

PREGLEDNI RAD/REVIEW

Stabilnost folata prilikom prerade i pripreme namirnica Folate Stability During Food Processing and Different Cooking Methods

Ivana Rumbak, Duška Ćurić, Irena Colić Barić

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

Sažetak

Biološki aktivni oblici folata su reducirani metaboliti folne kiseline - tetrahidrofolati. Tetrahidrofolati sudjeluju u reakcijama sinteze purina i pirimidina, temeljnih gradivnih sastavnica deoksiribonukleinske kiseline, dok je 5-metiltetrahidrofolat donor metilne skupine u reakciji prevođenja homocisteina u metionin. Dominantni oblici folata u životinjskom tkivu su poliglutamati tetrahidrofolata, 5-metiltetrahidrofolat i 10-formiltetrahidrofolat. Tetrahidrofolat je glavni oblik folata koji se nalazi u nekoliko vrsta ribe, a biljna tkiva sadržavaju uglavnom poliglutamil 5-metiltetrahidrofolat. Folna kiselina se može naći u jetricama, dok je u drugim namirnicama nema u značajnijoj količini, osim ako je prilikom čuvanja namirnica u aerobnim uvjetima, uslijed procesa oksidacije došlo do nastajanja folne kiseline. Procesi prerade i skladištenja namirnica u pravilu dovode do smanjenja folata u namirnicama. Stupanj razgradnje folata ovisi o vrsti hrane, dostupnosti kisika, kemijskom okruženju i primijenjenoj metodi termičke obrade, te obliku folata koji je prisutan u hrani.

Cljučne riječi: folat, prerada, metode termičke obrade

Summary

Biologically active folate forms are reduced metabolites of folic acid - tetrahydrofolates. Tetrahydrofolate acts as a carrier of one-carbon units in biochemical reactions that lead to the synthesis of the purines and the pyrimidines, which are the base constituents of deoxyribonucleic acid. In another important reaction, 5-methyltetrahydrofolate donates its methyl group to homocysteine to form methionine. The predominant folate vitamins in animal tissues are polyglutamyl forms of tetrahydrofolate, 5-methyltetrahydrofolate, and 10-formyltetrahydrofolate; tetrahydrofolate is main folate form found in several fish species while the plant tissues contain mainly 5-methyltetrahydrofolate. Folic acid can be isolated from liver but in most other foods it does not occur naturally to a significant extent. Presence of folic acid may occur due to oxidation, as an oxidation of tetrahydrofolates in foods stored in the presence of oxygen. Folate loss may occur during food processing, or as result of cooking and food storage. The degree of loss can be influenced by the type of food, oxygen content, chemical surrounding, heating and applied cooking method as well as the folate form present in food.

Key words: folate, food processing, cooking methods

1. Kratki povijesni pregled otkrića folne kiseline (Eitenmiller i sur., 2008)

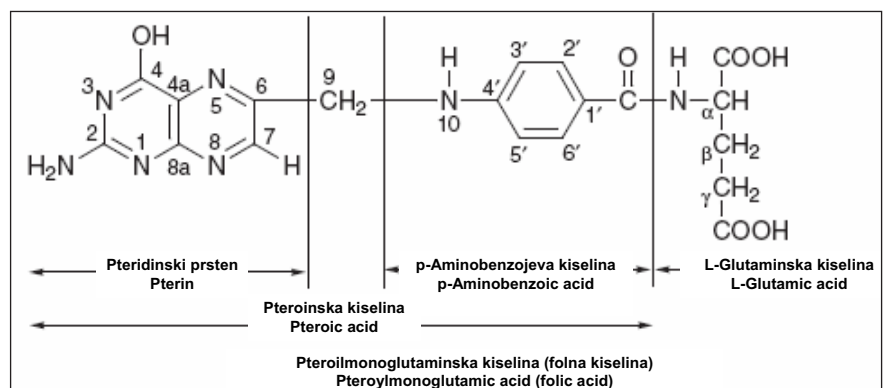
Djelotvornost pripravka autoliziranog kvasca u liječenju megaloblastične anemije u trudnica (nastaje uslijed nedostatka vitamina B₁₂ i/ili folata) prvi su utvrdili Wills i suradnici 1931. godine. Isti pripravak prije se pokazao terapijski neučinkovit kod perniciozne anemije (uzrokovane nedostatkom vitamina B₁₂).

Wills i suradnici su proveli istraživanje na testnim životinjama – majmunima, pri čemu su u ispitivane skupine izazvali megaloblastičnu anemiju. Životinje su reagirale jako dobro na neprerađene ekstrakte jetre, ali i izolate kvasca kojima su hranjeni, koji su tada nazvani „vitamin M“ i „vitamin B_C“. U to vrijeme, tvar izolirana iz jetre pokazala se esencijalnom za rast *Lactobacillus casei* i zbog toga je dobila ime „*L. casei* faktor“. Znanstvenik Mitchell 1941. godine pre-radio je golemu količinu špinata kako bi dobio pročišćenu tvar koja je djelovala kao aktivni faktor rasta za štakore i *L. casei*. Nazvali su taj faktor „folna kiselina“ (prema latinskoj riječi *folium* što znači list).

Naposljetku, za sve spomenute tvari pokazalo se da su identične kada je skupina istraživača pod vodstvom Angiera (1948) uspjela sintetizirati folnu kiselinu i definirati njezinu kemijsku strukturu.

2. Kemijska struktura (Ball, 2006)

Naziv folat je ime koje objedinjuje sve derivate pteroijske kiseline koji pokazuju vitaminsku aktivnost u ljudi. Struktura tzv. roditeljske molekule odnosno spoja – folne kiseline, po-



Slika 1. Kemijska struktura folne kiseline
Figure 1. Chemical structure of folic acid

Corresponding author: icecic@pbf.hr



drazumijeva bicikličku molekulu pterina vezanu metilenskim mostom za p-aminobenzojevu kiselinu, koja je preko peptidne veze vezana na molekulu glutaminske kiseline (Slika 1).

Folna kiselina, međutim, nije prirodni fiziološki oblik ovog vitamina. U većini namirnica, pteridinski prsten reduciran je do 7,8-dihidrofolata (DHF) ili 5,6,7,8-tetrahidrofolata (THF). Ovi reducirani oblici mogu biti supstituirani s jednim ugljikovim atomom vezanim za dušikov atom na 5 ili 10 mjestu ili za oba atoma čineći most. Slijedeći supstituirani oblici THF važni su intermedijeri u metabolizmu folata: 10-formil-THF, 5-metil-THF, 5-formimino-THF, 5,10-metilen-THF i 5,10-metenil-THF (Slika 2).

