

Stabilnost antocijana iz kultivirane borovnice (VACCINIUM CORYMBOSUM L.) nakon različitih postupaka sušenja

Čalić, Kristijan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:786760>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

STABILNOST ANTOCIJANA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) NAKON RAZLIČITIH POSTUPAKA
SUŠENJA

DIPLOMSKI RAD

KRISTIЈAN ČALIĆ

Matični broj: 64

Split, lipanj 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

STABILNOST ANTOCIJANA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) NAKON RAZLIČITIH POSTUPAKA
SUŠENJA

DIPLOMSKI RAD

KRISTIЈAN ČALIĆ

Matični broj: 64

Split, lipanj 2024.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**IMPACT OF DIFFERENT DRYING METHODS ON THE STABILITY
OF ANTHOCYANINS FROM CULTIVATED BLUEBERRY
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L)**

DIPLOMA THESIS

**KRISTIЈAN ČALIĆ
Parent number: 64**

Split, June 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: prof. dr.sc. Tea Bilušić
Komentor:

STABILNOST ANTOCIJANA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) NAKON RAZLIČITIH POSTUPAKA SUŠENJA

Kristijan Čalić, 64

Sažetak: Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) smatra se jednim od najznačajnijih komercijalnih predstavnika roda *Vaccinium*. U Hrvatsku je stigla iz Sjedinjenih Američkih Država i smatra se introduciranom vrstom. Kultivirana borovnica ima dobre nutritivne značajke (dobar sklad makro i mikronutrijenata), ali i senzorske karakteristike (ugodna boja, aroma i okus). Prisutnost biološki aktivnih komponenti, prije svega fenolnih spojeva, daje dodatnu vrijednost ovoj namirnici. S obzirom na brojnost i zdravstveni aspekt, treba istaknuti antocijane kao najbitnije predstavnike fenolnih spojeva prisutnih u kultiviranoj borovnici. U ovom radu ispitan je utjecaj različitih postupaka sušenja: liofilizacija uz postepeno smrzavanje (– 80 °C) i naglo smrzavanje (– 196 °C), vakuum sušenje i konvekcijsko sušenje na stabilnost fenolnih spojeva. Osušeni plodovi kultivirane borovnice samljeveni su uz pomoć mlina s noževima. Ukupni fenoli u svježim i osušanim uzorcima određeni su uz pomoć spektrofotometrijske metode koristeći Folin-Ciocalteu reagens. Analiza fenolnih spojeva iz svježih i osušanih uzoraka urađena je uz pomoć tehnike visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) s fotodiodnim detektorom (DAD). Negativan utjecaj sušenja na polifenole manifestirao se kroz smanjenje sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva prisutnih u plodu kultivirane borovnice. Metoda sušenja liofilizacijom, uz prethodno naglo smrzavanje plodova borovnice u tekućem dušiku pri – 196 °C, izazvala je najmanji gubitak fenolnih spojeva i stoga se smatra najprikladnijom metodom za sušenje, dok je liofilizacija uz postepeno smrzavanje pri – 80 °C ostvarila nešto veće gubitke fenolnih spojeva. Najveće gubitke polifenola pretrpjeli su uzorci podvrgnuti konvekcijskom sušenju.

Ključne riječi: kultivirana borovnica, antocijani, liofilizacija, konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje

Rad sadrži: 60 stranica, 28 slika, 11 tablica, 1 prilog, 70 literaturnih reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Mladenka Šarolić	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Marija Čosić	član/komentor
3. prof. dr.sc. Tea Bilušić	mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Supervisor: Full Professor Tea Bilušić, PhD
Co-supervisor:

IMPACT OF DIFFERENT DRYING METHODS ON THE STABILITY OF ANTHOCYANINS FROM CULTIVATED BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM L.*)

Kristijan Čalić, 64

Abstract: Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) is considered one of the most important commercial representatives of the genus *Vaccinium*. It arrived in Croatia from the United States of America and is considered an introduced species. Cultivated blueberry has good nutritional characteristics (good balance of macro and micronutrients) and sensory characteristics (pleasant color, aroma and taste). The presence of biologically active components, primarily phenolic compounds, gives additional value to this food. Considering the abundance and health aspect, anthocyanins should be highlighted as the most important representatives of phenolic compounds present in cultivated blueberry. In this work, the influence of different drying procedures: freeze-drying with gradual freezing (-80 °C) and flash freezing (-196 °C), vacuum drying and convective drying on the stability of phenolic compounds was examined. The dried fruits of the cultivated blueberry were ground with the help of a knife mill. Total phenolics in fresh and dried samples were determined using the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent. The analysis of phenolic compounds from fresh and dried samples was carried out using the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) with a photo-diode detector (DAD). The negative impact of drying on polyphenols was manifested through a decrease in the content of total and individual phenolic compounds present in the fruit of the cultivated blueberry. The freeze-drying technique, with previous flash freezing of blueberry fruits in liquid nitrogen at -196 °C, caused the least loss of phenolic compounds and is therefore considered the most suitable method for drying, while freeze-drying with gradual freezing at -80 °C achieved slightly higher losses of phenolic compounds. Samples subjected to convection drying had the greatest loss of polyphenols.

Keywords: cultivated blueberry, anthocyanins, freeze-drying, convective drying, vacuum drying

Thesis contains: 60 pages, 28 figures, 11 tables, 1 supplement, 70 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|---------------------------------------|----------------------|
| 1. Mladenka Šarolić, PhD, Asst. Prof. | chair person |
| 2. Marija Čosić, PhD, Assoc. Prof. | member/co-supervisor |
| 3. Full Professor Tea Bilušić, PhD | supervisor |

Defence date: (Employee of Student office fulfill the date after successfully defended thesis)

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr.sc. Tee Bilušić u razdoblju od lipnja 2023. godine do lipnja 2024. godine.

Posebno se zahvaljujem mentorici prof. dr.sc. Tei Bilušić na pomoći, savjetima i uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Zoranu Zoriću s Odjela za ekologiju, agronomiju i akvakulturu Sveučilišta u Zadru na pomoći pri analizama sastava fenolnih spojeva HPLC-DAD metodom.

Zahvaljujem obitelji na iznimnoj podršci tijekom studiranja, kao i prijateljima na lijepim uspomnama.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je:

- a) osušiti plodove kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) koristeći naglo (-196 °C) i postepeno smrzavanje plodova (- 80 °C) prije postupka sušenja liofilizacijom
- b) osušiti plodove kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) koristeći vakuum sušenje i konvekcijsko sušenje
- c) ekstrahirati fenolnu frakciju iz osušenih i svježih plodova kultivirane borovnice
- d) odrediti sastav fenola iz osušenih i svježih plodova kultivirane borovnice koristeći HPLC-DAD tehniku
- e) odrediti udio ukupnih fenola iz osušenih i svježih plodova kultivirane borovnice koristeći spektrofotometrijsku metodu uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa

SAŽETAK

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) smatra se jednim od najznačajnijih komercijalnih predstavnika roda *Vaccinium*. U Hrvatsku je stigla iz Sjedinjenih Američkih Država i smatra se introduciranom vrstom. Kultivirana borovnica ima dobre nutritivne značajke (dobar sklad makro i mikronutrijenata), ali i senzorske karakteristike (ugodna boja, aroma i okus). Prisutnost biološki aktivnih komponenti, prije svega fenolnih spojeva, daje dodatnu vrijednost ovoj namirnici. S obzirom na brojnost i zdravstveni aspekt, treba istaknuti antocijane kao najbitnije predstavnike fenolnih spojeva prisutnih u kultiviranoj borovnici. U ovom radu ispitan je utjecaj različitih postupaka sušenja: liofilizacija uz postepeno smrzavanje ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) i naglo smrzavanje ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), vakuum sušenje i konvekcijsko sušenje na stabilnost fenolnih spojeva. Osušeni plodovi kultivirane borovnice samljeveni su uz pomoć mlina s noževima. Ukupni fenoli u svježim i osušenim uzorcima određeni su uz pomoć spektrofotometrijske metode koristeći Folin-Ciocalteu reagens. Analiza fenolnih spojeva iz svježih i osušenih uzoraka urađena je uz pomoć tehnike visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) s foto-diodnim detektorom (DAD). Negativan utjecaj sušenja na polifenole manifestirao se kroz smanjenje sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva prisutnih u plodu kultivirane borovnice. Metoda sušenja liofilizacijom, uz prethodno naglo smrzavanje plodova borovnice u tekućem dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, izazvala je najmanji gubitak fenolnih spojeva i stoga se smatra najprikladnijom metodom za sušenje, dok je liofilizacija uz postepeno smrzavanje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ostvarila nešto veće gubitke fenolnih spojeva. Najveće gubitke polifenola pretrpjeli su uzorci podvrgnuti konvekcijskom sušenju.

Ključne riječi: kultivirana borovnica, antocijani, liofilizacija, konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje

ABSTRACT

Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is considered one of the most important commercial representatives of the genus *Vaccinium*. It arrived in Croatia from the United States of America and is considered an introduced species. Cultivated blueberry has good nutritional characteristics (good balance of macro and micronutrients) and sensory characteristics (pleasant color, aroma and taste). The presence of biologically active components, primarily phenolic compounds, gives additional value to this food. Considering the abundance and health aspect, anthocyanins should be highlighted as the most important representatives of phenolic compounds present in cultivated blueberry. In this work, the influence of different drying procedures: freeze-drying with gradual freezing (-80 °C) and flash freezing (-196 °C), vacuum drying and convective drying on the stability of phenolic compounds was examined. The dried fruits of the cultivated blueberry were ground with the help of a knife mill. Total phenolics in fresh and dried samples were determined using the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent. The analysis of phenolic compounds from fresh and dried samples was carried out using the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) with a photo-diode detector (DAD). The negative impact of drying on polyphenols was manifested through a decrease in the content of total and individual phenolic compounds present in the fruit of the cultivated blueberry. The freeze-drying technique, with previous flash freezing of blueberry fruits in liquid nitrogen at -196 °C, caused the least loss of phenolic compounds and is therefore considered the most suitable method for drying, while freeze-drying with gradual freezing at -80 °C achieved slightly higher losses of phenolic compounds. Samples subjected to convection drying had the greatest loss of polyphenols.

Keywords: cultivated blueberry, anthocyanins, freeze-drying, convective drying, vacuum drying

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Borovnica (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	2
1.1.1. Botanička svojstva i uzgoj borovnice	3
1.1.2. Sistematika borovnice	5
1.1.3. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost borovnice	7
1.1.4. Povijest uzgoja borovnice	10
1.1.5. Uzgoj borovnice u RH	12
1.2. Fenolni spojevi (polifenoli) iz borovnice	15
1.2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva	17
1.2.2. Sadržaj fenolnih spojeva u svježoj borovnici	18
1.2.3. Antocijani u borovnici	19
1.2.3.1. Stabilnost antocijana iz borovnice	22
1.2.3.1.1. Utjecaj pH vrijednosti	22
1.2.3.1.2. Utjecaj svjetlosti	24
1.2.3.1.3. Utjecaj temperature	24
1.2.3.1.4. Utjecaj kisika i enzima	25
1.2.3.2. Utjecaj antocijana na zdravlje čovjeka	26
1.3. Sušenje i postupci sušenja	27
1.3.1. Konvekcijsko sušenje	28
1.3.2. Vakuum sušenje	29
1.3.3. Liofilizacija	30
2. EKSPERIMENTALNI DIO	35
2.1. Biljni materijal	35
2.2. Sušenje liofilizacijom	35
2.3. Sušenje u vakuum sušioniku	37
2.4. Konvekcijsko sušenje	38
2.5. Određivanje udjela vode i suhe tvari u plovodima kultivirane borovnice	39
2.6. Meljava osušenih plodova borovnice	40
2.7. Postupak ekstrakcije fenola	41
2.8. HPLC-DAD analiza fenolnih spojeva	41
2.9. Određivanje udjela ukupnih fenola	42

3. REZULTATI	44
4. RASPRAVA	47
5. ZAKLJUČCI.....	50
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	51
7. LITERATURA	52
8. PRILOZI.....	58

UVOD

Borovnice pripadaju rodu *Vaccinium*. Iako rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta, u Hrvatskoj su native samo tri vrste (*V. myrtillus* – obična borovnica, *V. vitis-idaea* – brusnica i *V. uliginosum* – močvarna borovnica), dok je *V. corymbosum* (kultivirana borovnica) ‘pridošlica’ s početkom kultiviranja borovnice i uvozom sadnog materijala. Kultivirana borovnica ili američka borovnica u Hrvatsku stigla je iz SAD-a i smatra se introduciranom vrstom. Njezin uzgoj započeo je u SAD-u.

Borovnice su svrstane u skupinu bobičastog voća i predstavljaju dobar izvor antioksidansa, prehrambenih vlakana i mnogih biološki aktivnih spojeva. Borovnica ima dobre nutritivne značajke (dobar sklad makro i mikronutrijenata), ali i senzorske karakteristike (ugodna boja, aroma i okus). Riječ je o niskokaloričnoj namirnici koja je pogodna za zdravo mršavljenje.

Bitnost borovnice kao prehrambene namirnice prepoznali su američki domoroci već u 17. st., o čemu svjedoče pisani tragovi. Gledajući zdravstveni aspekt borovnica, kao glavni spojevi mogu se istaknuti fenolni spojevi zbog njihove izražene antioksidativne i protuupalne aktivnosti. Kod borovnice od polifenolnih spojeva treba istaknuti antocijane kao najznačajne predstavnike skupine biološki aktivnih spojeva s obzirom na brojnost i do sada otkrivene povoljne učinke na zdravlje čovjeka. Zbog svega navedenog borovnica uživa sve veću primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Budući su čuvanje, transport pa i neki postupci prerade bobičastog voća delikatni po njihovu nutritivnu vrijednost jer je bobičasto voće osjetljiva i lako kvarljiva sirovina, primjena postupaka sušenja smatra se dobrim odabirom u cilju očuvanja nutritivne vrijednosti sirovine i produljenja njezinog roka trajnosti.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih postupaka sušenja: liofilizacija uz postepeno smrzavanje (– 80 °C) i naglo smrzavanje (- 196 °C), vakuum sušenje i konvekcijsko sušenje na fenolni sastav i sadržaj fenolnih spojeva ploda kultivirane borovnice.

1. OPĆI DIO

1.1. Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.)

