

# UTJECAJ POSTUPAKA SUŠENJA NA MIKROSTRUKTURU PLODA KULTIVIRANE BOROVNICE (VACCINIUM CORYMBOSULUM L.)

---

Hvizdak, Marita

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:496073>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UTJECAJ POSTUPAKA SUŠENJA NA MIKROSTRUKTURU PLODA**  
**KULTIVIRANE BOROVNICE (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARITA HVIZDAK**

**Matični broj: 133**

**Split, rujan 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**UTJECAJ POSTUPAKA SUŠENJA NA MIKROSTRUKTURU**  
**PLODA**  
**KULTIVIRANE BOROVNICE (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARITA HVIZDAK**

**Matični broj: 133**

**Split, rujan 2023.**

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

**IMPACT OF DRYING PROCESS ON MICROSTRUCTURE  
CHARACTERISTICS OF CULTIVATED BLUEBERRY  
(*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

**BACHELOR THESIS**

**MARITA HVIZDAK**

**Parent number: 133**

**Split, September 2023**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Mentor:** Prof. dr. sc. Tea Bilušić

### UTJECAJ POSTUPAKA SUŠENJA NA MIKROSTRUKTURU PLODA KULTIVIRANE BOROVNICE (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

Marita Hvizdak, 133

#### Sažetak:

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je najvažnija komercijalna borovnica koja se konzumira u ljudskoj prehrani. Rod *Vaccinium* iz porodice *Ericaceae* obuhvaća velik broj vrsta koje za rast zahtijevaju dovoljnu količinu svjetlosti i kiselu sredinu pa se pronalaze u sredinama koje zadovoljavaju takvim uvjetima. Borovnice sadrže bogatstvo fitokemikalija koje pridonose zaštiti i očuvanju zdravlja ljudskog organizma. Različiti čimbenici (uzgoj, geografska regija, uvjeti skladištenja, zrelost, klima) utječu na njezin kemijski sastav i kvalitetu, a zbog visokog udjela vode i šećera, borovnica je bobičasto voće koje je vrlo lako podložno kvarenju. U ovom radu istražen je utjecaj različitih postupaka sušenja (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje, liofilizacija s različitim tehnikama smrzavanja) na mikrostrukturu plodova kultivirane borovnice. Nakon konvekcijskog i vakuumske postupka sušenja, osušeni uzorci samljeveni su mlinom s noževima, a za liofilizirani uzorak ispitivana je razlika u mikrostrukturi plodova upotrebom mlina s noževima i kugličnog mlina. Za uspoređivanje razlika u mikrostrukturi svježih uzoraka i osušenih uzoraka primjenom konvekcijskog sušenja, vakuumske sušenja te sušenja liofilizacijom, korištena je tehnika svjetlosne mikroskopije. Za sve uzorke korištena su ista povećanja (4 i 20 puta). Upotrebom pretražne elektronske mikroskopije istražena je i razlika u mikrostrukturi liofiliziranih plodova nakon različite predobrade uzoraka smrzavanjem (pri temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i u struji tekućeg dušika na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon različitog načina mljevenja (mlin s noževima i kuglični mlin).

**Cljučne riječi:** borovnica, sušenje, mikroskopija, SEM, DLS

**Rad sadrži:** 42 stranice, 30 slika, 1 tablicu, 66 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

- |                                            |             |
|--------------------------------------------|-------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Marija Čosić         | član        |
| 3. prof. dr.sc. Tea Bilušić                | mentor      |

#### Datum obrane:

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Undergraduate Study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Supervisor:** Tea Bilušić, Full professor

### IMPACT OF DRYING PROCESS ON MICROSTRUCTURE CHARACTERISTICS OF CULTIVATED BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

Marita Hvizdak, 133

#### **Abstract:**

Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is the most important commercial blueberry consumed in the human diet. The genus *Vaccinium* from the Ericaceae family includes a large number of species that require a sufficient amount of light and an acidic environment for growth, so they are found in environments that meet such conditions. Blueberries contain a wealth of phytochemicals that contribute to the protection and preservation of the health of the human body. Various factors (cultivation, geographical region, storage conditions, maturity, climate) affect its chemical composition and quality, and due to the high content of water and sugar, the blueberry is a berry that is very susceptible to spoilage. In this paper, the influence of different drying procedures (convection drying, vacuum drying, lyophilization with different freezing techniques) on the microstructure of cultivated blueberry fruits was investigated. After the convection and vacuum drying process, the dried samples were ground with a knife mill, and for the lyophilized sample, the difference in the microstructure of the fruits was examined using a knife mill and ball mill. To compare the differences in the microstructure of fresh samples and dried samples using convection drying, vacuum drying and lyophilization drying, the technique of light microscopy was used. The same magnifications (4 and 20 times) were used for all samples. Using scanning electron microscopy, the difference in the microstructure of lyophilized fruits was investigated after different pretreatment of samples by freezing (at a temperature of - 80 °C and in a stream of liquid nitrogen at -196 °C) and after different methods of grinding (knife and ball mill).

**Keywords:** blueberry, drying, microscopy, SEM, DLS

**Thesis contains:** 42 pages, 30 figures, 1 table, 66 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:**

- |                                              |              |
|----------------------------------------------|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, Ph.D., Assoc. Prof. | chair person |
| 2. Marija Ćosić, Ph.D., Assoc. Prof.         | member       |
| 3. Tea Bilušić, Ph.D., Full Prof.            | supervisor   |

#### **Defence date:**

**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.

*Završni rad je izrađen u Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić u periodu od siječnja do srpnja 2023. godine.*

## ZAHVALA

*Na prvom mjestu od srca se želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić na stručnom vodstvu, ogromnom trudu i uloženom vremenu pri izradi i pisanju ovoga rada.*

*Zahvaljujem se od srca izv. prof. dr. sc. Mariji Ćosić s Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu na pomoći pri interpretaciji rezultata dobivenih DLS tehnikom te prof. dr. sc. Anti Bilušić i prof. dr. sc. Ivani Bočini s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu pri pomoći u obradi uzoraka korištenjem svjetlosne i pretražne elektronske mikroskopije.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji na potpori, motivaciji i pomoći tijekom svih godina studiranja.*



## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak ovog završnog rada bio je ispitati razlike u mikrostrukturi plodova kultivirane borovnice osušenih različitim metodama (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje, liofilizacija s različitim tehnikama smrzavanja plodova) te ispitati razlike u mikrostrukturi liofiliziranih uzoraka plodova kultivirane borovnice nakon različite predobrade uzoraka smrzavanjem i nakon različitog načina mljevenja osušenih uzoraka.

## SAŽETAK

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je najvažnija komercijalna borovnica koja se konzumira u ljudskoj prehrani. Rod *Vaccinium* iz porodice *Ericaceae* obuhvaća velik broj vrsta koje za rast zahtijevaju dovoljnu količinu svjetlosti i kiselu sredinu pa se pronalaze u sredinama koje zadovoljavaju takvim uvjetima. Borovnice sadrže bogatstvo fitokemikalija koje pridonose zaštiti i očuvanju zdravlja ljudskog organizma. Različiti čimbenici (uzgoj, geografska regija, uvjeti skladištenja, zrelost, klima) utječu na njezin kemijski sastav i kvalitetu, a zbog visokog udjela vode i šećera, borovnica je bobičasto voće koje je vrlo lako podložno kvarenju. U ovom radu istražen je utjecaj različitih postupaka sušenja (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje, liofilizacija s različitim tehnikama smrzavanja) na mikrostrukturu plodova kultivirane borovnice. Nakon konvekcijskog i vakuumske postupka sušenja, osušeni uzorci samljeveni su mlinom s noževima, a za liofilizirani uzorak ispitivana je razlika u mikrostrukturi plodova upotrebom mlina s noževima i kugličnog mlina. Za uspoređivanje razlika u mikrostrukturi svježih uzoraka i osušenih uzoraka primjenom konvekcijskog sušenja, vakuumske sušenja te sušenja liofilizacijom, korištena je tehnika svjetlosne mikroskopije. Za sve uzorke korištena su ista povećanja (4 i 20 puta). Upotrebom pretražne elektronske mikroskopije istražena je i razlika u mikrostrukturi liofiliziranih plodova nakon različite predobrade uzoraka smrzavanjem (pri temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i u struji tekućeg dušika na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon različitog načina mljevenja (mlin s noževima i kuglični mlin). Rezultati ovog istraživanja pokazali su nam vizualnu razliku osušenih uzoraka konvekcijskim i vakuumskim postupkom sušenja u odnosu na sušenje liofilizacijom. Primjenom svjetlosne mikroskopije uočili smo da kod uzoraka osušenih plodova struktura stanica kože ostaje sačuvana pri svim navedenim postupcima sušenja, ali da primjenom konvekcijskog i vakuum sušenja dolazi do veće degradacije tkiva u odnosu na primjenu liofilizacijom. Pretražnom elektronskom mikroskopijom uočili smo da pri mljevenju mlinom s noževima i smrzavanjem u struji tekućeg dušika prije postupka liofilizacije dobivamo homogeniji uzorak te smo kod takvog uzorka odredili veličinu i raspršivanje čestica DLS metodom. Uočljivo je da je veličina čestica bila uglavnom u području 3000 nm.

**Ključne riječi:** borovnica, sušenje, mikroskopija, SEM, DLS

## ABSTRACT

Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is the most important commercial blueberry consumed in the human diet. The genus *Vaccinium* from the Ericaceae family includes a large number of species that require a sufficient amount of light and an acidic environment to grow, so they are found in environments that meet such conditions. Blueberries contain a wealth of phytochemicals that contribute to the protection and preservation of the health of the human body. Various factors (cultivation, geographical region, storage conditions, maturity, climate) affect its chemical composition and quality, and due to the high content of water and sugar, the blueberry is very susceptible to spoilage. In this research, the influence of different drying procedures (convection drying, vacuum drying, lyophilization with different freezing techniques) on the microstructure of cultivated blueberry fruits was investigated. After the convection and vacuum drying process, the dried samples were ground with a knife mill and for the lyophilized sample we examined the difference in the microstructure of the fruits using a knife and ball mill. To compare the differences in the microstructure of fresh samples and dried samples using convection drying, vacuum drying and lyophilization drying, we used the light microscopy technique. The same magnifications (4 and 20 times) were used for all samples. Using scanning electron microscopy, the difference in the microstructure of lyophilized fruits was investigated after different pretreatment of samples by freezing (at a temperature of -80 °C and in a stream of liquid nitrogen at -196 °C) and after different methods of grinding (knife and ball mill). The results of this research show us the visual difference between samples dried by convection and vacuum drying compared to drying by lyophilization. Using light microscopy, we observed that in the case of dried fruit samples, the skin cell structure remains preserved during all the mentioned drying procedures, but that with the application of convection and vacuum drying, there is a greater degradation of the tissue compared to the use of lyophilization. Using scanning electron microscopy, we observed that using a knife mill and freezing in a stream of liquid nitrogen before the lyophilization process, we obtained a more homogeneous sample, and we determined the size and dispersion of the particles in such a sample using the DLS method. It is noticeable that the size of the particle was mainly in the range of 3000 nm.

**Keywords:** blueberry, drying, microscopy, SEM, DLS

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
<b>1. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
1.1. Bobičasto voće – karakteristike i nutritivni značaj .....	2
1.1.1. Kultivirana borovnica ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) .....	3
1.2. Postupci sušenja .....	5
1.2.1. Konvekcijsko sušenje .....	6
1.2.2. Vakuum sušenje .....	7
1.2.3. Liofilizacija .....	7
2.3. Mikroskopija .....	9
2.3.1. Svjetlosna mikroskopija .....	10
2.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .....	12
2.3.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) .....	14
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
2.1. Biljni materijal .....	16
2.2. Određivanje sadržaja vode i suhe tvari u svježim plodovima kultivirane borovnice .....	16
2.3. Postupak sušenja .....	17
2.3.1. Konvekcijsko sušenje .....	17
2.3.2. Vakuum sušenje .....	17
2.3.3. Sušenje liofilizacijom .....	17
2.4. Mljevenje osušenih plodova kultivirane borovnice .....	19
2.5. Određivanje veličine čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) .....	20
2.6. Mikroskopija .....	20
2.6.1. Svjetlosna mikroskopija .....	20
2.6.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .....	22
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>24</b>
3.1. Sadržaj vode i suhe tvari u svježim plodovima kultivirane borovnice te morfološka komparacija plodova nakon različitih tehnika sušenja .....	24
3.2. Određivanje veličine čestica liofiliziranih plodova kultivirane borovnice .....	26
3.3. Mikrostruktura svježih i osušenih plodova kultivirane borovnice uz pomoć svjetlosne mikroskopije .....	27

<b>3.4. Mikrostruktura liofiliziranih plodova kultivirane borovnice uz skenirajuće elektronske mikroskopije.....</b>	<b>29</b>
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>

## UVOD

Poznato je da bobičasto voće obiluje bogatstvom antioksidansa, dijetalnim vlaknima i različitim fitokemikalijama te da svojom bojom privlači pozornost, a teksturom, ugodnom aromom i slatkim okusom predstavlja nutritivno bogatu i ukusnu namirnicu. Borovnice pripadaju rodu *Vaccinium* koji je u Hrvatskoj zastupljen sa četiri vrste: *Vaccinium myrtillus* (obična borovnica), *Vaccinium vitis-idaea* (brusnica), *Vaccinium uliginosum* (močvarna borovnica) i *Vaccinium corymbosum* (kultivirana borovnica).