Svi spojevi folata uglavnom su poliglutamati, i obično sadrže od pet do sedam jedinica glutamata vezanih γ -peptidnom vezom. Ova veza jedinstvena je u prirodi, postoji još samo u peptidima koje sintetiziraju dvije *Bacillus* vrste. Konjugati folata skraćeno se označavaju kao PteGlu_n pri čemu n označava broj vezanih jedinica glutamata, npr. 5-CH₃-H₄PteGlu₃ označava triglutamil-5-metiltetrahidrofolnu kiselinu.

2.1. Folati u hrani

Dominantni oblici folata u životinjskom tkivu su poliglutamati THF, 5-metil-THF i 10-formil-THF (Gregory i sur., 1984b). 5-Formil-THF je aktivni oblik koji se nalazi u maloj količini u većini životinjskih tkiva, međutim uslijed termičke obrade može doći do njegovog nastajanja (Gregory, 1989). THF je glavni oblik folata koji se nalazi u nekoliko vrsta ribe (Vahteristo i sur., 1997), ali i u svinjetini i goveđoj jetri (Vahteristo i sur., 1996).

Biljna tkiva sadržavaju uglavnom poliglutamati 5-metil-THF, kojem se pripisuje 90% aktivnosti folata (Gregory i sur., 1984b).

Folna kiselina prisutna je u jetricama, a u drugim namirnicama se ne pojavljuje u značajnijoj količini. Međutim, folna kiselina može nastati u namirnicama u maloj količini kao produkt oksidacije THF, kada se namirnice čuvaju u uvjetima u kojima je dostupan kisik (Gregory, 1984). 5-Metil-5,6-DHF i u manjoj mjeri 10-formilfolna kiselina mogu biti prisutni u prerađenoj hrani i nastaju kao produkt oksidacije 5-metil-THF i 10-formil-THF.

Općenito, folati su u namirnicama vezani za proteine i za tzv. skladišne polisaharide (škrob i glikogen).

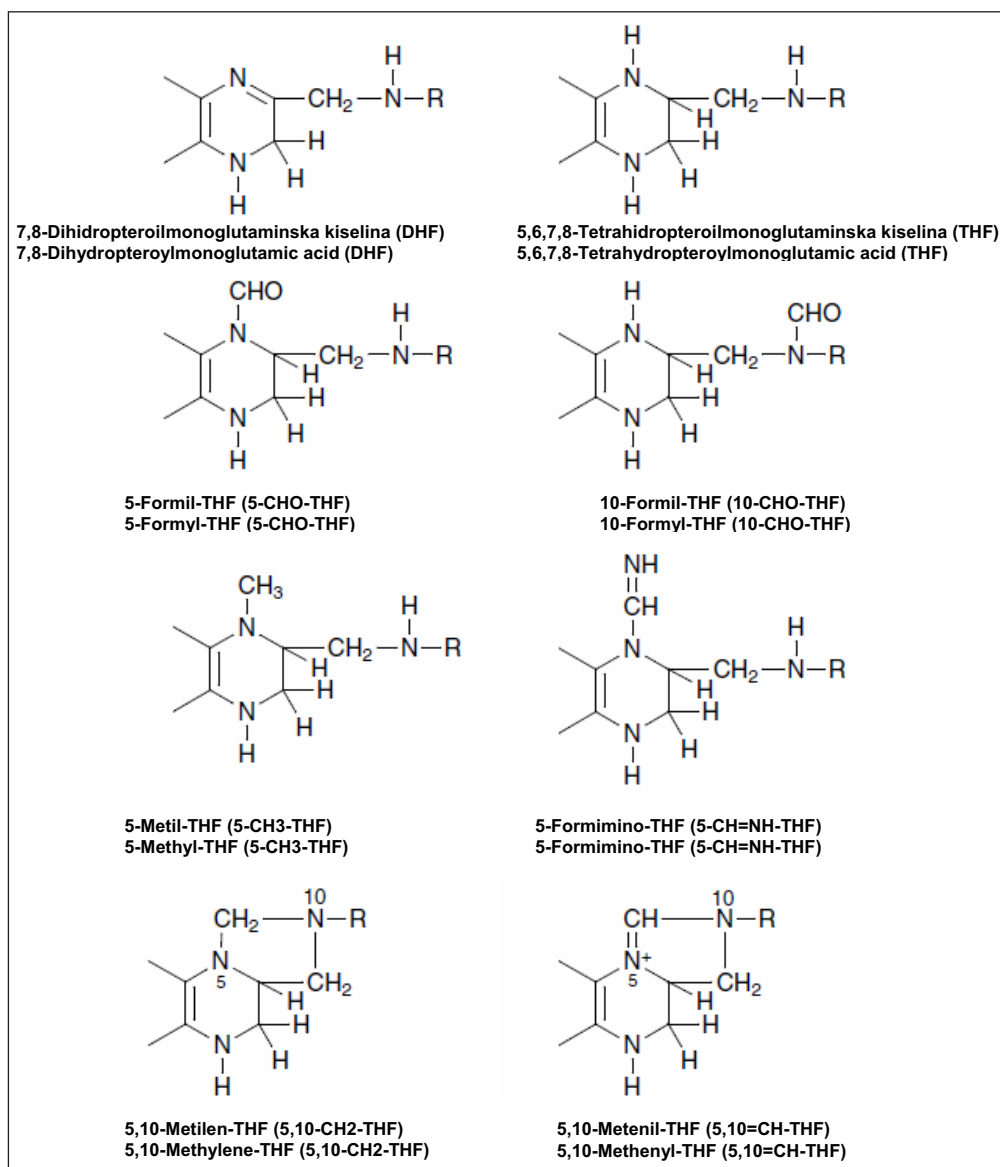
3. Fizikalno kemijska svojstva folata

(Ball, 2006)

Folna kiselina se proizvodi kemijskom sintezom i koristi se za obogaćivanje namirnica. Sintetička folna kiselina je narančasto-žute boje, u obliku kristala-listića koji tamne na zraku jer su higroskopni. Gotovo da nema mirisa ni okusa. Folna kiselina je netopljiva u hladnoj vodi, a teško je topljiva i u vreloj vodi (20 mg/100 ml). Slabo je topljiva u metanolu, znatno manje u etanolu, a u otapalima poput acetona, dietil etera, kloroforma ili benzena nije topljiva.

Folna kiselina se otapa u toploj razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini, a razgradnja se pospješuje povećanje koncentracije kiseline i povišenjem temperature. U razrijeđenim lužnati otopinama folna kiselina je topljiva i stabilna; vodena otopina pripremljena otapanjem natrijevog hidrogen karbonata ima pH između 6,5 i 6,8.

