0022	22.111	1.417	23.528	23.291	0.336	1.442
	14b	1.0016	21.356	1.697	23.053			
15.	15a	1.0004	22.541	1.200	23.741	23.869	0.182	0.763
	15b	1.0005	22.859	1.139	23.998			

Brašno najsiromašnije ukupnim čistim prehrambenim vlaknima je brašno s lokaliteta 1, koje sadrži 20.388 g vlakana na 100 g originalnog uzorka.

Relativna standardna devijacija kreće se u rasponu od 0.009 % (lokalitet 8) do 3.412 % (lokalitet 1).

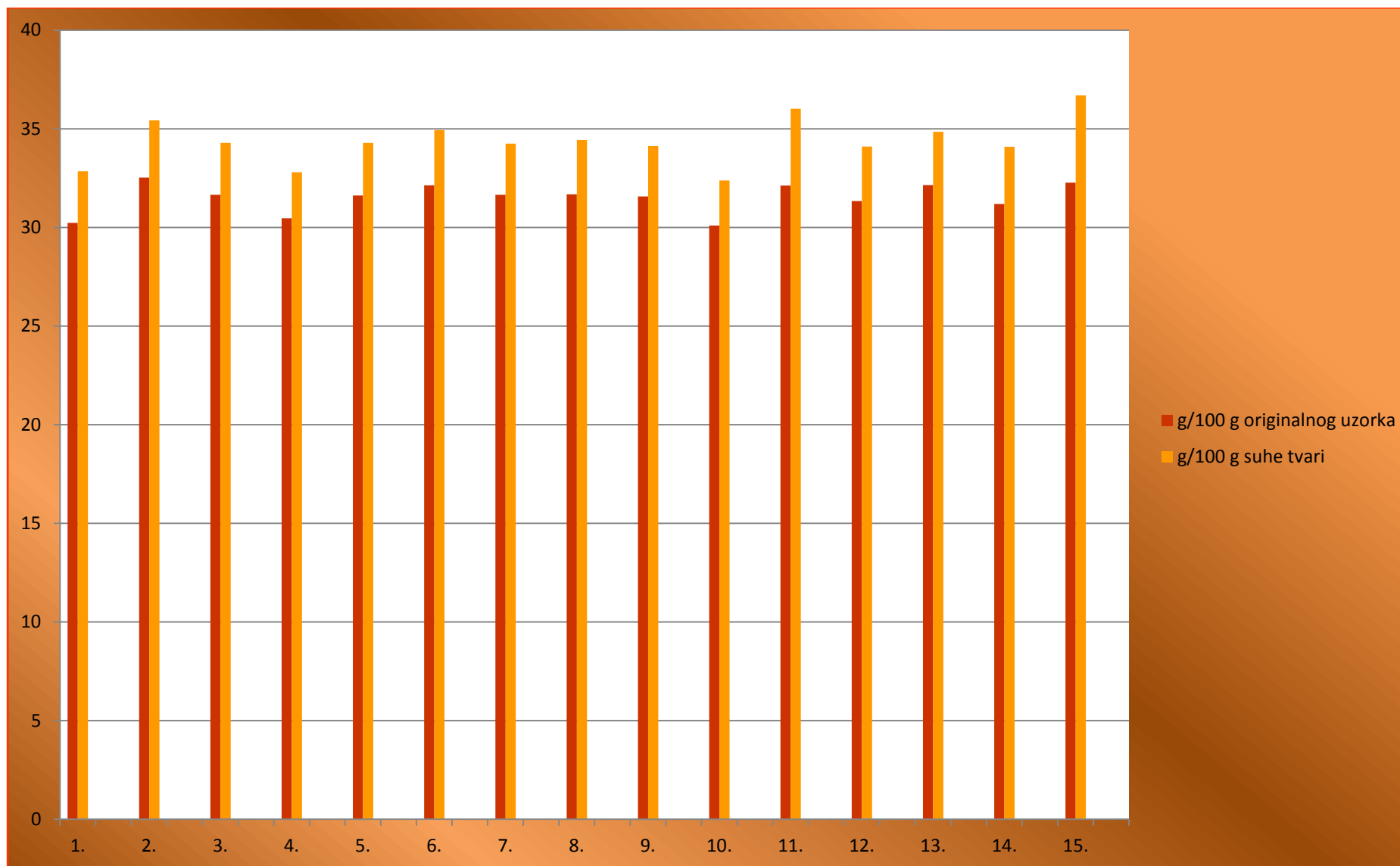
Kao što je ranije utvrđeno, ukoliko je neki uzorak bogat netopivim prehrambenim vlaknima, to ne mora značiti da će taj isti uzorak biti bogat i topivim prehrambenim vlaknima, a iz tablica 9 i 10 vidi se da se to odnosi i na ukupna vlakna. Tako je analizom utvrđeno da je brašno s lokaliteta 15 najbogatije sirovim netopivim prehrambenim vlaknima, dok je brašno s lokaliteta 14 najbogatije sirovim topivim prehrambenim vlaknima, a brašno s lokaliteta 2 najbogatije je ukupnim sirovim prehrambenim vlaknima. Analogna situacija prisutna je i kada se promatraju uzorci najsiromašniji pojedinim vrstama čistih vlakana. Brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije je čistim netopivim prehrambenim vlaknima, brašno s lokaliteta 11 najsiromašnije je čistim topivim, dok je brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije ukupnim čistim prehrambenim vlaknima.

Preračunato na suhu tvar uzorka, udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 32.375 g/100 g do 36.692 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 34.366 g/100 g (slika 8). Najmanji udio ukupnih sirovih prehrambenih vlakana sadrži brašno s lokaliteta 10 (32.375 g/100 g suhe tvari uzorka), a najveći udio brašno s lokaliteta 15 (36.692 g/100 g suhe tvari uzorka). Relativna standardna devijacija kretala se u rasponu od 0.051 % (lokalitet 15) do 1.939 % (lokalitet 12).

