

Utjecaj tehnologije pulsirajućeg električnog polja na stabilnost fenolnih spojeva u sokovima od jagode tijekom skladištenja

Batur, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:598235>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Luka Batur

UTJECAJ TEHNOLOGIJE
PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG
POLJA NA STABILNOST
FENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA
OD JAGODE TIJEKOM
SKLADIŠTENJA

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća te u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć Anice Bebek Markovinović, mag. ing. i dr. sc. Višnje Stulić.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za ekološki prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3D-SustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević.

ZAHVALA

Iskreno sam zahvalan svom osoblju Laboratorija za kemiju i tehnologiju voća i povrća te Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, koji su bilo na koji način pridonijeli izradi ovoga rada. Posebno hvala asistentici Anici, na svojoj podršci u laboratoriju i ugodnom društvu u čijem su i dugi sati rada prolazili brzo.

Zahvaliti mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević u svega par rečenica bilo bi jako „nezahvalno“. Ipak, pišem ih bogatiji za akademsko razdoblje u kojem sam od profesorice Danijele, osim neopisive stručne podrške i novih znanja, primio i nešto drugo, nešto „ljudski“. Siguran sam da će mi uspomene iz malog „food hub-a“ Pierottijeve 6. ostati vjeran pratitelj u daljnjem profesionalnom razvoju.

Zahvaljujem se mojim roditeljima i obitelji jer su sva moja postignuća samo kap u moru podrške koju su mi oni pružili. Veliko hvala Coli i Bokiju na svim zajedničkim kilometrima koji su obilježili kraj mog studijskog razdoblja kao jedno od najboljih životnih ulaganja.

Na kraju, najveće hvala mojoj Danieli, onoj bez „J“, čiji smiješak, ljubav i pružena ruka nikad nisu izostali.

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

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

UTJECAJ TEHNOLOGIJE PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Luka Batur, univ. bacc. nutr. 0058207902

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj tehnologije pulsirajućeg električnog polja (eng. *Pulsed Electric Field, PEF*) na udio topljive suhe tvari, pH vrijednost te stabilnost fenolnih spojeva u soku od jagode tijekom sedmodnevnog skladištenja pri 4 °C. Sok je pripremljen od jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.) sorte 'Albion' i to plodova ubranih pri 75 % (Z1) i 100 % (Z2) zrelosti. Varirani parametri tretiranja uključivali su: (i) jakost električnog polja (40 i 50 kV), (ii) frekvenciju (100 i 200 Hz) i (iii) vrijeme tretiranja (3 i 6 min). Svi rezultati obrađeni su multifaktorskom analizom varijance ($p \leq 0,05$). Svježi plodovi jagoda, kao i sokovi od jagode Z1 odlikovali su se manjom topljivom suhom tvari i pH vrijednošću, no i većim udjelom ukupnih fenola u usporedbi s istim uzorcima zrelosti Z2. Skladištenje je povoljno utjecalo na stabilnost polifenolnih spojeva, dok se od PEF procesnih parametara, jedino jakost električnog polja pokazala statistički signifikantnim utjecajem.

Ključne riječi: *PEF, polifenoli, sok od jagode, stupanj zrelosti*

Rad sadrži: 49 stranica, 5 slika, 5 tablica, 77 literaturnih navoda, 0 priloga

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: Anica Bebek Markovinović, mag. ing. i dr. sc. Višnja Stulić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (predsjednik) (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjenski član)

Datum obrane:

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

Graduate university study programme: Nutrition

THE INFLUENCE OF PULSED ELECTRIC FIELD TECHNOLOGY ON POLYPHENOLS STABILITY OF STRAWBERRY JUICES DURING STORAGE

Luka Batur univ. bacc. nutr. 0058207902

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of Pulsed Electric Field technology on soluble solids content, pH and stability of polyphenols in strawberry juice during seven days of storage at 4 °C. Juice was prepared from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivar 'Albion' whose fruits were harvested at 75 % (Z1) and 100 % (Z2) maturity. The treatment parameters were: (i) electric field strength (40 and 50 kV), (ii) frequency (100 and 200 Hz), and (ii) treatment time (3 and 6 min). All results were analysed using multifactorial analysis of variance ($p \leq 0.05$). Fresh strawberry fruits as well as Z1 juices were characterized by lower soluble solids and pH, but also by higher levels of total phenolics compared to the same samples with Z2 ripeness. Storage had a favourable effect on the stability of the polyphenolic compounds, while among the PEF process parameters only electric field strength showed a statistically significant effect.