Natrijeva sol folne kiseline (jedan od komercijalno



Slika 2. Kemijske strukture folata

Figure 2. Chemical structures of folate compounds

dostupnih oblika folne kiseline) topljiva je u vodi (1,5 g/100 ml pri 0 °C).

3.1 Stabilnost folata u vodenim otopinama

Biološki aktivni oblici folata značajno se razlikuju obzirom na sklonost oksidaciji, termostabilnost i stabilnost u ovisnosti o kiselosti otopine (Gregory, 1985). Najstabilniji oblik pri sobnoj i povišenoj temperaturi je folna kiselina. U vodenim otopinama folna kiselina je stabilna pri 100 °C tijekom perioda od 10 h i to u pH rasponu od 5,0-12,0, kada je otopina zaštićena od svjetla, no kada je pH otopine manji od 5,0 postaje izuzetno nestabilna (Paine-Wilson i Chen, 1979).

Alkalnom hidrolizom u aerobnim uvjetima nastaje p-aminobenzoilglutaminska kiselina (PABG) i pterin-6-karboksilna kiselina, dok kiselinskom hidrolizom nastaje 6-metilpterin (Tannenbaum i sur., 1985). Poliglutamil derivati folne kiseline se hidroliziraju na folnu kiselinu i glutaminsku kiselinu u lužnatim otopinama i pri anaerobnim uvjetima. Aktivnost folata postupno se uništava izlaganjem svjetlosti, posebno u prisutnosti riboflavina, pri čemu nastaju PABG i pterin-6-karboksialdehid (Tannenbaum i sur., 1985).

Stabilnost folne kiseline (i većine oblika folata) može se znatno povećati djelovanjem askorbinske kiseline. Jedina poznata iznimka je 5-metil-DHF, koji se djelovanjem antioksidansa prevodi u 5-metil-THF (Lucock i sur., 1995).

Nesupstituirana reducirana struktura THF-a je vrlo podložna oksidativnom cijepanju. Ioni metala u tragovima poput željeza (III) i bakra (II) kataliziraju oksidaciju THF-a (Hawkes i Villota, 1989).

Prisutnost supstituirajućih skupina na N-5 poziciji značajno povećava oksidativnu stabilnost reduciranih folata u odnosu na THF. 5-metil-THF je vrlo važan oblik folata u prehrani. U poliglutamatom obliku ima vrijeme poluraspada od 21 min pri 100 °C u vodenim otopinama, za razliku od THF čije je vrijeme poluraspada pri istim uvjetima 2 min (Chen i Cooper, 1979). Na stabilnost 5-metil-THF ima veći utjecaj temperatura nego svjetlo. U kojoj mjeri dolazi do gubitka aktivnosti 5-metil-THF znatno ovisi o kiselosti otopine. Pri pH=9 i temperaturi od 25 °C, bez prisutnosti antioksidanta vrlo je nestabilan, dok je pri pH=7,3 i pH=3,5 puno stabilniji. U prisutnosti antioksidanta pri 25 °C, 5-metil-THF je relativno stabilan pri pH=7,3 i pH=9,0, dok pri nižim pH=3,5 vrijednostima otopine antioksidansi imaju minimalni zaštitni učinak (Lucock i sur., 1993).

Oksidacija 5-metil-THF pri neutralnim uvjetima rezultira nastankom 5-metil-5,6-DHF (Donaldson i Keresztesy, 1962). 5-metil-5,6-DHF brzo se može reducirati nazad u početni spoj u prisutnost askorbata ili merkaptoetanolu, koji se često koristi kao antioksidansi u analizi folata, pa zbog toga postoji mogućnost da se 5-metil-5,6-DHF uopće ne pronađe u većini uzoraka analiziranih kromatografskim metodama koje se primjenjuju za određivanje folata. U jako kiselom mediju, kod 5-metil-5,6-DHF dolazi do kidanja veze C9-N10 (Maruyama i sur., 1978; Lewis i Rowe, 1979), dok u blago kiselom mediju dolazi do preuređenja sustava pteridinskog prstena. U oba slučaja dolazi do posljedičnog gubitka aktivnosti folata (Paine-Wilson i Chen, 1979).

10-formil-THF lako se na zraku oksidira do 10-formilfolne kiseline (Maruyama i sur., 1978; Lewis i Rowe, 1979) bez gubitka biološke aktivnosti (Gregory, 1984a). Stabilnost 10-formilfolne kiseline vrlo je slična stabilnosti folne kiseline (Paine-Wilson i Chen, 1979). Pod anaerobnim uvjetima 10-formil-THF podložan je izomerizaciji do 5-formil-THF pri neutralnom pH, dugotrajnom stajanju i naročito pri povišenoj temperaturi (Robinson, 1971).

5-formil-THF pokazuje jednaku stabilnost kao i folna kiselina pri neutralnom pH, ali pri kiselim uvjetima, i posebno pri visokoj temperaturi gubi molekulu vode pri čemu nastaje 5,10-metenil-THF (Tannenbaum i sur., 1985) Ovaj spoj je stabilan u kiseloj otopini, ali hidrolizira do 10-formil-THF u neutralnoj i blago lužnatoj otopini (Stokstad i Koch, 1967).

Kazein, željezo (II) i askorbati imaju sposobnost snižavanja koncentracije otopljenog kisika i uslijed toga povećavaju termalnu stabilnost folne kiseline i 5-metil-THF (Day i Gregory, 1983). Druge reducirajuće tvari koji se pojavljuju u hrani, kao npr. tioli i cistein mogu također odgoditi oksidaciju folata.

Pri pH=6,4, 5-metil-THF pokazuje izrazitu nestabilnost uz dodatak 0,1M ZnCl₂ (Lucock i sur., 1994). Nestabilnost je također u manjoj mjeri uočena i u prisutnosti drugih metalnih kationa, gdje je djelovanje redom od jačeg prema slabijim kako slijedi Zn²⁺>Ca²⁺~K⁺>Mg²⁺~Na⁺. Ovaj učinak može biti poništen prisustvom reduciranog glutaciona, što ukazuje na to da je do gubitka došlo uslijed oksidativne degradacije. Pretpostavlja se da oksidativni proces ovisi o ionskom obliku 5-metil-THF. Pri pH=6,4, 5-metil-THF dolazi u anionskom obliku, što ga čini manje stabilnim u prisustvu metalnih kationa s kojima stvara komplekse. Kako se pri pH=3,5 u prisutnosti istih kationa stabilnost 5-metil-THF povećava, vrlo je izvjesno da je protonirana slobodna kiselina manje dostupna za formiranje kompleksa, što za posljedicu ima veću stabilnost.

