

Utjecaj količine saharoze i trehaloze na fenolne i hlapljive komponente u punilima na bazi kupine

Horvatić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:696021>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Iva Horvatić

**UTJECAJ KOLIČINE SAHAROZE I TREHALOZE NA FENOLNE I
HLAPLJIVE KOMPONENTE U PUNILIMA NA BAZI KUPINE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2020.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Iva Horvatić

**UTJECAJ KOLIČINE SAHAROZE I TREHALOZE NA FENOLNE I
HLAPLJIVE KOMPONENTE U PUNILIMA NA BAZI KUPINE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Razvoj proizvoda u prehrambenoj industriji**Tema rada** je prihvaćena na IX redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno- tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 20. srpnja 2020..**Mentor:** prof. dr. sc. *Mirela Kopjar***Utjecaj količine saharoze i trehaloze na fenolne i hlapljive komponente u punilima na bazi kupine***Iva Horvatić, 0113140621***Sažetak:**

Cilj ovog rada bio je pripremiti punila na bazi kupina i odrediti utjecaj tipa i količine dodanih disaharida na istraživane parametre u pripremljenim punilima. Za pripremu punila korištena su citrus vlakna, sok kupine i disaharidi (saharoza i trehaloza u udjelima od 10 % i 20 %). Parametri koji su se određivali su udio fenola, proantocijanidina, antioksidacijska aktivnost, udio hlapljivih komponenata i parametri boje. Najveća količina fenola i proantocijanidina nakon pripreme i nakon skladištenja određena je u uzorcima s dodatkom 20 % trehaloze. Određivanjem hlapljivih komponenata utvrđeno je da najveći udio u sveukupnoj aromi imaju terpeni i aldehidi i ketoni. Ove komponente su određene u većoj koncentraciji u punilima sa saharozom i nakon pripreme i nakon skladištenja.

Ključne riječi: *kupina, disaharidi, fenoli, hlapljive komponente***Rad sadrži:** 50 stranica
19 slika
9 tablica
36 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

1. izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i>	predsjednik
2. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i>	član-mentor
3. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i>	Član
4. doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 28. listopada 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Product development in food industry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on July 20, 2020.

Mentor: *Mirela Kopjar*, PhD, prof.

Influence of amount of sucrose and trehalose on phenolic and volatile components in blackberry based fillers

Iva Horvatić, 0113140621

Summary:

The aim of this work was preparation of blackberry cream fillings and establishment of disaccharides type and their amount on evaluated parameters. For preparation of cream fillings, citrus fibre, blackberry juice and disaccharides (sucrose and trehalose in amount of 10 % and 20 %) were used. Parameters that have been evaluate were content of phenols, proanthocyanidins, antioxidant activity, content of volatile compounds and colour parameters. The highest amounts of phenols and proanthocyanidins, after preparation and after storage, were determined in fillings with 20 % of trehalose. Evaluation of volatile compounds revealed that terpens and aldehydes and ketones represented the highest portion in overall flavour of fillings. All of these compounds were determined in the highest concentration in fillings with sucrose, both after preparation and storage.

Key words: *blackberry, disaccharides, phenols, volatile compounds*

Thesis contains: 50 pages
19 figures
9 tables
36 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. <i>Nela Nedić Tiban</i> , PhD, prof. | member |
| 4. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: October 28, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na trudu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala i mojoj cijeloj obitelji, dečku i prijateljima koji su bili uz mene kroz cijelo moje školovanje i koji su omogućili da mi ovo razdoblje života bude najljepše u životu. Također hvala i svim profesorima i djelatnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku koji su uvijek bili voljni pomoći.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KUPINA.....	4
2.1.1. Botaničko podrijetlo kupine.....	4
2.1.2. Kemijski sastav kupine.....	5
2.1.3. Aroma kupine.....	6
2.2. POLIFENOLI.....	7
2.2.1. Podjela i kemijska struktura polifenolnih spojeva.....	8
2.2.2. Polifenoli kupine.....	12
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost polifenola.....	12
2.2.4. Veza između strukture i antioksidacijske aktivnosti polifenola.....	14
2.3. PREHRAMBENA VLAKNA.....	15
2.3.1. Netopljiva prehrambena vlakna.....	16
2.3.2. Topljiva prehrambena vlakna.....	17
2.4. SREDSTVA ZA ZASLAĐIVANJE.....	18
2.4.1. Saharoza.....	18
2.4.2. Trehaloza.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1. ZADATAK.....	22
3.2. MATERIJALI I METODE.....	23
3.2.1. Materijali.....	23
3.2.2. Priprema punila na bazi kupina.....	23
3.2.3. Metode.....	24
3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka.....	24
3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola.....	25
3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina.....	25
3.2.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	25
3.2.3.5. Određivanje parametara boje.....	26
3.2.3.6. Određivanje hlapljivih komponenata.....	28
3.2.3.7. Statistička analiza podataka.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1. UKUPNI FENOLI I PROANTOCIJANIDINI.....	32
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	33
4.3. PARAMETRI BOJE.....	34
4.4. HLAPLJIVE KOMPONENTE U PUNILIMA NA BAZI KUPINA.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	47

Popis oznaka, kratica i simbola

10 %_sah	Punila na bazi kupina s dodatkom 10 % saharoze
20 %_sah	Punila na bazi kupina s dodatkom 20 % saharoze
10 %_treh	Punila na bazi kupina s dodatkom 10 % trehaloze
20 %_treh	Punila na bazi kupina s dodatkom 20 % trehaloze

1. UVOD

Kupina (*Rubus fruticosus L.*) je voće iz porodice ruža koje je široko rasprostranjeno širom svijeta. Osim što je bogat izvor vitamina, minerala i prehrambenih vlakana koji su esencijalni za ljudsko zdravlje, kupina obiluje i polifenolima poput antocijanina, flavonola, flavanola, elagitanina, galotanina, proantocijanidina i fenolnih kiselina. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji imaju brojne biološke funkcije i pozitivan učinaka na ljudsko zdravlje (poput antioksidacijskog, antikancerogenog, antineurodegenerativnog i protuupalnog djelovanja) (Du i sur., 2009). Velika važnost kupine krije se u njezinom bogatstvu polifenolima zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja koje se temelji na njihovoj sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i vezanju iona metala u organizmu čime štite organizam i smanjuju rizik od brojnih karcinoma i kardiovaskularnih bolesti. Tamnoplava boja kupine pripisuje se antocijanima koje sadrži u visokoj koncentraciji i koji su glavni antioksidanti u kupini (Siriwoharn i sur., 2004). Kupina je poznata i po svojoj specifičnoj aromi. Glavni aromatski spojevi u kupini su furani, odnosno furfural i njegovi derivati među kojima je najzastupljeniji 5-hidroksimetilfurfural koji najviše utječe na jedinstvenu aromu kupine. Bitni su još i 3,5-dihidroksi-6-metil-2,3-dihidropiran-4-on, 3,4-dimetoksialilbenzen i heptan-2-ol koji se također mogu pronaći u većem udjelu u aromatskom profilu kupine (Turemis i sur., 2003).

U prehrambena vlakna ubrajamo celulozu, hemicelulozu, lignin, pektine, gume i dr., a zajednička im je karakteristika otpornost na utjecaj probavnih enzima u tankom crijevu odakle odlaze nerazgrađena u debelo crijevo gdje podliježu bakterijskoj fermentaciji (Gaćina, 2014). Prehrambena vlakna su u današnje vrijeme neizostavan dio zdrave prehrane zbog njihovih pozitivnih učinaka na zdravlje poput sniženja kolesterola, prevencije raka debelog crijeva i dr. (Vranešić Bender i Krstev, 2008).

Disaharidi, odnosno šećeri saharoza i trehaloza koriste se kao aditivi u prehrambenoj industriji zbog poboljšanja okusa proizvoda, također djeluju kao konzervansi i imaju pozitivne učinke na teksturu proizvoda (Ergović i sur., 2010). Saharozu je najčešće sladilo koje se koristi u prehrambenoj industriji i kućanstvima, to je nereducirajući šećer koji se sastoji od molekula α -D-glukoze i β -D-fruktoze povezanih glikozidnom vezom. Djelovanjem enzima saharaze, razgrađuje se na glukozu i fruktozu u ljudskom organizmu (Babić, 2007). Trehaloza je jedan od najstabilnijih šećera, a sastavljena je od dvije molekule D-glukoze koje su povezane α -1,1 glikozidnom vezom, te se u ljudskom organizmu razgrađuje na dvije molekule glukoze

djelovanjem enzima trehalaze. Ima manju slatkoću i energetska vrijednost od saharoze, a kao komercijalni proizvod se nalazi u obliku dihidrata (Kopjar, 2007).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj tipa disaharida i njihove količine na nekoliko parametara u pripremljenim punilima na bazi kupina. Za pripremu punila korištena su citrus vlakna, sok od kupine i disaharidi saharoza i trehaloza. Parametri koji su se određivali nakon pripreme punila i nakon njihovog skladištenja na sobnoj temperaturi su udio fenola, proantocijanidina, hlapljivih komponenata i parametri boje. Antioksidacijska aktivnost se određivala pomoću DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KUPINA

Kupina (*Rubus fruticosus L.*) je biljka koja pripada porodici ruža (*Rosaceae*), a poznata je još od davnina po svom ljekovitom djelovanju. **Slika 1** prikazuje zrele plodove kupine. Bogat je izvor vitamina, minerala i antioksidansa koji sudjeluju u zaštiti ljudskog zdravlja (Bincy i sur., 2017).



Slika 1 Plodovi kupine (Web 1)

2.1.1. Botaničko podrijetlo kupine

Kupina se koristila još u staroj Grčkoj kao ljekovita biljka, a danas je njezin uzgoj najveći u SAD-u. U Europi se većinom uzgajaju američke sorte kupine, bez trnja i uspravnog rasta, a u Hrvatskoj se kupina uzgaja u kontinentalnom dijelu. Sorte kupine su mnogobrojne (oko 300 sorti), među kojima najveće gospodarsko značenje imaju sorte: Wilsonova rana, Smoothstem, Black Satin, Thorenfree, Thornless Evergreen, Thornless Logan, Ebony King, Eldorado, Bailey, Himalaya, Darow i Boysen (Miljković, 2005).

Botanička klasifikacija kupine je sljedeća (USDA, 2020):

- Carstvo: Plantae (biljke)
- Podcarstvo: Tracheobionta (cijevnjače ili vaskularne biljke)
- Odjeljak: Spermatophyta (sjemenjače)
- Pododjeljak: Angiosperme (golosjemenjače)

- Divizija: Magnoliophytina (cvjetnice)
- Razred: Magnoliopsida (dvoupnice)
- Red: Rosales
- Porodica: Rosaceae (ruže)
- Rod: Rubus L.
- Vrsta: Rubus fruticosus L. (Kupina)

Kupine su višegodišnje biljke s dvogodišnjim trskama, koje mogu biti uspravnog ili puzećeg rasta, sa ili bez trnja, široko su rasprostranjene i lako se prilagode različitim klimatskim uvjetima i staništima (Clark i Finn, 2011). Mogu se pronaći na planinama, u ravninama, pokraj puteva i grmlja, u živicama i uz rubove šuma. Grm kupine može narasti 1 do 2 m, ima duge, bodljikave i tanke grane. Listovi su tamnozeleni i slabo dlakavi s gornje strane, dok su s donje strane svjetliji i prekriveni dlačicama i bodljama. Kupina cvjeta od lipnja do kolovoza, nakon čega počinju sazrijevati plodovi sve do listopada. Cvjetovi su bijeli ili ružičasti, s bodljikavim stapkama i peteljka listova. Iz svakog cvijeta razvije se po jedan jagodičasti plod koji je na početku svijetlozelen, te polako poprima crvenkastu boju da bi nakon sazrijevanja bio sjajan i tamnoplavi. Svježi plodovi kupine su osvježavajući i sočni, kiselkasto-slatkog okusa. Konzumira se svježa, ali se također u velikoj mjeri koristi za proizvodnju raznih marmelada, kompota, sokova, vina i likera (Grlić, 1990).

2.1.2. Kemijski sastav kupine

Plodovi kupine bogat su izvor ugljikohidrata, vitamina, minerala, fenolnih spojeva i prehrambenih vlakana, te zbog toga imaju veliku zdravstvenu i zaštitnu vrijednost. U **Tablici 1** prikazan je kemijski sastav kupine izražen na 100 g ploda. Pored vode, koja u plodu kupine zauzima oko 88%, od ostalih komponenti koje se nalaze u suhoj tvari, ugljikohidrata ima u najvećem udjelu (oko 9%). Kada govorimo o ukupnim šećerima, u kupini prevladavaju fruktoza i glukoza, a dobar je izvor i prehrambenih vlakana. Kupina je siromašna mastima i ima malu energetska vrijednost (43 kcal), a isto tako ne obiluje ni proteinima (Šoškić, 1984). Od ukupnih kiselina, najzastupljenija je jabučna kiselina, te fumarna, oksalna, jantarna, mliječna i salicilna kiselina. Kupina sadrži i elaginsku kiselinu koja ima veliko značenje jer

sudjeluje u sprječavanju negativnog djelovanja slobodnih radikala u organizmu (Pichler, 2011).