Keywords: *PEF, polyphenols, strawberry juice, ripeness stage*

Thesis contains: 49 pages, 5 figures, 5 tables, 77 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Associate professor*

Technical support and assistance: *Anica Bebek Markovinović, mag. ing., PhD Višnja Stulić*

Reviewers:

1. Sven Karlović, PhD, Associate professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor (member)
4. Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended:

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Jagoda (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.)	2
2.1.1. Kemijski sastav jagode	2
2.1.2. Bioaktivni spojevi jagode	4
2.1.3. Sok od jagode	7
2.1.4. Stabilnost fenolnih spojeva soka od jagode	10
2.2. Tehnologija pulsirajućeg električnog polja (PEF) u konzerviranju voćnih sokova	12
2.2.1. Primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) u obradi soka od jagode	14
2.2.2. Utjecaj tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na stabilnost bioaktivnih spojeva soka od jagode	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1 Materijali	18
3.2. Metode rada.....	19
3.2.1. Priprema soka od jagode	19
3.2.2. Obrada sokova od jagode pulsirajućim električnim poljem (PEF)	19
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti u sokovima od jagode	21
3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari (% Brix) u sokovima od jagode	21
3.2.5. Postupak ekstrakcije ukupnih fenola u sokovima od jagode.....	22
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	23
3.2.7 Obrada podataka.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Utjecaj zrelosti jagoda i režima skladištenja na topljivu suhu tvar, pH vrijednost i masene udjele ukupnih fenola u sokovima od jagode	27
4.2. Utjecaj zrelosti jagoda, režima skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na topljivu suhu tvar i pH vrijednost sokova od jagode	29
4.3. Utjecaj zrelosti jagoda, režima skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na masene udjele ukupnih fenola u sokovima od jagode	33
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

U doba pandemije kroničnih nezaraznih bolesti od kojih prednjače pretilost i njoj pridruženi metabolički i kardiovaskularni poremećaji, povećanje konzumacije svježeg voća i povrća smatra se ključnim korakom u prevenciji istih. Uzimajući u obzir ubrzani životni stil, ali i prehrambene trendove, sve veću pažnju na tržištu dobivaju svježi voćni sokovi koji se upravo zbog svoje praktičnosti konzumacije nalaze visoko na listi preferencija brojnih potrošača. Ipak, nužna termička obrada u svrhu održavanja trajnosti voćnih sokova, nažalost narušava njihovu biološku vrijednost što se očituje gubitkom bioaktivnih spojeva poput antioksidansa. Upravo su spojevi s antioksidacijskim svojstvima poput polifenola i vitamina C pokazali svoje blagotvorno i potencijalno terapijsko djelovanje na gore spomenute morbiditete. Iz toga razloga, jagoda se nameće kao interesantna sirovina za proizvodnju soka obzirom na iznimno visoke vrijednosti polifenolnih spojeva, posebice antocijana. Kako bi se bioaktivni spojevi maksimalno očuvali te konačnom proizvodu osigurali „funkcionalni“ epitet, predmetom sve većeg broja istraživanja postaju ne-termalne metode pasterizacije. Neke od njih jesu metode pulsirajućeg električnog polja, visokog hidrostatskog tlaka, hladne plazme ili ultrazvuka. Osnovna premisa aplikacije spomenutih noviteta prehrambene tehnologije jest osigurati proizvod koji bi osim svojih nutritivnih i senzorskih karakteristika, zadržao visoku biološku vrijednost i zdravstvenu ispravnost te kao takav postao usporediv svježem netretiranom proizvodu. Iako većina dotičnih tehnologija još uvijek nije zaživjela širu industrijsku primjenu i masovnu komercijalizaciju, veliki se naponi ulažu kako bi se u naredno vrijeme postavili temelji potencijalnoj revoluciji u proizvodnji funkcionalnih voćnih sokova. U tom tonu, cilj ovog rada bio je ispitati masene udjele ukupnih polifenola u soku od jagode ovisno o primijenjenim parametrima tretmana pulsirajućim električnim poljem. Pored navedenog, provedeno je i ispitivanje udjela topljive suhe tvari i pH vrijednosti kao najznačajnijih fizikalno-kemijskih faktora soka te konačno utjecaj skladištenja na promjene svih navedenih vrijednosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jagoda (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Porijeklom iz Europe (Francuska), ali kultivirana diljem svijeta, vrtna jagoda (lat. *Fragaria x ananassa* Duch.) nastala je u 18. stoljeću hibridizacijom virdžinijanske (*Fragaria virginiana*) i čileanske jagode (*Fragaria chiloensis*) te je najznačajniji predstavnik skupine jagodastog voća (engl. „berries“). U prilog navedenom govore i podaci FAOSTAT-a prema kojima je 2019. godine ukupna svjetska proizvodnja ove voćne vrste iznosila preko 8 milijuna tona što je neusporedivo više u odnosu na svo ostalo jagodasto voće zajedno (FAOstat, 2019).