Kultivirana borovnica je u Hrvatsku uvezena iz SAD-a i smatra se introduciranom vrstom. Njezin uzgoj započeo je u SAD-u te se zato još naziva i američka borovnica. Mnogi čimbenici utječu na kemijski sastav borovnice, a zdravstveno najvažniji spojevi borovnice su fenoli koji uključuju flavonoide, tanine, fenolne kiseline i ostale spojeve. Zahvaljujući nizu gore navedenih bioaktivnih spojeva koje sadrže, potvrđeno je da borovnice zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i ostalih bioloških svojstava imaju povoljan učinak na zdravlje.

Cilj ovog istraživanja je ispitati razlike u mikrostrukturi osušenih plodova kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) primjenom različitih metoda sušenja (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje, liofilizacija s različitim tehnikama smrzavanja plodova).

Primjenom konvekcijskog sušenja, vakuum sušenja i sušenja liofilizacijom, cilj je ispitati razlike u mikrostrukturi plodova kultivirane borovnice nakon istog načina mljevenja (mlin s noževima) upotrebom svjetlosne mikroskopije pri istim povećanjima.

Cilj je ispitati i razliku u mikrostrukturi liofiliziranog uzorka plodova kultivirane borovnice nakon različite predobrade uzorka smrzavanjem (pri temperaturi od – 80 °C i u struji tekućeg dušika na – 196 °C) i nakon različitog načina mljevenja (kuglični mlin i mlin s noževima) upotrebom pretražne elektronske mikroskopije.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Bobičasto voće – karakteristike i nutritivni značaj

Voće predstavlja plodove višegodišnjih, kultiviranih ili samoniklih biljaka koji se konzumiraju za ljudsku prehranu.<sup>1</sup> Sa botaničkog aspekta, to je specijalizirano biljno tkivo koje okružuje sjemenku. Zdrava je i neophodna namirnica za pravilno funkcioniranje i očuvanje zdravlja ljudskog organizma.<sup>2</sup>

Prema klasičnoj podjeli, posebnu skupinu voća čini sitno, jagodasto ili bobičasto voće koje ima sjemenke u plodnom mesu ili na samoj površini ploda. Bobičasto voće ima meku, osjetljivu i nezaštićenu strukturu, a zbog visokog udjela vode i šećera vrlo je lako podložno kvarenju. Osim u svježem i smrznutom obliku, bobičasto voće se konzumira i kao prerađeni i dobiveni proizvodi koji uključuju sušeno i konzervirano voće, pića, jogurte, džemove i žele. <sup>3,4</sup>

Prema građi plodova dijeli se u tri skupine:

- stolno grožđe, ribizli, ogrozdi, brusnice i borovnice
- maline i kupine
- vrtne i šumske jagode

Bobičasto voće sadrži visoku razinu različitih fitokemikalija koje uključuju niz korisnih spojeva poput fenolnih molekula, esencijalni masnih kiselina, vitamina, minerala i dijetalnih vlakana. Najvažniji spojevi prisutni u bobičastom voću su fenolne molekule koje uključuju flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli), tanine (proantocijanidini, elagitanini) i pojedine fenolne kiseline (hidroksibenzojeva kiselina). Bobičasto voće je važan izvor provitamina A, C i E. Sadrži oko 15 % topljivih krutih tvari (koji su uglavnom šećeri), a njihova visoka razina fruktoze važna je osobama s dijabetesom. Od ostalih poznatih kemopreventivnih sredstava prisutni još vitamini B-kompleksa (folna kiselina), minerali (kalcij i selen); karotenoidi (karoten i lutein); fitosteroli (sitosterol i stigmasterol) i triterpenski esteri. Vrlo je važan visok sadržaj dijetalnih vlakana jer voćni pektin djeluje kao crijevni regulator.<sup>5,6,7</sup>

Kemijski sastav ovisi o različitim čimbenicima, kao što su uzgoj, geografska regija, uvjeti skladištenja, zrelost i klima. Ti čimbenici mogu promijeniti kvalitetu bobičastog voća, njihov bioaktivni sadržaj i antioksidativni kapacitet.<sup>8</sup> Mnoge laboratorijske studije dokazale su da bobičasto voće ima antikancerogena, antioksidativna i antiproliferativna svojstva. Upravo zbog toga bobičasto voće predstavlja najzastupljenije voće u ljudskoj prehrani jer se konzumacijom takvog voća, bogatog hranjivim tvarima i fitokemikalijama, mogu spriječiti razne bolesti i poremećaji.<sup>4,9,10</sup>

### **1.1.1. Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) pripada rodu *Vaccinium* koji obuhvaća grmolike biljke iz porodice *Ericaceae*. Najvažnija je komercijalna borovnica koja se u ljudskoj prehrani koristi u svježem ili prerađenom obliku.<sup>11,12</sup>

Porodica *Ericaceae* na području Hrvatske obuhvaća oko 20 vrsta različitih rodova. Rod *Vaccinium* koji pripada porodici *Ericaceae* obuhvaća velik broj vrsta rasprostranjenih u hladnim, umjereno toplim i tropskim područjima. Te vrste za rast zahtijevaju kiselu sredinu i dovoljnu količinu svjetlosti. One dolaze u skupinama pa se zato pronalaze u sredinama koje zadovoljavaju takvim uvjetima, kao što su svijetle šume, rubovi šuma ili otvoreni prostori. U Hrvatskoj je rod *Vaccinium* zastupljen sa četiri vrste: *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Vaccinium uliginosum*, dok se četvrta vrsta *Vaccinium corymbosum* smatra kao „pridošlica“.<sup>13</sup>

*Vaccinium myrtillus* ili obična borovnica je nizak, razgranat listopadni grm visine 20-50 cm. Plod je sočna, plavocrna boba veličine graška i čini najrašireniju vrstu u Hrvatskoj.

*Vaccinium vitis-idaea* ili brusnica je grmolika biljka zimzelenih listova koja naraste u visinu do 30 centimetara. Plod je boba crvene boje koja je poznata javnosti kao prirodni antibiotik zbog svojih ljekovitih svojstava.

*Vaccinium uliginosum* ili močvarna borovnica je višegodišnja biljka s dugim podankom iz kojeg izbijaju grane koje oblikuju grmove. Na vrhu se razvijaju zvonasti cvjetovi bijele ili ružičaste boje iz kojih se razvijaju bobice modre boje s pepeljastom prevlakom i ona čini najmanje istraženu vrstu.





**Slika 1.** Obična borovnica<sup>14</sup>



**Slika 2.** Brusnica<sup>15</sup>



**Slika 3.** Močvarna borovnica<sup>16</sup>

*Vaccinium corymbosum* ili kultivirana borovnica je višegodišnja drvenasta biljka koja ima razgranati korijen i stabljiku, a listovi su jajoliko duguljasti, cjelovitog ruba. Plod je tamnoplava mesnata boba s ostacima čaške na vrhu, a od cvatnje do početka dozrijevanja boba prođe 60-90 dana. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), uzgoj borovnica je započeo 1893. godine, dok je u Hrvatskoj 1964. godine posađena prva američka borovnica pa se zato kultivirana borovnica još naziva i američka borovnica. Na slici 4. prikazana je kultivirana borovnica.



**Slika 4.** Kultivirana borovnica<sup>17</sup>

Bogatstvo fitokemikalija čini ju dobrim izvorom flavonoida, antocijana, fenolnih kiselina i ostalih različitih fenolnih spojeva koji utječu na boju, aromu, okus i nutritivnu vrijednost. Osim fenolnih spojeva, prisutni su i ostali nutritivni spojevi kao što su šećeri, eterična ulja, vitamini i minerali.<sup>18,19</sup>

U svježem stanju ona sadrži oko 84 % vode, 9,7 % ugljikohidrata, 0,6 % proteina i 0,4 % masti. Također je dobar izvor dijetalnih vlakana koji čine 3-3,5 % mase ploda.<sup>20</sup> Na 100 grama njezina prosječna energetska vrijednost je niska; iznosi oko 57 kcal. Svoju maksimalnu količinu hranjivih tvari i okusa zadržava u svježem stanju.<sup>21</sup>

Osim arome i dobrog okusa, predstavlja dobar izvor vitamina C jer je askorbinska kiselina u svježem voću prisutna u vrlo visokom udjelu.<sup>22</sup> Elementi u tragovima posjeduju regulatornu aktivnost ili djeluju kao kofaktori za razne enzimske sustave te imaju važnu ulogu u funkcioniranju ljudskog tijela.<sup>23</sup>

Zbog svojih bioaktivnih spojeva, kultivirana borovnica ima snažna antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna i protuupalna svojstva, te su brojna istraživanja potvrdila da njezina fitokemijska raznolikost ima povoljan učinak na zdravlje.<sup>18,19,24,25</sup>

## **1.2. Postupci sušenja**

Jedna od najstarijih i najraširenijih metoda konzerviranja hrane je sušenje.<sup>26</sup> Sušenje je operacija toplinskog uklanjanja vlage iz vlažnog materijala u cilju dobivanja čvrstog proizvoda.<sup>27</sup> Postupkom sušenja uklanja se dio vode iz čvrste tvari pri čemu se smanjuje vlažnost površine tvari te voda difundira iz unutrašnjosti prema površini tvari zbog nastale razlike koncentracija.<sup>28</sup> Sušenje je kompleksni proces koji uključuje prijenos mase i topline, a najvažniji cilj je produženje roka trajnosti hrane. Osim produženja roka trajnosti, sušenjem se smanjuje masa i volumen proizvoda čime se olakšava pakiranje, skladištenje i transport.<sup>29</sup> Mali udio vode u proizvodu sprječava rast i razvoj mikroorganizama, smanjuje i eliminira druge reakcije kvarenja u prisustvu vlage koje utječu na stabilnost i kvalitetu proizvoda te je poželjno da vlažnost materijala ne prelazi 10%.<sup>30,31</sup>

Prema načinu dovođenja topline postoje različite metode sušenja:<sup>32,33</sup>

- konvekcijsko sušenje: prijenos topline se ostvaruje neposrednim kontaktom zagrijanog plina (najčešće zrak) 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

### **1.2.1. Konvekcijsko sušenje**

Konvekcijsko sušenje je jeftina i jednostavna tehnika sušenja sa vrućim zrakom koja se koristi kao metoda dehidracije. Bobice voća u direktnom su kontaktu sa vrućim zrakom koji zagrijava materijal i odnosi vlagu iz njega. Prijenos topline odvija se sa površine u unutrašnjost voća, poticanjem izmjene vlage između proizvoda i vrućeg zraka koji struji u komori za sušenje.<sup>34,35</sup>

Iako tijekom procesa dolazi do isparavanja na površini, potrebno je ispariti vezanu vodu jer tek nakon razdoblja pada brzine proces omogućuje dobivanje sigurnog osušenog proizvoda.<sup>36</sup> Međutim zagrijavanje namirnice tijekom duljeg vremenskog perioda može rezultirati mehaničkim, fizikalnim, kemijskim i/ili nutritivnim promjenama unutar proizvoda.<sup>37</sup>

Isto tako zbog visokog sadržaja vlage i visokog tlaka pare unutar ploda, kod mekih bobica može doći do deformacije i pucanja. Ako je isparavanje s njezine površine presporo, vlaga unutar materijala jedva difundira prema van i dolazi do smanjenja brzine sušenja, pa čak sazrijevanja i pojave plijesni.<sup>38</sup>

Za razliku od ostalih postupaka sušenja proizvoda, konvekcijsko sušenje najčešća je metoda zbog povoljne cijene i jednostavne izvedbe postupka, dok se u kombinaciji sa ostalim postupcima, kao što je vakuum sušenje, dobiva kvalitetniji proizvod.<sup>37</sup>

