

Stabilnost polifenola i karotenoida u smoothie-sokovima obrađenim visokim hidrostatskim tlakom tijekom skladištenja

Kovač, Ana-Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:119540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Ana-Petra Kovač

1302/ USH

**STABILNOST POLIFENOLA I
KAROTENOIDA U SMOOTHIE-
SOKOVIMA OBRAĐENIM
VISOKIM HIDROSTATSKIM
TLAKOM TIJEKOM
SKLADIŠTENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno–tehnološko inženjerstvo, te u Laboratoriju za tehnološke operacije Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević i neposrednog voditelja asistenta Marka Škegre, mag. ing.

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.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

STABILNOST POLIFENOLA I KAROTENOIDA U SMOOTHIE-SOKOVIMA OBRADENIM VISOKIM HIDROSTATSKIM TLAKOM TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Ana-Petra Kovač, 1302/ USH

Sažetak: Cilj ovog rada je bio istražiti učinak visokog hidrostatskog tlaka (VHT) na stabilnost polifenola i karotenoida u smoothie sokovima tijekom skladištenja kroz 7, 14 i 21 dan pri + 4 °C. Smoothie sokovi su načinjeni od sokova jabuke, mrkve i aronije uz dodatak kaše indijanske banane i napitka od badema. VHT tretmani su odrađeni pri tlakovima od 350 i 450 MPa tijekom 5 i 15 minuta. Radi usporedbe netoplnske tehnologije s tradicionalnom toplinskom obradom provedena je i pasterizacija uzoraka (85 °C/7 min). VHT smoothie sokovi su pokazali smanjenje sadržaja ukupnih fenola i ukupnih karotenoida, dok su pasterizirani sokovi imali povećan udio polifenola, a smanjen udio karotenoida, u odnosu na netretirani uzorak. Tijekom skladištenja je došlo do fluktuacije vrijednosti navedenih spojeva u svim tretiranim uzorcima. Zaključno, pasterizacija je rezultirala boljom stabilnošću ukupnih fenola te većom degradacijom ukupnih karotenoida u usporedbi s VHT tretmanom pri čemu su tijekom skladištenja ukupni fenoli u odnosu na karotenoide, pokazali bolju stabilnost, neovisno o primijenjenom tretmanu.

Ključne riječi: *Visoki hidrostatski tlak, pasterizacija, smoothie sok, polifenoli, karotenoidi, skladištenje*

Rad sadrži: 47 stranica, 6 slika, 7 tablica, 121 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević*

Pomoć pri izradi: *Marko Škegro, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. *Sven Karlović*
2. izv. prof. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
4. doc.dr.sc. *Antonela Ninčević-Grassino (zamjena)*

Datum obrane: 24. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE EFFECT OF HIGH-PRESSURE PROCESSING ON POLYPHENOLS AND CAROTENOIDS IN SMOOTHIES DURING STORAGE

Ana-Petra Kovač, 1302/ USH

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of high hydrostatic pressure processing (HHPP) vs. pasteurization on the stability of polyphenols and carotenoids in smoothies during storage for 7, 14 and 21 days at + 4 ° C. Smoothies were made from apple, carrot and chokeberry juices with the addition of Indian banana puree and almond drink. HHPP treatments were performed at pressures of 350 and 450 MPa during 5 and 15 minutes, while pasteurization was conducted at 85 °C/7 min. HHPP smoothies showed a decrease in total phenols and total carotenoids, while the pasteurized juices revealed an increased polyphenol content and a reduced carotenoid content as compared to control (untreated) samples. During the storage, changes in the contents of polyphenols and carotenoids were observed for both, pasteurized and HHPP samples. In conclusion, pasteurization resulted in better stability of total phenols and higher degradation of total carotenoids as compared to HHPP. Regardless of applied treatment and duration of storage, total phenols exhibited a better stability in comparison to carotenoids.

Keywords: *High hydrostatic pressure, pasteurization, smoothie, polyphenols, carotenoids, storage*

Thesis contains: 47 pages, 6 figures, 7 tables, 121 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Associate professor*

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

Reviewers:

1. PhD *Sven Karlović*, Assistant professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
3. PhD *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
4. PhD *Antonela Ninčević-Grassino*, Scientific Assistant (substitute)

Thesis defended: 24 September 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Smoothie sokovi	3
2.2. Formulacije smoothie-sokova	4
2.3. Nutritivni potencijal smoothie-sokova	5
2.3.1. Jabuka (<i>Malus domestica</i> L.)	5
2.3.2. Mrkva (<i>Daucus carota</i> L.)	6
2.3.3. Aronija (<i>Aronia melanocarpa</i> L.)	7
2.3.4. Indijanska banana (<i>Asimina triloba</i> L.)	8
2.3.5. Bademovo mlijeko	8
2.4. Toplinska vs. netoplinska obrada smoothie sokova	9
2.5. Tehnologija visokog hidrostatskog tlaka (VHT)	10
2.5.1. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u obradi smoothie-sokova	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Priprema smoothie soka	17
3.2.2. Obrada smoothie sokova visokim hidrostatskim tlakom	18
3.2.3. Obrada smoothie sokova pasterizacijom	18
3.2.4. Izolacija polifenola i karotenoida iz smoothie sokova	19
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na stabilnost ukupnih fenola	26
4.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na stabilnost ukupnih karotenoida	30
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Potrošači postaju sve više svjesni važnosti konzumiranja voća i povrća kao dijela uravnotežene prehrane (Bursać Kovačević i sur., 2020). Rezultati brojnih studija upućuju da se pomno odabranom prehranom može pozitivno utjecati na brojne zdravstvene učinke (Dorhmann i sur., 2019). Iz tog razloga se sve više razvija industrija voća i povrća s ciljem dizajniranja novih, atraktivnih proizvoda, kompatibilnih s najnovijim trendovima zdrave prehrane (Granato i sur., 2020). Potrošači tako imaju stalni pristup proizvodima od voća i povrća, unatoč njihovoj sezonskoj dostupnosti, pa na taj način mogu imati zdravu i uravnoteženu prehranu tijekom cijele godine. Preporuka Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2020) je da se konzumira najmanje 5 porcija (oko 400 g) voća i povrća dnevno. Kako bi zadovoljili navedene preporuke, potrošači ponekad biraju alternativne oblike unosa voća i povrća, odnosno sokove i smoothie sokove. Konzumacija smoothie sokova je izvrstan način povećanja unosa hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva prisutnih u voću i povrću. Njihova senzorska svojstva, ponajviše izgled i okus te činjenica da se brzo i lako mogu pripremiti, jedan su od glavnih razloga velike popularnosti smoothie sokova.

Posljednjih desetljeća smoothie sokovi su postali jedan od najpopularnijih izbora pića. Između 2002. i 2006. godine tržište smoothie sokova u Republici Irskoj poraslo je za 214 % te je vrijednost tržišta 2006. godine iznosila oko 4 milijuna funti. Tržište smoothie sokova u Velikoj Britaniji je 2008. godine procijenjeno na 282 milijuna funti (Safefood, 2009). Mintel (2016) je u istraživanju izvijestio da je tržište smoothieja u Velikoj Britaniji poraslo za 8,7 % u razdoblju od 2011. – 2016. godine.

Utvrđeno je da tradicionalna toplinska pasterizacija može produljiti rok trajanja prehrambenih proizvoda i osigurati njihovu sigurnost (Lewis i Heppell, 2000), ali istovremeno uzrokuje gubitak bioaktivnih spojeva i antioksidansa (Keenan i sur., 2012). Da bi se ti problemi prevladali, potrebno je uvesti inovativne tehnologije koje se mogu uspješno koristiti za produljenje roka trajanja, osiguranje sigurnosti, poboljšanje kvalitete i percepcije potrošača bez štetnog utjecaja i oštećenja hranjivih tvari (Bursać Kovačević i sur., 2019; Putnik i sur., 2020; Kostelac i sur., 2020). Obrada visokim hidrostatskim tlakom, sama ili u kombinaciji s umjerenom toplinskom obradom, daje mikrobiološki stabilne proizvode visoke kvalitete. Poznato je da tretman visokim hidrostatskim tlakom utječe samo na nekovalentne kemijske veze (ionske, vodikove i hidrofobne veze), ostavljajući kovalentne veze netaknutima. Time se

omogućava uništavanje mikrobne aktivnosti bez značajnog utjecaja na nutritivan sastav i senzorske karakteristike sokova (Tříška, 2017).

Stoga, cilj ovog istraživanja je bio usporediti utjecaj tehnologije visokog hidrostatskog tlaka i toplinske pasterizacije na sadržaj ukupnih karotenoida i ukupnih fenola u smoothie soku nakon prerade te nakon 7., 14. i 21. dana skladištenja pri temperaturi od +4 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SMOOTHIE SOKOVI

Smoothie sokovi su miješani napitci koji se sastoje od sirovog voća ili povrća s vodom, voćnim sokom i pireom, jogurtom ili mlijekom. Sadrže i druge sastojke poput drobljenog leda, šećera, meda, žitarica, bilja, mliječnih ili biljnih bjelančevina, no u posljednje vrijeme mogu se i obogaćivati različitim funkcionalnim dodacima (Gallina i sur., 2019; Žuntar i sur., 2020). Smoothie sokovi imaju veću viskoznost od soka ili mlijeka zbog visokog sadržaja čvrstih tvari i nekih zgušnjivača poput pektina (Guneser i sur., 2019). Miješanje različitih vrsta voća i povrća je vrlo dobar način za uključivanje netradicionalnog i nedovoljno iskorištenog, a opet vrlo hranjivog povrća (Jayachandran i sur., 2015), poput listova i stabljike repe (Fernandez i sur., 2019), u svakodnevnu prehranu.

Izraz "smoothie" prvi je predstavio Steve Kuhnau u SAD-u 1973. godine. Kuhnao je patio od intolerancije na laktozu i hipoglikemije, zbog čega je počeo eksperimentirati s hranjivim pićima, miješajući razno voće, vitamine, minerale i proteinske praške. Kuhnau je 1973. otvorio trgovinu zdrave hrane u Kenneru u Louisiani, gdje je počeo prodavati napitke, koje je nazvao smoothie-ima. Pića su se pokazala popularnima pa je Kuhnau usavršio recepte i 1989. godine osnovao franšizu Smoothie King (Smith, 2013).

Smoothie sokovi se mogu smatrati tipičnim primjerom tzv. super hrane, koja je definirana kao prirodna hrana koja se smatra posebno korisnom zbog svog nutritivnog sastava, ali i zdravstvenih prednosti koje stvaraju voćne komponente (Medina, 2011). Istraživanja su potvrdila povezanost između konzumiranja voća te prevencije i liječenja pretilosti, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti (Valenzuela i sur., 2003). Voće karakterizira visoki sadržaj polifenola i antioksidacijsko djelovanje, pa je tako dokazano da aronija, višnja i dunja štite od oštećenja stanica slobodnim radikalima (Kujawska i sur., 2010; Wojdyło i sur., 2014; Wojdyło i sur., 2013). Studije također povezuju i zdravstvene koristi s konzumiranjem voća i povrća u obliku smoothie sokova. Fernandez i Murette (2017) su istraživali sinergijsko djelovanje probiotika i prebiotika, kombinacijom unosa jogurta i voća. Konzumiranje jogurta povezano je sa smanjenim povećanjem tjelesne težine i manjom učestalošću dijabetesa tipa 2, dok voće ima utvrđene učinke na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti. Međutim, pretjerana konzumacija smoothie sokova može imati štetan utjecaj na zdravlje zuba zbog visokog sadržaja šećera i kiselina u takvim pićima (Tahmassebi i sur., 2014).

2.2. FORMULACIJE SMOOTHIE-SOKOVA

Smoothie sokovi se sastoje od voća (ili rjeđe od povrća) i voćnog soka koji može sadržavati i neke druge sastojke. Mnogi komercijalni smoothie sokovi kao glavni sastojak sadrže neko široko rasprostranjeno voće (npr. naranča, banana ili jabuka), ali isto tako mogu sadržavati i neko crveno bobičasto voće poput jagoda, malina, kupina, crnog grožđa ili ribiza koje zbog svojih nutritivnih i senzorskih svojstava čine smoothie sokove više privlačnim za potrošače (Hurtado i sur., 2016). U tablici 1. navedeni su primjeri sastava smoothie sokova korištenih u različitim istraživanjima.

