

# Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stabilnost fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u mutnom soku od jabuke

---

**Bilobrk, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:323774>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Josipa Bilobrk

901/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA  
VISOKOG INTENZITETA NA  
STABILNOST FENOLNIH  
SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI  
KAPACITET U MUTNOM SOKU  
OD JABUKE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za tehnološke operacije na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, višeg asistenta i dr. sc. Domagoja Gabrića, znanstvenog suradnika.

**Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena visokog hidrostatskog tlaka u proizvodnji funkcionalnih sokova na bazi voća i povrća (IP-06-2016)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.**

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo koji su pomogli prilikom izrade ovog rada. Posebno i od srca zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na pruženoj pomoći, susretljivosti, razumijevanju i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svim svojim prijateljima i prijateljicama, posebice Blaženki i Miji, na podršci, zajedničkom učenju i zabavnim trenucima zbog kojih je tijek studiranja protekao lakše i veselije.*

*Na kraju, najveća HVALA mojim najdražima, mami Ankici, tati Petru, sestri Luciji i dečku Kreši što su uz mene u svim životnim situacijama. Hvala vam na razumijevanju, podršci i bezuvjetnoj ljubavi.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET U MUTNOM SOKU OD JABUKE

*Josipa Bilobrk, 901/PI*

**Sažetak:** Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj ultrazvuka na stabilnost fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta te usporediti dobivene rezultate s rezultatima svježeg netretiranog mutnog soka od jabuke sorte Zlatni Delišes neposredno nakon tretmana te tijekom sedmodnevnog skladištenja pri 4 °C. U radu je korišten ultrazvuk visokog intenziteta, snage 100 W, frekvencije 20 kHz, amplituda 40 % i 80 %, promjera sonde 7 i 10 mm te vremena tretiranja od 3, 6 i 9 minuta. Uslijed tretmana ultrazvukom, temperatura nije prelazila 41 °C. U odnosu na kontrolni uzorak u svim tretiranim uzorcima neovisno o amplitudi, promjeru sonde te vremenu tretiranja uočen je smanjen udio ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Nakon 7 dana skladištenja, kod svih uzoraka, tretiranih i netretiranih, došlo je do smanjenja navedenih vrijednosti. Uslijed skladištenja, veći pad vrijednosti primijećen je kod uzoraka tretiranih ultrazvukom.

**Ključne riječi:** sok od jabuke, ukupni fenoli, ultrazvuk, antioksidacijski kapacitet, skladištenje

**Rad sadrži:** 48 stranica, 7 slika, 7 tablica, 102 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Predrag Putnik, viši asistent i dr.sc. Domagoj Gabrić, znanstveni suradnik*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
2. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. Doc.dr.sc. *Tomislav Bosiljkov*
4. Doc.dr.sc. *Sven Karlović* (zamjena)

**Datum obrane:** 18. srpnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### THE EFFECT OF ULTRASOUND ON THE STABILITY OF PHENOLS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN CLOUDY APPLE JUICE

*Josipa Bilobrk, 901/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the influence of ultrasound treatment on the stability of phenolic compounds and antioxidant capacity in cloudy apple juice (cv. Golden Delicious) during seven days storage at 4 °C. For this purpose, the High Power Ultrasound (HPU) (100 W, 20 kHz frequency) was operated at following conditions: (i) amplitude 40 % and 80 %, (ii) ultrasound probe 7 and 10 mm, and (iii) treatment time of 3, 6 and 9 minutes. The temperature did not exceed 41 °C during any of the ultrasound treatments. Aside from the amplitude, ultrasound probe and treatment time, obtained results revealed that ultrasound treatment decreased total phenols and antioxidant capacity in cloudy apple juices. Moreover, seven days of storage at 4 °C also has negative impact on polyphenols stability and antioxidant capacity. However, during shelf-life, the greater stability of both, polyphenols and antioxidant capacity, was observed in all un-treated samples.

**Keywords:** *apple juice, ultrasound, total phenols, antioxidant capacity, storage time*

**Thesis contains:** 48 pages, 7 figures, 7 tables, 102 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *PhD Predrag Putnik, postdoc and PhD Domagoj Gabrić, Expert assistant*

#### **Reviewers:**

1. PhD *Anet Režek Jambrak*, Associate Professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
3. PhD *Tomislav Bosiljkov*, Assistant professor
4. PhD *Sven Karlović*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 18. July 2018.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. JABUKA .....	2
2.1.1. Kemijski sastav jabuke.....	3
2.1.2. Fenolni sastav jabuke .....	4
2.1.3. Sok od jabuke .....	5
2.1.4. Stabilnost fenolnih spojeva soka od jabuke.....	7
2.2. ULTRAZVUK.....	9
2.2.1. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u industriji voćnih sokova .....	11
2.2.2. Mikrobiološka stabilnost sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta.....	11
2.2.3. Fizikalna svojstva sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta .....	13
2.2.4. Nutritivni sastav sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta .....	14
2.2.5. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stabilnost fenolnih spojeva voćnih sokova .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. Priprema soka od jabuke .....	17
3.2.2. Ultrazvučni tretman mutnog soka od jabuke.....	18
3.2.3. Provedba ekstrakcije.....	19
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	20
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	23
3.2.6. Statistička analiza.....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. STABILNOST UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (DPPH) MUTNOG SOKA OD JABUKE TRETIRANOG ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA .....	27
4.2. STABILNOST UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (DPPH) MUTNOG SOKA OD JABUKE TRETIRANOG ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NAKON SEDAM DANA SKLADIŠTENJA .....	28



4.3. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKA NA MASENI UDIO UKUPNIH FENOLA .....	32
4.4. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET (DPPH) .....	34
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>

# 1. UVOD

U potrazi za novim prehrambenim proizvodima veće biološke vrijednosti, prehrambena industrija sve više se okreće implementaciji novih netoplinskih tehnika obrade obzirom da niže procesne temperature i kraće vrijeme tretiranja omogućavaju veću stabilnost termoosjetljivih bioloških spojeva. Veliku skupinu bioaktivnih spojeva čine upravo fenolni spojevi čiji su višestruki pozitivni učinci na zdravlje već od ranije utvrđeni. Sekundarni su metaboliti biljaka, a posebno se ističu svojim antioksidacijskim djelovanjem. Sastavni su dio čovjekove prehrane, a kako ih ljudski organizam nije u mogućnosti sam sintetizirati, navedene spojeve potrebno je unositi hranom biljnog podrijetla. Jabuka (*Malus domestica*) se ubraja u voćnu vrstu bogatu fenolnim spojevima s visokim stupnjem biodostupnosti. Osim potrošnje u svježem stanju, jabuka se također prerađuje u sokove, najčešće bistre i mutne. Iako potrošači preferiraju bistre sokove od jabuke, rezultati znanstvenih istraživanja upućuju da s biološkog i nutritivnog stajališta, prednost treba dati mutnim sokovima. U svrhu osiguranja njihove zdravstvene ispravnosti i produženog roka trajanja, primjenjuje se toplinski postupak pasterizacije. Nedostatak pasterizacije očituje se u primjeni visokih temperatura obrade uslijed kojih dolazi do nepoželjnih promjena boje, degradacije fenolnih spojeva, vitamina te gubitka mnogih drugih vrijednih bioaktivnih komponenata. Posljedično, finalni proizvod lošijih je senzorskih karakteristika, ali i niže nutritivne i biološke vrijednosti. Stoga se industrijski sektor voćnih sokova sve više okreće ispitivanju primjene manje invazivnih netoplinskih tehnika obrade s ciljem očuvanja senzorske kvalitete te nutritivne i biološke vrijednosti. Jedna od tih tehnika jest i ultrazvuk visokog intenziteta s niskim frekvencijama, koji se danas sve više primjenjuje za pasterizaciju tekućih proizvoda, bilo samostalno ili u kombinaciji s drugim netoplinskim tehnikama ( „hurdle“ koncept). Stoga, na temelju svega navedenog, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stabilnost biološki aktivnih spojeva u mutnom soku od jabuke. Ispitan je utjecaj nezavisnih varijabli ultrazvuka poput amplitude, promjera sonde i vremena tretiranja neposredno nakon obrade te nakon tjedan dana skladištenja pri 4 °C.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. JABUKA

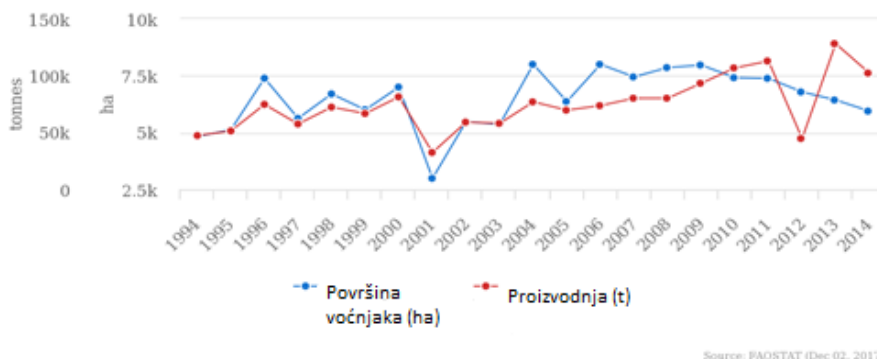
Jabuka, *Malus domestica* Borkh. listopadno je stablo iz porodice ružičnjača (lat. *Rosaceae*) čiji su plodovi složeni i jezgričavi (Anonymous 1, 2017). Najrasprostranjenije je kultivirano voće, a na svijetu prema nekim navodima nekih autora trenutno postoji preko 10000 sorti jabuka. Spada u klimakterijsko voće te se samim skladištenjem pod kontroliranim uvjetima trajnost svježe jabuke produžuje i do 12 mjeseci (Stajniko, 2015). Osim u svježem obliku, jabuka se na tržištu može pronaći i prerađena. Od proizvoda na bazi jabuke najčešće se susrećemo sa sokom od jabuke i s jabučnim cider-om (15,7 % ukupnih proizvoda), no od jabuka se proizvode i džemovi, pite, kolači i mnogi drugi termički ili netermički obrađeni proizvodi (Rieger, 2017).

Samo stablo jabuke doseže visine od 1,8 m do 4,6 m, a kod divljih sorti i do 10 m. Listovi su tamno zelene boje, ovalnog oblika s nazubljenim rubovima. Donji dio lista prekriven je vunastim dlačicama, a sam raspored između listova je naizmjeničan. Cvijet jabuke sastavljen je od 5 bijelo ružičastih latica, promjera od 4 do 6 cm koji je potrebno oprašiti kako bi se dobio plod jabuke. Samooprašivanje cvjetova nije moguće te se najčešće prilikom oprašivanja koriste pčele koje prenose polen. Nakon 3 do 5 godina pupanja dolazi do formiranja ploda, no kod nekih sorti i ranije. Boja, okus, izgled te mnoge druge morfološke i fiziološke karakteristike i fizikalno kemijska svojstva ploda značajno ovise o sortimentu (Rieger, 2017).

S obzirom na agroekološke uvjete uzgoja, parametri od značaja za uzgoj jabuke su temperatura, vlažnost te kvaliteta i vrsta tla. Temperature koje su poželjne za vrijeme vegetacije jabuka iznose 14-19 °C, no bez težih posljedica podnosi vrlo niske (od -25 do -28 °C) i vrlo visoke temperature (35 °C). Uzgoju također pogoduje umjerena relativna vlažnost (60 %) te pjeskovito-ilovasta blago kisela tla (pH 5,5-6,5). Na uzgoj nepovoljno utječu suhi i topli vjetrovi za vrijeme oprašivanja te tuča u bilo kojem stadiju vegetacije (Anonymous 2, 2017).

Prema FAOSTAT podacima država s najvećom proizvodnjom jabuka u svijetu je Kina, koja prosječno godišnje proizvede preko 25 milijuna tona jabuke. Usporedno s Kinom koja je 2014. proizvela preko 40 milijuna tona jabuke, Hrvatska je u istom periodu proizvela nešto više od 100 tisuća tona. No s obzirom na površinu voćnjaka takav odnos je očekivan.

Naime, površine voćnjaka u Kini zauzimaju preko 2 milijuna hektara, dok u Hrvatskoj površine zasađene jabukom zauzimaju svega 5944 hektara (Slika 1) (FAOSTAT, 2017).



**Slika 1.** Prikaz broja zasađenih površina (ha) te godišnje proizvodnje (t) jabuka u Hrvatskoj od 1994. do 2014. godine (FAOSTAT, 2017)

### 2.1.1. Kemijski sastav jabuke

Kemijski sastav ploda jabuke varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima uzgoja, podneblju uzgoja te o stupnju zrelosti samog ploda, no sam sastav iznimno je složen što je u direktnoj vezi s prehrambenim značajem jabuke. Najveći udio čini voda, na koju otpada oko 85 % ukupne mase, a ostatak čini suha stvar sastavljena od brojnih makro i mikro nutrijenata (Tablice 1.) od kojih su najzastupljeniji ugljikohidrati (13,81 %) (USDA, 2017). Osim navedenih, plod jabuke sadrži i neznatne količine proteina (0,26 %) i lipida (0,17 %), a obiluje vlaknima topljivim u vodi (2,4 %) od kojih posebno treba istaknuti pektin. Znanstveno je dokazano kako pektin pomaže u kontroli razine inzulina usporavajući oslobađanje šećera u krvotoku (niski glikemijski indeks). Osim toga smanjenim izlučivanjem inzulina utječe se i na snižavanje razine kolesterola u krvi (Chang, 2017). Na 100 g ploda jabuke od ugljikohidrata najveći dio otpada na šećer fruktozu (5,90 g), a preostale šećere čine glukoza (2,43 g) i saharoza (2,07 g), dok je udio škroba u plodu jabuke neznatan (0,05 g) (USDA, 2017).