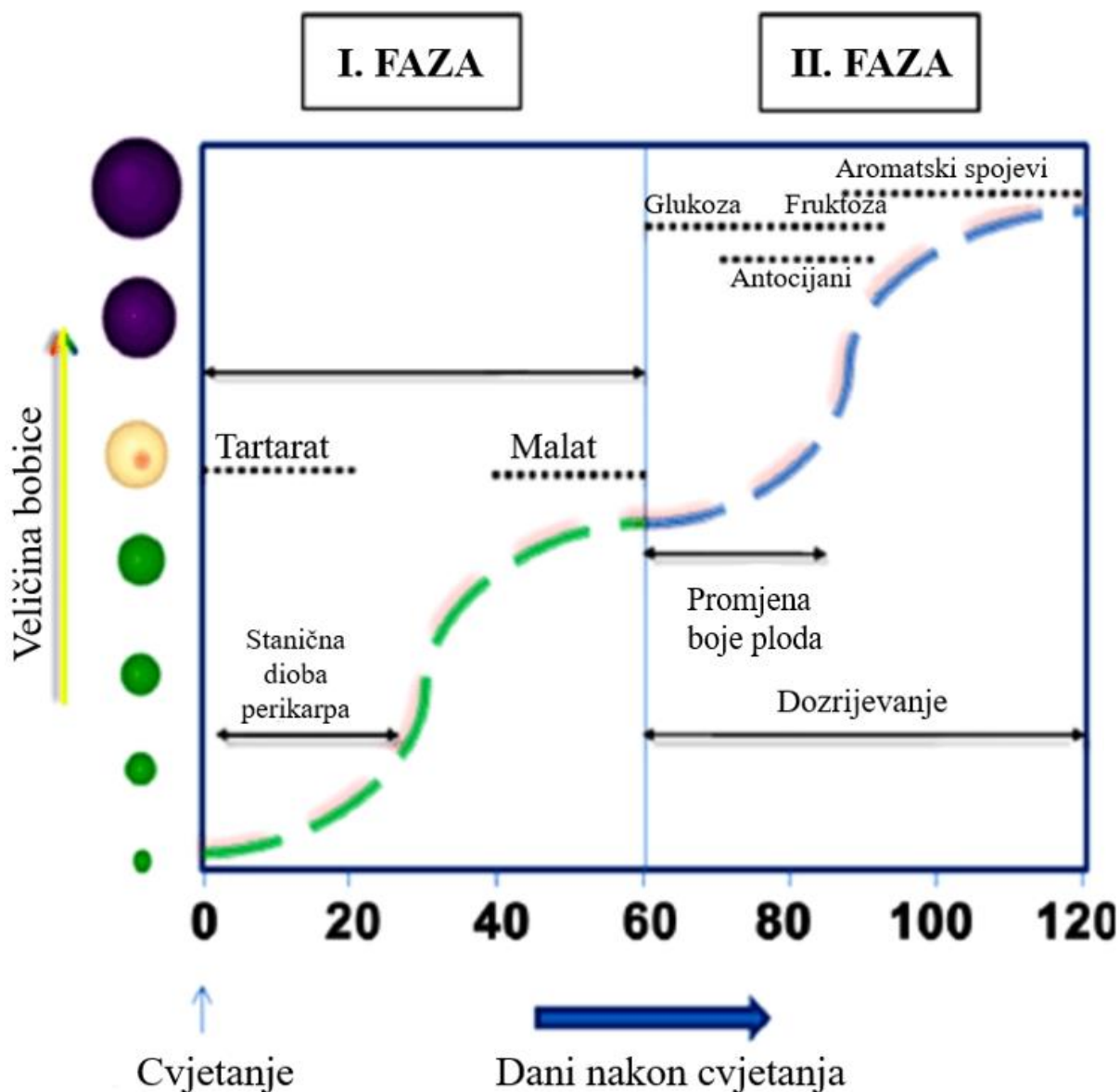
Borovnica (*Vaccinium*) je rod listopadnih grmova iz porodice crnjuša (*Ericaceae*). Rodu *Vaccinium* pripadaju i borovnice, ali i brojne druge srodne divlje vrste. Pripadnike ovog roda uglavnom možemo pronaći u tropskim krajevima većih nadmorskih visina, ali i u umjerenim i borealnim područjima. Iako rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta (oko 400), u Hrvatskoj su nativne samo tri vrste (*V. myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L. i *V. uliginosum* L.), dok je kultivirana borovnica *V. corymbosum* (Slika 1.) uvezena iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) 1964. godine. Kultivirana borovnica još se naziva i američka borovnica budući da je njezin uzgoj započeo u SAD-u 1893. godine.¹⁻⁶



Slika 1. *Vaccinium corymbosum* L.⁷

1.1.1. Botanička svojstva i uzgoj borovnice

Višegodišnja grmolika biljka, razgranatog korijena i stabljike. Pripada skupini trajnica. Grm naraste između 10 i 60 cm, a ponekad dosegne i 90 cm visine. Listovi su zelene boje, dok je plod tamnoplava mesnata bobica s ostacima čaške na vrhu. Mezokarp (mesnati – najveći dio ploda) sadrži sjemenke. Pokožica bobice prekrivena je voštanim kutikulom. Cvjetovi mogu biti bijele i ružičaste boje. Cvatnja se javlja u rano proljeće, a nakon oprašivanja plod borovnice se razvija i prati dvosigmoidnu krivulju rasta (Slika 2). Razvoj ploda možemo podijeliti na nekoliko faza: nezrelo zelena, prozirno zelenkasto bijela, zelenkasto ružičasta, plavo-crvena i plava faza. Plodovima je potrebno između 40 i 60 dana za dozrijevanje. Borovnice predstavljaju usjeve visoke vrijednosti. One mogu uspijevati na kiselim polupropusnim tlima koja su se prije smatrala bezvrijednima. Najbolje uspijevaju na kiselim, organski bogatim, srednje vlažnim i dobro propusnim tlima koja su izložena suncu ili se nalaze u polusjeni. Borovnice preferiraju umjerenu količinu vode i tlo čija je pH vrijednost manja od 6,8 (idealno 4,8-5,2). Tolerancija borovnica prema CaCO_3 je mala. Visoko grmolika borovnica bere se mehaničkim putem. Sjeverna visoko grmolika borovnica podnosi temperature i ispod $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Ako je prekrivena snijegom može podnijeti i niže temperature. Južna visoko grmolika borovnica ne podnosi rado temperature ispod $0\text{ }^\circ\text{C}$. Kod nekih sorata pupovi su otporni na temperature i do $-35\text{ }^\circ\text{C}$. Zanimljivo je da je otpornost na mraz povezana s nastankom bjelančevina u pupovima koje nazivamo dehidrin proteinima. Ovi proteini nastaju i za vrijeme suša i služe kao 'biomarkeri' za toleranciju na stres. Kada je u pitanju suša, borovnica je jako osjetljiva stoga joj treba osigurati dovoljno vlage kako bi se izbjegle štete kao što su kržljiv rast, slabiji urod i u konačnici sušenje grmova. Borovnice zahtijevaju količinu padalina tijekom godine od 600-1000 mm. Tradicionalno se borovnice razmnožavaju vegetativno, što osigurava genetske karakteristike kakve uzgajivači žele i brzo se postiže plodonosno stanje. Borovnice su jako privlačne pticama, što zbog izgleda, što zbog nutritivnog sastava, i stoga je potrebno usjeve zaštititi primjenom mreža i drugih agrotehničkih mjera. Kloroza (uzročnik žućenja listova) može se pojaviti u alkalnim tlima čija je pH vrijednost visoka. Bolesti i problemi kojima borovnica može biti izložena su: palež stabljike, trulež korijena, antraknoza, rak trske, botritis i mumija bobica. Plod borovnice također mogu napasti štetnici: crv borovnice, crv trešnje i pjegava drozofila.^{1-6,8,9}



Slika 2. Dvosigmoidna krivulja rasta¹⁰

Borovnice se mogu konzumirati u sirovom, osušenom i kuhanom obliku, mogu se želirati ili na neke druge načine preraditi. Koriste se za proizvodnju džemova, pita, sirupa, sokova, bezalkoholnih pića, vina itd. Borovnice su jako dobro prihvaćene na svjetskom tržištu, ponajviše zbog prisustva antioksidansa i bioloških aktivnosti poput protuupalnog djelovanja. Komercijalno su na tržištu prisutna dva tipa: divlja (niska grmolika) i kultivirana (visoko grmolika) borovnica. SAD je najveći svjetski proizvođač kultivirane borovnice.¹⁻⁶

1.1.2. Sistematika borovnice

Smatra se da u svijetu postoji oko 400 vrsta roda *Vaccinium* L.

Svojim značajem ističe se pet sljedećih vrsta borovnice:

1. *Vaccinium corymbosum* L. (sjeverna visokogrmolika borovnica) – Slika 3.
2. *V. australe* Small (jugoistočna visokogrmolika borovnica) – Slika 4.
3. *V. angustifolium* Aiton (niskogrmolika borovnica) - Slika 5.
4. *Vaccinium myrtilloides* Michaux (kanadska gorka niskogrmolika borovnica) – Slika 6.
5. *V. ashei* Reade (borovnica „zečje oko“) - Slika 7.¹¹

Sjeverna visokogrmolika borovnica zauzima sljedeće mjesto u sistematici biljaka:

Carstvo: *Plantae* - Biljke

Odjeljak: *Magnoliophyta* - Kritosjemjenjače

Razred: *Magnoliopsida* - Dvosupnice

Red: *Ericales* - Vrjesolike

Porodica: *Ericaceae* - Vrjesovke

Rod: *Vaccinium* - Borovnica

Vrsta: *Vaccinium corymbosum* L. – Sjeverna visokogrmolika borovnica^{6,12}



Slika 3. *Vaccinium corymbosum* L. (sjeverna visokogrmolika borovnica)¹³



Slika 4. *V. australe* Small (jugoistočna visokogrmolika borovnica)¹⁴



Slika 5. *V. angustifolium* Aiton (niskogrmolika borovnica)¹⁵



Slika 6. *Vaccinium myrtilloides* Michaux (kanadska gorka niskogrmolika borovnica)¹⁶



Slika 7. *V. ashei* Reade (borovnica „zečje oko“)¹⁷

1.1.3. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost borovnice

Kemijski sastav ploda svježe borovnice prikazan je u Tablici 1. Može se zaključiti da je riječ o niskokaloričnoj namirnici u čijem sastavu dominira prije svega voda s udjelom od blizu 85 %, a zatim ugljikohidrati koji su zastupljeni s 14,5 % u plodu svježe borovnice.

Nizak sadržaj šećera (Tablica 2.), u usporedbi s drugim voćem, omogućava ovoj namirnici da ima nizak glikemijski indeks, a i samim tim je čini jako pogodnom za konzumaciju od strane dijabetičara. Istraživanja su pokazala da organski kultivirana borovnica ima veći sadržaj glukoze i fruktoze u odnosu na tradicionalno uzgojenu. Od vlakana prisutnih u plodu zrele borovnice treba istaknuti polisaharide celulozu, hemicelulozu i pektin te lignin. Ovi spojevi se većinom nalaze u staničnoj stijenci.

Nadalje, svježa borovnica kao dobar izvor prehrambenih vlakana važna je u prehrani jer vlakna izazivaju osjećaj sitosti i smanjuju rizik od nekih crijevnih bolesti. Organske i fenolne kiseline daju plodu borovnice gorčinu i oporost. Organske kiseline pomažu kod stabilizacije askorbinske kiseline i važne su za boju ploda (stabiliziraju antocijane). Jabučna i limunska kiselina su glavne organske kiseline prisutne u borovnici. Što se tiče hlapljivih spojeva, u plodu borovnice zastupljeni su: esteri, alkoholi, hlapljive organske kiseline, aldehidi i ketoni. Polifenol oksidaza i peroksidaza su enzimi čija se aktivnost mijenja s procesom dozrijevanja ploda borovnice. Lipidi su važan dio stanične membrane. Oni ulaze u sastav voštanog sloja prisutnog na površini ploda i doprinose plavoj boji borovnice. Svježa borovnica također je dobar izvor mikronutrijenata (minerala i vitamina).¹⁸

Sadržaj minerala ploda svježe borovnice prikazan je u Tablici 3. i prema njoj u borovnici dominiraju kalij, fosfor, kalcij i magnezij. U sastavu vitamina (Tablica 4.) od vodotopivih vitamina zastupljeni su vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamini B kompleksa. Od vitamina topivih u mastima značajniji udio zauzima vitamin E.

Tablica 1. Kemijski sastav ploda svježe borovnice na 100 g¹⁹

Energija /kcal	57
Energija /kj	240
Voda /g	84,2
Ugljikohidrati /g	14,5
Proteini /g	0,74
Lipidi /g	0,32
Pepeo /g	0,24

Tablica 2. Ugljikohidrati ploda svježe borovnice na 100 g¹⁹

Fruktoza /g	4,97
Glukoza /g	4,88
Prehrambena vlakna /g	2,4
Sukroza /g	0,11
Škrob /g	0,03

Tablica 3. Minerali ploda sježe borovnice na 100 g¹⁹

Kalij (K) /mg	77
Fosfor (P) /mg	12
Kalcij (Ca) /mg	6
Magnezij (Mg) /mg	6
Natrij (Na) /mg	1
Mangan (Mn) /mg	0,336
Željezo (Fe) /mg	0,28
Cink (Zn) /mg	0,16
Bakar (Cu) /mg	0,057
Selen (Se) /μg	0,1

Tablica 4. Vitamini ploda svježe borovnice na 100 g¹⁹

Askorbinska kiselina (C) /mg	9,7
Alfa-tokoferol (E) /mg	0,570
Niacin (B ₃) /mg	0,418
Pantotenska kiselina (B ₅) /mg	0,124
Piridoksin (B ₆) /mg	0,052
Riboflavin (B ₂) /mg	0,041
Tiamin (B ₁) /mg	0,037

1.1.4. Povijest uzgoja borovnice

Američki domoroci su borovnicu i prije komercijalnog uzgoja smatrali jako korisnom i bitnom biljnom vrstom. Jedan od glavnih razloga tome bio je njezin pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. Borovnicu su upotrebljavali u svježem i suhom/konzerviranom obliku. Suhe bobice borovnice su koristili za razna jela (varivo, juha i sl.) te kod pripreme jela na bazi mesa. Jedno od poznatijih jela iz tog vremena bio je puding pod nazivom „Sautauthig“ koji se sastojao od borovnice, mesa, vode, meda i kukuruznog brašna. Osušene listove borovnice koristili su za proizvodnju čaja koji je dobro djelovao na krvnu sliku čovjeka. Za domorodačku uporabu borovnice doznalo se već na početku 17. stoljeća kada ju je prvi put zapisao i primijetio Samuel de Champlain – osnivač Quebeca. Na slici 9. nalazi se ilustrirani prikaz borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.).²⁰



Slika 8. Ilustrirani prikaz borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)²⁰

Neki autori smatraju da su se vrste roda *Vaccinium* započele sakupljati i uzgajati već krajem 18. stoljeća u Engleskoj. Tada su najviše bile korištene u dekorativne svrhe u vrtovima radi svojih ukrasnih cvjetova. U to vrijeme nisu postojale detaljne informacije i saznanja o optimalnim uvjetima za kultivaciju borovnice stoga su borovnice bile sađene u lužnato tlo te su bile gnojene stajskim gnojivom, što se protivi dobrim uvjetima za rast i razvoj borovnice.²¹ Prvi doseljenici nisu pretjerano cijenili borovnice zbog njihovog kiselog okusa koji je karakterističan za divlje bobičasto voće. Popularnost borovnice porasla je nakon razvoja

mesnatih i sočnih sorata. Značajan uzgoj borovnice zabilježen je 1893. god. u SAD-u gdje se i dan danas mogu pronaći velike površine prekrivene nasadama borovnica.²²

Vremenom je borovnica postala važan izvor hrane. Tijekom građanskog rata počinje velika uporaba pića na bazi borovnice. Početak ozbiljnije prerade počinje 1880. godine osnivanjem industrije u konzerviranju borovnice na sjeveroistoku SAD-a. Prijelomna godina za uzgoj borovnice bila je 1916. Upravo te godine Elizabeth Coleman White je proizvela prvu komercijalnu sortu borovnice. Prije te godine uzgajala se samo divlja borovnica koja je nedostižna kako prema kvaliteti tako i prema kvantiteti u usporedbi s kultiviranim sortama. Suradnik joj je bio botaničar Frederick A. Coville. Elizabeth Coleman White se godine 1911. udružila s botaničarom Frederickom Covilleom s ciljem identificiranja divljih borovnica s najboljim karakteristikama, nakon čega iste križaju i dobivaju 4 prve komercijalne sorte borovnice. Prva berba tih sorata dogodila se 1916. godine u New Jerseyu.