Od 47 poznatih vrsta jagode, a koje se odnose na diploidne, tetraploidne, heksaploidne, oktaploidne i dekaploidne, s komercijalnog aspekta posebno su značajne šumska ili divlja jagoda (lat. *Fragaria vesca* L.) (diploidna, $2n=14$) te čileanska jagoda (lat. *Fragaria chiloensis* L.) (oktaploidna, $2n=56$) (Gambardella i Sánchez, 2016). Neovisno o vrsti, radi se o višegodišnjim zeljastim biljkama s trolisnim liskama te cvijetom sastavljenim od 5 simetričnih bijelih latica. Otprilike 4 do 5 tjedana nakon cvatnje, plodovi jagode spremni su za berbu, pri čemu moraju imati minimalno 7 % topljive suhe tvari i ukupnu kiselost od 0,8 % (Kader, 1999). Osnovne razlike među vrstama odnose se na boju i oblik ploda što u konačnici znači i različit kemijski sastav, a time i mnogobrojne mogućnosti komercijalne upotrebe (Fierascu i sur., 2020).

Plod jagode, osim za konzumaciju u sirovom obliku predstavlja i važnu sirovinu za proizvodnju želiranih proizvoda i voćnih sokova. Primamljiva aroma, niska kalorijska vrijednost te bogat nutritivni profil s naglaskom na značajan udio vitamina C i polifenola, glavni su faktori koji jagodu pozicioniraju na visoko mjesto po pitanju preferencije potrošača (Fierascu i sur., 2020; Milosavljević i sur., 2020; Giampieri i sur., 2012.).

2.1.1. Kemijski sastav jagode

Visok udio vode (90 %) glavni je razlog niskoj energetskej vrijednosti jagode koja iznosi svega 30 kcal na 100 g ploda. Od makronutrijenata prednjače ugljikohidrati (7 %) među kojima su najzastupljeniji reducirajući šećeri fruktoza i glukoza (80–90 %) u omjeru 1:1, dok ostatak čini saharoza. Konzumacija jagode u značajnijoj mjeri ne doprinosi unosu bjelančevina s obzirom da njihov udio iznosi svega 0,67 g na 100 g proizvoda. Ulje sjemenki jagode

predstavlja izvor esencijalnih masnih kiselina od kojih 72 % otpada na višestruko nezasićene masne kiseline. Ipak, zbog jako male mase koja otpada na sjemenke, ukupni udio masti kao i proteina u plodu jagode je gotovo zanemariv. U tablici 1 sažeto je prikazan kemijski sastav jagode (Sood i Dogra Bandral, 2019; Giampieri i sur., 2012).