Udio aminokiselina u plodu nije značajan, a najzastupljenije su (na 100 g ploda): asparaginska kiselina (0,070 g), glutaminska kiselina (0,025 g), leucin (0,013 g), lizin (0,012 g), valin (0,012 g), alanin (0,011 g) i serin (0,010 g). Od zasićenih masnih kiselina najzastupljenija je palmitinska (0,024 g), a u manjem udjelu sadrži i zasićenu stearinsku (0,003 g) i miristinsku kiselinu (0,001 g). Količina nezasićenih masnih kiselina neznatno je

veća i iznosi 0,058 g na 100 g ploda jabuke (od čega 0,043 g linolne, 0,009 g linoleinske i 0,007 g oleinske masne kiseline) (USDA, 2017).

**Tablica 1.** Mineralni i vitaminski sastav jabuke na 100 g ploda (USDA, 2017)

MINERALI		VITAMINI	
Kalcij	6 mg	Vitamin C	4,6 mg
Željezo	0,12 mg	Vitamin B6	0,041 mg
Magnezij	5 mg	Vitamin A	3 µg
Fosfor	11 mg	Vitamin E (α-tokoferol)	0,18 mg
Kalij	107 mg	Vitamin K	2,2 µg
Natrij	1 mg	Niacin	0,091 mg
Cink	0,04 mg	Riboflavin	0,026 mg
Bakar	0,027 mg	Tiamin	0,017 mg
Mangan	0,035 mg	Pantotenska kiselina	0,017 mg
Fluor	3,3 µg	β-karoten	27 µg

### 2.1.2. Fenolni sastav jabuke

Fenolni spojevi, sekundarni su biljni metaboliti, topljivi u vodi i staničnom soku, a biljkama služe kao zaštita od vanjskih štetnih učinaka. Osim pozitivnog učinka kod biljaka, fenolni spojevi od velikog su biološkog značaja i za ljudski organizam. Pozitivno utječu na zdravlje djelujući pri tom antioksidacijski, antikancerogeno, antibakterijski, antimutageno, antialergijski, protuupalno i dr. (Tu i sur., 2016; Biedrzycka i Amarowicz, 2008). Prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na: fenolne kiseline, flavonoide i na neflavonoidne polifenole. Zastupljenost i udio pojedinog fenolnog spoja u jabuci ovisi o više čimbenika, a najvažniji su sorta, stupanj zrelosti, način kultiviranja, područje uzgoja te uvjeti skladištenja (Begić-Agakić i sur., 2011; Rössle i sur., 2010). Od fenolnih kiselina u jabuci su zastupljeni derivati hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina, dok su od flavonoida zastupljeni spojevi iz skupina antocijana (u kori), zatim flavonola te flavanola. Osim fenolnih kiselina i flavonoida u jabuci su pronađeni i neflavonoidi polifenoli iz skupine dihidrohalkona (Phenol-Explorer, 2017). Najzastupljenije fenolne skupine u jabuci s pripadajućim sastavnicama dane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Fenolni sastav ploda jabuke (mg/100 g ploda) (Phenol-Explorer, 2017)

FENOLNE KISELINE			FLAVONOIDI			
Hidroksibenzojeve kiseline	Siringinska kiselina	0,90	Antocijani	Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid	0,06	
	Hidroksicimetne kiseline	4-kafeoilkina kiselina		0,54	Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid	0,81
4- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina		2,25		Cijanidin-3- <i>O</i> -ksilozid	0,06	
5-kafeoilkina kiselina		13,37	Flavanoli	(+)-Katehin	1,22	
5- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina		1,05		(-)-Epikatehin	8,37	
Hidroksicimetne kiseline	Kafeinska kiselina	0,33	Flavonoli	dimerni procijanidin B2	14,56	
	Ferulinska kiselina	0,07		Kvercetin	0,13	
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,27		Kvercetin-3- <i>O</i> -arabinozid	1,40	
				Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	2,36	
				Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,64	
				Kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid	1,33	
				Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0,22	
				Kvercetin-3- <i>O</i> -ksilozid	0,78	
<b>NEFLAVONOIDNI POLIFENOLI</b>						
Dihidrohalkoni	3-hidroksifloretin 2'- <i>O</i> -glukozid	0,11				
	Floretin 2'- <i>O</i> -ksilozil -glukozid	2,58				
	Floridzin	2,69				

### 2.1.3. Sok od jabuke

Prema statističkim podacima za 2016. godinu, ukupna količina proizvedenog voćnog soka od jabuke na području EU iznosi oko 2,1 milijardu litara soka (Statista, 2017). Nadalje, European fruit Juice Association (AIJN) je u izvještaju za 2017. godinu objavila da je posljednjih 5 godina proizvodnja voćnih sokova (koji se ne proizvode iz koncentrata) dosegla rast od 5,4 %, kao i proizvodnja svježe cijedenih sokova (4,8 %), dok je proizvodnja nektara i ostalih vrsta sokova u padu za 3,8 %, odnosno 1,6 %. Na EU tržištu u 2016. godini, najveći

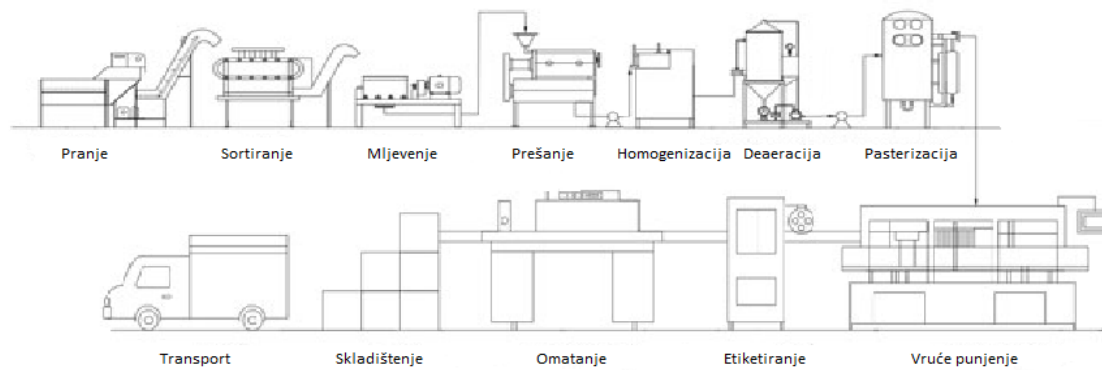
potrošač voćnih sokova bila je Njemačka (2,361 milijun litara), a slijede ju Francuska (1,415 milijun litara) te Velika Britanija (1,116 milijuna litara). Podaci za Hrvatsku jasno pokazuju da je potrošnja kupovnih voćnih sokova u padu (-2,6 %), dok je evidentan rast potrošnje voćnih sokova (12,4 %) u proizvodnji srednjih i malih proizvođača (AIJN, 2017). Stoga, potražnja za „svježim“ voćnim sokovima u stalnom je porastu, a potrošači zahtijevaju da voćni sokovi osiguraju adekvatan nutritivni unos kao i obrok od voća.

Prema Pravilniku (NN 48/2013) o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju, voćni sok predstavlja proizvod od jestivog dijela voća, a ima boju, aromu i okus karakterističan za sok od voća od kojega potječe. Sokovi od iste vrste voća međusobno se razlikuju prema veličini i topljivosti čestica te se prema tome dijele na bistre, mutne i kašaste sokove. Po definiciji bistri sok je potpuno bistar, dobiven bistrenjem i filtriranjem matičnog soka. Za razliku od bistrih, mutni ili opalescentni sokovi sadrže fino dispergirane koloidne čestice iz stanica voćnog tkiva i dobivaju se prešanjem i centrifugiranjem. Bez obzira na vrstu soka, svi sokovi imaju približno istu topljivu suhu tvar koja težinski iznosi 11 % odnosno 11 °Bx (stupnjevi Brix-a) i udio suhe tvari voća u suhoj tvari voćnog soka od 100 % (Lovrić i Piližota, 1994).

Tehnološki proces proizvodnje voćnog soka od jabuke započinje prihvatom sirovine te pranjem i probiranjem plodova. Mljevenje, odnosno usitnjavanje plodova u mlinovima-čekićarima sljedeći je korak kojim se iz cijelih plodova dobiva voćna pulpa odnosno voćna kaša. Tako pripremljena kaša od jabuka podvrgava se procesu prešanja bilo hidrauličkim, vijčanim, tračnim ili pneumatskim prešama. Po završetku prešanja dobije se mutni sok, koji se procesima bistrenja u užem smislu može prevesti u bistri sok. Bistrenje u užem smislu podrazumijeva depektinizaciju, koja se odvija uz prisutnost pektolitičkih enzima (45-55 °C/ 1-2 h), zatim bistrenje, dekantiranje, centrifugiranje i filtriranje. Bistrenjem se postiže stabilnost bistrih sokova i samim time sprječava pojava naknadnog zamućenja. Tako proizvedeni bistri sok deaerira se i pasterizira pri čemu se po završetku može odmah puniti u adekvatnu ambalažu i plasirati na tržište ili se može skladištiti u tankovima do naknadne dorade.

Za razliku od bistrih, mutni sokovi se ne depektiniziraju, niti se bistre u užem smislu, a također se niti ne filtriraju. Nakon postupka prešanja, a u svrhu stabilizacije, mutni sokovi se ili centrifugiraju, kako bi se uklonile veće čestice iz soka, ili grubo filtriraju. Čestice mutnog soka takvih su svojstava i dimenzija da se obično ne talože, čime se dodatno osigurava stabilnost tijekom skladištenja. Homogenizacija soka postiže se u visokotlačnim homogenizatorima pri tlakovima od 100 bara. Sok prolazi kroz uske otvore sapnica pod tlakom, prilikom čega se postiže veća usitnjenost i ujednačenost čestica, a samim time i

stabilnost mutnog soka. Homogenizirani mutni sok se deaerira i pasterizira te puni ili skladišti ovisno o zahtjevima na tržištu (Lovrić i Piližota, 1994). Shematski prikaz proizvodne linije za proizvodnju mutnog soka od jabuke dan je na slici 2.



**Slika 2.** Proizvodna linija mutnog soka od jabuke (prema TICO, 2017)

#### 2.1.4. Stabilnost fenolnih spojeva soka od jabuke

Polifenolni spojevi najvažniji su antioksidansi prirodno prisutni u plodu jabuke (Kolniak-Ostek i sur., 2014). Osim što neutraliziraju djelovanje prisutnih štetnih radikala u organizmu (Tsao i sur., 2005), pripisuju im se i brojni drugi pozitivni fiziološki učinci na zdravlje (Shahidi i sur., 2015). Ipak, obzirom na kemijsku strukturu, vrlo su nestabilni tijekom prerade i/ili obrade namirnica te skladištenja, stoga je važno utvrditi njihovu stabilnost tijekom proizvodnog procesa i/ili skladištenja te definirati utjecaj kritičnih čimbenika utjecaja kao što su temperatura, vrijeme tretmana/skladištenja, prisutnost kisika, svjetla itd.

Sulaiman i sur. (2017) uspoređivali su utjecaj pasterizacije (75 °C, 20 min) i novijih tehnika obrade poput termosonifikacije (TS) (1,3 W/mL, 58 °C, 10 min) i pulsirajućeg električnog polja (PEP) (24,8 kV/cm, 60 pulseva, 53,8 °C, 169 μs) na stabilnost bioaktivnih spojeva u bistrom soku od jabuke tijekom skladištenja 30 dana na temperaturama 3 °C i 20 °C. Dobiveni rezultati pokazuju neznatan utjecaj TS i PEP-a na antioksidacijsku aktivnost, dok je utjecaj pasterizacije značajno utjecao na smanjenje antioksidacijske aktivnosti (s početne vrijednosti od 86 % na 67 %,  $p < 0,05$ ). Smanjene antioksidacijske aktivnosti uslijed toplinske obrade dokazano je i u istraživanju Aguilar-Rosas-a i sur. (2007) gdje je u toplinski tretiranim (90 °C, 30 s) uzorcima bistrih sokova od jabuke uočen značajan pad koncentracije fenola za 32,2 % u odnosu na netretirane uzorke. Slične rezultate dobili su Spanos i Wrolstad (1992) koji su uočili smanjene koncentracije fenola za 50 % u toplinski (80 °C, 15 min) obrađenom



soku od jabuke. Rezultati dobiveni istraživanjima stavljaju naglasak na primjenu nižih temperatura obrade u svrhu sprječavanja degradacije bioaktivnih spojeva.

