

# Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu fizikalnih i mikrobioloških svojstava smoothieja

---

**Burcar, Dea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:159:300115>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Dea Burcar

1114/PI

**UTJECAJ VISOKOG  
HIDROSTATSKOG TLAKA NA  
PROMJENU FIZIKALNIH I  
MIKROBIOLOŠKIH SVOJSTAVA  
SMOOTHIEJA**

Rad je izrađen u sklopu projekta HRZZ (Hrvatska zaklada za znanost) pod nazivom „*Primjena visokog hidrostatskog tlaka u proizvodnji funkcionalnih sokova na bazi voća i povrća*“ (IP 2016 – 06 – 4006) čiji je voditelj Prof.dr.sc. Damir Ježek.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnološke operacije Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom Izv.prof.dr.sc. Tomislava Bosiljkova i neposrednog voditelja asistenta Marka Škegre, mag.ing.



Zahvaljujem mentoru Izv.prof.dr.sc. Tomislavu Bosiljkovu na stručnim savjetima, vodstvu i pomoći oko izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentu Marku Škegri na strpljenju, savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada te tehničarima Laboratorija za tehnološke operacije Darjanu Pipiću i Goranu Bosancu na strpljenju i uloženom vremenu i trudu oko izrade ovoga rada.

Također, zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica i Laboratorija za mjerenje regulaciju i automatizaciji na pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, prijateljima i dečku jer su me podnosili ovih 5 godina dok sam pričala o fakultetu. Ovaj rad posvećujem njima.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za procesno inženjerstvo

Laboratorij za tehnološke operacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA PROMJENU FIZIKALNIH I MIKROBIOLOŠKIH SVOJSTAVA SMOOTHIEJA

Dea Burcar, 00582057730

**Sažetak:** Smoothie je nutritivno vrijedan proizvod, čija popularnost neprekidno raste. U radu su proučene promjene fizikalnih (boja, apsorbancija, gustoća, pH, prividna viskoznost, raspodjela veličine čestica) i mikrobioloških svojstava nakon obrade visokim hidrostatskim tlakom (150, 300, 450 MPa) i vremena obrade 3, 9 i 15 minuta smoothieja primjenom filtera 0,3 i 0,5 mm. Osim izravnog mjerenja, korištena je i blisko infracrvena (NIR) spektroskopija. Za obradu podataka NIR spektara upotrijebljena je analiza glavnih komponenti, na temelju čega su se pomoću umjetnih neuronskih mreža predviđala spomenuta fizikalna svojstva u uzorcima. Procesni parametri pokazuju statistički značajan utjecaj na promjenu svih fizikalnih svojstava. Smoothie dobiven promjerom filtera 0,3 mm pokazuje veću stabilnost te se vrijednosti indeksa stabilnosti smoothieja (ISS) kreću između 50 i 750 sati. Na povećanje vrijednosti indeksa stabilnosti smoothieja (ISS) utječe primijenjeni tlak (450 MPa) i interval raspodjele veličine čestica između 0,48 – 1,44  $\mu\text{m}$  s prihvatljivom mikrobiološkom održivosti.

**Ključne riječi:** visoki hidrostatski tlak, smoothie, fizikalna svojstva, mikrobiološka svojstva, stabilnost

**Rad sadrži:** 65 stranica, 40 slika, 10 tablica, 76 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Izv.prof.dr.sc. Tomislav Bosiljkov

**Pomoć pri izradi:** Marko Škegro, mag.ing. upravljanja sigurnošću hrane

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Sven Karlović
2. Izv.prof.dr.sc. Tomislav Bosiljkov
3. Doc.dr.sc. Davor Valinger
4. Prof.dr.sc. Jadranka Frece (zamjena)

**Datum obrane:** 27. rujna, 2019.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Graduate thesis**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Process Engineering**

**Laboratory for Unit Operations**

**Scientific area: Biotechnological sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **THE EFFECT OF HIGH – PRESSURE PROCESSING ON PHYSICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF SMOOTHIE**

**Dea Burcar, 0058205773**

**Abstract:** Smoothie is a valuable nutritional product, whose popularity is constantly growing. In this paper, the effects of high hydrostatic pressure (150, 300, 450 MPa) and time of treatment (3, 9, 15 minutes) on physical (colour, absorbance, density, pH, apparent viscosity, particle size distribution) and microbiological properties of smoothies made with filter diameter of 0,3 and 0,5 mm were determined. Furthermore, near-infrared spectroscopy (NIR) was used as an alternative method. The principal component analysis (PCA) was used to process NIR spectra, based on which, by means of artificial neural networks, physical properties in the samples were predicted. Process parameters have a significant influence on all observed physical properties. Smoothie made with filter diameter a 0,3 mm has greater stability where values of the ISS were in range 50 – 740 hours. Applied pressure (450 MPa) increased the ISS value of smoothie and particle size distribution between 0,48 – 1,44  $\mu\text{m}$  with acceptable microbiology sustainability.

**Keywords:** high hydrostatic pressure, smoothie, physical properties, microbiological properties, stability

**Thesis contains:** 65 pages, 40 figures, 10 tables, 76 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Tomislav Bosiljkov, Associate professor

**Technical support and assistance:** Marko Škegro, mag.ing.techn.aliment.

**Reviewers:**

1. PhD. Sven Karlović, Assistant professor
2. PhD. Tomislav Bosiljkov, Associate professor
3. PhD. Davor Valinger, Assistant professor
4. PhD. Jadranka Frece, Full professor (substitute)

**Defence date:** 27 September 2019

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Visoki hidrostatski tlak</b> .....	2
2.1.1. Povijesni razvoj visokog hidrostatskog tlaka.....	3
2.1.2. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka .....	3
2.1.3. Oprema za tretiranje visokim hidrostatskim tlakom.....	5
2.1.4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na mikroorganizme, enzime i nutritivnu kvalitetu..	7
<b>2.2. Pasterizacija</b> .....	9
2.2.1. Povijesni razvoj .....	9
2.2.2. Princip djelovanja i oprema.....	9
<b>2.3. Smoothie</b> .....	10
<b>2.4. Raspodjela veličina čestica</b> .....	13
<b>2.5. NIR spektroskopija</b> .....	16
<b>2.6. Umjetna neuronska mreža</b> .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
<b>3.1. Materijali</b> .....	18
<b>3.2. Metode rada</b> .....	18
3.2.1. Priprema smoothieja.....	18
3.2.2. Plan provedbe eksperimenta.....	19
3.2.3. Obrada smoothieja visokim hidrostatskim tlakom .....	20
3.2.4. Obrada smoothieja pasterizacijom.....	21
3.2.5. Određivanje boje i apsorbancije .....	21
3.2.6. Određivanje indeksa stabilnosti smoothieja .....	23
3.2.7. Određivanje gustoće .....	24
3.2.8. Određivanje raspodjele veličine čestica.....	25
3.2.9. Određivanje pH .....	26
3.2.10. Određivanje viskoznosti .....	26
3.2.11. Praćenje mikrobiološke kvalitete smoothieja tretiranog visokim hidrostatskim tlakom	27
3.2.12. NIR spektroskopija.....	28
3.2.13. Analiza glavnih komponenti- PCA.....	28
3.2.14. Umjetne neuronske mreže .....	29
3.2.15. Statistička analiza .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	30

5. ZAKLJUČCI .....	57
6. LITERATURA .....	58

# 1. UVOD

U današnje vrijeme rastu trendovi zdrave i kvalitetne prehrane. Ljudi sve više vode računa o tome što konzumiraju te kojim je procesima neka namirnica bila podvrgnuta, a uz to imaju i manje vremena za pripremu hrane. Upravo zbog toga raste potrošnja smoothieja, koji su nutritivno vrijedni zbog velikog udjela bioaktivnih spojeva i njihove antioksidacijske aktivnosti (Barba i sur., 2012). Smoothie se jednostavno i brzo priprema od različitih kombinacija voća, rjeđe povrća, mlijeka i mliječnih proizvoda ili vode. Osim što se može pripremiti u domaćinstvu, nalazi se i na tržištu. Takvi proizvodi moraju biti procesirani kako bi zadržali svježinu, odnosno imali dulji rok trajanja. Najčešće se vrši procesiranje toplinskim tretmanima, kao što su pasterizacija i sterilizacija, pri čemu dolazi do gubitka nutritivne vrijednosti i senzorskih značajki.

Kako bi potrošači dobili što kvalitetnije proizvode s očuvanim nutritivnim i senzorskim značajkama razvijaju se nove metode procesiranja hrane, odnosno netoplinske tehnologije. Netoplinske tehnologije javljaju se kao alternative toplinskim tretmanima. Uz upotrebu netoplinskih tehnologija kao što su, obrada pulsirajućim električnim poljem, pulsirajućim svjetlom, ultrazvukom, omogućava se očuvanje svježine, nutritivne vrijednosti i dulji rok trajanja. Jedna od tehnologija kojom se proizvodi minimalno procesirana hrana je i visoki hidrostatski tlak (Oms-Oilu i sur., 2012).

Visoki hidrostatski tlak je izvrsna nova metoda koja zamjenjuje tradicionalnu pasterizaciju i osigurava minimalne promjene senzorskih, nutritivnih i teksturnih karakteristika. Do minimalnih promjena u procesiranoj namirnici dolazi upravo zbog neznatnog povišenja temperature i iznimno kratkog vremena obrade, koje može trajati od nekoliko sekundi do 30 minuta (Bosiljkov, i sur., 2010).

Visoki hidrostatski tlak, osim što osigurava minimalne gubitke nutritivne vrijednosti i senzorskih značajki, produžuje rok trajanja i osigurava mikrobiološku kvalitetu proizvoda. U ovom radu analiziran je utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na fizikalna i mikrobiološka svojstva smoothieja. Smoothie je napravljen kombinacijom voća (jabuka, aronija), povrća (mrkva) te kokosovog mlijeka i badema. Cilj ovog rada je određivanje optimalnih fizikalnih i mikrobioloških svojstava pri čemu se postiže najbolja stabilnost smoothieja (raspodjela veličine čestica). Promatrajući dobivene smoothieje sa mikrobiološkog aspekta cilj je postići minimalne promijene senzorskih i nutritivnih karakteristika tijekom duljeg vremenskog perioda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Visoki hidrostatski tlak

Visoki hidrostatski tlak (High pressure processing – HPP ili High hydrostatic pressure – HHP) je jedna od alternativnih metoda obrade tekućih ili krutih namirnica, s ili bez ambalaže, pri tlaku od 100 do 900 MPa. Tijekom obrade dolazi do neznatnog povećanja temperature, a vrijeme obrade je od nekoliko sekundi do 30 minuta (Bosiljkov i sur., 2010). Visoki hidrostatski tlak se sve češće koristi u prehrambenoj industriji zbog činjenice da inaktivira mikroorganizme i denaturira neke enzime, a da pri tome ne utječe na senzorske i nutritivne značajke, odnosno razgradnju hranjivih tvari (Rastogi, 2013). Visoki hidrostatski tlak, koji se koristi kao alternativa za toplinske tretmane ima brojne prednosti u odnosu na toplinske tretmane (Thakur i Nelson, 1998):

- Manji utrošak energije
- Djeluje na hranu neovisno o obliku, veličini i sastavu
- Veća mikrobiološka sigurnost
- Dulji rok trajanja
- Kraće vrijeme obrade
- Niska koncentracija otpadnih produkata
- Minimalni gubitci nutritivne vrijednosti i organoleptičkih značajki

Ograničenja u primjeni tehnologije visokim hidrostatskim tlakom (Thakur i Nelson, 1998):

- Namirnice se moraju skladištiti pri niskim temperaturama
- Bakterijske spore i enzimi su otporni na djelovanje povišenog tlaka, potreban je veći tlak (1200 MPa), što poskupljuje obradu
- Visoka početna cijena opreme

### 2.1.1. Povijesni razvoj visokog hidrostatskog tlaka

Visoki hidrostatski tlak, odnosno njegov učinak, se 1883. godine prvi puta u povijesti povezuju s organizmima (Knorr, 1995). Učinak visokog hidrostatskog tlaka na hranu spominje se krajem 19. stoljeća, a otkrio ga je Bert Hite sa suradnicima na West Virginia University-u. Hite je tada upotrebljavao visoki hidrostatski tlak (do 600 MPa) kako bi očuvao kvalitetu mlijeka, a kasnije i povrća i voća (Hite, 1899; Hite i sur., 1914). Nakon toga, sve više raste interes za visokim hidrostatskim tlakom kao zamjenom za tradicionalne toplinske metode obrade hrane. U Japanu je 1992. godine došlo do velike revolucije, kada je na tržište pušten proizvod obrađen visokim hidrostatskim tlakom (Knorr, 1993). Linija revolucionarnih proizvoda uključivala je proizvode poput želea, džemova i voćnih umaka, proizvedene bez primjene povišene temperature (Thakur i Nelson, 1998). U proteklih 30-ak godina industrije uspješno primjenjuju obradu visokim hidrostatskim tlakom na hranu kako bi im očuvali senzorska, nutritivna i organoleptička svojstva (Elamin i sur., 2015).

### 2.1.2. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka

Visoki hidrostatski tlak djeluje na namirnicu sa svih strana jednoliko te ne uzrokuje oštećenja na namirnici, osim ako je namirnica koja se obrađuje šuplja ili ima praznog prostora. Tijekom procesiranja namirnice dolazi do značajnog smanjenja broja mikroorganizama i denaturacije proteina, pri čemu visoki hidrostatski tlak ne utječe na veze između molekula (Elamin i sur., 2015). Upotrebom visokog hidrostatskog tlaka može se produžiti trajnost proizvoda, kemijske reakcije koje uzrokuju redukciju vitamina i pojavu neugodnih okusa mogu biti reducirane, a patogeni mikroorganizmi mogu biti inaktivirani (Rastogi, 2013). Načela koja objašnjavaju ponašanje namirnica pod utjecajem visokog hidrostatskog tlaka su Le Chatelier-ov princip, princip mikroskopskog uređenja i izostatički princip rada (Elamin i sur., 2015).

Prema Le Chatelier-ovom principu, kada se kemijski sustav nalazi u stanju ravnoteže i na njega se djeluje nekom promjenom, na primjer djelovanje povišenog tlaka na zatvoreni sustav, on tu promjenu nastoji umanjiti popratnim reakcijama. Odnosno, pospješuju se reakcije koje vode k smanjenju volumena, dok su reakcije koje vode k povećanju volumena potisnute. Isto tako, prema Le Chatelier-ovom principu bilo koja promjena, kao što su kemijska reakcija, fazni prijelaz ili promjena molekulske konfiguracije, popraćena smanjenjem volumena, dovest će do povećanja tlaka (Pauling, 1964). Zbog tog fenomena, odnosno Le Chatelier-ovog principa, su nekovalentne veze, kao što su ionske, vodikove i hidrofobne, izrazito osjetljive na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka. Nasuprot tome,



visoki hidrostatski tlak ima neznatno djelovanje na kovalentne veze sastojaka hrane. Posljedica toga je to da su komponentne u hrani, koje imaju veliku molekulsku masu podložne promjenama funkcionalnih svojstava i konformacije, dok su komponente hrane manje molekulske mase, koje imaju mali udio sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture, neosjetljive na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka. Odnosno komponente koje su odgovorne za organoleptičke značajke i nutritivnu vrijednost, kao što su vitamini i bioaktivni spojevi, su neosjetljive na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka (Balci i Wilbey, 1999). Prema principu mikroskopskog uređenja, u sustavu gdje je konstantna temperatura, povećanje tlaka vodi k povećanju stupnja uređenosti neke molekule (Benet, 2005). Pascal-ov princip, odnosno izostatski tlak je pojava pri kojoj se tlak jednomjerno raspoređuje u svim smjerovima, neovisno o sastavu, obliku i veličini hrane koja se tretira (Yordanov i Angelova, 2010).

Tijekom obrade, rad kompresije se održava povišenjem temperature proizvoda adijabatskim zagrijavanjem. Intenzitet povišenja temperature ovisi o sastavu uzorka koji se tretira. Kod vode i namirnica koje sadrže veći udio vode iznosi 3 °C za svakih 100 MPa, ako uzorak sadrži veći udio masti, promjena temperature može biti i do tri puta veća (8–9 °C za svakih 100 MPa) (Karlović i sur., 2014). Kompresija se može odraziti na promjenu pH vrijednosti, ako dođe do sniženja pH, mikroorganizmi postaju osjetljiviji na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka, što uz povišenu temperaturu povećava učinkovitost procesa. Namirnica, to jest uzorak se tijekom dekompresije hladi na svoju početnu temperaturu, ako nije došlo do nastanka ili gubitka topline od stijenke tlačne kapilare za vrijeme faze zadržavanja tlaka (Lovrić, 2000).

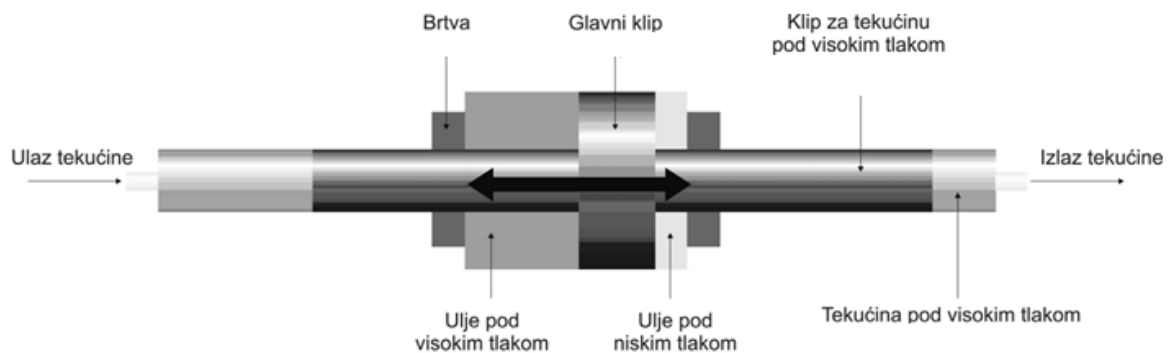
Namirnice, odnosno uzorci koji se obrađuju visokim hidrostatskim tlakom, moraju biti upakirani u fleksibilnu ambalažu, koja ima dovoljnu elastičnost za prijenos tlaka na proizvod te može osigurati visoku sposobnost brtvljenja. Odnosno, ambalaža u kojoj se obrađuju uzorci mora imati sposobnost prilagodbe na smanjenje volumena od 15 % i vraćanje u prvobitan oblik i veličinu (Hogan i sur., 2014). Za primjenu ove tehnologije najčešće se upotrebljavaju polimeri i kopolimeri. Odnosno, bočice različitih volumena od poli(vinil–alkohola)–PVAL i etilen/vinil–alkoholni kopolimer (E/VAL) (Norton i sur., 2008).

### 2.1.3. Oprema za tretiranje visokim hidrostatskim tlakom

Uređaj za obradu visokim hidrostatskim tlakom sastoji se od ovih dijelova (da Cruz i sur., 2010):

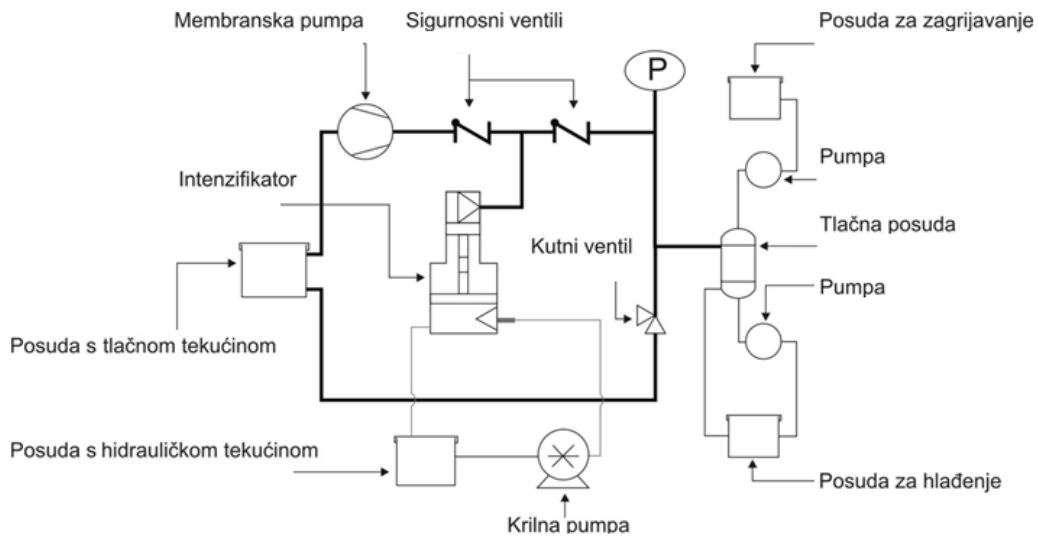
- tlačna komora
- mehanizam za zatvaranje komore
- mehanizam za brtvljenje komore dok je pod tlakom
- pumpa za generiranje visokog tlaka
- medij za prijenos tlaka
- sustav za kontrolu i praćenje tlaka i temperature

Najvažniji dio opreme je tlačna komora cilindričnog oblika, koja može podnijeti velika naprežanja. Debljina stijenke cilindra određuje maksimalni radni tlak (Elamin i sur., 2015). Visoki tlak se može proizvesti na jedan od tri načina, ali u prehrambenoj industriji koriste se dva, a to su direktna i indirektna metoda. U uređajima s direktnom metodom, volumen komore smanjuje se djelovanjem hidrauličkog tlaka na klip, odnosno ulje se pod tlakom od 20 MPa dovodi na površinu klipa i preko medija, koji je najčešće voda, prenosi radni tlak na uzorak koji se obrađuje (Slika 1). Dok se pri posrednoj, odnosno indirektnoj metodi, koristi pojačivač ili visokotlačna pumpa. Djelomično stlačena radna tekućina (smjesa vode i glikola ili voda) transportira se pomoću pumpe iz posude s tlačnom tekućinom u radni cilindar (Bosiljkov i sur., 2010).