### 1.2.2. Vakuum sušenje

Vakuum sušenje je metoda sušenja koja je prikladna za voće osjetljivo na visoke temperature i reakcije oksidacije. Primjenom nižih temperatura i tlakova u odsustvu kisika dobivamo kvalitetan proizvod s nižim udjelom vlage.<sup>39,40</sup>

Temperatura ključanja vode kod vakuum sušenja može se sniziti ispod 100 °C jer je tlak u komori za sušenje niži od atmosferskog. Tada će se tlak pare kapljevine izjednačiti s nižim atmosferskim tlakom pri nižoj temperaturi. Temperature sušenja kreću se od 35 °C do 60 °C te se proizvodi u vakuumu suše pri nižim temperaturama u odnosu na ostale postupke. Toplina se najčešće prenosi kontaktnim putem, a vrlo rijetko radijacijom. Na učinkovitost metode sušenja utječe odabir odgovarajućih parametara kao što su temperatura, tlak i brzina protoka topline.<sup>33,38,41</sup>

Proces sušenja odvija se u visokom vakuumu čime su spriječene oksidacijske promjene. Niska temperatura sušenja i uklanjanje velike količine vode štite termički osjetljive komponente što pridonosi poboljšanju kvalitete proizvoda. Osušeni proizvodi mogu se čuvati na sobnoj temperaturi, a sušiti se može i osjetljivo voće uz minimalne promjene u volumenu, sastavu ili svojstvima. Zbog toga je kvaliteta osušenih proizvoda primjenom vakuum sušenja bolja u odnosu na ostale metode. Međutim glavni nedostatak ove metode je skup postupak. Iz tog razloga ova metoda se rjeđe primjenjuje u prehrambenoj industriji, ali se vrlo često koristi u kombinaciji sa nekim drugim metodama sušenja.<sup>42,43</sup>

### 1.2.3. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem je tehnika vakuumskog sušenja za dehidraciju namirnica. Tim postupkom uklanja se voda iz osjetljivog materijala koji se ne suši ili se suši nedovoljno primjenom uobičajenih postupaka sušenja. Voda se uklanja iz prethodno zamrznutog proizvoda sublimacijom tj. prijelazom vode iz čvrste u plinovitu fazu djelovanjem topline pod odgovarajućim vakuumom.<sup>26,38</sup>

Postupak se sastoji od operacija zamrzavanja i dehidracije (sublimacije i desorpcije) te se odvija u tri glavne faze:

- faza zamrzavanja
- sušenje sublimacijom leda pod vakuumom
- faza skrućivanja

U prvoj fazi odvija se hlađenje proizvoda u kojem se materijal hladi od svoje početne temperature do temperature ledišta. Do promjene faza dolazi u drugoj fazi pri čemu tekuća faza prelazi u krutu fazu. U toj fazi sublimacije ili tzv. primarnoj dehidraciji uklanja se voda u obliku leda, tj. dolazi do uklanjanja slobodne vode. Zagrijavanjem zamrznutog proizvoda dolazi do sublimacije kristala leda te na taj način proizvod dehidratira bez promjene oblika poprimajući finu poroznu strukturu. U trećoj fazi desorpciji ili tzv. sekundarnoj dehidraciji uklanja se kapilarna voda ili ona voda koja nije bila izdvojena u obliku leda. Nakon nestanka tragova leda ta voda se uklanja zagrijavanjem proizvoda kroz određeno vrijeme pod vakuumom kod navedenih temperatura. Taj postupak najčešće se provodi u uređaju za liofilizaciju prikazanom na slici 5.



**Slika 5.** Liofilizator<sup>44</sup>

Liofilizacija je jedna od najvažnijih metoda kojom se dobiva osušeni proizvod visoke kvalitete u kojem su zadržani bioaktivni spojevi u vrlo visokom udjelu.<sup>34,40</sup> Budući da

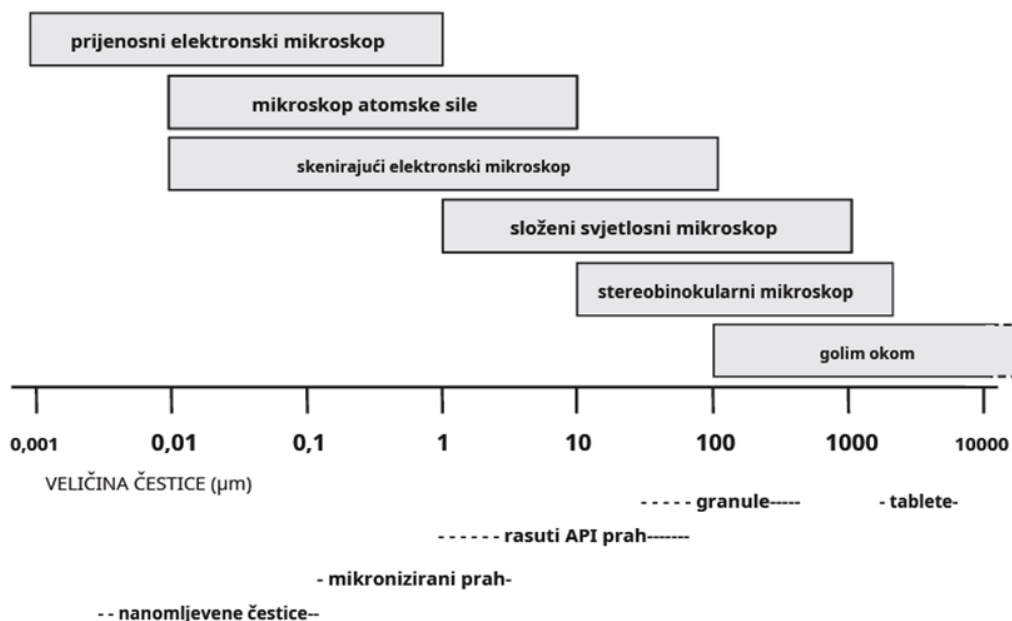
se proizvod dehidrira u zamrznutom stanju pod vakuumom na niskim temperaturama (ispod  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a u završnoj fazi temperatura sušenja ne prelazi  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , proizvod na taj način zadržava svoju strukturu, oblik, kemijski sastav i senzorska svojstva.<sup>45</sup>

Osim navedenih prednosti kao što su minimalne promjene oblika, boje, arome, okusa i strukture, primjenom liofilizacije smanjuje se težina proizvoda, a time su smanjeni troškovi transporta i skladištenja.

### **2.3. Mikroskopija**

Mikroskopija predstavlja brz, svestran i nedestruktivan način za analizu i karakterizaciju malih količina uzorka za širok raspon fizikalno-kemijskih svojstava, kao što su oblik i veličina čestica, optička svojstva, svojstva površine, kristalografija, kristalizacija, ponašanje pri otapanju i toplinsko ponašanje. Ona obuhvaća širok raspon tehnika koje daju slike uzoraka pri malim povećanjima kako bi se prikazale značajke velikih razmjera pa sve do velikih povećanja kako bi se dobile informacije na atomskoj razini. Korištenjem mikroskopskih metoda iz samo male količine uzorka može se dobiti velik broj korisnih informacija što je posebno važno kada je količina materijala ograničena.<sup>46</sup>

Izbor odgovarajućeg mikroskopa ovisi o razini ispitivanja i potrebnim informacijama koje se traže. Svjetlosni mikroskop, tj. mikroskop propuštenog svjetla koristi se za proučavanja optičkih svojstava ili određivanja oblika i veličina čestica u prahu. Kod proučavanja površina i mjerenja vrlo malih čestica koje se ne mogu prikladno razdvojiti svjetlosnim mikroskopom, koristi se elektronski mikroskop. U slučaju kada je potrebna atomska rezolucija, koristi se mikroskop atomskih sila. Vrsta mikroskopa koji se primjenjuje za mjerenje čestica u određenom uzorku ovisi o rasponu veličine čestica koje sadrži. Na slici 6. prikazan je dijagram raspona veličina čestica i različitih mikroskopskih metoda.<sup>46</sup>



**Slika 6.** Dijagram raspona veličina čestica i različitih mikroskopskih metoda

Budući da je svaka od navedenih tehnika komplementarna, za ispitivanje uzoraka bilo bi korisno koristiti više od jedne tehnike tako da se ne propuste važne značajke.<sup>46</sup>

### 2.3.1. Svjetlosna mikroskopija

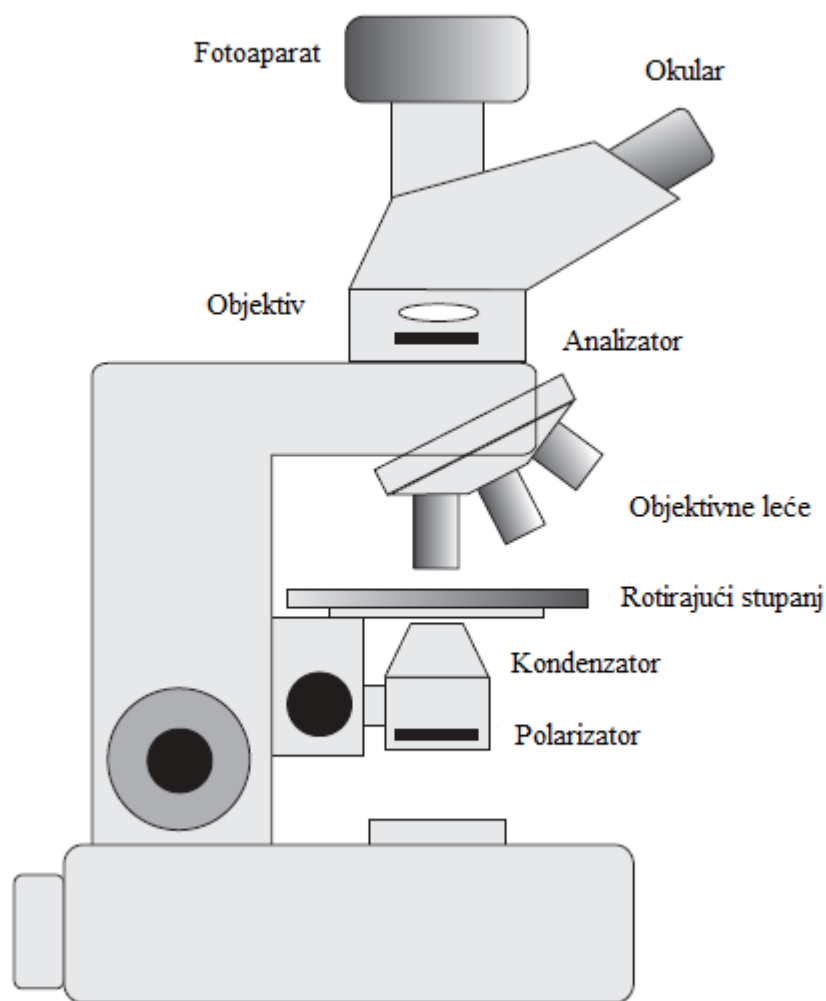
Svjetlosna ili optička mikroskopija predstavlja vrlo važnu tehniku kojom se povezuju analitički podaci koji su dobiveni drugim tehnikama tijekom fizikalno-kemijske karakterizacije spojeva ili se objašnjavaju uočene promjene oblika kristala.<sup>46,47</sup>

Prvi složeni mikroskop sastavljen od dvije konveksne leće postavljene u metalnu cijev izumio je Hans Janssen 1590. godine. 250 godina kasnije, William Fox Talbot izumio je polarizirajući svjetlosni mikroskop te je taj izum ključan u počecima proučavanja anorganskih i organskih kristala iz čega se kasnije razvila znanost o optičkoj kristalografiji.<sup>46</sup>

Svjetlosnom mikroskopijom ispituje se mikrostruktura materijala. Svjetlosni mikroskop snažan je sastavni alat u laboratoriju koji pruža uvid u atomsku strukturu materijala promatrajući način na koji svjetlost s njima stupa u interakciju.<sup>48</sup>

Ako svjetlosni mikroskop ima ugrađene polarizacijske filtre pomoću njega možemo poučavati mnoga optička svojstva kristala. Različiti polimorfi imaju različite kristalne

strukture i one se očituju kao razlike u njihovim optičkim svojstvima kao što su: indeks loma, boja i optička disperzija. Ta svojstva promatraju se pomoću ravnog polariziranog svjetla i između ukrštenih polarizatora kako bi se razlikovali različiti čvrsti oblici, kao čisti uzorci ili kao mješavina oblika. Aglomeracija, raspodjela veličine čestica, varijacije u obliku kristala, topljivost kristala u različitim otapalima, sublimacija, izomorfizam i ostale pojave također se lako proučavaju svjetlosnom mikroskopijom. Na slici 7. prikazane su glavne komponente polarizacijskog mikroskopa.<sup>46</sup>