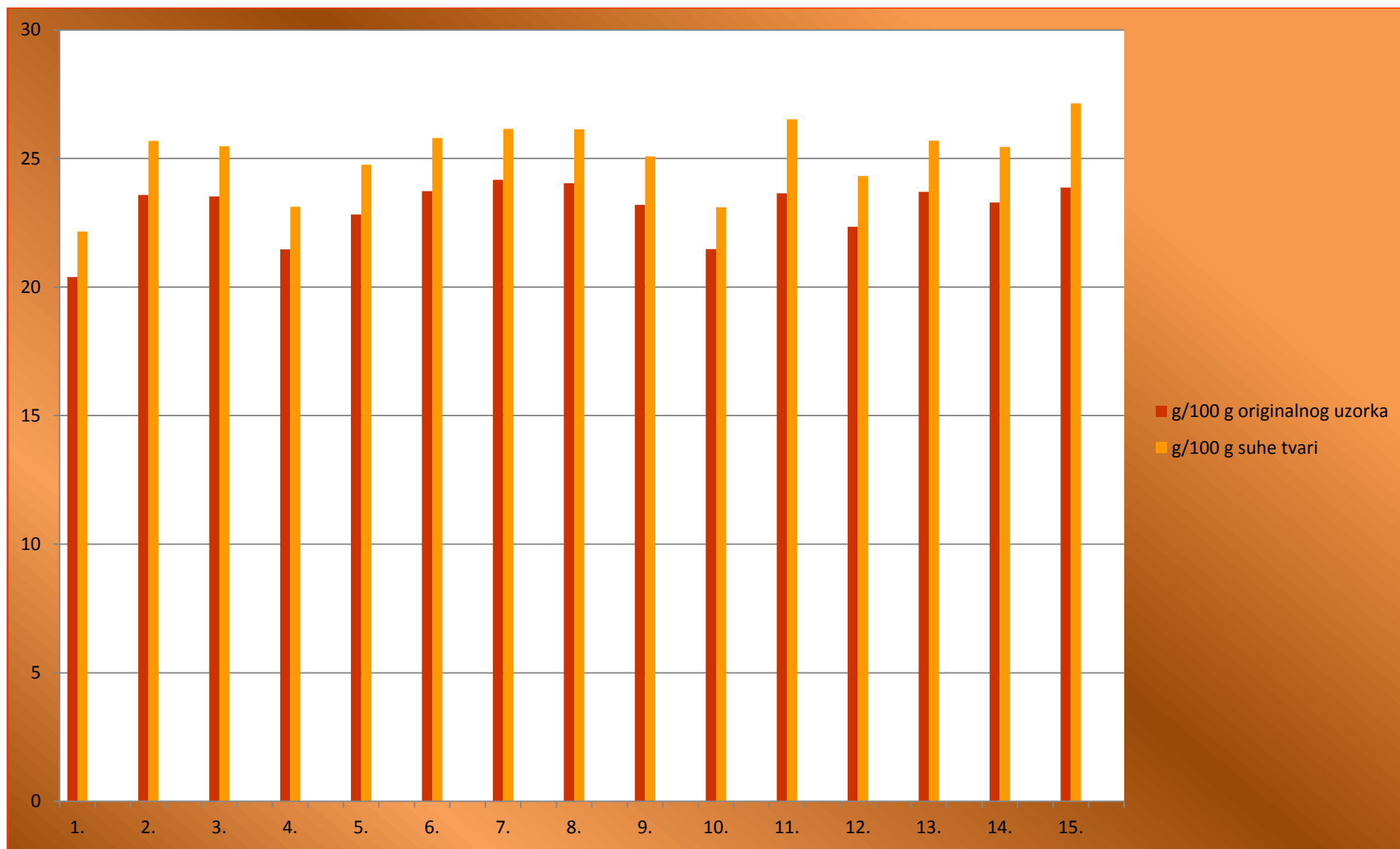
Preračunato na suhu tvar uzorka, udio ukupnih čistih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima kreće se od 22.155 g/100 g do 27.144 g/100 g, sa srednjom vrijednošću od 25.104 g/100 g (slika 9). Najviši udio ukupnih čistih prehrambenih vlakana određen je u uzorku brašna s lokaliteta 15 i iznosi 27.144 g na 100 g suhe tvari uzorka, dok je najniži udio određen u uzorku brašna s lokaliteta 1 i iznosi 22.155 g/ 100 g suhe tvari.

Treba istaknuti da je i u slučaju ukupnih sirovih i čistih prehrambenih vlakana prisutna određena korelacija između rezultata dobivenih za prehrambena vlakna u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Tako je brašno s lokaliteta 10 najsiromašnije ukupnim sirovim prehrambenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka, što nije slučaj kod brašna najbogatijeg navedenim vlaknima. Ispitivano brašno najbogatije ukupnim sirovim prehrambenim vlaknima u originalnom uzorku je brašno s lokaliteta 2, dok je brašno najbogatije istim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka brašno s lokaliteta 15. U slučaju ukupnih čistih prehrambenih vlakana, brašno s lokaliteta 1 je najsiromašnije navedenim vlaknima i u originalnom uzorku i preračunato na suhu tvar uzorka. Brašno najbogatije ukupnim čistim prehrambenim vlaknima u originalnom uzorku je brašno s lokaliteta 7, dok je brašno najbogatije istim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka brašno s lokaliteta 15.

Uspoređujući rezultate dobivene za netopiva, topiva i ukupna prehrambena vlakna preračunato na suhu tvar uzorka, uviđa se određena korelacija među pojedinim rezultatima. Brašno s lokaliteta 15 najbogatije je sirovim netopivim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka, ali sadrži i najveći udio ukupnih sirovih prehrambenih vlaknima preračunato na suhu tvar. Također, uviđa se da nijedan uzorak nije istovremeno najsiromašniji objema vrstama vlakana, netopivim i topivim. Brašno s lokaliteta 1 najsiromašnije je sirovim netopivim, a brašno s lokaliteta 8 najsiromašnije je sirovim topivim prehrambenim vlaknima. Brašno s lokaliteta 10 najsiromašnije je ukupnim sirovim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka. U slučaju čistih prehrambenih vlakana preračunato na suhu tvar uzorka, brašno s lokaliteta 15 najbogatije je netopivim i ukupnim vlaknima, dok je brašno s lokaliteta 14 najbogatije topivim prehrambenim vlaknima. Analizirano brašno najsiromašnije čistim netopivim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka je brašno s lokaliteta 1, koje je najsiromašnije i ukupnim prehrambenim vlaknima. Brašno s lokaliteta 2 najsiromašnije je čistim topivim prehrambenim vlaknima preračunato na suhu tvar uzorka.



Slika 8. Odnos udjela ukupnih sirovih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka



Slika 9. Odnos udjela ukupnih čistih prehrambenih vlakana u originalnom uzorku i suhoj tvari uzorka

4.5. Usporedba rezultata s preporučenim dnevnim unosom prehrambenih vlakana

S obzirom na dobivene rezultate za ukupna prehrambena vlakna, napravljeni su grafički prikazi odnosa udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i preporučenog dnevnog unosa (eng. RDA-recommended dietary allowance) prehrambenih vlakana ovisno o dobi i spolu (slike 10, 11 i 12).