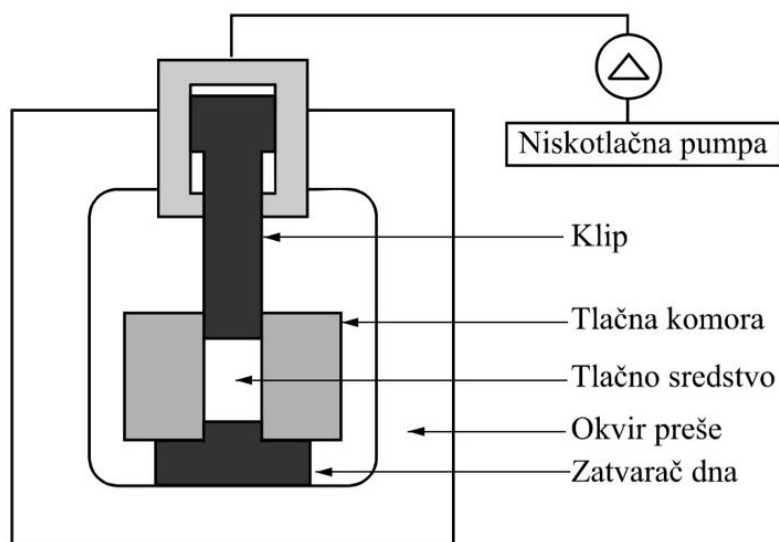


Slika 1. Visokotlačna pumpa (Bosiljkov i sur., 2010)

Postrojenja za obradu visokim tlakom mogu biti diskontinuirana, odnosno šaržna, polukontinuirana i kontinuirana (Slika 2). Pod pojmom visoki hidrostatski tlak podrazumijeva se diskontinuirana obrada (Bosiljkov i sur., 2010). Šaržni sustav (Slika 3) primjenjuje se za krute i tekuće namirnice, koje su upakirane u ambalažu. Cjelokupna obrada odvija se kroz nekoliko faza, a to su punjenje komore medijem za prijenos tlaka i materijalom koji se tretira (uzorkom), zatvaranje cilindra, kompresija, odnosno generiranje visokog tlaka, zadržavanje postignutog tlaka određeno vrijeme, dekompresija, otvaranje komore i vađenje tretiranog uzorka iz komore. Kao medij za prijenos tlaka u obradi hrane uobičajeno se upotrebljavaju voda, smjesa vode i glikola, silikonska ulja ili razrijeđeni etanol (Rasanayagam i sur., 2003).



Slika 2. Shema kontinuiranog procesa obrade visokim tlakom (Bosiljkov i sur., 2010)



Slika 3. Shema diskontinuiranog procesa obrade visokim tlakom (Lovrić, 2000)

#### 2.1.4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na mikroorganizme, enzime i nutritivnu kvalitetu

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na mikrobnu inaktivaciju ovisi o tipu mikroorganizama (kvasci, plijesni, bakterije), formi u kojoj se nalaze (vegetativne stanice, spore, gram pozitivne ili gram negativne), rodu, vrsti, soju i fazi rasta (faza prilagodbe, eksponencijalna, stacionarna, faza odumiranja). Odnosno, različiti mikroorganizmi pokazuju različitu osjetljivost na stres, koji uzrokuje visoki hidrostatski tlak (Manas i Pagán, 2005; Daryaei i sur., 2016). Uglavnom su bakterije koje su otporne na toplinu, otporne i na visoki hidrostatski tlak. Na primjer, gram pozitivne bakterije otpornije su od gram negativnih, spore su otpornije od vegetativnih stanica, stanice u eksponencijalnoj fazi rasta osjetljivije su nego one u stacionarnoj fazi (Lovrić, 2000). Za razliku od bakterija, kvasci i plijesni su osjetljiviji na stres koji uzrokuje visoki hidrostatski tlak (Daryaei i sur., 2016). Za inaktivaciju mikroorganizama odgovorna su oštećenja u različitim dijelovima stanice do kojih dolazi uslijed promjena na proteinima, ribosomima, propusnosti stanične membrane, sintezi proteina i enzimske aktivnosti (McKay i sur., 2011). Tako se uz tlak od 50 MPa može inhibirati sinteza proteina u mikroorganizmima i smanjiti broj ribosoma, uz tlak od 100 MPa može doći do denaturacije proteina, primjenom tlaka od 200 MPa nastaju oštećenja na staničnoj membrani i uništava se unutarnja stanična struktura, dok primjenom tlakova od 300 MPa i više dolazi do ireverzibilne denaturacije proteina, pucanja stanične membrane te inaktivacije

vegetativnih bakterija (bakterijske smrti) (Abe, 2007). Općenito se vegetativne bakterije, kvasci i plijesni inaktiviraju obradom na tlakovima od 200 do 700 MPa, ali bakterijske spore, koje su otporne na visoki hidrostatski tlak, ostaju neuništene čak do tlakova od 1200 MPa. Zbog toga se inaktivacija nekih mikroorganizama (vegetativnih bakterija, bakterijskih spora) postiže kombinacijom faktora, koji su karakteristični za proces, a to su vrijeme tretiranja, temperatura tretmana i adijabatsko zagrijavanje (McKay i sur., 2011).

Enzimi su kompleksni globularni proteini, koji djeluju kao katalizatori, odnosno ubrzavaju biokemijske reakcije. Tu funkciju obavljaju zbog prisutnosti aktivnog mjesta, koje ima afinitet za vezanje odgovarajuće molekule supstrata (Tsou, 1896). Važnost enzima u proizvodima na bazi voća je u tome što utječu na strukturu proizvoda (pektinmetilesteraze, celulaze, hemicelulaze) te promjenu boje, okusa i nutritivne vrijednosti proizvoda (polifenol oksidaza, peroksidaza, askorbat oksidaza) uzokovane oksidacijom (Augusto i sur., 2018). Struktura enzima, odnosno njegova stabilnost i aktivnost održava se disulfidnim vezama (sekundarna struktura) i nekovalentnim vezama (tercijarna i kvartarna struktura), kao što su vodikove, van der Walsove i hidrofobne. Neke od tih veza lako pucaju prilikom primijenjene energije, što vodi k promjeni struktura enzima. Odnosno, tlakovi od 100 MPa na dalje uzrokuju promjene u enzimskoj strukturi. Kako visoki hidrostatski tlak nema utjecaj na kovalentne veze, promjene na enzimima javljaju se u uslijed promjene tercijarne i kvartarne strukture (Augusto i sur., 2018). Ako se promjeni konformacijska struktura proteina, može doći do reverzibilnog ili ireverzibilnog gubitka biološke funkcije određenog proteina, odnosno enzima. To jest, promjenom konformacijske strukture, može doći do inaktivacije enzima (enzim gubi katalitičku aktivnost). Osim toga, i promjene u interakcijama između makromolekula i modificiranih funkcionalnih grupa mogu dovesti do inaktivacije enzima, bez obzira na to je li došlo do konformacijskih promjena ili ne (Oey, 2016).

Na nutritivnu vrijednost utječu spojevi, odnosno hranjive tvari koje se definiraju kao mikronutrijenti (minerali i vitamini) i makronutrijenti (ugljikohidrati, masti i proteini), dijele se ovisno o tome u kojoj količini su nam potrebni iz prehrane (Gibney i sur., 2009). Osim mikro i makronutrijenata, od velike važnosti postaju i bioaktivni spojevi. Bioaktivni spojevi (karotenoidi, fitosteroli, polifenoli, masne kiseline, peptidi) su fitokemikalije koje utječu na metaboličke procese i pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje (Correia i sur., 2012). Voće i povrće je izrazito bogato polifenolima, kao što su fenolne kiseline, flavonoli, flavoni, proantocijanidini, flavanoni, antocijani, katehinski monomeri, koji smanjuju rizik od pojave različitih degenerativnih bolesti, prerane smrti, kardiovaskularnih oboljenja te smanjuju upale organizma i oksidativni stres (Sánchez–Moreno i sur., 2009). Obrada visokim hidrostatskim

tlakom ima različiti utjecaj na minerale, vitamine i bioaktivne spojeve u hrani, ali su zbog minimalnog utjecaja visokog hidrostatskog tlaka na kovalentne veze sigurniji nego ostale komponente hrane. Međutim, izravna posljedica djelovanja visokog hidrostatskog tlaka na bioaktivne spojeve je promjena funkcionalnih svojstava tih sastojaka hrane, a to uključuje promjene antioksidacijske aktivnosti, kancerogene aktivnosti i biodostupnosti (Mahadevan i Karwe, 2016).

## **2.2. Pasterizacija**

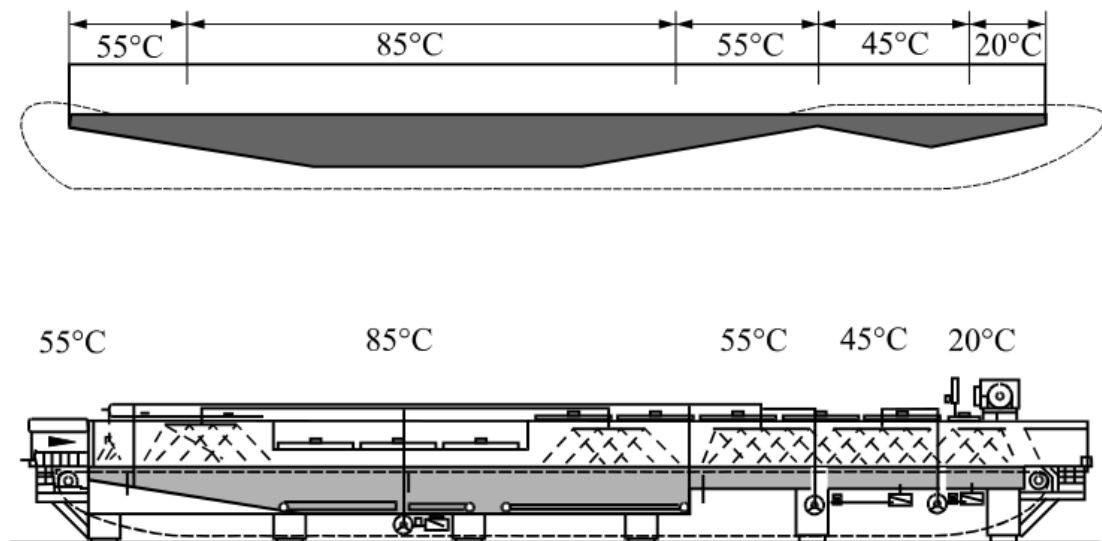
### **2.2.1. Povijesni razvoj**

Pasterizacija je obrada koja je dobila ime po francuskom kemičaru Louisu Pasteuru. Louis Pasteur je 1860-ih provodio istraživanja letalnog utjecaja povišenih temperatura na mikroorganizme u vinu, u svrhu zaštite proizvoda od kvarenja. Tim istraživanjem je potvrdio da su temperature od 50 do 60 °C dovoljne za uništavanje mikroorganizama koje djeluju na pretjeranu fermentaciju. Nakon toga, provodio je istraživanja na pivu, a ubrzo je i kiselost mlijeka povezoao s kvarenjem vina i piva. Zaključio je da sve proizlazi iz razvoja i rasta nepoželjnih mikroorganizama (Ryser, 2011).

### **2.2.2. Princip djelovanja i oprema**

Pasterizacija je relativno blagi toplinski tretman (temperatura obrade ispod 100 °C) koji se provodi u svrhu uništenja patogenih i ostalih štetnih mikroorganizama te inaktivacije enzima koji mogu uzrokovati ubrzano kvarenje proizvoda. Provodi se u svrhu produljenja trajnosti proizvoda te kako bi proizvod bio siguran za potrošača (Tratnik i Božanić, 2012). Toplinska inaktivacija bilo kojeg mikroorganizma, odnosno postizanje odgovarajućeg učinka pasterizacije zasniva se na dovoljno dugoj izloženosti pojedinog mikroorganizma dovoljno visokoj temperaturi (Ryser, 2011). Zbog toga se koriste različite kombinacije temperature i vremena obrade, na primjer niska temperatura, dugotrajno zagrijavanje (LTLT – 60 °C, 30 minuta), visoka temperatura, kratkotrajno zagrijavanje (HTST – 85 °C, 5 minuta) i ultra-visoka temperatura (UHT – 135 °C, 2 sekunde do 2 minute) (Park i sur., 2014). Režim postupka toplinske obrade ovisi o toplinskoj vodljivosti (što je veća, proces kraće traje), brzini prodiranja topline u namirnicu (ovisno o načinu prijenosa topline, stupnju punjenja ambalaže, rotacije ambalaže, veličini i obliku ambalaže) te o pH proizvoda. pH proizvoda, odnosno kiselost je važan uvjet za određivanje režima i izbora postupka toplinske obrade, jer o tome ovisi koji kontaminanti se pojavljuju u proizvodu (Lovrić, 2000). Osim toga, mikroorganizmi imaju različitu otpornost pri različitim pH vrijednostima. Toplinska otpornost bakterija veća

je oko pH 7, dok u kiselim namirnicama ( $\text{pH} < 7$ ) dolazi do brže inaktivacije mikroorganizama. Ako se pH 4,5 uzme kao granica, proizvodi se dijele na kisele ( $\text{pH} < 4,5$ ), za njih je dovoljna toplinska obrada do  $100\text{ }^\circ\text{C}$  (pasterizacija) i slabo kisele ( $\text{pH} > 4,5$ ) za koje je potrebna toplinska obrada iznad  $100\text{ }^\circ\text{C}$  (sterilizacija). Toplinska obrada proizvoda u hermetičkoj ambalaži provodi se u uređajima diskontinuiranog (vodena kupelj) ili kontinuiranog tipa (tunelski pasterizator) (Slika 4), pod povećanim ili atmosferskim tlakom (Lovrić, 2000).



Slika 4. Tunelski pasterizator (Lovrić, 2000)

### 2.3. Smoothie

Smoothie je osvježavajuće piće pripremljeno od različitih vrsta voća, voćnih sokova, rjeđe povrća, leda, jogurta ili mlijeka. Može se napraviti u domaćinstvu ili kupiti kao svježi ili pasterizirani proizvodi (Keenan, 2010). U zadnjih 10 godina takvim proizvodima je porasla popularnost jer raste svjesnost potrošača o tome što konzumiraju. U industrijskoj proizvodnji smoothieja se koriste tlakovi između 300 i 600 MPa s vremenom zadržavanja od 1 do 5 minuta (Andres i sur., 2016). Obradom smoothieja visokim hidrostatskim tlakom dolazi do inaktivacije mikrobnih vegetativnih stanica i enzima (Patterson i sur., 2012), dok se senzorska i nutritivna svojstva značajno ne mijenjaju (Rastogi i sur., 2007).

Smoothie sadrži velike količine voća i povrća te doprinosi unosu bioaktivnih komponenti u organizam. Voće je bogato fitokemikalijama, posebice fenolnim spojevima koji imaju važnu ulogu u zaštiti ploda od oksidativne razgradnje (Rastogi i sur., 2011). Osim toga, imaju i antioksidativna i protuupalna svojstva koja pozitivno utječu na zdravlje ljudi (Mertens–Talcott i sur., 2006). U industriji se kao baza za smoothie koristi voće koje je često

konzumirano (jabuka, banana, naranča), ali dodaje se i crveno voće (jagode, maline, kupine, aronija, crveno grožđe) koje zbog visoke nutritivne i senzorske vrijednosti čine smoothie privlačniji potrošačima (Hurtado i sur., 2016). U ovom radu se za pripremu smoothieja koristila jabuka kao baza, aronija, kokosovo mlijeko, mrkva i badem.

Badem (*Prunus dulcis*) je vrlo nutritivno vrijedan, bogat mononezasićenim masnim kiselinama, posebno oleinskom masnom kiselinom (C19:1), vitaminima (vitamin E) i mineralima te je dobar izvor proteina. Osim što je dobar izvor nutrijenata, badem je važan prirodni izvor antioksidansa koji pozitivno djeluju na zdravlje ljudi, utječe na snižavanje kolesterola, ima antikancerogeno djelovanje i pomaže kod prevencije kardiovaskularnih oboljenja (Shahidi i sur., 2008).

Kako bi naš proizvod bio nutritivno vrijedniji koristili smo mrkvu, koja je bogata karotenoidima. U mrkvi se nalazi najviše  $\beta$ -karotena (60–80 %), nakon njega  $\alpha$ -karotena (10–40 %), luteina (1–5 %), ostalih karotenoida (0,1–1,0 %) (Heinonen, 1990). Karotenoidi doprinose boji smoothieja, funkcionalnim svojstvima i nutritivnoj vrijednosti, odnosno pomažu kod očuvanja zdravlja. Imaju brojne zdravstvene prednosti, kao što su smanjen rizik od kardiovaskularnih bolesti, pozitivan utjecaj na vid, smanjenje rizika od pigmentacijske nepravilnosti (Tang, 2010). Iako imaju brojne prednosti, glavni nedostatak je osjetljivost na toplinu, svjetlost i kisik, zbog čega mogu biti razgrađeni tijekom toplinske obrade (Boon i sur., 2010). Za razliku od toplinske obrade, koja utječe na razgradnju karotenoida, obrada visokim hidrostatskim tlakom vodi k povećanju koncentracije pojedinih karotenoida ( $\beta$ -karotena, likopena), to je primijećeno tijekom analize smoothieja s mrkvom te voćnih sokova od mrkve i naranče (Andres i sur., 2016). Smatra se da do povećanja koncentracije pojedinih karotenoida dolazi zbog utjecaja visokog hidrostatskog tlaka na membrane biljnih stanica i induciranja denaturacije karotenoid vezujućih proteina, što vodi k povećanju njihove nutritivne vrijednosti. Osim toga, zapaženo je da tijekom skladištenja dolazi do smanjenja ukupnog udjela karotenoida, manje vrijednosti zabilježene su za uzorke obrađene toplinskom obradom. Odnosno, visoki hidrostatski tlak utječe na bolje očuvanje ukupne koncentracije karotenoida nego pasterizacija (Barba i sur., 2012).

Nadalje, kokosovo mlijeko je jedna od zamjena za kravlje mlijeko, dobiva se od plodova kokosove palme (*Cocos nucifera*, L.). Određeni dijelovi, poput kokosovih koštica i kokosove vode imaju antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antiparazitska, antioksidativna i brojna druga ljekovita svojstva (DebMandal i Mandal, 2011).

Kako bi proizvod bio privlačniji potrošačima, koristili smo aroniju. Aronija je bogata antocijaninima, proantocijinima i hidroksicinaminskom kiselinom te u manjem udjelu sadrži



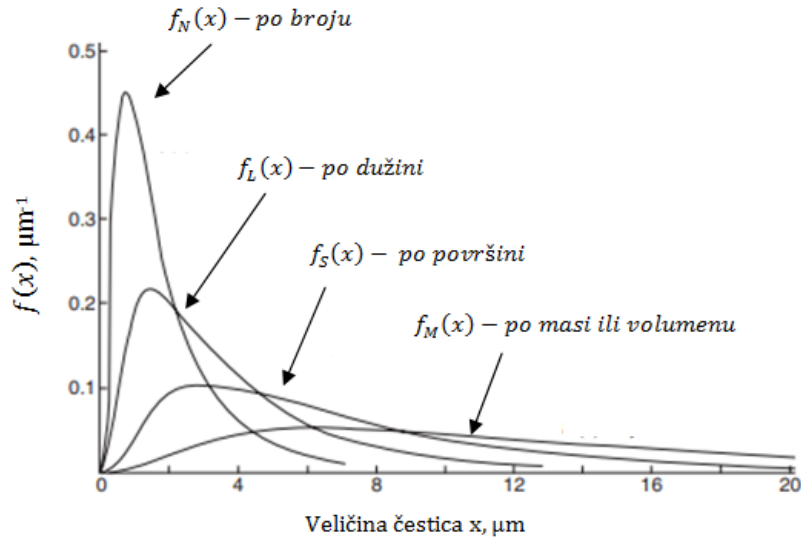
kvercetin, glikozide kvercetina i epikatehin. Pozitivni učinci aronije na zdravlje ljudi znanstveno su dokazani. Zabilježeno je antidijabetičko, antimutageno djelovanje, sprječavanje kardiovaskularnih oboljenja te pomaganje aktivnosti jetre (Denev i sur., 2012). U različitim istraživanjima dokazano je da visoki hidrostatski tlak ne utječe na stabilnost antocijanina, ali tijekom skladištenja se koncentracije antocijanina u smoothiejima i sokovima od jagode i kupine smanjuju (Zebetakis i sur., 2000).

Kao bazu smo koristili jabuku. Jabuka je voće koje je bogato pektinom, a jedne od glavnih tvari koje uzrokuju zamućenje su upravo pektini, zbog svoje netopljivosti u vodi. Pektin je složena organska tvar sastavljena od jedinica D-galakturonske kiseline, povezanih  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidnom vezom, čije su karboksilne skupine esterificirane metanolom (do 95 %). U glavnom lancu pojavljuju se i jedinice L-ramnopiranozila povezanih s  $(1\rightarrow2)$ - i  $(1\rightarrow2,4)$ -glikozidnom vezom. Na glavni lanac mogu se vezati kraći bočni lanci sastavljeni od neutralnih šećera, kao što su D-galaktoze, L-arabinoze, D-ksiloze, D-glukoze i D-manoze, koji čine 20 % molekule pektina (Van Buren, 1991). Osim što uzrokuje mutnoću sokova, koristi se kao gelirajuće sredstvo i smatra se važnim prehrambenim vlaknom te je dokazano da pozitivno djeluje na snižavanje kolesterola u krvi (Sudha i sur., 2007). Pektin se razgrađuje uz pektolitičke enzime, a u jabuci su najzastupljeniji pektin metilesteraza (PME) i poligalakturonaza (PG). PME katalizira demetilaciju pektina pri čemu nastaju deesterificirani pektin i metanol, a PG katalizira hidrolizu glikozidne veze u depolimeriziranom pektinu, te kao produkt nastaju slobodne jedinice galakturonske kiseline i karboksilne grupe (van der Broek i sur., 2000; Shook i sur., 2001). PG, kao sastavni enzim stanične stijenke, djeluje sinergistički s PME i degradira ili demetilira pektin u sokovima što dovodi do neželjenog smanjenja viskoznosti proizvoda, odnosno destabilizacije sustava i taloženja čestica mutnoće (Shook i sur., 2001). Smatra se da se povezivanjem pektina različitog stupnja esterifikacije i veličine u pektinsku mrežu povećava gustoća soka nakon obrade visokim hidrostatskim tlakom. Osim pektina, potrebno je uzeti u obzir i škrob koji može želatinizirati pri tlakovima većim od 500 MPa i vremenu obrade od oko 30 minuta te uzrokovati veću gustoću proizvoda (Oliveira i sur., 2014).