Tablica 1. Primjeri sastava smoothie sokova korištenih u različitim istraživanjima

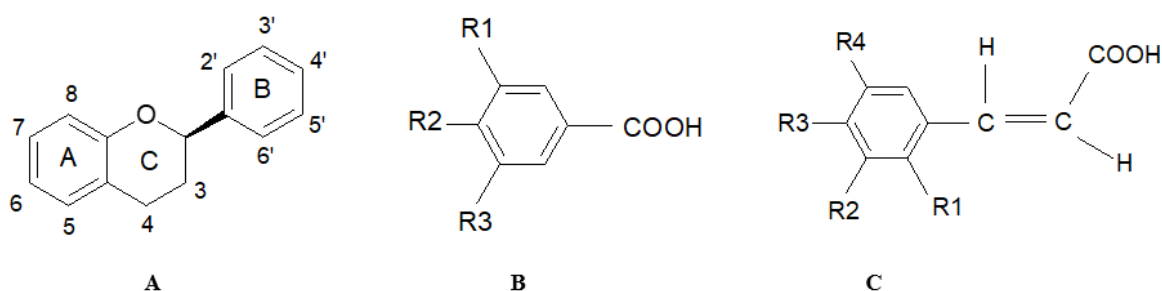
Voće	Povrće	Mliječna komponenta	Ostali sastojci	Referenca
Naranča 20 % Jagoda 20 % Jabuka 16 % Banana 10 % Crno grožđe 10 % Kupina 10 % Crveni ribiz 7 % Bijelo grožđe 5 % Limeta 2 %	-	-	-	Hurtado i sur., 2016
Naranča 59 % Jabuka 15 %	Mrkva 15 % Repa 11 %	-	-	Fernandez i sur., 2019
Jabuka 20 %	Mrkva 20 % Tikvica 19,9 % Bundeva 15 % Poriluk 5 %	-	otopina citrusnog pektina (1 %- tna) 20 % Sol 0,1 %	Hurtado i sur., 2019a
Banana 40 % Jagoda 40 % Palma <i>Euterpe edulis</i> 20 %	-	-	-	Ribeiro i sur., 2018
Naranča 50 % Papaja 13,5 % Dinja 13,5 %	Mrkva 13 %	Sojino mlijeko 10 %	-	Andrés i sur., 2016a
Limun 1,7 %	Rajčica 33 % Zelena paprika 17 % Celer 8,5 % Krastavac 4 % Luk 4 % Mrkva 4 %	-	Sol 1,7 % Maslinovo ulje 0,8 % Voda 25,3 %	Barba i sur., 2010
Šljiva 31 % Trešnja 26 % Bijelo grožđe 20 % Kupina 5 %	Rajčica 8 %	-	Aloe vera 10 %	Di Cagno i sur., 2011
Kivi 40 % Bijelo grožđe 20 % Papaja 15 %	Špinat 8 % Komorač 7 %	-	Aloe vera 10 %	Di Cagno i sur., 2011

2.3. NUTRITIVNI POTENCIJAL SMOOTHIE-SOKOVA

U proizvodnji smoothie sokova mogu se koristiti razne kombinacije različitih vrsta voća i povrća, pa ovisno o njihovom nutritivnom sastavu, smoothie sokovi mogu biti izvrstan izvor vitamina, minerala, biološki aktivnih spojeva te ostalih spojeva koji imaju blagotvorni utjecaj na zdravlje. U ovom radu, za pripremu smoothie soka, korištene su jabuka, mrkva, aronija, indijanska banana i bademovo mlijeko. Navedene namirnice imaju izvrstan nutritivan sastav i svaka od njih ima dokazane pozitivne učinke na zdravlje.

2.3.1. Jabuka (*Malus domestica* L.)

Jabuke su najpopularnija voćna vrsta u Europi, a uzgajaju se u cijelom svijetu. Od 2003. do 2005. godine prosječna potrošnja jabuka po glavi stanovnika u Europi je iznosila 61 g dnevno, što je dvostruko više od potrošnje po glavi stanovnika širom svijeta i predstavlja četvrtinu ukupne potrošnje voća u Europi. Cijena, praktičnost i pozitivan utjecaj na zdravlje su glavni razlozi za ovu popularnost (Ceymann i sur., 2012). Jabuke i njihovi proizvodi sadrže značajne količine fenolnih spojeva (Putnik i sur., 2017; Khanizadeh i sur., 2008). Fenolni spojevi se prema kemijskoj strukturi mogu razvrstati u dvije glavne skupine: flavonoidi i neflavonoidi. Flavonoidi su najzastupljeniji fenolni spojevi u voću i povrću, a sastoje se od dva fenolna prstena (A i B) spojena preko centralnog piranskog prstena (C). Najvažnija skupina neflavonoida u voću i povrću su fenolne kiseline, koje sadrže jednu fenilnu skupinu supstituiranu jednom karboksilnom skupinom i jednom ili više OH grupa (De la Rosa i sur., 2019) (Slika 1).



Slika 1. Kemijska struktura flavonoida (A), hidroksibenzojevih (B) i hidroksicimetnih kiselina (C) (De la Rosa i sur., 2019)

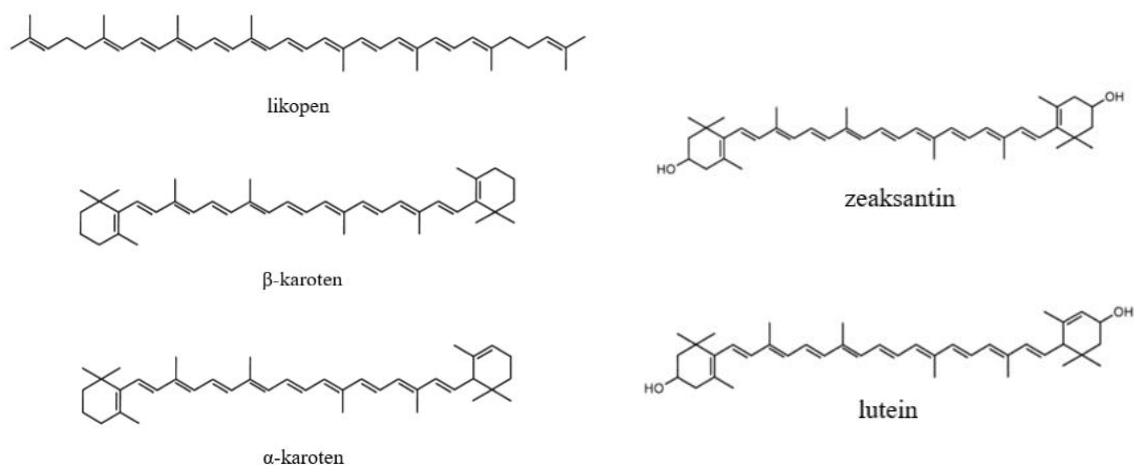
Za jabuke je pokazano da sadrže veći udio slobodnih fenolnih spojeva (91,8 %; 272,1 mg 100 g⁻¹) u odnosu na vezane fenolne spojeve (8,2 %; 24,3 mg 100 g⁻¹) (Sun i sur., 2002). Većina fenola u jabukama pripada skupini flavonoida, od kojih su najzastupljeniji flavonoli (kvercetin-3-glikozidi), flavan-3-oli (katehini, epikatehini i procijanidini), dihidrohalkoni (floridzin) te u kultivarima crvene boje kore antocijani (cijanidin 3-glikozid). Jabuke također sadrže značajne količine derivata hidroksicimetne kiseline među kojima se najviše ističe klorogenska kiselina (Lancaster i Dougall, 1992; Nicolas i sur., 1994). Različite flavonoidne skupine pretežno su smještene u kori jabuke (Guyot i sur., 1998). Potencijalne zdravstvene koristi jabuka su brojne. Redovita konzumacija voća i povrća, uključujući jabuke, može pomoći u prevenciji kroničnih bolesti i održavanju dobrog zdravlja (Boyer i Liu, 2004). Fenolni spojevi općenito su prepoznati kao glavne odrednice bioloških aktivnosti jabuka, poput prevencije kardiovaskularnih bolesti, astme i drugih plućnih disfunkcija, dijabetesa, pretilosti i raka (Boyer i Liu, 2004; Graziani i sur., 2005), kao i prevencija starosnih neurodegenerativnih poremećaja (Spencer, 2010). Istraživanja *in vitro* i na životinjama pokazala su da jabuke imaju visoku antioksidacijsku aktivnost, te mogu inhibirati proliferaciju stanica karcinoma (Sun i sur., 2002), smanjiti oksidaciju lipida (Mayer i sur., 2001) i snižavati kolesterol (Leontowicz i sur., 2002), što potencijalno objašnjava njihovu ulogu u smanjenju rizika od kroničnih bolesti.

2.3.2. Mrkva (*Daucus carota* L.)

Mrkva je jedno od najvažnijih korijenastih povrtnih kultura koje se uzgaja širom svijeta, a sadrži visoku razinu karotenoida, posebice β -karotena koji predstavlja glavni izvor provitamina A u prehrani ljudi (Klein i Rodriguez-Concepcion, 2015). Karotenoidi su po kemijskom sastavu ugljikovodici sastavljeni od 8 izoprenskih jedinica. Većina karotenoida sadrži lanac od 40 C atoma, koji može ili ne mora završiti cikličkim krajnjim skupinama (prstenovima), a može se i nadopuniti funkcionalnim skupinama koje sadrže kisik (Namitha i Negi, 2010). Karotenoidi se strukturno mogu podijeliti u dvije glavne skupine: karoteni (uključuju β -karoten, α -karoten, likopen), koji su isključivo ugljikovodici i ksantofili (uključuju lutein, astaksantin i zeaksantin), koji sadrže kisik (Jaswir i sur., 2010) (slika 2).

Brojne epidemiološke studije su potvrdile da je prehrana bogata karotenoidima povezana sa smanjenim rizikom od degenerativnih poremećaja, uključujući razne vrste raka, kardiovaskularne i oftalmološke bolesti (Mayne, 1996), kao što su očna mrežnjača i degradacija makule (Ribaya-Mercado i Blumberg, 2004). Sok od mrkve smatra se vrlo dobrim izvorom

karotenoida, a prevladavajući karotenoidi u svježim sokovima su β -karoten i α -karoten. Ostali karotenoidi prisutni u manjem omjeru su ζ -karoten, fitofluen, fitoen i lutein (Stinco i sur., 2019).



Slika 2. Kemijske strukture karotena i ksantofila (Oliver i Palou, 2000)

2.3.3. Aronija (*Aronia melanocarpa* L.)

Aronija je biljka podrijetlom iz Sjeverne Amerike, a prenesena je u Europu prije otprilike jednog stoljeća. Plodovi aronije su male, tamno plave bobice, koje se zbog svog adstringentnog okusa rijetko konzumiraju svježe, tj. neprerađene. U prehrambenoj industriji se plodovi aronije najčešće prerađuju u sokove, sirupe, džemove, voćne čajeve, likere i dodatke prehrani (Chrubasik i sur., 2010). Brojna su istraživanja pokazala da aronija pruža širok spektar pozitivnih učinaka na kronične degenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti, rak debelog crijeva i upalne procese (Lala i sur., 2006; Wiczowski i sur., 2010). Ove zdravstvene koristi pripisane su njezinom visokom fenolnom sadržaju, koji uglavnom uključuje antocijane, procijanidine, flavonolne glikozide i fenolne kiseline (Bursać Kovačević i sur., 2016; Lee i sur., 2014). Konzumacija soka od aronije tijekom 30 dana u dozi 10 mL soka po kg tjelesne mase poboljšava sposobnost učenja i pamćenja mladih i zdravih štakora (Valcheva Kuzmanova i sur., 2013; Valcheva Kuzmanova i sur., 2014). Najnovija istraživanja bave se antioksidacijskim i protuupalnim učincima polifenola aronije (Denev i sur., 2019). Dokazano je da sok od aronije ima neuroprotektivni učinak te da poboljšava kognitivne i lokomotorne funkcije (Daskalova i sur., 2019), a ima i blagotvorni učinak na smanjenje pretilosti (Kim i sur., 2018; Lim i sur., 2019).

2.3.4. Indijanska banana (*Asimina triloba* L.)

Indijanska banana je voće duguljasto-cilindričnog oblika, dužine 3–15 cm, širine 3–10 cm, težine ploda od 200 do 400 g. Plodovi se formiraju pojedinačno ili u grozdovima poput banana i sastoje se od dva reda sjemenki veličine badema okruženih pulpom (McGrath i Karahadian, 1994). Nejestiva kora prilikom dozrijevanja prelazi iz zelene u smeđe-crnu boju. Boja jestive pulpe kreće se od kremasto bijele do svijetlo žute ili narančaste (Archbold i sur., 2003). Plod indijanske banane ima okus koji podsjeća na kombinaciju manga, banane i ananasa, a bogat je hranjivim sastojcima poput vitamina i minerala (Templeton i sur., 2003; Pomper i Layne, 2005) te sadrži visoku razinu procijanidina koji imaju antioksidacijsko djelovanje (Brannan i sur., 2015). Indijanska banana sadrži značajne razine fitokemikalija i jedinstvenih spojeva koji mogu imati pozitivan utjecaj na zdravlje. Plodovi se mogu usporediti s jabukama i narančama, jer su bogati polifenolnim spojevima, vitaminom C, magnezijem, željezom, bakrom i manganom. Razina antioksidacijskih spojeva vrlo je visoka i usporediva je s ostalim tropskim voćem kao što su guava, papaja, banana i ananas (Kobayashi i sur., 2008). U usporedbi s mangom (*Mangifera indica* L.), indijanska banana ima sličnu (kafeinska kiselina) ili višu razinu polifenola (elaginska kiselina, ferulinska kiselina i kvercetin). Za neke alternativne prehrambene lijekove i proizvode koji sadrže ekstrakte indijanske banane pokazalo se da imaju antitumorsku djelotvornost na modelima životinja i u ograničenom broju kliničkih studija (Coothankandaswamy i sur., 2010).