Sulfitna kiselina i nitriti, koji se često koriste prilikom prerade namirnica, uzrokuju gubitak aktivnosti folata u vodenim otopinama. Reakcijom sulfitne kiseline i folata dolazi do cijepanja C9-N10 veze (Gregory, 1985). Nitritni ioni reagiraju s folnom kiselinom pri čemu nastaje 10-nitrozofolna kiselina, dok u reakciji s 5-formil-THF nastaju 10-nitrozo derivati, a interakcijom s THF i 5-metil-THF s nitritnim ionima nastaje PABG i nekoliko pterinskih produkata (Reed i Archer, 1979).

4. Stabilnost folata prilikom prerade i pripreme namirnica

4.1. Povrće i voće

Folati se tijekom blanširanja povrća vodom gube zbog razaranja pod utjecajem topline i otapanjem u vodi. Gubitak folata otapanjem u vodi veći je što je veća količina vode koja se koristi pri blanširanju. Npr. prilikom blanširanja špinata gubitak folata pri omjeru špinata i vode 1:1,6 bio je 33% (Chen i sur., 1983), a pri omjeru špinata i vode 1:7 iznosio je 83% (De-Souza i Eitenmiller, 1986). Kada je blanširanje provedeno pod utjecajem mikrovalova ili parom, gubitak folata bio je manji zbog toga što nije došlo do otapanja folata u vodi. Gubitak folata nakon blanširanja zelenih mahuna parom bio je 10% u usporedbi s gubitkom od 21% kada su mahune blanširane vo-



dom (Melse-Boonstra i sur., 2002). Blanširanje špinata vodom uzrokovalo je gubitak folata od 33% za razliku od blanširanja mikrovalovima gdje je gubitak bio 14% (Chen i sur., 1983). Istražujući učinak blanširanja, smrzavanja i skladištenja prokultura Malin (1977) je utvrdio da su folati stabilni u svim fazama prerade. Ovi rezultati objašnjavaju se manjom ukupnom površinom prokulica izloženoj otapanju folata u vodi nego što je to npr. kod špinata.

Skupina istraživača pod vodstvom Melse-Bonstra (2002) je u različitim vrstama povrća, nakon određenih metoda prerade, određivala folat (nakon konjugacije s konjugazama plazme štakora), monoglutamil folat (bez tretiranja enzimima) i poliglutamil folat (razlika između ukupnog folata i monoglutamil folata). U istraživanju su koristili poriluk (prsten, 5mm), cvjetaču (cvjetovi, 2-3 cm) i zelene mahune (komadići, 5 cm). Metode prerade namirnica su prikazane u Tablici 1.

Usljed zamrzavanja i odmrzavanja ili tretmana visokim tlakom nakon kojeg je slijedilo blanširanje došlo je do gubitka ukupnog folata za više od 55% i do povećanja omjera monoglutamil folata. Nasuprot tome, prilikom zamrzavanja i odmrzavanja ili tretmana visokim tlakom kojem je prethodilo blanširanje nije došlo do većeg gubitka folata nego prilikom samog blanširanja (<38%), a omjer monoglutamil folata blago je povećan. Na temelju toga očito je kako je prilikom zamrzavanja i odmrzavanja ili tretmana visokim tlakom došlo do loma na biljnim stanicama, pri čemu je došlo do kontakta endogenih konjugaza i poliglutamil folata, što je rezultiralo konverzijom poliglutamata u monoglutamat. Blanširanje koje je nakon toga uslijedilo dovelo je do otapanja oslobođenog monoglutamil folata. Suprotno tome, ako je blanširanje provedeno ranije dolazi do inaktivacije konjugaza, pa je onemogućena konverzija poliglutamil folata u monoglutamat i tako je smanjen ukupni gubitak folata.

Tablica 1. Opis primijenjenih metoda obrade (poriluk, cvjetača i zelene mahune) u radu Melse-Bonstra i sur. (2002)

Table 1. Description of the processing treatments (leeks, cauliflower and green beans) described by Melse-Bonstra et al. (2002)

Primijenjena metoda		Opis
Treatment		Description
A	Sirovi uzorci Raw	Bez metoda obrade No treatment
B	Skladištenje Storage	Skladištenje 24 h u hladnjaku na 4°C Storage for 24 h in a refrigerator at 4°C
C	Blanširanje Blanching	Blanširanje u industrijskom kotlu (10 L vode/200 g svježeg povrća), 5 min poriluk, 8 min cvjetača i 6 min zelene mahune Blanching in an industrial blanching kettle (10 L of water/200 g of fresh vegetable weight), for 5 min (leeks), 8 min (cauliflower), or 6 min (green beans)
D	Obrada vodenom parom Steaming	Obrada 200g povrća vodenom parom, u situ iznad 1 L vrijuće vode, 5 min poriluk, 7 min cvjetača i 6 min zelene mahune Steaming in a steaming sieve of 200 g of vegetable above 1 L of boiling water for 5 min (leeks), 7 min (cauliflower), or 6 min (green beans)
E	Tretman visokim tlakom High-pressure treatment	Obrada visokim tlakom na 200 MPa tijekom 5 min High-pressure treatment at 200 MPa for 5 min
F	Zamrzavanje, odmrzavanje, blanširanje Freezing, thawing, blanching	Zamrzavanje na -18°C tijekom 16 h, odmrzavanje tijekom skladištenja (metoda B) i blanširanje (metoda C) Freezing at -18 °C for 16 h, followed by thawing during storage (treatment B) and then blanching (treatment C)

G	Tretman visokim tlakom, blanširanje High-pressure treatment, blanching	Obrada visokim tlakom (metoda E), nakon koje slijedi skladištenje (metoda B) i potom blanširanje (metoda C) High-pressure treatment (treatment E) followed by storage (treatment B) and then blanching (treatment C)
H	Blanširanje, zamrzavanje, odmrzavanje Blanching, freezing, thawing	Blanširanje (metoda C), nakon kojeg slijedi zamrzavanje na -18°C tijekom 16 h, a potom odmrzavanje tijekom skladištenja (metoda B) Blanching (treatment C) followed by freezing at -18 °C for 16 h and thawing during storage (treatment B)
I	Blanširanje, tretman visokim tlakom Blanching, high-pressure treatment	Blanširanje (metoda C) nakon kojeg slijedi obrada pod visokim tlakom (metoda E) i skladištenje (metoda B) Blanching (treatment C) followed by high-pressure treatment (treatment E) and storage (treatment B)

Wambui Munyaka i suradnici su na temelju rezultata provedenog istraživanja zaključili da se kombiniranjem postupaka mljevenja (koje prethodi termičkoj obradi), povećanja kiselosti i blanširanja može postići povećanje sadržaja monoglutamil folata u uzorku brokule (Wambui Munyaka i sur., 2009).