Tablica 1 Kemijski sastav kupine izražen na 100 g ploda (Bincy i sur., 2017)

KOMPONENTA	MASA
Voda (g)	88,2
Proteini (g)	1,39
Lipidi (g)	0,49
Ugljikohidrati (g)	9,61
Vlakna (g)	5,30
Šećeri (g)	4,88
Minerali	
Kalij (mg)	162
Kalcij (mg)	29
Magnezij (mg)	20
Fosfor (mg)	22
Vitamini	
Vitamin C (mg)	21
Vitamin B9 (µg)	25
Vitamin A (µg)	11
Vitamin K (µg)	19,80
Vitamin E (mg)	1,17

Veliki značaj kupine krije se u bogatstvu vitamina i minerala. Kada govorimo o vitaminima, kupina je bogata vitaminom C i K, te folatom. Također sadrži i ostale vitamine B skupine, kao i antioksidans beta karoten tj. provitamin A. Što se tiče mineralnih tvari, kupina obiluje kalijem, kalcijem, magnezijem, fosforom i dr. Zbog visokog udjela vitamina i minerala, kupina se odavnina primjenjuje u zdravstvene svrhe jer ima niz blagotvornih učinaka kao što su sniženje krvnog tlaka i jačanje imuniteta (Bincy i sur., 2017).

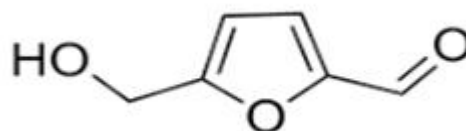
Kupina također ima veliki značaj zbog visokog sadržaja fenolnih spojeva koji su antioksidansi i sudjeluju u zaštiti ljudskog organizma od oksidativnog stresa i pozitivno djeluju na zdravlje čovjeka. Kupina sadrži od 114 do 1056 mg/100 g svježeg voća ukupnih fenola, među kojima su antocijani, tanini i flavonoidi (Bincy i sur., 2017). Antocijani su nositelji boje u kupini i odgovorni su za njezinu tamnoplavu boju.

2.1.3. Aroma kupine

Pojam aroma označava kombiniranu percepciju okusa i mirisa, gdje su tvari odgovorne za okus pri sobnoj temperaturi nehlapljive, dok su tvari odgovorne za miris hlapljive. Arome mogu biti prirodnog podrijetla ili kemijski sintetizirane. Arome prirodnog podrijetla su

sekundarni produkti živih organizama koji nastaju složenim reakcijama biosinteze tijekom prirodnog rasta živih organizama. Mogu ući i u dodatne kemijske reakcije koje određuju njihov konačni kemijski sastav. Prirodne arome se akumuliraju u cvijeću, voću i povrću, začinskom i aromatičnom bilju. Aroma svakog voća je karakteristična, te nastaje reakcijama biosinteze različitih hlapljivih spojeva kao što su aldehidi i ketoni, alkoholi, esteri, kiseline i dr. (Papić, 2007).

Kada je riječ o aromatskom sastavu kupine, utvrđeno je da su furani, odnosno furfural i njegovi derivati, glavni aromatski spojevi u kupini. Među furfuralima, najzastupljeniji u kupini je 5-hidroksimetilfurfural (**Slika 2**) koji čini od 79,7 do 96,1 % ukupnog aromatskog profila i najviše doprinosi jedinstvenom okusu kupina (Turemis i sur., 2003).



Slika 2 Kemijska struktura 5-hidroksimetilfurfurala (Web 2)

Drugi bitan spoj u aromatskom profilu kupine koji sudjeluje u udjelu od 5,7 do 9,8 % je 3,5-dihidroksi-6-metil-2,3-dihidropiran-4-on. U brojnim istraživanjima aromatskog profila kupine identificirano je preko 245 aromatskih spojeva, a osim već navedenih spojeva na karakterističnu aromu kupine utječu i 3,4-dimetoksialilbenzen, heptan-2-ol (43,06 %), p-cimen-8-ol (3,72 %), heptan-2-on (3,32 %), heksan-1-ol (3,05 %), 4-terpineol (2,38 %), pulegon (2,05 %) i oktan-1-ol (1,83 %) (Turemis i sur., 2003).

2.2. POLIFENOLI

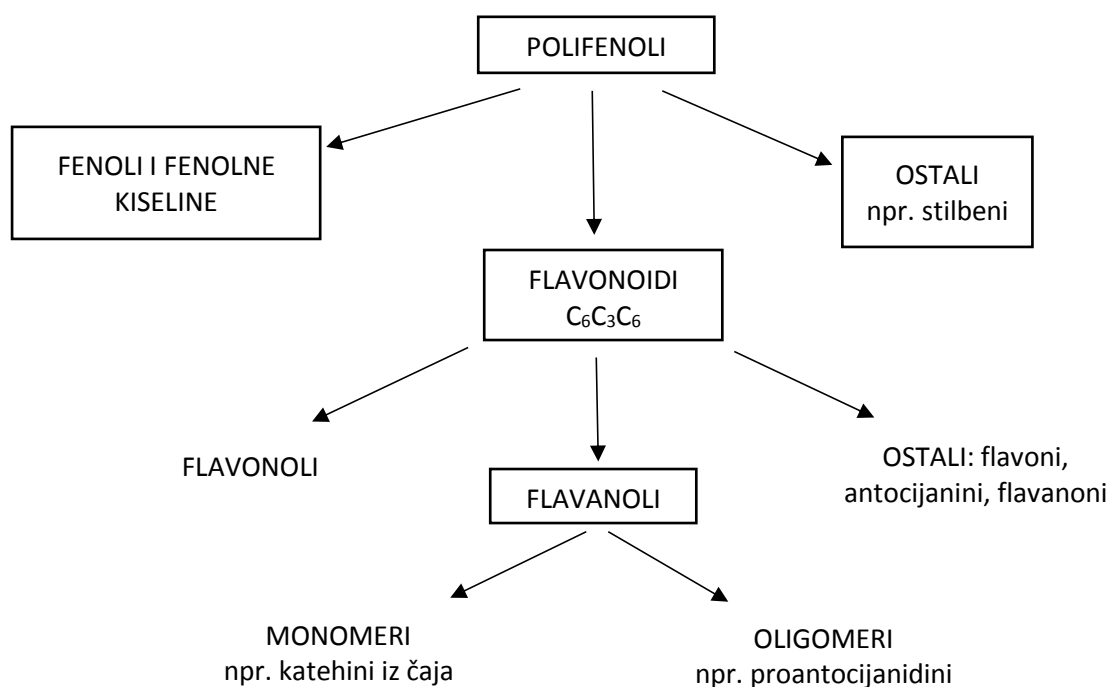
Polifenoli su sekundarni metaboliti viših biljaka, te predstavljaju jednu od najbrojnijih i najprisutnijih skupina biljnih metabolita tj. fitokemikalija. Također predstavljaju i najzastupljenije antioksidanse u hrani, a ova skupina spojeva sadrži oko 8000 spojeva različite kemijske strukture (Daglia, 2012).

Glavni izvori polifenola su voće, voćni sokovi, kava, crno vino i čaj, a ukupnom dnevnom unosu polifenola također doprinose i žitarice, povrće, čokolada i mahunarke. Brojna istraživanja se bave zdravstvenim učincima polifenolnih tvari, te je dokazano da polifenoli

imaju niz pozitivnih učinaka na ljudski organizam kao što je prevencija kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, različitih vrsta karcinoma i osteoporoze. Od velike je važnosti njihovo antioksidacijsko djelovanje, kao i antikancerogeno, antimikrobno i protuupalno djelovanje na organizam čovjeka (Scalbert i sur., 2005).

2.2.1. Podjela i kemijska struktura polifenolnih spojeva

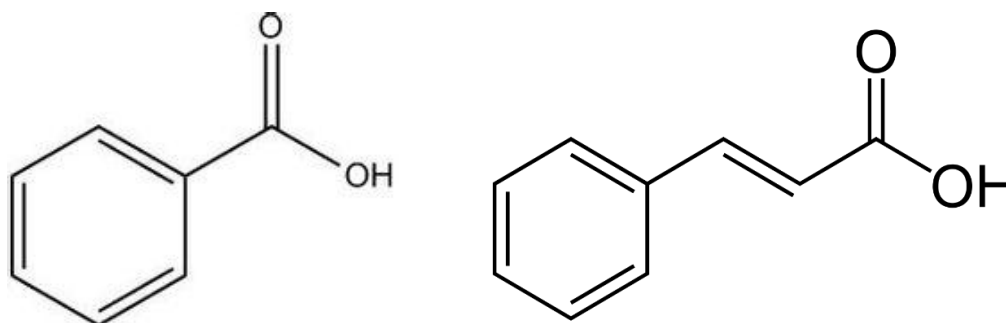
Široka rasprostranjenost polifenola u prirodi i raznolikost kemijskih struktura, utjecala je na brojne načine klasifikacije ovih biljnih metabolita. Budući da je poznato preko 8000 različitih polifenolnih spojeva od kojih je preko 4000 klasificirano kao flavonoidi. Podjela polifenola je vrlo kompleksna, te iako su polifenoli kemijski određeni kao spojevi sa značajkama fenolnih struktura, zbog svoje raznolikosti postoji nekoliko podskupina polifenolnih spojeva kao što je prikazano na **Slici 3**. Različiti načini klasifikacije ovih biljnih metabolita zasnivaju se na njihovom izvoru podrijetla, kemijskoj strukturi i biološkim funkcijama. Veliki broj biljnih polifenola prema kemijskoj strukturi je glikozid koji na različitim mjestima polifenolnog kostura sadrži različite šećerne jedinice i acilirane šećere. Prema tome, podjela polifenola na osnovi kemijske strukture aglikona sadrži 4 glavne grupe, a to su fenolne kiseline, flavonoidi, polifenolni amidi i ostali polifenoli (Tsao, 2010).



Slika 3 Osnovna podjela polifenolnih spojeva (Berend i Grabarić, 2008)

Fenolne kiseline se definiraju kao neflavonoidni polifenoli, a dijele se u dvije glavne podskupine (Tsao, 2010):

1. Derivati benzojeve kiseline (*p*-hidroksibenzojeva kiselina, galna kiselina, vanilinska kiselina),
2. Derivati cimetne kiseline (*p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina). Na **Slici 4** prikazane su strukture benzojeve i cimetne kiseline.

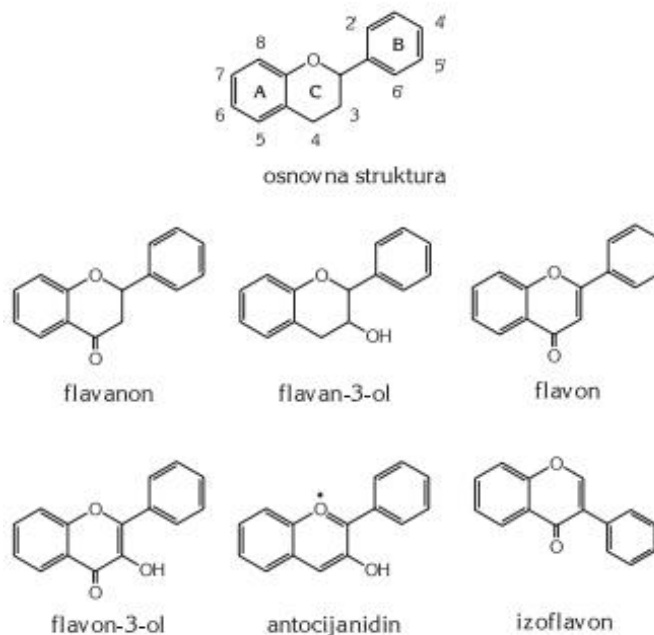


Slika 4 Struktura benzojeve (lijevo) i cimetne kiseline (desno) (Web 3 i Web 4)

Sastoje se od fenolnog prstena i bočnog niza koji se sastoji od jednog (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) atoma ugljika. Raznolikost derivata fenolnih kiselina temelji se na različitom stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena, te na različitom broju i pozicijama hidroksilnih skupina na prstenu. Fenolne kiseline imaju različite funkcije u biljkama poput sinteze proteina, fotosinteze, aktiviranja enzima i asimilacije hranjivih tvari (Vinčić, 2017). Fenolne kiseline razlažu se kiselinskom, lužnatom ili enzimskom hidrolizom. U voću i povrću se nalaze u slobodnom obliku, dok se u žitaricama i mekinjama nalaze u vezanom obliku te ih je potrebno hidrolizirati (Tsao, 2010).

Flavonoidi čine najveću i najbrojniju skupinu polifenola, te se zbog svoje raznolikosti dijele na više podskupina, a to su: antocijani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavani, flavanonoli, flavan-3,4-dioli, halkoni, flavanoli i dihidrohalkoni. Od svih nabrojanih podskupina, u biljkama prevladavaju tri podskupine flavonoli, flavanoli i antocijani (Jakobek, 2007). Osnovu strukturu flavonoida čine tri fenolna prstena koja grade flavonoidnu jezgru. Na osnovnu flavonoidnu jezgru vežu se različite supstitucijske skupine poput šećera, metoksi skupina i hidroksilnih skupina, što dovodi do njihove raznolikosti i velikog broja različitih spojeva kao što je prikazano na **Slici 5**. U prirodi su većinom prisutni u obliku glikozida, odnosno vežu se s različitim molekulama šećera što dovodi do povećanja polarnosti

molekule i lakšeg pohranjivanja u biljnim stanicama. Povezuju se s raznim šećerima kao što su glukoza, galaktoza, arabinoza, ksiloza i dr. (Jakobek, 2007).