Generalno, količina pojedinih fenolnih spojeva može se značajno povećati tijekom procesa prešanja i procesa bistrenja (Ramos-Aguilar i sur., 2017). Objašnjenje tomu dali su Kammerer i sur. (2014) koji smatraju kako povećanje koncentracije može biti posljedica toplinskog i enzimskog oslobađanja fenola iz vlakana tijekom proizvodnog procesa. U istraživanju kojeg su proveli Ramos-Aguilar i sur. (2017) proizvodnja soka od jabuke sorte Zlatni Delišes odvijala se u sljedećim koracima: prešanje (uz prethodno tretiranje pektin liazama 25 °C, 60 min), pasterizacija (90 °C, 60 s), bistrenje upotrebom enzima (poligalakturonaze, pektinaze i glukoamilaze na temp. od 50 °C, 100 min) i ultrafiltracijom (spiralnom ultrafiltracijskom membranom s prilagođenim MWCO- Molecular Weight Cut-Off od 100 kDa) te naposljetku dvostupanjsko koncentriranje (55 °C, 23 min i 70 °C, 60 min). Rezultati pokazuju povećanje koncentracije klorogenske, kafeinske i *p*-kumarinske kiseline nakon procesa pasterizacije i bistrenja za 34-109 %. Razlike u koncentracijama flavan-3-ola nakon pasterizacije i bistrenja veće su u odnosu na koncentraciju cimetine kiseline iz čega možemo zaključiti kako je stabilnost flavan-3-ola pri temperaturi od 90 °C manja u odnosu na stabilnost cimetine kiseline pri istoj temperaturi. Prosječno povećanje koncentracija epikatehina i procijanida B2 iznosilo je od 52 % do čak 163 %. Koncentracija kvercetin glikozida nije se značajno mijenjala tijekom različitih faza proizvodnog procesa, a detekcija kvercetin aglikona u bistrom soku rezultat je hidrolize glikozidne forme enzimatskim bistrenjem (Ramos-Aguilar i sur., 2017).

Suprotno rezultatima navedenog istraživanja, neke su studije pokazale kako se udio fenola nakon bistrenja spiralnom ultrafiltracijskom membranom MWCO od 30 do 30 kDa smanjio za 4-45 % u odnosu na mutni sok od jabuke (Gökmen i sur., 2001). Prema tome može se zaključiti kako i sam odabir ultrafiltracijske membrane može utjecati na količinu fenolnih spojeva u finalnom proizvodu. Slično kao i Ramos-Aguilar i sur. (2017), Spanos i sur. (1990) utvrdili su pozitivan učinak povišene temperature na ekstrakciju fenolnih spojeva u uzorku soka od jabuke. Naime, povišenjem temperature od 55 °C do 73 °C značajno se pospješila ekstrakcija cimetine kiseline (prosječno od 3 % do 222 %). Dobru stabilnost cimetine kiseline pri povišenoj temperaturi autori pripisuju inaktivaciji enzima polifenoloksidaze (PPO). U svom su istraživanju također uočili povećanje koncentracije flavan-3-ola (od 109 % do 286 %) tijekom procesa pasterizacije i bistrenja. Razlog tomu može biti utjecaj visoke temperature na hidrolizu veza unutar flavonoidnih kompleksa pri čemu dolazi do povećanja koncentracije monomernih i dimernih jedinica, epikatehina i procijanidina B2. Osim toga djelovanjem

enzima, u fazi bistrenja pospješuje se oslobađanje procijanidina iz strukture procijanidin-polisaharid (pektin u najvećoj mjeri) (De Paepe i sur., 2014; Oszmianski i sur., 2011).

Ispitivanjem utjecaja temperature (4 °C vs. 20 °C) tijekom mjesec dana skladištenja soka od jabuke (prethodno pasteriziranih pri 90 °C, 30 s) Van Der Sluis i sur. (2005) nisu utvrdili značajne razlike u koncentraciji kvercetin glikozida, katehina, klorogenske kiseline, floridzina te cijanidin galaktozida između sokova skladištenih na temperaturi od 4 °C i sokova skladištenih na +20 °C, što upućuje da temperatura skladištenja značajno ne utječe na biološki sastav soka od jabuke. Do sličnih su rezultata došli Sulaiman i sur. (2016) koji su uočili neznatnu razliku u antioksidacijskoj aktivnosti između bistrih sokova od jabuke prethodno toplinski obrađenih (75 °C, 20 min) i potom skladištenih tijekom 30 dana na temperaturama 3 °C i 20 °C. Antioksidacijska aktivnost neposredno nakon pasterizacije iznosila je prosječno 67 %, dok je ista izmjerena za sok skladišten na 3 °C prosječno iznosila 57 % te 51 % za sok skladišten na 20 °C.

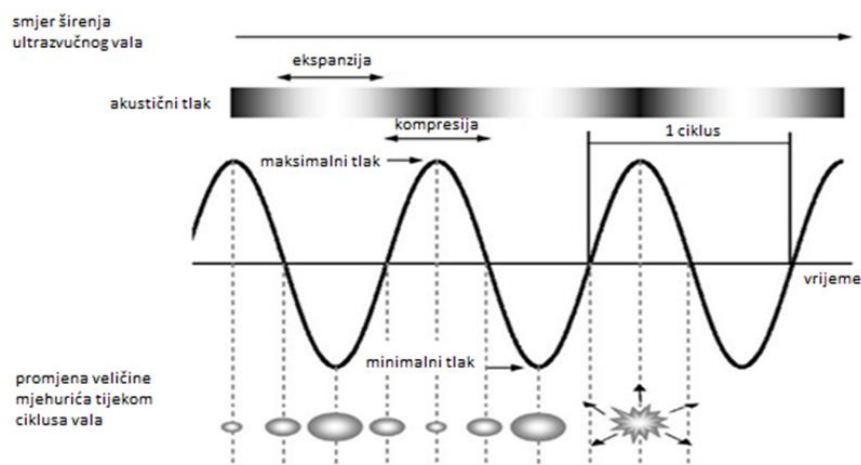
## **2.2. ULTRAZVUK**

Povećanjem osviještenosti i educiranosti potrošača o važnosti pravilne prehrane, povećava se i potreba za novim načinima prerade i/ili obrade hrane koji bi uz zadovoljavajuću zdravstvenu ispravnost istovremeno osigurali i veću biološku te nutritivnu vrijednost. Naime, novim tehnikama konzerviranja hrane pokušavaju se zamijeniti i/ili unaprijediti dosad već postojeće tehnike, stoga se danas razvijaju i ispituju različite metode, a jedna od novijih netoplinskih postupaka obrade hrane jest postupak obrade ultrazvukom (UZV), koji poprima i sve veći industrijski značaj (Priyadarshini i sur., 2018).

Ultrazvuk je oblik energije koju stvara zvuk, valova frekvencije viših od praga osjetljivosti za ljudsko uho, odnosno frekvencija viših od 16 kHz (Jayasooriya i sur., 2004). Ovisno o rasponu frekvencija, ultrazvuk se može podijeliti na: dijagnostički ultrazvuk (1-10 MHz), ultrazvuk visoke frekvencije (100 kHz-1 MHz) s niskim intenzitetom (0,1-1 Wcm<sup>-2</sup>) te na ultrazvuk visoke snage (ultrazvuk visokog intenziteta) s frekvencijama od 20 do 100 kHz i visokih intenziteta (10-1000 Wcm<sup>-2</sup>) (Ashokkumar i Kentish, 2011). U svrhu netoplinske obrade namirnica koristi se ultrazvuk visokih intenziteta, dok se ultrazvuk visokih frekvencija (niskih intenziteta) koristi u mjerenjima teksture, sastava, viskoznosti ili koncentracije tvari u hrani. Ultrazvuk visokog intenziteta uvelike se aplicira pri procesima kao što su emulgiranje, homogenizacija, ekstrakcija, otplinjavanje te pasterizacija (koriste se znatno niže

temperature). Posljedično dolazi do uklanjanja pjene, smanjenja veličine čestica te promjeni viskoznosti namirnica (Lorimer i sur., 1996). Parametri ultrazvuka koji pri tome utječu na sam proces obrade su frekvencija, akustična snaga, radni ciklus, amplituda te vrijeme primjene ultrazvuka (Wang i sur., 2006).

Stvaranje ultrazvuka visokog intenziteta provodi se jednim od sljedećih načina: pokretanjem tekućine, mlazom plina te pomoću električne snage koja se najčešće upotrebljava u prehrambenoj industriji (Režek Jambrak i sur., 2010). Uslijed promijene tlakova nastalih od strane ultrazvučnih valova u tekućini dolazi do stvaranja akustične kavitacije koja može biti prijelazna (uslijed ultrazvuka visokih intenziteta) ili stabilna (uslijed ultrazvuka niskih intenziteta) (Mason, 2003). Kada zvučni val u procesu sonifikacije dođe do tekućeg medija dolazi do stvaranja longitudinalnih valova, pri čemu nastaju izmjenične regije kompresije i ekspanzije (Lauterborn i Mettin, 2015). Tijekom ekspanzije nastali mjehurići imaju veću površinu, čime se posljedično povećava i difuzija plina što u konačnici rezultira rastom mjehurića zraka. Nizom izmjeničnih ciklusa kompresije i ekspanzije, mjehurići zraka postižu kritičnu veličinu uslijed koje energija zvuka više ne može zadržavati plinovitu fazu te u sljedećem ciklusu kompresije para kondenzira, a mjehurići zraka implodiraju (Slika 3.). Dolazi do snažnog sudaranja kondenziranih molekula što dovodi do stvaranja šok valova. Udarni valovi stvaraju “vruće točke”, lokalizirana područja vrlo visoke temperature (5500 °C) i tlaka (50 MPa) (Karlović i sur., 2014; Bosiljkov i sur., 2011). Dugo se smatralo kako upravo ovaj fenomen prijelazne kavitacije jest glavni letalni mehanizam ultrazvuka (Jeličić i sur., 2010; Sala i sur., 1995).



**Slika 3.** Prikaz izmjeničnih regija kompresije i ekspanzije te rasta i implodije mjehurića zraka uslijed ultrazvučne kavitacije (Soria i Villamiel, 2010)

### 2.2.1. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u industriji voćnih sokova

Industrija prerade voća i povrća posljednjih se godina sve više unaprjeđuje i okreće proizvodnji visoko kvalitetnih i sigurnih proizvoda upotrebom tehnika minimalnog procesiranja. U preradi voćnih sokova, toplinske tehnologije konzerviranja poput pasterizacije i sterilizacije uobičajeno se koriste, a kombinacija vremena i temperature izravno su povezane s gubitkom fitonutrijenata, organoleptičkih svojstava te razvoja nekih drugih nepoželjnih promjena u voćnim sokovima (Abid i sur., 2013). Stoga se danas brojna istraživanja okreću ispitivanju primjene novih netoplinskih tehnologija prerade, posebno onih koji koriste niže temperaturne tretmane u kraćem vremenskom intervalu. U tom kontekstu, prerada voćnih sokova s ultrazvukom visokog intenziteta, u usporedbi s klasičnom pasterizacijom, mogla bi pridonijeti većem očuvanju bioloških i nutritivnih svojstava namirnice, jamčeći pri tome mikrobiološku sigurnost i stabilnost (Rodrigues i Fernandes, 2016).

### 2.2.2. Mikrobiološka stabilnost sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta

Niski pH proizvoda na bazi voća kao što su voćni sokovi, pogoduje rastu acidorezistentnih bakterija, kvasaca i plijesni te ujedno čine tri glavne skupine mikroorganizama koji uzrokuju kvarenja voćnih sokova (Tribst i sur., 2009). Zadnjih 30 godina, zabilježena je pojava i acidotermofilnih bakterija *Alicyclobacillus spp.* (Režek Jambrak i sur., 2018). Iako navedena bakterija predstavlja izazov u pasterizaciji voćnih sokova, kvasci te bakterije mliječne kiseline predstavljaju značajan izazov u sanitaciji procesne opreme i proizvodnog objekta (Chang i Kang, 2004). Inaktivacija mikroorganizama ultrazvukom pokazuje različite rezultate ovisno o veličini, obliku te vrsti samog mikroorganizama (Gracin i sur., 2016). Prema dostupnim podacima iz literature, velike stanice pokazuju viši stupanj inaktivacije od manjih. Nadalje bakterijski *cocci* osjetljiviji su od bakterija štapića. Gram pozitivne bakterije otpornije su od gram negativnih bakterija, a anaerobne bakterije otpornije su od aerobnih bakterija (Herceg i sur., 2012). Slobodni radikali nastali uslijed kavitacije u vodenom medijima utječu na inaktivaciju odabranih mikroorganizama, što se može pripisati staničnim proteazama i ATP pumpama ( $H^+$  ionima) (Režek Jambrak i sur., 2018).