Dodavanje askorbinske kiseline konzerviranom povrću povećava stabilnost folata pri skladištenju, međutim nema zaštitno djelovanje za folat tijekom tretiranja povrća na povišenoj temperaturi. Lin i suradnici su kod konzerviranog slanuka utvrdili gubitak folata od 30% bez obzira da li je ili nije dodana 0,2% askorbinske kiseline (Lin i sur., 1975).

Međutim, nije došlo do povećanog gubitka kada je proizvod tretiran na 118°C (30 ili 53 min). Konzervirani slanuk ima pH u rasponu od 5,8 do 6,2 pri kojem je folat stabilan bez obzira na promjenu temperature.

Stabilnost folata promatrana je i u liofiliziranim, prethodno skuhanim jelima od povrća namijenjenim astronautima. Smanjenje ukupnog sadržaja folata (preostala aktivnost od 29-49%) je primijećeno u jelima od šparoga, cvjetače sa sirom, zelenim mahunama s brokulom). Do smanjenja aktivnosti najvjerojatnije je došlo zbog oksidativnih procesa koji su bili potencirani povećanjem ukupne površine namirnica. Do prividnog povećanja u sadržaju folata je došlo u jelu sastavljenom od kukuruza, brokule i tjestenine (129%) i špinatu s vrhnjem (160%). Jedan od mogućih razloga mogao bi biti uništenje inhibitora konjugaze prilikom liofilizacije pri čemu konjugaza postaje aktivna i oslobađa dodatne količine slobodnog folata koji koristi testni mikroorganizam (*Lactobacillus rhamnosus*).

Pri primjeni ionizirajućeg zračenja i to doze od 2,5 kGy dolazi do gubitka folata od 10% u špinatu, kupusu i prokulicama. Pri radijacijskoj dozi od 10 kGy (u većini zemalja najviša dopuštena doza ionizirajućeg zračenja) gubitak folata iznosio

je od 0 do 30% za dehidrirano povrće, ali i druge namirnice poput pekarskog kvasca, govede jetrice i sira Camembert. Rezultati istraživanja ukazali su na pretvorbu poliglutamata u monoglutamate bolje bioraspodivnosti uvjetovane zračenjem (Müller i Diehl, 1996).

Obrada visokim tlakom pri umjerenim temperaturama trenutno se primjenjuje za pasteurizaciju mnogih namirnica. Nguyen i suradnici istraživali su stabilnost folne kiseline i 5-metil-THF u fosfatnom puferu (0,2 M, pH=7) u odnosu na kombinirane toplinske tretmane i tretmane pod povećanim tlakom. Folna kiselina pokazala je visoku stabilnost, nije došlo do razgradnje na temperaturi od 60°C i tlaku od 600 MPa u trajanju 7 h. Za razliku od folne kiseline, do razgradnje 5-metil-THF došlo je na temperaturama višim od 40°C, kombiniranim djelovanjem temperature i visokog tlaka (Nguyen i sur., 2003). Indrawati i suradnici (2004) su istraživali učinak obrade visokim tlakom pri umjerenim temperaturama na stabilnost endogenog 5-metil-THF u šparogama, soku od mrkve, pireu od kivija i soku od naranče. Došli su do spoznaje da je gubitak folata uglavnom nastao uslijed otapanja u vodi, pa su u daljnjim istraživanjima uporabili zatvoreni sustav. 5-metil-THF je bio prilično stabilan u soku od naranče i pireu od kivija pri primjeni različitih kombinacija tlakova i temperature sve do 500 MPa/60 °C u trajanju od 40 min, dok je u soku od naranče i šparogama došlo do značajnog razaranja prisutnih folata. Dodatak askorbinske kiseline povećao je stabilnost 5-metil-THF u soku od mrkve i u manjoj mjeri u šparogama, pri uvjetima povećanog tlaka. Autori su zaključili da endogena askorbinska kiselina u hrani ima značajnu ulogu za stabilnost folata tijekom primjene povećanog tlaka i predložili da bi se dodatak askorbinske kiseline mogao primjenjivati kao mjera prevencije degradacije tijekom prerade. Butz i suradnici (2004) su također zaključili kako askorbinska kiselina u suvišku štiti



folat od utjecaja visokog tlaka i povišene temperature u soku od naranče. Obrada svježije cijedenog soka od naranče pri 600 MPa/80 °C u trajanju od 5 minuta nije prouzročilo značajniji gubitak folata.

Leichter i suradnici (1978) su istraživali učinak kuhanja (vrenje u trajanju 10 min) na sadržaj folata u povrću bogatom folatom. Folat je određen u sirovom i kuhanom povrću, ali i u vodi u kojoj je povrće kuhano. Osim kod špinata, količina folata iz kuhanog povrća i vode u kojem je povrće kuhano, premašivala je 100% količine određene u sirovom povrću. Time su dokazali da se folat iz povrća ne uništava nego se samo premješta u vodu u kojoj je povrće kuhano. Voda korištena za kuhanje sadržavala je više folata nego što je sadržavalo kuhano povrće i to kod brokule, kupusa, cvjetače i špinata. Prokulice i šparoge bile su iznimka vjerojatno zbog niskog omjera površine i mase ovih vrsta povrća. Istraživanje koje je proveo Klein i suradnici (1981) je pokazalo da nije bilo gubitka folata u špinatu pripremljenom u mikrovalnoj pećnici.

Petersen je uspoređivao utjecaj pripreme brokule na pari i zagrijavanja vakumiranog proizvoda u vodi na količinu folata. Postotak retencije folata pri pripremi brokule parom na 100 °C u trajanju od 20 min bio je 74%, a pri istim uvjetima u vremenu trajanja od 40 min 59%, te prilikom zagrijavanja vakumiranog proizvoda u vodi 40 min na 100 °C retencija je bila 97% (Petersen, 1993).

Namakanje suhog slanutka i graška u trajanju od 16 h uzrokovalo je gubitak folata od 17 odnosno 21% i to uslijed otapanja u vodi. Ako se slanetak i grašak kuhaju gubitak folata povećava se za dodatnih 20% odnosno 27%, a ako su kuhani pod tlakom gubitak je povećan za još 20% odnosno 27%. Ukupna retencija folata nakon namakanja i kuhanja bila je 53% za slanetak i 45% za grašak, a nakon namakanja i kuhanja pod tlakom bila je 62% za slanetak i 45% za grašak (Dang i sur., 2000).