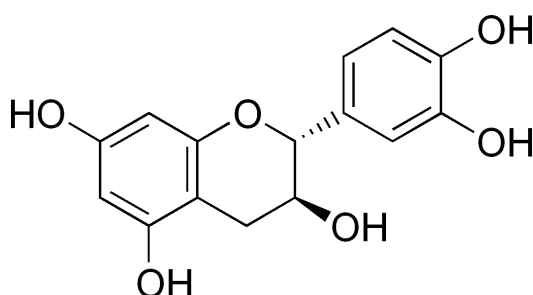


Slika 5 Osnovna struktura i podskupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Flavonoidi se mogu pronaći u lišću, cvijeću, sjemenkama, voću i kori drveća. Imaju važnu ulogu u zaštiti i održanju ljudskog organizma zbog svog antioksidacijskog, antibakterijskog, protuupalnog, antialergijskog i antikancerogenog djelovanja. Također utječu na okus i boju hrane. Njihovo antioksidacijsko djelovanje temelji se na sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, vezanju iona metala, aktivaciji antioksidacijskih enzima i inhibiciji oksidaza čime štite organizam od oksidativnog stresa i raznih bolesti (Kazazić, 2004).

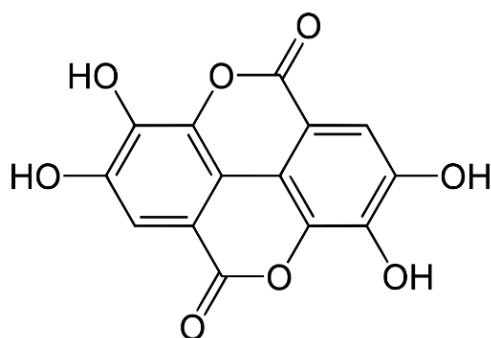
Antocijani predstavljaju jednu od najzastupljenijih podskupina flavonoida u voću. Imaju karakterističnu strukturu $C_6-C_3-C_6$, a u prirodi se uvijek javljaju u obliku glikozida čijom hidrolizom nastaje antocijanidin (aglikon) i šećerna komponenta. Velika raznolikost antocijana je rezultat različitog broja hidroksilnih i/ili metoksi skupina koje sadrže, različitog broja, vrste i položaja šećera koji su vezani, te različitog broja i vrste aromatskih kiselina koje su vezane za molekulu šećera. Antocijani su odgovorni za boju voća na čiji intenzitet utječu broj i položaj hidroksilnih skupina u B prstenu. Što je broj hidroksilnih skupina veći, to je intenzivnija boja voća. Antocijani su vrlo nestabilni, te na njihovu degradaciju utječu brojni faktori kao što su svjetlost, pH, temperatura, kisik, prisustvo enzima, proteina, metalnih iona i dr. (Vinčić, 2017).

Flavanoli (flavan-3-oli) predstavljaju najkompleksniju podskupinu flavonoida, postoje kao jednostavni monomeri i kao oligomerni i polimerni oblici, tzv. proantocijanidini. Karakterizira ih prisustvo hidroksilne skupine na C prstenu, te se nalaze u obliku glikozida (mono-, di- i triglikozidi), najčešće vezani za glukozu. Flavanoli predstavljaju gradivne jedinice tanina, žuto su obojani i najviše ih ima u kruškama, jabukama, kupini i jagodama. U biljkama su najzastupljeniji monomeri poput katehina (**Slika 6**) i epikatehina, te proantocijanidini koji čine kondenzirane tanine. Kondenzirani tanini (proantocijanidini) su spojevi velikih molekulskih masa, a najčešće nastaju C-C kondenzacijom flavan-3-ola (katehin i epikatehin) (Vinčić, 2017).



Slika 6 Struktura katehina (Web 5)

Osim fenolnih kiselina, flavonoida i fenolnih amida, postoji još i skupina ostalih polifenola u koju spadaju neflavonoidni polifenoli iz hrane koji imaju pozitivne učinke na zdravlje čovjeka. U ovu skupinu ubrajaju se resveratrol koji se nalazi u grožđu i crnom vinu, elaginska kiselina (**Slika 7**) i njeni derivati koje sadrži bobičasto voće (jagode, maline, kupine) i kožica orašastih plodova, lignani koji se nalaze u lanu i sezamu, kurkumin iz kurkume koji je jak antioksidans, te ružmarinska kiselina koja je dimer kafeinske kiseline (Tsao, 2010).



Slika 7 Struktura elaginske kiseline (Web 6)

2.2.2. Polifenoli kupine

Velika važnost kupine krije se u njezinom bogatstvu fenolnim spojevima, te zbog toga ona predstavlja bogat izvor antioksidanasa koji su izrazito važni i korisni u zaštiti ljudskog zdravlja. Kupina pored vitamina i minerala sadrži od 114 do 1056 mg ukupnih polifenola/100 g svježeg voća, među kojima su najzastupljeniji antocijani, elagitanini, flavonoli i flavanoli (Bincy i sur., 2017).

Iz skupine flavonoida, u kupini prevladavaju antocijani koji su odgovorni i za njezinu tamnoplavu boju, a prisutni su uglavnom kao derivati cijanidina koji sadrže šećere poput glukoze, rutinoze, ksiloze ili arabinoze vezane na C3 ugljiku. Ukupan sadržaj antocijana u kupini kreće se od 114,39 do 241,54 mg/100 g svježeg voća. Glavni antocijani koji prevladavaju u kupini su cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-dioksalil-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-soforozid, cijanidin-3-glukozilrutinozid, cijanidin-3-arabinozid, malvidin-3-arabinozid, pelargonidin-3-glukozid, cijanidin-3-(3-malonil) glukozid i cijanidin-3-(6-malonil) glukozid (Bincy i sur., 2017). Kupina još sadrži i značajnu količinu flavonola u rasponu od 10,20 do 16,02 mg/100 mg ploda, među kojima prevladavaju kvercetin glikozidi, a neki od najzastupljenijih su kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-ksilozid. Kada je riječ o fenolnim kiselinama, kupina sadrži *p*-hidroksibenzojevu, kumarnu, feruličnu, galnu i kafeinsku kiselinu (Bincy i sur., 2017).

U kupini se nalaze i tanini koji se mogu hidrolizirati, tj. elagitanini. Kupina sadrži oko 108 mg elagitanina/100 mg ploda i oko 20 mg konjugata elaginske kiseline/100 mg ploda. Slobodna elaginska kiselina predstavlja oko 37 % ukupnih konjugata elaginske kiseline u kupini. Među elagitaninima u kupini, prevladavaju sanguin H-6 i lambertianin C.

2.2.3. Antioksidacijska aktivnost polifenola

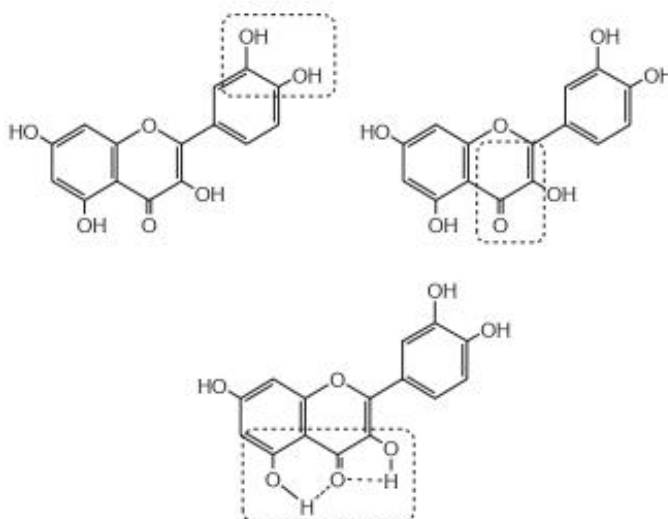
Sastav raznovrsnog voća je od velikog značenja zbog sadržaja fenolnih tvari koji su prirodni antioksidansi i imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Antioksidansi se definiraju kao sastojci hrane koji zaustavljaju, odgađaju ili sprječavaju negativne procese kao što su kvarenje hrane i stvaranje nepoželjne arome koji nastaju tijekom oksidacije. Moguća su dva načina inhibiranja ili usporavanja oksidacije antioksidansima (Pichler, 2011):

1. Uklanjanje slobodnih radikala pri čemu se sastojci definiraju kao primarni antioksidansi

2. Mehanizam koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala pri čemu se sastojci definiraju kao sekundarni antioksidansi.

Primarni antioksidansi su fenolne tvari, dok sekundarni antioksidansi djeluju antioksidacijski u prisustvu nekih drugih tvari npr. limunska kiselina djeluje kao antioksidans samo u prisustvu metalnih iona. Antioksidansi su brojni proteini, enzimi, vitamini i fenolne tvari. Glavni sastojci voća i povrća koji posjeduju antioksidacijsku aktivnost su vitamini i polifenoli. Kada je riječ o polifenolima, skupina koja je najzastupljenija u kupini su flavonoidi, odnosno antocijani koji u najvećoj mjeri doprinose antioksidacijskim svojstvima kupine (Pichler, 2011).

Antioksidacijsko djelovanje polifenola se temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodikova atoma i hvatanja elektrona slobodnih radikala, vezanju iona metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktivaciji antioksidacijskih enzima i inhibiciji oksidaza (lipooksigenaza, protein kinaza i dr.) čime štite organizam od raznih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti i brojnih karcinoma (Heim i sur., 2002). Njihova antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturnom rasporedu funkcionalnih skupina na glavnoj okosnici polifenola kao što je prikazano na **Slici 8** (Kazazić, 2004).



Slika 8 Strukturne skupine flavonoida bitne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

Najvažnije djelovanje flavonoida kao antioksidanasa je hvatanje elektrona slobodnih radikala prekidajući tako lančanu reakciju slobodnog radikala, pri čemu moraju zadovoljiti dva uvjeta:

1. Ako je flavonoid prisutan u manjoj koncentraciji od tvari koja je podložna oksidaciji, tada on mora usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije.

2. Iz flavonoida mora nastati stabilan radikal koji ne potiče lančanu reakciju oksidacije. Stabilizacija radikala se postiže delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Antioksidacijska aktivnost flavonoida određena je njihovim glavnim strukturnim značajka, a to su (Kazazić, 2004):

1. o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja stabilizira radikal i delokalizira elektron.
2. 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom što dovodi do delokalizacije elektrona iz B-prstena.
3. Hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje omogućavaju vodikovu vezu s keto-skupinom.

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika koji ulaze u lančane reakcije oksidacije su peroksidni radikal-anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2) i lipidni peroksidni radikali. Mehanizmom hvatanja slobodnih radikala nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal u slijedećim reakcijama (Kazazić, 2004):

1. $ROO^{\bullet} + F1-RO \longrightarrow OH + F1-O^{\bullet}$
2. $HO^{\bullet} + F1-OH \longrightarrow H_2O + F1-O^{\bullet}$

Drugi mogući način djelovanja flavonoida kao antioksidanasa je njihova interakcija s drugim antioksidansima (vitamin C ili vitamin E). Sinergijski efekt međudjelovanja tih antioksidanasa vidljiv je iz primjera povećanja antiproliferativnog učinka kvercetina u interakciji s askorbinskom kiselinom (vitamin C) (Kazazić, 2004).

2.2.4. Veza između strukture i antioksidacijske aktivnosti polifenola

Antioksidacijska aktivnost polifenola, odnosno flavonoida ovisi o strukturnom rasporedu funkcionalnih skupina na njihovoj glavnoj okosnici.

Antioksidacijska aktivnost velikog broja flavonoida određena je brojem i rasporedom hidroksilnih skupina na njihovoj glavnoj okosnici. Hidroksilne skupine prstena B najviše utječu na sposobnost hvatanja reaktivnih vrsta kisika i dušika. Doniranjem vodikova atoma i elektrona hidroksilnim i peroksidnim radikalima, dolazi do njihove stabilizacije, te nastaje relativno stabilni flavonoidni radikal. Prisutnost hidroksilnih skupina u položajima 3'- i 4'- (kateholna struktura) u prstenu B dovodi do povećanja inhibicije peroksidacije lipida. Takav

je raspored osobina najjačih antioksidanasa. Flavonoidi koji nemaju kateholnu strukturu su slabi hvatači radikala i stvaraju nestabilne flavonoidne radikale (Kazazić, 2004).