## 2.4. Raspodjela veličina čestica

Određivanje raspodjele veličine čestica kao fizikalnog svojstva je metoda na temelju koje se procjenjuje ponašanje disperznih sustava, a definiranje odgovarajuće veličine čestica neophodno je za učinkovito praćenje tehnološkog procesa i kontrolu proizvoda (Van der Meeren i sur., 2004). Disperzni sustavi koji opisuju pojedini proizvod utječu na kvalitetu okusa i njezin karakter, što se u konačnici može opisati određivanjem teksturnih karakteristika pojedinih proizvoda, dok je njezina dugotrajna stabilnost (disperzne faze u disperznom sredstvu) određena vrstom i veličinom (promjerom) čestica. Najveći učinak na senzorska i organoleptička obilježja imaju čestice veličine 0,1  $\mu\text{m}$  do 1 mm (Robins, 2006).

Čestice su trodimenzionalne strukture za koje je potrebno poznavati tri parametra (širina, dužina i visina). Pomoću tih parametara možemo u potpunosti okarakterizirati čestice. Mjerenje raspodjele veličine čestica je metoda koja je uobičajena u kemijskim, mehaničkim i fizičkim procesima, jer je povezana s fizikalnim svojstvima proizvoda i ponašanjem materijala tijekom naprezanja (Svarovsky, 2000). Čestice u hrani rijetko su istih dimenzija (veličine) (Robins, 2006). Osim nejednake veličine, mogu biti i različitih oblika, na primjer, u obliku kugle ili nepravilnog oblika. Čestice koje su u obliku kugle mogu se opisati jednom veličinom, odnosno promjerom, zbog toga što su sve dimenzije jednake. Dok se čestice nepravilnog oblika opisuju s više veličina, ovisno o tome koje se svojstvo ili dimenzija mjeri. Postoje 3 skupine veličina: ekvivalentni promjer (čestica ima ista svojstva kao sfera, isti volumen, brzinu taloženja i drugo), ekvivalentan promjer kruga (čestica ima istu površinu kao i čestica koja se promatra) i statistički promjeri (linearna dimenzija mjeri se paralelno s pravcem fiksiranja). Osim 3 skupine veličina koje se mogu mjeriti, definirane su 4 različite vrste raspodjele veličine čestica, a to su raspodjela veličine čestica prema broju, dužini, površini i masi ili volumenu (Slika 5) (Svarovsky, 2000).



Slika 5. Četiri vrste raspodjele veličine čestica (Svarovsky, 2000)

Numeričke vrijednosti dobivene mjerenjem raspodjele veličine čestica, mogu biti prikazane „Sauterovim“ srednjim promjerom. „Sauterov“ srednji promjer definiran je kao hipotetski promjer kugle koja ima isti volumni/površinski omjer kao i čestica koja je nepravilnog oblika (1) (Bosiljkov i sur., 2013):

$$d_{3,2} = \frac{1}{f} x \frac{M_{3,0}}{M_{2,0}} \quad (1)$$

gdje je:

$d_{3,2}$  – „Sauterov“ srednji promjer

$f$  – Heywood-ov faktor (karakterističan za promatrani oblik)

$M_{k,r}$  – statistički moment

Statistički moment može se izraziti (2) (Bosiljkov i sur., 2013):

$$M_{k,r} = \int_{x_{min}}^{x_{max}} x^k \times f(x) dx = \overline{x_r^k} = \frac{M_{k+r,0}}{M_{r,0}} \quad (2)$$

gdje je:

$k$  – eksponent promjera čestica  $d$

$r$  – indeks (karakteristika promatrane kategorije – broj, duljina, površina, masa)

Postoji veliki broj različitih veličina (srednjih ili prosječnih) pomoću kojih se može definirati raspodjela veličine čestica. Svrha tih veličina je prikazivanje populacije čestica s jednom vrijednosti. Osim toga, postoje tri najvažnije mjere središnje tendencije, a to su mod, srednji promjer i medijan. Mod je veličina koja se najčešće pojavljuje, odnosno veličina koja odgovara vrhu krivulje. Vrh, odnosno pik krivulje može biti monomodalni ili bimodalni. Srednji promjer je veličina do koje se dolazi računskim putem. Postoji veći broj različitih srednjih promjera, a to su aritmetički, kvadratni, kubni, harmonijski i geometrijski (Tablica 1). Medijan (50 % –tna veličina) je veličina od koje je 50 % čestica veće, a 50 % čestica manje. Medijan se najlakše određuje iz kumulativnih – postotnih krivulja, gdje odgovara vrijednosti od 50 % (Svarovsky, 2000).

Tablica 1. Vrste srednjih promjera, njihove funkcije i oznake (Svarovsky, 2000)

Funkcija $f(x)$	Srednji promjer	Oznaka
$f(x) = x$	Aritmetički	$\bar{x}_a$
$f(x) = x^2$	Kvadratni	$\bar{x}_q$
$f(x) = x^3$	Kubični	$\bar{x}_c$
$f(x) = \log x$	Geometrijski	$\bar{x}_g$
$f(x) = x^{-1}$	Harmonijski	$\bar{x}_n$

## 2.5. NIR spektroskopija

Blisko infracrvena spektroskopija, odnosno NIR spektroskopija (eng. *Near Infrared spectroscopy*) je metoda koja se koristi za kontrolu kemijskih i fizikalnih procesa te brzu kvantitativnu i kvalitativnu analizu spojeva u procesu. To je metoda koja se odnosi na valne duljine u području od 750 nm do 2500 nm gdje se pojavljuju preklapanja i kombinacije vrpce (Jednačak i Novak, 2013). U prehrambenoj se industriji pretežito koristi za senzorske i funkcionalne analize sastojaka hrane, međuprodukte procesa te gotove proizvode (Hernández Gómez i sur., 2006). Glavne prednosti NIR spektroskopije su to što omogućuje brzu (traje 15 do 90 sekundi) i nedestruktivnu in-situ analizu. Osim toga, tijekom analize se ne koriste kemijski reagensi te ne postoji opasnost od zagađenja okoliša kemijskim otpadom (Ozaki, 2016). S druge strane, NIR spektar obuhvaća veliku količinu podataka. Da bi se mogle utvrditi razlike između uzoraka, podaci NIR spektra moraju se kombinirati s drugim metodama multivarijantne analize, kao što je na primjer PCA metoda (Jednačak i Novak, 2013).

Analiza glavnih komponenti (PCA – Principal Components Analysis) je metoda koja se koristi za identificiranje specifičnih uzoraka koji se pojavljuju u eksperimentalnim podacima, kako bi se izrazile sličnosti ili razlike među tim podacima (Valinger i sur., 2011). PCA analizira serije podataka te nastoji prikazati bitne informacije iz tablice podataka i te informacije izraziti kao set novih ortogonalnih varijabli, nazvanih glavne komponente (Abdi i Williams, 2010). PCA metoda primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije detaljne analize kemijskog ili fizičkog procesa. Podaci koji se dobiju analizom mogu se prikazati točkama u n-dimenzijском prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja jednu

određenu varijablu  $x_i$  ( $i=1, 2, \dots, n$ ). Nasuprot tome, ako imamo veliki broj podataka i promatramo nekoliko varijabli, ne možemo doći do smislenog zaključka o podacima prikazanim u koordinatnom sustavu. Zato se uvode glavne komponente. Uvođenjem glavnih komponenti smanjuje se dimenzioniranost prostora i pojednostavljuje interpretacija podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, a preostale varijacije opisuju glavne komponente (PC2, PC3...) (Jednačak i Novak, 2013).

## **2.6. Umjetna neuronska mreža**

Umjetna neuronska mreža — ANN (eng. Artificial Neural Networks) predstavlja skup različitih tehnologija povezanih s umjetnom inteligencijom kojima se nastoji simulirati uloga i funkcije ljudskog mozga, odnosno, nastoji se imitirati rad čovjekova mozga. Umjetne neuronske mreže danas imaju raznoliku uporabu u različitim tehničkim disciplinama poput forenzičke analize, kontrole procesa, investicijskih analiza, prognoze vremena i klimatoloških promjena (Huang i sur., 2007). U prehrambenoj industriji primjenjuju se za analizu sigurnosti i kvalitete hrane te interpretiranje spektara i predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava pri proizvodnji hrane. Umjetne neuronske mreže primjenjuju se kod rješavanja problema klasifikacije i predviđanja velikog broja podataka kod kojih postoji nelinearna veza ulaza i izlaza. Upotreba umjetne neuronske mreže kod interpretacije podataka iz spektara (NIR spektroskopija, ultrazvučna spektroskopija i masena spektroskopija) uključuje kvantitativnu i kvalitativnu analizu (Yang i Griffiths, 1999). Pritom se kao ulazna informacija koriste izmjereni podaci cijelog spektra ili sažeti spektralni podaci, a kao izlazna informacija primjerice traženo fizikalno ili kemijsko svojstvo. Zahvaljujući fleksibilnosti i sposobnosti umjetne neuronske mreže da kombinira kompleksne skupove podataka i riješi brojne probleme na koje se može naići tijekom provedbe eksperimenata, ova tehnika se može koristiti za povezivanje velikog broja vrlo različitih karakteristika (Basheer i Hajmeer, 2000).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

Pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada, kao sirovine za pripremu smoothieja korištene su jabuke sorte „Zlatni delišes“ (50 %), sok od aronije iz OPG–a Obitelj Maletić (20 %), mrkve (20 %), bademi (5 %) i kokosovo mlijeko (5 %). Sirovine su skladištene u hladnjaku na temperaturi od 4 °C sve do trenutka obrade. Od navedenih sirovina pripremljen je smoothie, odnosno uzorci koji su tretirani visokim hidrostatskim tlakom i klasičnim postupkom pasterizacije. Smoothieju su prije i nakon obrade određena slijedeća fizikalna svojstva: boja, apsorbancija, apsorbancija nakon 2 h i apsorbancija nakon 24 h, gustoća, prividna viskoznost, pH vrijednost, raspodjela veličine čestica unutar sustava smoothieja oba filtera kao i raspodjela veličine čestica unutar sustava soka i badema kao i kokosovog mlijeka i badema. Provedena je i mikrobiološka analiza smoothieja.

### 3.2. Metode rada

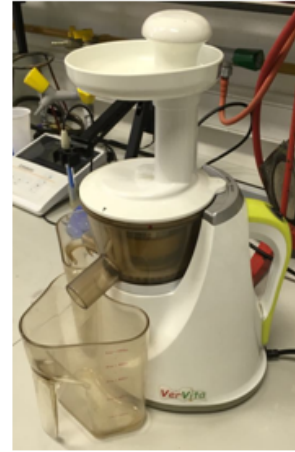
#### 3.2.1. Priprema smoothieja

Za pripremu smoothieja koristila su se dva sokovnika zbog razlike u veličini promjera filtera, kako bi dobili uzorke s manjim i većim česticama krute faze. Korišten je sokovnik „*TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38*“ (Slika 6a\*) snage 300 W, brzine okretaja 80 o min<sup>-1</sup>, promjera filtera 0,5 mm i sokovnik „*VerVita Hurom HU-100*“ (Slika 6b\*) snage 150 W, brzine okretaja 42 o min<sup>-1</sup>, promjera filtera 0,3 mm. Sokovnici rade na principu sporo rotirajućeg mehanizma prilikom čega noževi usitnjavaju voće ili povrće koje zbog centrifugalne sile odlazi na sito, sok prolazi kroz sito i skuplja se u odgovarajuću posudu. Nastala pjena tijekom cijedenja uklanja se žlicom.

Prije samog cijedenja, jabukama je uklonjena sjemena loža i peteljka, mrkve su oguljene, a bademi samljeveni u laboratorijskom mlinu s nožem „*RETSCH GM 300*“ snage 1,5 kW, brzine okretaja od 500 do 4000 o min<sup>-1</sup> u koracima od 100 o min<sup>-1</sup>. Za mljevenje badema namještena je brzina okretaja 4000 o min<sup>-1</sup>, izmjena smjera noževa odvijala se svakih 15 s, a trajanje samog mljevenja bilo je 40 s.



a\*



b\*

Slika 6. Sokovnik TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 (a\*), Sokovnik VerVita Hurom HU-100 (b\*)

*\*Slike svih mjernih uređaja korištenih u ovom radu izvorno su nastale u Laboratoriju za tehnološke operacije, Prehrambeno biotehnološkog fakulteta.*

### 3.2.2. Plan provedbe eksperimenta

Nakon obrade visokim hidrostatskim tlakom za svako promatrano fizikalno svojstvo napravljene su po tri paralelne analize. Uzorci su označeni na način koji je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Oznaka uzoraka s obzirom na promjer filtera sokovnika

OZNAKA UZORKA	d (filtera) [mm]
S <sub>0,5</sub>	0,5
S <sub>0,3</sub>	0,3

- Obrada uzoraka visokim hidrostatskim tlakom 150, 300 i 450 MPa, u trajanju od 3, 9 i 15 minuta,
- Obrada uzoraka pasterizacijom na 85 °C u trajanju od 5 minuta.

Primjer oznake uzoraka: S<sub>0,5\_0</sub> – referentni uzorak dobiven na TEFAL sokovniku; S<sub>0,5\_0\_120</sub> – referentni uzorak raspodjela veličine čestica (analiza provedena nakon 2 sata); S<sub>0,3\_0</sub> – referentni uzorak dobiven na VerVita sokovniku; S<sub>0,3\_0\_120</sub> – referentni uzorak raspodjela veličine čestica (analiza provedena nakon 2 sata); S<sub>0,5\_150\_3</sub> – TEFAL



sokovnik\_150 MPa\_3 minute obrade; **S<sub>0,3\_150\_3</sub>** – VerVita sokovnik\_150 MPa\_3 minute obrade; **S<sub>0,3\_85\_5</sub>** – pasterizirani\_85 °C\_5 minuta obrade; **S<sub>0,5\_badem\_0</sub>** – referentni uzorak dobiven na TEFAL sokovniku, bez mlijeka; **S<sub>0,3\_badem\_0</sub>** – referentni uzorak dobiven na VerVita sokovniku, bez mlijeka; **M\_badem\_0** – referentni uzorak kokosovog mlijeka i badema.

### 3.2.3. Obrada smoothieja visokim hidrostatskim tlakom

Za obradu smoothieja visokim hidrostatskim tlakom korišten je uređaj („*Stansted Fluid Power*“, Velika Britanija) (Slika 7) volumena 2 L i maksimalnog tlaka 900 MPa. Uzorci su tretirani u plastičnim bočicama veličine 200 mL, 50 mL i 20 mL, napunjenim do vrha i zatvorenim plastičnim zatvaračem. Ukupni volumen uzorka iznosio je 270 mL, ali se zbog provođenja mikrobiološke analize i NIR spektroskopije pakirao u 3 različite veličine plastičnih bočica: 200 mL za određivanje fizikalnih svojstava, 50 mL za mikrobiološku anallizu i 20 mL za NIR spektroskopiju. Podjela je napravljena kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka. Pripremljene bočice su vakumirane u predviđenu jednokratnu ambalažu u uređaju za vakuumiranje „*STATUS SV2000*“. Uzorci se nakon vakuumiranja postavljaju u radni cilindar ispunjen tlačnom tekućinom (propilen – glikol). Uzorci su obrađeni na 150, 300 i 450 MPa s duljinom obrade od 3, 9 i 15 minuta.



Slika 7. Uređaj za obradu visokim hidrostatskim tlakom "Stansed Fluid Power" (Velika Britanija)

### 3.2.4. Obrada smoothieja pasterizacijom

Za provedbu procesa pasterizacije smoothieja korišten je šaržni pasterizator „PS 100“ (Slika 8) volumena 100 L, snage grijača 6,5 kW. Uzorci su obrađeni u zatvorenim staklenim bocama veličine 500 mL, volumen uzorka iznosio je 450 mL. Pripremljene staklene boce s uzorcima stavljene su u vodenu kupelj te su osigurane metalnom pregradom kako se ne bi prevrnule. Uzorci su tretirani na temperaturi od 85 °C, u vremenu od 5 minuta.



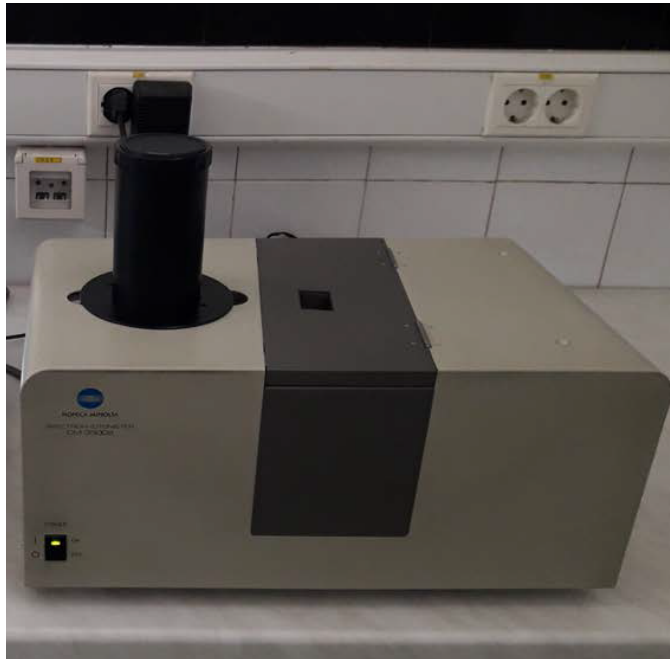
Slika 8. Šaržni pasterizator PS 100

### 3.2.5. Određivanje boje i apsorbancije

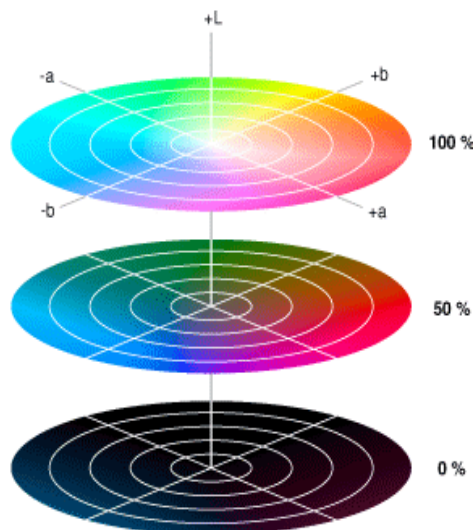
Boja i apsorbancija određivane su na spektrofotometru („Konica Minolta CM3500d“, Japan), koji je prikazan na slici 9. Prije svakog mjerenja uređaj je kalibriran. Za određivanje boje na mjernoj površini od 30 mm, uzorci su u količini od nekoliko mililitara prebačeni u Petrijeve zdjelice. Dok su za određivanje apsorbancije upotrijebljene kivete promjera 1 cm koje su napunjene uzorkom do oznake. Određivanje boje i apsorbancije vršilo se prije obrade visokim hidrostatskim tlakom i pasterizacijom te nakon obrade u intervalima od 15 minuta u ukupnom trajanju od 120 minuta i 24 h nakon obrade. Za svaki uzorak napravljena su tri paralelna mjerenja.

Prilikom određivanja boje uređaj se kalibrirao za izabranu masku otvora 30 mm. Postavljanjem geometrije na d/30, uzorak se namjesti na površinu otvora i mjere se

reflektancije u vidljivom području:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  vrijednosti (Slika 10). Sva mjerenja provedena su u (Specular Component Excluded) modu. Pomoću programskih paketa „*Spectra Magic™ NX Ver. 1.7*” i „*Color Data Software CM - S 100 W*” očitane su dobivene vrijednosti.



Slika 9. Spektrofotometar CM-3500d



Slika 10. Koordinatni sustav CIE –  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$

gdje su:

$L^*$  – koordinata svjetline s vrijednostima u rasponu od 0 do 100

$a^*$  – koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, tj. vektorom crvene boje,  $+a^*$  i vektorom komplementarne zelene boje,  $-a^*$

$b^*$  – koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, tj. vektorom žute boje,  $+b^*$  i vektorom komplementarne plave boje,  $-b^*$  sistema boje.

Nakon provedene analize, iz dobivenih vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , izračunate su  $\Delta E_{ab}^*$  (razlika u boji) vrijednosti za svaki uzorak (3):

$$\Delta E_{ab}^* = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\} \quad (3)$$

gdje je:

$\Delta E_{ab}^*$  – razlika u boji

$\Delta a^*$  – razlika između koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, tj. vektorom crvene boje,  $+a^*$  i vektorom komplementarne zelene boje,  $-a^*$

$\Delta b^*$  – razlika između koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, tj. vektorom žute boje,  $+b^*$  i vektorom komplementarne plave boje,  $-b^*$  sistema boje.