Kao izvor podataka za preporučene dnevne unose ovisno o dobi, spolu i specifičnim fiziološkim stanjima korišten je izvor *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002/2005)*, objavljen od strane Ministarstva poljoprivrede i Medicinskog instituta Sjedinjenih Američkih Država u sklopu Nacionalne Akademije Sjedinjenih Američkih Država.

Iz grafičkog prikaza odnosa udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i preporučenog dnevnog unosa (RDA) prehrambenih vlakana za djecu od 1. do 3. godine života (slika 10) vidljivo je da 100 g svih analiziranih uzoraka zadovoljava dnevne potrebe djeteta od 1. do 3. godine života za prehrambenim vlaknima (RDA=19g/dan). 100 g ispitivanih uzoraka zadovoljava 158-171 % dnevnih potreba za prehrambenim vlaknima kod djece od 1. do 3. godine života.

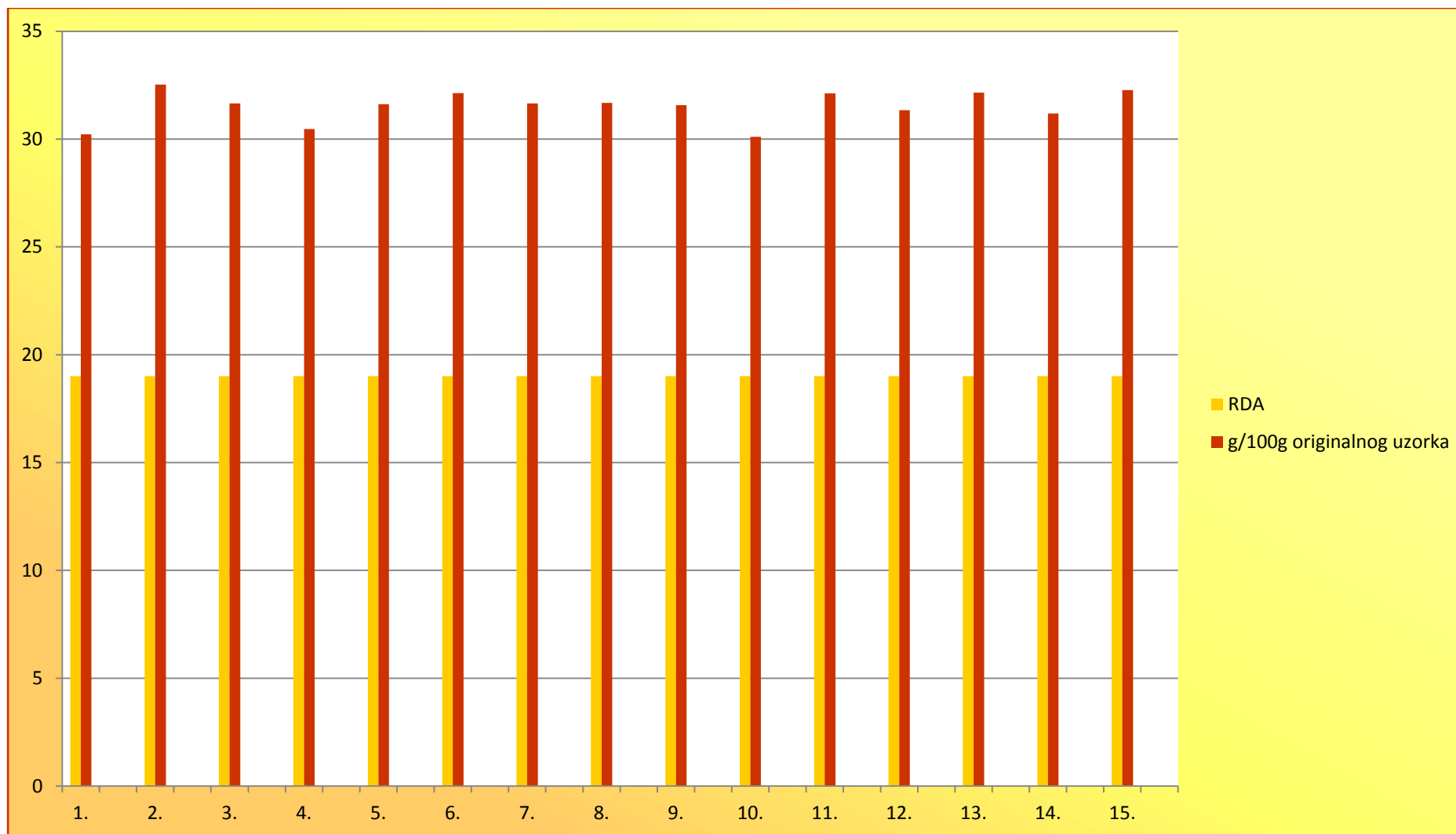
Kod djece od 4. do 8. godine života (RDA=25g/dan) prisutna je analogija s prethodnom skupinom. 100 g ispitivanih uzoraka zadovoljava 120-130 % dnevnih potreba za prehrambenim vlaknima kod djece od 4. do 8. godine života.

Grafički prikaz odnosa udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i RDA prehrambenih vlakana za muškarce starije od 50 godina prikazan je na slici 11. Kako ljudski organizam stari, tako se smanjuje i njegova potreba za unosom prehrambenih vlakana. Za muškarce mlađe od 50 godina, dnevna potreba za prehrambenim vlaknima iznosi 38 g/dan, dok se nakon 50-e godine života ta potreba smanjuje na 30 g/dan. S obzirom da svi analizirani uzorci sadrže više od 30 g ukupnih prehrambenih vlakana na 100 g uzorka, 100 g analiziranog brašna zadovoljava dnevne potrebe za prehrambenim vlaknima kod muškaraca starijih od 50 godina (100-108 % dnevnih potreba), dok kod muškaraca mlađih od 50 godina analizirano brašno zadovoljava 79-86% dnevnih potreba za prehrambenim vlaknima.