Smjernice američke Agencije za hranu i lijekove FDA (engl. *Food and Drug Administration*) navode kako namirnice trebaju sadržavati 20 % i više preporučenog dnevnog unosa vlakana da bi ih se deklariralo kao „odličan izvor“, odnosno između 10 i 19 % da bi zadovoljile uvjet „dobrog izvora“ (Anonymus 1). S obzirom na količinu od 2 g vlakana na 100 g proizvoda (Giampieri i sur., 2012), jagoda ne udovoljava niti jedan od prije spomenutih uvjeta, stoga se ne može smatrati dobrim izvorom vlakana.

Od organskih kiselina najzastupljenija je limunska kiselina (80 %), čiji udio ne ovisi o stupnju zrelosti ploda. Ipak, sadržaj limunske kiseline uvelike utječe na pH vrijednost, stabilnost boje i aktivnost oksidacijskih enzima (Sood i Dogra Bandral, 2019).

Za percepciju arome jagode posebno je važan omjer šećera i kiselina, pa tako omjer topljive suhe tvari (engl. *Total Soluble Solids, TSS*) i kiselina od 8,52/13,79 doprinosi punoj aromi jagode. Jagode s niskim pH (3,27–3,86) imat će atraktivniju crvenu boju, dok su jagode s visokom TSS (8,0–11,5 %) najpogodnije za preradu (Sood i Dogra Bandral, 2019). detaljan prikaz kemijskog sastava jagode prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav jagode (Sood i Dogra Bandral, 2019; Giampieri i sur., 2012)

Komponenta	100 g svježeg ploda
Voda (g)	90,95
Energija (kcal)	32
Masti (g)	0,3
Ugljikohidrati (g) – ukupni	7,68
Glukoza (g)	1,99
Fruktoza (g)	2,44
Saharoza (g)	0,47
Vlakna (g)	2,0
Proteini (g)	0,67
Kalij (mg)	153
Kalcija (mg)	14

Tablica 1. Kemijski sastav jagode (Sood i Dogra Bandral, 2019; Giampieri i sur., 2012)-
nastavak

Željezo (mg)	0,38
Magnezij (mg)	0,29
Vitamin C (mg)	58,8
Folat (µg)	24
Vitamin A (IU)	27
Vitamin E (mg)	0,14
Niacin (mg)	0,23
Pantotenska kiselina (mg)	0,34

Reputaciju jagodama kao voća sa znakovitim mikronutritivnim sastavom osigurao je vitamin C čije zabilježene vrijednosti prelaze 50 mg na 100 g ploda što je više od 50 % preporučenog dnevnog unosa ovog vitamina za odraslu osobu (Giampieri i sur., 2012). Osim što se radi o potentnom antioksidansu s isto tako esencijalnom ulogom održavanja optimalnog imunološkog odgovora (Carr i sur., 2017), vitamin C se smatra solidnim indikatorom kvalitete hrane, poglavito tijekom skladištenja i prerade (Sapei i Hwa, 2014). Uvriježeno je mišljeno da ukoliko je koncentracija vitamina C u namirnici dobro očuvana, istovremeno će i koncentracije drugih nutrijenata pratiti sličan trend (Sapei i Hwa, 2014). Imajući u vidu značajne količine vitamina C u jagodama, ali i činjenicu da je isti izuzetno podložan degradaciji tijekom skladištenja, optimalno čuvanje i obrada jagoda od velike su važnosti za plasiranje kvalitetnog konačnog proizvoda potrošačima (Sapei i Hwa, 2014).

2.1.2. Bioaktivni spojevi jagode

Uvriježena klasifikacija polifenola prema osnovnoj kemijskoj strukturi uključuje podjelu na dvije velike podskupine, flavonoidne polifenole i ne-flavonoidne polifenole (Durazzo i sur., 2019). Svaka od navedenih podskupina podliježe daljnjoj podijeli, no za jagodu su značajniji polifenoli iz prvotno spomenute skupine (Giampieri i sur., 2012). Pored njih također su prisutni hidrolizirani tanini uz nešto slabiju zastupljenost kondenziranih tanina kao predstavnika ne flavonoidnih polifenola (Giampieri i sur., 2012).