Wang i sur. (2010) su na inokuliranom soku od jabuke promatrali utjecaj UZV (200, 400 i 600 W, 25 kHz, D=6 mm, 1, 5, 10, 20 i 30 min, 50 °C) na stopu preživljavanja bakterija *Alicyclobacillus acidiphilus* i *Alicyclobacillus Acidoterrestris*. Primjenom UZV 200 W,30

min stopa preživljavanja za bakteriju *A. acidiphilus* iznosila je -2,69 log, odnosno -3,71 log za bakteriju *A. acidoterrestris*. Stopa preživljavanja bila je niža u odnosu na uzorke tretirane UZV 200 W, 1 min (-0,5 i -0,11 log) odnosno veća u odnosu na uzorke tretirane UZV 600 W, 30 min (-4,21 i -4,56 log). Istraživanjem je dokazano kako se povećanjem snage i vremena sonifikacije povećava i bakterijska inaktivacija roda *Alicyclobacillus spp.* u soku od jabuka. Nasuprot tomu, spore bakterija *A. acidoterrestris* značajno su izdržljivije te nije uočeno smanjenje broja spora u svježe prešanom i kupljenom soku od jabuke ni nakon 30 min sonifikacije (600 W, 20 kHz, D=8 cm, A=95.2  $\mu$ m, 30 min, 20, 30 i 44  $\pm$  1  $^{\circ}$ C) (Ferrario i sur., 2015).

Broj vegetativnih stanica *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Rhodotorula sp.* i *Saccharomyces cerevisiae* u soku od jabuke najčešće se smanjuje djelovanjem UZV visokog intenziteta (600 W, 20 kHz, D=12,7 mm, A=60, 90 i 120  $\mu$ m, 2,3,6 i 9 min, 20,40,60 i 80  $^{\circ}$ C). Suprotno tomu, kod nekih uzoraka ipak nije uočen pad broja vegetativnih stanica. Najveći log redukcije za plijesan *A. ochraceus* (4,444 log (CFU/mL)) uočen je nakon tretmana UZV pri uvjetima 60  $\mu$ m, 9 min, 20  $^{\circ}$ C, a najbolji rezultati redukcije rasta za plijesni *P. expansum* (4,262 log (CFU/mL)) i *Rhodotorula sp.* (5,193 log (CFU/mL)) dobiveni su nakon tretmana UZV pri uvjetima 60  $\mu$ m, 3 min, 60  $^{\circ}$ C. Nadalje, smanjenje broja vegetativnih stanica od 5,152 log (CFU/mL) za kvasac *S. cerevisiae* uočen je pri tretmanu UZV i uvjetima od 120  $\mu$ m, 9 min, 60  $^{\circ}$ C (Režek Jambrak i sur., 2018). Znanstvenici pretpostavljaju kako je inaktivacija kvasaca i plijesni uglavnom posljedica kombiniranog djelovanja fizikalnih i kemijskih mehanizama koji se javljaju uslijed nastanka ultrazvučne kavitacije. Budući da su stanice tih mikroorganizama relativno čvrste i nije ih lako razoriti isključivo kavitacijskim učinkom, pretpostavlja se kako je rezultat inaktivacije stvaranje slobodnih radikala (vodikov peroksid) i otpuštanje unutarstaničnog proteina (Gracin i sur., 2016).

U radu Zhu i sur. (2017) cilj je bio procijeniti učinak tretmana toplinske obrade (HT), termosonifikacije (TS) te manotermosonifikacije (MTS) na stopu preživljavanja vegetativnih stanica bakterije *Escherichia coli* O157:H7 u soku od borovnice. Konkretno, uzorci su tretirani sljedećim tretmanima: HT (80  $^{\circ}$ C), TS (560 W, 40 kHz, 5 min, 40  $^{\circ}$ C) te MTS (560 W, 350 MPa, 5 min, 40  $^{\circ}$ C). Očekivano, uzorci tretirani HT značajno su rezultirali smanjenjem broja vegetativnih stanica *E. coli* O157: H7 (2,00 log (CFU/mL)). Nešto lošija inaktivacija uočena je primjenom TS (0.17 log (CFU/mL)), dok je inaktivacija MTS tretmanom (5.85 log (CFU/mL)) značajno bolja u odnosu na prethodno navedene tretmane. Ovom studijom znanstvenici su zaključili kako kombinacija ultrazvuka, visokog tlaka i blage toplinske obrade najviše doprinose mikrobiološkoj sigurnosti sokova od borovnice.

### 2.2.3. Fizikalna svojstva sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta

Mutnoća soka značajan je parametar kvalitete voćnih i povrtnih sokova. Obzirom da su sokovi smjesa celuloze, hemiceluloze, pektina, organskih kiselina i proteina, stabilnost mutnoće važna je ne samo za boju i okus, već i za organoleptičku vrijednost finalnog proizvoda (Beveridge, 2002; Baker i Cameron, 1999). U odnosu na kontrolni netretirani uzorak soka od kruške, značajno poboljšanje vrijednosti mutnoće uočeno je u svim sonificiranim (750 W, 30 kHz, D=12,7 mm, A=70 %, 10 min, 25,45 i 65 °C) i pasteriziranim (95 °C, 5 min) uzorcima. Suprotno tomu, kod svih uzoraka tijekom skladištenja (21 dan, 4 °C) došlo je do pada navedene vrijednosti. Najbrže smanjenje tijekom skladištenja uočeno je u kontrolnom uzorku (s vrijednosti od 1,08 na 0,70 nakon 9 dana skladištenja), dok je najsporiji pad vrijednosti uočen kod UZV (65 °C) tretiranog uzorka (s vrijednosti od 1,41 na 0,97 21. dana skladištenja) (Saeeduddin i sur., 2017). Do sličnih rezultata došli su Abid i sur., (2015) koji su u radu promatrali utjecaj UZV (750 W, 20 kHz, D=12,7 mm, A=30,60 i 90 %, 3 min, 20 °C) na vrijednosti mutnoće soka od jabuke kroz 30 dana skladištenja (4 °C). Dobiveni rezultati u skladu su s prethodno navedenim radom. Zaključno, poboljšane vrijednosti mutnoće u tretiranim uzorcima (UZV) rezultat su cijepanja makromolekula u mikro molekule pod visokotlačnim gradijentom kavitacije nastale tijekom tretmana UZV (Cheng, i sur., 2007; Seshadri i sur., 2003).

Vezano uz ukupnu topljivu suhu tvar, rezultati dobiveni nakon tretmana UZV (750 W, 20 kHz, D=12,7 mm, A=30,60 i 90 %, 3 min, 20 °C) ne pokazuju značajnu promjenu u uzorcima soka od jabuke bez obzira na primijenjenu amplitudu i vrijeme skladištenja (0, 7, 15, 21, 30. dan, 4 °C). Nadalje, nakon tretmana UZV nije uočen značajan utjecaj na pH i kiselost, no uslijed 21 dnevnog skladištenja uočen je porast pH i lagano smanjenje kiselosti (Abid i sur., 2015). Rezultati dobiveni nakon 21 dnevnog skladištenja nisu u skladu ranijim istraživanjima (Zafra-Rojas i sur., 2013; Abid i sur., 2013; Santhirasegaram i sur., 2013; Gao i Rupasinghe, 2012; Bhat i sur., 2011; Adekunle i sur., 2010a). Kao objašnjenje, znanstvenici navode kako do smanjenje kiselosti potencijalno dolazi uslijed kisele hidrolize polisaharida kod koje se kiselina troši za prevođenje nereducirajućih šećera u reducirajuće (Bhardwaj i Pandey 2011).

#### 2.2.4. Nutritivni sastav sokova obrađenih ultrazvukom visokih intenziteta

Askorbinska kiselina poznatija kao vitamin C, najvažniji je vitamin u ljudskoj prehrani koji se u najvećoj mjeri unosi voćem i povrćem (Hernandez, i sur., 2006). Izvrstan je antioksidans i kofaktor, uključen u veliki broj enzimskih aktivnosti (Arrigoni i De Tullio, 2002). U istraživanju, Abid i sur. (2015) navode da tretman UZV (750 W, 20 kHz, D=12,7 mm, A=30,60 i 90 %, 3 min, 20 °C) pozitivno djeluje na stabilnost askorbinske kiseline u soku od jabuke. Neovisno o primijenjenoj amplitudi svi tretirani uzorci sadržavali su veći udio askorbinske kiseline u odnosu na kontrolni uzorak. No, neovisno o primijenjenom tretmanu vrijednosti askorbinske kiseline smanjivale su se tijekom vremena skladištenja. Djelovanjem UZV pri amplitudi od 90 % sok od jabuke zadržao je 84,47 % askorbinske kiseline nakon 30 dnevnog skladištenja (4 °C). Zaključno, povećanje askorbinske kiseline u soku od jabuka moglo bi se pripisati uklanjanju otopljenog kisika uslijed djelovanja kavitacije, obzirom je kisik uz povišenu temperaturu glavni uzrok degradacije askorbinske kiseline u voćnim sokovima (Adekunte i sur., 2010b; Cheng i sur., 2007; Knorr i sur., 2004). Suprotno tomu, neadekvatna temperatura skladištenja može biti jedan od uzroka smanjenja askorbinske kiseline tijekom skladištenja (Abid i sur. 2015).

Osim vitamina, istraživani su i utjecaji UZV na mineralni sastav voćnih sokova. U soku od jabuke, nakon tretmana UZV (2 Wcm<sup>-2</sup>, 25 kHz, 20 °C, 30 i 60 min) uočena su značajna povećanja koncentracija Na, K, Ca i Zn minerala, dok su koncentracije P, Cu i Mg manje u odnosu na kontrolni uzorak. Nadalje, porast koncentracija bio je izraženiji u uzorcima tretiranim 60 min (Abid i sur., 2014b). Smatra se kako dulje vrijeme izloženosti ultrazvuku izaziva rekombinaciju različitih struktura što posljedično dovodi do stvaranja novih spojeva i redukcije iona u tekućoj fazi (Carvalho i sur., 1995). Druga studija navodi kako ultrazvuk djeluje razorno na stranične strukture, povećavajući pritom aktivnost tvari u stanici i migraciju minerala iz stanice (Carcel i sur., 1998).

U radu Lieu i Le (2010), dokazan je pozitivan utjecaj UZV na udio reducirajućih šećera u soku od grožđa. Naime, uslijed djelovanja UZV pri uvjetima od 360 W, 35 kHz, temperaturi od 60 do 80 °C i vremenima tretmana od 5 do 15 min sadržaj reducirajućih šećera se povećao za 12,0 % u odnosu na kontrolni uzorak. U odnosu na kontrolni uzorak povećani udio saharoze (12,06 %), glukoze (3,31 %) i fruktoze (7,79 %) uočen je u tretiranim uzorcima s kraćim vremenom ekspozicije (30 min). Kod dužeg vremena obrade (60 min) povećanje udjela značajno je manje i redom iznosi: 6,15 %, 1,06 %, 1,93 %. Uslijed djelovanja UZV

povećanje sadržaja šećera može se pripisati pucanju staničnih struktura čime je omogućena bolja ekstrakcija šećere iz intracelularnih prostora (Abid i sur., 2014b).

Vezano uz koncentraciju proteina, vrijeme obrade i ultrazvučni intenzitet (75, 226, 376  $Wcm^{-2}$ , 19 kHz, D=13 mm, 2, 6, 10 min, 3-50 °C) značajno utječu na sadržaj proteina u tretiranim uzorcima soka od ananasa. U odnosu na kontrolu, veći udio bjelančevina u tretiranim uzorcima može se pripisati oslobađanju bjelančevina uzrokovanu promjenama u stanici uslijed djelovanja ultrazvuka. Suprotno navedenom, povećanjem ultrazvučnog intenziteta i vremena tretiranja (iznad 7 min i pri intenzitetima većim od 226  $Wcm^{-2}$ ), udio proteina se smanjuje. Do ove pojave dolazi kada brzina degradacije proteina nadilazi brzinu ekstrakcije istih (Costa et al., 2013).

#### 2.2.5. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stabilnost fenolnih spojeva voćnih sokova

Rezultati brojnih znanstvenih istraživanja ukazuju na pozitivne učinke UZV na prehrambenu kvalitetu namirnica, osobito proizvoda na bazi voća i povrća (Kiani i sur., 2013; Bhat i sur., 2011; Rawson i sur., 2011; Sun i Li, 2003). UZV je prepoznat kao iznimno učinkovita metoda obrade uslijed koje ne dolazi do značajnih gubitaka biološki aktivnih molekula, za razliku od termičkih postupaka, gdje je evidentirana njihova značajna redukcija. Za bolje razumijevanje utjecaja ove tehnologije na biološki sastav voćnih sokova potrebno je ispitati utjecaj/e svih relevantnih parametara procesa poput akustične snage, amplitude, temperature, vremena tretiranja te zasebno parametre skladištenja (vrijeme/temperatura).