Botaničar Frederick Coville je 1908.g. ukazao na nisku pH vrijednost zemljišta (pH 4,5-4,8) kao pogodnu za uzgoj borovnice. Osim toga, ukazao je još i na samoneoplodnost borovnice i potrebu za sortama oprašivačima u uzgoju. Godine 1911. Coville je uspješno križao dvije vrste divlje borovnice superiornih karakteristika, jednu visokogrmoliku, a drugu niskogrmoliku te ih nazvao Brooks i Russel. Križanja su se nastavila te su bila uspješna što govori podatak da je između 1911.g. i 1913.g. proizveo 3000 hibrida. Godine 1916. Elizabeth i Frederick zajedno započinju berbu i prodaju visoko grmolike borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) SAD 1917. godine započinje s pakiranjem borovnice u ambalažu.^{3,5,23}

Komercijalna proizvodnja borovnice doživljava vrhunac u periodu 1995.-2005. godine, a glavni razlog tome je razvoj novih i otpornijih sorata borovnice. Glavni svjetski proizvođači borovnice su: SAD, Kanada, Peru, Čile, Španjolska i Portugal.²⁴

1.1.5. Uzgoj borovnice u RH

Iako rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj vrsta, u Hrvatskoj su native samo tri vrste (*V. myrtillus*, *V. vitis-idaea* i *V. uliginosum*), dok je *V. corymbosum* 'pridošlica' s početkom kultiviranja borovnice i uvozom sadnog materijala.²⁵ Pripadnici roda *Vaccinium* pronađeni su na kiselim tlima, lake strukture, koja mogu biti pjeskovita, treset i na organskom tlu. Vrste roda *Vaccinium* možemo pronaći i u tropskim krajevima, umjerenim i hladnim krajevima. Pojavljuju se u svijetlim šumama, rubovima šuma, krčevinama i čistinama gdje imaju dovoljno svjetlosti za rast.²⁶

U Hrvatskoj je svakako najraširenija vrsta *V. myrtillus* (borovnica) koju se kao sezonsko šumsko voće još uvijek može naći na našim tržnicama, dok je u narodu, prije relativno nepoznata *V. vitis-idaea* (brusnica) posljednjih godina postala zanimljiva zbog njezinih povoljnih učinaka na zdravlje i velike razvikanosti od strane farmaceutske industrije.

Autohtone vrste roda *Vaccinium* su diploidi sa somatskim brojem kromosoma ($2n=24$), no međutim kod kultiviranih vrsta pojavljuju se tetraploidi i heksaploidi pa se u skladu s time pojavljuju čak i novi nazivi vrsta.

Hrvatska je podijeljena na regije prema Državnoj upravi za zaštitu prirode i okoliša, a to su: sredozemna, gorska i nizinska (Slika 9.).²⁵



Slika 9. Karta Hrvatske s označenim glavnim regijama s obzirom na obilježja klime i reljefa (1- nizinska Hrvatske, 2 – gorska Hrvatska, 3 – sredozemna Hrvatska)²⁵

U prirodnim uvjetima borovnica u Republici Hrvatskoj uglavnom raste u nizinskoj i gorskoj Hrvatskoj u crnogoričnim i bjelogoričnim šumama. Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum*), popularnog naziva američka borovnica, pogodna je za uzgoj u različitim uvjetima uz zadovoljavanje njenih osnovnih potreba. Neke od najpoznatijih vrsta borovnice koje uspijevaju u Republici Hrvatskoj, a koje imamo zasađene su Duke, Blue crop, Chandler, Spartan i mnoge druge. Kultivirana borovnica nije niti malo jednostavna za uzgoj te plantaža borovnice iziskuje znatne napore i zavidna znanja u uzgoju ove biljke, a isto tako i znatna financijska sredstva.²⁷

Na slici 10. prikazan je popis vrsti roda *Vaccinium* zastupljenih u tri geografsko-klimatska područja (nizinska, gorska, sredozemna) Hrvatske.²⁵

Br.	VRSTA	Područja														
		sredozemna Hrvatska	gorska Hrvatska	nizinska Hrvatska	Dinara	Gorski kotar	Ogulin	Plitvice	Velebit	Strahinica	Samborsko gorje	Žumberak	Medvednica	Zagreb i Zagrebacka županija	Hrvatsko zagorje	Papuk
1	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.		+	+		+							+			
2	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
3	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.		+			+	+									
4	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.		+	+		+			+			+	+			

Slika 10. Popis vrsti roda *Vaccinium* zastupljenih u tri geografsko-klimatska područja (nizinska, gorska, sredozemna) Hrvatske²⁵

Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju u sustavu potpora u Republici Hrvatskoj posjedujemo oko 213 hektara američke borovnice i nešto manje od 72 hektara sibirске borovnice. Iako je broj površina pod borovnicom u porastu još uvijek to nije na dovoljnoj razini. Iz ovoga možemo zaključiti da uzgoj borovnice nije prepoznat kao ozbiljna proizvodnja nego više kao hobi djelatnost.

Iz dostupnih podataka Agencije za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju prikazan je razvoj broja nasada odnosno ukupno zasađenih hektara američke i sibirске borovnice za razdoblje od 2015. do 2019. godine (Tablica 5.).²⁷

Tablica 5. Pregled ukupne proizvodnje borovnice u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2015. do 2019. godine²⁷

Godina	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.
Ukupno hektara	71,41	116,69	173,51	284,32	287,88

Borovnica je najviše zastupljena u zapadnoj i sjeverozapadnoj Hrvatskoj gdje se nalazi većina plantaža američke i sibirske borovnice i uglavnom je plasman iste na tržnicama te prodajom na kućnom pragu.

Na slici 11. prikazana je karta Republike Hrvatske s prikazom broja hektara zastupljenosti nasada borovnice po županijama u 2019. godini.²⁷



Slika 11. Karta Republike Hrvatske s prikazom broja hektara zastupljenosti nasada borovnice po županijama u 2019. godini²⁷

U Republici Hrvatskoj zaostaje proizvodnja borovnice u odnosu na zemlje Europe te ista ne zadovoljava potrebe naših potrošača za borovnicom. Trend potrošnje pak pokazuje porast u potrošnji zbog sve veće informiranosti javnosti o samim zdravstvenim benefitima borovnice i njezinim antioksidativnim svojstvima.²⁸

1.2. Fenolni spojevi (polifenoli) iz borovnice

Postoji preko 200 000 kemijskih spojeva koji su izolirani i/ili identificirani iz viših biljaka diljem svijeta. Ovi kemijski spojevi dijele se u dvije osnovne skupine: primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti neophodni su rast, razvoj i održavanje stanice, a tu spadaju masne kiseline, proteini, ugljikohidrati i nukleinske kiseline. Sekundarni metaboliti nisu manje važni od primarnih, iako ne sudjeluju izravno u fotosintetskom ili respiratornom metabolizmu. Ovi spojevi pružaju obranu biljci i nužni su za njeno preživljavanje pogotovo u stresnim situacijama. Sekundarni metaboliti klasificirani su prema njihovim biosintetskim putovima i strukturi na:

- 1) flavonoide, srodne fenole i polifenolne spojeve,
- 2) terpenoide i
- 3) alkaloidne koji sadrže dušik i spojeve koji sadrže sumpor.

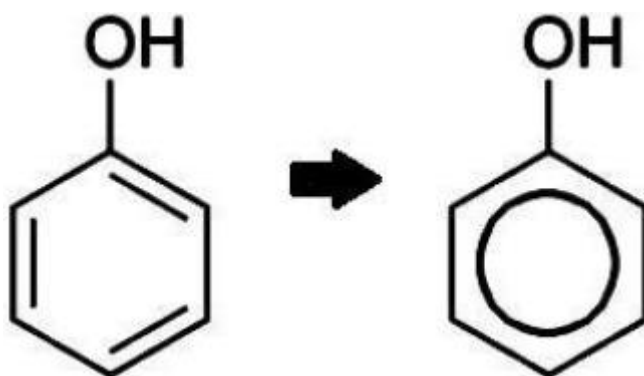
Fenolni spojevi ili polifenoli su prirodni biološki aktivni spojevi. Nastaju procesom sekundarnog biljnog metabolizma u biljkama. Proces biosinteze fenolnih spojeva u biljkama prikazan je na slici 12. Ne spadaju u skupinu esencijalnih nutrijenata poput vitamina i stoga njihov unos nije nužan. Ipak, redovno unošenje ovih spojeva organizam, u brojnim studijama, pokazalo se jako korisnim sa zdravstvenog aspekta. U ljudskoj prehrani zastupljeno je šest glavnih skupina fenolnih spojeva: klorogene i fenolne kiseline, flavoni i flavanoli, katehini, izoflavoni, i lignani. Ekološki čimbenici, svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja i obrade mogu utjecati na sastav i koncentraciju polifenola u biljkama. Sadržaj nekih polifenola može se povećati u uvjetima stresa, UV zračenja, patogenih stanja, ozljede, zagađenja zraka i u ekstremnim uvjetima. Fenolni spojevi podložni su brojnim metaboličkim reakcijama: oksidacija, hidroliza i kondenzacija u crijevima. Na biodostupnost i bioraspoloživost polifenola u organizmu utječe sastav i raznovrsnost crijevne mikroflore. Slično kao i endogeni hvatači radikala (npr. glutation), polifenoli doniraju jedan od svojih elektrona ROS-u (slobodni radikali na bazi kisika), što dovodi do neutralizacije slobodnih radikala. Fenolni spojevi, osim što djeluju kao izravni antioksidansi, mogu djelovati i kao neizravni antioksidansi. Polifenoli mogu potaknuti aktivnost antioksidativnih enzima poput glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze. Osim antioksidativnih svojstava, fenolni spojevi pokazuju i bitna biološka i farmakološka svojstva poput: antitumorskog, antikancerogenog, antimikrobnog, antialergijskog, antiviralnog djelovanja. Također mogu jetri pružiti zaštitnu funkciju i djelovati kao signalne molekule. Kod biljaka je većina polifenola kemijski vezana za šećere, tj. glikolizirani su.^{4,29-31}



Slika 12. Biosinteza fenolnih spojeva u biljkama³⁰

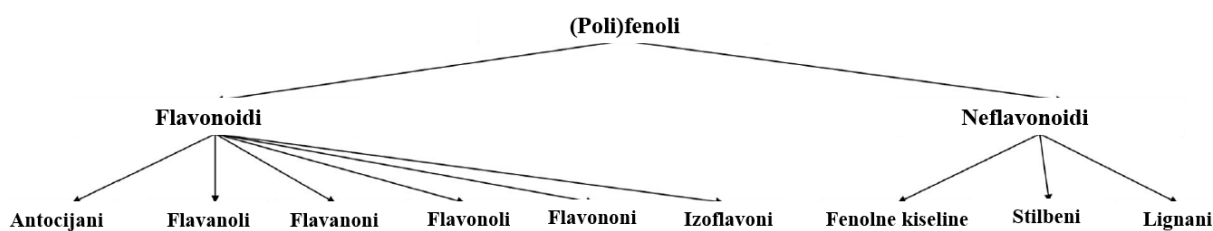
1.2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

Danas je poznato preko 8000 fenolnih spojeva. Podjela polifenola je složena kao i njihova struktura. Struktura fenolnih spojeva se sastoji od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatski ugljikovodik. Najjednostavniji takav spoj je fenol (C_6H_5OH) (Slika 13.), a mogu se kretati od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva.^{4,31}



Slika 13. Struktura fenola³¹

Fenolni spojevi mogu se svrstati u dvije osnovne skupine: neflavonoide i flavonoide. U neflavonoide spadaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani, dok flavonoidima pripadaju: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijani. Detaljnija klasifikacija polifenola prikazana je na slici 14.³²



Slika 14. Klasifikacija polifenola³²

1.2.2. Sadržaj fenolnih spojeva u svježoj borovnici

Sadržaj fenolnih spojeva dobiven primjenom HPLC-DAD tehnike prikazan je na slici 6.

Tablica 6. Sadržaj fenolnih spojeva u plodu svježe borovnice

Skupina spojeva	mg/L
Kolorgenska kiselina	1,56
Ukupno kiselina:	2,58
Kvercetin-glukozid	87,50
Kvercetin-rutinozid	12,36
Kvercetin-arabinozid	16,76
Kemferol-glukozid	7,38
Kemferol-rutinozid	6,09
Ukupno flavonol glukozidi:	130,08
Delfinidin-3-galaktozid	78,20
Delfinidin-3-glukozid	24,07
Cijanidin-3-galaktozid	7,44
Delfinidin-3-arabinozid	48,19
Petunidin-3-galaktozid	38,34
Petunidin-3-glukozid	20,80
Cijanidin-3-glukozid	4,41
Peonidin-3-glukozid	18,94
Malvidin-3-galaktozid	91,96
Malvidin-3-glukozid	38,74
Malvidin-3-arabinozid	57,65
Ukupno antocijani:	428,49

1.2.3. Antocijani u borovnici

Glavni predstavnici vodotopivih biljnih pigmenata su antocijani i oni pripadaju skupini flavonoidnih fenolnih spojeva. Riječ antocijan nastala je spajanjem dvije grčke riječi: *antho* (grč. cvijet) i *kyanos* (grč. plava boja). Termin „antocijan“ prvi put je upotrijebio njemački farmaceut Ludwig Clamor Marquart 1835. godine. Temeljna kemijska svojstva antocijana i flavona proučavana su u 19. stoljeću od strane Stanislausa von Kostaneckog i Richarda Willsättera. Do sada je u prirodi identificirano više od 630 antocijana.

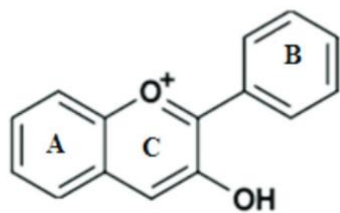
Antocijani nastaju procesom sekundarnog biljnog metabolizma. Smatraju se prirodnim antioksidansima zbog svoje sposobnosti da doniraju protone visoko reaktivnim slobodnim radikalima. Mogu se pronaći u staničnim vakuolama i u obliku glikozida. Antocijani su zaslužni za boju velikog broja biljaka i dovode se u vezu s brojnim biološkim aktivnostima (antioksidacijska, antitumorska i protuupalna aktivnost, regulacija lipida u krvi, poboljšanje otpornosti na inzulin i anti-mutacija). Zbog ovih potencijalnih bioloških funkcija antocijana, provedena su mnogobrojna istraživanja o raznim biljnim antocijanima koji se mogu koristiti kao prehrambeni pigmenti i funkcionalna hrana. Također, smatra se da antocijani imaju važnu ulogu kod propagacije, zaštite i fiziologije biljaka. Novi dokazi upućuju na to da ovi spojevi mogu odbiti prirodni neprijatelj biljke, privući oprašivače i raspršivače sjemena, ali i zaštititi biljku od biotskih i abiotskih stresova. Antocijane najlakše možemo pronaći u ljubičastom, crvenom i plavom malom voću, jer kod njega antocijani čine glavninu polifenola. Ovisno o izvoru, najveće količine antocijana prisutne su u mezokarpu i pokožici ploda. Nekoliko studija pokazalo je obrnuto proporcionalan odnos veličine ploda i količine pronađenih antocijana u istom (manji plod = više antocijana i obratno).