Flavonoli, flavanoli i antocijani, podskupine su prethodno spomenutih flavonoida karakterističnih za vrste roda *Fragaria*. Potonji antocijani, ističu se kao kvantitativno najznačajnije bioaktivne komponente jagode od kojih prednjače pelargonidin 3-glukozid i cijanidin 3-glukozid te njihovi derivati (Bursać Kovačević i sur., 2015). Koncentracija ukupnih antocijana prema rezultatima dosadašnjih znanstvenih istraživanja iznosi od 150 mg kg⁻¹ svježeg ploda jagode pa sve do 800 mg kg⁻¹ (Fiarescu i sur., 2020; Giampieri i sur., 2012).

Milosavljević i sur. (2020) ispitivali su fenolni sastav 12 različitih sorti jagoda s ciljem identificiranja onih najpotentnijih po pitanju antioksidacijskog kapaciteta s obzirom da isti dijelom ovisi upravo o prisustvu pojedinih polifenolnih spojeva. U istraživanje su uključene sorte 'Roxan', 'Arosa', 'Joly', 'Alba' i 'Asia' koje dozrijevaju tijekom lipnja, a komercijalno se uzgajaju na području Srbije. Zatim sorte 'Jenny', 'Laetitia', 'Garda' i 'Primy' karakteristične za Italiju koje također prinos daju tijekom lipnja te posljednje 'Albion', 'Capri' i 'Irma', čiji je prinos dostupan kontinuirano tijekom nekoliko mjeseci (Milosavljević i sur., 2020). Istraživanje je uključivalo spektrofotometrijsko određivanje ukupnog udjela polifenola (engl. *Total Phenolic Content, TPC*) i antocijana (engl. *Total Anthocyanin Content, TACY*), ukupni antioksidacijski kapacitet (engl. *Total Antioxidant Capacity, TAC*) te udio topljive suhe tvari (engl. *Total Soluble Sugar, TSS*). Minimalni standard TSS za prihvatljiv harmoničan okus iznosi 7 %, pa su se sorte 'Arosa', 'Garda' i 'Irma' vrijednostima od 6,67, 6,53 i 6,27 % TSS pokazale suboptimalnima, dok su se 'Primy', 'Jeny' i 'Joly' s vrijednostima 8,75, 8,33 i 8,13 % TSS pokazale kao najbolje (Milosavljević i sur., 2020). Sorta „Laetitia“, dominirala je s TAC vrijednošću s iznosom od $3,99 \pm 0,44$ mg AsA equiv (engl. *Ascorbic acid equivalents*) po gramu svježe mase što je primjerice 63,2 % veća vrijednost od najmanje izmjerene kod sorte 'Alba' ($1,47 \pm 0,78$ mg AsA equiv g⁻¹). Sličan trend zabilježen je kod TPC pa su 'Laetitia' i 'Joly' prednjačile s vrijednostima od $1,07 \pm 0,03$ i $0,88 \pm 0,09$ mg GAE (engl. *Gallic Acid Equivalents*) g⁻¹ svježe mase, odnosno čak 57 % i 47,7 % više u odnosu na sortu „Irma“ kao najlošiju obzirom na navedeni parametar (Milosavljević i sur., 2020). TACY vrijednosti od $12,10 \pm 0,58$ mg C-3-G equiv (engl. *Cyanidin-3-glucoside equivalents*) 100 g⁻¹ svježe mase za sortu 'Laetitia' te $14,48 \pm 0,30$ za sortu 'Joly' su čak 82,2 % i 85,2 % više u odnosu na najmanje izmjerenu kod sorte 'Jeny' ($2,15 \pm 0,22$ mg C-3-G equiv 100g⁻¹ svježe mase) (Milosavljević i sur., 2020).