**Slika 7.** Komponente polarizacijskog mikroskopa

Uzorak za mikroskopiranje može se pripremiti privremeno ili trajno. Priprema uzorka u obliku praha sastoji se od male količine uzorka raspršene u tekućem mediju koji se



nalazi između stakalca i pokrovnog stakla. Privremeni preparati pripremaju se raspršivanjem male količine uzorka u tekućem mediju koji ne otvrdnjava kao što je silikonsko ulje, voda, glicerin ili parafinsko ulje, dok se trajni preparati sastoje od uzoraka koji su raspršeni u optički čistom, bezbojnom i smolastom mediju. Oni se mogu pohraniti na neograničeno vrijeme te mogu poslužiti kao referentni uzorak za usporedbu s drugim uzorcima. Kod pripreme je najvažnije da medij ne otapa i da ne degradira uzorak, te je vrlo bitan dovoljan kontrast između čestica i medija za montiranje kako bi se one mogle vidjeti.<sup>46</sup>

### 2.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) najpoželjnija je metoda u mikrostrukturnoj analizi. Kod formiranja slike, SEM koristi elektrone ubrzane pod visokim naponom koji se fokusiraju na uzorak te elektroni skeniraju površinu uzorka.<sup>49</sup>

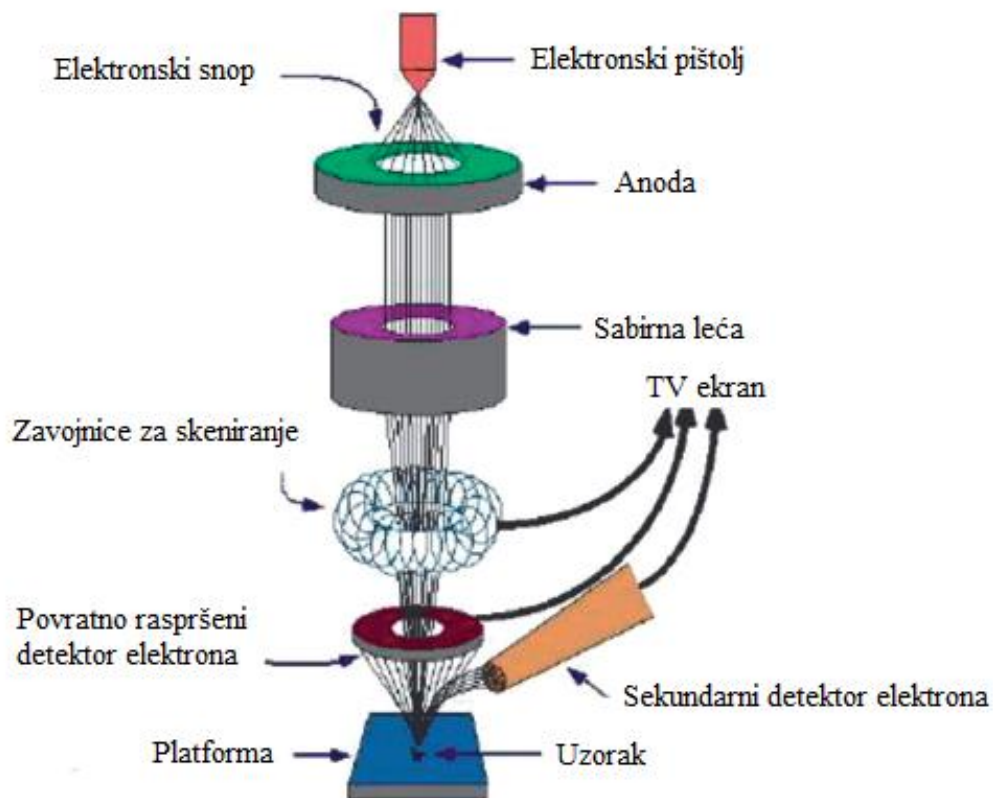
Osnovni SEM koristi se za promatranje topografskih značajka uzoraka. Dodavanjem posebnih detektora koji su osjetljivi na kemijski sastav uzoraka, on postaje moćan analitički alat.<sup>46</sup> Pomoću sistema elektromagnetskih leća, elektroni se usmjeravaju prema površini uzorka. Razlučivanje i dubina prodiranja od nekoliko nm do nekoliko  $\mu\text{m}$  ovise o naponu, materijalu uzorka i veličini spota (presjek snopa na mjestu dodira sa uzorkom). Upadni elektroni vraćaju se kao primarno ili sekundarno raspršeni. Primarni elektroni mogu pobuditi karakteristično rendgensko zračenje kojim se analizira kemijski sastav uzorka. Sekundarni elektroni su niskih energija, lakše se detektiraju u odnosu na primarne i najviše se koriste za istraživanje površina.<sup>50</sup>

Pretražni elektronski mikroskop koristi tri glavna tipa detektora:<sup>51</sup>

- SE (engl. *Secondary Electron*) – detektor sekundarnih elektrona,
- BSE (engl. *Back Scatter Electron*) – detektor povratnog raspršenja,
- EDS (engl. *Energy Dispersive Spectrometer*) – energijsko disperzijski spektrometar.

SEM se sastoji od tri glavna dijela: optičkog stupca, komore za uzorke i slike. Na vrhu optičkog dijela nalazi se elektronski top iz kojeg se emitira snop elektrona. Anodna ploča pod visokim je naponom tako da se ubrzaju elektroni koji padaju na uzorak.

Kondenzacijske leće omogućavaju ravnomjerno formiranje elektronskog snopa, a leća objektiva za fokusiranje i otvori koriste se za podešavanje gustoće leće. Tijekom skeniranja nastaju razne interferencije između elektrona i atoma uzorka. Detektori stanjuju snop elektrona iz elektronskog topa i fokusiraju ga na površinu uzorka. Detektori koji se nalaze u sustavu slike skupljaju elektrone i zračenja koja su nastala kao rezultat interferencije sa elektronskim snopom. Odgovarajući senzori prikupljaju signale koji proizlaze iz smetnje, a signali koji prolaze kroz pojačivače signala se prenose na ekran katodne cijevi i na taj način nastaje slika površine. U današnje vrijeme, signali dobiveni od senzora pretvaraju se u digitalne signale i prenose se na monitor.<sup>46,49</sup> Na slici 8. prikazani su dijelovi SEM-a.



**Slika 8.** Dijelovi pretražnog elektronskog mikroskopa<sup>49</sup>

Glavne prednosti SEM-a u odnosu su na svjetlosni mikroskop su: 250000x veće povećanje (kod svjetlosnog mikroskopa oko 1000x), dubina polja (puno veća dubina

polja u odnosu na svjetlosni mikroskop) i bočna prostorna rezolucija od 3 nm (200 nm za svjetlosni mikroskop).<sup>47</sup>

### 2.3.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), također poznato kao fotonska korelacijska spektroskopija (PCS), predstavlja vrlo snažan alat za proučavanje difuzijskog ponašanja makromolekula u otopini.<sup>52</sup> DLS tehnika primjenjuje se u brojnim znanstvenim disciplinama i jedna je od najčešćih metoda koje se koriste za određivanje veličine čestica.<sup>53</sup> Njezina primjena je raznolika i ona nije ograničena samo na određivanje veličina čestica. Osim za određivanje veličina čestica, koristi se za proučavanje agregacije čestica, otkrivanje i kvantificiranje biomolekula i za analizu interakcija čestica-čestica.<sup>54</sup>

Brownovo gibanje čestica ili molekula u suspenziji uzrokuje raspršenje laserske svjetlosti različitim intenzitetima.<sup>55</sup> Budući da prekomjerno ili neadekvatno raspršeno svjetlo dovodi do pogrešaka, DLS mjerenja nisu pouzdana za sve sustave. Djelovanjem monokromatskog snopa svjetlosti na otopinu koja sadrži makromolekule, svjetlost se raspršuje u svim smjerovima kao funkcija veličine i oblika makromolekula. DLS tehnika mjeri brzinu Brownovog gibanja makromolekula u otopini do kojeg dolazi zbog bombardiranja od strane otapala. Gibanje makromolekula ovisi o temperaturi i viskoznosti otapala, a budući da viskoznost otapala ovisi o temperaturi, za DLS mjerenje je važno poznavanje točne temperature. Brzina Brownovog gibanja povezana je sa veličinom čestice. Ako se u određenom vremenskom intervalu prati put kretanja čestica, mogu se saznati podatci o veličini makromolekula. Budući da velike čestice sporo difundiraju, gibanje je sporije što je veća čestica u otopini.<sup>56</sup>

Brzina čestica je definirana translacijskim difuzijskim koeficijentom ( $D$ ) koji se računa pomoću Einstein-Stokesove jednadžbe:

$$D = \frac{k_B * T}{3\pi\eta d}$$

gdje je  $k_B$  - Boltzmannova konstanta,  $T$  - apsolutna temperatura,  $\eta$  - viskoznost otapala, a  $d$  - hidrodinamički promjer čestice.<sup>53</sup>

Vrijednost difuzijskog koeficijenta ovisi o ionskoj jakosti medija, veličini i obliku čestice te strukturi njezine površine. Velika ionska jakost medija smanjuje međupovršinski sloj te dolazi do povećanja brzine difuzije i smanjenja hidrodinamičkog promjera čestice. Svaka promjena na površini čestice koja utječe na brzinu difuzije rezultirat će promjenom debljine hidrodinamičkog sloja. Svaka metoda mjerenja utječe na različita svojstva čestica (npr. gustoća, intenzitet, broj) i zato svaka metoda daje različite prosječne veličine i raspodjelu veličina za dani uzorak. Niti jedan dobiveni rezultat nije u potpunosti točan.<sup>53</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

Uzorci kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) nabavljeni su u lokalnoj trgovini u Splitu. Uzorci su raspoređeni na način da je jedan dio svježih plodova odvojen i pripremljen za optičku mikroskopiju u cilju određivanja strukture ploda u svježem stanju (kontrola). Jedan dio svježih plodova je podvrgnut postupku sušenja (konvekcijskom i vakuum sušenju) bez prethodnog smrzavanja, dok je jedan dio svježih plodova podvrgnut prethodnom smrzavanju na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom perioda od dva dana te smrzavanju u struji tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) prije postupka sušenja liofilizacijom.

### 2.2. Određivanje sadržaja vode i suhe tvari u svježim plodovima kultivirane borovnice

Postupak određivanja sadržaja vode proveo se na način da se prethodno odvagala određena masa svježih plodova kultivirane borovnice i ostavila se u sušioniku (Memmert, UF 30) na temperaturi od  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  do postizanja konstantne mase. Sadržaj vode određen je prema sljedećoj formuli:

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

$m_1$  – masa prazne posude

$m_2$  – masa posude i uzorka prije sušenja

$m_3$  – masa posude i uzorka nakon sušenja

Sadržaj suhe tvari određen je prema sljedećoj formuli:

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

## 2.3. Postupak sušenja

### 2.3.1. Konvekcijsko sušenje

Postupak konvekcijskog sušenja plodova kultivirane borovnice proveden je na način da se 60 g svježih plodova kultivirane borovnice ostavilo tijekom perioda od 10 h u sušioniku (Memmert, UF 30) na temperaturi od 60 °C uz kontinuiranu ventilaciju. Nakon završenog postupka sušenja osušeni plodovi su odvagani, podvrgnuti postupku mljevenja te su pohranjeni u vakumiranoj ambalaži na temperaturi od 4 °C.

### 2.3.2. Vakuum sušenje

Postupak vakuum sušenja plodova kultivirane borovnice proveden je na način da se 60 g svježih plodova kultivirane borovnice ostavilo tijekom perioda od 24 h u vakuum sušioniku (Thermo Scientific 3608-ICE, pumpa Pfeiffer, DUO Line, 5M) na temperaturi od 60 °C uz kontinuirani tlak od 76 mm Hg (Slika 9.). Nakon završenog postupka sušenja osušeni plodovi su odvagani, podvrgnuti postupku mljevenja te su pohranjeni u vakumiranoj ambalaži na temperaturi od 4 °C.