U radu Abid i sur. (2014a) ispitivan je utjecaj UZV na fenolni sastav soka od jabuke. Uzorke su sonificirali direktnim uranjanjem sonde u uzorak (0.30  $Wcm^{-3}$ , 20 kHz, 20, 30, 60 °C, 5 i 10 min) i indirektno, sonificiranjem u ultrazvučnoj kupelji (0.06  $Wcm^{-3}$ , 25 kHz, 20, 30, 60 °C, 30 min). Svježi kontrolni sok od jabuka sadržavao je 697,49  $\mu g$  GAE/g ukupnih fenola, 436,82  $\mu g$  CE/g ukupnih flavonoida i 2,70  $\mu g$  QE/g ukupnih flavonola. U usporedbi s kontrolnim uzorkom, djelovanjem UZV (pri temperaturi od 20 °C) sve navedene vrijednosti značajno su se povećale u tretiranim uzorcima. No, kako je temperatura tretiranja porasla s 40 na 60 °C tako se i stupanj degradacije bioaktivnih spojeva povećao, što potvrđuje termolabilnost navedenih spojeva.

U ranije objavljenom radu, znanstvenici su došli do sličnih rezultata. Uzorci soka od jabuke indirektno su sonificirani u ultrazvučnoj kupelji pri uvjetima od 2  $Wcm^{-2}$ , 25 kHz, 20 °C i vremenu tretiranja od 30 i 60 min. Nakon provedenog tretmana, vrijednosti fenolnih



spojeva značajno su se povećale u odnosu na kontrolni uzorak. I to redom: klorogenska kiselina s 61,27 (0 min) na 85,82 (30 min) i 85,55 (60 min) mg/L; kafeinska kiselina s 3,08 (0 min) na 3,66 (30 min) i 3,66 (60 min) mg/L; katehin s 14,69 (0 min) na 17,58 (30 min) i 17,15 (60 min) mg/L; epikatehin s 13,49 (0 min) na 33,05 (30 min) i 31,27 (60 min) mg/L te kloridzin s 1,88(0 min) na 3,33 (30 min) i 3,32 (60 min) mg/L (Abid i sur., 2014b).

Nasuprot navedenim istraživanjima postoje i znanstveni radovi koji opisuju negativan utjecaj UZV na fenolni sastav voćnih sokova. U radu Sun i sur. (2015) ističe se nepovoljan utjecaj UZV ( $2 \text{ Wcm}^{-2}$ , 20~25 kHz, D=6 mm, 15 °C, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 min) na stabilnost fenolnih spojeva u soku od jabuke. Rezultati ovog istraživanja upućuju da su svi tretirani uzorci sadržavali manji udio ukupnih fenola i flavonoida te klorogenske kiseline u odnosu na kontrolni uzorak. Udio ukupnih fenola većinom se smanjivao tijekom djelovanja UZV. Sličan padajući trend uočen je i za koncentracije ukupnih flavonoida i klorogenske kiseline. Povećanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida te klorogenske kiseline nakon UZV tretmana pripisuju istovremenoj kombinaciji degradirajućeg i ekstrahirajućeg djelovanja UZV obzirom se djelovanjem UZV generiraju slobodni radikali i različite nabijene/nenabijene čestice koje nepovoljno utječu na stabilnost bioaktivnih spojeva.

## 3.EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 MATERIJALI

U ovom diplomskom radu za izradu eksperimentalnog dijela, odnosno za pripremu mutnog soka od jabuke korištene su jabuke sorte Zlatni Delišes nabavljene putem tvrtke Fragaria d.o.o. Do trenutka obrade, jabuke su skladištene u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Neposredno prije tretmana ultrazvukom, od jabuka je pripremljen mutni sok topljive suhe tvari 11,0 % (digitalni refraktometar ATAGO, PAL).

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Priprema soka od jabuke

U pripremi soka od jabuke korišten je sokovnik TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 (Slika 4.) snage 300 W, brzine okretaja 80 o/min i promjera filtera 0,3 mm. Prije samog prešanja jabuke su oprane, izrezane na četvrtine te im je odstranjena sjemena loža i peteljka. Princip rada sokovnika bazira se na sporo rotirajućem mehanizmu koji omogućava lagan pritisak voćnog tkiva na sita, čime se osigurava kontinuirano prešanje.



**Slika 4.** Sokovnik TEFAL Infinity Press Revolution ZC500CH38

### 3.2.2. Ultrazvučni tretman mutnog soka od jabuke

Uzorci mutnog soka od jabuke (100 mL) tretirani su ultrazvukom visokog intenziteta i niske frekvencije (30 kHz) u staklenoj čaši volumena 250 mL prema definiranom planu pokusa (Tablica 3). Uzorci su tretirani pojedinačno ultrazvučnom sondom (7 i 10 min) uronjenom do dubine od 2,5 cm u čaši s uzorkom (Slika 5.). Tijekom ultrazvučnog tretmana temperatura je mjerena infracrvenim termometrom (TROTLEC BP20) i nije prelazila 41 °C.



**Slika 5.** Ultrazvučni procesor UP 100 H (Hielscher, Njemačka)

**Tablica 3.** Plan pokusa

Opis uzorka	Šifra uzorka	Vrijeme skladištenja (dani)	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	d sonde (mm)
<b>Svježi sok</b>	S-0	0	0	0	0
<b>Tretirani sokovi</b>	UZ-1	0	40	3	7
	UZ-2	0	40	6	7
	UZ-3	0	40	9	7
	UZ-4	0	80	3	7
	UZ-5	0	80	6	7
	UZ-6	0	80	9	7
	UZ-7	0	40	3	10
	UZ-8	0	40	6	10
	UZ-9	0	40	9	10
	UZ-10	0	80	3	10
	UZ-11	0	80	6	10
	UZ-12	0	80	9	10
<b>Svježi sok</b>	S-0-7	7	0	0	0
<b>Tretirani sokovi</b>	UZ-1-7	7	40	3	7
	UZ-2-7	7	40	6	7
	UZ-3-7	7	40	9	7
	UZ-4-7	7	80	3	7
	UZ-5-7	7	80	6	7
	UZ-6-7	7	80	9	7
	UZ-7-7	7	40	3	10
	UZ-8-7	7	40	6	10
	UZ-9-7	7	40	9	10
	UZ-10-7	7	80	3	10
	UZ-11-7	7	80	6	10
	UZ-12-7	7	80	9	10

### 3.2.3. Provedba ekstrakcije

Neposredno po završetku ultrazvučnog tretmana, uzorak je podvrgnut ekstrakciji. Odvaje se 3 g uzorka (izvaganog s točnošću  $\pm 0,1$ ) te homogenizira na vorteksu s 20 mL 70 %-tnog etanola (v/v) u plastičnoj kivetici volumena 50 mL. Homogena otopina se potom ekstrahira u vodenoj kupelji ultrazvučnog uređaja frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka) pri 55 °C tijekom 15 min, nakon čega se profiltrira (Whatman International Ltd.,

Kent, UK). Filtrat se kvantitativno prenese u tikvicu volumena 25 mL i nadopuni otapalom do oznake. Dobiveni ekstrakti se skladište pri 4 °C do provedbe analiza.

#### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

##### Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01$  g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična lađica za vaganje

##### Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

Priprema: Odvaži se 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čašici te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

3. Standard galne kiseline

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

### Postupak određivanja

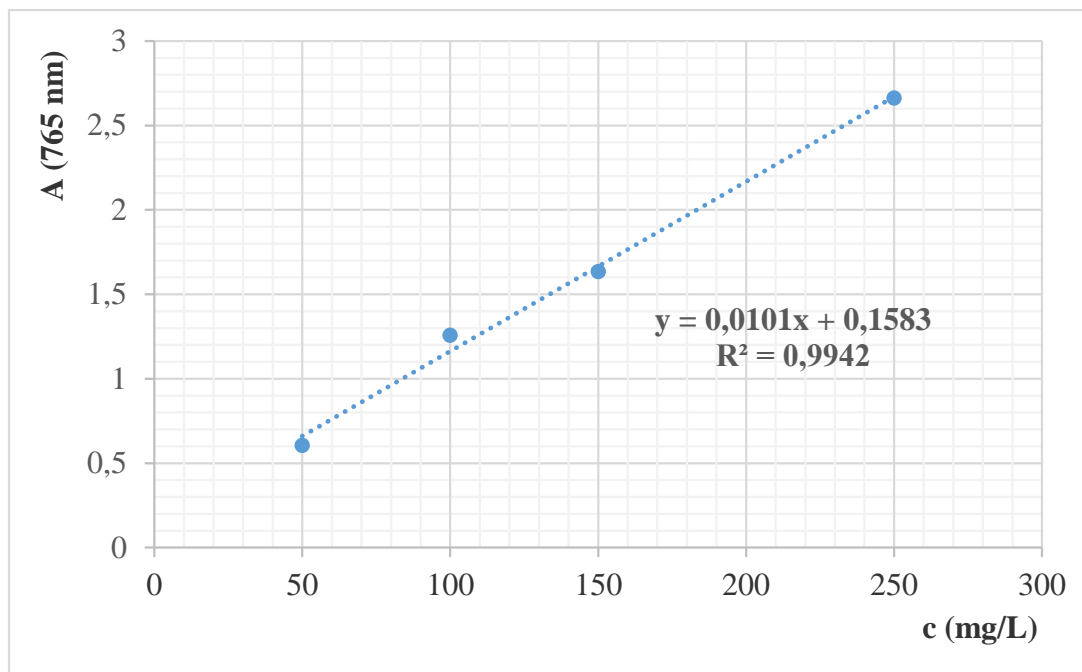
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 500  $\mu$ L ekstrakta, 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen), te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 15 min pri  $T=45$  °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

### Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 500  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10 puta razrijeđen) te nakon nekoliko min 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci se potom termostatiraju 15 min pri  $T=45$  °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 6.** Baždarni pravac galne kiseline (50-250 mg/L)

Na temelju dobivenih rezultata, jednađba pravca glasi:

$$Y = 0,0101X + 0,1583$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijskog kapaciteta spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

#### Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01$  g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
6. Epruvete
7. Stalak za epruvete
8. Plastična lađica za vaganje

#### Reagensi:

1. 100 %-tni metanol
2. 0,2 mM otopina DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0079 g 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

3. Standard Troloxa (6-hidroksi-2, 5, 6, 7, 8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (1 mM).

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2, 5, 6, 7, 8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvažuje 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150  $\mu$ M.



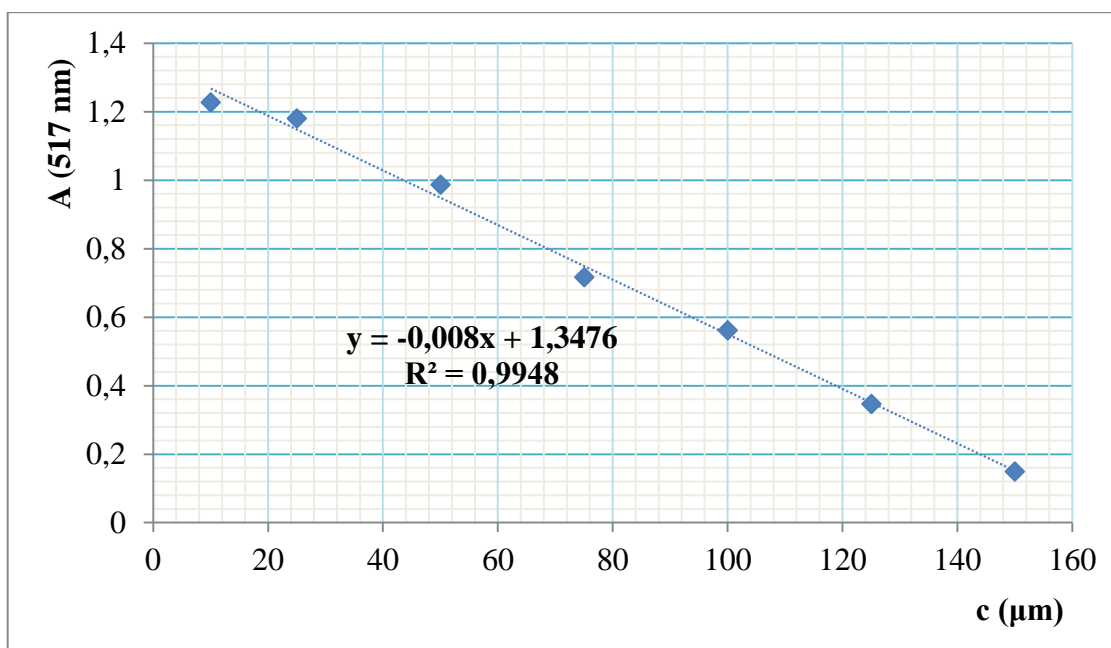
### Postupak određivanja

Postupak određivanja provodi se prema metodi za određivanje AA u ekstraktima gloga (Shortle et al., 2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100% metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

### Izrada baždarnog pravca za Trolox

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2, 5, 6, 7, 8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150  $\mu\text{M}$ .

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.