Razlozi velikom interesu proučavanja antocijana i drugih polifenolnih spojeva jesu njihovi potencijalno korisni učinci na ljudsko zdravlje (López-Pedrouso i sur., 2020). Smatra se kako upravo polifenolni spojevi u voću i povrću svojim antioksidacijskim, antitrombotičnim i protuupalnim svojstvima imaju značajan doprinos kardiovaskularnom zdravlju (Krga i Milenković, 2019). Međutim, da bi isti mogli ostvariti svoj biološki učinak, njihova dostupnost

u cirkulaciji i okolnim tkivima je osnovni preduvjet (Krga i Milenković, 2019). Czank i sur. (2013) proučavali su apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje izotopski obilježenog cijanidin-3-glukozida. Rezultati istraživanja sugeriraju bioraspoloživost od čak 12,4 % ovog antocijana što je oprečno do tada zabilježenim rezultatima drugih istraživanja koja su konstantno ukazivala na bioraspoloživost manju od 1 % (Czank i sur., 2013). Važno je naglasiti da se antocijani mogu apsorbirati u intaktnoj formi u želucu, no u tankom crijevu podliježu degradaciji te dospjevši u cirkulaciju podliježu konjugacijskim reakcijama metabolizma posredstvom enzima faze I i II što je direktan razlog identifikacije njihovih brojnih metiliranih, sulfo-konjugiranih i glukuronidnih derivata (Krga i Milenković, 2019). Upravo su metaboliti antocijana u fokusu mnogih istraživanja obzirom da isti ispoljavaju specifična bioaktivna svojstva na ljudski organizam (Krga i Milenković, 2019; Czank i sur., 2013).

Pored antocijana, elagitanini su značajni konstituenti polifenola jagode čiji metabolizam nije istovjetan antocijanima (Lorenzo i sur., 2008). Elaginska kiselina koja nastaje hidrolizom elagitanina loše se apsorbira te podliježe bakterijskoj razgradnji u kolonu pri čemu nastaju urolitini (Sandhu i sur., 2018). Urolitini također podliježu konjugacijskim reakcijama, pa se u krvi mogu detektirati njihovi različiti derivati poput urolitina A i urolitina B glukuronida (Sandhu i sur., 2018). Za razliku od mnogih polifenolnih spojeva i njihovih metabolita, navedeni urolitini ne posjeduju značajnu antioksidacijsku aktivnost, no *in vitro* studije ukazuju na potencijalne antikancerogene učinke na stanicama raka dojke, prostate i kolona (Truchado i sur., 2011). Ipak, rezultati Sandhu i sur. (2018) ukazuju na individualne razlike u pojavnosti urolitina u krvi gdje je kod pojedinih ispitanika identificiran samo jedan od navedena dva, a kod većine ispitanika nije bio prisutan niti jedan. Rezultati su u suglasnosti s onima provedenim od strane Truchada i sur. (2011) koji su također analizirali urin ispitanika, a na temelju detektiranih razina urolitina u urinu, ispitanici su svrstani u kategorije loših, srednjih odnosno visokih proizvođača urolitina. Kao potencijalno objašnjenje u oba slučaja autori navode prisustvo određenih bakterijskih vrsta o kojima ovisi proizvodnja urolitina i njihovih derivata, međutim iste nisu definirane (Sandhu i sur., 2018; Truchado i sur., 2011). Drugim riječima, koncentracija pojedinih urolitina i derivata može poslužiti kao svojevrsni indikator crijevne disbioze koja u konačnici može ograničiti potencijal koji urolitini imaju na zdravlje (Sandhu i sur., 2018).

2.1.3. Sok od jagode

Pandemija kroničnih nezaraznih bolesti povezanih s nepravilnom prehranom rezultirala je povećanim interesom za evaluacijom različitih prehrambenih strategija njihove prevencije. Nezaobilazna stavka gotovo svih svjetskih smjernica u tom pravcu jest povećana konzumacija voća i povrća. Razlog tome, pored bogatog mikronutritivnog sadržaja navodi se i prisustvo velikog broja funkcionalnih sastojaka koji konzumirani u adekvatnim količinama pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje (Bursać Kovačević i sur., 2020). Upravo je to potaklo interes prehrambene industrije za razvojem funkcionalne hrane odnosno njenog uvrštavanja među paletu svojih proizvoda (Granato i sur., 2020).