Antocijanidini su vrlo nestabilni i rijetko se nalaze u slobodnom obliku u biljnim tkivima. Uglavnom se pojavljuju u glikoliziranom obliku kao antocijani. Struktura antocijanidina i antocijana prikazana je na slici 15. Na slici 15. (A) prikazan je aromatski prsten koji je povezan s jednim heterocikličkim prstenom (C); (C) prsten povezan je s aromatskim prstenom (B) putem C-C veze i na sebi ima vezan pozitivno nabijeni kisik i hidroksilnu (OH) skupinu. Šećerna skupina prisutna kod antocijana povećava stabilnost i topljivost spoja u vodi. Acilacija smanjuje topljivost antocijana u vodi, dok glikolizacija djeluje obratno. Antocijani su stabilniji pri nižim pH vrijednostima, odnosno u kiselijim uvjetima. Boja i stabilnost cijanidina pri različitim pH vrijednostima prikazana je na slici 16. Antocijani su djelomično polarne molekule. Pozitivno nabijeni atom kisika pojačava polarni karakter molekule i njenu topljivost u vodi. Za ekstrakciju antocijana, do neke razine, koriste se polarna otapala poput: vode, metanola, etanola i acetona. Nadalje, antocijani mogu graditi komplekse s metalnim kationima,

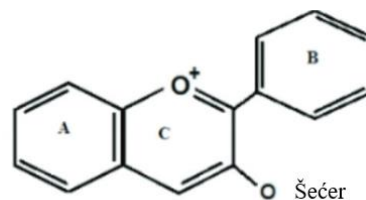
no još uvijek nije jasno utječe li kelacija na boju voća. Zbog raznolikosti aminoglikozida i acilacije s alifatskim kiselinama kao što su malonska i octena kiselina, mnogi antocijani identificirani su u različitim skupinama borovnica.

Glavni doprinos boji borovnice dolazi od strane antocijana. Boja može varirati od jarko crvene do ljubičaste/plave, ovisno o tome koja skupina elektron donora (metoksi ili hidroksil) je vezana na aglikon (antocijanidini). Antocijani se koriste kao prirodna bojila za hranu. U borovnicama je prisutno pet vrsta antocijanidina: delphinidin, malvidin, petunidin, peonidin i cijanidin. Najveća koncentracija antocijana nalazi se u pokožici ploda borovnice. Neki prirodni izvori antocijana su: borovnice, kupine, maline, višnje, brusnice, jagode, dud, nar, grožđe, jabuke, breskve, crveni kupus, patlidžan, crveni luk, slatki krumpir, rotkvice i repa, grah, soja, ječam, kukuruz, riža i dr.

Biodostupnost može se definirati kao udio nutrijenta koji se oslobađa iz matrice hrane tijekom probave, prenosi se u micelle i time postaje dostupan za apsorpciju od strane sluznice crijeva. Na biodostupnost antocijana, a time i na bioraspoloživost, utječe niz čimbenika uključujući fizikalno-kemijska svojstva, matrica hrane, prisutnost promotora i inhibitora apsorpcije antocijana i stupanj prerađenosti hrane. Za razliku od flavonoida gdje su glikozidi hidrolizirani, antocijanski glikozidi se brzo i učinkovito apsorbiraju u tankom crijevu. Nadalje, antocijani se brzo metaboliziraju i dopijevaju u cirkulaciju. Crijevno tkivo i mikroflora potiču apsorpciju antocijana u organizmu. Antocijani se izlučuju iz organizma putem žuči ili urina kao očuvani/intaktni i metabolizirani oblici.^{18,33-37}

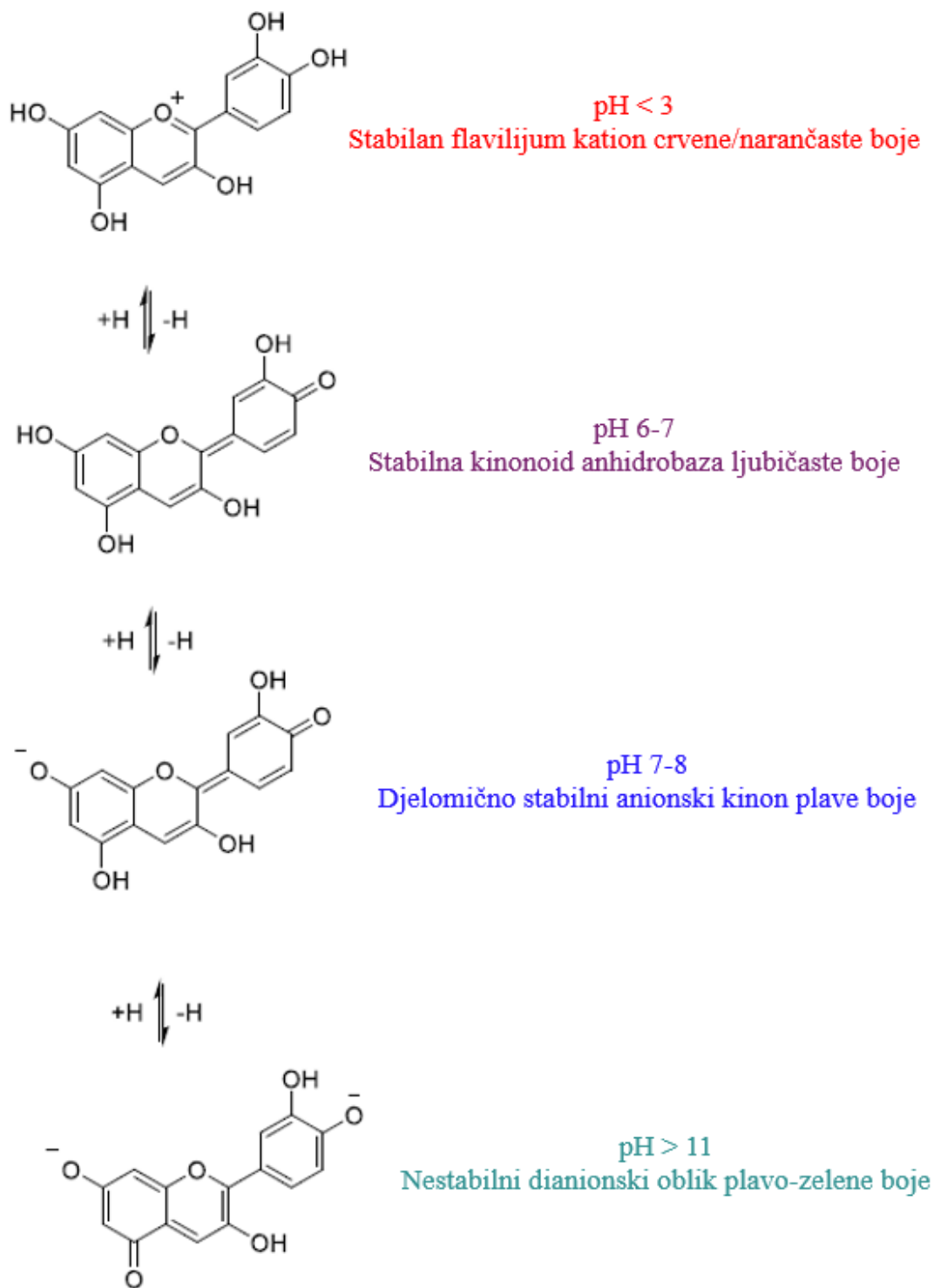


Struktura antocijanidina



Struktura antocijana

Slika 15. Prikaz strukture antocijanidina i antocijana³⁶



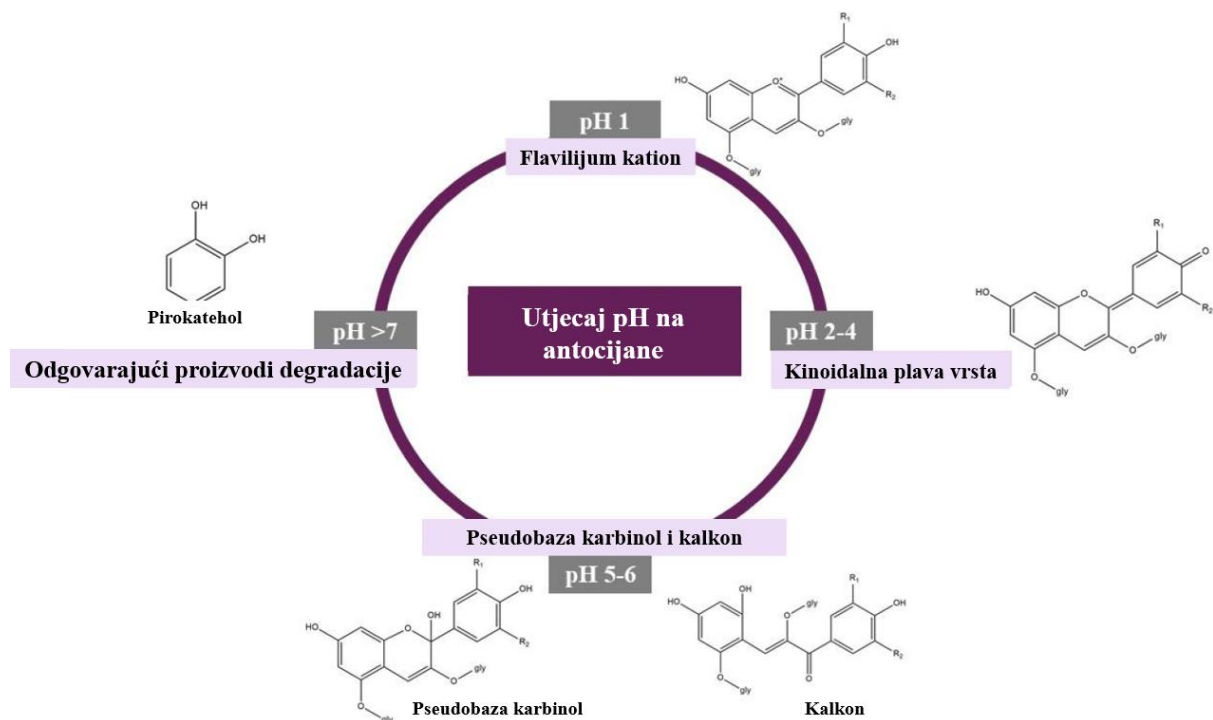
Slika 16. Boja i stabilnost cijanidina pri različitim pH vrijednostima³⁷

1.2.3.1. Stabilnost antocijana iz borovnice

Stabilnost antocijana u matrici hrane ovisi o brojnim čimbenicima. Od čimbenika vrijedi istaknuti utjecaj kemijske strukture, pH, svjetla, temperature, kisika i enzima na stabilnost antocijana. Temperatura se smatra jednim od glavnih čimbenika koji utječu na stabilnost antocijana. Antocijani pokazuju veću stabilnost u kiselim nego u alkalnim medijima. Izolirani antocijani su vrlo nestabilni i podložni degradaciji. Većina antocijana vrlo je stabilna u prirodnim biokemijskim uvjetima biljnog tkiva. Ovaj fenomen sugerira da se antocijani mogu stabilizirati pomoću nekih sredstava. Antocijani imaju široku upotrebu u prehrambenoj industriji. Koriste se kao zamjena za sintetski dobivene pigmente i antioksidanse. Glavni čimbenici koji utječu na upotrebu antocijana u prehrambenoj industriji su boja i stabilnost antocijana. Stabilnost antocijana usko je povezana s njihovom kemijskom strukturom (broj, vrsta i način vezivanja liganada). Općenito govoreći, stabilnost antocijana opada s porastom stupnja hidroksilacije glikozidnih liganada. Povećanje stupnja metoksidacije povećava stabilnost antocijana, dok glikolizacija slobodnih hidroksilnih skupina također povećava njihovu stabilnost.^{33,34}

1.2.3.1.1. Utjecaj pH vrijednosti

Antocijani se javljaju u četiri različita kemijska oblika koja ovise o pH medija/otopine. U kiselom području pri pH = 1, antocijani se nalaze u obliku flavilij kationa (crvena boja) što ih čini vrlo topivim u vodi. Ovaj oblik je također zaslužan za proizvodnju crvene i ljubičaste boje. U pH rasponu 2-4, plava kinoidna vrsta prisutna je u izobilju, dok se pri pH 5-6 javljaju bezbojni spojevi karbinol pseudobaza i kalkon. Pri pH iznad 7, antocijani će se degradirati u spojeve ovisno o supstitucijskim skupinama. (Slika 17.) Navedena četiri oblika antocijana mogu istovremeno postojati u pH rasponu 4-6. Njihovu ravnotežu održava prisutnost flavilij kationa.^{34,38}



Slika 17. Antocijani pri različitim pH vrijednostima³⁸

U tablici 7. prikazana je ovisnost pigmenta i strukture antocijana o pH vrijednosti

Tablica 7. Ovisnost pigmenta i strukture antocijana o pH vrijednosti³⁹

pH	Struktura i pigment antocijana
< 2	antocijan kation (flavilij kation), crveni pigment
2 - 4,5	kation + leukobaza, crveni pigment + bezbojan oblik
4,5	leukobaza, bezbojno
4,5 - 8	hidrobaza, ljubičasti pigment
8-10	anion hidrobaze, plavi pigment
>10	halkon, žuti pigment

1.2.3.1.2. Utjecaj svjetlosti

Antocijani su, u pravilu, nestabilni kada se izlože ultraljubičastom, vidljivom ili nekoj drugoj vrsti ionskog zračenja. Kraće valne duljine, poput onih kod UV svjetla, štetnije su nego duže valne duljine kod vidljive svjetlosti. Warner (2015)³⁵ navodi da nakon osam dana izlaganja svjetlosti 49 % antocijana degradira. Razgradnja antocijana izazvana utjecajem svjetla ovisi o koncentraciji prisutnog molekularnog kisika. Najveći gubitak antocijana događa se kada se pigmenti izlože fluorescentnom svjetlu. Svjetlost može imati pozitivne i negativne učinke na stabilnost antocijana. S jedne strane djeluje blagotvorno na biosintezu i akumulaciju antocijana u biljkama, dok s druge strane, u *in vitro* uvjetima, svjetlost uglavnom uzrokuje degradaciju antocijana. Stabilnost antocijana može se povećati ili smanjiti ovisno o okolišnim uvjetima nakon njihove kondenzacije ili kondenzacije s drugim organskim spojevima. Polihidroksiflavoni i izoflavoni otporni su na fotodegradaciju antocijana budući da se negativno nabijena sulfonska kiselina i pozitivno nabijeni ksantat ioni međusobno privlače, stvarajući komplekse s antocijanima. Odabir odgovarajućeg ambalažnog materijala može pomoći u zaštiti od svjetla, iz uglavnom ultraljubičastog spektra.^{33,35,40}