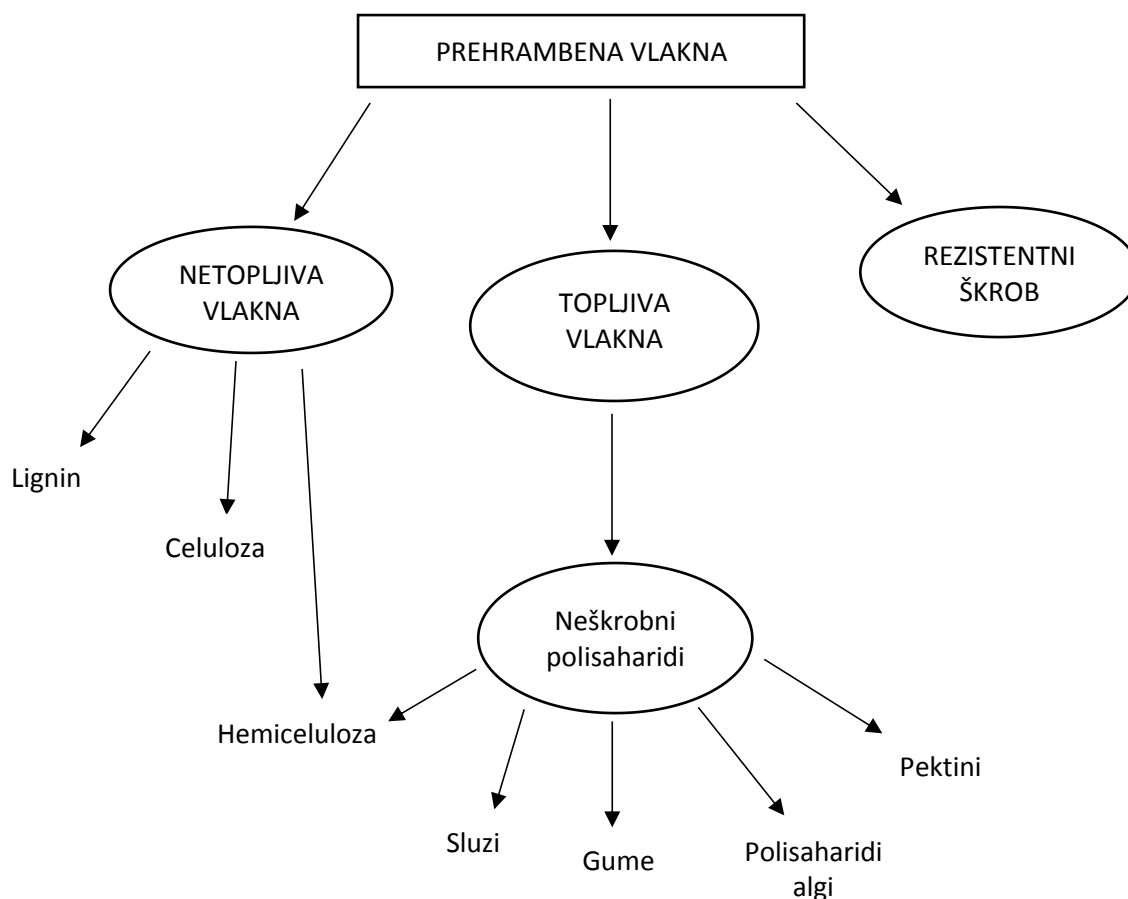
Prisutnost 2,3-dvostruke veze zajedno s 4-keto-skupinom dokazano povećava antioksidacijsku aktivnost flavonoida. Konjugacija dvostrukih veza između prstena A i B omogućuje rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgara, što dovodi do povećanja stabilnosti flavonoidnih radikala (Kazazić, 2004).

Razlike u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti između polimetoksiliranih i polihidroksiliranih flavonoida utječu na antioksidacijsku aktivnost. Kvercetin je jak hvatač peroksidnih radikala, dok su njegovi O-metilirani i O-glikozidirani derivati slabiji hvatači radikala. O-metiliranjem dolazi do efekta narušavanja planarnosti što utječe na smanjenje antioksidacijske aktivnosti (Kazazić, 2004).

Dokazano je da su aglikoni snažniji antioksidansi od odgovarajućih glikozida. S porastom broja glikozidnih skupina dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti flavonskih glikozida. Na antioksidacijsku aktivnost, osim prisutnosti i ukupnog broja glikozidnih skupina, utječe i njihov položaj te struktura šećera (Kazazić, 2004).

2.3. PREHRAMBENA VLAKNA

Prehrambena vlakna su tvari biljnog podrijetla koja su otporna na ljudsku probavu tj. otporna su na utjecaj probavnih enzima, te napuštaju tanko crijevo nerazgrađene (Gaćina, 2014). To su ugljikohidratne komponente koje dolaze nerazgrađene u debelo crijevo gdje podliježu bakterijskoj fermentaciji. Među prehrambena vlakna ubrajamo celulozu, lignin, hemicelulozu, oligosaharide, gume, pektine i voskove (Kay, 1982). Podjela prehrambenih vlakana na osnovu topljivosti, prikazana je na **Slici 9**. Prehrambena vlakna posjeduju niz njihovih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje kao što su reguliranje pretilosti, sniženje kolesterola, prevencija karcinoma debelog crijeva i bolesti srca, te poboljšanje funkcije probavnog sustava (Vranešić Bender i Krstev, 2008).



Slika 9 Podjela prehrambenih vlakana na osnovu topljivosti (Bošnjak, 2019)

2.3.1. Netopljiva prehrambena vlakna

Netopljiva prehrambena vlakna u koja ubrajamo celulozu, hemicelulozu i lignin, uglavnom možemo pronaći u kori voća, mekinjama i integralnim žitaricama. Kroz probavni sustav prolaze gotovo nerazgrađena, dok se manji dio razgradi u debelom crijevu bakterijskom fermentacijom. Ona vežu velike količine vode, bubre, povećavaju volumen stolice i omekšavaju je, te tako stimuliraju pokretljivost crijeva i sprječavaju opstipaciju (Gaćina, 2014). Imaju pozitivan učinak na rad crijeva, reduciraju rizik od pojave hemoroida i ostalih bolesti crijeva.

Celuloza je složeni polisaharid, najzastupljenija je u prirodi u usporedbi s drugim prehrambenim vlaknima i glavna je komponenta stanične stjenke biljaka. Sastoji se od nekoliko tisuća glukoznih jedinica koje su međusobno povezane β -1,4-glikozidnom vezom, čineći tako nerazgranati lanac celuloze. Hemiceluloza se također nalazi u staničnoj stjenki biljaka, ali se razlikuje od celuloze u građevnim jedinicama. Sastoji se od velikog broja heksoza, pentoza i uronskih kiselina, lanci su kraći i razgranati. Lignin je nepolisaharidno

vlakno za razliku od celuloze i hemiceluloze. Polifenolni je polimer koji se sastoji od fenilpropil alkohola i kiselina, dio je drvenastih dijelova biljaka (Gaćina, 2014). Osim ovih netopljivih vlakana, bitno je spomenuti i rezistentni škrob koji ima svojstva netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana. Također prolazi nerazgrađen kroz tanko crijevo, te u debelom crijevu podliježe bakterijskoj fermentaciji pri čemu nastaju kratkolančane masne kiseline (propionska, octena i maslačna) koje imaju niz blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje, kao i sam rezistentni škrob. Smanjuju pH crijeva djelujući prebiotički, potiču apsorpciju kalcija i magnezija i pozitivno utječu na smanjenje žučnog kamena. RS sudjeluje u prevenciji raka debelog crijeva, inhibira rast patogenih bakterija (*Escherichia coli*, *Clostridium difficile* i *Salmonella*), pomaže u liječenju upalnih procesa, sprječava skladištenje masti u organizmu, nakupljanje kolesterola i nastanak kardiovaskularnih bolesti. Izvori RS su cjelovite žitarice, krumpir, grašak, zelene banane i mahunarke (Šubarić i sur., 2012).

2.3.2. Topljiva prehrambena vlakna

Topljiva prehrambena vlakna su neškrobni polimeri koji se otapaju u procesu probave, a budući da su viskozni, stvaraju viskoznu masu koja je poput gela i mogu vezati velike količine vode čime smanjuju probavljivost u tankom crijevu. U debelom crijevu dolazi do njihove razgradnje uslijed bakterijske fermentacije pri čemu nastaju kratkolančane masne kiseline koje organizam koristi za energiju. Bogat izvor topljivih prehrambenih vlakna su integralna riža, povrće, voće i zob (Gaćina, 2014). Značajna je njihova uloga u fiziološkoj funkciji čovjeka, pripisuju im se brojni pozitivni učinci na ljudski organizam kao što su smanjenje razine kolesterola i krvnog tlaka, povećanje bioraspoloživosti minerala, sprječavanje gastrointestinalnih bolesti i dijabetesa, smanjenje rizika od raka dojke i prostate (Chawla i Patil, 2010). U ovu skupinu vlakana ubrajamo: pektine, gume, sluzi i beta-glukane.

Pektini se definiraju kao razgranati polimeri galakturonske kiseline čije su molekule povezane α -1,4-glikozidnom vezom. Pektine dijelimo prema stupnju esterifikacije na nisko i visoko esterificirane pektine gdje su karboksilne skupine galakturonske kiseline esterificirane metanolom. Stupanj esterifikacije kod nisko esterificiranih pektina kreće se od 7 do 50 %, a kod visokoesterificiranih od 50 do 75 % (Babić, 2007). Prisutni su u staničnim stjenkama biljaka, kao i u citrusima, kruškama, jabukama, kori naranče i limuna i mahunarkama. Pektini imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji zbog svoje dobre topljivosti i sposobnosti

stvaranja gela. Koriste se kao stabilizatori i sredstva za postizanje bolje konzistencije (Gaćina, 2014). Beta-glukani (β -glukani) su polisaharidi koji se sastoje od velikog broja glukoznih jedinica koje su povezane β -1,4- i β -1,3-glikozidnim vezama, te su u usporedbi s celulozom manje linearni. Bogat izvor β -glukana su ječam i zob. Imaju brojne pozitivne učinke na ljudski organizam, a to su smanjenje koncentracije glukoze u krvi i kolesterola, te pozitivan učinak na kardiovaskularne bolesti (Gaćina, 2014). Sluzi su polisaharidi koji sadrže galakturonsku kiselinu. Nalaze se u morskim travama i algama, a u prehrambenoj industriji se primjenjuju kao stabilizatori i ugušćivači. U TPV se ubrajaju i gume, dugolančani polisaharidi koji se sastoje od velikog broja ugljikohidrata, odnosno galaktoze, manoze, glukoze i ramnoze. Otapaju se u vodi, viskozne su i guste, te se u prehrambenoj industriji upotrebljavaju kao stabilizatori i ugušćivači. Imaju pozitivan učinak na smanjenje kolesterola u organizmu (Gaćina, 2014).

2.4. SREDSTVA ZA ZASLAĐIVANJE

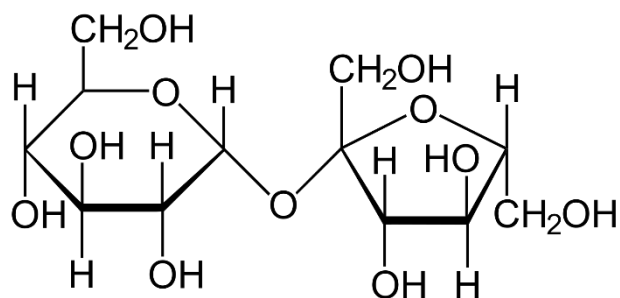
Disaharidi, odnosno šećeri saharoza i trehaloza koriste se u prehrambenoj industriji kao aditivi hrani kako bi se poboljšao okus, odnosno slatkoća proizvoda. Osim toga, šećeri povećavaju koncentraciju suhe tvari i energetske vrijednosti proizvoda, vežu i zadržavaju vodu, te djeluju kao konzervansi. Također imaju i pozitivne učinke na viskoznost i punoću proizvoda (Ergović i sur., 2010).

2.4.1. Saharoza

Saharoza ili konzumni šećer je nereducirajući šećer, molekulske formule $C_{12}H_{22}O_{11}$. Saharoza je disaharid koji se sastoji od molekula α -D-glukoze i β -D-fruktoze povezanih glikozidnom vezom kao što prikazuje **Slika 10**. Kristalna saharoza se proizvodi iz šećerne repe i šećerne trske i ima široku primjenu u prehrambenoj industriji i svim kućanstvima. Prirodno se nalazi u staničnom soku većine biljaka, ima visoku energetske vrijednosti (1650 J/100 g) i vrlo je jeftin izvor energije. Saharoza kristalizira u monoklinskom sustavu i sam kristal saharoze sadrži kombinaciju šest kristalografskih oblika (Babić, 2007).

Saharoza je najčešće i najvažnije sladilo koje se koristi u prehrani, otapa se u vodi, ali se ne otapa u većini organskih otapala. U ljudskom organizmu se potpuno razgrađuje na glukozu i

fruktozu djelovanjem enzima saharaze (invertaza). U prehrambenoj industriji se široko primjenjuje kao sladilo i konzervans (Babić, 2007).

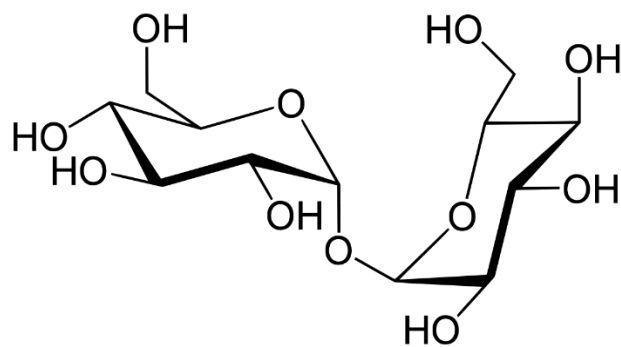


Slika 10 Strukturni prikaz molekule saharoze (Web 7)

2.4.2. Trehaloza

Trehaloza je disaharid sastavljen od dvije molekule D-glukoze koje su povezane α -1,1 glikozidnom. **Slika 11** prikazuje strukturni prikaz molekule trehaloze. Trehaloza je nereducirajući šećer, molekulske formule $C_{12}H_{22}O_{11}$, a kao komercijalni proizvod nalazi se u obliku dihidrata. Ima manju slatkoću od saharoze (oko 45 %), kao i energetska vrijednost. Trehaloza je vrlo stabilna zahvaljujući svojim fizikalnim svojstvima kao što su niska higroskopnost, visoki stupanj optičke rotacije i ponašanje prilikom taljenja. Taljenje trehaloze započinje na 97 °C, nastavkom zagrijavanja uklanja se voda kristalizacije sve do temperature od 130 °C kada se materijal ponovno skrutne, nakon čega se dehidratizirana trehaloza tali pri 230 °C. Trehaloza je stabilnija pri različitim pH vrijednostima i temperaturama u usporedbi s drugim šećerima. U ljudskom organizmu se razgrađuje djelovanjem enzima trehalaze na dvije molekule glukoze (Kopjar, 2007).