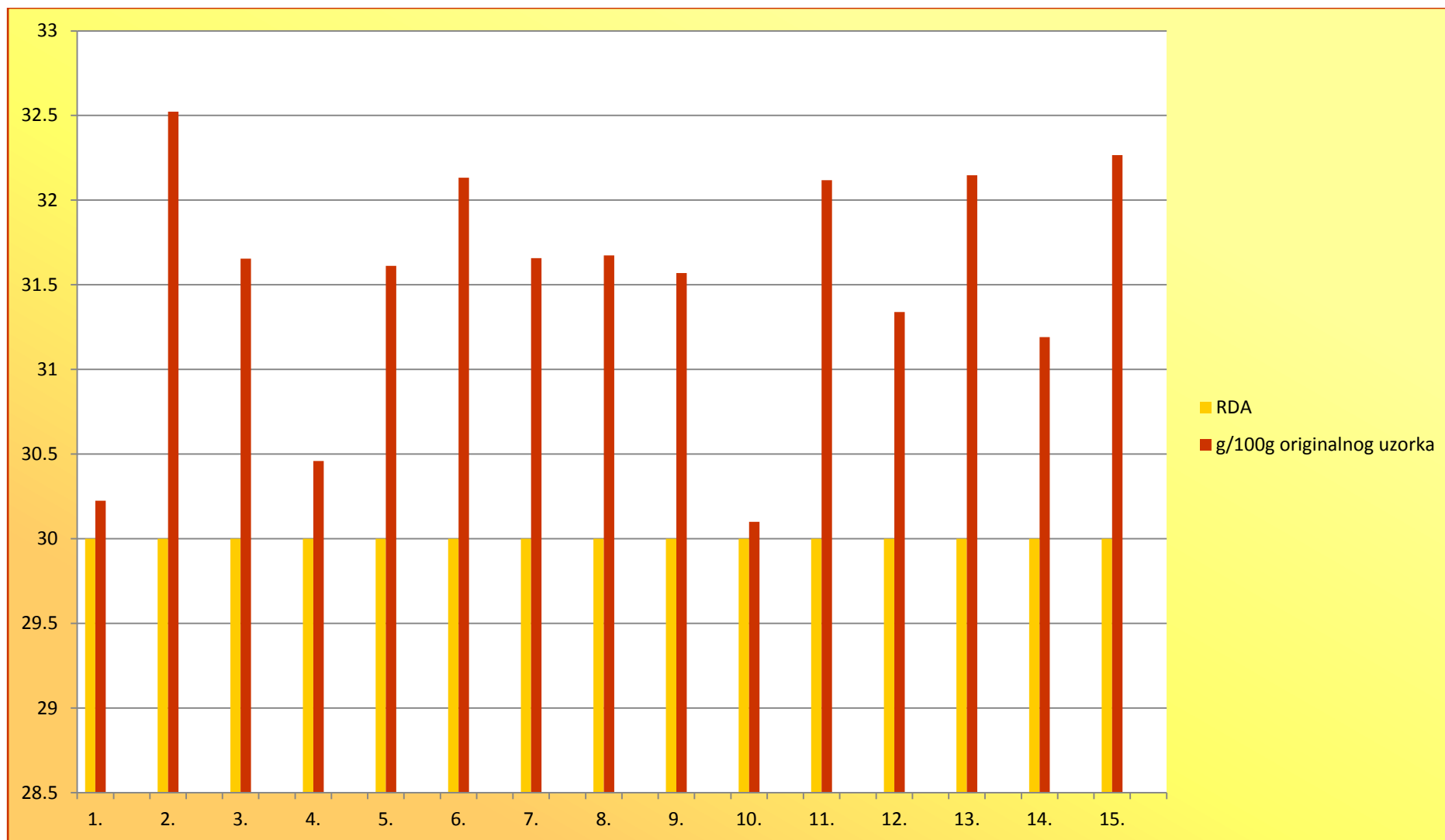
S obzirom da je ženama dnevno potrebno manje prehrambenih vlakana nego muškarcima, iz grafičkog prikaza odnosa udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i RDA prehrambenih vlakana za žene od 19.-50. godine života (slika 12) vidljivo je da 100 g svih analiziranih uzoraka zadovoljava dnevne potrebe prosječne odrasle žene za prehrambenim vlaknima (RDA=25g/dan). 100 g ispitivanih uzoraka zadovoljava 120-130 % dnevnih potreba za ukupnim prehrambenim vlaknima kod žena od 19.-50. godine života.

Analogija je prisutna i kod žena starijih od 50 godina (RDA=21g/dan), kod kojih 100 g ispitivanih uzoraka zadovoljava 143-155 % dnevnih potreba za prehrambenim vlaknima. Zanimljivo je za primijetiti da prosječna odrasla žena ima jednake potrebe za prehrambenim vlaknima kao i dijete od 4. do 8. godine života (25 g/dan), a žene starije od 50 godina imaju čak i manje potrebe za prehrambenim vlaknima od spomenute djece.

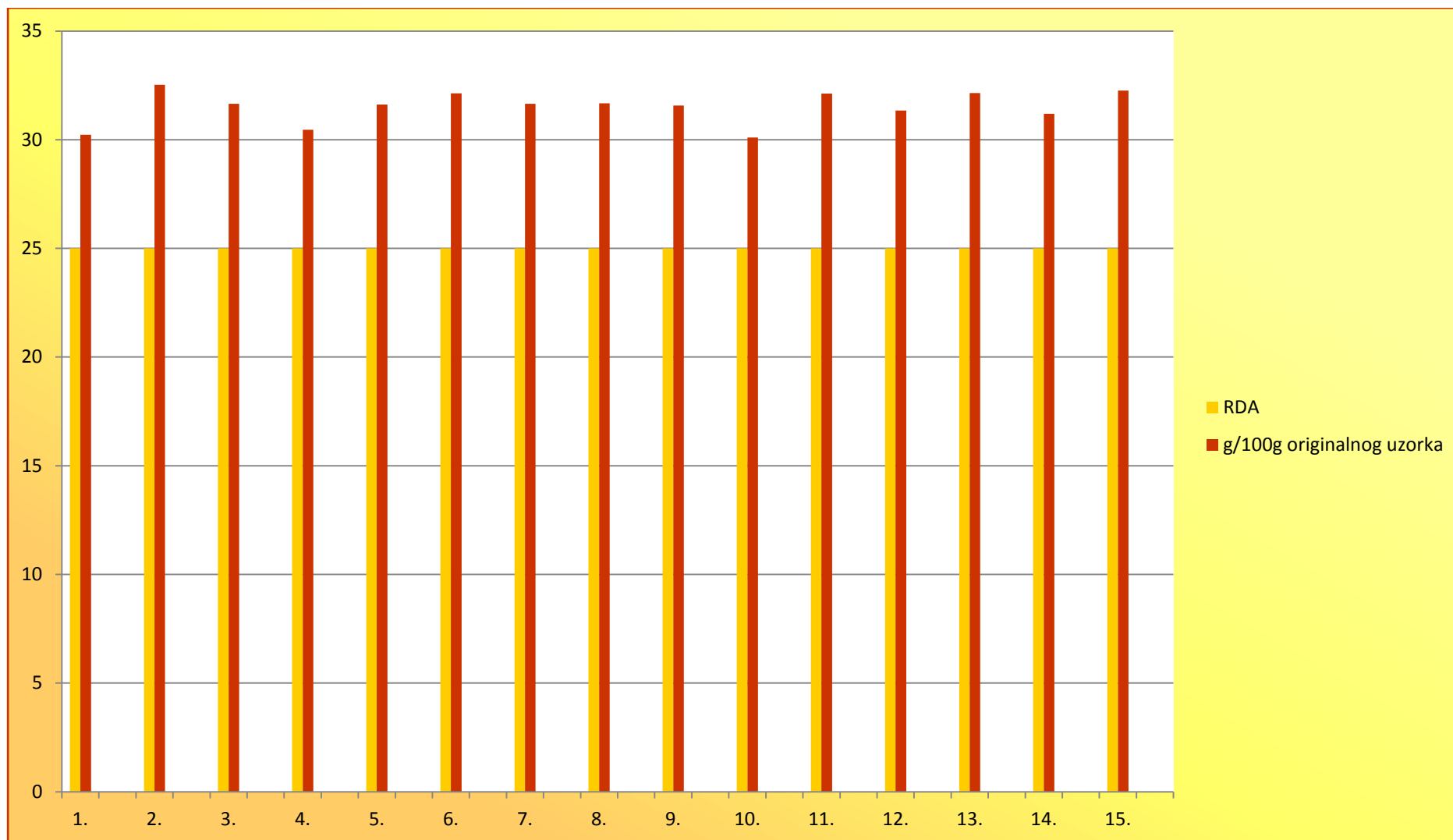
Trudnoća, kao kompleksno fiziološko stanje, povećava dnevne potrebu žene za prehrambenim vlaknima. Preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana kod prosječne odrasle žene iznosi 25 g/dan, dok isti kod trudne žene iznosi 28 g/dan. Zanimljiva je činjenica da je za ženu kada je u fazi laktacije preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana veći nego kada je žena trudna te iznosi 29 g prehrambenih vlakana dnevno. S obzirom da svi analizirani uzorci sadrže više od 30 g ukupnih prehrambenih vlakana na 100 g uzorka, 100 g rogačevog brašna zadovoljava dnevnu potrebu za prehrambenim vlaknima kod trudnica (108-116 % dnevnih potreba) i kod žena u fazi laktacije (104-112 % dnevnih potreba).