2.3.5. Bademovo mlijeko

Bademovo mlijeko je emulzija tipa ulje u vodi (Hasan, 2012), a prisutno je na tržištu kao alternativni hranjivi napitak za potrošače koji pate od intolerancije na laktozu, preosjetljivi su na kravlje mlijeko ili pak traže napitke na biljnoj osnovi kao zamjenu za kravlje mlijeko (Dhakal i sur., 2014). Promovira se kao zdrava hrana zbog svojih jedinstvenih prehrambenih svojstava poput visokog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina, uravnoteženog sastava u sadržaju proteina i masti i drugim korisnim biljnim spojevima kao što su vlakna, vitamini, antioksidansi i minerali (Jalali-Khanabadi i sur., 2010). Biljna mlijeka općenito imaju pozitivne učinke zbog bogatog antioksidacijskog djelovanja i masnih kiselina koji smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, raka, ateroskleroze i dijabetesa (Zujko i Witkowska, 2014). Osim uloge biljne prehrane u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, Pistollato i sur. (2018.) su primijetili da prehrana bogata biljnom hranom, uključujući i orašaste plodove, smanjuje rizik od neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti.

2.4. TOPLINSKA vs. NETOPLINSKA OBRADA SMOOTHIE SOKOVA

Toplinska pasterizacija je tip toplinske obrade koji se koristi za inaktivaciju toplinski labilnih mikroorganizama, poput vegetativnih bakterija, kvasaca i plijesni, koji su odgovorni za kvarenje hrane ili trovanje hranom (Lewis i Heppell, 2000). Uz mikrobiološku inaktivaciju, termička pasterizacija uspješno se koristi i za inaktivaciju enzima voćnog soka poput polifenol oksidaze (PPO), lipooksigenaze (LOX), peroksidaze (POD), pektin-metil esterase (PME) (Ağçam i sur., 2018) te poligalakturonaze (PG) (Marszałek i sur., 2017), čije aktivnosti mogu predstavljati probleme tijekom prerade i skladištenja (Lewis i Heppell, 2000). Stoga se termički obrađenim voćnim sokovima može produljiti trajnost i do nekoliko mjeseci, bez značajnih gubitaka kvalitete pri niskim ili sobnim temperaturama (Ağçam i sur., 2018).

Iako u novije vrijeme netoplinske tehnologije obrade, kao što su pulsirajuće električno polje (*Pulsed Electric Field, PEF*), visoki hidrostatski tlak (*High Hydrostatic Pressure, HHP*), obrada ultrazvukom visoke snage (*High Power Ultrasound, HPU*) i ultraljubičasto zračenje (*Ultra violet, UV*), imaju posebno obećavajuće rezultate u obradi voćnih sokova, toplinska pasterizacija i dalje se prihvaća kao najpouzdanija tehnika u pogledu dobivanja proizvoda koji su sigurni za konzumiranje i imaju duži vijek trajanja (Bursać Kovačević i sur., 2019; Putnik i sur., 2019; Koubba i sur., 2018; Gabrić i sur., 2017).

Prema intenzitetu primijenjene toplinske obrade, postoje četiri skupine konvencionalne pasterizacije (Ağçam i sur., 2018):

- visoka temperatura uz duže vrijeme tretmana (*High Temperature - Long Time, HTLT*);
- visoka temperatura uz kratko vrijeme tretmana (*High Temperature - Short Time, HTST*);
- blaga temperatura uz duže vrijeme tretmana (*Mild Temperature – Long Time, MTLT*);
- blaga temperatura uz kratko vrijeme tretmana (*Mild Temperature – Short Time, MTST*).

HTLT tretman (≥ 80 °C, > 30 s) je najčešće korištena toplinska obrada sokova i pića, dok proizvodi s $\text{pH} > 4,5$ zahtijevaju intenzivniji tretman u cilju osiguranja zdravstvene ispravnosti (Petruzzi i sur., 2017). Kod proizvodnje voćnih sokova, u tradicionalnoj praksi, sokovi se zagrijavaju na temperaturu od 60 °C do 75 °C u trajanju od 30 minuta, a zatim se pri toj temperaturi pune, zatvaraju i pasteriziraju pri temperaturi od 84 °C do 88 °C tijekom 15 do 45 minuta, ovisno o veličini samog pakiranja. Nakon ove toplinske obrade, proizvodi se hlade na sobnu temperaturu. HTST pasterizacija se provodi pri višim temperaturama (> 90 °C) kraće vrijeme. Na taj način može se pasterizirati sok od jabuke, primjenom temperature od 95 °C do 98 °C tijekom 15 do 30 sekundi (Renard i Maingonnat, 2012).

Kao i kod voćnih sokova, toplinska obrada smoothie sokova koristi se za uništavanje patogenih mikroorganizama i za uklanjanje enzimske aktivnosti, što u konačnici rezultira produženim rokom trajanja. Primjena toplinske obrade u smoothie sokovima može dovesti do promjene u senzorskim svojstvima, kao što su boja, okus ili miris te funkcionalnim svojstvima proizvoda, pri čemu su posebno osjetljivi toplinski labilni bioaktivni spojevi. Keenan i sur. (2010) su uočili da su fenolni spojevi u voćnim smoothiejima osjetljiviji na toplinsku obradu (pri temperaturi od 70 °C, u trajanju od 10 minuta), tj. prosječne vrijednosti (361 mg GAE (ekvivalenti galne kiseline) 100 g⁻¹) niže su od neobrađenih smoothieja (401 mg GAE 100 g⁻¹). Međutim, pasterizacija može imati i pozitivan utjecaj na neke bioaktivne spojeve. Neki od primjera uključuju poboljšanje ukupnog fenolnog sastava, udio ukupnih flavonoida i monomernih antocijana, kao i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u soku od crne murve (Tomas i sur., 2015), ukupne količina fenola i hidroksicimetnih kiselina u soku od mrkve (Dereli i sur., 2015) te sadržaj antocijana i fenolnih kiselina u soku višnje (Elez Garofulić i sur., 2015).

Mnoga istraživanja o utjecaju toplinske obrade na karotenoide imaju kontradiktorne rezultate, ali generalno se može zaključiti da su ovi spojevi relativno stabilni na utjecaj povišene temperature (Vásquez-Caicedo i sur., 2007; Lee i Coates, 1999). Karotenoidi se mogu razvrstati u dvije skupine s obzirom na toplinsku osjetljivost. Dhuique-Mayer i sur. (2007) su otkrili da karoteni imaju veću toplinsku stabilnost, s gubicima u rasponu od 1 do 18 % nakon 15 minuta tretmana pri temperaturi od 55 °C, dok se ksantofili brže degradiraju, s gubicima između 30 i 60 % nakon 15 min pri istoj temperaturi. Gama i de Sylos (2007) su uočili da pasterizacija pri temperaturama između 95 °C i 105 °C u trajanju od 10 sekundi značajno utječe na degradaciju ksantofila: sadržaj violaksantina smanjio se za 38 %, a luteina za 20 %. Razlog tome je prisutnost kisika u kemijskoj strukturi ksantofila, čime su oni podložniji oksidaciji pri višim temperaturama. U zaključku, udio karotena (β -karoten, α -karoten) i β - kriptoksantina pri istim uvjetima pasterizacije nije bio značajno smanjen (Gama i de Sylos, 2007).

2.5. TEHNOLOGIJA VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA (VHT)

Visoki hidrostatski tlak (VHT) (*engl. HPP - High pressure processing ili HHP - High hydrostatic pressure*) ubraja se u alternativne, netoplinske metode procesiranja hrane, te se koristi kao zamjena toplinskoj obradi jer učinkovito inaktivira i inhibira mikroorganizme i denaturira neke enzime (Elamin i sur., 2015), prilikom čega dolazi do minimalnih promjena

teksturnih, senzorskih, organoleptičkih i nutritivnih svojstava (Sánchez-Moreno i De Ancos, 2017). Namirnica se može tretirati u čvrstom ili tekućem obliku, s ili bez ambalaže, u temperaturnom rasponu od 5 °C do 90 °C, pri tlakovima od 50 do 1000 MPa, a sam postupak obrade može trajati od nekoliko sekundi do 30 minuta (Muntean i sur., 2016).

Primjena visokog hidrostatskog tlaka ima brojne prednosti u usporedbi s tradicionalnom toplinskom obradom (Muntean i sur., 2016; Houška i Silva, 2017; Abera i sur., 2019):

- minimalne promjene na organoleptičkim svojstvima (nisu prisutne note okusa "po kuhanom" kao kod toplinske pasterizacije),
- bolja stabilnost izvornih hranjivih svojstava,
- nije potrebna upotreba kemijskih konzervansa,
- manji utrošak energije (obrada pri nižim temperaturama),
- manji troškovi obrade (obrađuje se ambalažni materijal),
- veća mikrobiološka sigurnost (visokoučinkovita selektivna inaktivacija mikroorganizama),
- mogućnost razvijanja potpuno novih prehrambenih proizvoda.

Opća načela koja objašnjavaju ponašanje hrane pod utjecajem visokog hidrostatskog tlaka su Le Chatelier-ov princip, izostatički princip rada i princip mikroskopskog uređenja (Elamin i sur., 2015).

Prvi od njih je Le Chatelier-ov princip, koji se primjenjuje na sve fizičke procese i navodi da, kada je sustav u ravnoteži poremećen, sustav reagira na način koji teži da se smetnje minimaliziraju. To znači da visoki tlak pospješuje reakcije koje rezultiraju smanjenjem volumena, ali potiskuje reakcije koje uključuju povećanje volumena. Le Chatelier-ov princip također navodi da je svaki fenomen, poput faznog prijelaza, promjene u molekularnoj konfiguraciji ili kemijska reakcija, koje prati smanjenje volumena, pojačan djelovanjem visokog tlaka (Norton i Sun, 2007). Učinci visokog tlaka na stabilizaciju kemijskih veza također su regulirani ovim principom, pa je tako utvrđeno da tretman visokim hidrostatskim tlakom utječe samo na nekovalentne kemijske veze (ionske, vodikove i hidrofobne veze), ostavljajući kovalentne veze netaknutima (Tríska, 2017). Stoga su najviše pogođene velike biomolekule, poput proteina, nukleinskih kiselina i polisaharida, koje za održavanje strukture i funkcije ovise o nekovalentnoj vezi (Dattaa i Deeth, 2018). Cijepanje nekovalentnih veza i narušavanje različitih struktura dovodi do inaktivacije mikroorganizama i enzima te može izazvati

teksturalne promjene u hrani (Linton i Patterson, 2000). S druge strane, na manje organske molekule poput pigmenata, molekula odgovornih za okus i hranjive tvari (npr. vitamini), u kojima su kovalentne veze dominantne, tretman visokim hidrostatskim tlakom utječe vrlo malo ili uopće ne utječe. Niska temperatura na kojoj se obično rade tretmani visokim tlakom osiguravaju male ili nikakve promjene u ovim komponentama (Dattaa i Deeth, 2018).

Prema izostatičkom principu tlak se prenosi ravnomjerno i brzo u svim smjerovima, u cijelom uzorku, čime postupak postaje neovisan o volumenu i obliku proizvoda. Na ovaj način hrana se tretira ravnomjerno tijekom cijelog procesa, što je u suprotnosti s toplinskim procesima kod kojih se različiti dijelovi hrane mogu zagrijavati različitom brzinom (Dattaa i Deeth, 2018).

Princip mikroskopskog uređenja govori da pri konstantnoj temperaturi, porast tlaka povećava stupanj uređenosti molekula određene tvari (Elamin i sur., 2015).

Zbog adijabatskog zagrijavanja, tijekom obrade namirnice VHT-om dolazi do povećanja temperature od 3 do 5 °C za svakih 100 MPa, a prilikom smanjivanja tlaka dolazi do odgovarajućeg smanjenja temperature. Jačina porasta temperature ovisi o podvrgnutom tlaku i kemijskim komponentama hrane. Tako namirnice koje sadrže više kompresibilnih sastojaka hrane, npr. masti, pokazuju porast od 4 do 5 °C, dok hrana koja sadrži veći udio vode pokazuje porast od 3 °C na 100 MPa (Dattaa i Deeth, 2018).