Xue i suradnici (2011.) su istraživali učinak namakanja suhog graha u vodi, a zatim i različitih metoda termičke obrade na stabilnost 5-metil-THF. Slično prethodnom istraživanju, na stabilnost 5-metil-THF je značajno utjecalo vrijeme namakanja i volumen vode za namakanje. Sadržaj 5-metil-THF otopljenog u vodi povećavao se proporcionalno s povećanim vremenom namakanja i povećanim volumenom vode za namakanje. Tako je pri omjeru graha i vode 1:3 gubitak 5-metil-THF iznosio od 1,1-30,5%, u ovisnosti o ukupnom trajanju namakanja (od 3 do 12 sati). Pri omjeru graha i vode 1:7 gubitak 5-metil-THF iznosio je od 5,2-44,7%, za trajanje namakanja od 3 do 12 sati. Nadalje, vrijeme termičke obrade, vrsta termičke obrade i medij u kojem je kuhan grah (voda ili mješavina vode i ulja) dodatno je utjecalo na gubitak stabilnosti folata. Najveći gubitak 5-metil-THF prilikom termičke obrade graha ostvaren je nakon kuhanja pod tlakom, dok je medij sastavljen iz uljne i vodene komponente povećao stabilnost 5-metil-THF. Namakanje koje je prethodilo termičkoj obradi povećalo je gubitak folata nakon termičke obrade, bez obzira na medij i vrstu termičke obrade (Xue i sur., 2011).

U istraživanju skupine čeških istraživača brokula, cvjetača, špinat, kelj, prokulica i mrkva kuhani su u vodi 2, 4 i 8 min (odnosno 4, 8 i 12 minuta cvjetača) i potom je određen folat koji je zaostao u povrću. Najviše folata, obzirom na količinu prije kuhanja, zaostao je u prokulici, cvjetači i brokuli. Nakon 8 minuta kuhanja zadržano je 75% od početnog 5-metil-THF. Niže vrijednosti, između 37-52% zaostale su u špinatu, kelju

i mrkvi. Autori razliku tumače svojstvima pojedinog povrća kao npr. omjerom mase i površine ili prisutnošću endogenih antioksidanata. Općenito, autori podržavaju hipotezu da kod zelenog lisnatog povrća dolazi do većeg gubitka folata tijekom kuhanja nego kod korjenastog povrća (Holasova i sur., 2008).

Öhrvik i Witthöft (2008) su utvrdili da je u soku od naranče gubitak dominantnog aktivnog oblika folata, 5-metil-THF, tijekom 7 dana čuvanja bio do 7%, dok je gubitak folne kiseline (kojom je sok bio obogaćen) po isteku roka trajanja soka od naranče bio 1-4%.

Tehnološka prerada bobičastih plodova vučjeg trna prouzročilo je kompletni gubitak THF i 5-formil-THF u soku istih plodova. Sadržaj osnovnog aktivnog oblika 5-metil-THF ostao je nepromijenjen pri proizvodnji koncentrata, kao i tijekom skladištenja soka 7 dana pri 6 °C. Pri skladištenju soka na 25 °C i 40 °C tijekom 7 dana došlo je do gubitka 5-metil-THF od 17-20% (Gutzeit i sur., 2008).

4.2. Meso

THF je pokazao manju stabilnost u usporedbi s 5-metil-THF prilikom termičke obrade (pečenja) ribe i piletine (Vahteristo i sur., 1998). To ukazuje na sklonost namirnica životinjskog porijekla da tijekom prerade i kuhanja gube više folata vjerojatno zbog toga što je prevladavajući oblik THF. Skladištenje u zamrznutom obliku na -18 °C u trajanju do 6 mjeseci ne utječe na sadržaj 5-metil-THF u sirovoj jetrici, ali i jagodama (Vahteristo i sur., 1998).

U istraživanju McKillopa i suradnika (2002) kuhanje govedine rezultiralo je neznatnim gubitcima folata čak i nakon produljene termičke obrade (16 minuta). Međutim, u radu Aramounija i Godbera (1991) je utvrđeno da se sadržaj folata u goveđoj jetri smanjuje za 41% kuhanjem i 50% prženjem. Bergström (1994) je utvrdio da u piletini zaostaje od 55-70% folata nakon kuhanja i pirjanja, a 60-90% nakon pečenja. U ribama i školjkama zaostaje 70-100% folata nakon pripreme na pari ili poširanjem te 80-90% folata nakon kuhanja u pećnici.

4.3. Mlijeko

Konzerviranje trajnog mlijeka pri vrlo visokim temperaturama utječe na gubitak folata za oko 12,5% (Oamen i sur., 1989), dok je gubitak folata u pasteriziranom mlijeku manji od 10% (Renner, 1988). Prisutnost askorbinske kiseline u mlijeku štiti folat od oksidacije otopljenim kisikom.

Postoje značajni podaci o stabilnosti 5-metil-THF u mlijeku. Mlijeko je vrlo prikladan proizvod za istraživanje o stabilnosti tijekom termičke obrade zato što je 90-95% prisutnog folata u formi 5-metil tetrahidrofolata. Gubitak tijekom UHT pasterizacije je obično manji od 20%. Nedavna istraživanja pri kojima su se primjenjivali UHT uvjeti na model otopinama su pokazala da je razgradnja 5-metil-THF bitno smanjena ako je prije termičke obrade primijenjeno degaziranje (Viberg i sur., 1997).

4.4. Žitarice

Folna kiselina koja se dodaje u brašno i žitarice, u skladu s obveznim obogaćivanjem koje je na snazi u određenom broju zemalja, pokazuje dobru stabilnost tijekom mljevenja žitarica i skladištenja brašna (Ranhotra i Keagy, 1995). Pečenjem kruha gubi se oko 20% dodane folne kiseline i isto toliko prirodno prisutnog folata (Osseyi i sur., 2001).

U istraživanju Gujske i Majewske (2005.) tijekom pečenja pšeničnog i raženog kruha dolazi do smanjenja sadržaja folata u rasponu od 12%-21%. Međutim, autori smatraju da tijekom fermentacije u obje vrste kruha dolazi do povećanja ukupnog folata zahvaljujući aktivnosti kvasaca, i smatraju da se odabirom količine i vrste kvasaca može utjecati na povećanje sadržaja folata. Također su utvrdili da tijekom prerade dolazi do značajnijeg gubitka dodane folne kiseline u odnosu na ukupni sadržaj folata, pa prisutnost endogenih folata djelomično kompenzira gubitak folne kiseline (Gujska i Majewska, 2005).