Slika 10. Odnos udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i preporučenog dnevnog unosa (RDA, g/dan) ukupnih prehrambenih vlakana za djecu od 1. do 3. godine života



Slika 11. Odnos udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i preporučenog dnevnog unosa (RDA, g/dan) ukupnih prehrambenih vlakana za muškarce (nakon 50-e godine života)



Slika 12. Odnos udjela ukupnih prehrambenih vlakana u analiziranim uzorcima i preporučenog dnevnog unosa (RDA, g/dan) ukupnih prehrambenih vlakana za žene (19.-50. godina života)

4.6. Usporedba rezultata s literaturnim podacima

Rezultati analiza provedenih u okviru ovog rada uvelike se podudaraju s već postojećim literaturnim podacima o udjelu prehrambenih vlakana u plodu rogača.

Saura-Calixto je koristeći istu, AOAC 991.43, enzimsko-gravimetrijsku metodu za utvrđivanje udjela prehrambenih vlakana utvrdio da suha tvar ploda španjolskog rogača sadrži: 32.6% netopivih prehrambenih vlakana, 6.8% topivih prehrambenih vlakana i 39.4% ukupnih prehrambenih vlakana (Saura-Calixto, 1988.).

Istraživanje provedeno u ovom radu utvrdilo je da suha tvar ploda dalmatinskog rogača sadrži: 27.1-32.5% netopivih prehrambenih vlakana, 3.8-5.7% topivih prehrambenih vlakana i 32.4-36.7% ukupnih prehrambenih vlakana.

Iipumbu je, koristeći istu metodu, utvrdio da udio ukupnih prehrambenih vlakana u plodu južnoafričkog rogača iznosi 29.88-36.07% suhe tvari ploda (Iipumbu, 2008.).

Rezultati provedenih analiza u ovom radu uvelike se poklapaju i s rezultatima istraživanja Shawakfeh i Ereifej, koji su pokazali da udio prehrambenih vlakana u jordanskom rogaču iznosi 4.2-39.8% suhe tvari ploda, ovisno o vrsti prehrambenih vlakana (netopiva, topiva ili ukupna) koja se ispituju (Shawakfeh i Ereifej, 2005.).

Udio ukupnih prehrambenih vlakana u plodovima rogača analiziranim u okviru ovog rada sukladan je i Makris i Kefalakovom istraživanju, koji su utvrdili da udio ukupnih prehrambenih vlakana u plodu grčkog rogača može činiti čak do 40% suhe tvari uzorka (Makris i Kefalas, 2004.).

5. Zaključak

Analiza uzoraka homogeniziranog brašna dalmatinskog rogača (*Ceratonia siliquae farina*, *Fabaceae*), prikupljenih na 15 lokaliteta, koji obuhvaćaju otoke i priobalje srednje i južne Dalmacije, provedena je enzimsko-gravimetrijskom TDF 1.4 (AOAC 991.43) metodom te je utvrđen udio netopivih, topivih i ukupnih prehrambenih vlakana u istima. Rezultati analize su pokazali:

- udio vode u ispitivanim brašnima ploda rogača iznosio je 7.028-12.065 g vode na 100 g originalnog uzorka
- udio netopivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima ploda rogača iznosio je: 24.955-28.622 g sirovih netopivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka, 19.221-22.951 g čistih netopivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka
- udio topivih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima ploda rogača iznosio je: 3.499-5.269 g sirovih topivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka, 1.557-1.014 g čistih topivih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka
- udio ukupnih prehrambenih vlakana u ispitivanim brašnima ploda rogača iznosio je: 30.100-32.522 g ukupnih sirovih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka, 24.168-20.388 g ukupnih čistih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka
- svi ispitivani uzorci ploda rogača bogatiji su netopivim, nego topivim prehrambenim vlaknima
- određeni uzorak ne mora istovremeno biti jednako bogat topivim i netopivim prehrambenim vlaknima
- uzorak koji je najbogatiji sirovim prehrambenim vlaknima može, ali i ne mora, istovremeno biti najbogatiji i čistim prehrambenim vlaknima

Unos 100 g brašna dalmatinskog rogača zadovoljava preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana u gotovo svim dobnim skupinama, neovisno o spolu (RDA za muškarce=30-38 g prehrambenih vlakana/dan, za žene=21-25 g/dan), kao i u specifičnim fiziološkim stanjima poput trudnoće (28 g/dan) i laktacije (29 g/dan), što ukazuje na činjenicu da je plod dalmatinskog rogača (TDF=30.1-32.5 g/100 g originalnog uzorka) izuzetno bogat prirodni izvor prehrambenih vlakana.