Konzerviranje hrane pomoću visokotlačne obrade može se provoditi u kontinuiranim, polukontinuiranim ili šaržnim sustavima. Prva dva su prikladna za tekuće proizvode koji se nakon VHT tretmana pune u ambalažu u aseptičkim uvjetima. Međutim, većina namirnica se ipak prerađuje u šaržama, tj. unutar ambalaže. Takva ambalaža treba biti pogodna za tretiranje VHT-om, tj. mora omogućiti prijenos tlaka iz tekućine koja prenosi tlak do hrane unutar pakiranja (Dobiáš i Vápenka, 2017). Pri odabiru ambalažnog materijala za obradu pod visokim hidrostatskim tlakom mora se uzeti u obzir i činjenica da se ukupni volumen ambalaže smanjuje za oko 15 % tijekom tretmana pa sama ambalaža mora imati sposobnost vraćanja u prvobitan oblik nakon tretmana, bez utjecaja na svojstva brtvljenja (Hogan i sur., 2014). Kombinacija različitih materijala, dobivenih laminiranjem ili koekstruzijom, omogućuje dobivanje ambalažnih filmova s optimalnim funkcijskim parametrima (Dobiáš i Vápenka, 2017). Polimeri i kopolimeri smatraju se najprikladnijima za obradu VHT-om i najčešće se koriste kao ambalažni materijali (Norton i Sun, 2007).

Američki FDA i USDA su priznali obradu VHT-om kao jedinu relevantnu netermalnu tehnologiju konzerviranja te su razvili smjernice i propise za proizvode tretirane ovim postupkom. U odnosu na Sjevernu Ameriku, gdje obrada VHT-om obuhvaća otprilike 55 % ukupne komercijalne obrade koja se koristi diljem svijeta, u Europskoj Uniji se VHT još uvijek smatra novom tehnologijom i tek treba pronaći široku primjenu u komercijalnoj obradi (Koutchma i Warriner, 2017).

2.5.1. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u obradi smoothie-sokova

Obrada visokim hidrostatskim tlakom često se koristi u proizvodnji proizvoda od voća i povrća. Uobičajeni tretman VHT-om se provodi pri 500–600 MPa u trajanju od 1 do 5 minuta na sobnoj ili nižoj temperaturi (Matser i Vollebregt, 2017). S obzirom na to da se tijekom obrade namirnice visokim hidrostatskim tlakom najčešće koriste niske temperature, većina originalnih nutritivnih i funkcionalnih svojstava zadržava se nakon prerade. Visoki hidrostatski tlak oštećuje mikrobnu staničnu membranu te denaturira proteine koji su uključeni u mikrobnu replikaciju. Nakon provedenog tretmana proizvodi od voća i povrća mogu sadržavati mikroorganizme u nižim koncentracijama (Silva i Evelyn, 2017). Zbog toga je potrebno takve proizvode čuvati u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, kako bi se izbjegao ili usporio neželjeni rast mikroba tijekom skladištenja. Rok trajanja je ograničen zbog preostale aktivnosti enzima, potencijalnog rasta spora i kemijskih promjena, a može varirati u rasponu od 3 do 8 tjedana kada se čuvaju pri temperaturi od 4 °C (Matser i Vollebregt, 2017).

Obrada smoothie sokova VHT-om može imati povoljan utjecaj na stabilnost bioaktivnih spojeva u usporedbi s toplinskom obradom. Pregled promjena ukupnih karotenoida i ukupnih fenola u različitim smoothie te voćnim sokovima dan je u tablici 2. Andrés i sur. (2016a, 2016b) u svojim istraživanjima navode da VHT tehnologija uzrokuje povećanje ukupnih karotenoida i ukupnih fenola u usporedbi s neobrađenim smoothie sokom, što je posljedica lakše ekstrakcije navedenih spojeva nakon VHT tretmana. De Ancos i sur. (2002) otkrili su da do ove povećane ekstraktibilnosti karotenoida dolazi zbog činjenice da visoki tlak utječe na membrane u biljnim stanicama i izazva denaturaciju proteina koji su povezani s karotenoidima. Nadalje, obrada namirnice VHT-om stvara promjene u raspodjeli fenolnih spojeva te povećava brzinu prijenosa mase, to rezultira pojačanim prodiranjem otapala u stanice razbijanjem staničnih zidova i hidrofobnih veza u staničnoj membrani, što u konačnici dovodi do velike propusnosti i oslobađanja nekih antioksidativnih komponenata (Andrés i sur., 2016b). Za razliku od smoothie

soka tretiranog VHT-om, pasterizirani smoothie sok je u usporedbi s neobrađenim smoothie sokom pokazao suprotan trend, odnosno smanjenje navedenih spojeva (Andrés i sur., 2016a). Smanjenje ukupnih fenola u pasteriziranom uzorku može biti posljedica i enzimske i neenzimske oksidacije. Prilikom termičke obrade i skladištenja dolazi do neenzimske autooksidacije fenolnih kiselina u kinone i daljnje produkte razgradnje (De Ancos i sur., 2002). Tijekom prerade i skladištenja hrane stvaraju se uvjeti koji uzrokuju oksidaciju i izomerizaciju karotenoida. Oksidativna razgradnja glavni je uzrok velikih gubitaka karotenoida prilikom toplinske obrade namirnice, a samu razgradnju stimuliraju toplina, svjetlost, enzimi, metali i kooksidacija s lipidnim hidroperoksidima (Rodriguez-Amaya, 1999). Neka istraživanja navode da VHT tehnologija može povoljno djelovati na stabilnost ukupnih fenola, dok istovremeno nepovoljno djeluje na stabilnost karotenoida (Barba i sur., 2010; Carbonell-Capella i sur., 2013).

Istraživanje De Ancos i sur. (2020) ukazuje na to da ukupni karotenoidi i fenoli nisu stabilni prilikom obrade VHT-om (ovisno o sorti naranče, uglavnom su rezultati manji od kontrolnog uzorka). Dokazano je da je smanjenje koncentracije bioaktivnih spojeva nakon VHT-a u voću i povrću uglavnom povezano s preostalom aktivnošću enzima (peroksidaza, polifenol oksidaza, β -glukozidaza itd.) te kombinacijom visokog tlaka s povišenom temperaturom. Također, na stabilnost bioaktivnih spojeva mogu utjecati kemijske reakcije do kojih dolazi pod utjecajem visokog tlaka, npr. kemijske reakcije popraćene smanjenjem volumena, kao što je trans - cis izomerizacija karotenoida (Mahadevan i Karwe, 2016).

Tablica 2. Pregled istraživanja o utjecaju visokog hidrostatskog tlaka na karotenoide i ukupne fenole u smoothie skovoima različitog sastava

Uzorak	Tretman	Ukupni karotenoidei (mg L ⁻¹)	Ukupni fenoli (mg GAE L ⁻¹)	Referenca
<u>Smoothie sok:</u> rajčica 33 % zelena paprika 17 % celer 8,5 % krastavac 4 % luk 4 % mrkva 4 % limun 1,7 % sol 1,7 % maslinovo ulje 0,8 % voda 25,3 %	neobrađeni uzorak pasterizacija 90 °C, 15 s VHT 100 MPa, 2 min VHT 100 MPa, 9 min VHT 200 MPa, 2 min VHT 200 MPa, 9 min VHT 300 MPa, 2 min VHT 300 MPa, 9 min VHT 400 MPa, 2 min VHT 400 MPa, 9 min	2,62 ± 0,35 2,71 ± 0,12 1,95 ± 0,18 1,87 ± 0,11 1,71 ± 0,16 2,00 ± 0,21 1,45 ± 0,07 2,21 ± 0,09 1,88 ± 0,30 1,65 ± 0,25	746,9 ± 90,5 848,7 ± 56,0 684,9 ± 28,3 735,1 ± 56,1 768,1 ± 8,3 724,9 ± 10,5 750,0 ± 53,2 758,4 ± 67,6 805,1 ± 37,0 726,2 ± 58,8	Barba i sur., 2010
<u>Smoothie sok:</u> naranča 50 % papaja 13,5 % dinja 13,5 % mrkva 13 % sojino mlijeko 10 %	neobrađeni uzorak pasterizacija 80 °C, 3 min VHT 550 MPa, 3 min VHT 650 MPa, 3 min	127,4 ± 2,3 124,1 ± 3,9 134,5 ± 1,9 136,6 ± 1,6	444 ± 10 419 ± 17 497 ± 11 503 ± 12	Andrés i sur., 2016a
<u>Smoothie sok:</u> naranča 50 % papaja 13,5 % dinja 13,5 % mrkva 13 % obrano mlijeko 10 %	neobrađeni uzorak pasterizacija 80 °C, 3 min VHT 450 MPa, 3 min VHT 600 MPa, 3 min	206,2 ± 2,6 204,3 ± 4,7 228,2 ± 3,2 225,7 ± 3,5	456,2 ± 9,8 454,0 ± 7,0 485,7 ± 8,4 475,2 ± 7,8	Andrés i sur., 2016b
Sok od naranče (sorta Washington Navel)	neobrađeni uzorak VHT 200 MPa, 1 min VHT 400 MPa, 1 min	7,514 ± 0,154 7,75 ± 0,232 4,95 ± 0,104	250,3 ± 5,6 208,4 ± 12,5 205,6 ± 8,0	De Ancos i sur., 2020
Sok od naranče (sorta Cara Cara)	neobrađeni uzorak VHT 200 MPa, 1 min VHT 400 MPa, 1 min	25,019 ± 0,852 19,985 ± 0,548 21,992 ± 0,754	210,0 ± 7,7 198,0 ± 5,3 232,3 ± 5,9	
<u>Voćni sok:</u> papaja 32,5 % mango 10 % naranča 7,5 % voda 50 %	neobrađeni uzorak VHT 300 MPa, 5 min VHT 300 MPa, 15 min VHT 500 MPa, 5 min VHT 500 MPa, 15 min	3,293 ± 0,141 2,946 ± 0,173 2,794 ± 0,153 2,954 ± 0,170 3,643 ± 0,151	166,9 ± 11,7 184,5 ± 10,2 164,2 ± 9,6 170,7 ± 9,6 165,7 ± 9,8	Carbonell- Capella i sur., 2013

*GAE = ekvivalenti galne kiseline

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje ovog istraživanja pripremljeni su smoothie sokovi iz navedenih sirovina:

- jabuka sorte „Zlatni Delišes“ (*Malus domestica* L. cv. Golden Delicious) (Fragaria d.o.o, Hrvatska);
- mrkva (*Daucus carota* L.) (iz trgovačke mreže);
- pasterizirani sok od aronije (*Aronia melanocarpa* L.) OPG-a Obitelji Maletić (Hrvatska);
- kaša indijanske banane (*Asimina triloba* L.);
- Alpro napitak od badema Original (Danone, Belgija) (sastojci: voda, šećer, bademi (2 %), trikalcijev fosfat, morska sol, stabilizatori (karuba guma, gellan guma), emulgator (suncokretov lecitin), vitamini (riboflavin (B2), B12, E, D2) (Tablica 3).

Tablica 3. Nutritivni sastav Alpro napitka od badema na 100 mL

Energija	102 kJ / 24 kcal
Masti	1,1 g
zasićene	0,1 g
monozasićene	0,8 g
polinezasićene	0,2 g
Ugljikohidrati	3 g
šećeri	3 g
Vlakna	0,2 g
Bjelančevine	0,5 g
Sol	0,14 g
Vitamini	
vitamin D	0,75 µg
vitamin B2	0,21 mg
vitamin B12	0,38 µg
vitamin E	180 mg
Minerali	
kalcij	120 mg

Jabuke, mrkve i napitak od badema su do pripreme smoothie sokova bili skladišteni u hladnjaku na temperaturi od +4 °C, dok su kaša indijanske banane i sok od aronije bili skladišteni na -18 °C.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema smoothie soka

Neposredno prije same pripreme smoothie sokova, jabukama je uklonjena sjemena loža i peteljka, mrkve su oguljene, a sok od aronije i kaša indijanske banane odmrznuti. Sok od jabuke je proizveden prešanjem uz pomoć sokovnika na hladno prešanje TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 (snage 300 W, brzine okretaja 80 rpm, promjera filtera 0,3 mm), dok je sok od mrkve pripremljen u sokovniku BOSCH MES 4000 (snage 1000 W, promjer filtera 0,5 mm). Smoothie sok se potom pripremao u staklenoj čaši volumena 5 L dodavanjem svake pojedine sirovine u odgovarajućem omjeru (Tablica 4) te se na kraju homogenizirao upotrebom štapnog miksera SIEMENS MQ 33001 (snage 170 W) (Slika 3). Pripremljeni smoothie sokovi prebačeni su u plastične bočice volumena 500 mL i 20 mL u kojima su podvrgavani tretmanima visokog hidrostatskog tlaka te u staklene boce volumena 500 mL u kojima se provodila pasterizacija prema planu pokusa (Tablica 5). Jedan uzorak smoothie soka, prebačen u staklenu bocu volumena 500 mL, ostao je netretiran i predstavljao je kontrolni uzorak.