Slika 7. Baždarni pravac Troloxa (10-150  $\mu\text{M}$ )

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,008 x + 1,3476$$

gdje je:

Y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent Troloxa (TAE) ( $\mu\text{M}$ )

### 3.2.6. Statistička analiza

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara tretmana) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija za ultrazvuk su amplituda, promjer sonde, vrijeme tretiranja te vrijeme skladištenja (nulti i sedmi dan). Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  STDEV.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Obzirom se ultrazvuk sve više primjenjuje, bilo kao zasebna ili kao tehnologija konzerviranja u kombinaciji s nekim drugim toplinskim/netoplinskim tehnologijama, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka na stabilnost ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta mjereno DPPH metodom u mutnom soku od jabuke neposredno po provedenom tretmanu te tijekom sedmodnevnog skladištenja pri 4 °C. Rezultati znanstvenih istraživanja upućuju da ultrazvuk uspješno inaktivira enzime odgovorne za posmeđivanje u jabuci (PPO i POD), čiji primarni supstrati su, između ostalih, i visokovrijedni fenolni spojevi (Silva i sur., 2015). Stoga se ovim istraživanjem željelo utvrditi može li ova tehnologija imati perspektivu u očuvanju biološke vrijednosti mutnih sokova od jabuke, koji se sve više potražuju na tržištu.

Ovo poglavlje podijeljeno je u četiri potpoglavlja, pri čemu su u prva dva potpoglavlja prikazane prosječne vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) u mutnim sokovima jabuke tretiranim ultrazvukom neposredno nakon tretmana te nakon sedmodnevnog skladištenja (Tablice 4 i 5).

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni te su na temelju dobivenih rezultata određeni statistički signifikantni utjecaji ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) (Tablice 6 i 7).

#### **4.1. STABILNOST UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (DPPH) MUTNOG SOKA OD JABUKE TRETIRANOG ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA**

Nakon provedenog istraživanja, dobiveni rezultati prikazani u Tablici 4. pokazuju negativan trend tretiranih uzoraka u vrijednostima masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na netretirani kontrolni uzorak (svježi mutni sok od jabuke). Naime, kod svih tretiranih uzoraka, neovisno o amplitudi, promjeru sonde i vremenu tretiranja ultrazvukom, uočen je pad gore navedenih vrijednosti. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Saeeduddin i sur. (2017) kod kojih je zabilježen pad vrijednosti ukupnih fenola u soku od kruške nakon provedenog tretmana ultrazvukom (750 W, 30 kHz, amplituda 70 %, 45 i 65 °C, 10 min). Do sličnih rezultata došli su i Saikia i sur. (2016) koji su utvrdili pad koncentracija ukupnih fenola za ultrazvukom tretirane sokove od ananasa (17,32 %) i crne šljive (61,80 %) uz uvjete tretmana: 100 W, 30 kHz, 50 °C tijekom 30 min. Pad koncentracije ukupnih fenola znanstvenici najčešće pripisuju termoosjetljivošću bioaktivnih spojeva, obzirom se tijekom dužeg tretmana ultrazvukom tretirani medij ubrzano zagrijava (Saeeduddin i sur., 2017; Saikia i sur., 2016; Cortes i sur., 2008). Nadalje, Saikia i sur. (2016) u radu opisuju i pad antioksidacijske aktivnosti nakon tretmana ultrazvukom u uzorcima sokova od ličija i lubenice pri gore navedenim uvjetima. Pad antioksidacijske aktivnosti uslijed tretmana ultrazvukom autori pojašnjavaju strukturnom preraspodjelom fenolnih spojeva do koje može doći pri višim temperaturama. Nasuprot tomu, dobiveni rezultati ne podudaraju se s ranije provedenim istraživanjem Abid i sur. (2014a), u kojem je uočen rast koncentracije ukupnih fenola u UZV tretiranim voćnim sokovima od jabuke. Također, ne slažu se ni s istraživanjem Abid i sur. (2015) u kojem je uočen porast vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta voćnih sokova od jabuke nakon tretmana ultrazvukom (750 W, 20 kHz, D=12,7 mm, A=30, 60 i 90 %, 3 min, 20 °C). Povećanje antioksidacijske vrijednosti autori opisuju kao posljedicu ultrazvučnog tretmana pri kojem ujedno dolazi i do povećane ekstrakcije antioksidacijskih spojeva (askorbinske kiseline i fenolnih spojeva) uslijed djelovanja mehaničkog učinka kavitacije i implozije mjehurića zraka (Jabbar i sur., 2014; Abid I sur., 2013; Bhat i sur., 2011).

Prema vrijednostima u Tablici 4, vidljivo je da je najveća vrijednost masenog udjela ukupnih fenola određena u uzorku UZ-12. Kod navedenog uzorka pri amplitudi 80 %, promjeru sonde 10 mm i vremenu tretiranja 9 minuta postignuto je najveće iskorištenje

procesa. U odnosu na kontrolni uzorak, u ovom uzorku zabilježena je najmanja razlika u koncentraciji ukupnih fenola (5,99 % manje u odnosu na kontrolni uzorak), tj. zabilježena je njihova najveća stabilnost. Nadalje, rezultati dobiveni mjerenjem ukupnih fenola koreliraju s vrijednostima antioksidacijskih kapaciteta (0,891), čime se potvrđuje njihov doprinos antioksidacijskom kapacitetu, što je u skladu i s ranije publiciranim radovima (Wani i sur., 2018; Askoy i sur., 2013; Piluzza i Bullitta, 2011). Sukladno tomu, i najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta tretiranih uzoraka izmjerena je u uzorku UZ-12. Nasuprot tomu, najniža vrijednost masenog udjela ukupnih fenola, a samim time i najmanje iskorištenje procesa, zabilježena je pri amplitudi 40 %, promjeru sonde 7 mm i vremenu tretiranja 9 min (UZ-3). Uzorak UZ-3 bilježi najveću razliku u masenom udjelu ukupnih fenola (44,94 % manje ukupnih fenola) u odnosu na kontrolni uzorak. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta ipak pokazuju da je u uzorku UZ-10 (pri amplitudi 80 %, promjeru sonde 10 mm i vremenu tretiranja 3 min) izmjerena najmanja vrijednost.

#### **4.2. STABILNOST UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (DPPH) MUTNOG SOKA OD JABUKE TRETIRANOG ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NAKON SEDAM DANA SKLADIŠTENJA**

Nakon sedmodnevnog skladištenja u svim uzorcima (kontrolnom i tretiranim) uočen je pad masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta (Tablica 5.). Nadalje, veći pad uočen je kod tretiranih uzoraka, dok je kontrolni uzorak zadržao 85,02 % ukupnih fenola i 79,45 % antioksidacijskog kapaciteta. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima rada Khandpur i Gogate (2015) u kojem je promatran utjecaj skladištenja (10 tjedana, 4 °C) na sadržaj ukupnih fenola i na antioksidacijsku aktivnost ultrazvukom tretiranih (100 W, 2 kHz, D=10 mm, 15 min, 30 °C) sokova od naranče i slatke limete. Naime, već nakon prvog tjedna skladištenja u tretiranim uzorcima zabilježen je pad navedenih vrijednosti kako slijedi: 10-20 % manji udio ukupnih fenola te 10 % manja antioksidacijska aktivnost u odnosu na nulti dan skladištenja. Do sličnih rezultata došli su i Saeeduddin i sur. (2017) na sonificiranim (750 W, 30 kHz, A=70 %, 25, 45 i 65 °C, 10 min) uzorcima soka od kruške u kojima je uočen pad ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta već nakon 3 dana skladištenja (4 °C). Ovo smanjenje fenola tijekom skladištenja znanstvenici objašnjavaju formiranjem novonastalih spojeva, kao razgradnih produkata većih polimernih jedinica oslobođeni uslijed tretmana, koji

reagiraju s nespecifičnim Folin-Ciocalteu reagensom i samim time značajno u konačnici smanjuju udio fenolnih spojeva (Escarpa i Gonzalez, 2001; Vinson i sur., 2001).

Tretirani uzorak s najvećim udjelom ukupnih fenola i antioksidacijskim kapacitetom jest uzorak UZ-7-7. Naime, u navedenom uzorku pri amplitudi 40 %, promjeru sonde 10 mm i vremenu tretiranja od 3 min uočen je najmanji gubitak navedenih vrijednosti (48,21 % ukupnih fenola i 46,02 % antioksidacijske aktivnosti). Suprotno tomu, najveći gubitak ukupnih fenola uočen je pri amplitudi 80 %, promjeru sonde 7 mm i vremenu tretiranja 3 min (UZ-4-7). U navedenom uzorku nakon sedam dana skladištenja došlo je do gubitka od čak 98,86 % ukupnih fenola odnosno, što upućuje da se svega 1,14 % ukupnih fenola od početne vrijednosti zaostalo nakon provedenog skladištenja.

**Tablica 4.** Maseni udjeli ukupnih fenola (mg/g s.tv.) i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom (mg/g s.tv.) u svježim (S) i ultrazvukom tretiranim (UZ) mutnim sokovima od jabuke nultog dana skladištenja

Opis uzorka	Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Promjer sonde (mm)	UKUPNI FENOLI (mg/g s.tv.)	DPPH (mg/g s.tv.)
Svježi sok	S-0	0	0	0	2,67 ± 0,12	7,59 ± 0,03
Tretirani sokovi	UZ-1	40	3	7	1,69 ± 0,13	6,28 ± 0,12
	UZ-2	40	6	7	2,01 ± 0,13	6,03 ± 0,18
	UZ-3	40	9	7	1,47 ± 0,10	5,84 ± 0,12
	UZ-4	80	3	7	0,88 ± 0,00	3,97 ± 0,22
	UZ-5	80	6	7	1,87 ± 0,05	5,73 ± 0,00
	UZ-6	80	9	7	2,43 ± 0,01	7,16 ± 0,06
	UZ-7	40	3	10	2,07 ± 0,16	6,41 ± 0,17
	UZ-8	40	6	10	1,67 ± 0,14	5,27 ± 0,13
	UZ-9	40	9	10	1,69 ± 0,04	5,48 ± 0,10
	UZ-10	80	3	10	1,49 ± 0,11	4,74 ± 0,25
	UZ-11	80	6	10	1,67 ± 0,04	5,28 ± 0,05
	UZ-12	80	9	10	2,51 ± 0,10	7,26 ± 0,05

**Tablica 5.** Maseni udjeli ukupnih fenola (mg/g s.tv.) i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom (mg/g s.tv.) u svježim (S) i ultrazvukom tretiranim (UZ) mutnim sokovima od jabuke nakon 7 dana skladištenja na 4 °C

Opis uzorka	Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Promjer sonde (mm)	UKUPNI FENOLI (mg/g s.tv.)	DPPH (mg/g s.tv.)
Svježi sok	S-0-7	0	0	0	2,27 ± 0,04	6,03 ± 0,04
Tretirani sokovi	UZ-1-7	40	3	7	0,80 ± 0,06	2,20 ± 0,25
	UZ-2-7	40	6	7	0,10 ± 0,03	0,57 ± 0,13
	UZ-3-7	40	9	7	0,10 ± 0,01	0,92 ± 0,05
	UZ-4-7	80	3	7	0,01 ± 0,00	0,54 ± 0,07
	UZ-5-7	80	6	7	0,13 ± 0,07	1,19 ± 0,13
	UZ-6-7	80	9	7	0,12 ± 0,01	0,92 ± 0,07
	UZ-7-7	40	3	10	1,07 ± 0,07	3,46 ± 0,27
	UZ-8-7	40	6	10	0,07 ± 0,02	0,90 ± 0,03
	UZ-9-7	40	9	10	0,06 ± 0,01	0,80 ± 0,13
	UZ-10-7	80	3	10	0,03 ± 0,02	0,95 ± 0,13
	UZ-11-7	80	6	10	0,04 ± 0,02	1,06 ± 0,40
	UZ-12-7	80	9	10	0,39 ± 0,01	1,33 ± 0,11



### 4.3. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKA NA MASENI UDIO UKUPNIH FENOLA

Nakon provedene analize vidljiv je negativan utjecaj tretmana ultrazvukom na sadržaj ukupnih fenola u mutnom soku od jabuke. U odnosu na svježi sok, a neovisno o amplitudi, promjeru sonde te vremenu tretiranja u svim tretiranim uzorcima uočen je značajno manji udio navedenih spojeva. Svi rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na maseni udio ukupnih fenola u svježem i ultrazvukom tretiranim sokovima od jabuke prikazani su tablično (Tablica 6).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako parametri amplitude, promjera sonde te vremena tretiranja značajno ne utječu na promjenu sadržaja ukupnih fenola ultrazvukom tretiranih uzoraka. Do sličnih rezultata došli su Pala i sur. (2015). Navedeni znanstvenici u radu na sonificiranim (500 W, 20 KHz, D=19 mm, A= 50, 75, 100 %, 35 °C, 6, 12, 18, 24, 30 min) uzorcima sokova od nara ovisno o primijenjenoj amplitudi i ovisno o vremenu tretiranja nisu primijetili značajnu promjenu u sadržaju ukupnih fenola tretiranih uzoraka. U ultrazvukom tretiranim (500 W, 19 kHz, D=1,3 cm, 9-49 °C, 2-10 min) uzorcima sokova od dinje, a ovisno o promjeni amplitude (20, 60, 100 %), Fontles i sur. (2012) nisu uočili značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola. Odnosno, kao i u prethodno navedenom radu statističke razlike u rezultatima nije bilo. Nadalje, u radu Costa i sur. (2015) uzorci sokova od ananasa tretirani su UZV (75, 226 i 376 Wcm<sup>-2</sup>, 19 kHz, D=13 mm) 2, 6 i 10 min, a dobiveni rezultati vrijednosti ukupnih fenola nisu se statistički razlikovali. Ipak, postoje i studije u kojima je uočen značajan utjecaj vremena tretiranja ultrazvukom na sadržaj ukupnih fenola. Jedno od tih je i istraživanje Ordonez-Santos i sur. (2017) na soku peruanske jagode u kojem je zabilježen značajan porast ukupnih fenola povećanjem vremena tretiranja ultrazvukom (240 W, 42 kHz, 10, 20 i 40 min, 30 °C). S povećanjem vremena tretiranja, koncentracije ukupnih fenola povećale su se za 4,43 % (s 10 na 20 min) odnosno 9,87 % (s 10 na 40 min). Povećanje koncentracije ukupnih fenola znanstvenici pripisuju pucanju staničnih stijenki biljnih stanica uslijed pojave kavitacije (Zafra-Rojas i sur., 2013).