Lan i sur. (2007) su istražili utjecaj prerade na sadržaj folata u rezancima. Ispitivane su 3 vrste rezanaca: od bijelog brašna uz dodatak soli, od bijelog brašna uz dodatak alkalnih soli i instant rezanaca. Sve vrste rezanaca pripremljene su u laboratoriju kako bi usporedba među različitim vrstama bila lakša i u sve uzorke dodana je jednaka količina folne kiseline. Pokazalo se da ne postoji razlika u količini zaostalih folata uslijed sušenja pri 40 °C, između rezanaca od bijelog brašna uz dodatak soli i rezanaca od bijelog brašna uz dodatak alkalnih soli. pH nije imao utjecaja na gubitak folata do ove faze proizvodnje. Kuhanjem u vodi rezanci sa soli su izgubili 38% folne kiseline, a rezanci s alkalnim solima 40% folata.

Vrijeme kuhanja bilo je dvostruko veće za rezance s alkalnim solima pa autori zaključuju da je pH rezanaca važan čimbenik pri kuhanju. Naime, rezanci s dodanim alkalnim solima (pH=10) imaju sličan gubitak folata premda su kuhani dvostruko dulje od rezanaca sa soli (pH=6,12), pa se može zaključiti da je folat bio stabilniji u rezancima dodanim alkalnim solima. Instant rezanci imali su najveći gubitak folne kiseline (44%), do kojeg je došlo tijekom kuhanja na pari i prženja u dubokom ulju, a potom i tijekom kuhanja (Bui i Small, 2007).

Premda bi se iz pregleda do sada navedenih radova moglo zaključiti da su istraživanja o stabilnosti folata u namirnicama relativno stara, ova tema je još uvijek aktualna.

Skupina istraživača iz Poljske (Gujska i sur, 2009) proučavala je stabilnost folata u dvije vrste raženog kruha tijekom pripreme i skladištenja. Skladištenje kruha pri -18 °C tijekom 2 tjedna nije imalo značajnog učinka na ukupan sadržaj folata u odnosu na sadržaj izmjeren prije skladištenja, netom nakon pečenja kruha. Nakon vremenskog perioda od 5 tjedana došlo je do smanjenja folata u prosjeku za 14% za obje vrste kruha, a nakon 16 tjedana skladištenja za oko 25% u kruhu koji je bio pripremljen s pekarskim kvascem, a za oko 38% je bio gubitak u kruhu od kiselog tijesta.

5. Zaključak

Do smanjenja aktivnosti folata može doći uslijed prerade namirnica ili njihovog skladištenja. Smanjenje aktivnosti može biti različito i ovisiti o vrsti hrane, izloženosti zraku odnosno kisiku, kemijskom sastavu hrane, stupnju i intenzitetu obrade odnosno zagrijavanja namirnice i obliku folata koji su prisutni u hrani.

a) Budući da su folati topljivi u vodi, može doći do gubitka folata stavljanjem hrane u vodu.

b) Prisutnost reducirajućih tvari kao što je askorbinska kiselina može povoljno utjecati na stabilnost folata u sirovini tijekom termičke obrade.

c) Prisutnost metalnih ione (npr. Fe²⁺) može nepovoljno utjecati na stabilnost folata u namirnicama.

d) Uobičajeni aditiv NaNO₂ koji se koristi prilikom procesa konzerviranja mesa nepovoljno utječe na količinu folata u gotovom proizvodu.

e) Folati su relativno stabilni u proizvodima s malom količinom vode, bez prisutnosti svjetla i kisika. Tako se udio folne kiseline ne mijenja tijekom skladištenja u brašnu i žitaricama za doručak, dok do malog smanjenja aktivnosti dolazi tijekom pečenja.

f) Za obogaćivanje namirnica koristi se folna kiselina, jer ona ima veću stabilnost nego folati koji se prirodno nalaze u namirnicama.

g) Stabilnost 5-metil-THF je iznimno dobra kod zamrznutog voća i povrća.

Zahvala

Autori zahvaljuju doc.dr.sc. Senki Djaković na korisnim savjetima vezanim uz nomenklaturu organskih spojeva.

Reference

Aramouni F.M., Godber J.S. (1991): Folate losses in beef liver due to cooking and frozen storage. *Journal of Food Quality*, 14, str. 357-365.

Ball G.F.M. (2006) Folate, U: Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability, str. 232-233, CRC Press, Boca Raton, USA.

Bergström L. (1994): Nutrient losses and gains in the preparation of food. NLG Report, National Food Administration, Sweden, Report No. 32/1994.

Bui L.T., Small D.M. (2007): Foliates in Asian Noodles: III. Fortification, Impact of Processing, and Enhancement of Folate Intakes, *Journal of Food Science*, 72, str. C288-293.

Butz P., Serfert Y., Fernandez Garcia A., Dieterich S., Lindauer R., Bognar A., Tauscher B. (2004): Influence of high-pressure treatment at 25 °C and 80 °C on folates in orange juice and model media, *Journal of Food Science*, 69, str. 117-121.

Chen T.S., Cooper R.G. (1979): Thermal destruction of folacin: effect of ascorbic acid, oxygen and temperature, *Journal of Food Science*, 44, str. 713-716.

Chen T.S., Song Y.O., Kirsch A.J. (1983): Effects of blanching, freezing and storage on folacin contents of spinach, *Nutrition Reports International*, 28, str. 317-324.

Dang J., Arcot J., Shrestha A. (2000): Folate retention in selected processed legumes, *Food Chemistry*, 68, str. 295-298.

Day B.P.F., Gregory J.F. III (1983): Thermal stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems, *Journal of Food Science*, 48, str. 581-587.

DeSouza S.C., Eitenmiller R.R. (1986): Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli, *Journal of Food Science*, 51, str. 626-628.

Donaldson K.O., Keresztesy J.C. (1962): Naturally occurring forms of folic acid. III. Characterization and properties of 5-methyldihydrofolate, an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate, *The Journal of Biological Chemistry*, 237, str. 3815-3819.