Slika 9. Uređaj za vakuum sušenje<sup>57</sup>

### 2.3.3. Sušenje liofilizacijom

Postupak sušenja plodova kultivirane borovnice liofilizacijom proveden je na način da se 60 g svježih plodova kultivirane borovnice ostavilo tijekom perioda od 48 h na

temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hera freeze), a drugi dio plodova (60 g) je stavljen u struju tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i postigao je trenutno smrzavanje (Slika 10.). Nakon predobrade smrzavanjem, plodovi su stavljeni u liofilizator (Labconco) (Slika 11.). Uvjeti liofilizacije su bili kontinuirana temperatura od  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i tlak od 0,122 mbara. Period sušenja trajao je 24 h. Nakon završenog postupka sušenja liofilizacijom osušeni plodovi su odvagani, podvrgnuti postupku mljevenja te su pohranjeni u vakumiranoj ambalaži na temperaturi od  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 10.** Smrzavanje borovnica u struji tekućeg dušika



**Slika 11.** Uređaj za liofilizaciju<sup>58</sup>

#### **2.4. Mljevenje osušenih plodova kultivirane borovnice**

Postupak mljevenja osušenih plodova kultivirane borovnice proveden je na način da je jedan dio plodova samljeven koristeći mlinac za kavu (mlin s noževima) u koji je za sve vrste osušenih plodova stavljena ista odvaga plodova (14 g) i isto vrijeme trajanja mljevenja (3 min). Jedan dio osušenih plodova je samljeven koristeći kuglični mlin (Retsch, MM 400) (Slika 12.). Period mljevenja je trajao 3 min, snaga je iznosila 30 Hz, 6 kuglica je korišteno za volumen od 20 mL. Uzorci su stavljani u posude volumena do 35 mL, izrađene od nehrđajućeg materijala kao i kuglice promjera 12 mm.



**Slika 12.** Kuglični mlin<sup>59</sup>



## 2.5. Određivanje veličine čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)

Određivanje veličine čestica samljevenog liofiliziranog praha plodova kultivirane borovnice provedeno se na uređaju za dinamičko raspršivanje svjetlosti (DLS) (Litesizer 500, Anton Paar) (Slika 13.) na način da se odvagalo 5 mg praha u 5 mL etanola. Uzorak je potom stavljen u ultrazvučnu kupelj na sobnu temperaturu tijekom perioda od 10 min. Od toga je pripravljen omjer uzorka i etanola 1:5 koji je stavljen u kivetu za mjerenje. Vremenska ovisnost intenziteta raspršene svjetlosti mjerena je pod kutom od 90 stupnjeva u odnosu na smjer upadne svjetlosti valne duljine 658 nm.



**Slika 13.** Analizator veličine čestica<sup>60</sup>

## 2.6. Mikroskopija

### 2.6.1. Svjetlosna mikroskopija

Uzorci svježe i osušene kultivirane borovnice (konvekcijsko i vakuum sušenje) fiksirano je koristeći 10 % formaldehid i dehidrirano u sljedovima koristeći etanol. Parafin se koristio za oblaganje u parafinskom kupelji tri puta (svaka kupelj u trajanju 1 h na temperaturi od 58 °C). Uzorci su potom obloženi u parafinskom bloku koristeći HistoCore Arcadia (Leica) (Slika 14.). Uređaj za rezanje mikrotom (SM 2021E, Leica) (Slika 15.) je korišten za dobivanje debljine tankog sloja od 5  $\mu\text{m}$ . Tanki slojevi su obojani koristeći bojanje periodičnom kiselinom po Schiffu<sup>61</sup> i promatrani pod DM3000 LED (Leica) svjetlosnim mikroskopom. Fotomikrografi su snimljeni koristeći DMC 4500 (Leica) digitalnu kameru.



**Slika 14.** Uređaj za parafinsko uklapanje<sup>62</sup>



**Slika 15.** Mikrotom za precizno rezanje uzoraka<sup>63</sup>



**Slika 16.** Uklopljeni uzorci svježih i osušenih plodova kultivirane borovnice

### **2.6.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Uzorci osušenih plodova kultivirane borovnice nisu imali jednaku morfologiju i veličinu čestica nakon postupka mljevenja. Najfiniji prah dobio se pri mljevenju liofiliziranih plodova i stoga su samo ti uzorci snimljeni pretražnim elektronskim mikroskopom (Slika 17.) (pri povećanjima od 250 do 1000 puta) JEOL JSM 7610FPlus u LEI modu, odnosno bilježenjem elastično raspršenih elektrona iz snopa. Zbog činjenice da su uzorci električni izolatori, prije snimanja na njih je u uređaju Quorum Q150 ES plus (Slika 18.) metodom magnetronskog rasprašenja nanesen sloj zlata debljine 10 nm. Prije nanošenja sloja zlata, uzorci su zalijepljeni dvostrano ljepljivom vodljivom ugljikovom trakom na nosač uzoraka za pretražni elektronski mikroskop.



**Slika 17.** Skenirajući elektronski mikroskop



**Slika 18.** Uređaj za magnetronsko rasprašenje (za oslikavanje površina električnih izolatora)<sup>64</sup>

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Sadržaj vode i suhe tvari u svježim plodovima kultivirane borovnice te morfološka komparacija plodova nakon različitih tehnika sušenja

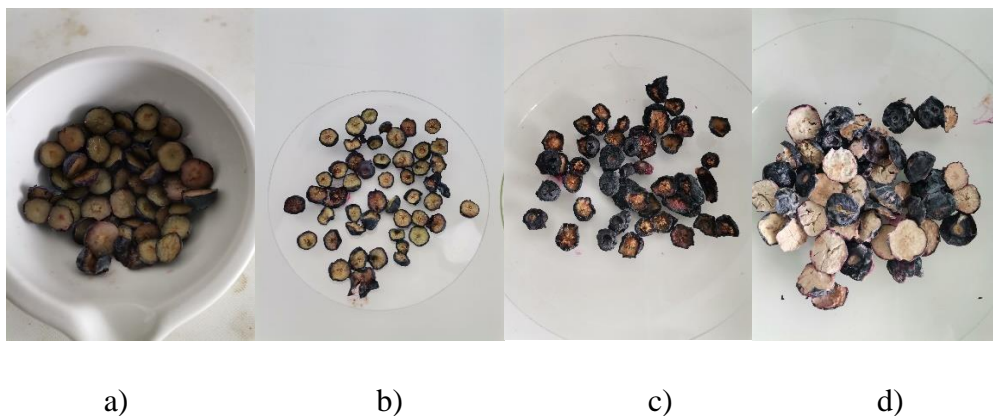
U ovom istraživanju pripremljeni su uzorci kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) osušeni različitim tehnikama (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje te liofilizacija s prethodnim smrzavanjem na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i u struji tekućeg dušika,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

U svježim uzorcima borovnice određen je sadržaj vode i sadržaj suhe tvari kako je prikazano u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sadržaj vode i suhe tvari u svježem plodu kultivirane borovnice

Postotak vode (%)	85,1
Postotak suhe tvari (%)	14,9

Na Slici 19. prikazani su uzorci kultivirane borovnice a) svježi i nakon b) konvekcijskog sušenja c) vakuum sušenja i d) liofilizacije



**Slika 19.** Uzorci kultivirane borovnice a) svježi i nakon b) konvekcijskog sušenja, c) vakuum sušenja i d) liofilizacije

Na Slici 20. prikazan je uzorak kultivirane borovnice nakon sušenja (identično je izgledao nakon konvekcijskog i vakuum sušenja) i nakon mljevenja mlinom s noževima.



**Slika 20.** Uzorak kultivirane borovnice nakon sušenja i mljevenja mlinom s noževima

Na Slici 21. prikazan je fini prah dobiven nakon mljevenja liofiliziranih uzoraka uz pomoć običnog mlina s noževima.



**Slika 21.** Prah dobiven nakon mljevenja liofiliziranih uzoraka kultivirane borovnice koristeći mlin s noževima

Na Slici 22. prikazan je prah dobiven nakon mljevenja liofiliziranih uzoraka kultivirane borovnice koristeći kuglični mlin.

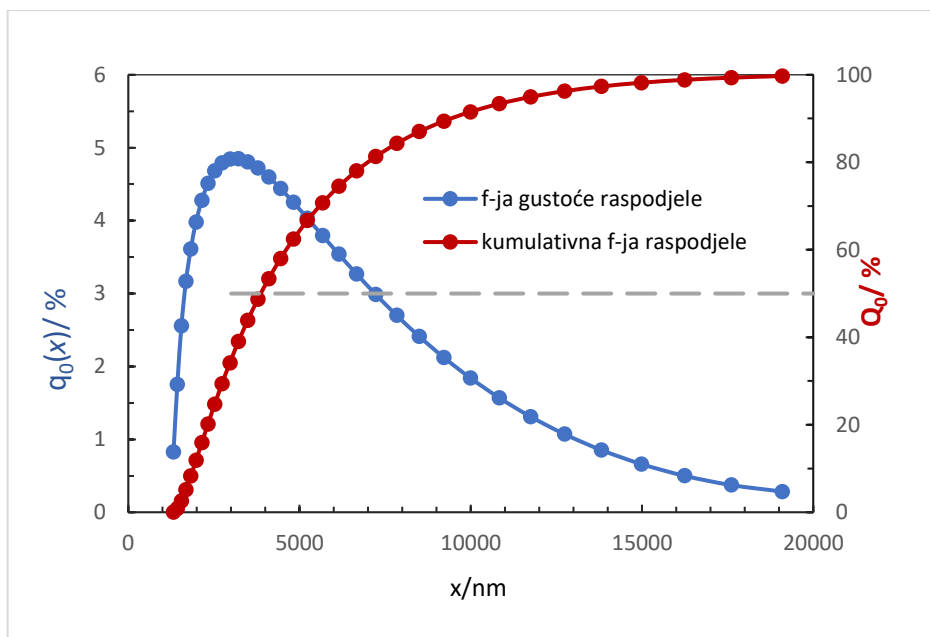


**Slika 22.** Prah dobiven nakon mljevenja liofiliziranih uzoraka kultivirane borovnice koristeći kuglični mlin

### **3.2. Određivanje veličine čestica liofiliziranih plodova kultivirane borovnice**

Određivanje veličine čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) vršilo se samo kod liofiliziranih uzoraka borovnice. Na Slici 23. prikazana je krivulja funkcije gustoće raspodjele,  $q_0(x)$ , te kumulativna funkcija raspodjele,  $Q_0$ , čestica borovnice dobivenih mljevenjem plodova borovnice u mlinu s noževima, nakon sušenja liofilizacijom. S obzirom na to da se radi o volumnoj raspodjeli veličina čestica, u indeksu je ista označena s  $0$ .

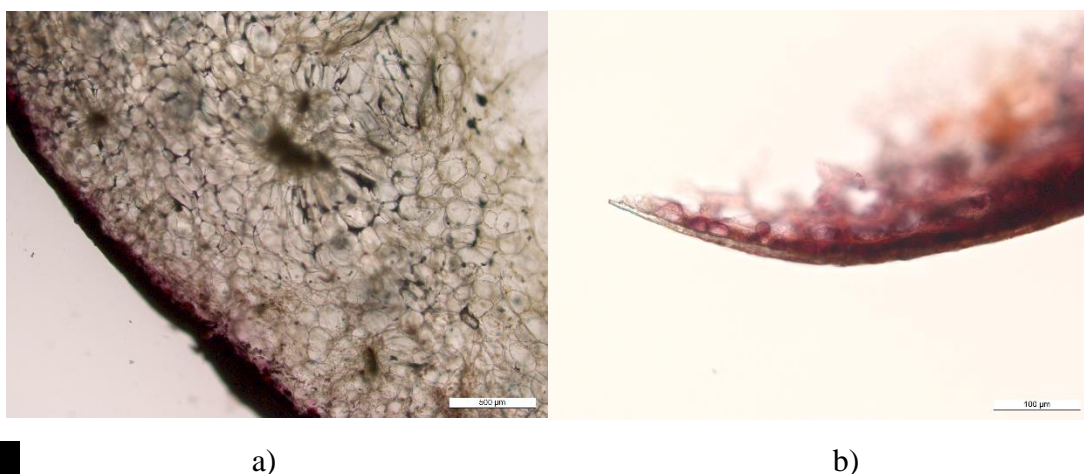




**Slika 23.** Krivulje funkcije gustoće raspodjele i kumulativne funkcije raspodjele veličina čestica borovnice dobivenih nakon mljevenja liofiliziranog ploda u mlinu s noževima