Promotri li se utjecaj vremena skladištenja na stabilnost ukupnih fenola u sokovima jabuke, dobiveni rezultati pokazuju da se s duljim vremenom skladištenja (7 dana vs. nulti dan) značajno smanjuje stabilnost fenolnih spojeva. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Saeduddin i sur. (2017) u kojem je na sonificiranim (750 W, 30 kHz, A=70 %, 25, 45 i 65 °C, 10 min) uzorcima sokova od kruške uočen značajan pad ukupnih fenola

tijekom 21 dana skladištenja pri temperaturi od 4 °C. Nadalje u radu Khandpur i Gogate (2015) ultrazvukom tretirani uzorci sokova od naranče i slatke limete značajno su se razlikovali u sadržaju ukupnih fenola nakon provedenog skladištenja (10 tjedana, 4 °C). Kao što je već navedeno, pad vrijednosti ukupnih fenola tijekom skladištenja pripisuje se formiranju novih spojeva, kao posljedice degradacije većih polimernih struktura, koji reagiraju s nespecifičnim Folin-Ciocalteu reagensom i samim time u konačnici značajno smanjuju udio fenolnih spojeva (Escarpa i Gonzalez, 2001; Vinson i sur., 2001).

**Tablica 6.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ultrazvučnih parametara na masene udjele ukupnih fenola u svježim (S) i ultrazvukom tretiranim (UZ) sokovima od jabuke skladištenim 7 dana na 4 °C

Parametri tretmana ultrazvukom	n	Maseni udjeli ukupnih fenola (mg/g s.tv.)
Amplituda (%)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$2.81 \pm 0.4^a$
40	52	$1.04 \pm 0.09^b$
80	52	$0.94 \pm 0.09^b$
Vrijeme tretiranja (min)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$2.58 \pm 0.41^a$
3	52	$1.00 \pm 0.11^b$
6	52	$0.94 \pm 0.11^b$
9	52	$1.09 \pm 0.11^b$
Promjer sonde (mm)		$p \leq 0.05^\dagger$
7	52	$0.97 \pm 0.09^b$
10	52	$1.07 \pm 0.09^b$
Vrijeme skladištenja (dani)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$1.86 \pm 0.09^a$
7	52	$0.4 \pm 0.09^b$

#### **4.4. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET (DPPH)**

Osim utjecaja zasebnih parametara ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola, u ovom radu promatran je i utjecaj parametara ultrazvuka na antioksidacijski kapacitet. Jednako kao i u slučaju ukupnih fenola, uočen je negativan utjecaj tretmana ultrazvukom na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Neovisno o primijenjenoj amplitudi, promjeru sonde te vremenu tretiranja, negativan utjecaj primijećen je u svim tretiranim uzorcima. Rezultati dobiveni multifaktorskom analizom, prikazani su tablično (Tablica 7).

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Ramirez-Moreno i sur. (2018) gdje je pokazano da u ultrazvukom (1500 W, 20 kHz) tretiranim uzorcima sokova od kupine promjena amplitude (sa 60 % na 80 %) ili vremena tretiranja (s 15 na 25 min) ne utječe na promjenu antioksidacijskog kapaciteta. Do sličnih rezultata došlo se i na tretiranim (1500 W, 20 kHz, D=13 mm, A=80 %, 15 i 30 min, 8-50 °C) uzorcima sokova indijske smokve, gdje povećanje vremena tretiranja ne utječe značajno na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (Cruz-Cansino i sur., 2015). Suprotno navedenom, u istraživanju Aadil i sur. (2013) promjena vremena tretiranja značajno utječe na antioksidacijski kapacitet. Naime, u sonificiranim (600 W, 28 kHz, 20 °C, 30, 60 i 90 min) uzorcima sokova od grejpa povećanjem vremena tretiranja značajno se povećava i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom. Isti učinak primijećen je u radu Zou i Hou (2017) na tretiranim (0,5 Wcm<sup>-2</sup>, 40 kHz, 20, 40 i 60 min) uzorcima sokova od borovnice. Opozitni rezultati navedenih istraživanja ukazuju kako tretman ultrazvukom poboljšava ekstrakciju antioksidacijskih spojeva te na taj način izravno doprinosi višim vrijednostima (Guerrouj i sur., 2016).

Jedini procesni parametar koji se izdvojio kao statistički značajan čimbenik jest vrijeme skladištenje. Naime, nakon 7 dana skladištenja pri temperaturi od 4 °C, antioksidacijski kapaciteti svih uzoraka značajno su se smanjili u odnosu na nulti dan mjerenja. Na uzorku od 52 mutna soka od jabuke (tretirani i netretirani uzorci) prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta smanjila se s početnih  $5.93 \pm 0.2$  na  $1.6 \pm 0.2$  mg/g s.tv. Dobivene vrijednosti u skladu su s istraživanjem Jiang i sur., (2015). Navedeni znanstvenici promatrali su utjecaj ultrazvuka (650 W, 20 kHz, D=6 mm, 30 min, 20 °C) i vremena skladištenja (8 dana, 15, 15 i 25 °C) na antioksidacijski kapacitet soka od crnog dudu. U tretiranim uzorcima već nakon drugog dana skladištenja pri svim gore navedenim

temperaturama uočen je pad vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Do sličnih rezultata došlo se u radu Saeeduddin i sur. (2017) u kojem se na sonificiranim (750 W, 30 kHz, A=70 %, 25, 45 i 65 °C, 10 min) uzorcima soka od kruške antioksidacijski kapacitet značajno smanjio nakon 21 dana skladištenja pri temperaturi od 4 °C. Kao razlog smanjenja antioksidacijskog kapaciteta skladištenjem navodi se snažna tendencija polifenola za polimerizacijom. Kada stupanj polimerizacije dosegne kritičnu vrijednost, povećana molekularna kompleksnost i steričnost smanjuju raspoloživost hidroksilnih skupina DPPH radikalima, što posljedično dovodi do pada antioksidacijskog kapaciteta (Pinelo i sur., 2004).

**Tablica 7.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ultrazvučnih parametara na vrijednosti antioksidacijskih kapaciteta u svježim (S) i ultrazvukom tretiranim (UZ) sokovima od jabuke skladištenim 7 dana na 4 °C

Parametri tretmana ultrazvukom	n	DPPH (mg/g s.tv.)
Amplituda (%)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$7.29 \pm 0.92^a$
40	52	$3.64 \pm 0.2^b$
80	52	$3.30 \pm 0.2^b$
Vrijeme tretiranja (min)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$6.69 \pm 0.93^a$
3	52	$3.58 \pm 0.25^b$
6	52	$3.26 \pm 0.25^b$
9	52	$3.73 \pm 0.25^b$
Promjer sonde (mm)		$p \leq 0.05^\dagger$
7	52	$3.47 \pm 0.2^b$
10	52	$3.61 \pm 0.2^b$
Vrijeme skladištenja (dani)		$p \leq 0.05^\dagger$
0	52	$5.93 \pm 0.2^a$
7	52	$1.6 \pm 0.2^b$

## 5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i obrade dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Prosječni maseni udio ukupnih fenola u uzorcima mutnog soka od jabuke iznosio je  $1,13 \pm 0,06$  mg/g s.tv., a prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena DPPH metodom iznosila je  $3,77 \pm 0,13$  mg/g s.tv., čime se mutni sokovi od jabuke mogu svrstati u dobar izvor fenolnih spojeva sa značajnom antioksidacijskom aktivnošću.
2. U odnosu na netretirani uzorak soka, tretman ultrazvukom značajno je utjecao na smanjenje stabilnosti ukupnih fenola u mutnim sokovima od jabuke. Duži tretman ultrazvukom (9 min vs. 3 i 6 min) nije rezultirao većim prinosom ukupnih fenola ( $p \leq 0,05$ ). Odnosno, vrijeme tretiranja (3 min, 6 min i 9 min) kao jedan od parametara obrade ultrazvukom, statistički nije utjecao na povećanje masenih udjela ukupnih fenola u tretiranim uzorcima. Nadalje, ni promjer sonde nije se pokazao ključnim čimbenikom obrade. Kao i kod parametra vremena tretiranja, povećanje promjera sonde (10 mm vs. 7 mm) statistički nije utjecalo na povećanje prinosa ukupnih fenola ( $p \leq 0,05$ ). Jednako tako povećanje amplitude s 40 % na 80 % nije dovelo do značajnog povećanja masenih udjela ukupnih fenola u mutnim uzorcima sokova od jabuke ( $p \leq 0,05$ ).
3. U odnosu na netretirani uzorak soka, obrada mutnog soka od jabuke ultrazvukom visokog intenziteta negativno je utjecala na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Statističkom obradom svih parametara ponaosob, dobiveni rezultati ukazuju kako niti jedan od parametara obrade (amplituda, promjer sonde i vrijeme tretiranja) značajno ne utječu na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ( $p \leq 0,05$ ).
4. Skladištenje tijekom 7 dana na temperaturi od 4 °C značajno je utjecalo na smanjenje ukupnih fenola (prosječno za 78,49 %) i antioksidacijskog kapaciteta (prosječno za 73,02 %) u uzorcima mutnih sokova od jabuke ( $p \leq 0,05$ ) u usporedbi s netretiranim uzorcima.

## 6. LITERATURA

Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., & Sun, D.W. (2013). Effect of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem.* **141**, 3201-3206.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M., M., Hu, B., Saeeduddin, M., Zeng, X. (2015) Qualitative assessment of sonicated apple juice during storage. *J. Food Process. Pres.* **39**, 1299–1308.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M., M., Wu, T., Lei, S., Khan, M., A., Zen, X. (2014a) Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* **21**, 984–990.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M., M., Hu, B., Lei, S., Zen, X. (2014b) Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* **21**, 93-97.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 1182–1187.

Adekunte, A., O., Tiwari, B., K., Cullen, P., J., Scannell, A., G., M., O'Donnell, C., P. (2010a) Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem.* **122**, 500-507.

Adekunte, A., Tiwari, B., K., Scannell, A., Cullen, P., J., O' Donnell, C. (2010b) Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 116-120.

Aguilar-Rosas, S., F., Ballinas-Casarrubias, M., L., Nevarez-Moorillon, G., V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E. (2007) Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *J. Food Eng.* **83**, 41-46.

AIJN (2017) Liquid fruit market report. AIJN-European Fruit Juice Association. <<http://www.aijn.org/publications/facts-and-figures/aijn-market-reports/>>. Pristupljeno 18.12.2017.

Aksoy, L., Kolay, E., Agilonu, Y., Aslan, Z., Kargioglu, M. (2013) Free radical activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi J. Biol. Sci.* **20**, 235-239.

Anonymous 1 (2017) Jabuka. Priroda i bilje. <<https://www.plantea.com.hr/jabuka/>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Anonymous 2 (2017) Jabuka. <<https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/jabuka-7/>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Ashokkumar, M., Kentish, S. (2011) The physical and chemical effects of ultrasound. U: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, (Feng, H., Barobosa-Cànovas, G., Weiss, J., ured.), Springer, New York, str. 1-105.

Baker, R., A., Cameron, R., G. (1999) Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food Technol.* **53**, 64–69.

Begić-Akagić, A., Spaho, N., Oručević, S., Drkenda, P., Kurtović, M., Gaši, F., Kopjar, M., Piližota, V. (2011) Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 1-8.

Beveridge, T. (2002). Opalescent and cloudy fruit juices: Formation and particle stability. *Crit. Rev. in Food Sci.* **42**, 317–337.

Bharswaj, R., L., Pandey, S. (2011) Juice blends-a way of utilization of under – utilized fruits, vegetables, and spices: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 563–570.

Bhat, R., Kamaruddin, N., S., B., C., Min-Tze, L., Karim, A., A. (2011) Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 1295-1300.

Biedrzycka, E., Amarowicz, R. (2008) Diet and health: Apple polyphenols as antioxidants. *Food Rev. Int.* **24**, 235-251.

Bosiljkov T., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Karlović S., Jagušć I. (2011) Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 34–41.

Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I., (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod.* **64**, 892-895.

Carcel, J., A., Benedito, J., SanJuan, N., Sánchez, E. (1998) Aplicación de los ultrasonidos en las industrias de productos lácteos y derivados. *Alimen, Equip. Tecnol.* **17**, 135–141.