6. Literatura

Albanell E, Caja G, Plaixats J. Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes*, 1991, 16, 135-136.

Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev*, 2009, 67, 188-205.

Anderson JW. Dietary fiber and associated phytochemicals in prevention and reversal of diabetes. U: Nutraceuticals, Glycemic Health and Type 2 Diabetes. Pasupuleti VK, Anderson JW, Ames, Iowa, Blackwell Publishing Professional, 2008, str. 111–142.

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

Ayaz FA, Torun H, Ayaz S, Correia PJ, Alaiz M, Sanz C, Gruz J, Strnad M. Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *J Food Qual*, 2007, 30, 1040–1055.

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. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rim, Institute of Plant Genetic Resources Institute, 1997.

Brennan CS. Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49, 560-570.

Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. Cholesterol lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69, 30–42.

Chen G. Effect of low fat and/or high fruit and vegetable diets on plasma level of 8-isoprostane-F2alpha in nutrition and breast health study. *Nutr Cancer*, 2004, 50, 155-160.

Corsi L, Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C, Baraldi M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 2002, 73, 674-684.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Topics Med Chem*, 2001, 1, 569-590.

Crozier A, Jaganath IH, Clifford MN. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. U: Secondary Metabolites and the Human Diet. Crozier A, Ashihara H, Clifford MN, Oxford, Blackwell Publishing, 2006, str. 1-31.

Cummings JH. The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. U: Dietary fiber in human nutrition. Spiller G, Boca Raton, Florida, *CRC Press*, 2001, 183-252.

Dai J, Mumper R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.

De Vries J, Camire ME, Cho S, Gordon D, Jones JJ, Lineback D, Prosky L, Tunland B. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Foods World*, 2001, 46, 112-126.

Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002/2005).

Institute of Medicine of The National Academies, The National Academies Press, 2005. http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Energy/energy_full_report.pdf, pristupljeno 15. 05. 2015.

Edwards CA, Blackburn NA, Craigen L, Davison P, Tomlin J, Sugden K, Johnson IT, Read NW. Viscosity of food gums determined in vitro related to their hypoglycemic actions. *Am J Clin Nutr*, 1987, 46, 72-77.

El-Serag HB, Satia JA, Rabeneck L. Dietary intake and the risk of gastro-oesophageal reflux disease: a cross sectional study in volunteers. *Gut*, 2005, 54, 11–17.

Ershoff BH, Wells AF. Effects of gum guar, locust bean gum and carrageenan on liver cholesterol of cholesterolfed rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1962, 110, 580-582.

Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 2006, 12, 5941–5950.

Feldman N, Norenberg C, Voet H, Manor E, Berner Y, Madar Z. Enrichment of an Israeli ethnic food with fibres and their effects on the glycaemic and insulinaemic responses in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Br J Nutr*, 1995, 74, 681-688.

Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res*, 2011, 5, 6697-6703.

Giannini EG, Mansi C, Dulbecco P, Savarino V. Role of partially hydrolyzed guar gum in the treatment of irritable bowel syndrome. *Nutrition*, 2006, 22, 334–342.

Gruendel S, Garcia AL, Otto B, Mueller C, Steiniger J, Weickert MO, Speth M, Katz N, Koebnick C. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *J Nutr*, 2006, 136, 1533-1538.

Guarner F. Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation. *J Nutr*, 2007, 137, 2568–2571.

Guggenbichler JP. Adherence of enterobacteria in infantile diarrhea and its prevention. *Infection*, 1983, 11, 239-242.

Hagerman AE. Condensed tannin structural chemistry. U: Tannin Handbook. Hagerman AE, Oxford, SAD, 1998, str. 1-8.

Hammer K, Knüpffer H, Laghetti G, Perrino P. Seeds from the past. Bari, A Catalogue of Crop Germplasm in South Italy and Sicily, 1992.

Harmuth-Hoene AE, Schwerdtfeger E. Effect of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. *Nutr Metab*, 1979, 23, 399-407.

Haskell WL, Spiller GA, Jensen CD, Ellis BK, Gates JE. Role of water-soluble dietary fiber in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. *Am J Cardiol*, 1992, 69, 433-439.

Horvath P.J. The nutritional and ecological significance of Acer-tannins and related polyphenols. M.S. thesis, Cornell University, Ithaca, New York, 1981.

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

Jaganath IB, Crozier A. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. U: Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Jaganath IB, Crozier A, 2010, str. 1-39.

Karkacier M, Artik N. Determination of physical properties, chemical composition and extraction conditions of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Gida*, 1995, 20, 131-136.

Klenow S, Gleis M, Beyer-Sehlmeyer G, Haber B, Pool-Zobel BL. Carob fiber-functional effects on human colon cell line HT29. *Poster, Functional Food: Safety Aspects*, 2004.

Krantz JC Jr, Carr CJ, de Farson CB. Guar polysaccharide as a precursor of glycogen. *J Amer Diet Assoc*, 1948, 24, 212.

Kukic J, Petrovic S, Niketic M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol Pharmaceut Bull*, 2006, 29, 725-729.

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.

Kwiterovich PO Jr. The role of fiber in the treatment of hypercholesterolemia in children and adolescents. *Pediatrics*, 1995, 96, 1005-1009.

Lindstrom J, Peltonen M, Eriksson JG, et al. High-fibre, low-fat diet predicts long-term weight loss and decreased type 2 diabetes risk: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia*, 2006, 49, 912-920.

Linskens HF, Scholten W. The flower of carob. *Portug Acta Biol*, 1980, (A) XVIII-4, 95-102.

Lukyanova LD, Storozheva ZI, Proshin AT. Corrective effect of flavonoid containing preparation extralife on the development of Parkinson's syndrome. *Bull Exp Biol Med*, 2007, 144, 42-45.

Luo H, Rankin GO, Liu L, Daddysman MK, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutr Cancer*, 2009, 61, 554-563.

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

Mastromarino P, Petruzzello R, Macchia S, Rieti S, Nicoletti R, Orsi N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 39, 339-345.

Mitrakos, K. The botany of *Ceratonia*. INTERNATIONAL CAROB SYMPOSIUM II, Valencia, 1988, 209-218.

Morais MB, Vitolo MR, Aguirre AN, Fagundes-Neto U. Measurement of low dietary fiber intake as a risk factor for chronic constipation in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999, 29, 132-135.

Nicklas TA, Myers L, O'Neil C, Gustafson N. Impact of dietary fat and fiber intake on nutrient intake of adolescents. *Pediatrics*, 2000, 105, 21–27.

Ogasawara M, Matsunaga T, Suzuki H. Differential effects of antioxidants on the *in vitro* invasion, growth and lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol Pharmaceut Bull*, 2007, 30, 200-204.

Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chem Toxicol*, 2003, 41, 1727-1738.

Ozcan MM, Arslan D, Gokcalik H. Some compositional properties and mineral contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 2007, 58, 652-658.

Paliwal S, Sundaram J, Mitragotri S. Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *Br J Cancer*, 2005, 92, 499-502.

Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro-inflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res*, 2008, 31, 1303-1311.

Pereira MA, Jacobs DR Jr, Pins JJ. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75, 848–855.

Reed JD. Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *J Ani Sci*, 1995, 73, 1516-1528.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20, 933-956.

Riedl KM, Hagerman AE. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 4917-4923.

Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr*, 2007, 137, 2493–2502.

Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F, Laczano-Burciaga L. Lipid- and glucose-lowering efficacy of plantago psyllium in type II diabetes. *J Diabetes Complicat*, 1998, 12, 273–278.

Roukas T. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24, 54–59.

Saura-Calixto F. Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fibre in carob pods. *J Food Sci*, 1988, 53, 1769–1771.

Schaefer DC, Cheskin LJ. Constipation in the elderly. *Am Fam Physician*, 1998, 58, 907–914.

Shawakfeh K, Ereifej KI. Pod characteristics of two *Ceratonia siliqua* L. varieties from Jordan. *Ital J Food Sci*, 2005, 17, 187–194.

Steffen LM, Jacobs DR Jr, Stevens J, Shahar E, Carithers T, Folsom AR. Associations of whole-grain, refined grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr*, 2003, 78, 383–390.

Streppel MT, Arends LR, Grobbee DE, Geleijnse JM. Dietary fiber and blood pressure: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*, 2005, 165, 150–156.

Šebečić B, Vedrina Dragojević I. Biokemija prehrane: Osnovni sastojci i energetska vrijednost namirnica. Zavod za kemiju prehrane, FBF, Zagreb, 2007, str. 17, 45-79, 96-97.

Šoljić M, Šustru A. Određivanje ukupnih dijetalnih vlakana. 8. Stručno savjetovanje inženjera konditorske industrije Hrvatske, Umag, 2000.

Tagari H, Henis Y, Tamir M, Volcani R. Effect of Carob Pod Extract on Cellulolysis, Proteolysis, Deamination, and Protein Biosynthesis in an Artificial Rumen. *Amer Soc Microb*, 1965.

Tang F, Chiang E, Shih C. Green tea catechin inhibits ephrin-A1-mediated cell migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *J Nutr Biochem*, 2007, 18, 391-399.

Trommer H, Neubert RH. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *Int J Pharm*, 2005, 298, 153-163.

Tsai AC, Peng B. Effects of locust bean gum on glucose tolerance, sugar digestion, and gastric motility in rats. *J Nutr*, 1981, 111, 2152-2156.

Tucker SC. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). *Am J Bot*, 1992, 79, 318-327.

Vos AP, M'Rabet L, Stahl B, Boehm G, Garssen J. Immunomodulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol*, 2007, 27, 97-140.

Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, Yi Y, Whelton PK, He J. Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *J Hypertens*, 2005, 23, 475-481.

Williams CL, Strobino BA. Childhood diet, overweight, and CVD risk factors: the Healthy Start project. *Prev Cardiol*, 2008, 11, 11-20.

Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Hebe D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and humancancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 670-675.

Živković R. Hranom do zdravlja. Hrana nije lijek, ali liječi. Medicinska naklada, Zagreb, 2000, str. 201-208.

7. Sažetak

Stablo rogača (*Ceratonia siliqua*, L.) još je od antičkih vremena uzgajano u većini mediteranskih zemalja s umjerenom i suhom klimom. Kroz stoljeća koja su uslijedila, prepoznat je značajan farmakološki i nutritivni potencijal ove zimzelene biljke koja se danas koristi diljem svijeta. Bogat ugljikohidratni, mineralni i aminokiselinski sastav, kao i sastav polifenolnih spojeva, razlog su njegovog pleiotropnog farmakološkog učinka, dokazanog mnogim znanstvenim studijama. Plod rogača vrlo je bogat prehrambenim vlaknima, koja imaju blagotvorne fiziološke učinke na mnoga patološka i patofiziološka stanja u ljudskom organizmu. S obzirom na nepostojanje podataka o udjelima prehrambenih vlakana u plodu dalmatinskog rogača, cilj ovog rada je bio odrediti udjele netopivih, topivih i ukupnih prehrambenih vlakana u uzorcima ploda rogača prikupljenima na 15 lokaliteta, koji obuhvaćaju otoke i priobalje srednje i južne Dalmacije. Određivanje prehrambenih vlakana provedeno je enzimsko-gravimetrijskom TDF 1.4 (AOAC 991.43) metodom, a rezultati su obrađeni prikladnim statističkim metodama. Rezultati analize su pokazali da ispitivana brašna ploda dalmatinskog rogača sadrže: 7.028-12.065 g vode, 24.955-28.622 g sirovih netopivih prehrambenih vlakana, 19.221-22.951 g čistih netopivih prehrambenih vlakana, 3.499-5.269 g sirovih topivih prehrambenih vlakana, 1.557-1.014 g čistih topivih prehrambenih vlakana, 30.100-32.522 g ukupnih sirovih prehrambenih vlakana i 24.168-20.388 g ukupnih čistih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka. Svi ispitivani uzorci ploda rogača bogatiji su netopivim, nego topivim prehrambenim vlaknima. Također je utvrđeno da određeni uzorak ploda rogača ne mora istovremeno biti jednako bogat topivim i netopivim prehrambenim vlaknima te da uzorak koji je najbogatiji sirovim prehrambenim vlaknima može, ali i ne mora, istovremeno biti najbogatiji i čistim prehrambenim vlaknima. Analiza je pokazala da unos 100 g brašna dalmatinskog rogača zadovoljava preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana u gotovo svim dobnim skupinama, neovisno o spolu, kao i u specifičnim fiziološkim stanjima poput trudnoće i laktacije.