### 3.3. Mikrostruktura svježih i osušenih plodova kultivirane borovnice uz pomoć svjetlosne mikroskopije

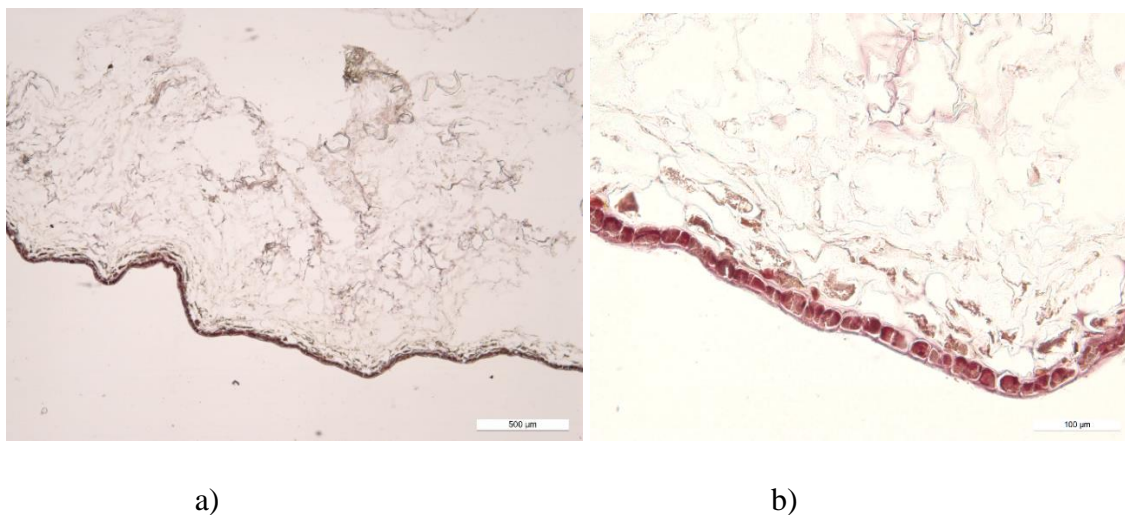
Na Slici 24. prikazana je mikrostruktura svježih uzoraka kultivirane borovnice snimljena pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta



**Slika 24.** Mikrostruktura svježih plodova borovnice snimljena svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta

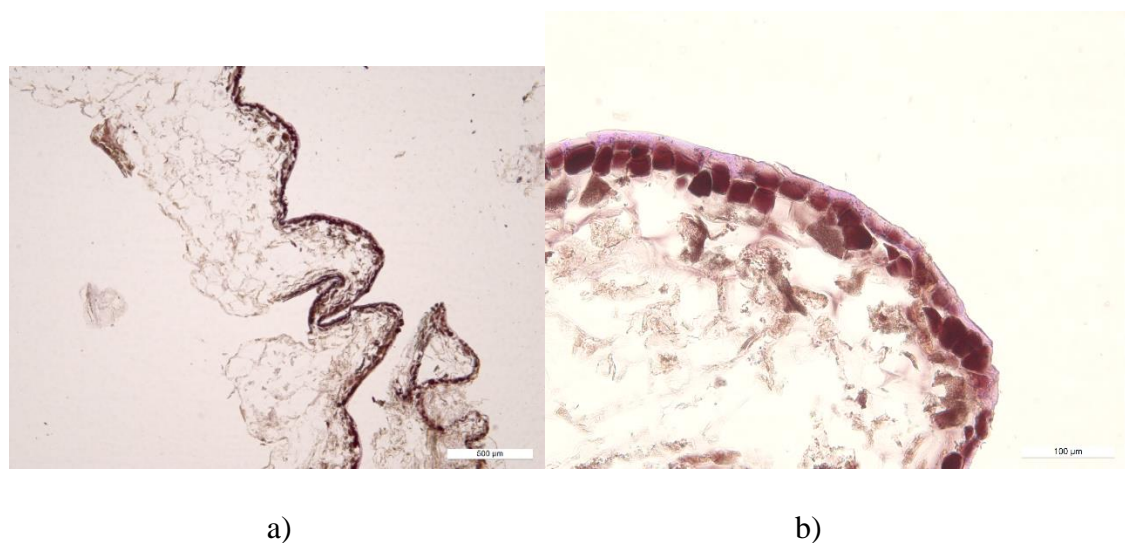


Na Slici 25. prikazana je mikrostruktura osušenih plodova kultivirane borovnice (konvekcijsko sušenje) pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta



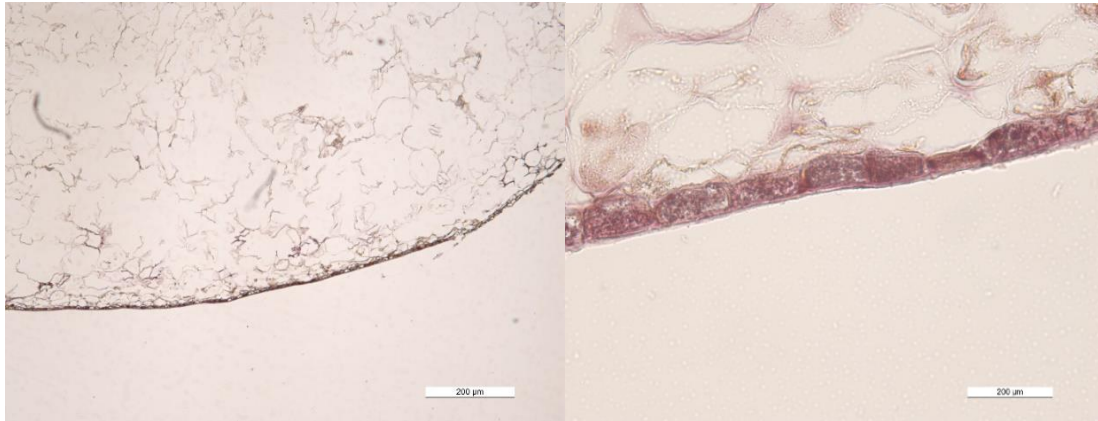
**Slika 25.** Mikrostruktura osušenih plodova borovnice (konvekcijsko sušenje) snimljena svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta)

Na Slici 26. prikazana je mikrostruktura osušenih plodova kultivirane borovnice (vakuum sušenje) pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta



**Slika 26.** Mikrostruktura osušenih plodova borovnice (vakuum sušenje) snimljena svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta)

Na Slici 27. prikazana je mikrostruktura osušenih plodova kultivirane borovnice (liofilizacija) pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta



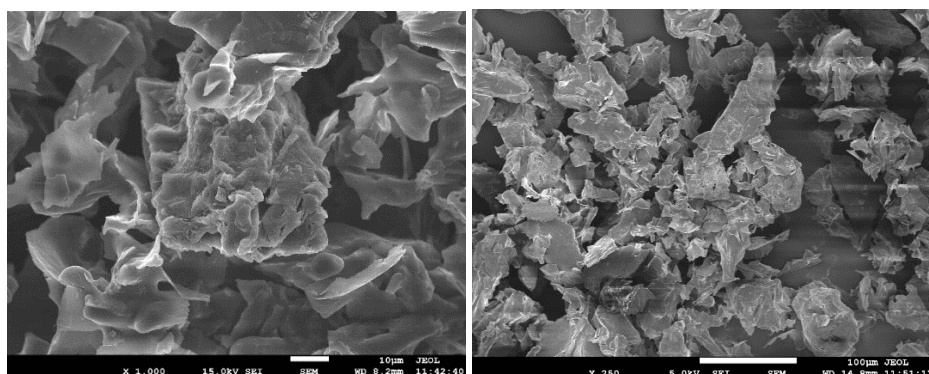
a)

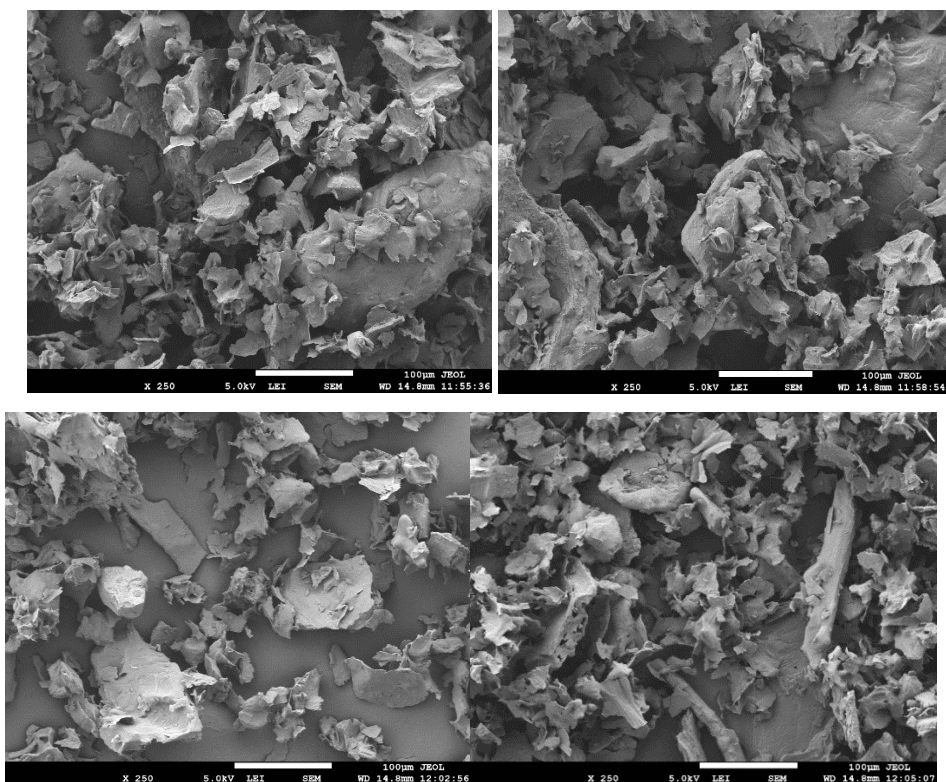
b)

**Slika 27.** Mikrostruktura osušenih plodova borovnice (liofilizacija) snimljena svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od: a) 4 puta i b) 20 puta)

### **3.4. Mikrostruktura liofiliziranih plodova kultivirane borovnice uz skenirajuće elektronske mikroskopije**

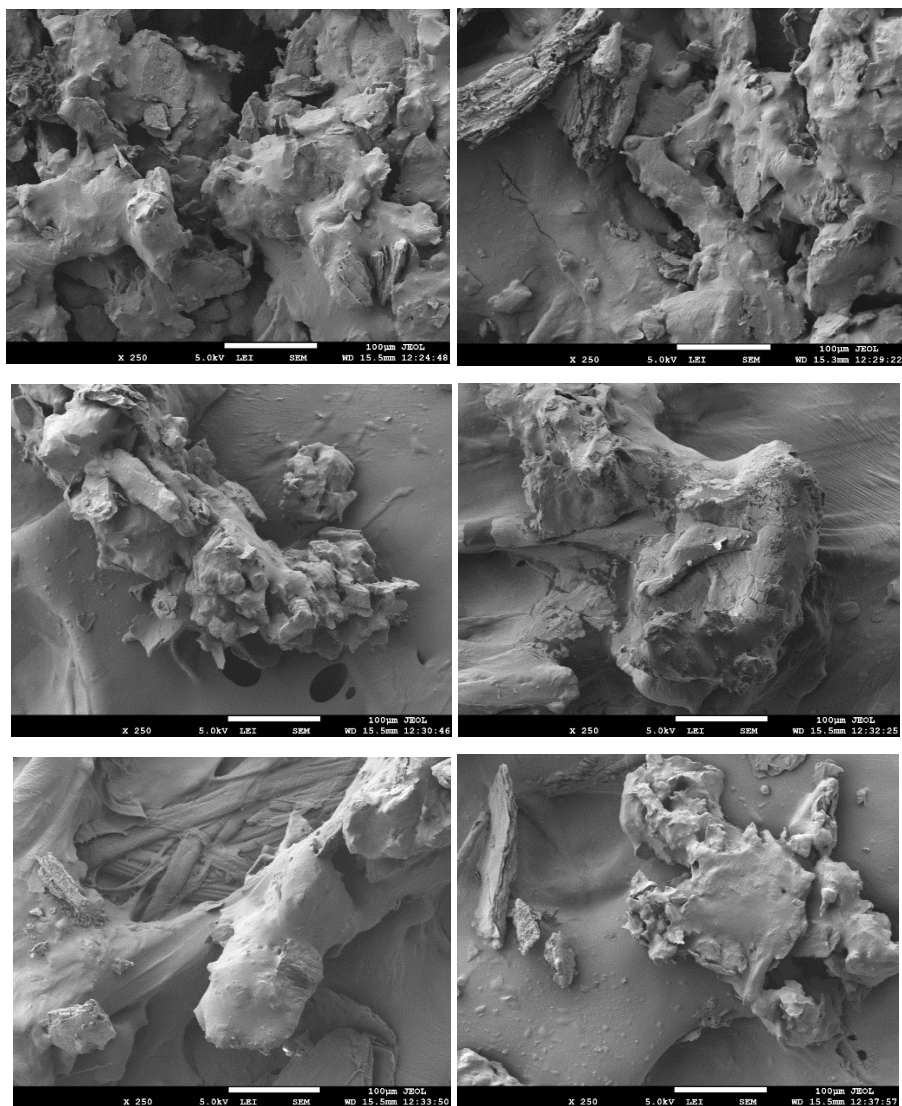
Na Slici 28. prikazana je mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon predobrade smrzavanjem na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i mljevenja mlinom s noževima.