### 3.2.6. Određivanje indeksa stabilnosti smoothieja

Vrijednosti indeksa stabilnosti smoothieja (ISS) određene su na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije neposredno nakon obrade visokim hidrostatskim tlakom ili pasterizacijom i 24 h nakon obrade. Na osnovu izmjerenih vrijednosti izračuna se optička gustoća prema formuli (4):

$$T_m = \frac{2,303 \times A_x}{d_{kiv}} \quad (4)$$

gdje je:

$T_m$  – optička gustoća smoothieja

$A_x$  – apsorbancija pri 360 nm

$d_{kiv}$  – promjer kivete [m]

Na osnovu vrijednosti apsorbancije određene 24 h nakon obrade visokim hidrostatskim tlakom ili pasterizacijom, izračunata je stabilnost uzoraka. Indeks stabilnosti smoothieja (ISS) računa se prema formuli (5):

$$ISS = \frac{T_m \times \Delta t}{\Delta T_m} \quad (5)$$

gdje je:

ISS – indeks stabilnosti smoothieja

$T_m$  – optička gustoća uzorka određena neposredno nakon obrade (0 h)

$\Delta t$  – vremenski interval (24 h)

$\Delta T_m$  – promjena optičke gustoće uzorka neposredno nakon obrade i nakon 24 h

### 3.2.7. Određivanje gustoće

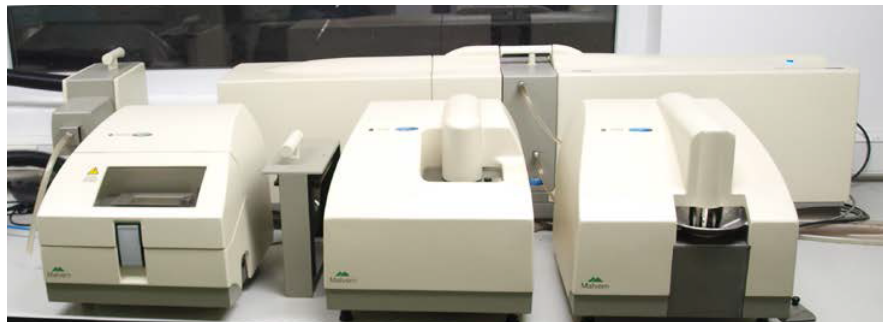
Za određivanje gustoće pripremljenih uzoraka korišten je mjerač gustoće („*Mettler Toledo DE40*“, Švicarska) (Slika 11) raspona mjerenja od  $0,0000 \text{ g cm}^{-3}$  do  $3,0000 \text{ g cm}^{-3}$ . Mjerenja su provedena pri temperaturi od  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prije mjerenja, potrebno je isprati radnu komoru s destiliranom vodom te pomoću pumpe izbaciti sadržaj kako bi se uređaj doveo u odgovarajuće stanje za mjerenje. Gustoća je mjerena injektiranjem približno 1 mL uzorka pomoću plastične šprice. Nakon postizanja zadane temperature od  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  očitava se vrijednost, s točnošću od  $0,0001 \text{ g cm}^{-3}$ .



Slika 11. Mjerač gustoće Mettler Toledo DE40, Švicarska

### 3.2.8. Određivanje raspodjele veličine čestica

Raspodjele veličine čestica određena je na uređaju Mastersizer 2000 („*Malvern Masterseizer 2000*“, Worcestershire, Velika Britanija) (Slika 12). Uređaj se sastoji od lasera, koji služi kao izvor svjetlosti točno definirane valne duljine, detektora, koji mjeri intenzitet raspršene svjetlosti pod raznim kutovima te dobavnu jedinicu koja je odgovorna za raspršivanje i ravnomjernu raspodjelu čestica u mjernoj ćeliji. Mjerenje se vrši pomoću optičkih jedinica. Osim He – Ne lasera (svjetlost crvene boje), submikronska osjetljivost povećana je i izvorom plave svjetlosti (LED izvor svjetlosti) manje valne duljine, što povećava mjerni raspon instrumenta koji iznosi 0,02 – 2000  $\mu\text{m}$ . Raspodjela veličine čestica određivana je pasteriziranom uzorku, uzorcima prije obrade visokim hidrostatskim tlakom, uzorcima neposredno nakon obrade i 2 h nakon obrade. Za određivanje raspodjele veličine čestica, uzorak se uzimao iz sredine kivete. Uzorci koji su mjereni prije obrade i neposredno nakon obrade su dobro promiješani.



Slika 12. Mastersizer 2000 s vanjskom jedinicom Hydro 2000S

Određivanje veličine čestica soka smoothieja zasniva se na principu propuštanja uzorka kroz radnu ćeliju uz pomoć vanjske jedinice Hydro 2000S. 1 do 10 mL uzorka se dodaje u komoru ispunjenu destiliranom vodom, volumena 150 mL. 2000S ima ugrađen ultrazvučni procesor za otplinjavanje mjehurića zraka unutar komore te sustav ispiranja i čišćenja destiliranom vodom. Analiza određivanja veličine čestica tekućeg uzorka je nedestruktivna metoda s velikom pouzdanošću. Raspodjela veličine globula očituje se kao grafički prikaz ovisnosti relativne učestalosti o promjeru globula izraženih u  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.9. Određivanje pH

pH vrijednost uzoraka određena je prije i neposredno nakon obrade uz pH metar („*WTW Ph 330i/SET*“). Prije mjerenja pH vrijednosti uzoraka potrebno je sondu staviti u destiliranu vodu, tek nakon toga u tekućinu čiji pH mjerimo.

### 3.2.10. Određivanje viskoznosti

Viskoznost uzoraka određena je na uređaju („*Fungilab ALPHA*“) (Slika 13a\*) uz mjerno vratilo oznake L2 (Slika 13b\*). Određivanje se vršilo prije obrade visokim hidrostatskim tlakom ili pasterizacijom te neposredno nakon obrade. Uzorci su stavljeni u čaše od 150 mL te je nakon uranjanja mjernog vratila do oznake započelo mjerenje. Mjerenje viskoznosti provedeno je pri različitim brzinama okretaja mjernog vratila od 100, 60, 50, 30 i 20 o min<sup>-1</sup>.



Slika 13. Viskozimetar Fungilab ALPHA (a\*) i L2 mjerno vratilo (b\*)

### 3.2.11. Praćenje mikrobiološke kvalitete smoothieja tretiranog visokim hidrostatskim tlakom

Za provedene analize bilo je potrebno pripremiti hranjive podloge. Podloge koje su se koristile za uzgoj test-mikroorganizama su:

- HA (hranjivi agar), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3; agar 18. pH vrijednost podloge je 7.3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min
- SA (sladni agar), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): sladni ekstrakt 6; maltoza 1,8; glukoza 6,0; kvašćev ekstrakt 1.2. pH vrijednost podloge je 4.7; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min
- LJCŽA (ljubičasto crveno žučni agar), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton 7; kvašćev ekstrakt 3; natrijev klorid 5; žučne soli 1.5; glukoza 10; neutralno crveno 0.03; kristal violet 0.002; agar 15. pH vrijednost podloge je 7.4; podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje
- Fraser bujon, sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): proteoza pepton 5; tripton 5; goveđi ekstrakt 5; ekstrakt kvasca 5; natrijev klorid 20; di-natrij hidrogenfosfat anhidrid 9.5; kalijev dihidrogenfosfat 1.35; eskulin 1; litijev klorid 3; akriflavin HCl 0.025; nalidiksična kiselina 0.02. pH vrijednost podloge je 7.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min
- PALCAM agar, sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepto-kompleks 10; triptoza 10; pepton 3; ekstrakt kvasca 3; kukuruzni škrob 1; natrijev klorid 5; glukoza 0.5; manitol 10; eskulin 0.8; željezo amonijev citrat 0.5; litij-klorid 15; fenolno crvenilo 0.08 g/l; agar 12; polimiksin B 0.01; ceftazidim 0.02; akriflavin HCl 0.005. pH vrijednost podloge je 7.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min
- RVS (rappaport vassiliadis soja) bujon, sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode) : sojin pepton 4.5; natrijev klorid 7.2; kalijev dihidrogenfosfat 1.26; di-kalij hidrogen fosfat 0.18; magnezijev klorid 13.4; malahitno zelenilo oksalat 0.036. pH vrijednost podloge je 5.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min
- XLD agar (ksiloza-lizin-deoksiholat), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): ksiloza 3.75; L-lizin 5; laktoza 7.5; saharoza 7.5; natrijev klorid 5; kvašćev ekstrakt 3; natrijev deoksikolat 1; natrijev tiosulfat 6.8; amonij željezo (III) citrat 0.8; fenol crveno 0.08; agar 14.5. pH vrijednost podloge je 4.7; Podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje



Kako bi uspješno proveli analize koristili smo ovu opremu i pribor:

- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- Inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- automatske pipete (Eppendorf, SAD)

Mikrobiološke analize provodile su se odmah nakon pripreme smoothieja, te nakon 7 i 14 dana za one mikroorganizme propisane pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za namirnice (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu; EC, 2073/2005; EC, 853/2004; EC 854/2004). Ukupan broj mikroorganizama određen je nakon inkubacije na hranjivom agaru na 37 °C tijekom 48 sati, a *Listeria monocytogenes* je određivana metodom dvostrukog predobogaćivanja u Fraser bujonu, nakon čega je uslijedio uzgoj na PALCAM agaru na 37 °C tijekom 24 sata. Enterobakterije su određene uzgojem na LJCŽA agaru na 37 °C tijekom 48 sati a *Salmonella* sp. predobogaćivanjem u RVS bujonu nakon čega je uslijedio uzgoj na XLD agaru na 37 °C tijekom 72 sata. Kvasci i plijesni određeni su uzgojem na sladnom agaru na 28 °C tijekom 48 sati. Mikrobni rast određen je brojanjem poraslih kolonija, a rezultati su izraženi kao CFU mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.12. NIR spektroskopija

Za snimanje uzoraka u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm korišten je NIR-128-1.7USB/6.25/50µm skenirajući monokromator (Control Development, SAD) s instaliranim pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development, SAD). Svaki uzorak je prethodno dobro homogeniziran te je sniman u plastičnoj kiveti od 3 mL. Pripremljene kivete postavljane su na postolje s poklopcem u svrhu sprječavanja utjecaja vanjskog izvora svjetla. Svaki uzorak snimljen je po 5 puta. Podaci su pohranjeni kao .xls datoteke u softwareu Microsoft Office Excel te kasnije korišteni za obradu podataka PCA metodom.

### 3.2.13. Analiza glavnih komponenti- PCA

Za obradu podataka sakupljenih upotrebom NIR spektara korištena je kemometrijska metoda analize glavnih komponenti (PCA). Analiza glavnih komponenti koristi se kako bi se iz velikog skupa varijabli izdvojile specifične informacije, odnosno kako bi se veliki skup varijabli smanjio na mali skup koji još uvijek sadrži većinu informacija velikog skupa. Takvo izdvajanje olakšava nam uočavanje sličnosti i razlike među podacima na temelju njihovog

međusobnog razdvajanja i grupiranja. Najznačajnije informacije, koje su dobivene kao rezultat mjerenja apsorpcije (u raspona valnih duljina 904 – 1699 nm), pretvorene su u skup novih ortogonalnih varijabli koje zovemo glavne komponente ili faktori (Abdi i Williams, 2010). Za analizu podataka NIR spektra PCA metodom korišten je software Statistica 10.0 (StatSoft, SAD).

#### 3.2.14. Umjetne neuronske mreže

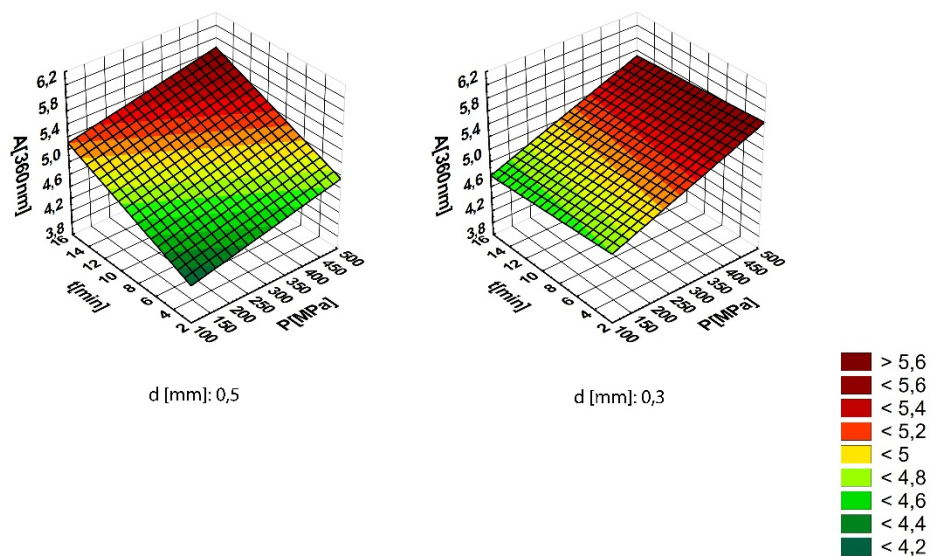
Umjetne neuronske mreže korištene su kako bi se na temelju podataka iz NIR spektra predvidjela fizikalna svojstva smoothieja (izlazne varijable) na bazi jabuke, dobivenog na filterima različite veličine. Razvijene su višeslojne perceptronske mreže u softveru Statistica v.10.0 (StatSoft, Tulsa, USA) koje su sadržavale 4 – 11 neurona u skrivenom sloju. Na temelju PCA analize odabrano je prvih 10 faktora koji su korišteni kao ulazne varijable i koji su bili odgovorni za 76,03 % varijabilnosti u podacima. Vježba umjetne neuronske mreže (ANN) provedena je s odvajanjem podataka u trening, test i validaciju u 4 različita omjera (60:20:20, 50:30:20, 70:20:10 I 70:15:15) od kojih se omjer 70:15:15 pokazao kao najprikladniji. Izvedba modela ocjenjena je na temelju vrijednosti  $R^2$  i srednjih kvadratnih pogrešaka (RMSE) za treniranje, testiranje i validaciju.

#### 3.2.15. Statistička analiza

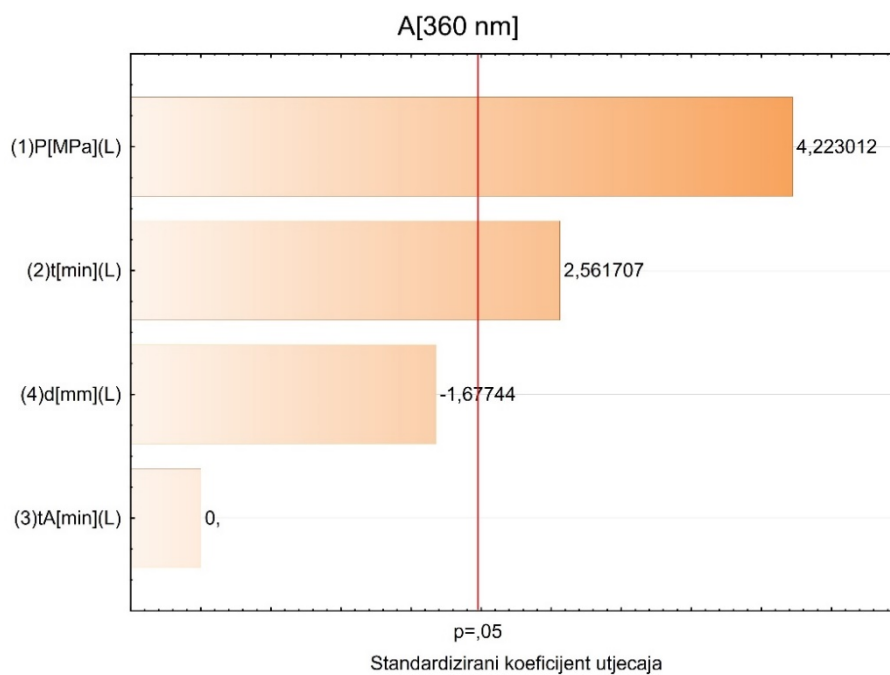
Rezultati dobiveni u ovom radu obrađeni su pomoću programskog paketa “*Statistica 12*”. Statistička značajnost utjecaja procesnih parametara na parametre deskriptivne statistike određena je analizom varijance (ANOVA) i multivarijantne analize varijance (MANOVA) i izražena je preko p – vrijednosti. Svi članovi koji imaju ANOVA, p – vrijednost nižu od 0,05 ( $p < 0,05$ ; 95 % – tna razina signifikantnosti) uzeti su u obzir i razmatranje.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

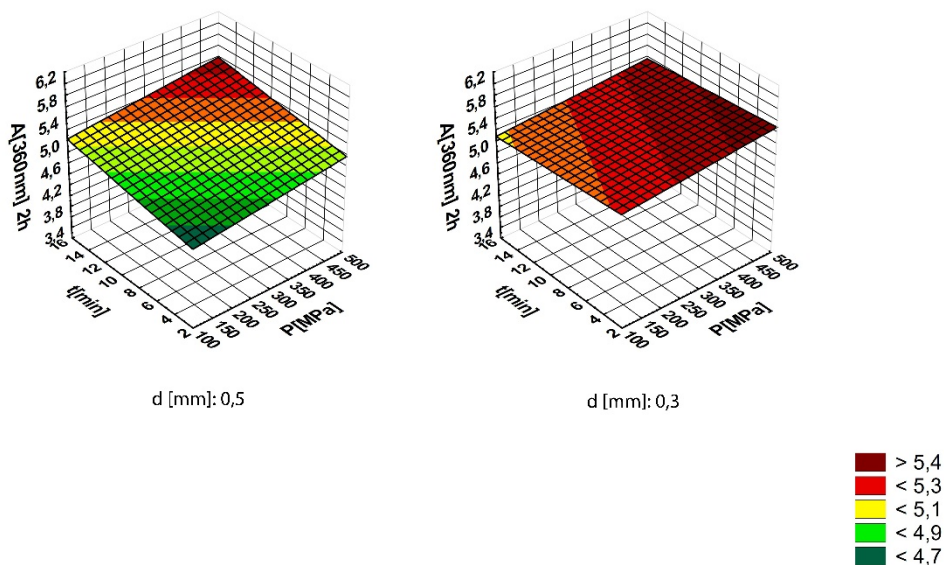
Cilj ovog diplomskog rada bila je odrediti utjecaj visokog hidrostatskog tlaka ( $P$ ), vremena obrade kao ( $t$ ), intervalnog vremena nakon 2 h ( $t_A$ ), promjera otvora filtera ( $d$ ) na smoothieje čija je baza svježi sok od jabuke kojeg karakterizira različita veličina pulpe koja je presudna u karakterizaciji stabilnosti tako dobivenog proizvoda. Osim definiranja fizikalnih svojstava provedena je i mikrobiološka analiza s ciljem dobivanja proizvoda s produljenom trajnosti i svježinom i minimalnih promjena nutritivnih i senzorskih obilježja. Rezultati su prikazani 3D – kategorijskim dijagramima s odgovarajućim Pareto dijagramima (prikazom  $\beta$ -koeficijenta utjecaja), kako bi se nakon statističke obrade dao što bolji uvid u značajnost razine promjene promatranih fizikalnih svojstava smoothieja (Slike 14 – 26). Preko vrijednosti  $\beta$  – standardiziranog koeficijenta, izražena je razina utjecaja ANOVA brojanom vrijednošću. Koeficijenti s višom vrijednosti pokazuju veći utjecaj procesnih parametara na pojedino fizikalno svojstvo, dok predznak određuje promjenu promatranog fizikalnog svojstva u smislu povećanja ili smanjenja izlazne veličine. Raspodjela veličine čestica prikazana je frekvencijskim krivuljama odnosa relativne učestalosti o promjeru čestica smoothieja (Slike 27 – 40), a rezultati indeksa stabilnosti, kolorimetrijske analize, mikrobiološke analize i NIR spektroskopije prikazani su u tablicama 3 – 10.