U prirodi se najčešće nalazi u α , α obliku (α -D-glukopiranozil α -D-glukopiranozid, šećer gljiva) u algama, različitim biljkama, kvascima, gljivicama, bakterijama, kukcima i drugim nekralježnjacima. Dokazano je zaštitno djelovanje trehaloze na biomolekule od negativnih utjecaja koji se pojavljuju prilikom dehidracije ili zamrzavanja uklanjanjem vode, te se trehaloza široko primjenjuje u biotehnologiji za očuvanje bakterija i kvasaca, kao i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Trehaloza se primjenjuje i u prehrambenoj industriji u proizvodnji smrznute hrane, pića i konditorskih proizvoda (Babić, 2007).



Slika 11 Strukturni prikaz molekule trehaloze (Web 8)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

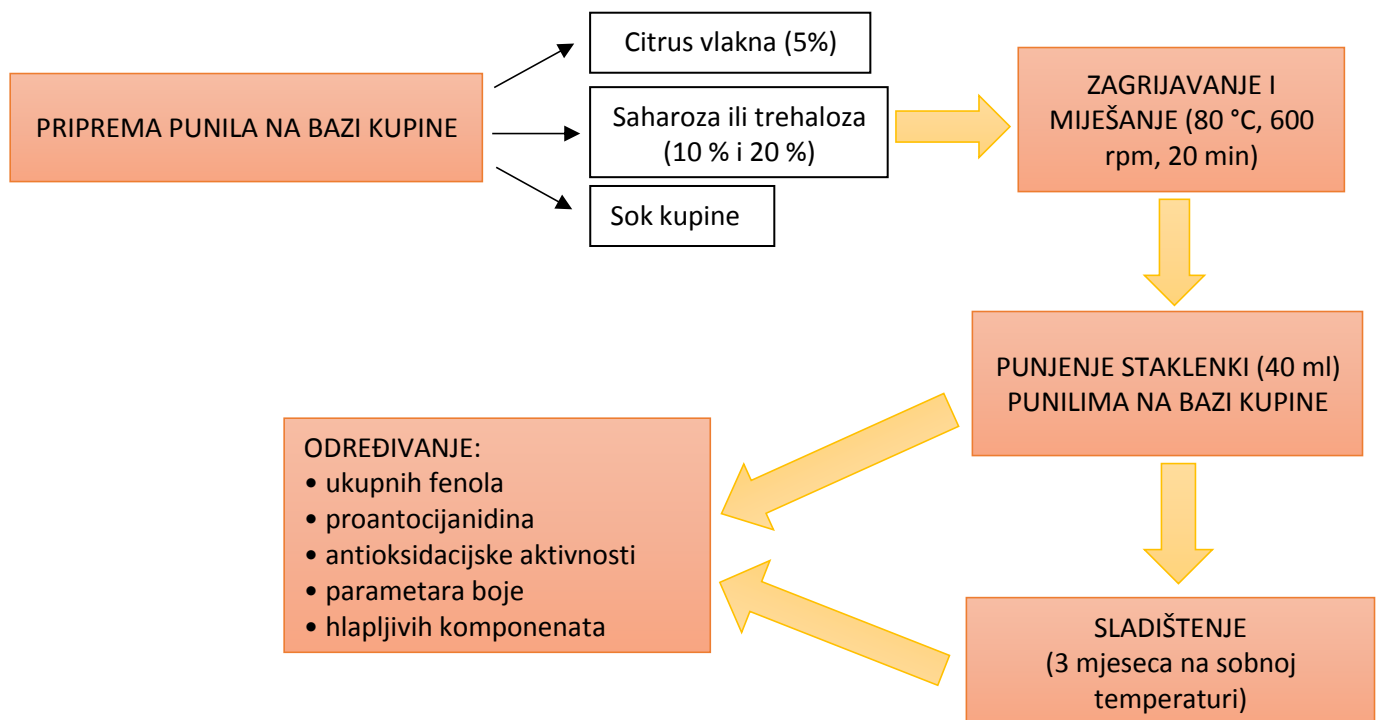
3.1. ZADATAK

U ovom diplomskom radu, zadatak je bio pripremiti punila na bazi kupina. Punila su se pripremala od soka kupine, citrus vlakna te disaharida. Od disaharida su se koristili saharoza i trehaloza u udjelima od 10% i 20%.

Za istraživanje je pripremljeno 4 uzorka koja su se međusobno razlikovala po tipu dodanog disaharida i udjelu dodanog disaharida. Na dobivenim uzorcima određeni su slijedeći parametri:

- ukupni fenoli;
- proantocijanidini;
- antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda;
- parametri boje (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^* , ΔE);
- hlapljive komponente.

Na temelju dobivenih parametara, utvrđen je utjecaja tipa disaharida i udjela disaharida na ispitivane parametre. Uzorci su skladišteni 3 mjeseca na sobnoj temperaturi te su evaluirani svi prethodno navedeni parametri kako bi se utvrdile promjene tijekom skladištenja.



Slika 12 Shematski prikaz rada

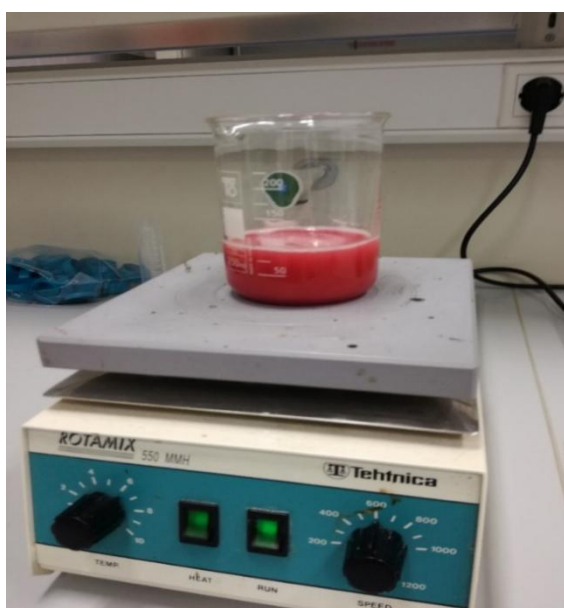
3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

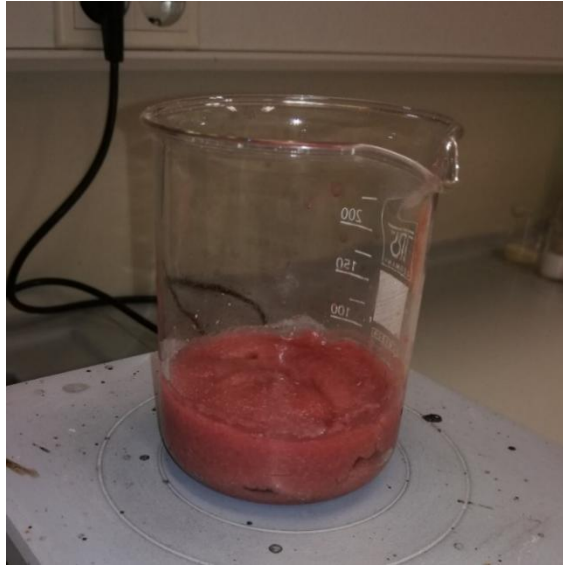
Klorovodična kiselina, octena kiselina, metanol, natrij karbonat, željezo klorid i amonij acetat Folin-Ciocalteu reagens su nabavljeni od proizvođača Kemika (Zagreb). Trolox je nabavljen od proizvođača Sigma (Njemačka). 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiozin-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) su nabavljeni od proizvođača Fluka (Njemačka). 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), galna kiselina, procijanidin B2 i mirtenol su nabavljeni od proizvođača Sigma, Njemačka. Neokuproin i bakar klorid su proizvodi Gram-mola (Hrvatska). Saharoza je nabavljena od Gram-mola (Hrvatska), a trehaloza je dobivena od Hayashibara doo (Nagase group, Japan). Citrus vlakna su nabavljena od Biesterfeld AG (Hrvatska).

3.2.2. Priprema punila na bazi kupina

Na magnetskoj miješalici se miješala i zagrijavala (80 °C) smjesa soka kupine i citrus vlakna (5 %) kao što je prikazano na **Slici 13**. Nakon što se smjesa dobro homogenizirala, dodan je disaharid (saharoza ili trehaloza) u količini od 10 % ili 20 %. Priprema punila je trajala 20 minuta dok nije dobiven proizvod odgovarajuće konzistencije (**Slika 14**). Vruća smjesa se prelila u zagrijane staklenke od 40 mL i zatvorila (**Slika 15**). Jedan set uzoraka je korišten za određivanje definiranih parametara odmah nakon pripreme, a drugi set uzoraka se skladištio 3 mjeseca na sobnoj temperaturi zbog utvrđivanja promjena tijekom skladištenja.



Slika 13 Zagrijavanje smjese soka kupine i citrus vlakna (5 %)



Slika 14 Punilo na bazi kupine odgovarajuće konzistencije



Slika 15 Punila na bazi kupine u staklenkama

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka

Za određivanje ukupnih fenola, proantocijanidina i antioksidacijske aktivnosti, punila su ekstrahirana. Odvagano je 2 g uzorka, te je dodano 20 mL zakiseljenog metanola na sobnoj temperaturi. Smjesa je stajala 24 sata te je profiltrirana, a dobiveni ekstrakt koristio se u daljnjim analizama.

3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa i 8 mL otopine natrijevog karbonata u epruvetu, promućka se i ostavi da stoji 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se pripravi sa destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina

Postupak: otpipetira se 0,1 mL uzorka te se doda 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehida. Reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta te se mjeri apsorbancija na 640 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje mjerenja antioksidacijske aktivnosti, korištene su četiri metode; DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP.

DPPH metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga, mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

ABTS metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

CUPRAC metoda

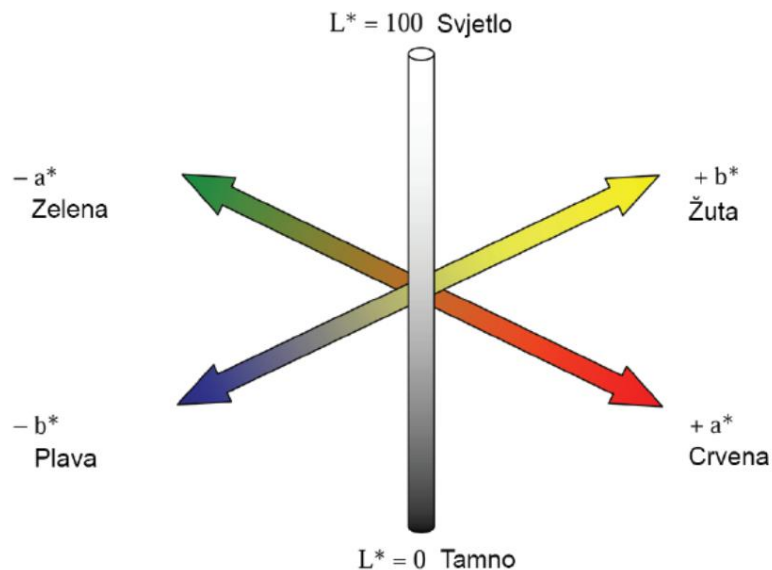
Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

FRAP metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP otopine, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.5. Određivanje parametara boje

Mjerenje boje kao i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira, te takvu svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (**Slika 16**).



Slika 16 Prikaz CIE LAB prostora boja

Pomoću L^* vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je $L^* = 0$, tada je predmet taman, a ako je $L^* = 100$, predmet je svijetao. a^* vrijednost određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je a^* pozitivan, predmet je crvene boje, a ako je a^* negativan, predmet je zelen. b^* vrijednost određuje je li neki predmet žute ili plave boje. Ako je b^* pozitivan, predmet je žute boje, a ako je b^* negativan, predmet je plav.

Osim L^* , a^* i b^* vrijednosti, na kromometru su određeni i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$). Ton boje ($^{\circ}h$) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd., ovisno o dominantnoj valnoj duljini (**Slika 17**). Zasićenje (C^*)

definira udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje. Svjetlina (L^*) opisuje sličnost boje s nizom akromatskih boja, od crne preko sive do bijele, odnosno udio crne u nekom tonu boje.



Slika 17 Prikaz ovisnosti tona boje ($^{\circ}h$) i boje

Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje se izražava kao promjena boje odnosno ΔE . Promjena boje izračunava se na temelju L^* , a^* i b^* vrijednosti prema sljedećoj formuli:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$$

gdje je:

ΔL^* – promjena L^* vrijednosti, koja se izračunava prema izrazu:

$$\Delta L^* = L_k^* - L_u^*$$

Δa^* – promjena a^* vrijednosti, koja se izračunava prema izrazu:

$$\Delta a^* = a_k^* - a_u^*$$

Δb^* – promjena b^* vrijednosti, koja se izračunava prema izrazu:

$$\Delta b^* = b_k^* - b_u^*$$

k – kontrolni uzorak

u – uspoređivani uzorak

Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 2**.