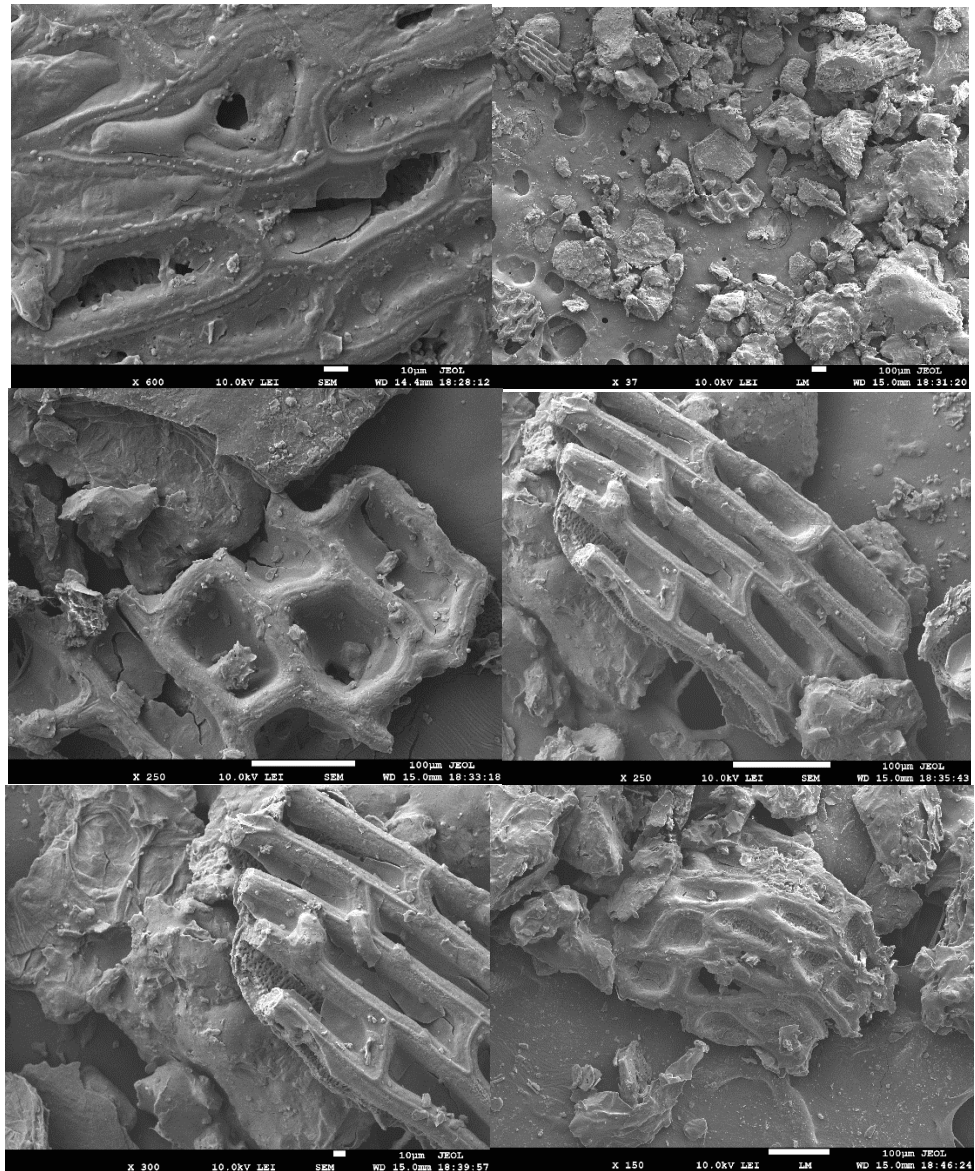
**Slika 28.** Mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon predobrade smrzavanjem na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i nakon mljevenja mlinom s noževima.

Na Slici 29. prikazana je mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon predobrade smrzavanjem u struji tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon mljevenja mlinom s noževima.



**Slika 29.** Mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon predobrade smrzavanjem u struji tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon mljevenja mlinom s noževima

Na Slici 30. prikazana je mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon predobrade smrzavanjem u struji tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon mljevenja kugličnim mlinom.



**Slika 30.** Mikrostruktura liofiliziranih uzoraka borovnice nakon preobrade smrzavanjem u struji tekućeg dušika ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i nakon mljevenja kugličnim mlinom.



## 4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u mikrostrukturi plodova kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) osušenih različitim metodama (konvekcijsko sušenje, vakuum sušenje, liofilizacija s različitim tehnikama smržavanja plodova). U svježim, netretiranim uzorcima borovnice određen je sadržaj vode i sadržaj suhe tvari (Tablica 1.). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima koje navode drugi autori.<sup>65,66</sup> (Skupieň, 2006; An i sur., 2019). Na Slici 19. prikazani su uzorci svježe kultivirane borovnice i uzorci nakon konvekcijskog sušenja, vakuum sušenja i liofilizacije. Vizualno je uočljiva razlika između uzoraka osušenih konvekcijskom i vakuum tehnikom u odnosu na tehniku liofilizacije (Slika 19.) Nakon postupka sušenja uzorci su samljeveni mlinom s noževima, a samo je kod liofiliziranog uzorka ispitana razlika u mikrostrukturi između upotrebe mlina s noževima i kugličnog mlina zbog adekvatnosti (nije bio ljepljiv). Nakon mljevenja mlinom s noževima uočljiva je razlika između uzoraka osušenih konvekcijskom i vakuum tehnikom u odnosu na tehniku liofilizacije na način da se kod liofiliziranog uzorka dobio vrlo fini, homogeni prah dok su uzorci meljave plodova osušenih konvekcijskom i vakuum tehnikom bili grudičasti i ljepljivi što se može pripisati visokom sadržaju šećera u plodovima borovnice (postotak šećera je oko 9,7 %) i izostanku korištenja tehnika inkapsulacije. Iz Slika 20. i 21. vizualno je uočljiva gore opisana razlika. Nadalje, liofilizirani uzorci kultivirane borovnice podvrgnuti su dvama načinima mljevenja koristeći mlin s noževima i kuglični mlin (Slike 21. i 22.). Iz prikazanih slika uočljiva je morfološka razlika na način da su uzorci samljeveni mlinom s noževima rezultirali vrlo finim, homogenim prahom dok su uzorci samljeveni kugličnim mlinom bili nehomogeni te se može zaključiti da primjena kugličnog mlina nije prikladna za plodove borovnice čija je kožica tvrda i neperforirana. Samljeveni uzorci su nadalje ispitani pretražnim elektronskim mikroskopom čiji su rezultati prezentirani na slikama 28.-30. Pretragom literaturnih referenci nije bilo moguće pronaći istraživanje koje je uspoređivalo razliku upotrebe mlina s noževima i kugličnog mlina na mikrostrukturu plodova borovnice i morfologiju dobivenih uzoraka meljave.

Upotreba svjetlosne mikroskopije imala je za cilj usporediti mikrostrukturu svježih uzoraka plodova kultivirane borovnice (kontrolni uzorak) u odnosu na plodove osušene konvekcijskom i vakuum tehnikom. Kod svih su uzoraka korištena ista povećanja (4 i

20 puta). Iz prikazanih rezultata (Slike 24.-27.) uočava se jasna razlika u mikrostrukturi kontrolnog uzorka (svježi plodovi) u odnosu na osušene uzorke plodova borovnice te razlika između plodova osušenih konvekcijskom i vakuum tehnikom u odnosu na plodove osušene tehnikom liofilizacije. Navedene se razlike očituju u tome što se kod svježih plodova borovnice jasno vide stanice, njihov oblik i struktura, te prisustvo određenih nitastih tvorevina u tkivu ploda borovnice, dok kod osušenih plodova dolazi do gubitka staničnih struktura (osim kod liofiliziranih uzoraka), dok je struktura stanica kožice ostala očuvana kod svih uzoraka radi svoje tvrdoće i neperforiranosti te se stanice kožice jasno ocrtavaju na svim prikazanim mikrografima. Iz prikazanih rezultata je uočljivo da je kod liofiliziranih uzoraka došlo do povećanja površine stanice, one su postale deformirane i u pravilu izdužene, ali uočljivo je da tkivo nije toliko degradirano kao što je slučaj kod uzoraka nakon konvekcijskog i vakuum sušenja. Kombinacija tehnika prethodnog smrzavanja i liofilizacije uzrokuje manje oštećenje stanica u usporedbi sa ostalim metodama. Smrzavanje na niskim temperaturama prije liofilizacije pomaže očuvanju strukture stanica te se tako smanjuje rizik od oštećenja stanica uslijed stvaranja kristala leda. Liofilizacijom stanice ostaju sačuvane jer se voda u njima sublimira direktno iz leda u plin te se na taj način također smanjuje rizik od oštećenja.

U ovom je istraživanju ispitana i razlika u mikrostrukturi liofiliziranih uzoraka plodova kultivirane borovnice nakon a) različite predobrade uzoraka smrzavanjem (pri temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  te u struji tekućeg dušika, na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), b) različitog načina mljevenja osušenih uzoraka (upotreba kugličnog mlina i mlina s noževima). Utjecaj predobrade uzoraka smrzavanjem vidi se na slikama dobivenim pretražnom elektronskom mikroskopijom (Slike 28.-30.). Iz prikazanih mikrografa može se opisati mikrostruktura liofiliziranih uzoraka plodova borovnice nakon postupka smrzavanja na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i nakon mljevenja mlinom s noževima koja odgovara česticama koje imaju oštre rubove, mrvičaste su teksture, nisu homogene, različitih su oblika i veličina. Pri istim uvjetima mljevenja (mlin s noževima), ali drugačijim uvjetima predobrade uzoraka (smrzavanje u struji tekućeg dušika,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) prije postupka liofilizacije, mikrografi pokazuju nešto drugačiju mikrostrukturu uzoraka. Ona odgovara homogenijem uzorku, mekanih, skoro pastoznih rubova, bez izraženih oblika, rubova i stuktura, te je uzorak bitno homogeniji (Slika 29.). Kod takvog uzorka provedena je granulometrijska analiza veličina čestica DLS metodom te su rezultati predočeni na Slici 23. Iz prikazane krivulje funkcije gustoće raspodjele uočava se da je

raspon veličina analiziranih čestica od 1000 do 19 000 nm. Vrh ove krivulje, tj. mod funkcije raspodjele ukazuje da su u analiziranom uzorku najzastupljenije čestice veličine oko 3 000 nm. S druge strane, iz kumulativne funkcije raspodjele može se uočiti da je vrijednost medijana,  $x_{50}$ , tj. veličine čestice od kojih je u uzorku 50 % manjih, iznosi oko 3200 nm, dok je 90 % čestica manjih od 10000 nm. Nadalje, ispitan je utjecaj primjene kugličnog mlina kod liofiliziranih uzoraka kultivirane borovnice (Slika 30.). Iz dobivenih mikrografa uočljiva je bitno drugačija mikrostruktura uzoraka, čestice su veće, površina im je izbrazdana, grublja, karakteristične teksture poput pčelinjeg saća. Pretraživanjem dostupne literature nije bilo moguće pronaći istraživanje koje je ispitalo mikrostrukturu plodova kultivirane borovnice nakon različitih tehnika sušenja (konvekcijsko, vakuum i liofilizacija) koristeći pretražnu elektronsku mikroskopiju kao ni istraživanje koje je istraživalo utjecaj različitih tehnika mljevenja na mikrostrukturu liofiliziranih uzoraka borovnice.