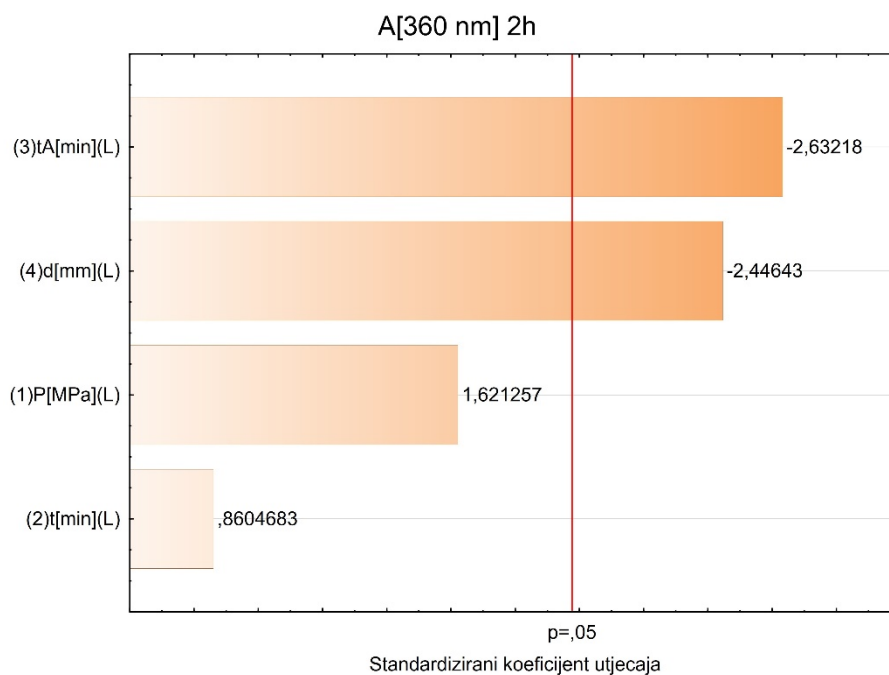
Slika 14. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na apsorbanciju (360 nm) smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$



Slika 15. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na apsorbanciju (360 nm) smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$  izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

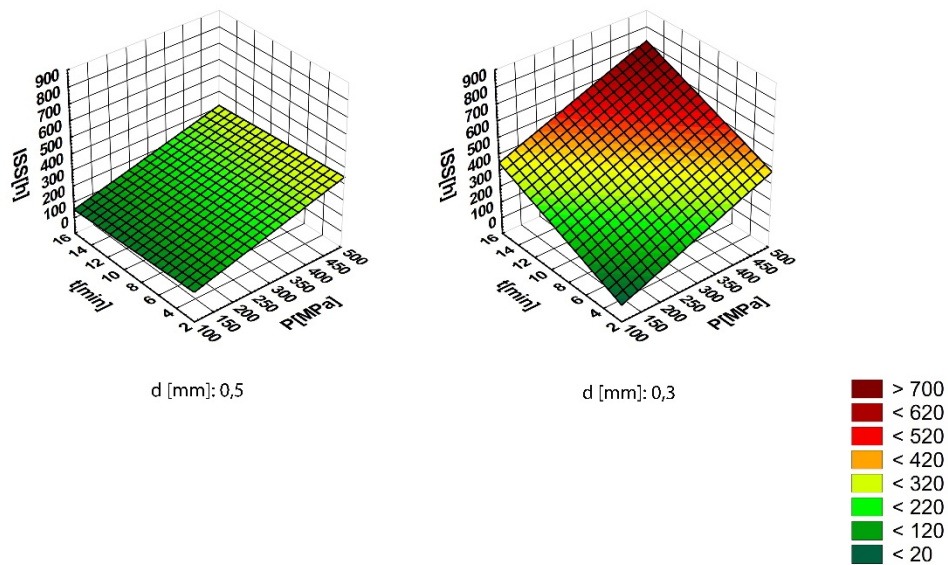


Slika 16. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na apsorbanciju (360 nm) nakon 2 h, smoothieja S<sub>0,5</sub> i S<sub>0,3</sub>

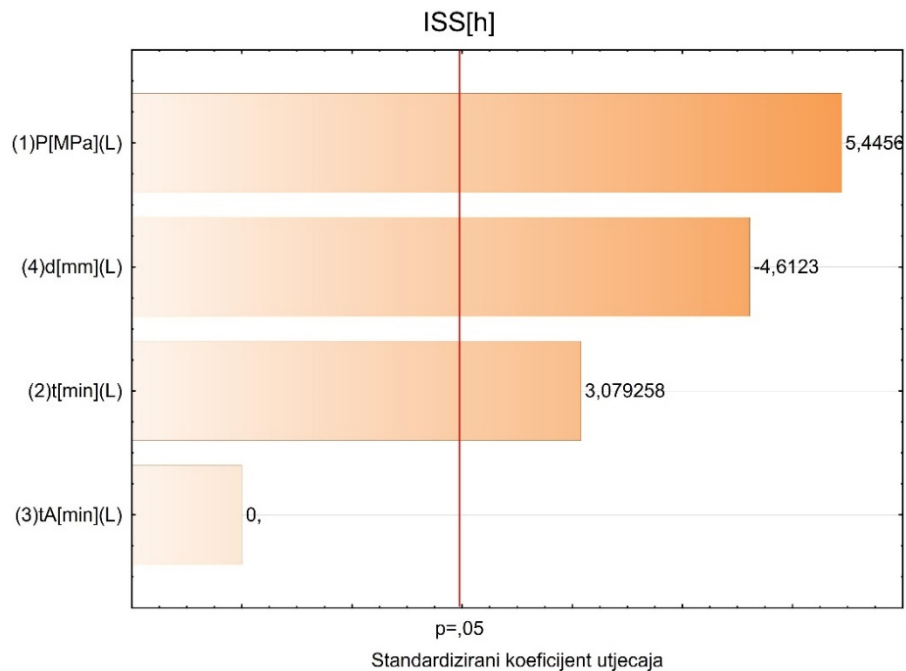


Slika 17. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na apsorbanciju (360 nm) nakon 2 h, smoothieja S<sub>0,5</sub> i S<sub>0,3</sub> izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

Intervalno vrijeme nakon obrade pokazuje trend veće stabilnosti unutar prvog sata mjerenja kao i nešto stabilniji uzorak smoothieja dobivenog filterom promjera 0,3 mm što je u skladu s negativnim vrijednostima koeficijenta utjecaja dobivenih ISS vrijednosti za oba smoothieja.



Slika 18. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na ISS [h], smoothieja S<sub>0,5</sub> i S<sub>0,3</sub>

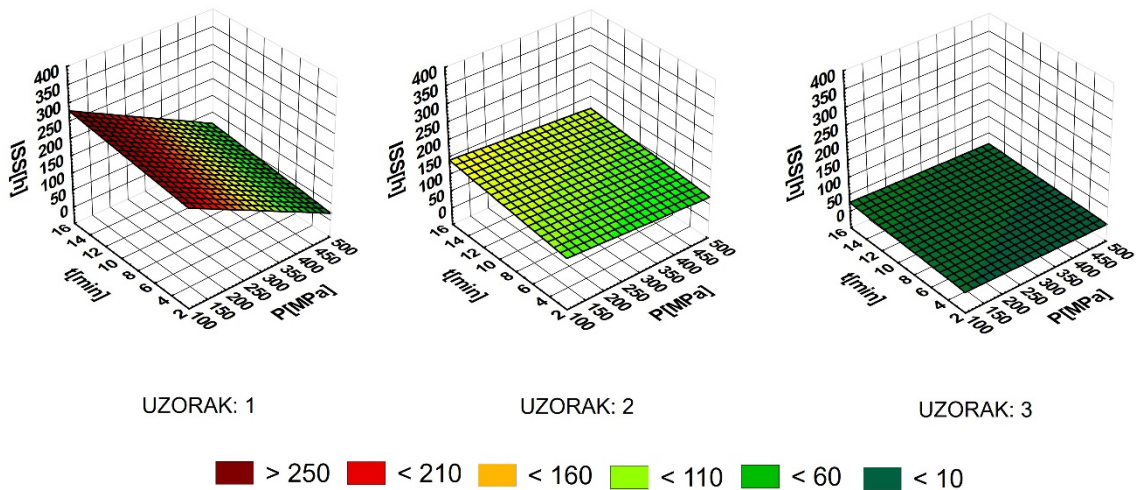


Slika 19. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na ISS [h], smoothieja S<sub>0,5</sub> i S<sub>0,3</sub> izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

Tablica 3. Izračunate vrijednosti indeksa stabilnosti smoothieja (ISS) dobivenog na filteru 0,3 i 0,5 mm.

UZORAK	ISS(h)	UZORAK	ISS(h)
S <sub>0,5_0</sub>	106,80	S <sub>0,3_0</sub>	84,32
S <sub>0,5_85_5</sub>	84,00	S <sub>0,3_85_5</sub>	192,00
S <sub>0,5_150_3</sub>	179,61	S <sub>0,3_150_3</sub>	168,12
S <sub>0,5_150_9</sub>	142,88	S <sub>0,3_150_9</sub>	422,86
S <sub>0,5_150_15</sub>	52,84	S <sub>0,3_150_15</sub>	538,56
S <sub>0,5_300_3</sub>	78,86	S <sub>0,3_300_3</sub>	108,43
S <sub>0,5_300_9</sub>	220,62	S <sub>0,3_300_9</sub>	152,73
S <sub>0,5_300_15</sub>	139,74	S <sub>0,3_300_15</sub>	129,57
S <sub>0,5_450_3</sub>	80,79	S <sub>0,3_450_3</sub>	364,09
S <sub>0,5_450_9</sub>	507,92	S <sub>0,3_450_9</sub>	685,72
S <sub>0,5_450_15</sub>	432,71	S <sub>0,3_450_15</sub>	757,89

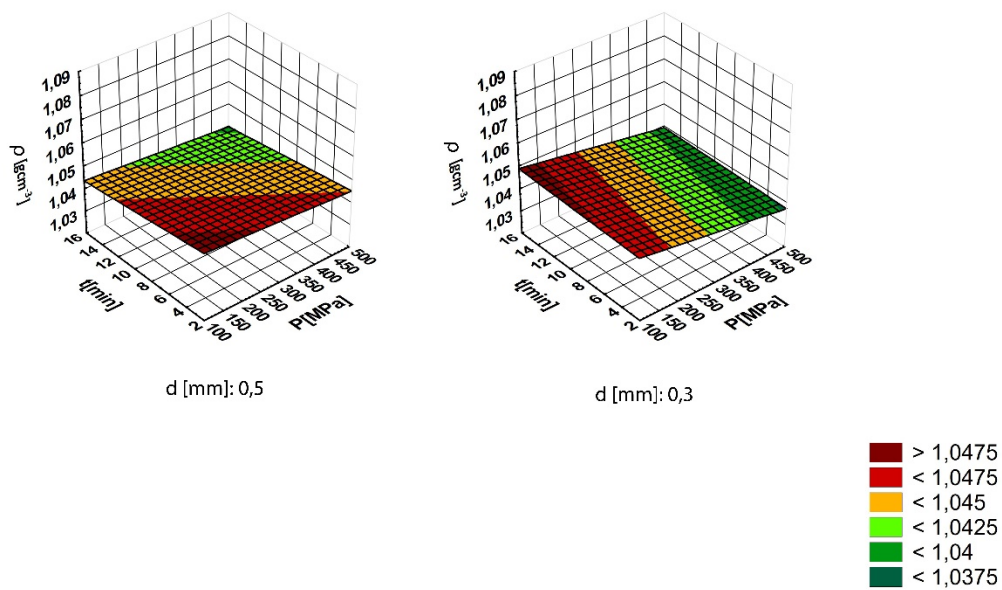
Utjecaj viših vrijednosti hidrostatskog tlaka i vremena obrade rezultirao je povećanjem vrijednosti apsorbancije neposredno nakon obrade kod oba smoothieja S<sub>0,5</sub> i S<sub>0,3</sub>. Budući da se mjerila intervalna vrijednost apsorbancije svakih 15 minuta unutar 2 sata značajniju promjenu ove vrijednosti moguće je primijetiti kod filtera S<sub>0,3</sub> što je u izravnoj korelaciji sa statistički značajnom promjenom vrijednosti ISS kod smoothieja dobivenog filterom S<sub>0,3</sub>. Prave vrijednosti ISS dobivene su na temelju izmjerene vrijednosti apsorbancije nakon 24 sata koje su bliske izračunatim vrijednostima ISS na temelju izmjerenih vrijednosti intervalne apsorbancije. Iz Pareto dijagrama (Slika 19) intervalne apsorbancije (2h) negativni koeficijent utjecaja promjera filtera ukazuje na konačnu veću stabilnost smoothieja dobivenih filterom 0,3 mm, isti trend vidljiv je i iz dijagrama za ISS (Slika 18). Kod smoothieja S<sub>0,5</sub> vrijednosti ISS kreću se u intervalu od 50 – 450 sati, dok se kod S<sub>0,3</sub> vrijednosti kreću u intervalu od 50 – 750 sati. Uspoređujući dobivene vrijednosti s referentnim vrijednostima S<sub>0,5\_0</sub> = 106,8 h; S<sub>0,3\_0</sub> = 84,32 h, vidljiva su veća pozitivna odstupanja u maksimalnim vrijednostima ISS kod smoothieja dobivenog filterom većeg promjera. Uspoređujući vrijednosti ISS pasteriziranog uzorka S<sub>0,5\_85\_5</sub> = 84,00 h i S<sub>0,3\_85\_5</sub> = 192,00 h vidi se značajno povećanje indeksa stabilnosti obrađenih uzoraka u odnosu na konvencionalni postupak toplinske obrade. Kod oba filtera najveća stabilnost smoothieja dobiva se pri tlaku od 450 MPa i vremenu obrade 9 minuta (Tablice 3).



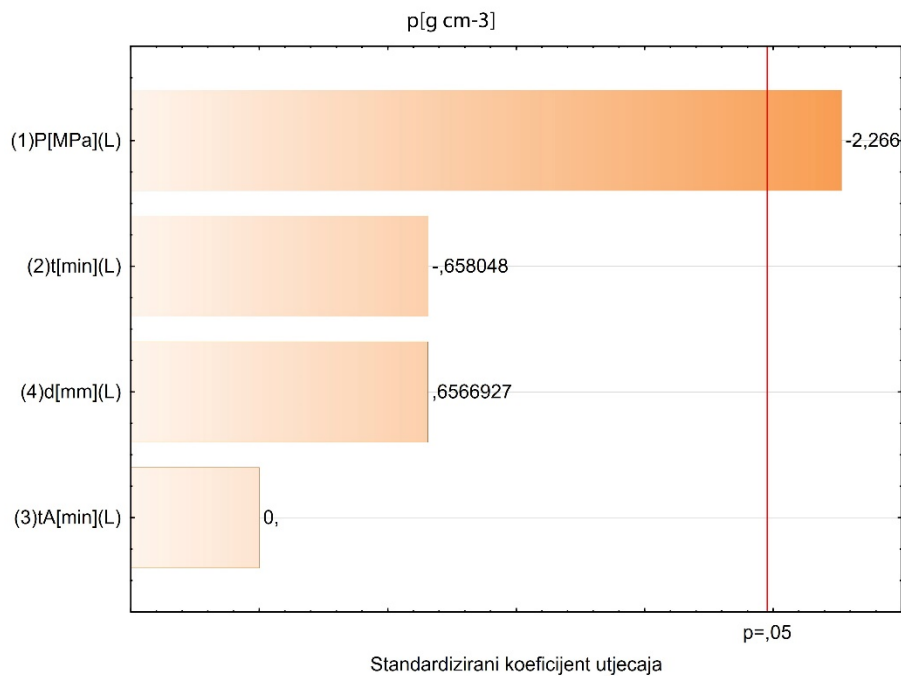
Slika 20. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na odabrane sustave disperzne faze u disperznom sredstvu (*uzorak 1:  $S_{0,5\_badem}$  ; uzorak 2:  $S_{0,3\_badem}$ ; uzorak 3:  $M\_badem$* )

Kako bi se dao što bolji uvid u složenost ovakvog višekomponentnog sustava i utjecaja pojedinih komponenti na stabilnost (sokovi s različitom raspodjelom čestica pulpe, kokosovog mlijeka i usitnjenog badema kao krute faze) napravljena je parcijalna raspodjela veličine čestica kako bi se utvrdilo koja je od tekućih faza najbolji nosač krute faze i koja od tih faza najviše doprinosi stabilnosti ovako pripremljenih smoothieja. Obzirom na različitost fizikalnih svojstava komponenti smoothieja bez obzira na veličinu udjela pojedine komponente odabrani su sustavi disperzne faze u disperznom sredstvu prikazane na Slici 20 (*uzorak 1:  $S_{0,5\_badem}$  ; uzorak 2:  $S_{0,3\_badem}$ ; uzorak 3:  $M\_badem$* ). Iz slike 20 vidljivo je da se disperzija čestica usitnjenog badema najbolje stabilizira u uzorku 1 dok se kod uzorka 3 stabilnost kreće u intervalu od 0 – 50 sati.





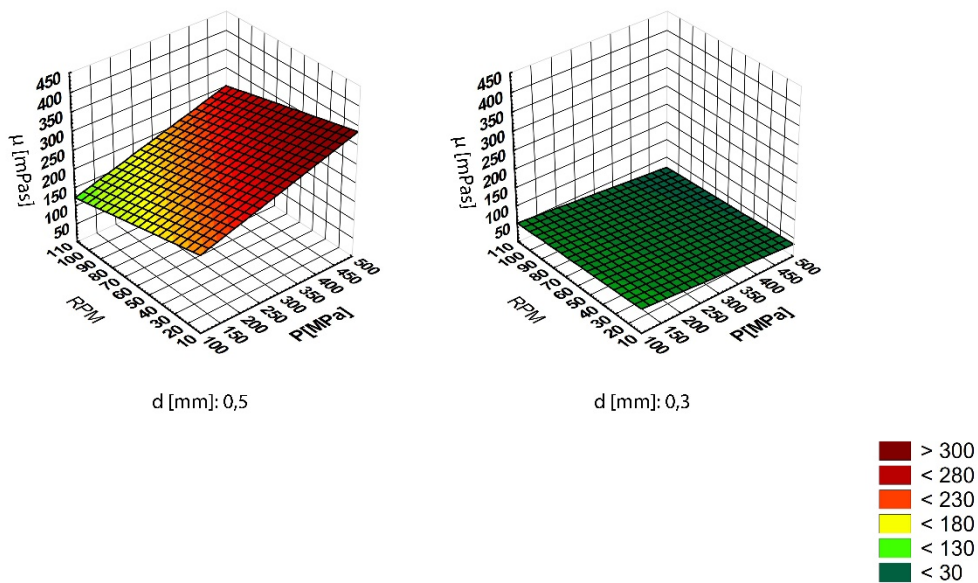
Slika 21. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na gustoću [ $\text{g cm}^{-3}$ ] smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$



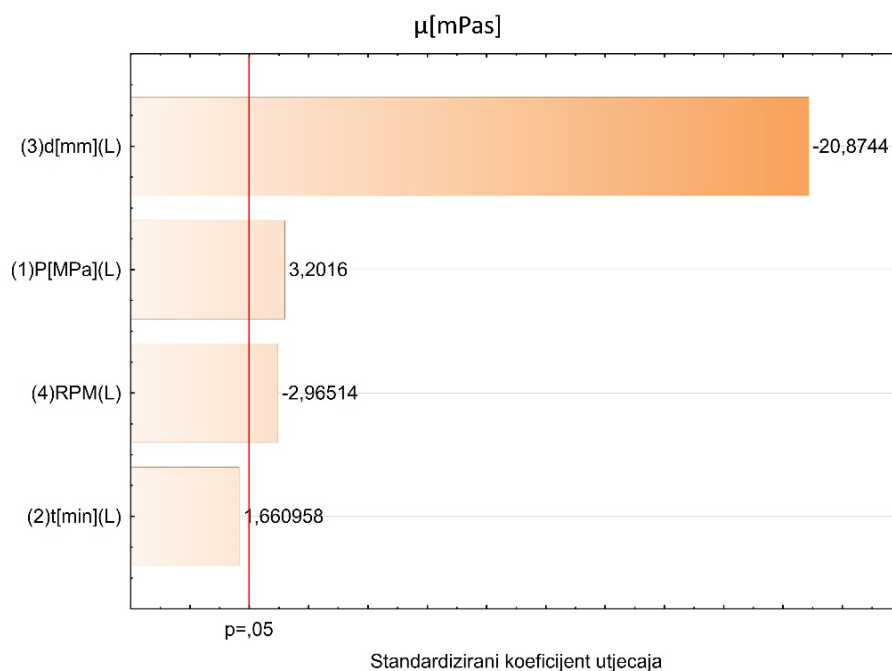
Slika 22. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na gustoću [ $\text{g cm}^{-3}$ ], smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$  izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

Iz dobivenih rezultata (Slika 21) može se primijetiti da se dobivene vrijednosti gustoće za  $S_{0,3}$  i  $S_{0,5}$  kreću u intervalu od  $1,0374 - 1,0475 \text{ g cm}^{-3}$ . Unatoč različitoj raspodjeli veličine čestica uzoraka utjecaj procesnih parametara pokazao je minimalan utjecaj nižih vrijednosti visokog hidrostatskog tlaka na povećanje gustoće. Budući da vrijeme obrade kao i promjeri filtera nemaju značajan utjecaj na promjenu gustoće, dobivene vrijednosti  $S_{0,5}$  kreću se do ili malo iznad  $1,045 \text{ g cm}^{-3}$ , dok se kod  $S_{0,3}$  kreću do ili malo iznad vrijednosti  $1,047 \text{ g cm}^{-3}$ .

Osim toga, nema velike razlike između gustoće referentnih uzoraka i uzoraka obrađenih visokim hidrostatskim tlakom i pasterizacijom. Slične rezultate dobili su i Hurtado i sur. (2015) kod obrade smoothieja (sok jabuke, sok naranče, jagode, cijele jabuke, banane) tlakovima od 350, 450 i 600 MPa oko 5 minuta i toplinskom obradom na  $85 \text{ °C}$  tijekom 7 minuta.

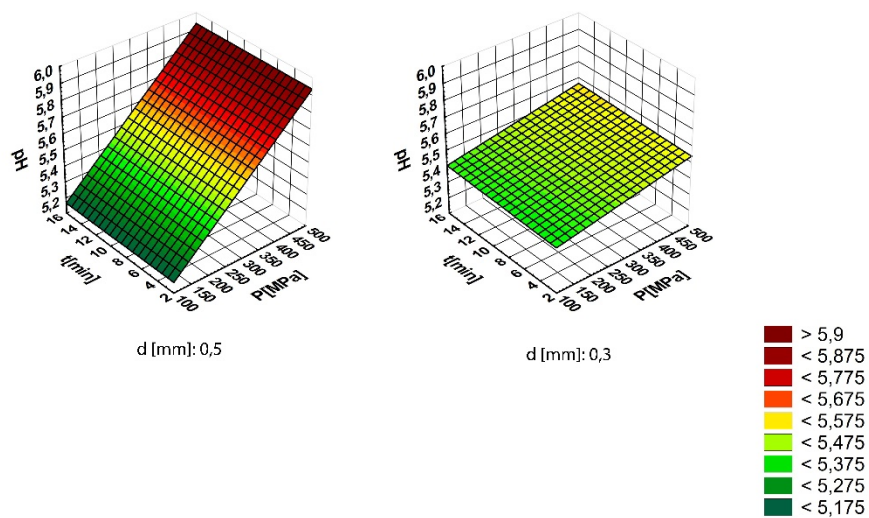


Slika 23. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na prividnu viskoznost [mPas], smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$

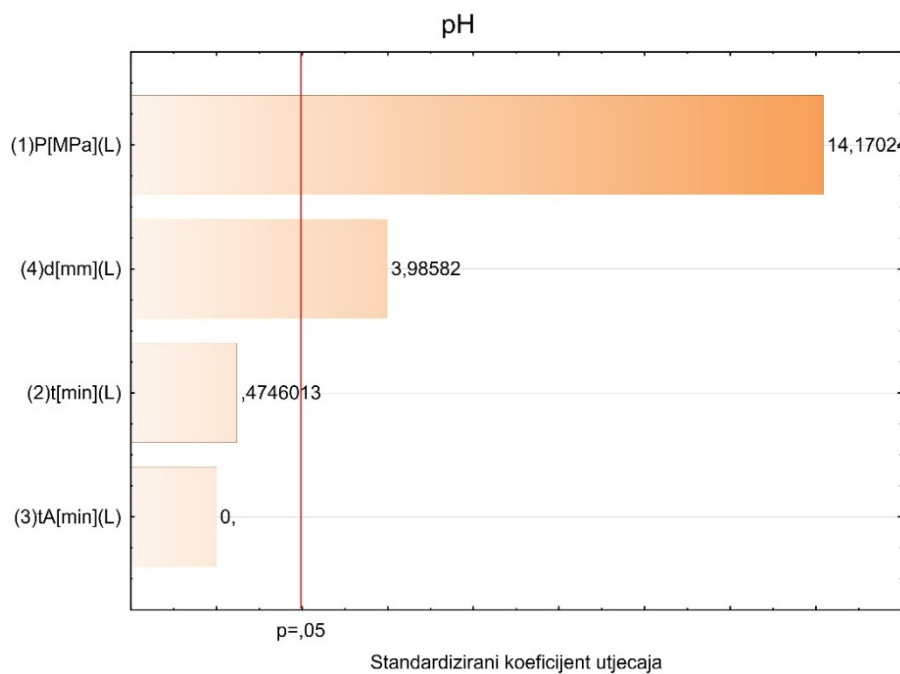


Slika 24. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na prividnu viskoznost [mPas], smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$  izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

Izmjerene vrijednosti prividne viskoznosti ukazuju na značajno smanjenje primjenom filtera 0,3 mm. Isto tako, primjetan je utjecaj na prividnu viskoznost povećanjem vrijednosti hidrostatskog tlaka dok vrijeme obrade nema značajan utjecaj. Slične rezultate dobili su i Hurtado i sur. (2015), osim toga, primijećeno je i da je prividna viskoznost toplinski obrađenih uzoraka nešto veća od uzoraka obrađenih visokim hidrostatskim tlakom. Nasuprot tome, Keenan i sur. (2012) nisu primijetili promjene prividne viskoznosti između smoothieja obrađenih visokim hidrostatskim tlakom i toplinskom obradom. Budući da je prividna viskoznost određena pri pet vrijednosti smičnih brzina iz slike 23 može se primijetiti utjecaj povećanja viskoznosti pri nižim smičnim brzinama kod uzoraka dobivenih filterom 0,5 mm. Obzirom na definirani sastav i fizikalna svojstva ovako pripremljenih smoothieja veća razina osjetljivosti (prag naprezanja) postiže pri smičnim brzinama od 20 – 50 s<sup>-1</sup>.