- Eitenmiller R.R., Ye L., Landen W.O. Jr. (2008) Folate and folic acid. U: Vitamin analysis for the health and food science, str. 443-493, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Gregory J.F. III (1984): Determination of folacin in foods and other biological materials, *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 67, str. 1015-1019.
- Gregory J.F. III (1985) Chemical changes of vitamins during food processing, U: Richardson T., Finley J.W. (ed.): Chemical Changes of Food during Processing, str. 373-408, Van Nostrand Co., New York, USA.
- Gregory J.F. III (1989) Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. U: Kinsella J.E. (ed.): Advances in Food and Nutrition Research, str. 1-101, Academic Press, New York, USA.
- Gregory J.F. III, Ristow K.A., Sartain D.B., Damron B.L. (1984a): Biological activity of the folacin oxidation products 10-formylfolic acid and 5-methyl-5,6-dihydrofolic acid, *Journal of agricultural and food chemistry*, 32, str. 1337-1342.
- Gregory J.F. III, Sartain D.B., Day B.P.F. (1984b): Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography, *Journal of Nutrition*, 114, str. 341-353.
- Gujaska E., Michalak J., Klepacka J. (2009): Foliates Stability in Two Types of Rye Breads During Processing and Frozen Storage, *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, str. 129-134.
- Gujaska G., Majewska K. (2005): Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Foliates Stability in Wheat and Rye Breads, *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, str. 37-42.
- Gutzeit D., Mönch S., Jerz G., Winterhalter P., Rychlik M. (2008): Folate content in sea buckthorn berries and related products (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*): LC-MS/MS determination of folate vitamers stability influenced by processing and storage assessed by stable isotope dilution assay, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, str. 211-219.
- Hawkes J.G., Villota R. (1989) Foliates in foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, str. 439-538.
- Holasova M., Fiedlerova V., Vavreinova S. (2008): Determination of Foliates in Vegetables and their Retention During Boiling, *Czech Journal of Food Sciences*, 26, str. 31-37.
- Indrawati, Arroqui C., Messagie I., Nguyen M.T., Van Loey A., M. Hendrickx (2004) Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, str. 485-492.
- Johansson M., Furuhaugen C., Frolich W., Jagerstad M. (2008): Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods, *LWT - Food Science and Technology*, 41, str. 528-536.
- Klein B.P., Kuo C.H.Y., Boyd G. (1981): Folacin and ascorbic acid retention in fresh raw, microwave, and conventionally cooked spinach, *Journal of Food Science*, 46, str. 640-641.
- Leichter J., Switzer V.P., Landymore A.F. (1978): Effect of cooking on folate content of vegetables, *Nutrition Reports International*, 18, str. 475-479.
- Lewis G.P., Rowe, P.B. (1979): Oxidative and reductive cleavage of folates — a critical appraisal, *Analytical Biochemistry*, 93, str. 91-97.
- Lin K.C., Luh B.S., Schweigert B.S. (1975): Folic acid content of canned garbanzo beans, *Journal of Food Science*, 40, str. 562-565.
- Lucock M.D., Green M., Hartley R., Levene M.I. (1993): Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection, *Food Chemistry*, 47, str. 79-86.
- Lucock M.D., Green M., Priestnall M., Daskalakis M.I., Levene M.I., Hartley R. (1995): Optimization of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work, *Food Chemistry*, 53, str. 329-338.
- Lucock M.D., Nayeemuddin F.A., Habibzadeh N., Schorah C.J., Hartley R., Levene, M.I. (1994): Methylfolate exhibits a negative in vitro interaction with important dietary metal cations, *Food Chemistry*, 50, str. 307-310.
- Malin J.D. (1977): Total folate activity in Brussels sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic acid content, *International Journal of Food Science & Technology*, 12, str. 623-632.
- Maruyama T., Shiota T., Krumdieck C.L. (1978): The oxidative cleavage of folates — a critical study, *Analytical Biochemistry*, 84, str. 277-295.
- McKillop D.J., Pentieva K., Daly D., McPartlin J.M., Hughes J., Strain J.J., Scott J.M., McNulty H. (2002): The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet, *British Journal of Nutrition*, 88, str. 681-688.
- Melse-Boonstra A., Verhoef P., Konings E.J.M., van Dusseldorp M., Matser A., Hollman P.C.H., Meyboom S., Kok F.J., West C.E. (2002): Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower, and green beans, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, str. 3473-3478.
- Müller H., Diehl J.F. (1996): Effect of ionizing radiation on folates in food, *LWT - Food Science and Technology*, 29, str. 187-190.
- Nguyen M.T., Indrawati, Hendrickx M. (2003): Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, str. 3352-3357.
- Oamen E.E., Hansen A.P., Swartz K.R. (1989): Effect of ultra-high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk, *Journal of Dairy Science*, 72, str. 614-619.
- Öhrvik V., Witthöft C. (2008): Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion, *European Journal of Nutrition*, 47, str. 92-98.
- Osseyi E.S., Wehling R.L., Albrecht J.A. (2001): HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking, *Cereal Chemistry*, 78, str. 375-378.

Paine-Wilson B., Chen T.S. (1979) Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions, *Journal of Food Science*, 44, str. 717-722.

Petersen M.A. (1993): Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 197, str. 375-380.

Ranhotra G.S., Keagy P.M. (1995): Adding folic acid to cereal-grain products, *Cereal Foods World*, 40, str. 73-76.

Reed L.S., Archer M.C. (1979): Action of sodium nitrite on folic acid and tetrahydrofolic acid, *Journal of agricultural and food chemistry*, 27, str. 995-999.

Renner E. (1988) Effects of agricultural practices on milk and dairy products. U: Karmas E., Harris R.S. (ed.): *Nutritional Evaluation of Food Processing*, str. 203-224. Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA.

Robinson D.R. (1971): The nonenzymatic hydrolysis of N 5,N 10-methenyltetrahydrofolic acid and related reactions, *Methods in Enzymology*, 18B, str. 716-725.

Stokstad E.L.R., Koch, J. (1967): Folic acid metabolism, *Physiological Reviews*, 47, str. 83-116.

Tannenbaum S.R., Young V.R., Archer M.C. (1985) Vitamins and minerals, U: Fennema O.R. (ed.): *Food Chemistry*, 2. izd., str. 477-544, Marcel Dekker, New York, USA.

Vahteristo L., Ollilainen V., Varo P. (1996): HPLC determination of folate in liver and liver products, *Journal of Food Science*, 61, str. 524-526.

Vahteristo L.T., Lehtikoinen K.E., Ollilainen V., Koivistoinen P.E., Varo P. (1998): Oven-baking and frozen storage affect folate vitamers retention, *LWT - Food Science and Technology*, 31, str. 329-333.

Vahteristo L.T., Ollilainen V., Varo P. (1997): Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products, *Journal of AOAC International*, 80, str. 373-378.

Viberg U., Jägerstad M., Öste R., Sjöholm I. (1997): Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen, *Food Chemistry*, 59, str. 381-386.

Wambui Munyaka A., Oey I., Verlinde P., Van Loey A., Hendrickx M. (2009): Acidification, crushing and thermal treatments can influence the profile and stability of folate poly- γ -glutamates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), *Food Chemistry*, 117, str. 568-575.

Xue S., Ye X.Q., Shi J., Jiang Y.M., Liu D.H., Chen J.C., Shi A., Kakuda Y. (2011): Degradation kinetics of folate (5-methyltetrahydrofolate) in navy beans under various processing conditions, *LWT-Food Science and Technology*, 44, str. 231-238.

Autori / Authors

Ivana Rumbak, dipl.ing.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr.sc. Duška Ćurić, red prof.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Dr.sc. Irena Colić Barić, red prof.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6