Tablica 2 Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje

PROMJENA BOJE (ΔE)	VIDLJIVOST RAZLIKE LJUDSKIM OKOM
< 0,2	Razlika boja se ne vidi
0,2 - 1	Razlika boja se primjećuje
1 - 3	Razlika boja se vidi
3 - 6	Razlika boja se dobro vidi
> 6	Očigledna odstupanja boja

3.2.3.6. Određivanje hlapljivih komponenata

Za određivanje hlapljivih komponenata korišten je plinski kromatoraf s masenim detektorom (GC-MS). Za pripremu uzorka korištena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za koju je neophodna SPME aparatura. Polimerna stacionarna faza (unutar igle) bila je polidimetilsiloksana-divinilbenzen. U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka te doda 1 g natrij klorida. U bočicu se ubaci magnet te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u posudu s vodom te se, uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, hlapljivi sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 10 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija. Određivanje kvantitativnog udjela hlapljivih sastojaka uzoraka provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf Agilent 7890B s masenim spektrometrom Agilent 5977A (Agilent Technologies, CA, USA)

Uvjeti uzorkovanja SPME metodom:

- vlakno divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), 50/30 μm , Supelco, USA;
- adsorpcija: 45 min, 40 °C, 300 rpm;
- desorpcija: 7 min, 250 °C, splitless mod.

Uvjeti plinskog kromatografa i masenog spektrometra:

- kolona: HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- temperature: od 40 °C (10 min) do 120 °C (3 °C/min), zatim do 250 °C (10 °C/min);

- plin nosioc: helij (čistoće 5.0), protok 1 mL/min;
- temperatura injektora: 250 °C;
- temperatura detektora: 280 °C;
- m/z : 40 do 400, 70 eV.

Količina hlapljivih komponenata je izražena preko mirtenola kao internog standarda.

3.2.3.7. Statistička analiza podataka

Statistička analiza rezultata je provedena pomoću ANOVA testa uz statističku značajnost od $P < 0,5$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu pripremljena su punila na bazi kupine. Punila su se pripremala iz soka kupine, citrus vlakna i disaharida (saharoze i trehaloze u udjelu od 10% i 20%). Uobičajeno je da se punila pripremaju dodatkom pektina ili nekog drugog hidrokoloida, ali u ovom radu se željelo utvrditi postoji li mogućnost pripreme punila s dodatkom citrus vlakna, kako bi konačan proizvod bio obogaćen s vlaknima za koja je znanstveno dokazano da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje. Na temelju preliminarnih istraživanja, utvrđeno je da je potrebna količina citrus vlakna 5% kako bi se pripremio proizvod odgovarajuće konzistencije. Citrus vlakna osim što sadrže različite tipove pektina, sadrže i druge polisaharide poput celuloze. Uz citrus vlakna korišteni su disaharidi, saharoza i trehaloza, kako bi se utvrdio njihov utjecaj na kvalitetu proizvoda. U punilima na bazi kupine određeni su ukupni fenoli, proantocijanidini, antioksidacijska aktivnost, parametri boje i hlapljive komponente.

4.1. UKUPNI FENOLI I PROANTOCIJANIDINI

Ukupni fenoli i proantocijanidini u punilima na bazi kupina prikazani su u **Tablici 3**. Tip disaharida i količina disaharida utječu na koncentraciju ovih komponenata u uzorcima. Uzorci s dodatkom trehaloze imaju veću koncentraciju fenola nego uzorci s dodatkom saharoze ako se prate iste količine disaharida. Isto tako je vidljivo da uzorci s 20 % disaharida imaju veću koncentraciju fenola od uzoraka s dodatkom 10 % disaharida. Najveća koncentracija fenola određena je u uzorku s 20 % trehaloze (5,233 g/100 g), dok uzorci s 10 % trehaloze i 20 % saharoze imaju jednaku koncentraciju (4,946 g/100 g). Uzorci s 10 % saharoze imaju najmanju koncentraciju fenola (4,652 g/100 g). Tijekom skladištenja došlo je do degradacije fenola, a najveću koncentraciju fenola imali su uzorci s 20 % trehaloze i 20 % saharoze (4,52 g/100 g). Uzorak s dodatkom 10 % saharoze imao je najmanju koncentraciju fenola (4,133 g/100 g). Koncentracija proantocijanidina je također ovisila o tipu disaharida i količini disaharida. Uzorci s dodatkom trehaloze imali su veće koncentracije proantocijanidina u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze. Uzorak s 20 % trehaloze sadržavao je 156,85 mg/100 g proantocijanidina, a uzorak s 10 % 140,46 mg/100 g. Kako je već spomenuto, uzorci sa saharozom imali su manje koncentracije proantocijanidina, odnosno 129,78 mg/100 g proantocijanidina u uzorcima s 20 % saharoze i 120,33 mg/100 g u uzorcima s 10 % dodane saharoze.

Tablica 3 Ukupni fenoli (g/100 g) i proantocijanidini (mg/100 g) u punilima na bazi kupina

UZORAK	Fenoli (g/100 g)	Proantocijanidini (mg/100 g)
Nakon pripreme		
10 %_sah	4,652±0,005 ^c	120,33±0,98 ^d
20 %_sah	4,937±0,056 ^b	129,78±0,45 ^c
10 %_treh	4,946±0,045 ^b	140,46±1,11 ^b
20 %_treh	5,233±0,044 ^a	156,85±1,34 ^a
Nakon skladištenja		
10 %_sah	4,133±0,044 ^f	88,45±0,20 ^f
20 %_sah	4,504±0,031 ^d	105,56±0,77 ^e
10 %_treh	4,354±0,062 ^e	120,26±1,73 ^d
20 %_treh	4,558±0,054 ^d	121,72±1,56 ^d

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidacijska aktivnost punila na bazi kupina je određena primjenom četiri metode; DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC čiji su rezultati prikazani u **Tablici 4**. Metode se razlikuju prema mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Prve dvije metode se baziraju na blokiranju slobodnih radikala dok se druge dvije baziraju na inaktivaciji metala. Antioksidacijska aktivnost utvrđena primjenom DPPH metode najveća je kod uzorka s 20 % saharoze (233,91 nmol TE/100 g), a ujedno i najmanja kod uzorka s 10 % ovog istog disaharida (197,92 nmol TE/100 g). U slučaju oba disaharida, antioksidacijska aktivnost je veća dodatkom veće količine. Nakon skladištenja, antioksidacijska aktivnost se smanjila, a uzorci s dodatkom trehaloze imali su znatno veću antioksidacijsku aktivnost. Količina dodanog disaharida nije utjecala na antioksidacijsku aktivnost odnosno razlike nisu statistički značajne i kod jednog i kod drugog disaharida. Nakon pripreme uzoraka, primjenom ABTS metode dobiven je drugačiji trend u odnosu na DPPH metodu. Uzorci s dodatkom trehaloze imali su veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze, ali nije postojala statistički značajna razlika između količine primijenjenih disaharida. Nakon skladištenja, došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti bez obzira na tip disaharida. Uzorci s dodatkom trehaloze su i nakon skladištenja imali veću antioksidacijsku aktivnost. Kod svih metoda je utvrđen pad antioksidacijske aktivnosti nakon skladištenja, osim u slučaju ABTS metode. Razlog porasta bi mogao biti taj što ABTS metoda nije selektivna, tako da može reagirati s komponentama različitih struktura odnosno i s degradacijskim produktima fenolnih spojeva dok ostale metode pokazuju veću selektivnost. I FRAP metodom uzorci s

dotankom trehaloze imali su veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze. Kod uzoraka s dodatkom trehaloze, količina disaharida nije imala utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (292 nmol TE/100 g). Za razliku od njih, kod uzoraka s dodatkom saharoze, veća antioksidacijska aktivnost je utvrđena za uzorak s 20 % saharoze. Nakon skladištenja, utvrđen je jednaki trend kao i nakon pripreme uzoraka. Primjenom CUPRAC metode nije utvrđena razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između uzoraka s 10 % i 20 % trehaloze (170 nmol TE/100 g). Uzorak s 20 % saharoze imao je najveću antioksidacijsku aktivnost (173,71 nmol TE/100 g) dok je uzorak s 10 % saharoze imao najmanju (148,76 nmol TE/100 g). Nakon skladištenja, antioksidacijska aktivnost se smanjila, te i tada nije postojala razlika između uzoraka s 10 % i 20 % trehaloze, ali su nakon skladištenja ti uzorci imali znatno veću antioksidacijsku aktivnost od uzoraka s dodatkom saharoze.

Tablica 4 Antioksidacijska aktivnost punila na bazi kupina

UZORAK	DPPH (nmol TE/100 g)	ABTS (μ mol TE/100 g)	FRAP (nmol TE/ 100 g)	CUPRAC (nmol TE/100 g)
Nakon pripreme				
10 %_sah	197,92 \pm 1,23 ^d	1,054 \pm 0,038 ^d	245,71 \pm 2,94 ^c	148,76 \pm 0,98 ^d
20 %_sah	233,91 \pm 1,47 ^a	1,114 \pm 0,067 ^d	253,70 \pm 0,41 ^b	173,71 \pm 1,21 ^a
10 %_treh	204,13 \pm 1,21 ^c	1,478 \pm 0,044 ^b	292,29 \pm 1,10 ^a	170,16 \pm 1,05 ^b
20 %_treh	216,55 \pm 1,57 ^b	1,526 \pm 0,099 ^b	291,05 \pm 0,96 ^a	170,61 \pm 1,11 ^b
Nakon skladištenja				
10 %_sah	160,03 \pm 1,37 ^f	1,248 \pm 0, 011 ^c	206,69 \pm 1,65 ^e	134,24 \pm 0,97 ^f
20 %_sah	164,98 \pm 1,41 ^f	1,214 \pm 0,038 ^c	226,42 \pm 3,34 ^d	142,40 \pm 1,99 ^e
10 %_treh	181,45 \pm 1,47 ^e	1,502 \pm 0,018 ^b	254,42 \pm 1,87 ^b	166,80 \pm 1,17 ^c
20 %_treh	184,19 \pm 1,61 ^e	1,654 \pm 0,077 ^a	256,49 \pm 1,52 ^b	167,42 \pm 1,01 ^c

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

4.3. PARAMETRI BOJE

L* vrijednost definira da li je neki predmet taman ili svijetao. Uzorci s dodatkom 20 % disaharida tamniji su od uzoraka s dodatkom 10 % disaharida. Također je vidljivo iz rezultata da su uzorci s dodatkom saharoze svjetliji u odnosu na uzorke s dodatkom trehaloze jednake količine. Tijekom skladištenja, došlo je do promjene L* vrijednosti odnosno do povećanja, tako da su uzorci posvijetlili. I nakon skladištenja se zadržao isti trend kao i nakon pripreme, odnosno uzorci s većom količinom disaharida su tamniji, a općenito vrijedi da su uzorci s dodatkom saharoze svjetliji u odnosu na uzorke s dodatkom trehaloze. Parametar a* koji

definira crvenu boju, nakon pripreme uzoraka veći je za uzorke s dodatkom trehaloze u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze. Također je vidljivo da je a^* vrijednost veća za uzorke s manjom količinom disaharida. Tijekom skladištenja, došlo je do značajnog opadanja a^* vrijednosti, odnosno gubitka crvene boje, što je bilo i vidljivo okom. I nakon skladištenja su uzorci s dodatkom trehaloze imali veće a^* vrijednosti od uzoraka s dodatkom saharoze. b^* vrijednost definira žutu boju, i svi uzorci imaju pozitivnu vrijednost. Uzorci s dodatkom trehaloze imali su neznajno veće vrijednosti u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze, ali je vidljiva razlika između različitih količina dodanog disaharida, tako da uzorci s manjom količinom disaharida imaju veću b^* vrijednost. Žuta boja potječe od citrus vlakna. Tijekom skladištenja, kako a^* vrijednost opada tako b^* vrijednost dolazi više do izražaja, odnosno b^* vrijednost je porasla. Značajni porast b^* vrijednosti utvrđen je u uzorku s dodatkom 10 % saharoze. Na temelju L^* , a^* i b^* vrijednosti izračunata je i ukupna promjena boje (ΔE) nakon skladištenja. Kod svih uzoraka utvrđena je ukupna promjena boje u vrijednostima koje potvrđuju da je promjena boje vidljiva okom (**Tablica 5**). Najveća ukupna promjena boje utvrđena je za punilo pripremljeno s 10 % saharoze (7,39) a najmanja za punilo s dodatkom 20 % saharoze (6,27).

Tablica 5 Parametri boje (L^* , a^* i b^*) punila na bazi kupina i ukupna promjena boje (ΔE)

UZORAK	L^*	a^*	b^*	ΔE
Nakon pripreme				
10 %_sah	35,79±0,03 ^e	12,90±0,01 ^b	4,31±0,02 ^d	
20 %_sah	32,95±0,03 ^g	12,14±0,03 ^c	3,92±0,01 ^f	
10 %_treh	34,91±0,03 ^f	13,50±0,05 ^a	4,33±0,02 ^d	
20 %_treh	32,32±0,01 ^h	12,95±0,03 ^b	4,03±0,02 ^e	
Nakon skladištenja				
10 %_sah	39,02±0,03 ^a	6,85±0,03 ^e	7,08±0,03 ^a	7,39
20 %_sah	35,96±0,03 ^d	6,72±0,03 ^f	4,79±0,03	6,27
10 %_treh	38,19±0,03 ^b	7,66±0,03 ^d	5,70±0,03 ^b	6,84
20 %_treh	36,25±0,03 ^c	7,76±0,03 ^d	5,49±0,03 ^c	6,67

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Osim L^* , a^* i b^* vrijednosti, na kromometru su određeni i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$) čiji su rezultati prikazani u **Tablici 6**. Veće vrijednosti parametra C^* imali su uzorci s dodatkom 10 % disaharida, a također je vidljivo da uzorci s dodatkom trehaloze imaju veće vrijednosti u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze. Tijekom skladištenja, došlo je do smanjenja ovog

parametra. Kod uzoraka s dodatkom trehaloze nema razlike između uzoraka bez obzira na različitu količinu disaharida, za razliku od saharoze kod koje je značajna razlika između 10 % i 20 % (uzorak s 10 % ima veću C* vrijednost od uzorka s većom količinom saharoze). Ton boje, odnosno °h vrijednost veća je za uzorke s dodatkom saharoze. Također i količina disaharida utječe na ovu vrijednost, tako da uzorci s dodatkom 10 % disaharida imaju veće vrijednosti ovog parametra. Tijekom skladištenja, došlo je do značajne promjene tona boje, odnosno vrijednosti su značajno porasle. Najveći porast vrijednosti °h utvrđen je za uzorak s dodatkom 10 % saharoze. I nakon skladištenja zadržan je trend da uzorci s manjom količinom disaharida imaju veću vrijednost parametra °h.