Slika 25. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na pH vrijednost smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$



Slika 26. Pareto dijagram – utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na pH vrijednost, smoothieja  $S_{0,5}$  i  $S_{0,3}$  izraženog preko standardiziranog koeficijenta utjecaja ( $\beta$ )

Na promjenu pH vrijednosti značajan utjecaj ima povećanje vrijednosti tlaka kod oba smoothieja. Ovaj utjecaj posebno je izražen kod smoothieja dobivenih filterom 0,5 mm što se vidi na slici 26. Vrijeme obrade kao i intervalno vrijeme obrade nemaju značajan utjecaj na promjenu pH vrijednosti.

Hurtado i sur. (2015) nisu primijetili promjene pH vrijednosti kod obrađenih i neobrađenih uzoraka smoothieja, kao ni Bull i sur. (2004) kod analize soka od naranče kao i Barba i sur. (2013) kod analize soka od kupine.

Tablica 4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  i  $\Delta E_{ab}^*$  vrijednosti smoothieja dobivenog filterom 0,5 mm

Uzorak	t/h	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E_{ab}^*$
$S_{0,5\_0}$	0	35,03	12,93	1,52	/
	24	37,00	8,37	7,57	/
$S_{0,5\_85\_5}$	0	40,56	9,37	1,93	6,60
	24	40,72	6,57	4,17	5,25
$S_{0,5\_150\_3}$	0	38,33	11,67	1,40	3,54
	24	41,54	8,67	7,31	4,56
$S_{0,5\_150\_9}$	0	48,44	13,20	0,25	3,65
	24	43,88	8,99	9,66	7,21
$S_{0,5\_150\_15}$	0	38,54	12,23	1,14	3,60
	24	42,89	8,50	9,51	6,20
$S_{0,5\_300\_3}$	0	41,57	10,67	2,34	6,97
	24	51,77	8,80	11,24	6,03
$S_{0,5\_300\_9}$	0	38,21	11,75	-0,54	4,55
	24	40,81	8,53	9,99	4,51
$S_{0,5\_300\_15}$	0	36,46	11,73	0,15	2,31
	24	39,35	8,16	8,46	2,52
$S_{0,5\_450\_3}$	0	42,53	11,51	1,38	7,63
	24	42,63	8,48	10,79	6,48
$S_{0,5\_450\_9}$	0	40,78	12,45	1,37	5,78
	24	42,81	8,97	10,70	6,60
$S_{0,5\_450\_15}$	0	42,70	11,95	-0,52	8,00
	24	42,64	8,69	20,81	6,51

Tablica 5. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i vremena obrade na  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  i  $\Delta E_{ab}^*$  vrijednosti smoothieja dobivenog filterom 0,3 mm

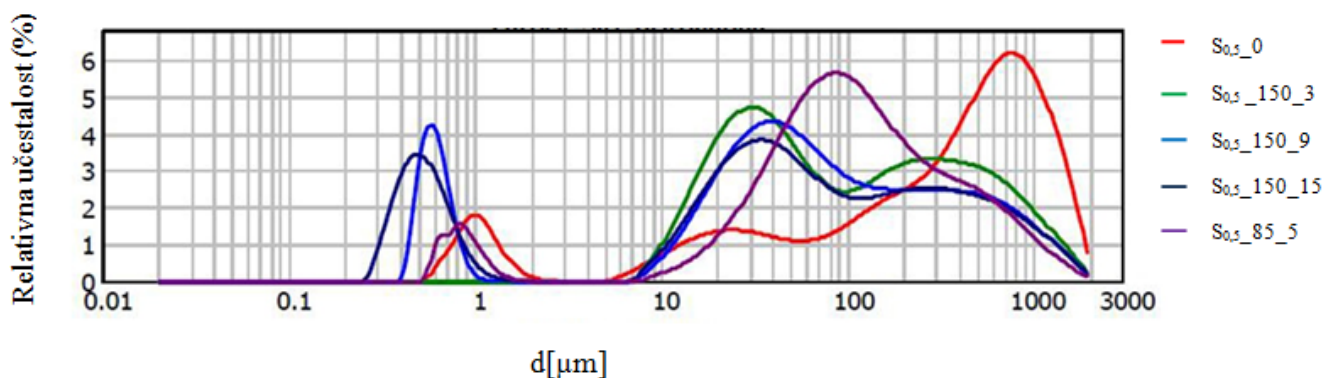
Uzorak	t/h	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E_{ab}^*$
S <sub>0,3_0</sub>	0	31,43	11,29	3,85	/
	24	35,35	8,04	7,84	/
S <sub>0,3_85_5</sub>	0	39,31	9,39	1,94	8,32
	24	40,92	7,60	8,57	5,64
S <sub>0,3_150_3</sub>	0	51,20	8,25	3,30	10,25
	24	43,53	6,51	5,23	8,73
S <sub>0,3_150_9</sub>	0	40,62	8,53	3,88	9,59
	24	42,13	8,00	9,56	7,00
S <sub>0,3_150_15</sub>	0	40,97	9,25	2,18	9,90
	24	35,72	10,27	11,88	4,63
S <sub>0,3_300_3</sub>	0	39,96	9,45	1,99	8,92
	24	42,53	7,32	3,61	8,37
S <sub>0,3_300_9</sub>	0	40,42	9,07	2,13	9,42
	24	42,42	7,90	8,10	7,08
S <sub>0,3_300_15</sub>	0	40,33	8,80	2,42	9,35
	24	42,42	7,54	7,67	7,10
S <sub>0,3_450_3</sub>	0	43,09	8,26	3,32	12,05
	24	44,82	7,98	10,39	9,61
S <sub>0,3_450_9</sub>	0	39,44	8,55	1,43	8,80
	24	41,33	6,85	2,71	7,97
S <sub>0,3_450_15</sub>	0	39,66	8,22	1,21	9,17
	24	40,79	6,94	3,50	7,05

U tablicama 4 i 5 prikazani su rezultati promjene parametara boje uzoraka smoothieja, odnosno  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti, te izračunate  $\Delta E_{ab}^*$  vrijednosti. Može se primijetiti kako u 24 h dolazi do porasta  $L^*$  (lightness) vrijednosti u oba uzorka te da svi uzorci koji su tretirani visokim hidrostatskim tlakom i pasterizacijom imaju veće  $L^*$  vrijednosti od netretiranih uzoraka. To su dokazali i Andres i sur. (2016) obradom smoothieja visokim tlakom pri 450 i 600 MPa. Nasuprot tome, kod soka od naranče pomiješanog s mlijekom, obrađenog visokim hidrostatskim tlakom, primijećeno je smanjenje  $L^*$  vrijednosti (Barba i sur., 2012) zbog razlaganja molekula kazeina na manje molekule, što rezultira većoj prozirnosti mlijeka. Cao i sur. (2012) su dokazali da se tijekom skladištenja, kroz 2 mjeseca, obrađenog mutnog soka od jagode (600 MPa tijekom 4 min)  $L^*$  vrijednost postepeno smanjila kao i kod netretiranog

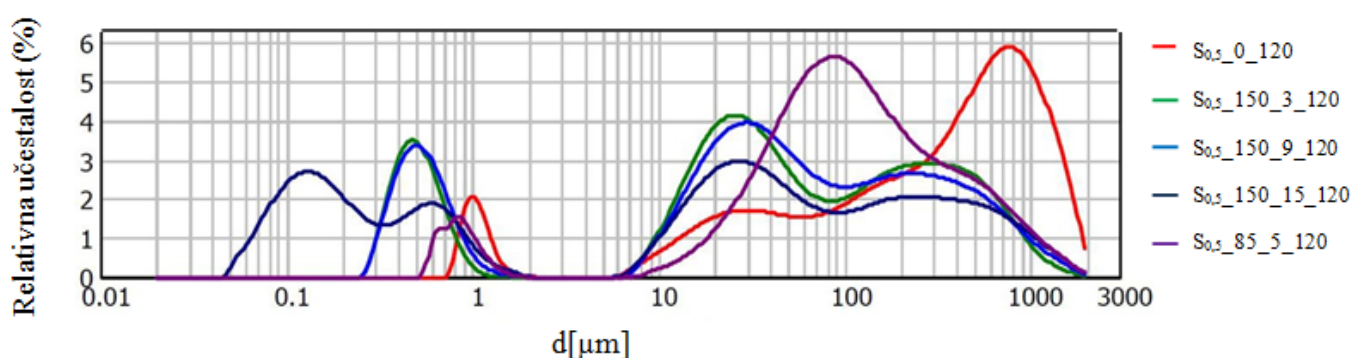
uzorka, dok se nije znatno promijenila kod pasteriziranog. Isto tako, tijekom 24 h dolazi do porasta  $b^*$  (yellowness) vrijednosti, najveći porast zabilježen je kod pasteriziranih uzoraka. Hsu i sur. (2018) su dokazali značajniju promjenu smeđe boje kod pasteriziranog soka od rajčice zbog degradacije likopena i odvijanja Maillardovih reakcija kao posljedice visokih temperatura, što nije bio slučaj kod uzoraka obrađenih visokim tlakom. Tijekom mjerenja došlo je do pada  $a^*$  (redness) vrijednosti, kao i kod Andres i sur. (2016), gdje je pad  $a^*$  vrijednosti zabilježen kod smoothieja na bazi sojinog mlijeka. Slični rezultati dobiveni su i kod Patras i sur. (2009) u pireu od jagode i kupine. Gubitak crvene boje može biti posljedica aktivnosti zaostalih enzima uključujući i enzime koji uzrokuju enzimsko posmeđivanje (Huang i sur., 2013). Ukupna promjena boje ( $\Delta E_{ab^*}$ ) ukazuje na razliku boje između tretiranih i netretiranih uzoraka. Može se primijetiti da su razlike u boji tretiranih i netretiranih uzoraka veće kod smoothieja dobivenog uz filter 0,3 mm, te da je ukupna promjena boje približno jednaka kod uzoraka koji su toplinski obrađeni i onih koji su obrađeni visokim hidrostatskim tlakom.

Prikazom raspodjele veličine čestica smoothieja cilj je prikazati povezanost utjecaja procesnih parametara na stabilnost proizvoda. Važno je istaknuti da se pri svim tlakovima i vremenima obrade dobija raspodjela čestica u prihvatljivim intervalima. „Prijelazni“ tlak od 300 MPa pokazuje stabilnost, ali manje izražene razlike u intervalima frekvencijskih krivulja nego kao što je to slučaj kod tlakova od 150 i osobito 450 MPa.

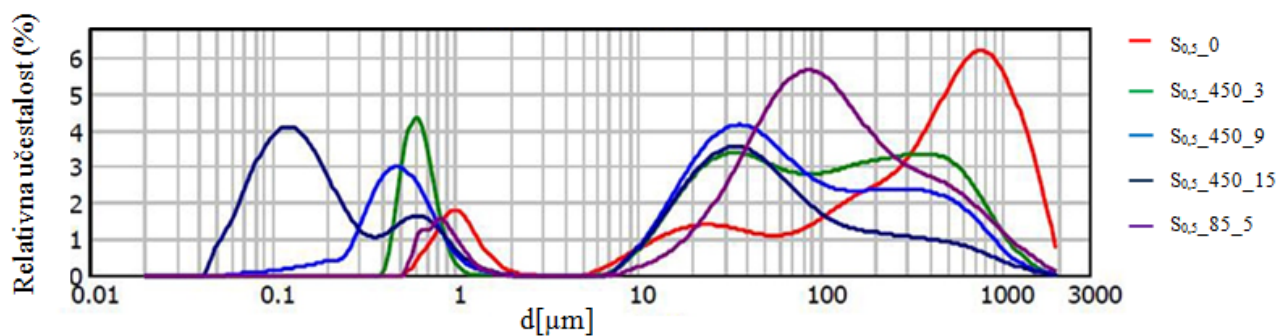




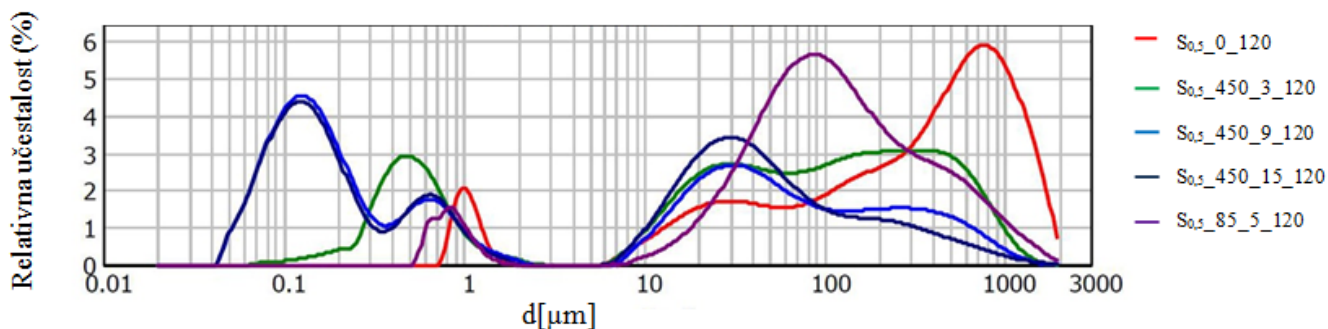
Slika 27. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja dobivenog filterom 0,5 mm neposredno nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



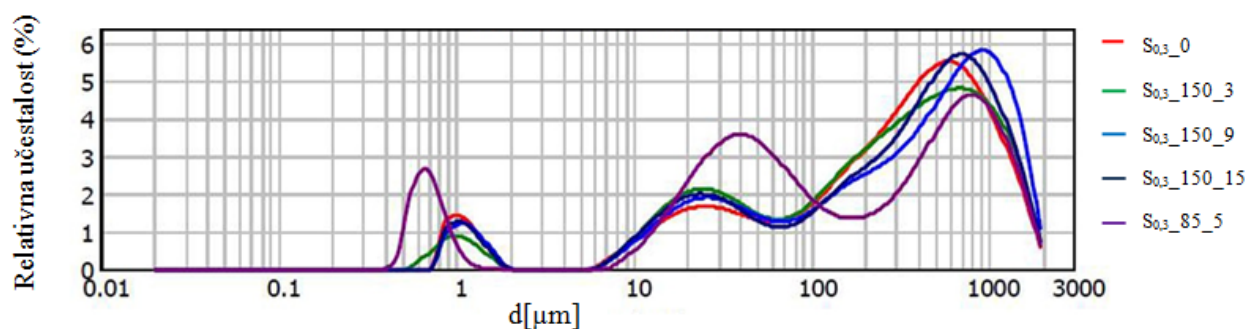
Slika 28. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja nakon intervalnog vremena (2h) dobivenog filterom 0,5 mm nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



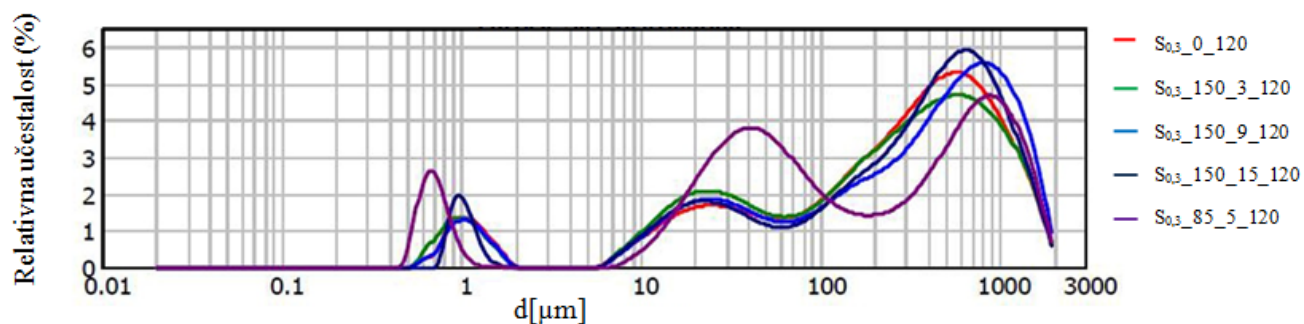
Slika 29. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja dobivenog filterom 0,5 mm neposredno nakon obrade visokim tlakom (450 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



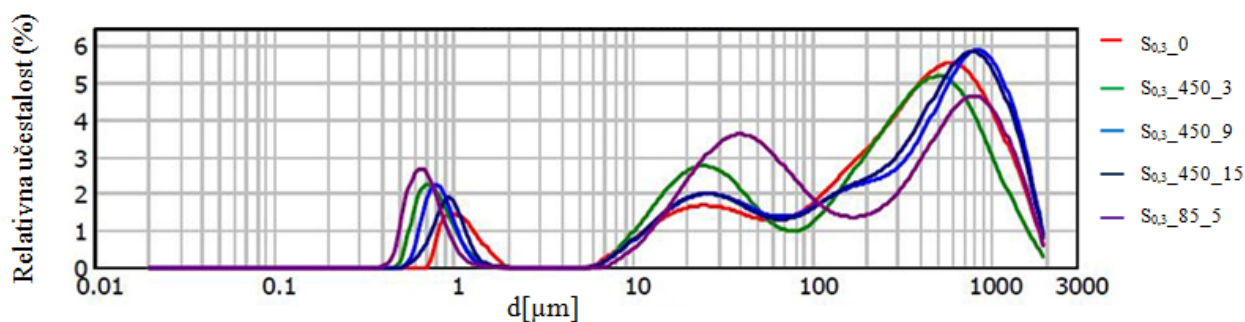
Slika 30. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja nakon intervalnog vremena (2h) dobivenog filterom 0,5 mm nakon obrade visokim tlakom (450 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



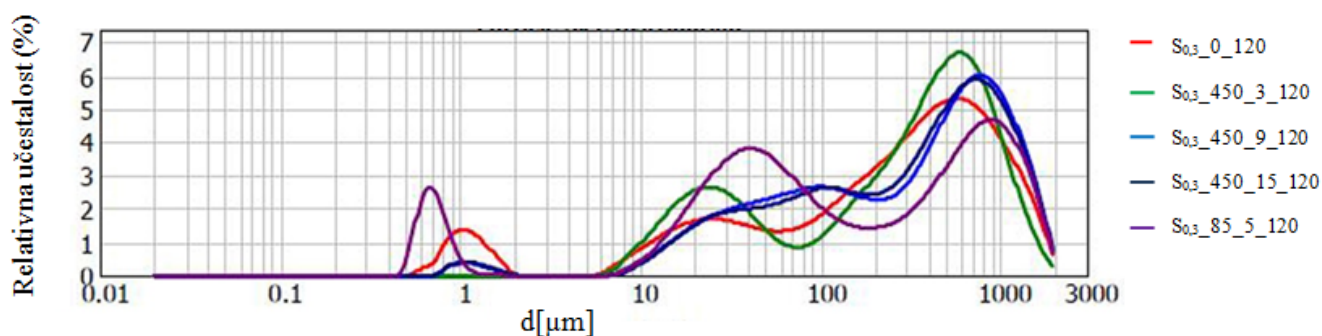
Slika 31. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja dobivenog filterom 0,3 mm neposredno nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



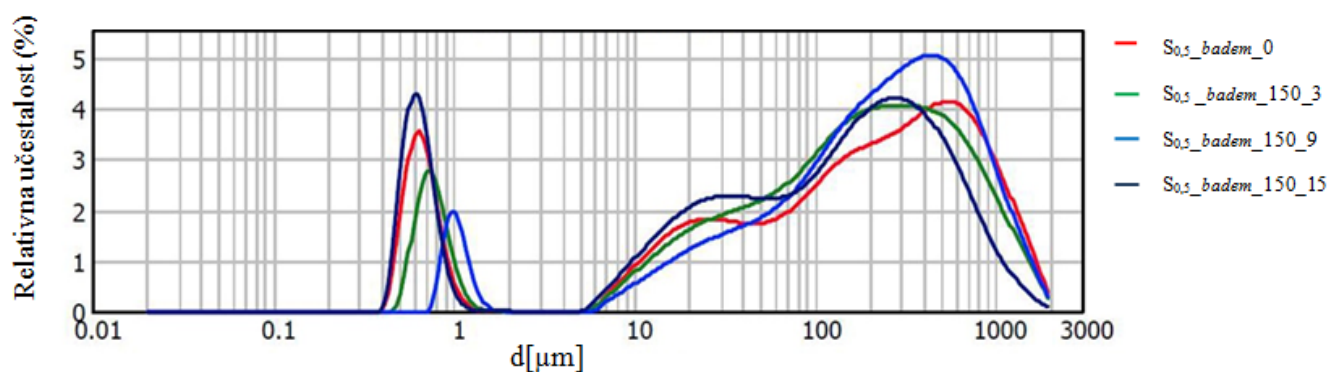
Slika 32. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja nakon intervalnog vremena (2h) dobivenog filterom 0,3 mm nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