1.2.3.1.3. Utjecaj temperature

Toplinska obrada hrane jedna je od najčešće korištenih metoda za produljenje trajnosti i očuvanje sigurnosti i/ili zdravstvene ispravnosti namirnice. Ovisno o funkcionalnim značajkama hrane i željenom roku trajanja, toplinska obrada najčešće se odvija u rasponu od 50 do 180 °C. Antocijani značajnije podliježu toplinskoj degradaciji pri temperaturama ispod 80 °C. Visoke temperature mogu uzrokovati promjenu boje hrane, količine antocijana, ali i smanjenje antioksidativnog kapaciteta namirnice. Uslijed toplinske obrade, antocijani podliježu nizu mehanizama, poput glikolizacije, nukleofilnog napada vode, cijepanja i polimerizacije, koji mogu uzrokovati gubitak i degradaciju ovog pigmenta. Utjecaj temperature na degradaciju antocijana ovisi o prisutnosti kisika za vrijeme toplinske obrade. U pravilu, porastom temperature stabilnost antocijana opada, kao i intenzitet obojenja i sama koncentracija antocijana, dok količina smeđih pigmenata/polimera raste. Šećerna skupina prisutna kod antocijana značajno utječe na njihovu stabilnost za vrijeme toplinske obrade. Acilirani antocijani pokazuju veću stabilnost od neaciliranih antocijana pri različitim temperaturnim režimima. Hidroksilacija glikozidnih liganada smanjuje toplinsku stabilnost antocijana, dok je metilacija, glikolizacija i acilacija povećavaju. Osim kod toplinske obrade namirnica, temperatura predstavlja jako bitan čimbenik i kod skladištenja namirnica. Preporuka

je da se namirnice bogate antocijanima skladište na temperaturama ispod sobne kako bi se isti sačuvali u što većoj količini. Kratka toplinska obrada, poput blanširanja, može povećati stabilnost antocijana budući da ona inaktivira enzim PPO.^{33,35,38}

1.2.3.1.4. Utjecaj kisika i enzima

Antocijani su, uslijed nezasićene kemijske strukture, osjetljivi na reakcije s molekulskim kisikom. Stoga se kisik smatra jako važnim čimbenikom koji utječe na stabilnost antocijana. Prisutnost kisika može ubrzati proces razgradnje antocijana na dva načina: izravnim oksidacijskim mehanizmom ili djelovanjem putem oksidacijskih enzima kao npr. polifenol oksidaze (PPO). Najčešći enzimi koji razgrađuju antocijane su glikozidaze, peroksidaze (fenol oksidaze) i fenolaze (polifenol oksidaze). Antocijanaze je zajednički naziv za ovu skupinu enzima. Ove enzime može sintetizirati biljka i oni su prisutni u tkivima ili se mogu pojaviti kao posljedica kontaminacije mikroorganizmima. Glikozidaze izravno utječu na antocijane, dok peroksidaze i fenolaze imaju neizravan učinak na njihovu stabilnost. Enzimatska aktivnost je viša pri nižim pH vrijednostima, a optimalna pri pH od 4,0. Polifenol oksidaza (PPO) katalizira oksidaciju antocijana i potiče stvaranje smeđe obojenih kondenziranih produkata. Remini i sur. 2018⁴¹ smatraju da je očuvanost, odnosno stabilnost, antocijana veća kada se taj izvor antocijana čuva pod vakuumom, dušikom ili argonom, nego u uvjetima normalne atmosfere koja sadrži oko 21 % kisika. Kod svih uzoraka koji su čuvani u uvjetima normalne atmosfere zabilježen je veći pad sadržaja antocijana nego pod drugim uvjetima. Visoka temperatura i prisutnost kisika pokazali su se kao najštetnija kombinacija svih čimbenika koji utječu na stabilnost antocijana. S druge strane, jedno istraživanje pokazalo je da modificirana atmosfera koja sadrži 60-100 % kisika povećava sadržaj antocijana u svježe ubranim borovnicama u početnom razdoblju (0-7 dana) hladnog skladištenja (Zheng i sur. 2003)⁴². Međutim, dulje skladištenja pri ovakvim uvjetima uzrokovalo bi pad sadržaja antocijana.^{34,35,38,41,42}

1.2.3.2. Utjecaj antocijana na zdravlje čovjeka

Pored niza pozitivnih učinaka koje obavljaju kao sekundarni biljni metaboliti u biljkama, antocijani blagotvorno djeluju i na zdravlje čovjeka. Ogroman interes za antocijanima potvrđuju brojna istraživanja koja su objavljena u znanstvenim časopisima. Potencijalni blagotvorni učinak na zdravlje čovjeka, prije svega je utemeljen na činjenici da su antocijani jaki antioksidansi. Antocijani mogu reagirati s kisikovim radikalima i spriječiti oštećenje stanica zbog oksidativnog stresa. Zbog povećane nestabilnosti antocijana otežano je dobivanje njihovih čistih spojeva. Dokazani su različiti zdravstveni benefiti antocijana na zdravlje među kojima treba istaknuti: protuupalno djelovanje, antidijabetičko djelovanje i povoljan utjecaj na živčani i kardiovaskularni sustav. Detaljniji potencijalni zdravstveni učinci antocijana i predloženi mehanizmi djelovanja prikazani su u prilogu 1.

1.3. Sušenje i postupci sušenja

Sušenje predstavlja jednu od najstarijih i najraširenijih načina konzerviranja hrane. Smatra se jednom od energetski najzahtjevnijih operacija. Glavni cilj sušenja je ukloniti vlagu/vodu ili neko drugo otapalo iz proizvoda do prihvatljive razine pažljivom primjenom topline. Konzerviranje sušenjem obuhvaća prirodno sušenje uklanjanjem vode sunčevim zračenjem i prirodnim strujanjem zraka i „umjetno sušenje“ pod kontroliranim (mikroklimatskim) uvjetima (ponekad zvano dehidracijom). Prirodno sušenje je ograničeno na neka klimatska područja i neku hranu. Umjetno sušenje ima mnogo širu mogućnost uporabe.

Konzerviranje sušenjem zasnovano je na kseroanabiozi (grč. *kseros* = suh, anabiozi uzrokovanoj sušenjem), odnosno osmoanabiozi, koje djeluju kao dehidracija do nekog udjela vode u hrani još dovoljnog za aktivnost mikroorganizama. Obično je to, već prema vrsti hrane, 10 do 20 %, ponekad više, ali je redovito manje od udjela vode u koncentriranoj hrani. Zbog toga je osušena hrana uvijek čvrsta, pa i onda kad je dobivena od tekuće (npr. od mlijeka, jaja, sokova, kaša).

Hrana se ne suši samo da bi se spriječilo njezino mikrobiološko kvarenje, već i kvarenja uzrokovana drugim, osobito kemijskim promjenama (kemijsko kvarenje). Dehidracijom se postižu i drugi važni efekti, npr. smanjenje mase, često i volumena hrane. Navedeni učinci olakšavaju pakiranje, skladištenje i transport dehidriranih proizvoda.

Sušenjem se iz hrane uklanja i hidratna i konstitucijska voda, pa nastaju velike promjene. Neke su važne promjene ireverzibilne. Očituju se npr. smanjenjem moći rehidracije, neenzimskim posmeđivanjem, gubitkom nekih važnih sastojaka (tvari arome) i termolabilnih komponenti. Rješavanje problema sušenja danas je najviše usmjereno prema savladavanju tih nedostataka. Glavni cilj je dobiti proizvod porozne strukture, dobre moći rehidracije sa što manje izmijenjenim senzorskim svojstvima s obzirom na značajke sirovine.

Uklanjanje vode iz hrane je bit procesa dehidracije u kojemu su povezani (kontinuirani) prijenos tvari i energije (topline). Proces dehidracije zrakom kod konstantnih uvjeta okoline može se podijeliti na period „konstantne brzine“ i jedan ili više perioda „padajuće brzine“ (sušenja). Zato materijale koji se podvrgavaju sušenju moguće je svrstati u dvije kategorije: nehigroskopne i higroskopne. Za nehigroskopne materijale karakteristično je da je parcijalni tlak vode u njima jednak tlaku pare (čiste) vode. Međutim, kod higroskopnih materijala parcijalni tlak vode postaje manji od tlaka para vode kod istog kritičnog sadržaja (razine) vlage.

Glavne značajke koje utječu na sam proces sušenja su: veličina proizvoda, poroznost materijala, vrijeme sušenja, kapacitet proizvodnje, brzina, temperatura, tlak i način dovođenja topline te dinamici strujanja fluida koji odnosi vlagu te može dovoditi toplinu.

Ovisno o načinu dovođenja topline, postoje različite metode sušenja:

- konvekcijsko sušenje: prijenos topline se ostvaruje neposrednim kontaktom zagrijanog plina (najčešće zrak) koji struji iznad vlažne površine materijala
- kondukcijsko (kontaktno) sušenje: prijenos topline na vlažni materijal ostvaruje se preko zagrijane površine
- sublimacijsko sušenje: sušenje vlažnog materijala u zamrznutom stanju pod visokim vakuumom
- radijacijsko sušenje: sušenje vlažnog materijala energijom koju materijal prima elektromagnetskim zračenjem

Odabir prikladne metode i opreme za proces sušenja može smanjiti degradaciju kvalitete proizvoda, izbjeći neželjene strukturalne promjene, povećati učinkovitost procesa, smanjiti utrošak energije za sam proces (smanjiti operativne troškove), povećati kapacitet proizvodnje, smanjiti utjecaj na okoliš i omogućiti sigurnije uvjete rad.⁴³⁻⁴⁸

1.3.1. Konvekcijsko sušenje

Konvekcijsko sušenje kod kojeg se toplina dovodi strujom toplog zraka koji osim što dovodi toplinu, također odnosi isparenu vlagu. S termodinamičkog aspekta on predstavlja složen proces u kojem se istodobno odigravaju fenomeni prijenosa tvari i topline. Odvija se pri visokim temperaturama (iznad 55 °C) i aerobnim uvjetima (uz prisustvo kisika). Tijekom procesa istodobno se odvijaju prijenos energije tj. topline sa sušnog medija na vlažnu površinu, zagrijavanje vlažne površine te prijenos tvari, tj. isparavanje vlage. Kako proces napreduje usljed zagrijavanja vlažnog materijala mogu se dogoditi strukturne i kemijske promjene unutar materijala. Neke od kemijskih promjena koje se događaju za vrijeme ovog procesa su: oksidacija fenolnih spojeva katalizirana oksidazom, degradacija termolabilnih vitamina, Maillard-ova reakcija neenzimskog posmeđivanja. Za vrijeme konvekcijskog sušenja odvijaju se dvije difuzije: vanjska difuzija (prijenos vlage s površine materijala kojeg sušimo do sušnog medija) i unutrašnja difuzija (prijenos vlage iz unutrašnjosti materijala kojeg sušimo do njegove površine). Prijenos topline na vlažni materijal kod konvekcijskog sušenja ostvaruje se neposrednim kontaktom zagrijanog plina (najčešće zrak) iznad vlažne površine materijala. Tijekom procesa sušenja vrući zrak kontinuirano opstrujava hranu i omogućava intenzivno

uklanjanje površinske i adsorpcijski vezane vode/vlage iz materijala hranu prije izlaska iz sušnice. Uređaji, tj. oprema za sušenje biraju se u ovisnosti o značajkama hrane koju želimo sušiti. Kabinske, tunelske sušnice, sušnice s fluidiziranim slojem i sušnice s raspršivanjem se uobičajeno koriste kod konvekcijskog sušenja vrućim zrakom. Temperatura i brzina strujanja, tj. protok toplog zraka su glavni procesni parametri kod konvekcijskog sušenja i oni značajno utječu na kvalitetu finalnog proizvoda. Kombiniranje s drugim metodama sušenja (npr. vakuum sušenje) omogućava dobivanje još kvalitetnijeg proizvoda.

Prednosti konvekcijskog sušenja su: dugačak rok trajanja tretiranih namirnica, jednostavan dizajn i način rada te niska cijena.

Nedostaci konvekcijskog sušenja su: visoka temperatura sušnog medija ili vrlo niska vlažnost, dugo vrijeme sušenja, izloženost oksidaciji, stvaranje off-okusa/mirisa, stvaranje kore na površini proizvoda uslijed visokih temperatura.⁴⁹⁻⁵³

1.3.2. Vakuum sušenje

Vakuum sušenje važna je metoda za sušenje termolabilnih materijala i široko se koristi u farmaceutskoj, kemijskoj i prehrambenoj industriji. Uvedena je neposredno nakon Drugog svjetskog rata za dehidraciju tekućih i polutekućih namirnica. Materijal koji se suši nalazi se u okruženju sniženog tlaka/vakuuma, a samim time kapljevina (najčešće voda) koja se nalazi u vlažnom materijalu će intenzivnije isparavati iz istog, budući da temperatura vrelišta vode opada snižavanjem tlaka. Tlak u komori/sušnici snižava se uz pomoć vakuum pumpi. Toplina se, u pravilu, dovodi putem vruće pare, vode, metalne stijenke ili radijacije. Temperature sušenja mogu biti oprezno kontrolirane za vrijeme odvijanja procesa sušenja. Tlak u vakuum komori/sušnici se nalazi uobičajeno između 30-60 kPa. U uvjetima vakuuma temperatura vrelišta vode nalazi se u području između 25-30 (35) °C. Nastala para se usmjerava prema kondenzatoru. Termolabilne materijale i one podložne promjeni boje moguće je sušiti pri nižim temperaturama primjenom ove metode. Vakuum sušnice dolaze u šaržnoj i kontinuiranoj izvedbi. Na učinkovitost metode i kvalitetu proizvoda utječu odabrani tlak, temperatura i brzina prijenosa topline. Ova metoda vrlo često se koristi u kombinaciji s nekim drugim metodama sušenja poput mikrovalnog sušenja, čime se dobiva još kvalitetniji proizvod.

Prednosti vakuum sušenja su:

- idealna metoda za termolabilne namirnice
- vakuum uklanja vlagu i istovremeno sprječava oksidaciju i eksplozije do kojih može doći kada određeni materijali dođu u kontakt sa zrakom

- vakuum sušenje također je idealno za postizanje vrlo niskih udjela vlage u materijalima
-budući da je točka vrelišta vode pri sniženom tlaku niža, vakuum sušenje osigurava veću razliku temperatura između ogrjevnog medija i materijala koji se suši, što rezultira bržim i učinkovitijim sušenjem

-zatvoreni sustav vakuum komore onemogućava reaktivnim spojevima i opasnim otapalima, prisutnim u vlažnom materijalu, da dođu u kontakt s ljudima

Nedostaci vakuum sušenja su:

-u usporedbi s drugim metodama, za vakuum sušenje potrebna je skuplja i kompleksnija oprema

-niža dostupna površina za prijenos topline u usporedbi s konvekcijskim sušnicama

-niža gornja temperaturna granica sušnice (315,6 °C) u usporedbi s konvekcijskim sušnicama

-veći utrošak energije (veći operativni troškovi)^{43,54-57}

1.3.3. Liofilizacija

Liofilizacija je jedan od novijih načina dehidracije hrane. Tijekom Drugog svjetskog rata primjena liofilizacije se znatnije proširila na područje SAD-a i Velike Britanije, gdje su se proizvodile namirnice (meso, povrće, voće, voćni sokovi itd.) za potrebe vojske. Dugo se smatralo da je ovaj postupak prihvatljiv samo za dehidraciju biološkog materijala poput krvi, plazme i nekih antibiotika. U pravilu se većina namirnica može liofilizirati. Na tržištu se mogu dobiti ili se koriste kod daljnje prerade sljedeće liofilizirane namirnice: meso, ribe, perad, mlijeko, jaja, rakovi, voće, voćni sokovi, povrće, gotova jela, juhe i kava.