Tablica 6 Parametri boje (°h i C*) punila na bazi kupina

UZORAK	°h	C*
Nakon pripreme		
10 %_sah	18,46±0,09 ^d	13,60±0,01 ^b
20 %_sah	17,92±0,06 ^e	12,76±0,02 ^c
10 %_treh	17,75±0,12 ^e	14,18±0,05 ^a
20 %_treh	17,29±0,07 ^f	13,56±0,03 ^b
Nakon skladištenja		
10 %_sah	45,93±0,21 ^a	9,85±0,04 ^d
20 %_sah	35,50±0,14 ^c	8,25±0,03 ^f
10 %_treh	36,64±0,12 ^b	9,55±0,04 ^e
20 %_treh	35,28±0,15 ^c	9,50±0,03 ^e

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

4.4. HLAPLJIVE KOMPONENTE U PUNILIMA NA BAZI KUPINA

U **Tablici 7** prikazane su identificirane hlapljive komponente u soku kupine i u punilima na bazi kupine. U soku je identificirano 19 hlapljivih komponenata, a u punilima 28, odnosno jedan dio komponenata u punilima potječe od citrus vlakna. Komponente su podijeljene u 4 skupine: alkohole, kiseline, aldehide i ketone, te terpene. Na **Slikama 18 i 19** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata prema navedenim skupinama. Terpeni su određeni u najvećoj koncentraciji, zatim aldehidi i ketoni, te alkoholi i kiseline, bez obzira na tip disaharida i njegovu količinu. Uzimajući u obzir sveukupnu aromu, na terpene otpada 56 % i 52 % za punila sa saharozom i trehalozom. Aldehidi i ketoni su činili 35 % i 32 % za punila sa trehalozom i saharozom. Alkoholi i kiseline su određeni u jednakim omjerima i u punilima s trehalom i u punilima sa saharozom (oko 8 % za alkohole i 4 % za kiseline). Nakon

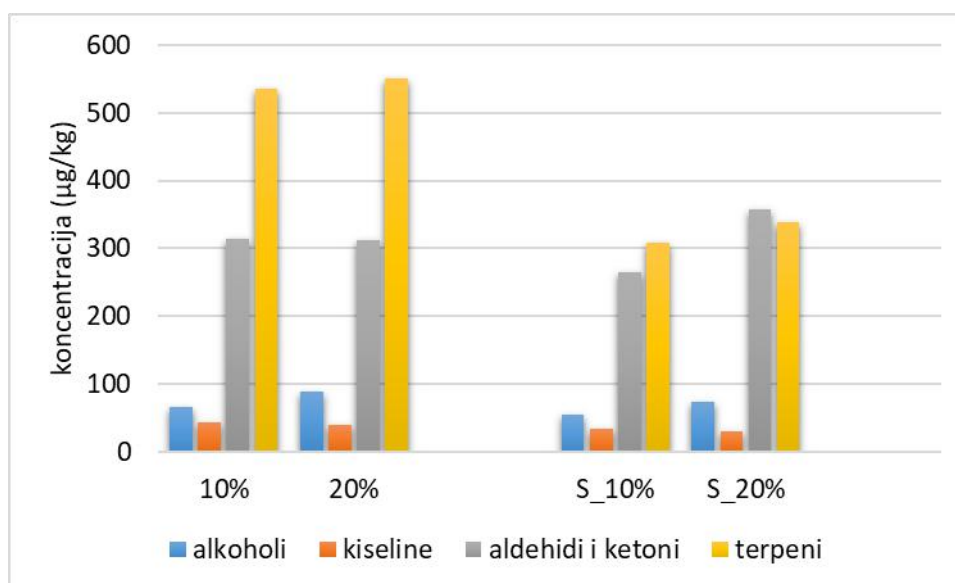
skladištenja, došlo je do promjene udjela pojedinih skupina ukupnoj aromi. Alkoholi i kiseline su određeni u jednakim omjerima i u punilima s trehalozom i u punilima sa saharozom, kao i nakon pripreme uzoraka, a njihov udio se neznatno povećao (oko 9% za alkohole i 5% za kiseline). Promjena je nastala u odnosu aldehida i ketona, te terpena. Udio terpena u sveukupnoj aromi se smanjio, ali i nakon skladištenja, uzorci sa saharozom su imali veći udio ove skupine komponenata. U uzorcima s dodatkom 10 % saharoze, udio terpena je iznosio 47 %, a u uzorcima s dodatkom 20 % saharoze 43 %. U punilima s dodatkom trehaloze, udio terpena je iznosio 43 % s dodatkom 10 % trehaloze, a u uzorcima s dodatkom 20 % trehaloze 41 %. Udio aldehida i ketona se povećao u odnosu na početne uzorke, te je u uzorcima s dodatkom 10 % saharoze njihov udio iznosio 40 %, a u uzorcima s dodatkom 20 % saharoze 45 %. Sličan trend je utvrđen i za uzorke s dodatkom trehaloze. U uzorcima s dodatkom 10 % trehaloze, njihov udio je iznosio 43 %, a u uzorcima s dodatkom 20 % trehaloze 41 %.

Tablica 7 Prikaz hlapljivih komponenata identificiranih u soku kupine i u punilima na bazi kupine

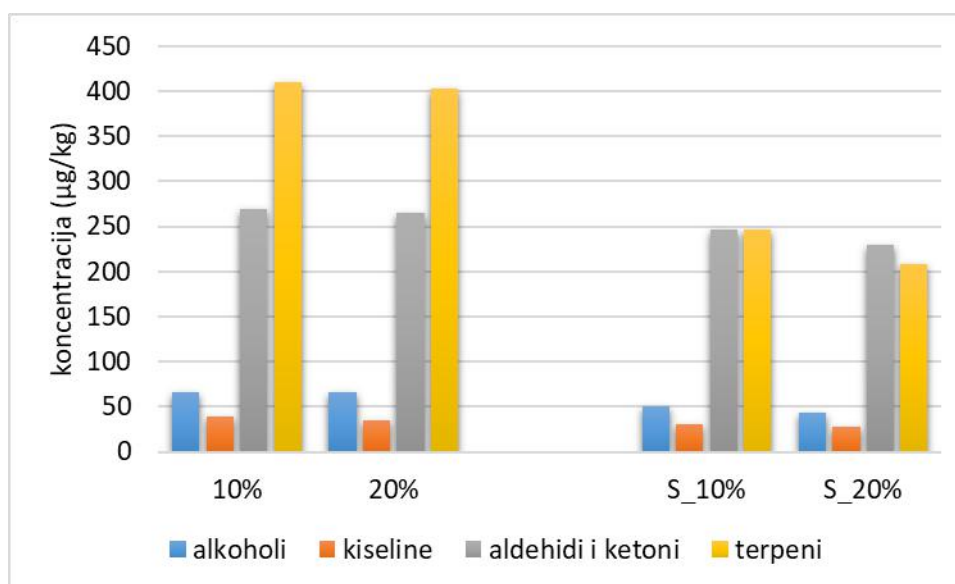
Komponenta	Sok	Punila	RT	RI
2-etil heksanol	+	+	19,96	1030
Benzil alkohol	-	+	20,11	1037
1-oktanol	+	+	22,48	1071
Fenetil alkohol	+	+	24,6	1103
Perilil alkohol	+	+	33,93	1290
Heksanska kiselina	-	+	18,54	1005
Nonanska kiselina	+	+	33,49	1281
Heksanal	-	+	5,13	800
Heptanal	+	+	10,76	897
1-okten-3-on	-	+	16,46	982
6-metil-5-hepten-2-on	-	+	17,11	987
Oktanal	-	+	18,08	998
2-oktenal	+	+	21,49	1054
2-nonenal	-	+	27,11	1155
Dekanal	-	+	29,50	1200
2,4-nonadienal	+	+	29,86	1205
2-dekenal	+	+	32,23	1255
Geranil aceton	+	+	39,598	1448
Lili aldehid	+	+	41,15	1519
D-limonen	+	+	19,41	1018
Gvajakol	+	+	23,17	1080
Linalool	+	+	23,96	1096
Trans-verbenol	+	+	25,72	1129
Nerol	+	+	30,63	1222
Felandral	-	+	32,61	1264

α -jonon	+	+	38,95	1420
γ -jonon	+	+	40,18	1473
β -jonon	+	+	40,34	1480

Prema koncentracijama za pojedine skupine komponenata, vidljivo je da u punilima s dodatkom trehaloze imamo manju koncentraciju svih navedenih skupina komponenata u odnosu na punila s dodatkom saharoze. Količina trehaloze nije imala utjecaj na koncentracije pojedinih skupina komponenata. U uzorcima sa saharozom utvrđen je drugačiji trend. Terpeni i alkoholi su određeni u većoj koncentraciji u uzorcima s dodatkom 20 % saharoze u odnosu na uzorke s manjom količinom ovog disaharida. Količina saharoze nije utjecala na koncentracije preostale dvije skupine komponenata. Nakon skladištenja, alkoholi, aldehidi i ketoni, te terpeni su određeni u većoj koncentraciji u uzorcima s dodatkom 20 % saharoze. Za punila pripravljena s trehalozom utvrđen je obrnuti trend te su, nakon skladištenja, alkoholi, aldehidi i ketoni, te terpeni određeni u većoj koncentraciji u uzorcima s dodatkom 10 % trehaloze.



Slika 18 Koncentracija hlapljivih komponenata po skupinama u punilima na bazi kupina pripremljenim sa saharozom nakon pripreme i skladištenja



Slika 19 Koncentracija hlapljivih komponenata po skupinama u punilima na bazi kupina pripremljenim s trehalozom nakon pripreme i skladištenja

U **Tablicama 8 i 9** prikazani su rezultati određivanja terpena (skupine komponenata koja je određena u najvećoj koncentraciji u punilima) nakon pripreme i nakon skladištenja. Također su u **Tablici 8** dani rezultati navedenih terpena u soku kupine. D-limonen je terpen koji se nalazi u najvećoj koncentraciji u punilima, i u odnosu na druge terpene, njegova koncentracija je značajno veća. U soku kupine, koncentracija ovog terpena je svega 7,37 µg/kg, a u punilima iznad 360 µg/kg, tako da vjerojatno najveći dio limonena potječe od citrus vlakna. Tip disaharida je utjecao na količinu terpena, a količina disaharida nije. Punila pripremljena sa saharozom imala su značajno veću koncentraciju limonena. Tijekom skladištenja, došlo je do gubitka limonena odnosno skladištenim uzorcima utvrđena je manja koncentracija limonena. Punila sa saharozom imala su veću koncentraciju limonena u odnosu na punila s trehalozom. Količina disaharida utjecala je na zadržavanje ovog spoja tijekom skladištenja tako da je veće zadržavanje postignuto sa saharozom s 20 %, a s trehalozom s 10 %. Felandral nije detektiran u soku kupine, tako da i ovaj spoj potječe od citrus vlakana obzirom da se nalaze u punilima. I u ovom slučaju, veća koncentracija je postignuta u punilima sa saharozom. Što se tiče količine disaharida, više koncentracije felandrala su utvrđene s 20 % disaharida (bez obzira na tip). Tijekom skladištenja je došlo do gubitka ovog spoja, ali je tendencija zadržana kao i u punilima nakon pripreme. β-jonon je također terpen koji je detektiran u nešto većoj koncentraciji u punilima u odnosu na sok, ali samo kada su punila pripremljena sa saharozom. Punila s trehalozom imala su jednaku

koncentraciju ovog terpena kao i sok. Tijekom skladištenja, došlo je do malog smanjenja koncentracije β -jonona u punilima sa saharozom, dok je u punilima s trehalozom ovaj spoj bio stabilan. Svi ostali terpeni su utvrđeni u manjim koncentracijama u punilima nego u soku. Najveća koncentracija gvajakola određena je u punilima s 20 % saharoze (15,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$), a najmanja s 10 % saharoze (11,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Vrijednosti za trehalozu bile su između ove dvije vrijednosti, ali je punilo s 10 % trehaloze imalo veću koncentraciju (14,29 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gvajakola nego punilo s 20 % (12,82 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tijekom skladištenja, došlo je do gubitka gvajakola, ali punila s dodatkom saharoze imala su veću koncentraciju ovog spoja. Što se tiče linalola, nakon pripreme punila uzorci s trehalozom imali su veću koncentraciju ovog terpena u odnosu na punila sa saharozom. Kao i kod prethodnih terpena, tijekom skladištenja je došlo do smanjenja koncentracije linalola, ali početni trend je zadržan odnosno punila s trehalozom imala su veću koncentraciju ovog spoja. Trans-verbenol je određen u većoj koncentraciji u punilima sa saharozom, ali tijekom skladištenja svi uzorci su imali podjednake vrijednosti. U slučaju nerola, utvrđeno je da punila s 20 % disaharida imaju veću koncentraciju ovog terpena nego punila s 10 % disaharida. Punila s trehalozom imaju nešto veću koncentraciju nerola nego punila sa saharozom. Tijekom skladištenja, utvrđeno je malo smanjenje koncentracije nerola, ali početni trend je zadržan. I α -jonon i γ -jonon su određeni u većoj koncentraciji u punilima sa saharozom, a tijekom skladištenja je ovaj trend zadržan uz smanjenje koncentracije.