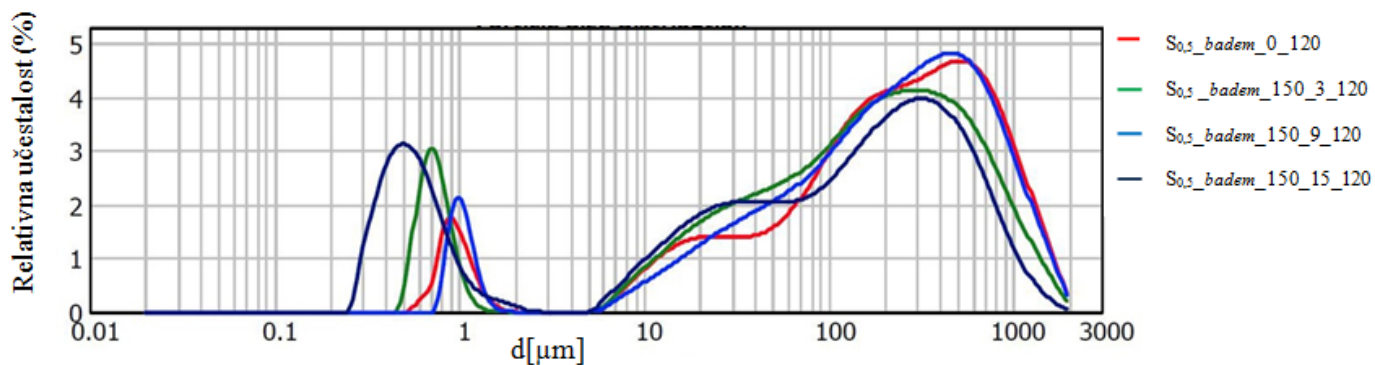
Slika 33. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja dobivenog filterom 0,3 mm neposredno nakon obrade visokim tlakom (450 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



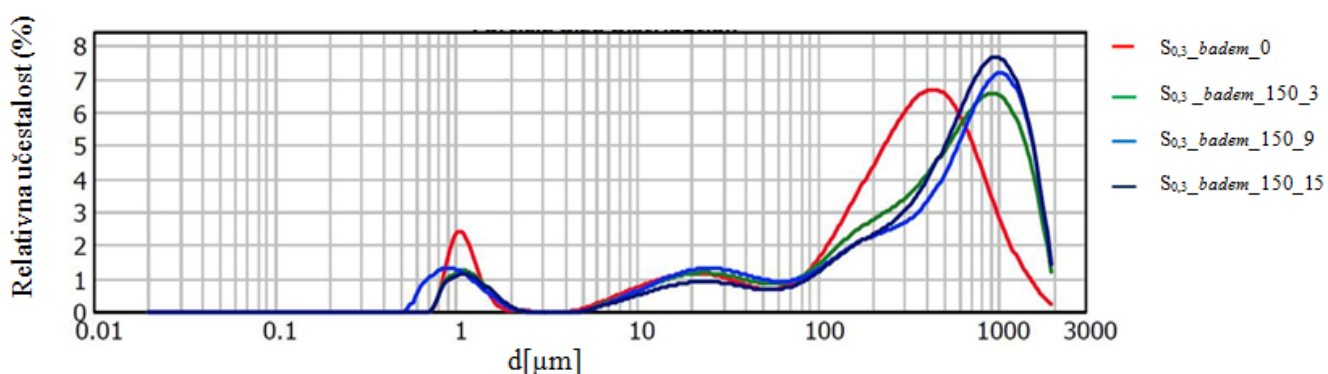
Slika 34. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) smoothieja nakon intervalnog vremena (2h) dobivenog filterom 0,3 mm nakon obrade visokim tlakom (450 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



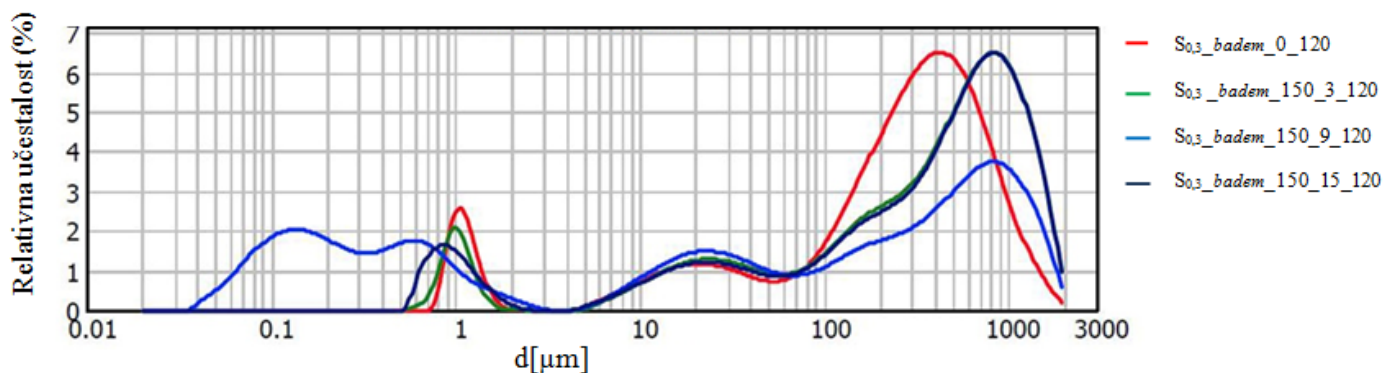
Slika 35. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 1* neposredno nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



Slika 36. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 1* nakon intervalnog vremena (2h), nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)

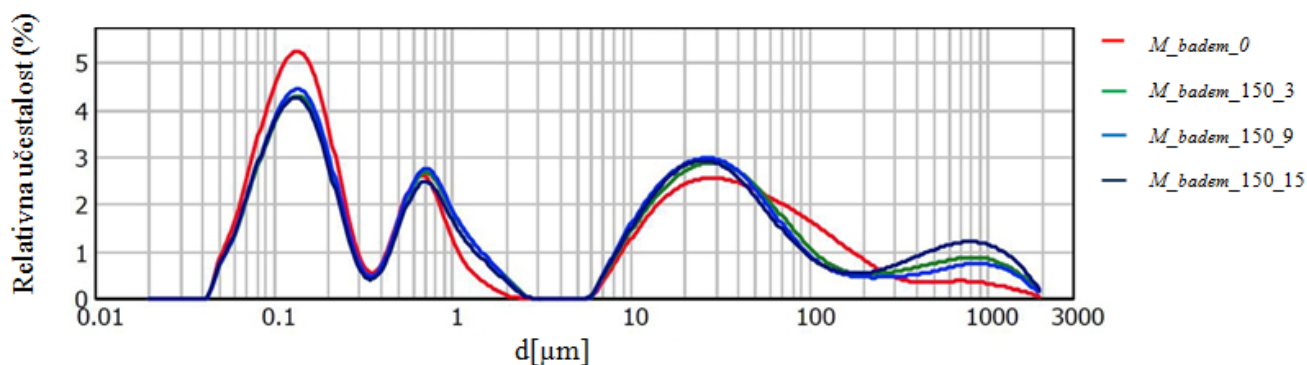


Slika 37. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 2* neposredno nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)

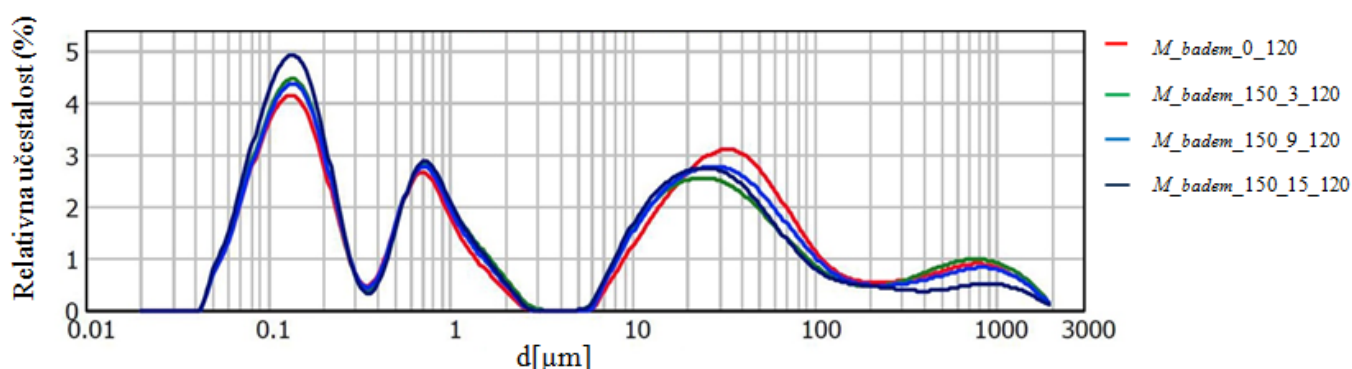


Slika 38. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 2* nakon intervalnog vremena (2h), nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)





Slika 39. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 3* neposredno nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)



Slika 40. Raspodjela veličine čestica ( $\mu\text{m}$ ) *uzorka 3* nakon intervalnog vremena (2h), nakon obrade visokim tlakom (150 MPa) u ovisnosti o relativnoj učestalosti (%)

Promatrajući krivulje raspodjele veličine čestica smoothieja pripremljenih filterima različitih promjera vidi se odnos povezanosti dobivenih frekvencijskih krivulja, odnosno intervala raspodjele veličine čestica s dobivenim indeksima stabilnosti smoothieja. Referirajući se na razinu utjecaja procesnih parametara nakon same obrade kao i utjecaja intervalnog vremena na stabilnost višefaznog sustava, multimodalnost frekvencijske krivulje kod smoothieja  $S_{0,3}$  i  $S_{0,5}$  je očekivana i nalazi se u intervalu od 7,58 – 1905,46  $\mu\text{m}$  i 0,64 – 1659,58  $\mu\text{m}$ .

Kod uzoraka dobivenih filterom 0,5 mm (Slike 27 – 30) primjećuju se značajnija odstupanja u frekvenciji raspodjele referentnog, pasteriziranog i uzoraka obrađenih visokim tlakom. Kod uzoraka obrađenih tlakom 150 MPa pri vremenu obrade od 9 minuta (Slika 28) vidljivo je značajno povećanje frekvencije učestalosti čestica nakon isteka intervalnog vremena prosječno u rasponu od 0,64 – 1,44  $\mu\text{m}$ . Isti trend primjećuje se i kod utjecaja tlaka od 450 MPa pri vremenu obrade od 9 i 15 minuta, neposredno nakon i nakon isteka intervalnog vremena praćenja stabilnosti (Slike 29 i 30).

Statistički značajan interval raspodjele čestica ostaje isti kao i kod obrade tlakom 150 MPa, ali sa značajnim povećanjem vrijednosti relativne učestalosti. Ovo povećanje relativne učestalosti u sinergiji je s dobivenim vrijednostima ISS za navedene procesne parametre i kreću se u intervalu od 432 – 507 sati.

Uspoređujući statistički značajan utjecaj vrijednosti tlaka kod uzoraka dobivenih filterom 0,3 mm od 150 i 450 MPa (Slike 31 – 34) vidljiva je sličnost raspodjele veličine čestica nakon obrade i nakon 2 sata što ukazuje na stabilnost promatranog sustava. Iznimku čini raspodjela dobivena pri tlaku od 450 MPa gdje je vidljivo prosječno povećanje relativne učestalosti čestica pri svim vremenima obrade od 0,48 – 1,44  $\mu\text{m}$  (Slike 33 i 34). Prethodna istraživanja su pokazala da u dvokomponentnom sustavu (jabuka, mrkva) u kojemu je dominantan sok od jabuke, povećanje čestica u navedenom intervalu također ima značajan utjecaj na stabilnost i povećanje indeksa stabilnosti. Najveća ISS vrijednost dobivena je pri tlaku 450 MPa i vremenu obrade od 9 minuta i iznosi 685 sati. Promatrajući ovakav sustav u cjelini ne vide se značajna odstupanja frekvencije raspodjele čestica kod referentnog, pasteriziranog i obrađenih uzoraka u intervalu od 400 – 1905  $\mu\text{m}$ .

U sustavima dispergiranih čestica usitnjenog badema u soku od jabuke (0,5 i 0,3 mm) i kokosovom mlijeku vidljiva je usporedna stabilnost s intervalom raspodjele čestica uzoraka smoothieja. Najmanja stabilnost dispergiranih čestica vidljiva je u sustavu badema u kokosovom mlijeku (Slike 39 i 40) na što ukazuje sličnost multimodalne raspodjele čestica nakon obrade i nakon intervalnog vremena. Indeks stabilnosti čestica badema kreće se u intervalu od 0 – 50 sati dok se stabilnost badema u soku od jabuka kreće od 100 – 300 sati (Slike 35 – 38).

Tablica 6. Praćenje mikrobiološke kvalitete smoothieja dobivenog uz filter promjera 0,5 mm

Uzorak	Dan	<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Aerobne mezofilne bakterije	Enterobakterije	Kvasci	Plijesni
S <sub>0,5_150_3</sub>	0	n.d.	n.d.	1×10 <sup>4*</sup>	3,1×10 <sup>6*</sup>	1×10 <sup>4***</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	3,7×10 <sup>6*</sup>	8,9×10 <sup>8**</sup>	2,2×10 <sup>5***</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	6×10 <sup>8*</sup>	1,3×10 <sup>10**</sup>	4,4×10 <sup>6***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_150_9</sub>	0	n.d.	n.d.	2,1×10 <sup>3</sup>	2,6×10 <sup>5**</sup>	4×10 <sup>4***</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	8,3×10 <sup>5*</sup>	4,7×10 <sup>7**</sup>	1,3×10 <sup>6***</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	5,1×10 <sup>7</sup>	3,7×10 <sup>9**</sup>	6×10 <sup>8***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_150_15</sub>	0	n.d.	n.d.	6,1×10 <sup>2</sup>	5,2×10 <sup>5**</sup>	2,8×10 <sup>2</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	4,4×10 <sup>4*</sup>	6,9×10 <sup>7**</sup>	2,7×10 <sup>4***</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	5,1×10 <sup>6*</sup>	9×10 <sup>8**</sup>	4,3×10 <sup>6***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_300_3</sub>	0	n.d.	n.d.	1×10 <sup>3</sup>	3,6×10 <sup>4**</sup>	9,4×10 <sup>2*</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	8,3×10 <sup>5*</sup>	5,5×10 <sup>6**</sup>	1,7×10 <sup>4***</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	2,8×10 <sup>7*</sup>	6×10 <sup>8**</sup>	3,9×10 <sup>6***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_300_9</sub>	0	n.d.	n.d.	1×10 <sup>3</sup>	8×10 <sup>4**</sup>	4,5×10 <sup>1</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	2,7×10 <sup>4*</sup>	3,5×10 <sup>6**</sup>	7,4×10 <sup>2</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	7,1×10 <sup>6*</sup>	4,1×10 <sup>8**</sup>	2×10 <sup>4***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_300_15</sub>	0	n.d.	n.d.	4,3×10 <sup>1</sup>	1,2×10 <sup>5**</sup>	2,3, ×10 <sup>1</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	7,5×10 <sup>3</sup>	4,8×10 <sup>6**</sup>	3,6×10 <sup>2</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	4,5×10 <sup>5</sup>	7,3×10 <sup>8**</sup>	5×10 <sup>4***</sup>	n.d.
S <sub>0,5_450_3</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,5_450_9</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,5_450_15</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,5_85_5</sub>	0	n.d.	n.d.	1×10 <sup>1*</sup>	n.d.	1,24×10 <sup>3**</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	8,6×10 <sup>2*</sup>	n.d.	2×10 <sup>4**</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	4×10 <sup>3*</sup>	n.d.	7,3×10 <sup>5**</sup>	n.d.

n.d.-nije detektirano

\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>

\*\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>2</sup> CFU mL<sup>-1</sup>

\*\*\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>3</sup> CFU mL<sup>-1</sup>

Tablica 7. Praćenje mikrobiološke kvalitete smoothieja dobivenog uz filter promjera 0,3 mm

Uzorak	Dan	<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Aerobne mezofilne bakterije	Enterobakterije	Kvasci	Plijesni
S <sub>0,3_150_3</sub>	0	n.d.	n.d.	3×10 <sup>4*</sup>	1,2×10 <sup>4**</sup>	3,3×10 <sup>4****</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	9×10 <sup>4*</sup>	6×10 <sup>4**</sup>	1,7×10 <sup>6****</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	3,3×10 <sup>6*</sup>	5,9×10 <sup>6**</sup>	7,7×10 <sup>8*</sup>	n.d.
S <sub>0,3_150_9</sub>	0	n.d.	n.d.	2×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>5*</sup>	7×10 <sup>3****</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	1,5×10 <sup>5*</sup>	2,3×10 <sup>6**</sup>	2,3×10 <sup>6****</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	3,9×10 <sup>7*</sup>	6,2×10 <sup>8**</sup>	1,7×10 <sup>8****</sup>	n.d.
S <sub>0,3_150_15</sub>	0	n.d.	n.d.	5,7×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>5**</sup>	2,2×10 <sup>2</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	3×10 <sup>4*</sup>	4,3×10 <sup>7**</sup>	1,35×10 <sup>6****</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	9,3×10 <sup>6*</sup>	3,7×10 <sup>9**</sup>	8,7×10 <sup>8****</sup>	n.d.
S <sub>0,3_300_3</sub>	0	n.d.	n.d.	6×10 <sup>2</sup>	1,4×10 <sup>4*</sup>	4,5×10 <sup>2</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	1×10 <sup>3</sup>	2,1×10 <sup>5**</sup>	3×10 <sup>3****</sup>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	7,4×10 <sup>5</sup>	4,5×10 <sup>7**</sup>	2,1×10 <sup>4****</sup>	n.d.
S <sub>0,3_300_9</sub>	0	n.d.	n.d.	1,6×10 <sup>2</sup>	6,5×10 <sup>4**</sup>	2×10 <sup>1</sup>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	2×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>5**</sup>	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	7,3×10 <sup>5*</sup>	4,7×10 <sup>6**</sup>	n.d.	n.d.
S <sub>0,3_300_15</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,3_450_3</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,3_450_9</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,3_450_15</sub>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S <sub>0,3_85_5</sub>	0	n.d.	n.d.	3×10 <sub>1</sub>	n.d.	2×10 <sub>1**</sub>	n.d.
	7	n.d.	n.d.	4,2×10 <sub>2*</sub>	n.d.	3,7×10 <sub>3**</sub>	n.d.
	14	n.d.	n.d.	1,5×10 <sub>4*</sub>	n.d.	4,5×10 <sub>5**</sub>	n.d.

n.d.-nije detektirano

\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>

\*\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>2</sup> CFU mL<sup>-1</sup>

\*\*\* ne zadovoljava kriterije < 10<sup>3</sup> CFU mL<sup>-1</sup>



Iz rezultata mikrobiološke analize (Tablica 6 i 7) može se primijetiti kako u smoothiejima nisu bile prisutne bakterije *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* te plijesni. Dok su za inaktivaciju aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija i kvasaca bili potrebni tlakovi veći od 150 MPa, kako bi se zadovoljili kriteriji propisani u pravilniku o mikrobiološkoj kvaliteti (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu; EC, 2073/2005; EC, 853/2004; EC 854/2004). Kod uzorka S<sub>0,5</sub> s tlakom od 450 MPa, 3 minute postiže se odgovarajuća kvaliteta kroz 14 dana (postignuta je inaktivacija aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija i kvasaca), dok se kod uzorka S<sub>0,3</sub> odgovarajuća kvaliteta postiže i s tlakom od 300 MPa, 15 minuta. Isto tako, može se primijetiti kako uzorci podvrgnuti toplinskoj obradi ne zadovoljavaju kriterije propisane u pravilniku (nije došlo do inaktivacije aerobnih mezofilnih bakterija i kvasaca). Odnosno, obrada visokim hidrostatskim tlakom imala je bolji učinak na inaktivaciju mikroorganizama, nego toplinska obrada (85 °C tijekom 5 minuta). Isto je primijećeno i kod Hurtado i sur. (2015) kod mikrobiološke analize smoothieja na bazi jabuke, naranče, jagode i banane. Osim toga, primijetili su kako je moguće ostvariti mikrobiološku stabilnost smoothieja uz tlakove veće od 350 MPa. Scolari i sur. (2015) su dokazali redukciju 2 log CFU mL<sup>-1</sup> aerobnih mezofila, kvasaca i plijesni obradom uzoraka smoothieja visokim tlakom od 300 MPa, kao i redukciju 6 log CFU mL<sup>-1</sup> bakterija mliječne kiseline i gram pozitivnih *Listeria monocytogenes*. Također su Valera–Santos i sur. (2012) i Lavinias i sur. (2008) dokazali da se razina aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca smanjila ispod razine detekcije, obradom raznih kiselih voćnih sokova tlakom od 350 MPa i 400 MPa pri sobnoj temperaturi te i ostala niska tijekom skladištenja u hladnom prostoru, dok su McKay i sur. (2011) iste rezultate postigli kod tlakova od 500 do 600 MPa pri sobnoj temperaturi.

Uzroci koji su se koristili za ispitivanje fizikalnih svojstava i mikrobiološke kvalitete, također su bili snimani i s NIR instrumentom. Na temelju prvih 10 faktora PCA analize ispitivane su umjetne neuronske mreže kako bi se vidjelo može li se NIR uspješno koristiti za predviđanje vrijednosti promatranih parametara u usporedbi s onima direktno mjerenima (Slike 14 – 26). Odabrano je po pet neuronskih mreža koje su imale najviše koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama za filtrirane i pet neuronskih mreža za nefiltrirane uzorke (Tablica 8).