Liofilizirati se mogu i enzimski preparati i mikrobne kulture koje se potom koriste u prehrambenoj industriji. Prednosti liofilizacije su ponajprije: velika trajnost proizvoda, održavanje strukture i vanjskog oblika, dobra topljivost proizvoda u prahu, dobra rekonstitucija kod ponovnog primanja vode, porozna struktura pogodna za bubrenje, neznatne promjene boje, arome i okusa, te minimalan gubitak vitamina. Osim navedenih prednosti, smanjenjem mase namirnice snizuju se troškovi transporta i skladištenja. Pored toga mnoge liofilizirane namirnice mogu se koristiti kao poluproizvodi i/ili sirovine u prehrambenoj industriji (npr. liofilizirano voće za proizvodnju pekarskih proizvoda). Liofilizacija omogućava uklanjanje vode iz osjetljivog materijala koji se primjenom uobičajenih postupaka sušenja ne mogu sušiti ili se suše nedovoljno. Nedostaci postupka liofilizacije: dugotrajnost postupka, cijena i složenost potrebne opreme, veći energetske troškovi i troškovi održavanja.^{43,58-63}

Usporedba konvencionalnog postupka sušenja i postupka sušenja liofilizacijom prikazana je u tablici 8.

Tablica 8. Usporedba konvencionalnog postupka sušenja i postupka sušenja liofilizacijom⁶¹

Konvencionalno sušenje	Liofilizacija
Pogodan za hranu koja se lako suši (npr. povrće i žitarice)	Uspješno primjenjiv za većinu namirnica, no cijena koštanja je visoka i predstavlja limitirajući faktor češće primjene
Kod sušenja mesa, u pravilu, ne daje dovoljno dobre rezultate	Uspješan kod sušenja kuhanog i sirovog mesa
Raspon temperatura 40-90 °C pri atmosferskom tlaku	Temperatura ispod 0 °C pri nižim tlakovima od atmosferskog (12-133 Pa)
Voda isparava s površine namirnice, ali i iz dubljih slojeva kada se ravnina isparavanja pomjera u unutrašnjosti sloja	Voda sublimira tj. izravno prelazi iz krutog (led) u plinovito (vodena para) agregatno stanje
Migracija otopljenih tvari	Minimalno kretanje otopljenih tvari
Stresovi kod čvrstih namirnica uzrokuju strukturna oštećenja i skupljanje	Minimalne strukturne promjene i skupljanje
Spora i nepotpuna rehidracija	Brza i potpuna rehidracija
Čvrste ili porozne osušene čestice mogu imati veću gustoću nego izvorna namirnica	Porozne osušene čestice imaju manju gustoću nego izvorna namirnica
Promjene okusa, mirisa i arome su učestale	Promjene okusa, mirisa i arome nisu česte
Boja namirnice često postane tamnija	Boja namirnice u pravilu ostane nepromijenjena
Snižena nutritivna vrijednost	Nutritivna vrijednost namirnice je zadržana
U pravilu, niski troškovi postupka	U pravilu, visoki troškovi postupka (i do 5 puta veći nego kod konvencionalnog sušenja)

Danas se liofilizacija uglavnom koristi za dehidraciju tekućih i polutekućih namirnica.

Liofilizacija je jedinstveni postupak sušenja namirnica u zamrznutom stanju. Obuhvaća sljedeće karakteristične operacije: zamrzavanje i dehidraciju (a-sublimacijom i b-desorpcijom), te kondicioniranje proizvoda (uključujući pakiranje i skladištenje). Svaka od spomenutih operacija zahtijeva posebnu pažnju, jer o uspješnosti primijenjenih tehničkih rješenja ovisi kvaliteta i stabilnost proizvoda te ekonomičnost samog postupka.

Postupci koje obuhvaća operacija liofilizacije odnose se prvenstveno na zamrzavanje i sublimaciju vode iz zamrznutog materijala.

Osnovni inženjerski aspekti u procesu zamrzavanja vezani su uz prijenos topline i kristalizaciju, a u procesu sublimacije uz prijenos topline i prijenos tvari. Potrebno je poznavati određena fizikalna i fizikalno – kemijska svojstva materijala koji se podvrgava liofilizaciji. Među ta svojstva spadaju: toplinska vodljivost, specifični toplinski kapacitet, latentna toplina taljenja i isparavanja, svojstvo sorpcije – uključujući izoterme sorpcije, topline sorpcije kod različitog sadržaja vlage i svojstvo histereze - zatim permeabilnost prema toku pare i sl. Navedena svojstva su poznata pri primjeni uobičajenih metoda prijenosa topline. Međutim, kod nekih novijih metoda prijenosa topline, kao što je npr. dielektrično zagrijavanje, potrebno je mnogo temeljitije poznavanje svojstava materijala, budući da ta svojstva ne ovise samo o vrsti, već i o temperaturi i vlažnosti materijala. A upravo se ti čimbenici mijenjaju tijekom procesa dehidracije.

Princip na kojemu se zasniva liofilizacija je naizgled vrlo jednostavan. On se obično definira na sljedeći način: iz prethodno zamrznutog proizvoda voda se uklanja sublimacijom leda, tj. neposrednim prijelazom iz čvrstog u plinovito stanje. To se realizira podvrgavanjem zamrznutog proizvoda djelovanju topline pri sniženom tlaku. Budući da se uklanjanje vode vrši sublimacijom leda, taj postupak dehidracije je karakteriziran i time što je isključena migracija topljivih sastojaka (šećera, kiselina, mineralnih soli, aminokiselina itd.) prema površini proizvoda, karakteristična za ostale metode dehidracije. Na taj način je isključeno stvaranje krute površinske „kore“, koja usporava proces dehidracije i koja redovito predstavlja mjesto najintenzivnijih degradacijskih pojava. Osim toga, kako se molekule vode izdvajaju iz krute strukture koja se postupno pretvara u fino-poroznu, onemogućeno je aglomeriranje molekula bjelančevina, a primjenom niskih temperatura znatno su usporene kemijske reakcije.

Sušenje zamrzavanjem u vakuumu provodi se u liofilizatoru koji se sastoji od tri osnovne komponente, a to su: komora za sušenje, vakuumska pumpa koja osigurava podtlak u komori za sušenje i kondenzator koji prikuplja nastali kondenzat s hladne površine.

Tijekom operacije voda sadržana u proizvodu podvrgnutom liofilizaciji uklanja se kroz dvije faze:

- U fazi sublimacije ili tzv. primarnoj dehidraciji uklanja se voda koja se nalazi u vidu leda; to je prije svega tzv. slobodna voda. Tijekom te faze toplina dovedena proizvodu troši se isključivo kao entalpija sublimacije leda, a da se ni u jednom trenutku ne pojavljuje voda u tekućem stanju. Na taj način nestajanjem kristala leda zamrznuti materijal se postupno dehidratizira bez osjetnije promjene oblika, poprimajući fino poroznu strukturu. Tijekom čitave te faze (primarne dehidracije) proizvod mora ostati zamrznut i zbog toga zagrijavanje treba provesti tako da se u tretiranom materijalu konstantno održava tako niska temperatura koja rezultira iz ravnoteže između količine dovedene topline i one potrebne za sublimaciju.
- U fazi izotermne desorpcije ili tzv. sekundarnoj dehidraciji uklanja se vezana voda ili ona voda koja nije bila izdvojena u vidu leda. Ta se voda uklanja zagrijavanjem proizvoda na temperaturu od 30 °C do 60 °C, (što ovisi o prirodi i svojstvima proizvoda) nakon što su nestali i posljednji tragovi leda. To se postiže vakuum sušenjem proizvoda pri spomenutim temperaturama.

Dok je relativno lako odrediti trajanje prve faze dehidracije, čiji se završetak poklapa s trenutkom sublimacije posljednjeg kristalića leda, to nije slučaj s drugom fazom; ustvari, proces desorpcije je kontinuiran i s fizikalnog stajališta nema završne točke.

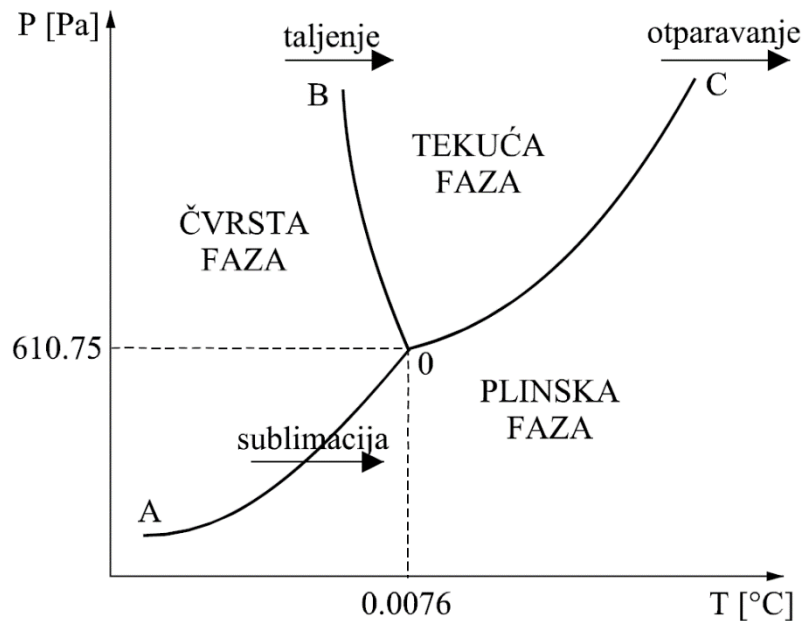
U ovisnosti o trajanju operacije i primijenjenim uvjetima, u proizvodu zaostaje određena količina vode, koja predstavlja tzv. zaostalu vlagu. Upravo količina te zaostale vode neposredno uvjetuje trajnost finalnog liofiliziranog proizvoda.^{43,58-63}

Iz faznog p-T dijagrama za čistu vodu (Slika 18.) vidljivo je pod kojim se uvjetima mijenja agregatno stanje vode. Točka 0 predstavlja trojnu točku u kojoj je moguće postojanje sve tri faze (čvrste, tekuće i plinovite).

U trojnoj točki se sijeku ravnotežne krivulje promjene faza i u toj točki sve tri faze su u istovremenoj ravnoteži. Kod običnog isparavanja proces se odigrava po krivulji OC. Molekule vodene pare odlaze u parni prostor, što se može ubrzati i olakšati održavanjem veće razlike u tlakovima.

Trojna točka ima koordinate $0,0076\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $610,75\text{ Pa}$ i za odvijanje procesa sublimacije (krivulja OA) vrijednosti temperature i tlaka treba održavati ispod njih.

Prema tome, da bi se proces sublimacije mogao odvijati te potom dovoditi toplinu (entalpiju sublimacije) da bi se potakao prijelaz faze iz čvrste u plinovitu te je potrebno uklanjati vodenu paru kako bi bio ostvaren uvjet da parcijalni tlak vodne pare na granici faza (čvrsto-plinovito) bude veći od parcijalnog tlaka pare u okolnom prostoru.⁴³



Slika 18. Fazni p-T dijagram vode; OA – krivulja sublimacije (leda – para), OB – krivulja (led – voda), OC – krivulja zasićene vlažne pare (voda – para), O – trojna točka⁴³

Praktična primjena ove pravilnosti diktira što veću udaljenost od točke 0. Iz faznog dijagrama za vodu vidi se da je kod sušenja sublimacijom uloga vakuuma višestruka (stvara podtlak i odvodi vodenu paru). Kod donjih dijelova krivulja OA i OC tangens kuta je manji čime je objašnjeno da je sa manjim promjenama tlaka udaljavanje od trojne točke brže i proces se može lakše ostvariti.⁴³

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Uzorci plodova kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) nabavljeni su u lokalnoj trgovini hrane. Plodovi su, u svježem stanju, bili pakirani u PET posudicama za voće i povrće s poklopcem, ukupne mase od 125 g. Dimenzije posudica su iznosile: dužina 142 cm, širina 94 cm, visina 35 cm. Ukupna masa svježih plodova kultivirane borovnice korištena u ovom radu iznosila je 375 g. Ta je masa podijeljena na tri jednaka dijela koja su potom podvrgnuta postupku sušenja koristeći različite tehnike sušenja.



Slika 19. Svježi plodovi kultivirane borovnice

2.2. Sušenje liofilizacijom

Navedena odvaga svježih plodova kultivirane borovnice (125 g), namijenjena postupku sušenja liofilizacijom, podijeljena je u dva jednaka dijela (62,5) i jedan je dio pohranjen u kriogenom hladnjaku, na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific Hera Freeze) tijekom perioda od 4 dana prije postupka sušenja liofilizacijom, dok je drugi dio svježih plodova kultivirane borovnice (62,5 g) tretiran tekućim dušikom ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) neposredno prije postupka liofilizacije. Postupak sušenja liofilizacijom proveden je na liofilizatoru (FreeZone 2.5, Labconco, Kansas

City, MO, USA). Parametri postupka sušenja liofilizacijom su bili: stalna temperatura od -50 °C, tlak od 0,122 mbara, procesno vrijeme sušenja je iznosilo 24 h.



Slika 20. Uređaj za sušenje liofilizacijom



Slika 21. Naglo smrzavanje plodova borovnice u tekućem dušiku



Slika 22. Plodovi kultivirane borovnice nakon postupka liofilizacije

2.3. Sušenje u vakuum sušioniku

Svježi plodovi kultivirane borovnice (125 g) stavljeni su u vakuum sušionik (Thermo Scientific 3608-ICE, pumpa Pfeiffer, DUO Line, 5M) tijekom perioda od 24 h, pri temperaturi od 60 °C i tlaku (76 mm Hg) do postizanja konstantne mase uzorka.



Slika 23. Sušionik za sušenje pod vakuumom



Slika 24. Plodovi kultivirane borovnice nakon postupka vakuum sušenja

2.4. Konvekcijsko sušenje

Svježi uzorci kultivirane borovnice (125 g) podvrgnuti su postupku konvekcijskog sušenja u sušioniku (Memmert, UF 30) tijekom perioda od 10 h pri konstantnoj temperature od 60 °C uz kontinuiranu brzinu strujanja sušnog medija. Završetak postupka sušenja određen je postizanjem ustaljene mase osušenih plodova borovnice.



Slika 25. Sušionik za konvencijsko sušenje



Slika 26. Plodovi kultivirane borovnice nakon postupka konvekcijskog sušenja

2.5. Određivanje udjela vode i suhe tvari u plodovima kultivirane borovnice

Udio vode i suhe tvari u plodovima kultivirane borovnice određen je tako da se prvo odvagala masa plodova (125 g) i potom se ostavila u sušioniku (Memmert, UF 30) pri konstantnoj temperaturi od 105 °C. Tijekom perioda sušenja, uzorci su povremeno vagani da se vidi promjena mase uzorka sve do postizanja konstantne mase. Udio vode određen je prema formuli:

$$w(\text{H}_2\text{O} \%) = [(m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)] \times 100$$

gdje je:

m_1 – masa prazne posude

m_2 – masa posude i uzorka prije sušenja

m_3 – masa posude i uzorka nakon sušenja

Udio suhe tvari u plodovima kultivirane borovnice izračunat je prema dolje navedenoj formuli:

$$w(\text{suha tvar \%}) = 100 - w(\text{H}_2\text{O})$$

2.6. Meljava osušenih plodova borovnice

Osušeni plodovi kultivirane borovnice samljeveni su uz pomoć mlina s noževima. Za jedno mljevenje korištena je masa osušenih plodova odvage 14 g, a trajanje mljevenja iznosio je 3 min. Nakon postupka mljevenja, uzorci su vakuumirani u uređaju za vakuumiranje (FoodSaver FM 2000) i pohranjeni na temperaturu od 4 °C do provedbe analiza.