Slika 3. Homogenizacija pripremljenog smoothie soka pomoću štapnog miksera (Vlastita fotografija)

Tablica 4. Udio pojedine sirovine u smoothie soku

Sirovina	Udio (%)
Sok od jabuke sorte „Zlatni delišes“	50
Sok od mrkve	20
Sok od aronije	5
Kaša indijanske banane	10
Napitak od badema	15

3.2.2. Obrada smoothie sokova visokim hidrostatskim tlakom

Za provedbu tretmana visokim hidrostatskim tlakom (VHT) smoothie sok se do vrha punio u odgovarajuće plastične bočice i to 1 bočica volumena 500 mL i 1 bočica volumena 20 mL po jednoj šarži, tj. po jednom tretmanu VHT-a. Tako pripremljene bočice, zbog zaštite od propuštanja tlačne tekućine u uzorak, vakuumirale su se u plastičnim vrećicama u uređaju za vakuumiranje „STATUS SV2000“. Konačno, smoothie sok tretiran je VHT-om u uređaju za obradu visokim hidrostatskim tlakom Stansed Fluid Power (Velika Britanija). Parametri koji su prema planu varirani su tlak (350 i 450 MPa) i vrijeme tretiranja (5 i 15 min) te su svi uzorci podvrgnuti skladištenju kroz 7, 14 i 21 dan u hladnjaku na temperaturi od +4 °C (Tablica 5).

Tablica 5. Plan pokusa tretiranja smoothie sokova

Broj uzorka	Uzorak	Skladištenje (dani)	Tlak (MPa)	Vrijeme (min)
1	Kontrola	0	0	0
2	Pasterizacija 85°C/7 min	0	0	0
3	VHT1	0	350	5
4	VHT2	0	350	15
5	VHT3	0	450	5
6	VHT4	0	450	15
7	Pasterizacija 85°C/7 min -7	7	0	0
8	VHT1-7	7	350	5
9	VHT2-7	7	350	15
10	VHT3-7	7	450	5
11	VHT4-7	7	450	15
12	Pasterizacija 85°C/7 min -14	14	0	0
13	VHT1-14	14	350	5
14	VHT2-14	14	350	15
15	VHT3-14	14	450	5
16	VHT4-14	14	450	15
17	Pasterizacija 85°C/7 min -21	21	0	0
18	VHT1-21	21	350	5
19	VHT2-21	21	350	15
20	VHT3-21	21	450	5
21	VHT4-21	21	450	15

3.2.3. Obrada smoothie sokova pasterizacijom

Za provedbu tretmana pasterizacije smoothie sok se punio u staklene boce volumena 500 mL, a sama pasterizacija provodila se u šaržnom pasterizatoru ukupne snage grijača 6 kW

(2x3 kW) (PS-100, Oprema Ludbreg d.o.o. Hrvatska). Prema radu Hurtado i sur. (2019b) režim pasterizacije iznosio je 85 °C tijekom 7 minuta (Hurtado i sur., 2019a). S obzirom na to da je bilo potrebno 24 minute da se u smoothie sokovima postigne željena temperatura, ukupno vrijeme koje su uzorci proveli u pasterizatoru iznosilo je 31 minutu. Pasterizirani smoothie sokovi (Slika 4) su nakon hlađenja na sobnoj temperaturi skladišteni prema planu pokusa (Tablica 5) u hladnjaku na temperaturi od +4°C.



Slika 4. Pasterizirani smoothie sok (lijevo); Netretirani kontrolni smoothie sok (desno)
(Vlastita fotografija)

3.2.4. Izolacija polifenola i karotenoida iz smoothie sokova

Izolacija polifenola i karotenoida provodila se neposredno nakon provedenog tretmana, odnosno prema planu pokusa (Tablica 5) nakon 7., 14. i 21. dana skladištenja.

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučna kupelj frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične kivete, volumena 50 mL
- Trbušasta pipeta, volumena 20 mL
- Stakleni lijevak

- Odmjerna tikvica, volumena 25 mL

Otapala i reagensi:

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Postupak ekstrakcije:

Ekstrakcija je provedena u plastičnim kivetama volumena 50 mL, na način da se u njih najprije na alitičkoj vagi odvažuje približno 5g ($\pm 0,0001$) smoothie soka i zatim se nadoda 20 mL 96 %-tnog etanola, kao ekstrakcijskog otapala. Pripremljeni uzorak ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka) (Slika 5) pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 10 min. Nakon završetka ekstrakcije, uzorak se pomoću staklenog lijevka i filter papira profiltrira u odmjernu tikvicu volumena 25 mL, a tikvica se do oznake nadopuni ekstrakcijskim otapalom (Slika 5). Pripremljeni ekstrakt se potom prebaci u plastičnu kivetu volumena 50 mL, u kojoj se do provedbe analiza čuva u hladnjaku na temperaturi od +4 °C. U dobivenim ekstraktima smoothie sokova spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli i ukupni karotenoidi.



Slika 5. Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex (Njemačka) (lijevo) i filtracija ekstrakata smoothie sokova (desno) (Vlastita fotografija)

3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih fenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom modifikaciji spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola

s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Staklene kivete
- Centrifuga (Hettich, Rotofix 32)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Plastične kivete, volumena 50 mL
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100 μ L i 1000 μ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Stakleni lijevak

Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (5x razrijeđen)
- Destilirana voda
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Otopina natrijevog karbonata (7,5 %-tna otopina)

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

- Standard galne kiseline

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

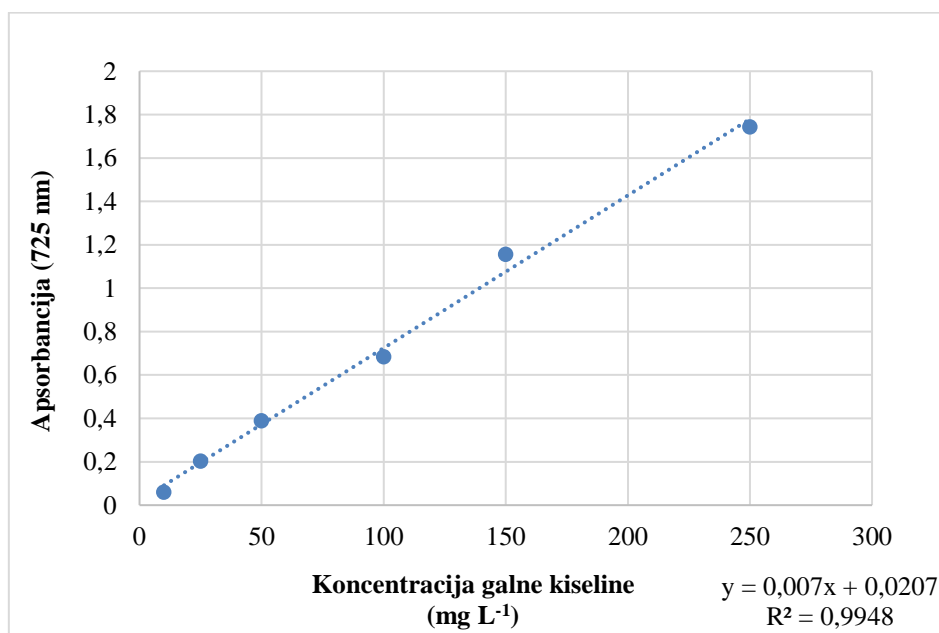
Postupak određivanja: U plastičnu kivetu otpipetira se redom 200 μ L ekstrakta i 200 μ L 96 %-tnog etanola (razrijeđenje ekstrakta 2X), 400 μ L F.C. reagensa (koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa stoji

1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se centrifugira 10 min na 5000 o/min, kako bi se odvojio talog i dobio bistri uzorak kojem se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm. Određivanje se provodi u paraleli, a kao slijepa proba koristi se destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca odvaži se 500 mg galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 20, 50, 100, 200, 300, 500 μL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150, 250 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se 400 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 400 μL F.C. reagensa (koji je 5x razrijeđen) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci stoje 1 h na sobnoj temperaturi, a nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac (Slika 6) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 6. Baždarni pravac za standard galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,007x + 0,0207$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida

Princip određivanja: Određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se mjeri intenzitet obojenja pri 470 nm, 649 nm i 664 nm.

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Staklene kivete

Otapala i reagensi:

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Postupak određivanja: Spektrofotometrijsko određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u smoothie sokovima provodi se direktnim mjerenjem apsorbancije prethodno pripremljenih alkoholnih ekstrakata na 470 nm i 649 nm za klorofil a i b te na 664 nm za karotenoide. Kao slijepa proba uzima se 96 %-tni etanol. Udjeli klorofila a i b te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (1, 2, 3) (Lichtenthaler i Buschmann, 2005; Sumanta i sur., 2014):

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad (1)$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad (2)$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b) / 209 \quad (3)$$

gdje su:

A = apsorbancija

C_a = klorofil a

C_b = klorofil b

$C_{(x+c)}$ = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na stabilnost ukupnih fenola i ukupnih karotenoida u smoothie-sokovima po provedenim tretmanima te tijekom skladištenja. Tretmani visokim hidrostatskim tlakom provedeni su variranjem tlakova (350 i 450 MPa) i vremena tretiranja (5 i 15 min) pri sobnoj temperaturi. Za usporedbu učinkovitosti netoplinske i toplinske tehnologije na nutritivnu kvalitetu smoothie-sokova, provedena je i toplinska obrada pasterizacijom pri temperaturi od 85 °C tijekom 7 minuta. Svi uzorci podvrgnuti su skladištenju bez pristupa svjetla kroz 7, 14 i 21 dan pri temperaturi od +4 °C.

Ekstrakcija ukupnih fenola i ukupnih karotenoida u kontrolnom, kao i tretiranim smoothie-sokovima provedena je u skladu s načelima zelene kemije, pri čemu se kao otapalo koristio 96 %-tni etanol koji ima GRAS (*Generally Recognized as Safe*) status (Pimentel-Moral, 2020). U dobivenim ekstraktima ukupni fenoli i ukupni karotenoidi određeni su spektrofotometrijski, a svi dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija, dok je porast i/ili gubitak masenih udjela ukupnih fenola i ukupnih karotenoida iskazan u postocima.

4.1. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA STABILNOST UKUPNIH FENOLA

Obzirom je pokazano da se porastom visokog tlaka (npr. 300 vs. 600 MPa) može značajno produžiti rok trajnosti (12 vs. 28 tjedana) (Marszałek i sur., 2016), ideja ovog rada bila je utvrditi kako porast tlaka utječe na stabilnost bioaktivnih spojeva poput polifenola i karotenoida. U tablici 6 prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola u svim ispitivanim uzorcima tijekom skladištenja.

Analizom kontrolnog (netretiranog) uzorka određen je maseni udio ukupnih fenola od $782,57 \pm 20,00$ mg GAE 100 g^{-1} čime se može zaključiti da je pripremljeni smoothie-sok visokovrijedan izvor polifenolnih spojeva. Unatoč tome što rezultati dosadašnjih istraživanja masovno navode da netoplinske tehnologije, među kojima se svojom učinkovitošću posebno izdvaja visoki hidrostatski tlak, povoljno djeluju na stabilnost različitih bioaktivnih spojeva u usporedbi s tradicionalnim toplinskim tehnologijama (Barba i sur., 2017; Poojary i sur., 2017), rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju da je najveća količina ukupnih fenola utvrđena u pasteriziranom uzorku, a iznosi $944,25 \pm 8,98$ mg GAE 100 g^{-1} , što čini rast od 20,66 % u odnosu na kontrolni uzorak. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Kim i sur. (2012), gdje je pasterizirani uzorak soka od jabuke (85° C , 1 min) imao veći prinos ukupnih fenola od uzorka tretiranog VHT-om, a taj porast je prosječno iznosio 38,12 % u odnosu na kontrolni uzorak. Slični rezultati pronađeni su i u ranijim istraživanjima (Gil-Izquierdo i sur., 2002; Barba i sur., 2010). Gil-Izquierdo i sur. (2002) su uočili porast ukupnih fenola u soku od naranče nakon pasterizacije (75 i 95° C , 30 s), a Barba i sur. (2010) su također primijetili porast sadržaja ukupnih fenola od 13,63 % u pasteriziranom uzorku smoothie soka (90° C , 15 s) u odnosu na netretirani. Stoga, prema dobivenim rezultatima vidljivo je da uzorci tretirani visokim hidrostatskim tlakom pokazuju negativan trend u vrijednostima ukupnih fenola, pri čemu je najveći pad od 21,90 % zabilježen kod uzorka tretiranog tlakom od 350 MPa tijekom 5 minuta, dok je najmanji pad od 4,57 % uočen kod uzorka tretiranog tlakom od 450 MPa tijekom 5 minuta. Slične rezultate utvrdili su i De Ancos i sur. (2020) u soku od naranče sorte *Washington Navel* gdje je uočen pad vrijednosti ukupnih fenola za 16,74 % pri tlaku od 200 MPa tijekom obrade u trajanju od 1 minute, odnosno pad od 17,86 % pri tlaku od 400 MPa tijekom istog vremena obrade. Bursać Kovačević i sur. (2016) pojašnjavaju da povećanje bioaktivnih spojeva u soku od aronije uslijed pasterizacije u odnosu na netretirani sok može biti

zbog pospješene ekstrakcije poradi toplinske dezintegracije koloidnih staničnih struktura unutar kojih zaostane dio ciljanih spojeva.