Tablica 8. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje fizikalnih svojstava smoothieja

Struktura mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
<b>S<sub>0,3</sub></b>								
10-12-14	0.939	0.088	0.892	0.172	0.850	0.278	Exponential	Tanh
10-7-14	0.930	0.103	0.855	0.245	0.843	0.273	Logistic	Exponential
10-10-14	0.985	0.028	0.931	0.104	0.892	0.174	Tanh	Logistic
10-13-14	0.980	0.042	0.967	0.068	0.930	0.124	Tanh	Logistic
10-11-14	0.974	0.040	0.917	0.144	0.880	0.219	Logistic	Logistic
<b>S<sub>0,5</sub></b>								
10-12-14	0.953	0.076	0.862	0.222	0.781	0.277	Logistic	Logistic
10-7-14	0.893	0.147	0.819	0.305	0.735	0.449	Tanh	Tanh
10-11-14	0.992	0.015	0.867	0.222	0.774	0.254	Logistic	Logistic
10-11-14	0.864	0.180	0.809	0.345	0.749	0.335	Exponential	Exponential
10-9-14	0.966	0.054	0.837	0.280	0.752	0.358	Tanh	Logistic

Podaci su bili raspodjeljeni na učenje, testiranje i validaciju (Tablica 8) prema omjeru 70:15:15 koji se pokazao kao najbolji između 4 isprobana (60:20:20, 50:30:20, 70:20:10 i 70:15:15). Broj neurona u skrivenom sloju bio je postavljen na raspon od 4 do 13.  $R^2$  vrijednosti kod  $S_{0,3}$  za učenje, testiranje i validaciju iznose između 0,843 i 0,985 dok kod  $S_{0,5}$   $R^2$  vrijednosti iznose između 0,735 i 0,992. Pogreške su kod  $S_{0,3}$  bile manje nego kod  $S_{0,5}$ . Kod  $S_{0,3}$  variraju od 0,028 do 0,278, dok kod  $S_{0,5}$  variraju od 0,015 do 0,449. Najbolja neuronska mreža je izabrana na osnovu  $R^2$  vrijednosti i najmanje pogreške. Za uzorak  $S_{0,3}$  odabrana je neuronska mreža 10-13-14 s trinaest neurona u skrivenom sloju koja ima najveće vrijednosti  $R^2$  za učenje, testiranje i validaciju. Za uzorak  $S_{0,5}$  odabrana je neuronska mreža 10-12-14 s dvanaest neurona u skrivenom sloju koja je za učenje i validaciju imala najviše  $R^2$  vrijednosti od svih pet odabranih neuronskih mreža. Ove dvije odabrane mreže koristili smo za daljnje analize predviđanja fizikalnih svojstava smoothieja (Tablice 9 i 10).

Tablica 9. Rezultati predviđanja fizikalnih svojstava  $S_{0,3}$  na temelju odabranih ANN modela iz tablice 8

Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
<b>P</b>	0.993	0.939	0.990
<b>t</b>	0.877	0.883	0.787
<b>A[360nm] 2h</b>	0.995	0.977	0.995
<b>Tm</b>	0.995	0.978	0.996
<b>ISS[h]</b>	0.982	0.948	0.847
<b>A[360nm]</b>	0.995	0.992	0.910
<b>gustoća</b>	0.963	0.945	0.939
<b>pH</b>	0.986	0.980	0.932
<b><math>\Delta L</math></b>	0.993	0.985	0.973
<b><math>\Delta a</math></b>	0.974	0.984	0.980
<b><math>\Delta b</math></b>	0.994	0.985	0.912
<b><math>\Delta E_{ab}</math></b>	0.990	0.988	0.970
<b>Cab</b>	0.995	0.962	0.821
<b><math>\Delta H_{ab}</math></b>	0.989	0.991	0.975

Tablica 10. Rezultati predviđanja fizikalnih svojstava  $S_{0,5}$  na temelju odabranih ANN modela iz tablice 8

Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
<b>P</b>	0.998	0.997	0.996
<b>t</b>	0.929	0.904	0.796
<b>A[360nm] 2h</b>	0.941	0.777	0.898
<b>Tm</b>	0.941	0.778	0.903
<b>ISS[h]</b>	0.967	0.927	0.926
<b>A[360nm]</b>	0.959	0.692	0.799
<b>gustoća</b>	0.977	0.847	0.804
<b>pH</b>	0.996	0.996	0.997
<b><math>\Delta L</math></b>	0.932	0.835	0.520
<b><math>\Delta a</math></b>	0.957	0.882	0.826
<b><math>\Delta b</math></b>	0.904	0.887	0.316
<b><math>\Delta E_{ab}</math></b>	0.934	0.857	0.488
<b><math>C_{ab}</math></b>	0.965	0.868	0.864
<b><math>\Delta H_{ab}</math></b>	0.938	0.820	0.801

Iz rezultata predviđanja fizikalnih svojstava (Tablica 9 i 10) može se primijetiti da vrijednosti koeficijenta determinacije za tlak kod  $S_{0,5}$  iznose 0,993 za učenje, 0,939 za testiranje i 0,990 za validaciju, dok su kod uzorka  $S_{0,3}$  0,998 za učenje, 0,997 za testiranje i 0,996 za validaciju. Odnosno, vrijednosti koeficijenta determinacije za tlak veće su kod  $S_{0,3}$ . Isti trend prate i vrijednosti za A [360 nm] 2h.  $R^2$  kod uzorka  $S_{0,3}$  iznosi 0,995 za učenje, 0,977 za testiranje i 0,995 za validaciju, a kod uzorka  $S_{0,5}$   $R^2$  iznosi 0,941 za učenje, 0,777 za testiranje i 0,898 za validaciju. Do značajnijeg pada koeficijenta determinacije dolazi kod izmjerenih vrijednosti za vrijeme obrade, pogotovo za vrijeme obrade kod  $S_{0,3}$  gdje je  $R^2$  za učenje iznosio 0,877, za testiranje 0,883 i za validaciju 0,787 što zapravo predstavlja najmanju uspješnost modela. Kod uzorka  $S_{0,5}$  koeficijenti determinacije za parametre dobivene kolorimetrijskom analizom generalno su bili niži nego kod  $S_{0,3}$ . Vrijednosti za testove učenja, testiranja i validacije kreću se između 0,316 i 0,938. Najniže vrijednosti odnose se na parametar  $\Delta b$ , gdje  $R^2$  za učenje iznosi 0,904, za testiranje 0,887 i validaciju 0,316. Za razliku od vrijednosti kod  $S_{0,5}$ , kod uzoraka  $S_{0,3}$  koeficijenti determinacije su dosta visoki, kreću se između 0,821 i 0,995.

Koeficijenti determinacije za ISS su nešto veći kod  $S_{0,3}$  (0,982 za učenje, 0,948 za testiranje), osim koeficijenta determinacije za validaciju, koji kod  $S_{0,3}$  iznosi 0,847.  $R^2$  kod  $S_{0,5}$  iznosi 0,967 za učenje, 0,927 za testiranje i 0,926 za validaciju. Koeficijenti determinacije za optičku gustoću ( $T_m$ ) značajno su veći kod  $S_{0,3}$ , gdje  $R^2$  za učenje iznosi 0,995, za testiranje 0,978 i za validaciju 0,996, nego kod  $S_{0,5}$  (0,941 za učenje, 0,778 za testiranje i 0,898 za validaciju).

Koeficijenti determinacije za pH viši su u slučaju  $S_{0,5}$  (0,996 za učenje, 0,996 za testiranje i 0,997 za validaciju) nego u slučaju  $S_{0,3}$  (0,986 za učenje, 0,980 za testiranje i 0,932 za validaciju). Kod predviđanja gustoće, situacija je podjeljena. Koeficijenti determinacije za testiranje i validaciju su značajno veći za  $S_{0,3}$ , nego za  $S_{0,5}$ .  $R^2$  kod  $S_{0,3}$  za testiranje iznosi 0,945, za validaciju 0,939, dok je  $R^2$  kod  $S_{0,5}$  za testiranje 0,847, a za validaciju 0,804. Kod testa učenja situacija obrnuta, koeficijenti determinacije veći su kod  $S_{0,5}$  (0,977), nego kod  $S_{0,3}$  (0,963).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave, mogu se donjeti ovi zaključci:

1. Veća stabilnost smoothieja dobije se filterom promjera 0,3 mm te je stabilnost većine uzoraka obrađenih visokim hidrostatskim tlakom veća (50 – 750 sati) nego onih obrađenih klasičnom toplinskom obradom (192 sata).
2. Utjecaj procesnih parametara pokazuje značajni utjecaj na promjenu svih promatranih fizikalnih svojstava, promjena vrijednosti prividne viskoznosti izraženija je pri nižim smičnim brzinama (20 – 50 s<sup>-1</sup>, 0,5 mm).
3. Najveća stabilnost smoothieja postiže se pri tlaku od 450 MPa i vremenu obrade od 9 minuta što je u skladu s maksimalnim vrijednostima indeksa stabilnosti od 685 sati (0,3 mm) i 507 sati (0,5 mm).
4. Optimalnim procesnim parametrima možemo smatrati tlak od 450 MPa i vrijeme obrade od 9 i 15 minuta.
5. Povećanje stabilnosti smoothieja karakterizira povećanje relativne učestalosti čestica u intervalu raspodjele 0,48 – 1,44 μm.
6. Visoki hidrostatski tlak ima veći utjecaj na inaktivaciju mikroorganizama nego toplinska obrada (85 °C tijekom 5 minuta). Uz tlakove od 450 MPa postiže se odgovarajuća kvaliteta proizvoda (mikrobiološka održivost) tijekom 14 dana.
7. Uspoređujući koeficijente determinacije dobivene primjenom ANN modela i onih dobivenih direktnim mjerenjem možemo zaključiti da se pomoću NIR spektroskopije primjenom neuronskih mreža vrlo precizno mogu odrediti određena fizikalna svojstva.

## 6. LITERATURA

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wires. Comput. Stats.* **2** (4), 433–459.

Abe, F. (2007) Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology, and survival: perspectives from piezophysiology. *Biosci. Biotech. Bioch.* **71**, 2347–2357.

Andres, V., Villanueva, M. J., Tenorio, M. D. (2016) The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. *Food Chem.* **192**, 328–335.

Augusto, P. E. D., Tribst, A. A. L., Christianini, M. (2018) High hydrostatic pressure and high-pressure processing of fruit juices. U: Fruit juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis, (Rajauria, G., Tiwari, B. K., ured.) Academic Press, Massachusetts, str. 393–423.

Balci, A. T., Wilbey, R. A. (1999) High pressure processing of milk the first 100 years into the development of a new technology. *Int. J. Dairy: Technol.* **52**, 149–155.

Barba, F. J., Esteve, M. J., Frigola, A. (2012) High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **11** (3), 307–322.

Barba, F. J., Esteve, M. J., Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Res. Int.* **50**, 545–549.

Basheer, I. A., Hajmeer, M. (2000). Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiol. Meth.* **43** (1), 3–31.

Benet, G. U. (2005) High-pressure low-temperature processing of foods: Impact on metastable phases on process and quality parameters, PhD dissertation, Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin University of Technology, Berlin.

Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., Decker, E. A. (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**, 515–532.

- Bosiljkov, T., Brnčić, M., Karlović, S., Tripalo, B., Ježek, D., Dujmić, F., Vadjla, D. (2013) Primjena ultrazvuka i visokih hidrostatskih tlakova na promjenu raspodjele veličine masnih globula i kemijski sastav kravljeg mlijeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8 (3-4)**, 82–89.
- Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M., Karlović, S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u industriji, *Kem.Ind.* **59 (11)**, 539–545.
- Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **5**, 135–149.
- Cao, X., Bi, X., Huang, W., Wu, J., Hu, X., Liao, X. (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **16**, 181–190.
- Correia, R. T., Borges, K. C., Medeiros, M. F., Genovese, M. I. (2012) Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food. Sci. Technol. Int.* **18 (6)**, 539–547.
- da Cruz, A. G., Fonseca Faria, J. D. A., Isay Saad, S. M., André Bolini, H. M., Sant'Ana, A. S., Cristianini, M. (2010). High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 483–493.
- Daryei, H., Yousef, A.E., Balasubramaniam, V.M. (2016) Microbial aspects of high-pressure processing of food: Inactivation of microbial vegetative cells and spores. U: High Pressure Processing of Food-Principles, Technology and Application, (Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., Leliveld, H. L. M., ured.), Springer, New York, str. 271–294.
- DebMandal, M., Mandal, S. (2011) Coconut (Coconut nucifera L.: Aracaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **43 (3)**, 241–247.
- Denev, P., Kratchanov, C., Číž, M., Lojek, A., Kratchanova, M. (2012) Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: In vitro and in vivo evidences and possible mechanisms of action: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **11 (5)**, 471–489.



- Elamin, W. M., Endan, J. B., Yosuf, Y. A., Shamsudin, R., Ahmedov, A. (2015) High pressure processing technology and equipment evolution. *J. Eng. Sci. Technol.* **85 (5)**, 75–83.
- Gibney, M. J., Lanham–New, S. A., Cassidy, A., Vorster, H. H.(2009) Introduction to Human Nutrition, 2. izd., Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Heinonen, M. I. (1990) Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 609–612.
- Hernández Gómez A, He Y., García Pereira A. (2006) Non–destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* **77**, 313–319.
- Hite, B. H. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. Bull. West Virginia Univ. Agric. Exp. Stn., **58**, 15–35.
- Hite, B. H., Giddings, N. J., Weakley, C. E. (1914) Effect of pressure on certain micro-organisms encountered in the preservation of fruits and vegetables, West Virginia Univ. Agric. Exp. Stn. **146**, 2–67.
- Hogan, E., Kelly, A.L., Sun, D. – W. (2014) High pressure processing of foods. U: Emerging Technologies for Foes Processing, (Sun, D. – W. ured.) Elsevier Academic, London, str. 3– 24.
- Hsu, K. C., Tan, F. J., Chi, H. Y. (2008) Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurized tomato juice during refrigerated storage. *Lwt – Food Science and Technology*, **41**, 367–375.
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., Jihong, W. (2013) Comparative study of enzymes, phenonolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innov. Food Sci. Emerg.* **18**, 74–82.
- Huang, Y., Kangas, L. J., & Rasco, B. A. (2007). Applications of artificial neural networks (ANNs) in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47 (2)**, 113–126.
- Hurtado, A., Picouete, P., Jofré, A., Guárdia, M. D., Ros, J. M., Bañón, S. (2015) Application of high pressure processing for obtaining „fresh-like“ fruit smoothie. *Food Bioprocess Tech.* **8**, 2470–2482.

- Hurtado, A., Gàrdia, M. D., Picouet, P., Jofre, A., Ros., J. M., Bañón, S. (2016) Stabilization of red fruit-based smoothies by high-pressure processing. Part A. Effects on microbial growth, enzyme activity, antioxidant capacity and physical stability. *J. Sci. Food Agric.* [online] **97** (3) 770–776, <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7796>>. Pristupljeno 7. Lipnja 2019.
- Jednačak, T., Novak, P. (2013). Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62** (3-4), 71– 80.
- Karlović, S., Bosiljkov, T., Brnčić, M., Semenski, D., Dujmić, F., Tripalo, B., and Ježek, D. (2014) Reducing Fat Globules Particle-Size in Goat Milk: Ultrasound and High Hydrostatic Pressures Approach. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **28**, 499–507.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B.K., Patras, A. (2010) Effect of thermal and high hydrostatic pressure on antioxidant activity and color of fruit smoothies. *Innov. Food Sci. Emerg.* **11**, 551–556.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Mitchell, M., Gormley, T. R., Butler, F. (2012) Flavour profiling of fresh and processed fruit smoothies by instrumental and sensory analysis. *Food. Res. Int.* **45**, 17–25.
- Knorr, D. (1993) Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* **47**, 156–161.
- Knorr, D. (1995) Hydrostatic Pressure Treatment of Food: Microbiology. U: New Methods of Food Preservation (Gould, G.W., ured.), Springer, New York, str. 159–175.
- Lavinas, F. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., Valente Mesquita, V. L. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice preservation. *J. Food Sci.* **73** (6), 273–277.
- Lovrić, T. (2000) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb.
- Mahadevan, S., Karwe, M. V. (2016) Effect of high-pressure processing on bioactive compound. U: High Pressure Processing of Food- Principles, Technology and Application, (Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., Leliveld, H. L. M., ured.), Springer, New York, str. 479–509.

- Manas, P., Pagán, R. (2005) Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 1387–1399.
- McKay, A. M., Linton, M., Stirling, J., Mackle, A., Patterson, M. F. (2011) A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH). *Food Microbiol.* **28**, 1426–1431.
- Mertens-Talcott, S. U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L., Derendorf, H. (2006) Absorption, metabolism and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 8956–8961.
- Norton, T., Sun, D. – W. (2008) Recent advances in the use of high pressure as an effective processing techniques in the food industry. *Food Bioprocess Tech.* str. 2–34.
- Oey, I. (2016) Effects of high hydrostatic pressure of enzymes. U: High Pressure Processing of Food—Principles, Technology and Application, (Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., Leliveld, H. L. M., ured.), Springer, New York, str. 371–433.
- Oliveira, M. M., Augusto, P. E. D., da Cruz, A. G., Cristianini, M. (2014) Effect of dynamic high pressure on milk fermentation kinetics and rheological properties of probiotic fermented milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **26**, 67–75.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., & Martín-Belloso, O. (2012). The effects of nonthermal technologies on phytochemicals. U: Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health, (Rao, V. ured.), IntechOpen, London, str. 107–126, <<https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-effects-of-non-thermal-technologies-on-phytochemicals>>.
- Pristupljeno 7. Lipnja 2019.
- Ozaki, Y., Genkawa, T., Futami, Y. (2016). Near-infrared spectroscopy. U: Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry, 3. izd. (Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D., ured.) Academic Press, Massachusetts, str. 40–49.
- Park, S. H., Lamsal, B. P., Balasubramaniam, V. M. (2014) Principles of food processing, U: Food Processing: Principles and Applications, 2 izd. (Clark, S., Jung, S., Lamsal, B., ured.) John Wiley & Sons, Ltd. New Jersey, str. 1–17.

- Patterson, M. F., McKay, A. M., Connolly, M., Linton, M. (2012) The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. *Food Microbiol.* **30**, 205–212.
- Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., Butler, F. (2009) Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov. Food Sci. Emerg.* **10**, 308–313.
- Pauling, L. (1964) *College Chemistry: An introductory textbook of general chemistry.* Freeman and coMPany, San Francisco.
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V., Ting, E., Sizer, C., Bush, C., Anderson, C. (2003) Compression heating of selected fatty food materials during high–pressure processing. *J. Food Sci.* **68**, 254–259.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., Knorr, D. (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci.* **47** (1), 69–112.
- Rastogi, N. K. (2013) "Introduction," in *Recent Developments in High Pressure Processing of Foods*, Springer, US, str. 1–7.
- Robins, M. M. (2006) Particle size analysis in food. U: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, (Meyers, R. A., ured.) John Wiley & Sons, Ltd, New Yersey, str. 4130–4153.
- Ryser, E. T. (2011) Pasteurization of liquid milk products: Principles, public health aspects. U: *Encyclopedia of Dairy Science*, (Fox, P.F., ured.), Academic Press, Massachusetts, str. 310– 315.
- Sánchez-Moreno, C., Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P., Cano, M. P., (2009) Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Crit. Rev. Food Sci.* **49**, 552– 576.
- Scolari G, Zacconi C, Busconi M, Lambri M (2015) *Food Control* 47:166–174. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.006.

- Shahidi, F., Zhong, Y., Wijeratne, S.S.K., Ho, C. – T. (2008) Almond and almond products: nutraceutical components and health effects. U: *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals and Health Effects*, (Alasalvar, C., Shahidi, F. ured.) CRC Press, Tylor & Francis Group, Boca Raton, str. 127–138.
- Shook, C., Shellhammer, T., Schwartz, S. (2001) Polygalacturonase, pectinesterase, and lipoxygenase activities in high-pressure-processed diced tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 664–8.
- Sudha, M. L., Baskaran V., Leelavathi, K. (2007) Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem.* **104**, 686–692.
- Svarovsky, L. (2000) Characterization of particles suspended in liquids U: *Solid-Liquid Separation*, 4.izd., (Svarovsky, L., ured.), Butterworth-Heinemann, Oxford, str. 30– 65.
- Tang, G. (2010) Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1468–1473.
- Thakur, B. R., Nelson, P. E. (1998) High-pressure processing and preservation of food. *Food Rev. Int.* **14**, 427–447.
- Tsou, C. L. (1986) Location of the Active Sites of Some Enzymes in Limited and Flexible Molecular Regions. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 427–429.
- Tratnik, T., Božanić, R. (2012) *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Varela–Santos, E., Ochoa–Martinez, A., Tabilo–Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez–Won, M., Briones–Labarca, V., Morales–Castro, J. (2012) Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innov. Food Sci. Emerg.* **13**, 13–22.
- Valinger, D., Benković, M., Kljusurić–Gajdoš, J., Bauman, I., Kurtanjek, Ž. (2011). Application of NIR spectroscopy for monitoring different particle sizes of sucrose. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, **15 (3)**, 188– 190.
- Van Buren, J. P. (1991) *Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness*. U: *The chemistry and technology of pectin*, (Walter, R.H., ured.), Academic Press, Inc., San Diego, str. 1– 22.

Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L. R., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2000) Inactivation of orange pectinesterase by combined high-pressure and temperature treatments: a kinetic study. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1960–1970.

Van der Meeren, P., Dewetlinck, K., Saveyn, H. (2004) Particle size analysis. U: Handbook of Food Analysis: Methods and instruments in applied food analysis, 2. izd., (ured. Nollet, L.M.L.) CRC Press, Florida, str. 1805–1823.

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu; EC, 2073/2005; EC, 853/2004; EC 854/2004.

Zabetakis, I., Leclerc, D., Kajda, P. (2000) The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2749–2754.

Yang, H., Griffiths, P. R. (1999). Application of multilayer feed-forward neural networks to automated compound identification in low-resolution open-path FT-IR spectrometry. *Anal. Chem.* **71** (3), 751–761.

Yordanov, D., Angelova, G. (2010) High pressure processing for foods preserving. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **24**, 1940–1945.

## 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.

---

Dea Burcar