Tablica 8 Koncentracija terpena ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u soku i u punilima na bazi kupine nakon pripreme

Terpeni	Sok	Saharoza		Trehaloza	
		10 %	20 %	10 %	20 %
D-limonen	7,37 \pm 0,13	496,20 \pm 5,42 ^a	505,88 \pm 2,74 ^a	368,44 \pm 10,35 ^b	362,97 \pm 4,75 ^b
Gvajakol	104,17 \pm 1,80	11,35 \pm 0,30 ^d	15,75 \pm 0,17 ^a	14,29 \pm 0,02 ^b	12,82 \pm 0,02 ^c
Linalool	23,39 \pm 0,42	5,33 \pm 0,02 ^c	5,21 \pm 0,05 ^c	8,16 \pm 0,09 ^a	7,75 \pm 0,14 ^b
Trans-verbenol	43,40 \pm 0,46	4,59 \pm 0,11 ^b	5,67 \pm 0,03 ^a	4,16 \pm 0,07 ^c	2,88 \pm 0,14 ^d
Nerol	20,25 \pm 0,61	3,90 \pm 0,10 ^c	4,50 \pm 0,05 ^a	4,26 \pm 0,02 ^b	4,70 \pm 0,21 ^a
Felandral	-	4,28 \pm 0,00 ^b	5,57 \pm 0,00 ^a	3,67 \pm 0,02 ^c	5,02 \pm 0,29 ^a
α -jonon	13,10 \pm 0,44	2,99 \pm 0,00 ^a	1,56 \pm 0,01 ^b	1,15 \pm 0,02 ^d	1,40 \pm 0,03 ^c
γ -jonon	4,18 \pm 0,43	3,35 \pm 0,00 ^a	3,27 \pm 0,10 ^a	2,58 \pm 0,07 ^b	2,48 \pm 0,05 ^b
β -jonon	2,58 \pm 0,11	3,36 \pm 0,03 ^b	3,59 \pm 0,00 ^a	2,52 \pm 0,04 ^c	2,62 \pm 0,05 ^c

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Tablica 9 Koncentracija terpena ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u punilima na bazi kupine nakon skladištenja

Terpeni	Saharoza		Trehaloza	
	10 %	20 %	10 %	20 %
D-limonen	278,32 \pm 12,99 ^b	304,63 \pm 5,42 ^a	215,25 \pm 4,71 ^c	174,82 \pm 0,34 ^d
Gvajakol	10,19 \pm 0,05 ^b	12,46 \pm 0,05 ^a	9,66 \pm 0,14 ^c	9,00 \pm 0,15 ^d
Linalool	3,34 \pm 0,03 ^c	4,14 \pm 0,08 ^b	6,89 \pm 0,17 ^a	6,74 \pm 0,10 ^a
Trans-verbenol	3,09 \pm 0,14 ^a	2,76 \pm 0,06 ^b	2,88 \pm 0,18 ^b	2,71 \pm 0,11 ^b
Nerol	3,66 \pm 0,07 ^d	4,02 \pm 0,07 ^b	3,81 \pm 0,07 ^c	4,27 \pm 0,06 ^a
Felandral	3,18 \pm 0,09 ^c	4,38 \pm 0,02 ^a	2,03 \pm 0,00 ^d	3,72 \pm 0,06 ^b
α -jonon	1,03 \pm 0,01 ^b	0,98 \pm 0,01 ^b	1,10 \pm 0,01 ^b	1,74 \pm 0,27 ^a
γ -jonon	2,40 \pm 0,00 ^b	2,82 \pm 0,23 ^a	2,02 \pm 0,01 ^c	2,34 \pm 0,03 ^b
β -jonon	2,29 \pm 0,02 ^b	2,65 \pm 0,06 ^a	2,74 \pm 0,18 ^a	2,39 \pm 0,02 ^b

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata ovog istraživanja, moguće je izvesti sljedeće zaključke:

1. Tip i količina dodanog disaharida u punilima na bazi kupina utjecao je na koncentraciju ukupnih fenola i proantocijanidina u punilima. Uzorci s dodatkom 20 % disaharida imali su veću koncentraciju fenola i proantocijanidina od uzoraka s dodatkom 10 % disaharida, također su uzorci s dodatkom trehaloze imali veće koncentracije od uzoraka s dodatkom saharoze. Najveću koncentraciju fenola i proantocijanidina su imali uzorci s dodatkom 20 % trehaloze, a najmanju uzorci s 10 % saharoze. Nakon skladištenja, došlo je do degradacije odnosno smanjivanja koncentracije ukupnih fenola i proantocijanidina u svim uzorcima, s tim da je uzorak s dodatkom 20 % trehaloze i dalje imao najveću koncentraciju fenola i proantocijanidina.
2. Primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda, određena je antioksidacijska aktivnost punila te su dobiveni različiti rezultati. DPPH i CUPRAC metode pokazale su da najveću antioksidacijsku aktivnost imaju uzorci s dodatkom saharoze, dok su ABTS i FRAP metode pokazale da najveću antioksidacijsku aktivnost imaju uzorci s dodatkom trehaloze. DPPH metoda pokazala je da se antioksidacijska aktivnost punila povećava s dodatkom veće količine disaharida. Primjenom ABTS metode, dobiveni rezultati antioksidacijske aktivnosti punila s različitim količinama dodanih disaharida nisu se statistički značajno razlikovali. FRAP i CUPRAC metode pokazale su da u uzorcima s trehalozom, njezina količina ne utječe na antioksidacijsku aktivnost punila, dok uzorci s dodatkom 20 % saharoze imaju veću antioksidacijsku aktivnost od uzoraka s 10 % saharoze. Primjenom DPPH, FRAP i CUPRAC metoda utvrđen je pad antioksidacijske aktivnosti punila nakon skladištenja, dok je kod ABTS metode utvrđen porast antioksidacijske aktivnosti.
3. L* vrijednost pokazala je da su uzorci s dodatkom saharoze svjetliji od uzoraka s dodatkom trehaloze, te da su uzorci s dodatkom 10 % disaharida svjetliji od uzoraka s 20 % disaharida. Tijekom skladištenja, došlo je do povećanja L* vrijednosti tako da su svi uzorci posvijetlili. Parametar a* veći je za uzorke s dodatkom trehaloze i za uzorke s manjom količinom dodanog disaharida. Značajan pad a* vrijednosti dogodio se tijekom skladištenja, odnosno došlo je do gubitka crvene boje što je bilo i okom vidljivo. b* vrijednost bila je pozitivna za sve uzorke, a uzorci s manjom količinom disaharida imali su veću b* vrijednost. Tijekom skladištenja, opadanjem a* vrijednosti došlo je do porasta b*

vrijednosti u svim uzorcima. U uzorku s 10 % saharoze došlo je do najveće ukupne promjene boje, dok je za uzorak s 20 % dodane saharoze utvrđena najmanja ukupna promjena boje. Zasićenje, odnosno parametar C^* bio je veći kod uzoraka s dodatkom 10 % disaharida i kod uzoraka s dodatkom trehaloze, a tijekom skladištenja je došlo do njegovog smanjenja u svim uzorcima. Ton boje, odnosno parametar $^{\circ}h$ imao je veće vrijednosti u uzorcima s dodatkom saharoze i u uzorcima s dodatkom 10 % disaharida. Vrijednosti parametra $^{\circ}h$ značajno su porasle tijekom skladištenja, te je najveći porast utvrđen u uzorku s dodatkom 10 % saharoze.

4. Bez obzira na tip i količinu dodanih disaharida, hlapljive komponente koje su identificirane u najvećoj koncentraciji u svim uzorcima su terpeni i aldehidi i ketoni, te alkoholi i kiseline u puno manjoj koncentraciji. Punila s dodatkom trehaloze imala su manju koncentraciju svih skupina hlapljivih komponenata u odnosu na punila s dodatkom saharoze. Količina trehaloze nije imala utjecaj na koncentraciju pojedinih komponenata, dok je u uzorcima s 20 % saharoze određena veća koncentracije terpena i alkohola od uzoraka s 10 % saharoze. Nakon skladištenja, došlo je do povećanja koncentracije alkohola, aldehida i ketona, te terpena u uzorcima s dodatkom 10 % trehaloze, dok je kod uzoraka sa saharozom do tog povećanja došlo u uzorcima s većom količinom saharoze. D-limonen je najzastupljeniji terpen u soku kupine i u punilima na bazi kupine, a budući da se u punilima nalazi u puno većoj koncentraciji nego u soku kupine možemo zaključiti da najvećim dijelom potječe od citrus vlakna koje smo dodali u punila.

6. LITERATURA

- Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodataka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Berend S, Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59:205-212, 2008
- Bincy B, Priya A, Ranjit V: Antioxidant and anticancer properties of berries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2017.1329198, 2017.
- Bošnjak S: Uloga prehrambenih vlakana u očuvanju zdravlja probavnog sustava. *Diplomski rad*. Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
- Chawla R, Patil GR: Soluble Dietary Fiber. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9:178-196, 2010.
- Clark JR, Finn CE: Blackberry Breeding and Genetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, Global Science Books 5:27-43, 2011.
- Daglia M: Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23:174-181, 2012.
- Du X, Finn CE, Qian MC: Volatile composition and odour-activity value of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.024, 2009.
- Ergović M, Obradović V, Škrabal S: Promjena reoloških svojstava kaše kupine sa dodacima tijekom skladištenja u hladnjaku. *2nd International Conference "Vallis Aurea"* pp.0331-0335, 2010.
- Gaćina N: Alternativne sirovine prehrambenih vlakana. *Zbornih radova Veleučilišta u Šibeniku*, 123-130, 2014.
- Grić LJ: Kupina. U *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*, str. 190-192. August Cesarec, ISBN: 86-393-0172-7, Zagreb, 1990.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-584, 2002.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene Rada i Toksikologije* 55:279-290, 2004.
- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- McPherson Kay R: Dietary fiber. *Journal of Lipid Research* 23:221-242, 1982.
- Miljković I: Sorte kupina. *Glasnik zaštite bilja* 4:45-49, 2005.
- Papić J: Biološki aktivne tvari prirodnih aroma. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* Vol 3, Broj 10, 2007.
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M: Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Society for Clinical Nutrition* 81:215S-217S, 2005.
- Siriworn T, Wrolstad RE, Finn CE, Clifford BP: Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:8021-8030, 2004.
- Šoškić A: Kupina. NIRO Zadrugar, Sarajevo, 1984.
- Šubarić D, Babić J, Ačkar Đ: Modificiranje škroba radi proširenja primjene. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, 1:247-258, 2012.
- Tsao, R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.
- Turemis N, Kafkas E, Kafkas S, Kurkcuoğlu M i Baser K.H.C.: Determination of aroma compounds in blackberry by GC/MS analysis. *Chemistry of Natural Compounds* 39:174-176, 2003.
- USDA, United States Department of Agriculture: National Resources Conservation Service, 2020. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>, [5.9.2020.].
- Vinčić M: Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća. *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2017.

Vranešić Bender D, Krstev S: Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. Nutricionizam, Medicus 17:1, 19-25, 2008.

Web1:https://www.google.com/search?q=kupina&client=opera&hs=Sg9&source=Inms&tbnisch&sa=X&ved=2ahUKEwivrNTwnP3rAhWLAhAIHR3rBMkQ_AUoAXoECB0QAw&biw=1560&bih=759#imgrc=dXBfGISRXHzzhM, [22.9.2020.].

Web2:https://www.google.com/search?q=5hidroksimetilfurfural&client=opera&hs=o1a&source=Inms&tbnisch&sa=X&ved=2ahUKEwigzoT_vOvrAhVLkMMKHeumCjQQ_AUoAnoECBsQBA&biw=760&bih=756 [6.9.2020.].

Web3:https://www.google.com/search?q=benzojeva+kiselina&client=opera&hs=WeR&source=Inms&tbnisch&sa=X&ved=2ahUKEwiMvfPctLTsAhWvllsKHYQQBVwQ_AUoAXoECBoQAw&biw=1560&bih=759#imgrc=pHteff73FvMTAM [15.10.2020.].

Web4:https://www.google.com/search?q=cimetna+kiselina&client=opera&hs=beR&source=Inms&tbnisch&sa=X&ved=2ahUKEwig0_3etLTsAhWP-ioKHdZsD5sQ_AUoAXoECAsQAw&biw=1560&bih=759#imgrc=A5UOVp9kdB3duM [15.10.2020.].

Web5:[https://sh.wikipedia.org/wiki/Katehin#/media/Datoteka:\(+\)-Catechin.png](https://sh.wikipedia.org/wiki/Katehin#/media/Datoteka:(+)-Catechin.png) [23.9.2020.].

Web6:https://sh.wikipedia.org/wiki/Elaginska_kiselina#/media/Datoteka:Ellagic_acid.svg [10.9.2020.].

Web7:<https://hr.wikipedia.org/wiki/Saharoza#/media/Datoteka:Sucrose-inkscape.svg> [15.9.2020.].

Web8:<https://ro.wikipedia.org/wiki/Trehaloză> [15.9.2020.]