Slika 27. Uređaj za vakuumiranje



Slika 28. Prah osušenih plodova kultivirane borovnice nakon mljevenja mlinom s noževima

2.7. Postupak ekstrakcije fenola

Za ekstrakciju antocijana iz svježih i osušenih plodova kultivirane borovnice korištena je modificirana metoda prema Elez i sur. (2013)⁶⁴. U Erlenmayerovu tikvicu odvagalo se 2 g uzorka, dodalo se 8 mL 80 % vodene otopine metanola (v/v) koja sadrži 1 % mravlje kiseline (v/v), smjesa se propuhala inertnim plinom dušikom te se postupak ekstrakcije provodio na ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 50 °C tijekom perioda od 15 min. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se profiltrirao kroz filter papir Whatman br.1 u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunio otapalom za ekstrakciju do oznake. Dobiveni ekstrakti su korišteni za određivanje antocijana. Za HPLC analizu profiltrirani ekstrakt filtriran je kroz filter 0,45 µm u vialu od 1,5 mL.

2.8. HPLC-DAD analiza fenolnih spojeva

Analiza fenolnih spojeva iz svježih i osušenih uzoraka kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) urađena je uz pomoć tehnike visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) s foto-diodnim detektorom (DAD) (Agilent 1260 quaternary LC infinity system, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) prema metodi od Zorić i sur. (2014)⁶⁵. Korišten je automatski injektor i ChemStation program i kromatografska kolona (250 × 4,6 mm) (Luna 100-5C18, Phenomenex). Mobilna faza A sadržavala je 3 % mravlje kiseline u vodi, dok je B otopina sadržavala 3 % mravlje kiseline u 80 % acetonitrilu. Program je bio sljedeći: od 0 do 28 min 0 % B, od 28 do 35 min 25 % B; od 35 do 40 min 50 % B, od 40 do 45 min 80 % B i konačno u zadnjih 10 min opet 0 % B. Protok je bio 0,8 mL/min, volumen uzorka 5 mL.

Detekcija je urađena koristeći UV/VIS foto dioda detektor na valnim duljinama od 220 do 570 nm. Antocijani su identificirani na valnoj duljini od 520 nm, fenolne kiseline na 280 nm, a flavonol glikozidi na 360 nm. Fenolni spojevi su identificirani usporedbom retencijskim indeksa i dobivenih spektara s podacima korištenih standarda za klorogensku kiselinu, kava kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu, kvercetin-3-glukozid, kempferol-3-rutinozid i antocijane: delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid. Fenolne kiseline, flavonol glikozidi i antocijani su kvantificirani koristeći vanjski standard. Standardi fenolnih kiselina i flavonol glukozida su otopljeni u metanolu, dok su antocijani otopljeni u metanolu s dodatkom kiseline. Radne koncentracije standarda su bile raspona koncentracije od 10 do 50 mg/L za fenolne kiseline, 25 do 200 mg/L za flavonol glikozide i od 15 do 100 mg/L za antocijane.

2.9. Određivanje udjela ukupnih fenola

Određivanje udjela ukupnih fenola provedeno je prema metodi Singleton i Rossi (1965)⁶⁶ koristeći Folin-Ciocalteu reagens. U plastičnu kivetu doda se 680 μ L destilirane vode, 17 μ L uzorka, 85 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 min doda se 170 μ L natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se konačno doda još 748 μ L destilirane vode. Uzorak se ostavi tijekom 1,5 h u mraku, na sobnoj temperaturi. Potom se očita apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm. Iz baždarne krivulje galne kiseline očita se vrijednost ukupnih ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). U slučaju da je uzorak razrijeđen, rezultat se pomnoži s faktorom razrijeđenja.

Priprava standardne otopine galne kiseline:

Standardna otopina galne kiseline se pripravlja miješanjem 0,5 g galne kiseline s cca. 10 mL 96 %-tnog etanola, a smjesa se otopi u tikvici od 100 mL u destiliranoj vodi. Iz tikvice se uzima po 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL i 10 mL otopine i otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda 60 mL vode i 5 mL prethodno pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se potom dobro promućka i u intervalu od 30 sekundi do 8 minuta u tikvicu se doda još 15 mL natrijevog karbonata (Na_2CO_3) i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Ostavi se da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi i zatim se očita absorbancija na 765 nm. Odmjerna tikvica bez uzorka je slijepa proba i služi za određivanje nule na spektrofotometru.

Priprava 20 %-tne otopine Na₂CO₃:

20 %-tna otopina Na₂CO₃ priprema se tako da se otopi 200 g bezvodnog Na₂CO₃ u 800 mL destilirane vode i stavi se malo zagrijati. Otopina se potom ohladi na sobnu temperaturu, doda se malo kristalića Na₂CO₃ i ostavi da se taloži 24 h. Nakon toga se filtrira i nadopuni do volumena od 1 L.

3. REZULTATI

U Tablici 9. prikazani su rezultati određivanja udjela vode i suhe tvari u svježim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

Tablica 9. Udio vode i suhe stvari u svježim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.). Prikazani rezultat predstavlja srednju vrijednost dvaju mjerenja.

	Udio vode (%)	Udio suhe tvari (%)
Svježa borovnica	85,1	14,9

U Tablici 10. prikazani su rezultati udjela ukupnih fenola u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

Tablica 10. Udio ukupnih fenola u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.). Prikazani rezultat predstavlja srednju vrijednost tri mjerenja i standardnu devijaciju.

	Udio ukupnih fenola (mg GAE/100g)
Svježi plodovi	1350,85 ± 8,44
Liofilizacija (predobrada – 80 °C)	725,23 ± 10,22
Liofilizacija (predobrada – 196 °C)	989,12 ± 12,00
Vakuum sušenje	621,45 ± 7,89
Konvekcijsko sušenje	453,11 ± 9,22

U Tablici 11. prikazani je sastav fenola u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) određen HPLC-DAD tehnikom.

Tablica 11. Sastav fenola u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) određen HPLC-DAD tehnikom. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost dvaju mjerenja.

	Svježa borovnica mg/L	Liofilizacija (predobrada – - 80 °C) mg/L	Liofilizacija (predobrada – - 196 °C) mg/L	Vakuum sušenje mg/L	Konvekcijsko sušenje mg/L
Kolorgenska kiselina	1,56	95,96	113,98	46,94	15,96
Ukupno kiselina:	2,58	101,80	118,49	46,94	15,96
Kvercetin-glukozid	87,50	56,47	66,39	24,91	0,00
Kvercetin-rutinozid	12,36	0,00	0,00	0,00	0,00
Kvercetin-arabinozid	16,76	11,87	13,74	5,41	1,73
Kemferol-glukozid	7,38	5,26	5,79	2,40	5,82
Kemferol-rutinozid	6,09	4,21	3,86	2,25	3,20
Ukupno flavonol glukozidi:	130,08	77,81	89,79	34,97	10,75
Delfinidin-3-galaktozid	78,20	46,78	58,67	29,32	15,41
Delfinidin-3-glukozid	24,07	15,34	18,31	9,64	0,36
Cijanidin-3-galaktozid	7,44	4,35	5,73	0,00	2,42
Delfinidin-3-arabinozid	48,19	28,71	36,82	20,48	10,05

Petunidin-3-galaktozid	38,34	19,78	24,75	12,75	8,38
Petunidin-3-glukozid	20,80	12,99	15,83	7,89	1,80
Cijanidin-3-glukozid	4,41	0,00	0,00	0,00	0,00
Peonidin-3-glukozid	18,94	8,55	17,33	4,98	2,82
Malvidin-3-galaktozid	91,96	47,14	62,73	31,10	24,28
Malvidin-3-glukozid	38,74	22,48	27,97	14,98	1,49
Malvidin-3-arabinozid	57,65	32,47	42,35	21,21	14,37
Ukupno antocijani:	428,49	238,58	310,35	152,36	81,37

4. RASPRAVA

Borovnica spada među najzdravije namirnice zbog velikog udjela biološki aktivnih spojeva iz skupine antocijana kojima se pripisuju mnoge funkcionalne aktivnosti. U cilju očuvanja trajnosti te stabilizacije bioaktivnih komponenti primjenjuje se postupak sušenja. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj različitih postupaka sušenja na udio fenolnih spojeva te na njihov sastav s posebnim naglaskom na antocijane koji su jako zastupljeni u bobičastom voću poput borovnice. U Tablici 9. prikazan je udio vode i suhe tvari u plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.). Rezultati pokazuju da udio vode u uzorcima iznosi 85,1 %, a udio suhe tvari 14,9 %. Dobiveni rezultati su u skladu s podacima iz dostupne literature (Akcicek i sur., 2023).⁶⁷

Tablica 10. prikazuje rezultate udjela ukupnih fenola (izraženi kao mg GAE/100 g) u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice. Svježa borovnica imala je najveći udio ukupnih fenola (1350,85 mg GAE/100 g) u odnosu na liofilizirane plodove koji su bili prethodno smrznuti na temperaturi od - 196 °C (u tekućem dušiku) (989,12 mg GAE/100 g) i na liofilizirane plodove prethodno smrznute na temperaturi od - 80 °C (725,23 mg GAE/100 g) te na plodove osušene vakuum sušenjem (621,45 mg GAE/100 g) i konvekcijskim sušenjem (453,11 mg GAE/100 g). Prikazani rezultati potvrđuju utjecaj primjene različitih metoda sušenja na udio ukupnih fenola u plodu kultivirane borovnice. Postupak sušenja liofilizacijom uz prethodno naglo smrzavanje plodova (u struji tekućeg dušika) izazvalo je smanjenje udjela ukupnih fenola za 26,78 % u odnosu na svježi plod. Postepeno smrzavanje plodova prije sušenja liofilizacijom izazvalo je smanjenje udjela ukupnih fenola za 46,32 % u odnosu na svježe plodove, dok je smanjenje udjela ukupnih fenola nakon vakuum i konvekcijskog postupka sušenja bilo još izraženije (54 % kod vakuum sušenja i 66,46 % kod konvekcijskog sušenja). Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima drugih, sličnih, istraživanja. Muñoz-Fariña i sur. (2023)⁶⁸ istraživali su utjecaj različitih metoda sušenja na udio polifenola u kultiviranoj borovnici i prema njihovim rezultatima konvekcijsko sušenje je pokazalo najbolji učinak na očuvanje udjela polifenola u plodovima kultivirane borovnice, a nisu uočene bitne razlike u udjelu antocijana u plodovima kultivirane borovnice između konvekcijsko sušenja i sušenja liofilizacijom. Prema njihovom istraživanju proces sušenja liofilizacijom smanjio je udio ukupnih fenola za čak 63 %. Nisu uočili razliku u utjecaju konvekcijskog sušenja i liofilizacije na koncentraciju cijanidin-3-glukozida. S druge strane, Nemzer i sur. (2018)⁶⁹ su uočili viši udio antocijana u plodovima borovnice nakon sušenja liofilizacijom u odnosu na konvekcijsko sušenje. Ochmian i sur. (2020)⁷⁰ objašnjavaju gubitak antocijana iz plodova

borovnice nakon konveksijskog sušenja povećanom enzimskom aktivnošću polifenol oksidaze. Akcicek i sur. (2023)⁶⁷ su proučavali učinak četiri načina sušenja (vakuum sušenje, liofilizacija, konveksijsko sušenje, ultrazvukom potpomognuto vakuum sušenje) na udio ukupnih fenola u plodovima borovnice i prema njihovim rezultatima sušenje liofilizacijom najmanje je utjecalo na smanjenje udjela ukupnih fenola dok su sve ostale tehnike sušenja značajno utjecale na smanjenje udjela ukupnih fenola. Rezultati njihovog istraživanja prilično su u skladu s rezultatima ovog istraživanja na način da je očuvanje udjela ukupnih fenola bilo najbolje nakon sušenja liofilizacijom, potom nakon vakuum sušenja i onda nakon konveksijskog sušenja.

Tablica 11 prikazuje sastav fenola (izraženi kao mg/L) u svježim i osušenim plodovima kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) određen HPLC-DAD tehnikom, pri čemu prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost dvaju mjerenja.

Svježa borovnica imala je najmanji udio klorogenske kiseline i ukupnih fenolnih kiselina (1,56 mg/L i 2,58 mg/L) u odnosu na liofilizirane plodove koji su bili prethodno smrznuti na temperaturi od - 196 °C (u tekućem dušiku) (113,98 mg/L i 118,49 mg/L) i na liofilizirane plodove prethodno smrznute na temperaturi od - 80 °C (95,96 mg/L i 101,80 mg/L). Također, svježa borovnica imala je manji udio klorogenske kiseline i ukupnih fenolnih kiselina u usporedbi s plodovima osušenim primjenom vakuum sušenja (46,94 mg/L) i konveksijskog sušenja (15,96 mg/L).

Nadalje, svježa borovnica imala je najveći udio flavonol glukozida (130,08 mg/L) u odnosu na liofilizirane plodove koji su bili prethodno smrznuti na temperaturi od - 196 °C (u tekućem dušiku) (89,79 mg/L) i na liofilizirane plodove prethodno smrznute na temperaturi od - 80 °C (77,81 mg/L) te na plodove osušene vakuum sušenjem (34,97 mg/L) i konveksijskim sušenjem (10,75 mg/L).

Prema Tablici 11 svježa borovnica je također imala najveći udio antocijana (428,49 mg/L) u odnosu na liofilizirane plodove koji su bili prethodno smrznuti na temperaturi od - 196 °C (u tekućem dušiku) (310,35 mg/L) i na liofilizirane plodove prethodno smrznute na temperaturi od - 80 °C (238,58 mg/L) te na plodove osušene vakuum sušenjem (152,36 mg/L) i konveksijskim sušenjem (81,37 mg/L).

Postupak sušenja liofilizacijom uz prethodno naglo smrzavanje plodova (u struji tekućeg dušika) izazvalo je smanjenje udjela ukupnih flavonol glukozida za 30,97 % u odnosu na svježi plod. Postepeno smrzavanje plodova prije sušenja liofilizacijom izazvalo je smanjenje udjela ukupnih flavonol glukozida za 40,18 % u odnosu na svježe plodove, dok je smanjenje udjela

ukupnih flavonol glukozida nakon vakuum i konvekcijskog postupka sušenja bilo još izraženije (73,12 % kod vakuum sušenja i 91,74 % kod konvekcijskog sušenja).