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola u smoothie sokovima izražen u mg GAE 100 g⁻¹ uzorka

Broj uzorka	Uzorak	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g⁻¹)
1	Kontrola	782,57 ± 20,00
2	Pasterizacija 85°C/7 min	944,25 ± 8,98
7	Pasterizacija 85°C/7 min -7	786,62 ± 17,04
12	Pasterizacija 85°C/7 min -14	931,16 ± 55,22
17	Pasterizacija 85°C/7 min -21	869,92 ± 86,12
3	VHT1	611,16 ± 68,55
8	VHT1-7	774,64 ± 47,26
13	VHT1-14	671,25 ± 91,16
18	VHT1-21	703,99 ± 57,23
4	VHT2	628,28 ± 78,17
9	VHT2-7	671,05 ± 57,45
14	VHT2-14	673,93 ± 2,99
19	VHT2-21	659,88 ± 62,71
5	VHT3	746,81 ± 34,24
10	VHT3-7	689,19 ± 39,92
15	VHT3-14	761,39 ± 51,06
20	VHT3-21	733,37 ± 34,22
6	VHT4	699,04 ± 49,01
11	VHT4-7	583,41 ± 33,77
16	VHT4-14	764,72 ± 130,96
21	VHT4-21	607,67 ± 18,91

Nakon sedmodnevnog skladištenja pasterizirani uzorak sadržavao je 0,52 % više ukupnih fenola u usporedbi s kontrolnim uzorkom., ali je u usporedbi s istim uzorkom

analiziranim nultog dana došlo do pada od 16,69 %. U svim uzorcima tretiranim tehnologijom VHT-a uočen je pad masenih udjela ukupnih fenola u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Najznačajnija promjena izazvana tretmanom VHT-a u cjelokupnoj analizi bila je smanjenje ukupnih fenola od 25,45 %, a zabilježena je 7. dana skladištenja u uzorku tretiranom tlakom jačine 450 MPa tijekom 15-minutne obrade. Nadalje, veći pad uočen je kod uzoraka s dužim vremenom obrade, tj. obrada tlakom od 350 MPa u trajanju od 5 minuta evidentirala je pad od 1,01 %, odnosno pad od 14,25 % tijekom obrade od 15 minuta, dok je obrada tlakom od 450 MPa u trajanju od 5 minuta rezultirala padom od 11,93 %, odnosno 25,45 % za 15- minutnu obradu, što upućuje da kraći VHT tretmani favoriziraju bolju stabilnost ukupnih fenola. S druge strane, uzorak obrađen tlakom 350 MPa tijekom 5 minuta zadržao je 98,99 % ukupnih fenola, što je ujedno i najmanji pad ukupnih fenola u cjelokupnoj analizi uzoraka obrađenih VHT-om. Ako pak usporedimo 7. dan skladištenja uzoraka tretiranih VHT-om sa nultim danom, možemo uočiti kako je kod uzoraka tretiranih tlakom jačine 350 MPa došlo do povećanja količine ukupnih fenola i to za 26,75 % (5 min), tj. 6,81 % (15 min), dok je kod uzoraka tretiranih tlakom od 450 MPa uočeno smanjenje od 7,72 % (5 min), tj. 16,54 % (15 min).

14.-ti dan skladištenja pasterizirani uzorak je zadržao pozitivan trend s porastom od 18,99 % ukupnih fenola u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, uzorci tretirani VHT-om zadržali su negativni trend, odnosno smanjenje navedenih spojeva u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Veći gubitci ukupnih fenola uočeni su pri nižem tlaku od 350 MPa (5 minuta pad 14,23 %, 15 minuta pad 13,88 %), dok su pri višem tlaku od 450 MPa ukupni fenoli ostali relativno stabilni (5 minuta pad 2,71 %, 15 minuta pad 2,28 %). Uspoređujući 14. dan skladištenja s rezultatima analize provedene 7. dana, vidljiv je pad ukupnih fenola za 13,35 % u uzorku tretiranim tlakom od 350 MPa tijekom 5 minuta. Svi ostali uzorci imali su porast količine ukupnih fenola u odnosu na 7.dan analize, a sami porast kretao se od 0,43 % za uzorak tretiran tlakom od 350 MPa tijekom 15 minuta do 31,08 % za uzorak tretiran tlakom od 450 MPa tijekom 15 minuta.

Konačno, 21.-dana skladištenja analiza je potvrdila stabilnost ukupnih fenola u pasteriziranom uzorku (11,16 % više u odnosu na kontrolni uzorak), što je suprotno rezultatima koje su dobili Chen i sur. (2013), gdje se navodi smanjenje ukupnih fenola koje se kretalo od 15,67 % za uzorak analiziran 13. dana, odnosno 19,39 % za uzorak analiziran 19. dana skladištenja (pri režimu pasterizacije 110 °C, 8,6 s). Analizom uzoraka tretiranih VHT-om potvrđeno je smanjenje ukupnih fenola, pri čemu je uzorak tretiran tlakom jačine 450 MPa tijekom 15 minuta imao najveći pad ukupnih fenola od 22,35 %, dok je uzorak tretiran istim

tlakom ali kraće vrijeme imao najmanji pad od 6,29 %. Iz navedenog se može zaključiti kako VHT tretman jačine 450 MPa u trajanju od 5 minuta daje proizvod najbolje kvalitete u smislu najvišeg sadržaja ukupnih fenola. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja koje su proveli Chen i sur. (2013) u kojem su proučavali kvalitetu soka od nara tretiranog VHT-om (400 MPa, 5 min) u usporedbi s HTST pasterizacijom (110 °C, 8,6 s) tijekom skladištenja pri temperaturi od +4° C. U navedenom istraživanju utvrđeno je smanjenje ukupnih fenola za 2,22 % 13. dana skladištenja, odnosno 6,81 % 19. dana skladištenja za uzorak tretiran sa VHT-om, što se podudara s našim vrijednostima za uzorak tretiran tlakom od 450 MPa, 5 min (pad od 2,71 % 14. dana, odnosno pad od 6,29 % 21. dana skladištenja). Do smanjenja ukupnih fenola prilikom skladištenja je vjerojatno došlo zbog veće rezidualne aktivnosti enzima polifenol oksidaze i peroksidaze, budući da ti enzimi kataliziraju oksidacijsku razgradnju fenolnih spojeva i polimerizaciju fenolnih spojeva s proteinima (Cao i sur., 2011).

4.2. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA STABILNOST UKUPNIH KAROTENOIDA

Rezultati određivanja ukupnih karotenoida u svim ispitivanim uzorcima tijekom skladištenja prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Sadržaj ukupnih karotenoida u smoothie sokovima izražen u mg 100 g⁻¹ uzorka

Broj uzorka	Uzorak	Ukupni karotenoidi (mg 100 g ⁻¹)
1	Kontrola	1,42 ± 0,01
2	Pasterizacija 85°C/7 min	1,10 ± 0,01
7	Pasterizacija 85°C/7 min -7	1,04 ± 0,00
12	Pasterizacija 85°C/7 min -14	0,45 ± 0,00
17	Pasterizacija 85°C/7 min -21	0,95 ± 0,00
3	VHT1	0,76 ± 0,01
8	VHT1-7	0,57 ± 0,00
13	VHT1-14	0,38 ± 0,00
18	VHT1-21	0,39 ± 0,00
4	VHT2	0,90 ± 0,00
9	VHT2-7	0,60 ± 0,02
14	VHT2-14	0,35 ± 0,00
19	VHT2-21	0,42 ± 0,00
5	VHT3	0,69 ± 0,01
10	VHT3-7	0,86 ± 0,03
15	VHT3-14	0,40 ± 0,01
20	VHT3-21	0,61 ± 0,00
6	VHT4	0,76 ± 0,00
11	VHT4-7	0,90 ± 0,00
16	VHT4-14	0,37 ± 0,00
21	VHT4-21	0,69 ± 0,00

Kontrolni, netretirani uzorak sadržavao je 1,42 mg 100 g⁻¹ ukupnih karotenoida, dok je za sve ostale uzorke tretirane bilo pasterizacijom, bilo VHT-om vidljivo da se količina istih smanjila nakon tretmana. Analiza provedena neposredno nakon tretiranja smoothie sokova pokazala je da je pasterizacija najmanje utjecala na smanjenje ukupnih karotenoida i to za 22,84 % u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Cortés i sur. (2006) gdje je uočeno smanjenje ukupnih karotenoida za 12,57 % pri režimu pasterizacije 90 °C tijekom 20 s. Cinquanta i sur. (2010) su isto također prilikom pasterizacije svježeg soka naranče odredili gubitak od oko 41 % pri režimu od 75 °C tijekom 1 min, dok je pri nešto višoj temperaturi od 85 °C tijekom 1 min gubitak iznosio 52 %.

Tretman VHT-om je utjecao na smanjenje ukupnih karotenoida, i to u rasponu od 36,55 % pri tlaku od 350 MPa tijekom 15 minuta, pa sve do 51,56 % pri tlaku od 450 MPa tijekom 5 minuta. Iz rezultata dobivenih u istraživanju koje su proveli Barba i sur. (2010) također je uočeno smanjenje ukupnih karotenoida, koje se kretalo od 15,65 % za uzorak smoothie soka tretiran tlakom od 300 MPa tijekom 9 minuta, pa do 44,66 % u uzorku koji je tretiran istim tlakom, ali u vremenu od 2 minute. Carbonell-Capella i sur. (2013) također navode smanjenje karotenoida u voćnom soku uslijed djelovanja VHT-a, i to smanjenje od 10,54 % pri tlaku od 300 MPa tijekom 5 minuta, te smanjenje od 15,15 % pri istom tlaku tijekom 15 minuta. Pri tlaku od 500 MPa u trajanju od 5 minuta uočen je pad od 10,29 %, no pri dužoj obradi u trajanju od 15 minuta vidljiv je porast karotenoida za 10,63 %.

Stinco i sur. (2019) su utvrdili da VHT tretman ima značajan utjecaj na stabilnost kako ukupnih, tako i pojedinačnih karotenoida u mutnom soku od mrkve. Ispitivani su VHT tretmani od 300 MPa (1 i 3 ciklusa), 450 MPa (1 ciklus) te 600 MPa (1 ciklus), a dobiveni rezultati pokazuju da je najveća degradacija ukupnih karotenoida (41 %) ishodovana tretmanom od 300 MPa tijekom 3 ciklusa, dok je tretman od 600 MPa tijekom 1 ciklusa rezultirao najboljom stabilnošću karotenoida uz gubitak od svega 26 %. Autori pojašnjavaju da ovakav rezultat može biti rezultat kombinacije dva različita učinka. S jedne strane, uz niži tlak i veći broj ciklusa, veća degradacija karotenoida posljedica je intenzivnijeg oštećenja staničnih struktura čime se molekule karotenoida bolje ekstrahiraju, ali i više izlažu negativnom utjecaju enzima, kisika i drugih spojeva. S druge pak strane, dezintegracijom stanične strukture olakšano je prodiranje ekstrakcijskog otapala do molekula karotenoida niže molekulske mase čime je olakšano njihovo oslobađanje, pa tako može doći do povećane koncentracije ovih spojeva uslijed VHT tretmana.

U prvih 7 dana skladištenja vidljivo je da uzorak tretiran pasterizacijom bilježi pad količine ukupnih karotenoida za 27,27 % u odnosu na kontrolni uzorak, odnosno 5,75 % u odnosu na pasterizirani uzorak analiziran nultog dana. U usporedbi s kontrolnim uzorkom, uzorci tretirani VHT-om od 350 MPa isto tako bilježe pad količine ukupnih karotenoida za 59,69 % (5 min tretiranja) i 57,86 % (15 min tretiranja). Kod uzoraka tretiranih tlakom od 450 MPa došlo je do povećanja količine ukupnih karotenoida za 24,13 % (5 min), tj. 17,73 % (15 min) u odnosu na iste uzorke analizirane nultog dana.

Najmanju vrijednost u cjelokupnoj analizi imao je uzorak tretiran tlakom jačine 350 MPa tijekom 15 minuta i skladišten 14 dana, a sadržavao je samo 0,35 mg 100 g⁻¹ ukupnih karotenoida, što čini pad od 75,59 % u odnosu na kontrolni uzorak. Općenito je 14. dan skladištenja imao najmanje vrijednosti ukupnih karotenoida, a samo smanjenje navedenih spojeva kretalo se od 68,72 % za pasterizirani uzorak do spomenutih 75,59 % za uzorak tretiran VHT-om.