Summary

Carob tree (*Ceratonia siliqua*, L.) has been cultivated since ancient times in the majority of the Mediterranean countries with mild and temperate climate. Throughout the centuries, a significant pharmacological and nutritional potential of this evergreen plant has been recognized and it is being used today worldwide. Rich carbohydrate, mineral and amino acid composition, as well as polyphenolic composition, is the cause of its pleiotropic pharmacological effect, proven by many scientific studies. Carob pod is highly rich in dietary fibers, which have beneficial physiological effects on many pathological and pathophysiological conditions in the human organism. Considering the lack of data on dietary fibers in Dalmatian carob pod, the aim of this study was to determine the insoluble, soluble and total dietary fibers in carob pod samples collected at 15 locations, which include islands and the coastal part of middle and south region of Dalmatia. Determination of dietary fibers has been made by the TDF 1.4 (AOAC 991.43) enzymatic-gravimetric method, and the results have been processed by suitable statistical methods. Results of the analysis have shown that Dalmatian carob pod flours contain: 7.028-12.065 g of water, 24.955-28.622 g of crude insoluble dietary fibers, 19.221-22.951 g of pure insoluble dietary fibers, 3.499-5.269 g of crude soluble dietary fibers, 1.557-1.014 g of pure soluble dietary fibers, 30.100-32.522 g of crude total dietary fibers and 24.168-20.388 g of pure total dietary fibers in 100 g of the original sample. All carob pod samples had higher amounts of insoluble dietary fibers than soluble dietary fibers. It was also determined that a certain carob pod sample doesn't have to be equally rich in both soluble and insoluble dietary fibers and if a certain carob pod sample is highly rich in crude dietary fibers it can also be highly rich in pure dietary fibers, but not necessarily. The analysis has shown that the intake of 100 g of Dalmatian carob pod flour meets the recommended dietary allowances for dietary fibers in almost all age groups, regardless of gender, as well as in specific physiological conditions, such as pregnancy and lactation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PREHRAMBENA VLAKNA U DALMATINSKOM ROGAČU (*CERATONIA SILIQUA* L.)

Vedran Piršić

SAŽETAK

Stablo rogača (*Ceratonia siliqua*, L.) još je od antičkih vremena uzgajano u većini mediteranskih zemalja s umjerenom i suhom klimom. Kroz stoljeća koja su uslijedila, prepoznat je značajan farmakološki i nutritivni potencijal ove zimzelene biljke koja se danas koristi diljem svijeta. Bogat ugljikohidratni, mineralni i aminokiselinski sastav, kao i sastav polifenolnih spojeva, razlog su njegovog pleiotropnog farmakološkog učinka, dokazanog mnogim znanstvenim studijama. Plod rogača vrlo je bogat prehrambenim vlaknima, koja imaju blagotvorne fiziološke učinke na mnoga patološka i patofiziološka stanja u ljudskom organizmu. S obzirom na nepostojanje podataka o udjelima prehrambenih vlakana u plodu dalmatinskog rogača, cilj ovog rada je bio odrediti udjele netopivih, topivih i ukupnih prehrambenih vlakana u uzorcima ploda rogača prikupljenima na 15 lokaliteta, koji obuhvaćaju otoke i priobalje srednje i južne Dalmacije. Određivanje prehrambenih vlakana provedeno je enzimsko-gravimetrijskom TDF 1.4 (AOAC 991.43) metodom, a rezultati su obrađeni prikladnim statističkim metodama. Rezultati analize su pokazali da ispitivana brašna ploda dalmatinskog rogača sadrže: 7.028-12.065 g vode, 24.955-28.622 g sirovih netopivih prehrambenih vlakana, 19.221-22.951 g čistih netopivih prehrambenih vlakana, 3.499-5.269 g sirovih topivih prehrambenih vlakana, 1.557-1.014 g čistih topivih prehrambenih vlakana, 30.100-32.522 g ukupnih sirovih prehrambenih vlakana i 24.168-20.388 g ukupnih čistih prehrambenih vlakana na 100 g originalnog uzorka. Svi ispitivani uzorci ploda rogača bogatiji su netopivim, nego topivim prehrambenim vlaknima. Također je utvrđeno da određeni uzorak ploda rogača ne mora istovremeno biti jednako bogat topivim i netopivim prehrambenim vlaknima te da uzorak koji je najbogatiji sirovim prehrambenim vlaknima može, ali i ne mora, istovremeno biti najbogatiji i čistim prehrambenim vlaknima. Analiza je pokazala da unos 100 g brašna dalmatinskog rogača zadovoljava preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana u gotovo svim dobnim skupinama, neovisno o spolu, kao i u specifičnim fiziološkim stanjima poput trudnoće i laktacije.

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

Rad sadrži: 68 stranica, 12 grafičkih prikaza, 10 tablica i 78 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: prehrambena vlakna, rogač, *Ceratonia siliqua*

Mentor: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Irena Vedrina Dragojević, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željka Vanić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Food Chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DIETARY FIBER IN DALMATIAN CAROB POD (*CERATONIA SILIQUA* L.)

Vedran Piršić

SUMMARY

Carob tree (*Ceratonia siliqua*, L.) has been cultivated since ancient times in the majority of the Mediterranean countries with mild and temperate climate. Throughout the centuries, a significant pharmacological and nutritional potential of this evergreen plant has been recognized and it is being used today worldwide. Rich carbohydrate, mineral and amino acid composition, as well as polyphenolic composition, is the cause of its pleiotropic pharmacological effect, proven by many scientific studies. Carob pod is highly rich in dietary fibers, which have beneficial physiological effects on many pathological and pathophysiological conditions in the human organism. Considering the lack of data on dietary fibers in Dalmatian carob pod, the aim of this study was to determine the insoluble, soluble and total dietary fibers in carob pod samples collected at 15 locations, which include islands and the coastal part of middle and south region of Dalmatia. Determination of dietary fibers has been made by the TDF 1.4 (AOAC 991.43) enzymatic-gravimetric method, and the results have been processed by suitable statistical methods. Results of the analysis have shown that Dalmatian carob pod flours contain: 7.028-12.065 g of water, 24.955-28.622 g of crude insoluble dietary fibers, 19.221-22.951 g of pure insoluble dietary fibers, 3.499-5.269 g of crude soluble dietary fibers, 1.557-1.014 g of pure soluble dietary fibers, 30.100-32.522 g of crude total dietary fibers and 24.168-20.388 g of pure total dietary fibers in 100 g of the original sample. All carob pod samples had higher amounts of insoluble dietary fibers than soluble dietary fibers. It was also determined that a certain carob pod sample doesn't have to be equally rich in both soluble and insoluble dietary fibers and if a certain carob pod sample is highly rich in crude dietary fibers it can also be highly rich in pure dietary fibers, but not necessarily. The analysis has shown that the intake of 100 g of Dalmatian carob pod flour meets the recommended dietary allowances for dietary fibers in almost all age groups, regardless of gender, as well as in specific physiological conditions, such as pregnancy and lactation.

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

Thesis includes: 68 pages, 12 figures, 10 tables and 78 references. Original is in Croatian language.

Keywords: dietary fiber, carob, *Ceratonia siliqua*

Mentor: **Lovorka Vujić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Lovorka Vujić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Irena Vedrinar Dragujević, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Željka Vanić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: June 2015.