Carvalho, L., R., F., Souza, S., R., Martinis, B., S., Korn, M. (1995) Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography, *Anal. Chim. Acta.* **317**, 171–179.

Chang, Y., L. (2017) Common nutrients and nutraceutical quality of apples <<http://nyshs.org/wp-content/uploads/2016/10/1.Common-Nutrients-and-Nutraceutical-Quality-of-Apples.pdf>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Chang, S.-S., Kang, D.-H. (2004) *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history characteristics and current isolation, detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 55-74.

Cheng, L., Soh, C., Liew, S, Teh, F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem.* **104**, 1396–1401.

Cortes, C., Esteve, M., J., Frigola A. (2008) Effect of refrigerated storage on ascorbic acid content of orange juice treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization. *Eur. Food Res. Technol.* **227**, 629–635.

Costa, M., G., M., Fonteles, T., V., De Jesus, A., L., T., Almeida, F., D., L., De Miranda, M., R., A., Fernandes, F., A., N., Rodrigues, S. (2013) High-Intensity Ultrasound Processing of Pineapple Juice. *Food Bioprocess Tech.* **6**, 997-1006.



Cruz- Cansino, N., D., Ramirez- Moreno, E., Leon-Rivera, J., E., Delgado- Olivares, L., Alanis- Garcia, E., Ariza-Ortega, J., A., Manriquez- Torres, J., D., Jaramillo- Bustos, D., P. (2015) Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrason.Sonochem.* **27**, 277-286.

De Paepe, D., Valkenburg, D., Coudijzer, Noten, B., Servaes, K., De Loose, M., Voorspoels, S., Diels, L., Van Droogenbroeck, B. (2014) Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chem.* **162**, 176–185.

Escarpa, A., Gonzalez, M., C. (2001) Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta.* **427**, 119–127.

FAOSTAT (2017) FAOSTAT- The Food and Agriculture Organization of the United Nations <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Ferrario, M., Alzamora, S., M., Guerrero, S. (2015) Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiol.* **46**, 635-642.

Fonteles, T., V., Costa, M., G., M., Tiberio de Jesus, A., L., Alcantara de Miranda, M., R., Fernandes, F., A., N., Rodrigues, S. (2012) Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: effects on quality parameters. *Food Res. Int.* **48**, 41-48.

Gao, J., Rupasinghe, H., V. (2012) Nutritional, physicochemical and microbial quality of ultrasound-treated apple-carrot juice blends. *Food Nutr.* **3**, 212–218.

Gökmen, V., Artık, N., Acar, J., Kahraman, N., Poyrazoğlu, E. (2001) Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 194–199.

Gracin, L., Režek Jambrak, A., Juretić, H., Dobrović S. Barukčić, I., Grozdanović, M., Smoljanić, G. (2016) Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment, *Appl. Acoust.* **103**, 143–147.

Guerrouj, K., Sanchez- Rubio, M., Taboada-Rodriguez, A., Cava-Rolla, R., M., Marin-Iniesta, F. (2016) Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food Bioprod. Process.* **99**, 20-28.

Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Lelas, V. Thagard, S., M. (2012) The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk, *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 46–52.

Jabbar, S., Abid, M., Wu, T., Hashim, M., M., Hu, B., Lei, S., Zhu, X., Zeng, X. (2014) Study on combined effects of blanching and sonication on different quality parameters of carrot juice. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 28–33.

Jayasooriya, S.,D., Bhandari, B.,R., Torley, P., D’Arcy, B.,R. (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *Int. J. Food Prop.* **7**, 301-319.

Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, Lj., Lisak, K. (2010) Mogućnosti primjene netradicionalnih postupaka procesiranja u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo.* **60**, 113-126.

Jiang, B., Mantri, N., Hu, Y., Lu, J., Y., Jiang, W., Lu, H., F. (2015) Evaluation of bioactive compounds of black mulberry juice after thermal, microwave, ultrasonic processing, and storage at different temperatures. *Food Sci. Technol. Int.* **21**, 392-399.

Kammerer, D., R., Kammerer, J., Valet, R. Carle, R. (2014) Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Res. Int.* **65**, 2–12.

Karlović, S., Bosiljkov, T., Brnčić, M., Semenski, D., Dujmić, F., Tripalo, B., Ježek, D. (2014) Reducing fat globules particle-size in goat milk: Ultrasound and high hydrostatic pressures approach, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **28**, 499 – 507.

Khandpur, P., Gogate, P., R. (2015) Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. *Ultrason. Sonochem.* **27**, 125-136.

Kiani, H., Sun, D., W., Zhang, Z. (2013) Effects of processing parameters on the convective heat transfer rate during ultrasound assisted low temperature immersion treatment of a stationary sphere. *J. Food Eng.* **115**, 384–390.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. (2004) Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 261-266.

Kolniak-Ostek, J., Oszmianski, J., Rutkowski, K.,P., Wojolylo, A. (2014) Effect of 1-methylcyclopropene postharvest treatment apple and storage on the cloudy juices properties. *Food Sci. Technol.-LEB.* **59**, 1166-1174.

Lauterborn, W., Mettin, R. (2015) Acoustic cavitation: bubble dynamics in high-power ultrasonic fields. U: *Power Ultrasonics: Applications of High-intensity Ultrasound* (Gallego-Juárez, J., A., Graff, K., F., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 37–78.

Lieu, L., N., Le, V., V., M. (2010) Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 273-279.

Lorimer, J. P., Mason, T. J., Paniwnyk, L. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* **3**, 253-260.

Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji*, HINUS, Zagreb, str. 271-274.

Lovrić, T., Piližota, V. (1994) *Konzerviranje i prerada voća i povrća*. Nakladni Zavod Globus, Zagreb, str. 83.-95.

Mason T. J. (2003) Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrason. Sonochem.* **10**, 175-179.

Ordenez-Santos, L., E., Martinez- Giron, J., Arias- Jaramillo, M., E. (2017) Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chem.* **233**, 96-100.

Oszmiański, J., Wojdyło, A., Kolniak, J. (2011) Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree- enriched cloudy apple juices. *Food Chem.* **127**, 623–631.

Pala, Ç., U., Zorba, N., N., Özcan, G., J. (2015) Microbial Inactivation and Physicochemical Properties of Ultrasound Processed Pomegranate Juice. *Food Prot.* **78**, 531-539.

Piluzza, G., Bullitta, S. (2011) Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* **49**, 240-247.

Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C., (2005) Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* **92**, 109-117.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M., J., Nicoli, M., C. (2004) Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1177–1180.

Phenol-Explorer (2018) Showing all polyphenols found in Apple [Dessert], whole, raw, <<http://phenol-explorer.eu/contents/food/23>>. Pristupljeno 03.12.2017.

Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (2013) Narodne novine **48**, Zagreb.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K., (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem.* **53**, 4290-4302.

Priyadarshini, A., Rajauria, G., O'Donnell, C., P., Tiwari, B., K. (2018) Emerging Food Processing Technologies and Factors Impacting their Industrial Adoption. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (objavljeno online 4. lipnja 2018.). doi: 10.1080/10408398.2018.1483890

Ramirez-Moreno, E., Zafra-Rojas, Q., Y., Arias-Rico, J., Ariza-Ortega, J., A., Alanis-Garcia, E., Cruz-Cansino, N. (2018) Effect of ultrasound on microbiological load and antioxidant properties of blackberry juice. *J. Food Process. Pres.* **42**, e13489. doi: 10.1111/jfpp.13489

Ramos-Aguilar, A., L., Victoria-Campos, C., I., Ochoa-Reyes, E., de Jesús Ornelas-Paz, J., Zamudio-Flores, P., B., Rios-Velasco, C., Reyes-Hernández, J., Pérez-Martínez, J., D., Ibarra-Junquera, V. (2017) Physicochemical properties of apple juice during sequential steps of the industrial processing and functional properties of pectin fractions from the generated pomace, *Food Sci. Tech.-Leb.* **86**, 465-472.

Režek Jambrak, A., Šimunek, M., Evačić, S., Markov, K., Smoljanić, G., Frece, J. (2018) Influence of high power ultrasound on selected moulds, yeasts and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple, cranberry and blueberry juice and nectar. *Ultrasonics.* **83**, 3-17.

Režek Jambrak, A., Lelas, V. Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem ind.* **59**, 169-177.

Rieger, M. (2017) Apple – *Malus domestica*. <<http://www.fruit-crops.com/apple-malus-domestica/>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Rodrigues, S., Fernandes, F., A., N. (2016). Advantages in fruit processing technologies. Taylor & Francis group, Boca Raton

Rossle, C., Wijngaard, H. H., Gormley, R. T., Butler, F., Brunton, N. (2010) Effect of storage on the content of polyphenols of minimally processed skin-on apple wedges from ten cultivars and two growing seasons. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1609-1614.

Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Yuan, Q., Riaz, A., Hu, B., Zhou, L., Zeng, X. (2017) Nutritional, microbial and physicochemical changes in pear juice under ultrasound and commercial pasteurization during storage. *J. Food Process. Pres.* **41**, 1-7.

Saikia, S., Mahnot N., K., Mahanta, C., L. (2016) A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Sci. Technol. Int.* **22**, 288-301.

Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation*, (Gould, G.W., ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 176-204.

Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C. (2013) Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica L.*) juice. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 1276-1282.

Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G., J., Mount, J. (2003) Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocoll.* **17**, 191-197.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J. Funct. Foods.* **18**, 820-897.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Silva, L., C., A., Almeida, P., S., Rodrigues, S., Fernandes, F., A., N. (2015) Inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in apple cubes and in apple juice subjected to high intensity power ultrasound processing. *J. Food Process. Pres.* **39**, 2081-2087.

Soria, A. C., Villamiel, M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 323-331.

Spanos, G., A., Wrolstad, R., E. (1992) Phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage – a review. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1478–1487.

Spanos, G., A., Wrolstad, R., E., Heatherbell, D., A. (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agr. Food Chem.* **38**, 1572–1579.

Sun, Y., Zhong, L., Cao, L., Lin, W., Ye, X. (2015) Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*malus pumila mill,cv.Red Fuji*) juice. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 8336–8342.

Sun, D.,W., Li, B. (2003) Microstructural change of potato tissuesfrozen by ultrasound assisted immersion freezing. *J. Food Eng.* **57**, 337–345.

Stajniko, D. (2015) Dinamičko kontrolirano skladištenje jabuka. *Glasnik zaštite bilja.* **38**, 32-39.

Statista (2017) Production volume of apple juice in the EU 2008-2016. The Statistics Portal.<<https://www.statista.com/statistics/423198/production-volume-of-apple-juice-eu/>>.

Pristupljeno 07.12.2017.

Sulaiman, A., Farid, M., Silva, F., V. (2017) Quality stability and sensory attributes of apple juice processed by thermosonication, pulsed electric field and thermal processing. *Food Sci. Technol. Int.* **23**, 265-276.

TICO (2017) Fruit juice production line introduction. TICO – Tianjin Anson International Co., Ltd.,<<http://www.ticomachine.com/complete-line/Fruit-Juice-Production-Line.html>>.

Pristupljeno 08.12.2017.

Tiwari, B., K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C., P., Cullen, P., J. (2008) Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2423–2428.

Tribst, A., A., L., Sant'Ana, A., S., Rodriguez de Massaguer, P. (2009) Review: Microbiological quality and safty of frut juices-past, present and future perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**, 310-339.

Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S. (2005) Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4989–4995.

Tu, S.-H., Chen, L.-C., Ho, Y.-S. (2016) An apple a day to prevent cancer formation: Reducing cancer risk with flavonoids. *J Food Drug Anal.* **25**, 119-124.

USDA (2017) National Agricultural Library, United States Department of Agriculture, <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>>. Pristupljeno 02.12.2017.

Van Der Sluis, A., A, Dekker, M., Van Boekel, M., A., J., S. (2005) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during Storage. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1073-1080.

Vinson, J., A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5315–5321.

Zafra-Rojas, Q., Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., Alanís-García, E. (2013) Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 1283-1288.

Zhu, J., Wang, Li, X., Li, B., Liu, S., Chang, N., Jie, D., Ning, C., Gao, H., Meng, X. (2017) Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on Escherichia coli O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrason. Sonochem.* **37**, 251-259.

Zou, Y., Hou, X. (2017) Sonication enhances quality and antioxidant activity of blueberry juice. *Food Sci. Technol.* **37**, 599-603.

Wang, J., Hu, X., S., Wang, Z., F. (2010) Kinetics models for the inactivation of Alicyclobacillus acidiphilus DSM14558(T) and Alicyclobacillus acidoterrestris DSM 3922(T) in apple juice by ultrasound. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, 177-181.



Wang, L., Weller, C., L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends.Food.Sci.Tech.* **17**, 300-312.

Wani, M., S., Gupta, R., C., Munshi, A., H., Pradhan, S., K. (2018) Phytochemical screening, total phenolics, flavonoid content and antioxidant potential of different part of *Betula utilis D. Don* from Kashmir Himalaya. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **9**, 2411-2417.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

A handwritten signature in blue ink, reading "Josipa Bilobrk", is written over a horizontal line.

Josipa Bilobrk