Iako su 14. dana skladištenja svi uzorci imali tendenciju smanjenja, nakon 21. dana bilježi se porast vrijednosti ukupnih karotenoida u svim uzorcima, što se podudara s rezultatima istraživanja koje su proveli Cortés i sur. (2006) gdje je isto tako uočeno smanjenje i povećanje ukupnih karotenoida u pasteriziranom soku tijekom 6 tjedana skladištenja pri temperaturi +2° C. Do sličnih rezultata došli su i Plaza i sur. (2006) u svojem istraživanju u kojem su naveli da je uzorak tretiran tlakom jačine 150 MPa tijekom 15 minuta imao kontinuirano smanjenje količine ukupnih karotenoida do 10. dana skladištenja na temperaturi od +4° C, dok je 15. dana skladištenja došlo do povećanja njihove količine.

Pasterizacija se u našem slučaju pokazala najučinkovitijom u smislu očuvanja ukupnih karotenoida, jer je u konačnici taj uzorak imao najvišu količinu navedenih spojeva u usporedbi sa svim ostalim uzorcima. Uspoređujući ovaj uzorak s kontrolnim uzorkom, došlo je do pada od 33,07 %, no u usporedbi sa 14. danom vidljiv je porast od 113,96 %. Uzorci tretirani VHT-om jačine 350 MPa zadržali su 27,40 % (5 min), tj. 29,59 % (15 min) ukupnih karotenoida, dok su uzorci tretirani VHT-om jačine 450 MPa zadržali 42,94 % (5 min), odnosno 48,77 % (15 min) početne vrijednosti. Iz navedenog se može zaključiti kako, bez obzira na velike gubitke ukupnih karotenoida u tretiranim smoothie sokovima, viši tlakovi u konačnici ipak doprinose njihovoj boljoj ekstrakciji i stabilnosti. Do istog zaključka došli su i Stinco i sur. (2019), koji su u svojem istraživanju naveli da se najveća razgradnja karotenoida u soku od mrkve događa

kod nižih tlakova (300 MPa), dok je pri najvišem ispitivanom tlaku (600 MPa) razgradnja istih bila najmanja.

5. ZAKLJUČCI

1. U smoothie sokovima pripremljenim od sokova jabuke, mrkve i aronije uz dodatak kaše indijanske banane i napitka od badema u omjeru 50:20:5:10:15 (%) određeni su udjeli ukupnih fenola i karotenoida u vrijednostima od $782,57 \pm 20,00$ mg GAE 100 g^{-1} te $1,42 \pm 0,01$ mg 100 g^{-1} , čime se ovi sokovi mogu smatrati nutritivno vrijednim proizvodima.
2. Rezultati istraživanja pokazuju da tretiranje smoothie sokova visokim hidrostatskim tlakom, u usporedbi s kontrolnim netretiranim uzorkom, utječe na smanjenje ukupnih fenola i ukupnih karotenoida u svim uzorcima neovisno o izvorima varijacija (tlak, vrijeme tretiranja, vrijeme skladištenja), za razliku od pasterizacije, koja je pozitivno djelovala na stabilnost ukupnih fenola, a negativno na stabilnost ukupnih karotenoida.
3. Tlak nije pokazao veći utjecaj na stabilnost ukupnih fenola za razliku od vremena tretiranja pri čemu je dulje vrijeme tretmana (15 vs. 5 minuta) negativno djelovalo na stabilnost ukupnih fenola. Nasuprot tome, više vrijednosti tlaka (450 MPa u usporedbi s 350 MPa) bolje doprinose stabilnosti ukupnih karotenoida.
4. Uzorak tretiran VHT tretmanom pri 450 MPa u trajanju od 5 minuta nakon 21. dana skladištenja zadržao je 93,71 % početne vrijednosti ukupnih fenola, što predstavlja najmanji pad istih u usporedbi s kontrolnim uzorkom, stoga se može zaključiti kako spomenuti tretman može osigurati proizvod najbolje kvalitete obzirom na sadržaj ukupnih fenola.
5. Najveća stabilnost ukupnih karotenoida u smoothie sokovima ostvarena je VHT tretmanom od 450 MPa tijekom 15 minuta pri čemu je nakon 21. dana skladištenja gubitak iznosio 51,23 %, u usporedbi s kontrolnim uzorkom.
6. Pasterizirani uzorak je tijekom cijelog perioda skladištenja imao veću količinu ukupnih fenola od kontrolnog uzorka, s tim da je 21. dana skladištenja taj rast iznosio 11,16 %, dok je prosječan gubitak karotenoida uslijed pasterizacije iznosio oko 43 %.
7. U konačnici se može zaključiti da je toplinski tretman pasterizacije pogodovao boljoj stabilnosti ukupnih fenola te većoj degradaciji ukupnih karotenoida u odnosu na VHT tretman te da su tijekom skladištenja ukupni fenoli pokazali bolju stabilnost, neovisno o primijenjenom tretmanu.

6. LITERATURA

- Abera, G. (2019) Review on high pressure processing of foods. *Cogent Food Agric.* **5**, 1568725.
- Ağçam, E., Akyıldız, A., Dündar, B. (2018) Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices. U: *Fruit Juices: extraction, composition, quality and analysis* (Rajauria, G., Tiwari, B. K., ured.), Academic Press, London, str. 309–339.
- Andrés, V., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Villanueva, M. J., Tenorio, M. D. (2016a) High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *LWT - Food Sci. Technol.* **69**, 123–130.
- Andrés, V., Villanueva, M. J., Tenorio, M. D. (2016b) The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. *Food Chem.* **192**, 328–335.
- Archbold, D. D., Koslanund, R., Pomper, K. W. (2003) Ripening and postharvest storage of pawpaw. *Horttechnology.* **13**, 439–441.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Frigola, A. (2010) Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *J. Agric. Food. Chem.* **58**, 10070–10075.
- Boyer, J., Liu, R. H. (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* **3**, 5.
- Brannan, R. G., Peters, T., Talcott, S. T. (2015) Phytochemical analysis of ten varieties of pawpaw (*Asimina triloba* L. Dunal) fruit pulp. *Food Chem.* **168**, 656–661.
- Bursać Kovačević, D., Brdar, D., Fabečić, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2020) Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. U: *Agri-food industry strategies for healthy diets and sustainability* (Barba, F. J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., ured.), Academic Press, London, str. 51-88.
- Bursać Kovačević, D., Bilobrk, J., Buntić, B., Bosiljkov, T., Karlović, S., Rocchetti, G., Lucini, L., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2019) High power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in cloudy apple juice during storage. *J. Food Process. Preserv.* **43**, 1-9.

- Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Putnik, P., Vukušić, T., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma, *Food Chem.* **212**, 323-331.
- Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., Liao, X. (2011) Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 877–885.
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A. (2013) High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **18**, 48–56.
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Bozzi Nising, A., Hurrell, R. F. (2012) Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J. Food Compost. Anal.* **26**, 128-135.
- Chen, D., Xi, H., Guo, X., Qin, Z., Pang, X., Hu, X., Liao, X., Wu, J. (2013) Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **19**, 85–94.
- Chrubasik, C., Li, G., Chrubasik, S. (2010) The clinical effectiveness of chokeberry: A systematic review. *Phytother. Res.* **24**, 1107–1114.
- Cinquanta, L., Albanese, D., Cuccurullo, G., Di Matteo, M. (2010) Effect on orange juice of batch pasteurization in an improved pilot-scale microwave oven. *J. Food Sci.* **75**, E46–E50.
- Coothankandaswamy, V., Liu, Y., Mao, S. C., Morgan, J. B., Mahdi, F., Jekabsons, M. B., Nagle, D. G., Zhou, Y. D. (2010) The alternative medicine pawpaw and its acetogenin constituents suppress tumor angiogenesis via the HIF-1/VEGF Pathway. *J. Nat. Prod.* **73**, 956–961.
- Cortés, C., Torregrosa, F., Esteve, M. J., Frígola, A. (2006) Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice and orange juice treated with high-intensity pulsed electric fields. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 6247–6254.
- Daskalova, E., Delchev, S., Topolov, M., Dimitrova, S., Uzunova, Y., Valcheva-Kuzmanova, S., Kratchanova, M., Vladimirova-Kitova, L., Denev, P. (2019) *Aronia melanocarpa* (Michx.)

Elliot fruit juice reveals neuroprotective effect and improves cognitive and locomotor functions of aged rats. *Food Chem. Toxicol.* **132**, 110674.

Dattaa, N., Deeth, H. C. (2018) Non-thermal technologies: High pressure processing. U: *Reference module in food science* (Smithers, G. W., Day, L., Ferranti, P., Fischer, A., Glibetic, M., Knoerzer, K., Lee, A., McSweeney, P., Robertson, G., Schasteen, C., Smith, N., Tanner, D., Varelis, P., ured.), Elsevier Academic, London, str. 1-8.

De Ancos, B., Rodrigo, M. J., Sánchez-Moreno, C., Pilar Cano, M., Zacarías, L. (2020) Effect of high-pressure processing applied as pretreatment on carotenoids, flavonoids and vitamin c in juice of the sweet oranges “Navel” and the red-fleshed “Cara Cara”. *Food Res. Int.* **132**, 109105.

De Ancos, B., Sgroppo, S., Plaza, L., Cano, M. P. (2002) Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *J. Sci. Food Agric.* **82**, 790–796.

De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. (2019) Phenolic compounds. U: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (Yahia, E. M., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 253–271.

De Oliveira Ribeiro, L., Almeida, A. C. S., de Carvalho, C. W. P., Borguini, R. G., Ferreira, J. C. S., Freitas, S. P., da Matta, V. M. (2018) Effect of processing on bioactive compounds, physicochemical and rheological characteristics of juçara, banana and strawberry smoothie. *Plant Foods Hum. Nutr.* **73**, 222–227.

Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., Blazheva, D. (2019) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophilmodulating activities. *Food Chem.* **284**, 108–117.

Dereli, U., Türkyilmaz, M., Yemiş, O., Özkan, M. (2015) Effects of clarification and pasteurization on the phenolics, antioxidant capacity, color density and polymeric color of black carrot (*Daucus Carota* L.) juice. *J. Food Biochem.* **39**, 528–537.

Dhakar, S., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K. H., Sathe, S. K., Balasubramaniam, V. M. (2014) Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk, *Food Res. Int.* **62**, 215–222.

- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M. J. (2007) Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4209–4216.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011) Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* **28**, 1062–1071.
- Dobiáš, J., Vápenka, L. (2017) Packaging system for high-pressure processing. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 63-72.
- Dohrmann, D. D., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Simal-Gandara, J., Lorenzo, J. M., Barba, F. J. (2019) Japanese, Mediterranean and Argentinean diets and their potential roles in neurodegenerative diseases. *Food Res. Int.* **120**, 464-477.
- 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. Rev.* **8**, 75–83.
- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., Herceg, Z. (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT - Food Sci. Technol.* **62**, 894–900.
- Fernandez, M. V., Denoya, G. I., Jagus, R. J., Vaudagna, S. R., Agüero, M. V. (2019) Microbiological, antioxidant and physicochemical stability of a fruit and vegetable smoothie treated by high pressure processing and stored at room temperature, *LWT - Food Sci. Technol.* **105**, 206-210.
- Fernandez, M. A., Marette, A. (2017) Potential health benefits of combining yogurt and fruits based on their probiotic and prebiotic properties. *Adv. Nutr.* **8**, 155S-164S.
- Gabrić, D., Barba, F. J., Roohinejad, S., Gharibzahedi, S. M. T., Radojčin, M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (2017) Pulsed electric fields as an alternative to thermal processing for preservation of nutritive and physicochemical properties of beverages: A review. *J. Food Process Eng.* **41**, 1-14.

- Gallina, D. A., Barbosa, P. P. M., Ormenese, R. D. C., Garcia, A. O. (2019) Development and characterization of probiotic fermented smoothie beverage. *Rev. Ciênc. Agron.* **50**, 378-386.
- Gama, J. J. T., de Sylos, C. M. (2007) Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem.* **100**, 1686–1690.
- Gil- Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F. (2002) Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5107– 5114.
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., Putnik, P. (2020) Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **11**, 93-118.
- Graziani, G., D'Argenio, G., Tuccillo, C., Loguercio, C., Ritieni, A., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, C., Fogliano, V., Romano, V. (2005) Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa *in vivo*. *Gut* **54**, 193–200.
- Guneser, O., Isleten Hosoglu, M., Aydeniz Guneser, B., Karagul Yuceer, Y. (2019) Engineering of milk-based beverages: current status, developments, and consumer trends. U: *Milk-based beverages: the science of beverages, vol 9* (Grumezescu, A., Holban, A. M., ured.), Woodhead Publishing, Sawston, str. 1–37.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J. F. (1998) Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1698–1705.
- Hasan, N. A. (2012) Almond milk production and study of quality characteristics. *Journal of Academia*, **2**, 1-8.
- Hogan, E., Kelly, A. L., Sun, D.–W. (2014) High pressure processing of foods. U: *Emerging Technologies for Foos Processing* (Sun, D.–W. ured.), Academic Press, London, str. 3–24.
- Houška, M., Silva, F. V. M. (2017) Introduction to high-pressure processing of fruit and vegetable products. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 1-2.