Postupak sušenja liofilizacijom uz prethodno naglo smrzavanje plodova (u struji tekućeg dušika) izazvalo je smanjenje udjela ukupnih antocijana za 27,57 % u odnosu na svježi plod. Postepeno smrzavanje plodova prije sušenja liofilizacijom izazvalo je smanjenje udjela ukupnih antocijana za 44,32 % u odnosu na svježe plodove, dok je smanjenje udjela ukupnih antocijana nakon vakuum i konvekcijskog postupka sušenja bilo još izraženije (64,44 % kod vakuum sušenja i 81,01 % kod konvekcijskog sušenja).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata i rasprave ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Postupak sušenja negativno utječe na udio fenola u plodu kultivirane borovnice
- Negativan utjecaj sušenja manifestira se kroz smanjenje sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva prisutnih u plodu kultivirane borovnice
- Ovisno o primijenjenoj metodi sušenja, gubici ukupnih fenolnih spojeva, u odnosu na svježi plod borovnice, mogu se nalaziti u rasponu od 26,78 % do 66,46 %
- Vakuum sušenje i konvekcijsko sušenje pokazali su najnegativniji učinak na fenolni sastav ploda kultivirane borovnice – izazvali su najveći gubitak ukupnih fenolnih spojeva, ali i najveći gubitak ukupnih flavonol glukozida i ukupnih antocijana
- Temperatura predobrade (smrzavanja) značajno je utjecala na fenolni sastav liofiliziranih plodova borovnice, na način da su gubici ukupnih fenolnih spojeva kod naglo smrznutih plodova (u struji tekućeg dušika pri - 196 °C) bili značajno manji (26,78 %), nego kod plodova koji su pri - 80 °C postepeno smrznuti (46,32 %)
- Metoda sušenja liofilizacijom, uz prethodno naglo smrzavanje plodova borovnice u struji tekućeg dušika pri - 196 °C izazvala je najmanji gubitak fenolnih spojeva i stoga se smatra najprikladnijom metodom za sušenje, no visoka cijena operacije može predstavljati prepreku za njezinu učestaliju primjenu
- Materijal dobiven primjenom različitih metoda sušenja je lako kvarljiv, ljepljiv i nije pogodan za duže skladištenje budući sadrži znatnu količinu šećera koji brzo i lako vezuju vodu te je preporučljivo plodove sušiti uz primjenu inkapsulacijskih materijala

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

god. – godina

itd. - i tako dalje

dr. - drugi

SAD – Sjedinjene Američke Države

V. – *Vaccinium* – rod

CaCO₃ – kalcijev karbonat

ROS - Reactive Oxygen Species – Reaktivne Vrste Kisika (slobodni radikali na bazi kisika)

RNS – Reactive Nitrogen Species – Reaktivne Vrste Dušika (slobodni radikali na bazi dušika)

UV – ultra violet (ultraljubičasto)

R – radikal – supstituent

OGlu - *O*-β-D-glukopiranozid

LDL – Low-Density Lipoprotein – Lipoprotein Niske Gustoće

RH – Republika Hrvatska

PPO – Polyphenol Oxidase – enzim polifenol oksidaza

7. LITERATURA

1. Liović N. Utjecaj metoda obrade na biološku aktivnost i in vitro gastrointestinalnu stabilnost fenola iz kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) [Doktorska disertacija]. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet sveučilišta u Zagrebu; 2019.
2. Kole C, urednik. Genome Mapping and Molecular Breeding in plants: Fruits and Nuts. New York City, New York, SAD: Springer, 2007, str. 217-218.
3. Nayik GA i Gull A, urednici. Antioxidants in Fruits: Properties and Health benefits. New York City, New York, SAD: Springer, 2020, str. 592-608.
4. Caballero B, Finglas PM i Toldra F, urednici. Encyclopedia of Food and Health Volume 1: A-Che. Amsterdam, Nizozomska: Elsevier, 2016, str. 248-249, 391-392.
5. Retamales JB i Hancock JF, urednici. Blueberries, Crop Production Science in Horticulture. Wallingford, Ujedinjeno Kraljevstvo: CABI, 2018, str. 1-3, 18-19.
6. Malivuk M. Aklimatizacija i ukorjenjivanje borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) ex vitro [Diplomski rad]. Osijek, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2019.
7. URL: <https://www.gardenia.net/plant/vaccinium-corymbosum-patriot>
Pristupljeno 1.7.2023.
8. URL: https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=vaco
Pristupljeno: 30.10.2023.
9. URL:
<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=279992>
Pristupljeno: 30.10.2023.
10. URL: https://www.researchgate.net/figure/Double-sigmoidal-curve-of-grape-berry-growth-and-development-Grape-berry-development-can_fig1_234094294
Pristupljeno 30.10.2023.
11. Moore JN i Balington Jr. JR, urednici. Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. Leuven, Belgija: ISHS, 1991, str. 393-458.
12. URL: <https://plants.usda.gov/home/classification/65446>
Pristupljeno: 30.10.2023.
13. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:261823-2/general-information>
Pristupljeno: 24.2.2024.

14. URL: <https://pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Vaccinium+australe>
Pristupljeno: 24.2.2024.
15. URL: https://www.researchgate.net/figure/Different-types-of-blueberry-species-Vaccinium-spp_fig2_373236184
Pristupljeno: 24.2.2024.
16. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_myrtilloides#/media/File:Vaccinium_myrtilloides_berrries.jpg
Pristupljeno 24.2.2024.
17. URL: https://www.researchgate.net/figure/Different-types-of-blueberry-species-Vaccinium-spp_fig2_373236184
Pristupljeno 24.2.2024.
18. Marsh M, urednik. Blueberries: Harvesting Methods, Antioxidant Properties and Health Effects. New York City, New York, SAD: Novinka, 2016, str. 8-10, 16-17, 34-35.
19. URL: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients>
Pristupljeno: 24.2.2024.
20. Thoreau HD, urednik. Wild Fruits: Thoreau's Rediscovered Last Manuscript. New York City, New York, SAD: W.W. Norton, 2000, str. 30-36.
21. Trehane J, urednik. Blueberries, Cranberries and Other Vacciniums. Portland, Oregon, SAD: Timber Press, 2004.
22. Miljković I, urednik. Suvremeno voćarstvo. Zagreb, Hrvatska: Znanje, 1991.
23. Glavan I. Utjecaj sortne specifičnosti i ravnoteže hormona u hranjivoj podlozi mikropropagacije borovnice [Diplomski rad]. Osijek, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2019.
24. Zhao Y, urednik. Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion. Boca Raton, Florida, SAD: CRC Press, 2007, str. 11-13.
25. Dujmović Purgar D, Šindrak Z, Mihelj D, Voća S, Duralija B. Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. Pomologija Croatica. 2007;13(4):219-228.
URL: <https://hrcak.srce.hr/en/36221>
Pristupljeno 26.2.2024.
26. Ali A. Borovnica – uzgoj, kemijski sastav i mogućnosti prerade [Završni rad]. Koprivnica, Hrvatska: Odjel za Prehrambenu tehnologiju sveučilišta Sjever u Koprivnici, 2021.

27. Majhen I. Agroekonomski indikatori proizvodnje borovnice u Republici Hrvatskoj [Diplomski rad]. Osijek, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2020.
28. Đorđić N. Primjena kelatizirajućih spojeva sa željezom u mikropropagaciji borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) [Diplomski rad]. Osijek, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2021.
29. Galanakis CM, urednik. Food Bioactives and Health. New York City, New York, SAD: Springer, 2021, str. 1-41.
30. Segura-Campos MR, urednik. Bioactive Compounds: Health Benefit and Potential Applications. Sawston, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo: Woodhead Publishing, 2019, str. 33-50.
31. Soče M. Antioksidacijska aktivnost divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) [Diplomski rad].
32. Rodriguez-Daza MC, Pulido-Mateos EC, Lupien-Meilleur J, Guyonnet D, Desjardins Y, Roy D. Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Front. Nutr.* 2021;8:689456.
doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.689456>
33. Li B, Wang L, Bai W, Chen W, Chen F, Shu C, urednici. Anthocyanins: Chemistry, Processing & Bioactivity. Singapur, Singapur: Springer, 2021, str. 1-2, 19-32, 115-116, 118.
34. Varelis P, Melton L, Shahidi F, urednici. Encyclopedia of Food Chemistry. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, 2018, str. 10-11, 808, 810.
35. Warner LM, urednik. Handbook of Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits. New York City, New York, SAD: Novinka, 2014, str. 186-187, 189-190.
36. Deveoglu O, Karadag R. A Review on the Flavonoids – A Dye Source. *JEPS.* 2019;31(3):188-200.
doi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jeps/issue/48917/476514>
37. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2020;25(17):3809.
doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
38. Enaru B, Dretcanu G, Pop TD, Stanila A, Diaconeasa Z. Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants.* 2021;10(12):1967.
doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>

39. West ME, Mauer LJ. Color and Chemical Stability of a Variety of Anthocyanins and Ascorbic Acid in Solution and Powder Forms. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61(17):4169-4179.
doi: <https://doi.org/10.1021/jf400608b>
40. Kour J, Nayik GA, urednici. *Nutraceuticals and Health Care*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, 2021, str. 325.
41. Remini H, Dahmoune F, Sahraoui Y, Madani K, Kapranov VN, Kiselev EF. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2018;13(4):257-286.
doi: <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2018-13-4-257-286>
42. Zheng Y, Wang CY, Wang SY, Zheng W. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(24):7162-9.
doi: <https://doi.org/10.1021/jf030440k>
43. Lovrić T, urednik. *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Zagreb, Hrvatska: Hinus, 2003, 179-180, 207, 214-215.
44. Hnin KK, Zhang M, Mujumdar AS, Zhu Y. Emerging food drying technologies with energy-saving characteristics: A review. *Dry. Technol.* 2018;37(12):1465-1480.
doi: <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1510417>
45. Kudra T, Mujumdar AS, urednici. *Advanced Drying Technologies*. Boca Raton, Florida, SAD: CRC Press, 2009, str. 1-26.
46. Potter NN, Hotchkiss JH, urednici. *Food Science Fifth Edition*. Boston, Massachusetts, SAD: Aspen Publishing, 1998, str. 200-232.
47. URL:
<https://www.chemengonline.com/solids-drying-basics-and-applications/?printmode=1>
Pristupljeno: 1.3.2024.
48. URL: <https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Susenje.pdf>
Pristupljeno 1.3.2023.
49. Chandramohan VP. Convective drying of food materials: An overview with fundamental aspect, recent developments, and summary. *Heat Transfer*. 2020;49(3):1281-1313.
doi: <https://doi.org/10.1002/htj.21662>
50. Kilic EE, Cinar I. Convective hot air drying characteristics of selected vegetables. *Int. adv. res. eng. j.* 2019;3(1):007-013.
doi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/iarej/issue/44303/449564>
51. Pala-Rosas I, urednik. *Current Drying Processes*. London, Ujedinjeno Kraljevstvo: IntechOpen, 2019.

52. Calin-Sanchez A, Lipan L, Cano-Lamadrid M, Kharaghani A, Masztalerz K, Carbonell-Barrachina AA, i sur. Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs. *Foods*. 2020;9(9):1261.

doi: <https://doi.org/10.3390/foods9091261>

53. URL: <https://fooddryingoven.com/drying-ideas/fruits-vegetables-hot-air-drying-process.html>

Pristupljeno 2.3.2024.

54. Parikh DP. Vacuum Drying: Basics and Application. *Chemical Engineering*. 2015;122(4):48-54.

doi: <https://www.proquest.com/docview/1672755803?sourcetype=Trade%20Journals>

55. Bazyma LA, Kutovoy VA. Vacuum drying and hybrid technologies. *Stewart Postharvest Review*. 2005;1(4):1-4.

doi: <https://doi.org/10.2212/spr.2005.4.7>

56. URL: <https://www.bdrotarykilndryer.com/info/advantages-and-disadvantages-of-vacuum-dryer-33628590.html>

Pristupljeno: 3.3.2024.

57. URL: <https://pharmaguddu.com/vacuum-dryer/>

Pristupljeno: 3.3.2024.

58. Nowak D, Jakubczyk E. The Freeze-Drying of Foods-The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods*. 2020;9(10):1488.

doi: <https://doi.org/10.3390/foods9101488>

59. Marelja M, Dujmić F, Ježek D, Škegro M, Bosiljkov T, Karlović S, i sur. Vakuum sušenje u prehrambenoj industriji. *CJFSAU*. 2020;15(3-4):94-101.

doi: <https://hrcak.srce.hr/file/361535>

60. Berk Z, urednik. *Food Process Engineering and Technology*. Cambridge, Massachusetts, SAD: Academic Press, 2018, str. 567-568.

61. Fellows PJ, urednik. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. Sawston, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo: Woodhead Publishing, 2022, str. 619-620.

62. URL: https://www.researchgate.net/figure/Advantages-and-limitations-of-the-following-processes-freeze-drying-spray-drying-and_tbl2_353406932

Pristupljeno: 3.3.2024.

63. URL: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/lyophilization-parenteral-793>
Pristupljeno 3.3.2024.
64. Elez Garofulić I, Dragović-Uzelac V, Režek Jambrak A, Jukić M. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*), J. Food Eng. 2013;117(4):437–442.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043>
65. Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Kurtanjek Ž, Elez Garofulić I. Kinetics of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols Degradation During Heat Treatments of Freeze-Dried Sour Cherry Marasca Paste. Food technology and biotechnology. 2014;52(1):101-108.
doi: <https://hrcak.srce.hr/118565>
66. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16:144-158.
doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144
67. Akcicek A, Avci E, Tekin-Cakmak ZH, Kasapoglu MZ, Sagdic O, Karasu S. Influence of Different Drying Techniques on the Drying Kinetics, Total Bioactive Compounds, Anthocyanin Profile, Color, and Microstructural Properties of Blueberry Fruit. ACS Omega. 2023;8(44):41603-41611.
doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05749>
68. Muñoz-Fariña O, López-Casanova V, García-Figueroa O, Roman-Benn A, Ah-Hen K, Bastias-Montes JM, i sur. Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chemistry Advances. 2023;2:100171.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100171>
69. Nemzer B, Vargas L, Xia X, Sintara M, Feng H. Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. Food Chem. 2018;262:242-250.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.047>
70. Ochmian I, Blaszak M, Lachowicz S, Piwowarczyk R. The impact of cultivation systems on the nutritional and phytochemical content, and microbiological contamination of highbush blueberry. Sci Rep. 2020;10(1):16696.
doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73947-8>

8. PRILOZI

Prilog 1.

Tip studije	Učinak	Mehanizam djelovanja
<i>In vitro</i>	antidijabetičko	Povećanje unosa glukoze poboljšanjem osjetljivosti na inzulin Smanjena regulacija glukoza-6-fosfataze (G6Pase) Povećano lučenja peptida sličnom glukagonu (GLP)-1
	protuupalno	Smanjena regulacija upalnog signalnog puta Inihbicija nuklearne translokacije upalnih molekula u makrofagima
	spječavanje i poboljšavanje kardiovaskularnih oboljenja	Inhibicija 15-lipoksigenaze i ksantin oksidaze Povećanje protein kinaze B (Akt) i fosforilacije sintaze endotelnog dušikovog oksida
	neurozaštita	Suzbijanje smrti dopaminergičkih stanica i oslobađanje nitrita iz stanica mikroglije Poboljšanje vitalnosti stanica, normalizacija potencijala mitohondrijske membrane i razine kalcija te smanjena smrt neuronskih stanica

<i>In vivo</i>	antidijabetičko	<p>Aktivacija AMPK i ekspresija prijenosnika glukoze membrane.</p> <p>Smanjena regulacija G6Pase</p> <p>Aktivacija fosforilacije inzulinskog receptora, povećan unos glukoze, sprječavanje apoptoze stanica gušterače</p>
	protuupalno	<p>Smanjenje upalnih molekula (interleukin-6, monocitni kemoatraktantni protein-1 i nekroza tumora faktor-a)</p> <p>Smanjena regulacija inducibilne sintaze (iNOS) dušikovog oksida i COX-2</p>
	spječavanje i poboljšavanje kardiovaskularnih oboljenja	<p>Smanjenje srednjeg arterijskog krvnog tlaka (za 5-15 mmHg) i broja otkucaja srca (za približno 100 otkucaja u minuti) nakon srčane ozljede izazvane ciklofosamidom</p> <p>Poboljšanje srčane disfunkcije i hipertrofije lijeve klijetke</p>

		Smanjenje razine citokina (za približno 100 pg/mL) i povećanje antioksidativne aktivnosti superoksid dismutaze (za približno 3 UI/mL) nakon izlaganja finim česticama
	neurozaštita	Smanjenje povećanja neurotoksičnosti izazvane glutatomom i povećanje sadržaja glutaciona i drugih endogenih antioksidansa Poboljšanje glutamatergičke neurotransmisije, sinaptičke disfunkcije, i neuralne apoptoze stimulacijom specifičnih putova u hipokampusu