## 5. ZAKLJUČAK

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

- Tehnike sušenja utječu na mikrostrukturu plodova kultivirane borovnice pri čemu je izraženiji destruktivan utjecaj konvekcijskog i vakuum sušenja u odnosu na tehniku liofilizacije
- Čvrsta, neperforirana kožica ploda borovnice te visok sadržaj šećera predstavlja problem pri postupku sušenja jer je osušeni materijal lako kvarljiv, ljepljiv i ne sadrži svojstva koja omogućavaju njegovu optimalnu primjenu i dulji period pohrane
- Korištenje kugličnog mlina nije pogodno za dobivanje finog, homogenog praha liofiliziranih uzoraka borovnice radi tvrde i neperforirane kožice plodova
- Predobrada smrzavanjem rezultira nehomogenijom, grubljom mikrostrukturom liofiliziranih plodova borovnice u odnosu na predobradu u struji tekućeg dušika

## 6. LITERATURA

1. C. R. Sauterre, J. N. Cash, D. J. Vannorman: Ascorbic acid/citric acid combination in the processing of frozen apple slices, *Journal of Food Science*, 1988, 1713-1736
2. D. Skroza, I. Generalić, V. Katalinić, *Tehnologija mediteranskog voća i povrća*, skripta, Split, 2010.
3. Ž. Lambaša Belak, N. Gaćina, T. Radić, *Tehnologija hrane*, skripta, Šibenik, 2005.
4. N. P. Seeram, Chapter 37 - Berries, Editor(s): *David Heber*, *Nutritional Oncology (Second Edition)*, Academic Press, 2006, Pages 615-628, <https://doi.org/10.1016/B978-012088393-6/50093-2>.
5. M. J. Bermudez-Soto, F. A. Tomas-Barberan, *J. Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 133–141.
6. M. F. Ramadan, M.Z. Sitohy, J.T. Moersel, Solvent and enzyme-aided aqueous extraction of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace oil: Impact of processing on composition and quality of oil and meal, *European Food Research and Technology*, (2008) 226(6), 1445-1458. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0676-y>
7. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan; 81(1 Suppl): 230S-242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>
8. G. D'Urso, S. Piacente, C. Pizza, P. Montoro, Metabolomics of healthy berry fruits. (2017) *Current Medicinal Chemistry*, 25(37), 4888–4902. doi: 10.2174/0929867323666161206100006.
9. F. L. Meyskens, E. Szabo, Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005; 14: 1366–1369. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0666>.
10. L. A. Bazzano, Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases, In: *Background Paper of the Joint FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health*. World Health Organization, 2005, Kobe, Japan, 1-65.

11. *S. P. Vander Kloet*, The genus *Vaccinium* in North America. Pub 1828. Res Branch, Agri Canada, Canadian Government Publication Centre, Ottawa, ON, 1988, Canada.
12. *G. Q. Song, J. F. Hancock*, *Vaccinium*. In: *Kole C* (ed), *Wealth of wild crop relatives: genetic, genomic & breeding resource*. Springer, Berlin, 2011, 197–222
13. *D. D. Purgar, Z. Šindrak, D. Mihelj, S. Voća, B. Duralija*, Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj, *Pomologia Croatica*, 2007, 13 (4): 219-228
14. URL: <https://plantura.garden.uk/fruits/blueberries/bilberry> (03.07.2023)
15. URL: <https://hr.glosbe.com/en/hr/lingonberry> (03.07.2023.)
16. URL: <https://calscape.org/Vaccinium-uliginosum-%28%29> (03.07.2023)
17. URL: <https://www.gardenia.net/plant/vaccinium-corymbosum-patriot> (03.07.2023.)
18. *SH. Nile, S.W. Park*, Edible berries: bioactive components and their effect on human health, 2014, *Nutrition*, 30(2):134–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
19. *S. T. Talcott*, Chemical components of berry fruits. In: *Zhao Y.*, editor. *Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion*. 1st ed. CRC; Boca Raton, FL, USA: 2007, 51–72
20. *A. Michalska, G. Lysiak*, Bioactive compounds of blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *Int J Mol Sci.*, 2015, 16 (8): 18642-18663, <https://doi.org/10.3390/ijms160818642>.
21. *S. Vogl, P. Picker, J. Mihaly-Bison, N. Fakhrudin, A. G. Atanasov, E. H. Heiss, C. Wawrosch, G. Reznicek, V. M. Dirsch, J. Saukel, B. Kopp* (2013) Ethnopharmacological in Vitro Studies on Austria's Folk Medicine—An Unexplored Lore in Vitro Anti-Inflammatory Activities of 71 Austrian Traditional Herbal Drugs. 2013. *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 750-771., <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.007>
22. *R. L. Prior., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. Mcewen, C. O'brian, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer, C. K. Mainland*, Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. 1998, *J. Agric. Food Chem.* 46: 2686-2693.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf980145d>

23. C. G. Fraga, Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Asp Med.*, 2005, 26:235–244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.013>.
24. N. B. Samad, T. Debnath, M. Ye, M. A. Hasnat, B. Q. Lim, In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts, 2014, *Asian Pac J Trop Biomed* 4 (10): 807–815, <http://dx.doi.org/10.12980/apjtb.4.2014c1008>
25. S. J. Hwang, W. B. Yoon, O. H. Lee, S. J. Cha, J. D. Kim, Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem.*, 2014, 146:71-77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.035>
26. T. Lovrić, *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, knjiga, Zagreb, 2003.
27. S. Mujumdar, *Handbook of Industrial Drying*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 2nd ed., Vol. 1., 605-739, 1995.
28. M. Marelja, F. Dujmić, D. Ježek, M. Škegro, T. Bosiljkov, S. Karlović, M. Lasić, M. Brnčić, Vakuom sušenje u prehrambenoj industriji // *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 15 (2020.); 94 – 101
29. S. Grabowski, M. Marcotte, H. Ramaswamy, *Dehydrated Vegetables: Principles and Applications in Hui, Y. H., Sherkat, F. (ed.): Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume*. CRC Press, 2005.
30. R. P. Singh, D. R. Heldman, *Introduction to Food Engineering*. Academic Press, London, 556-591, 2001.
31. M. V. Zambrano, B. Dutta, D. G. Mercer, H. L. MacLeana, M. Touchie, Assessment of moisture content measurement methods of dried food products in small-scale operations in developing countries: A review. 2019, *Trends in Food Science & Technology*, 88 484-496. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.006>
32. T. Kudra, A. S. Mujumdar, *Advanced Drying Technologies*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1-26, 2002.
33. N. N. Potter, H. J. Hotchkiss, *Food Science*. Chapman & Hall, New York, 5th ed., 200-232, 1995.

34. *M. C. Bustos, D. Rocha-Parra, I. Sampedro, S. De Pascual-Teresa, A. E. Le'on*, The influence of different air-drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of berries, 2018, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (11), 2714–2723. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05395>
35. *D. I. Onwude, N. Hashim, R. Janius, K. Abdan, G. Chen, A.O. Oladejo*, Non-thermal hybrid drying of fruits and vegetables: A review of current technologies. 2017, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43, 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.010>
36. *'A. Calin-S'anchez, L. Lipan, M. Cano-Lamadrid, A. Kharaghani, K. Masztalerz, 'A. A. Carbonell-Barrachina, A. Figiel*, Comparison of traditional and novel drying techniques and its effect on quality of fruits, vegetables and aromatic herbs. *Foods*, 2020, 9(9), 1261. <https://doi.org/10.3390/foods9091261>
37. *M. Radojčin, I. Pavkov, D. Bursać Kovačević, P. Putnik, A. Wiktor, Z. Stamenković*, Effect of Selected Drying Methods and Emerging Drying Intensification Technologies on the Quality of Dried Fruit: A Review., 2021, *Processes* 9, 1-21. <https://doi.org/10.3390/pr9010132>
38. *M. Pateiro, M. Vargas-Ramella, D. Franco, A. Gomes da Cruz, G. Zengin, M. Kumar, K. Dhama, J. M. Lorenzo*, The role of emerging technologies in the dehydration of berries: Quality, bioactive compounds, and shelf life. *Food Chem X.*, 2022, Volume 16:100465. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100465>
39. *J. L'opez, A. Vega-G'alvez, C. Bilbao-Sainz, B.S Chiou, E. Uribe, I. Quispe-Fuentes*, Influence of vacuum drying temperature on: Physico-chemical composition and antioxidant properties of murta berries. 2017, *Journal of Food Process Engineering*, 40 (6), e12569. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12569>
40. *I. Quispe-Fuentes, A. Vega-G'alvez, M. Aranda*, Evaluation of phenolic profiles and antioxidant capacity of maqui (*Aristotelia chilensis*) berries and their relationships to drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98 (11), 4168–4176. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8938>
41. *Z. Šumić*, Optimizacija sušenja voća u vakuumu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2014, Novi Sad, Srbija.
42. *R. M. Topić, G. R. Topić, D. Aćimović*, Justify using of sublimation drying with aspect of characteristics and energy demand value. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi (PTEP)*, 2001, 81-84.

43. *S. M. Mašović, M. A. Janković, E. P. Radulović*, Ispitivanje promena kvaliteta jabuka konzervisanih sušenjem, sušenjem - smrzavanjem i liofilizacijom. 2000, *Acta Periodica Technologica*, 31, 213-219.
44. URL:[https://www.mrclab.com/laboratory\\_freeze\\_dryer\\_philippines](https://www.mrclab.com/laboratory_freeze_dryer_philippines) (14.07.2023.)
45. *G. Niketić-Aleksić*, Tehnologija voća i povrća, Poljoprivredni fakultet, 1982, Beograd, 163-167
46. *G. Nichols, S. Luk, C. Roberts*, Microscopy, Book Editor(s): *R. A. Storey, I. Ymén*, Solid State Characterization of Pharmaceuticals, University of Nottingham, 2011, United Kingdom, Ch(9), 287–355  
<https://doi.org/10.1002/9780470656792.ch9>
47. *J. Orešković*, "Ispitivanje utjecaja pomoćnih tvari na fizičku stabilnost suspenzije posakonazola", Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:026216>
48. *A. M. Bowen, S. B. Sparenga*, Light microscopy in the chemistry laboratory. 2008, *Amer. Lab.*, 40(8), 9–11.
49. *C. Temiz*, Scanning Electron Microscopy, Zonguldak Bulent Ecevit University, 2022, Turkey. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103956>
50. *A. Tonejc*, Fizika nanomaterijala, skripta, Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb, 2011-2012
51. *I. Škrinjarić*, "Utjecaj toplinske obrade na mehanička svojstva CuAlMn legure s prisjetljivosti oblika", Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak, 2017. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:115:107268>
52. *J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel*, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016, 8(4): 409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
53. *M. Drušković*, "Biokompatibilne nanočestice s povećanom terapijskom efikasnošću flavonoida", Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:522830>
54. *A. Atahar, N. Nusrat Mafy, M. Muhibur Rahman, M. Yousuf Ali Mollah, Md. Abu Bin Hasan Susan*, Aggregation of urea in water: Dynamic light scattering

- analyses, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 294, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111612>.
55. URL: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering> (26.08.2023.)
56. *M. Tropčić*, "Sinteza Ag/SiO<sub>2</sub> nanokompozita", Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:563935>
57. URL: <https://www.mgscientific.com/products/oven-vacuum-model-3606-3608-3618-and-3618p-barnstead-lab-line/> (26.08.2023.)
58. URL: <https://www.thelabworldgroup.com/product/labconco-freezone-1-benchtop-freeze-dry-system/> (26.08.2023.)
59. URL: <https://www.fishersci.com/shop/products/retsch-mm-400-mixer-mill-9/08418241> (26.08.2023.)
60. URL: [https://www.google.com/search?sca\\_esv=563740992&rlz=1C1KNTJ\\_hrHR973HR975&sxsrf=AB5stBid5EKoLDteleOWqsHrd6Iqb3onMg:1694185198206&q=Litesizer+500,+Anton+Paar&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiOxLDXo5uBAxU02gIHHbnJBXcQ0pQJegQICxAB&biw=1600&bih=751&dpr=1#imgrc=BdKF3Jf-G4UNdM](https://www.google.com/search?sca_esv=563740992&rlz=1C1KNTJ_hrHR973HR975&sxsrf=AB5stBid5EKoLDteleOWqsHrd6Iqb3onMg:1694185198206&q=Litesizer+500,+Anton+Paar&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiOxLDXo5uBAxU02gIHHbnJBXcQ0pQJegQICxAB&biw=1600&bih=751&dpr=1#imgrc=BdKF3Jf-G4UNdM) (26.08.2023.)
61. *M. Umaña, M. Calahorra, V. Eim, C. Rosselló, S. Simal*, Measurement of microstructural changes promoted by ultrasound application on plant materials with different porosity. *Ultrason Sonochem.* 2022, 88:106087. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106087>
62. URL: <https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/histology-embedding-centers-accessories/histocore-arcadia/> (02.09.2023.)
63. URL: <https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/microtomes/leica-rm2125-rts/> (02.09.2023.)
64. URL: <https://milexia.com/products/product/quorum-q150r-plus/> (02.09.2023.)
65. *K. Skupień*, "Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.)." *Folia Horticulturae*, 2006, 47-56.
66. *K. An, M. Fu, H. Zhang, D. Tang, Y. Xu, G. Xiao*, Effect of ethyl oleate pretreatment on blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.): drying kinetics, antioxidant activity, and structure of wax layer. *J Food Sci Technol.*, 2019, 56 (2): 783-791. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3538-7>