- Hurtado, A., Dolors Guàrdia, M., Picouet, P., Jofré, A., Bañón, S., Ros, J. M. (2019a) Shelf-life extension of multi-vegetables smoothies by high-pressure processing compared with thermal treatment. Part I: Microbial and enzyme inhibition, antioxidant status, and physical stability. *J. Food Process. Preserv.* **43**, e14139.
- Hurtado, A., Guàrdia, M. D., Picouet, P., Jofré, A., Bañón, S., Ros, J. M. (2019b) Shelf-life extension of multi-vegetables smoothies by high pressure processing compared with thermal treatment. Part II: Retention of selected nutrients and sensory quality. *J. Food Process. Preserv.* **43**, e14210.
- Hurtado, A., Guàrdia, M. D., Picouet, P., Jofré, 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.* **97**, 770-776.
- Jalali-Khanabadi, B. A., Mozaffari-Khosravi, H., Parsaeyan, N. (2010) Effects of almond dietary supplementation on coronary heart disease lipid risk factors and serum lipid oxidation parameters in men with mild hyperlipidemia, *J. Altern. Complement. Med.* **16**, 1279–1283.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R. F., Octavianti, F. (2011) Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J. Med. Plants Res.* **5**, 7119–7131.
- Jayachandran, L. E., Chakraborty, S., Rao, P. S. (2015) Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **28**, 1–9.
- Keenan, D. F., Röbke, C., Gormley, R., Butler, F., Brunton, N. P. (2012) Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Sci. Technol.* **45**, 50–57.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B. K., Patras, A. (2010) Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**, 551–556.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T., Rupasinghe, H. P. V. (2008) Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 396–401.

- Kim, N. H., Jegal, J., Kim, Y. N., Chung, D. M., Heo, J. D., Rho, J. R., Yang, M. H., Jeong, E. J. (2018) Antiobesity effect of fermented chokeberry extract in high-fat diet-induced obese mice. *J. Med. Food.* **21**, 1113–1119.
- Kim, H. K., Leem, K.- H., Lee, S., Kim, B.- Y., Hahm, Y. T., Cho, H.- Y., Lee, J. Y. (2012) Effect of high hydrostatic pressure on immunomodulatory activity of cloudy apple juice. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 175–181.
- Klein, C. S., Rodriguez - Concepcion, M. (2015) Carotenoids in Carrot. U: *Pigments in Fruits and Vegetables* (Chen, C., ured.), Springer, New York, str. 217–228.
- Kobayashi, H., Wang, C.Z., Pomper, K.W. (2008) Phenolic content and antioxidant capacity of pawpaw fruit (*Asimina triloba* L.) at different ripening stages. *HortScience* **43**, 268–270.
- Kostelac, D., Putnik, P., Markov, K., Frece, J., Bursać Kovačević, D. (2020) Effects of electrotechnologies on enzymes in foods and food model systems. *Curr. Opin. Food Sci.* **31**, 47-56.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Bursać-Kovačević, D., Putnik, P., Santos, M. D., Queirós, R. P., Moreira, S. A., Inácio, R. S., Fidalgo, L. G., Saraiva, J. A. (2018) Pulsed electric field processing of fruit juices. U: *Fruit Juices* (Rajauria, G., Tiwari, B., ured.), Academic Press, London, str. 437-449.
- Koutchma, T., Warriner, K. (2017) Regulatory aspects of high-pressure processed foods in North America, Europe, Asia, New Zealand, and Australia. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 155-168.
- Kujawska, M., Ignatowicz, E., Ewertowska, M., Oszmiański, J., Jodynis-Liebert, J. (2010) Protective effect of chokeberry on chemical-induced oxidative stress in rat. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**, 199–208.
- Lala, G., Malik, M., Zhao, C., He, J., Kwon, Y., Giusti, M. M., Magnuson, B. A. (2006) Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr. Cancer.* **54**, 84–93.
- Lancaster, J. E., Dougall, D. K. (1992) Regulation of skin color in apples. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 487–502.

- Lee, J. E., Kim, G.-S., Park, S., Kim, Y.-H., Kim, M.-B., Lee, W. S., Shin, S. C. (2014) Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chem.* **146**, 1–5.
- Lee, H. S., Coates, G. A. (1999) Thermal pasteurization effects on color of red grapefruit juices. *J. Food Sci.* **64**, 663–666.
- Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Číž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y. S., Jung, S. T., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O. (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 603–610.
- Lewis, M. J., Heppell, N. J. (2000) *Continuous thermal processing of foods: pasteurization and UHT sterilization*, Aspen Publishers, Gaithersburg, str.193, 220.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterisation by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1 – F4.3.8.
- Lim, S. M., Lee, H. S., Jung, J. I., Kim, S. M., Kim, N. Y., Seo, T. S., Bae, J. S., Kim, E. J. (2019) Cyanidin-3-O-galactoside-enriched *Aronia melanocarpa* extract attenuates weight gain and adipogenic pathways in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrients* **11**, 1190.
- Linton, M., Patterson, M. F. (2000) High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **47**, 175–182.
- Mahadevan, S., Karwe, M. V. (2016) Effect of high-pressure processing on bioactive compounds. U: *High pressure processing of food* (Balasubramaniam, V. M., ured.), Springer, New York, 479–507.
- Marszałek, K., Krzyżanowska, J., Woźniak, Ł., Skąpska, S. (2016). Kinetic modelling of tissue enzymes inactivation and degradation of pigments and polyphenols in cloudy carrot and celery juices under supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* **117**, 26–32.
- Marszałek, K., Krzyżanowska, J., Woźniak, Ł., Skąpska, S. (2017) Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main

pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *LWT - Food Sci. Technol.* **85**, 412–417.

Matser, A., Vollebregt, M. (2017) High-pressure processing combined with heat for fruit and vegetable preservation. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 135-145.

Mayer, B., Schumacher, M., Brandstätter, H., Wagner, F. S., Hermetter, A. (2001) High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal. Biochem.* **297**, 144–153.

Mayne, S.T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* **10**, 690–701.

McGrath, M. J., Karahadian, C. (1994) Evaluation of physical, chemical, and sensory properties of pawpaw fruit (*Asimina triloba*) as indicators of ripeness. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 968–974.

Medina, M. B. (2011) Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J. Funct. Foods* **3**, 79–87.

Mintel report (2016, studeni) Fruit juice, juice drinks and smoothies - UK - November 2016., <<https://reports.mintel.com/display/748812/>>. Pristupljeno 8. svibnja 2020.

Muntean, M.-V., Marian, O., Barbieru, V., Cătunescu, G. M., Ranta, O., Drocas, I., Terhes, S. (2016) High pressure processing in food industry – characteristics and applications. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* **10**, 377–383.

Namitha, K. K., Negi, P. S. (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**, 1040–8398.

Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M., Aubert, S. Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 109–157.

Norton, T., Sun, D.-W. (2007) Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food Bioproc. Tech.* **1**, 2–34.

Oliver, J., Palou, A. (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr. A.* **881**, 543-555.

Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2017) Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: a literature overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 668–691.

Pimentel- Moral, S., Borrás-Linares, I., Lozano- Sánchez, J., Alañón, M. E., Arráez-Román, D., Segura- Carretero, A. (2020) Pressurized GRAS solvents for the green extraction of phenolic compounds from hibiscus sabdariffa calyces. *Food Res. Int.* **137**, 109466.

Pistollato, F., Iglesias, R. C., Ruiz, R., Aparicio, S., Crespo, J., Lopez, L. D., Manna, P. P., Giampieri, F., Battino, M. (2018) Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: a focus on human studies. *Pharmacol. Res.* **131**, 32–43.

Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Cano, M. P. (2006) Carotenoid content and antioxidant capacity of Mediterranean vegetable soup (gazpacho) treated by high-pressure/temperature during refrigerated storage. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 210–215.

Pomper, K. W., Layne, D. R. (2005) The North American pawpaw: botany and horticulture. U: *Horticultural Reviews*, Volume 31 (Janick, J., ured.), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, str. 351–84.

Putnik, P., Pavlič, B., Šojić, B., Zavadlav, S., Žuntar, I., Kao, L., Kitonić, D., Bursać Kovačević, D. (2020) Innovative hurdle technologies for the preservation of functional fruit juices. *Foods* **9**, 699.

Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Režek Jambrak, A., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Roohinejad, S., Granato, D., Žuntar, I., Bursać Kovačević, D. (2019) Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. *Food Chem.* **279**, 150–161.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Herceg, K., Pavkov, I., Levaj, B. (2017) Effects of modified atmosphere, anti-browning treatments and ultrasound on the polyphenolic stability, antioxidant capacity and microbial growth in fresh-cut apples. *J. Food Process Eng.* **40**, e12539.

Renard, C., Maingonnat, J. F. (2012) Thermal Processing of Fruits and Fruit Juices. U: *Thermal food processing: new technologies and quality issues*, 2.izd. (Sun, D.-W., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 413–438.

Ribaya-Mercado, J. D., Blumberg, J. B. (2004) Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 567S–587S.

Rodriguez-Amaya, D. B. (1999) *A guide to carotenoid analysis in foods*, International life Sciences Institute Press, Washington DC, str. 12.

Safefood (2009, veljača) SMOOTHIES consumer knowledge, attitudes and beliefs around the nutritional content of smoothies., <[http://www.safefood.eu/SafeFood/media/SafeFoodLibrary/Documents/Publications/Research %20Reports/9354-Smoothies-AW_web-FINAL-030309.pdf](http://www.safefood.eu/SafeFood/media/SafeFoodLibrary/Documents/Publications/Research%20Reports/9354-Smoothies-AW_web-FINAL-030309.pdf)>. Pristupljeno 8. svibnja 2020.

Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B. (2017) High-pressure processing effect on nutrients and their stability. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 85-103.

Silva, F. V. M., Evelyn (2017) High-pressure processing effect on microorganisms in fruit and vegetable Products. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 3-37.

Smith, A. F. (2013) *Food and drink in American history : a "full course" encyclopedia*, ABC-CLIO, Santa Barbara, California, str. 826, 827.

Spencer, J. P. E. (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* **104**, S40–S47.

Stinco, C. M., Szczepanska, J., Marszalek, K., Pinto, C. A., Inácio, R. S., Mapelli-Brahm, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Saraiva, J. A., Meléndez-Martínez, A. J. (2019) Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. *Food Chem.* **299**, 1-7.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.

Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., Liu, R. H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7449–7454.

Tahmassebi, J. F., Kandiah, P., Sukeri, S. (2014) The effects of fruit smoothies on enamel erosion. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* **15**, 175-181.

Templeton, S. B., Marlette, M., Pomper, K. W., Jones, S. C. (2003) Favorable taste ratings for several pawpaw products. *Horttechnology* **13**, 445–448.

Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R., Beekwilder, J., Capanoglu, E. (2015) The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. *Food Chem.* **186**, 277–284.

Tríska, J. (2017) Health active components in fruit/ vegetable juices treated by high pressure. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 105-119.

Valcheva-Kuzmanova, S., Eftimov, M., Tashev, R., Belcheva, I., Belcheva, S. (2014) Memory effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in a passive avoidance test in rats. *Folia Med.* **56**, 199–203.

Valcheva-Kuzmanova, S., Eftimov, M., Belcheva, I., Tashev, R., Belcheva, S. (2013) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on learning and memory in the two-way active avoidance task in rats. *J. Biomed. Clin. Res.* **6**, 18–23.

Valenzuela, A., Sanhueza, J., Nieto, S. (2003) Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biol. Res.* **36**, 291-302.

Vásquez-Caicedo, A. L., Schilling, S., Carle, R., Neidhart, S. (2007) Effects of thermal processing and fruit matrix on β -carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and nectar. *Food Chem.* **102**, 1172–1186.

WHO (2020, 29.travanj) Healthy diet. WHO - World Health Organization, <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet/>>. Pristupljeno 8. svibnja 2020.

Wiczowski, W., Romaszko, E., Piskula, M. K. (2010) Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietaryrelevant dose of anthocyanins in humans. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12130–12136.

Wojdyło, A., Nowicka, P., Laskowski, P., Oszmiański, J. (2014) Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12332–12345.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Bielicki, P. (2013) Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 2762–2772.

Yuan, B., Danao, M.- G. C., Stratton, J. E., Weier, S. A., Weller, C. L., Lu, M. (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **47**, 249-255.

Zujko, M. E., Witkowska, A. M. (2014) Antioxidant potential and polyphenol content of beverages, chocolates, nuts, and seeds. *Int. J. Food Prop.* **17**, 86–92.

Žuntar, I., Petric, Z., Bursać Kovačević, D., Putnik, P. (2020) Safety of probiotics: functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods*, **9**, 947.

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.

Ana-Petra Kovač

Ana-Petra Kovač