S obzirom na prisustvo za jagodu karakterističnih polifenolnih spojeva poput flavonoida, antocijana i fenolnih kiselina, sok od jagode počeo je privlačiti interese ne samo zbog nutritivne vrijednosti, već i potencijalnih zdravstvenih koristi proizašlih upravo iz dotičnih spojeva (Yildiz i sur., 2020). Polifenoli jagode značajni su zbog mogućnosti blokiranja djelovanja slobodnih radikala, reguliranja ekspresije gena putem moduliranja metabolizma i antioksidacijskih mehanizama te prevenciju DNK oštećenja (Yildiz i sur., 2020). Također, konzumacija voćnog soka može imati korist jednaku preporučenoj dnevnoj konzumaciji voća (Benton i Young, 2019).

Voćni sok definiran je kao proizvod jedne ili više vrsta zdravog, tehnološki zrelog, svježeg ili ohlađenog voća koje nije fermentiralo, ali može fermentirati. Pri tome organoleptička svojstva soka moraju odgovarati voću od kojeg je isti i proizveden. Kao sirovina za proizvodnju soka može poslužiti voće ili voćna kaša, a soku se može dodati samo aroma, pulpa i čestice voćnog tkiva izdvojene tijekom procesa proizvodnje. Za razliku od voćnog nektara, u voćni sok nije dozvoljen dodatak šećera, Pravilnik (2013).

Osim što dodatak šećera u voćni sok nije prihvatljiv zbog stroge zakonske regulative, isti interferira sa zahtjevima potrošača koji sve više streme nutritivno kvalitetnijim proizvodima uz mogućnosti što veće sličnosti s onim „svježe“ pripremljenim (Cassani i sur., 2018). Upravo su takvi trendovi doveli do razmišljanja o alternativnim „funkcionalnim“ dodacima voćnim sokovima odnosno razvoju funkcionalnih sokova koji bi se isticali dodatno modificiranim nutritivnim sastavom s ciljem potenciranja blagotvornih učinaka na zdravlje potrošača (Cassani i sur., 2018; Horačkova i sur., 2018). Primjerice, inulin i oligofruktoza glase kao jedni od najistraživanijih prebiotika te su mogućnosti njihova dodatka u sok od jagode više puta istraživane od strane Cassanija i sur. (2018). Isto tako, voćni sokovi pa tako i sok od jagode predstavlja potencijalno dobar supstrat za dodatak probiotika. Horačkova i sur. (2018)

moгуćnosti vide u činjenici kako vitamin C u soku mođe poslužiiti boljoj održivosti probiotika snižavajući redoks potencijal, dok šećeri i organske kiseline predstavljaju izvor ugljika uz istovremenu zaštitnu ulogu celuloze tijekom skladištenja i proizvodnje. Isti autori, prilikom evaluacije dodatka *Bifidobacterium* vrsta u sok od jagode i jabuke, ističu unos probiotika putem voćnih sokova kao opciju kod laktoza netolerantnih potrošača, ali i ostalih koji izbjegavaju mliječne proizvode (Horačkova i sur., 2018).

Jagoda predstavlja izvrsnu sirovinu za proizvodnju voćnog soka, no isto tako postoje i otegotne okolnosti na koje treba obratiti pažnju prilikom industrijske prerade. Jednu od osnovnih zapreka predstavlja visoki udio vode koji u staničnim tkivima jagode iznosi oko 90 % (Giampieri i sur., 2012). Kako je voda medij za odvijanje različitih kemijskih i biokemijskih reakcija, ali i predstavlja plodno tlo za razmnožavanje mikroorganizama, zamrzavanje je stoga nužno u svrhu očuvanja kvalitete sirovine i konačnog proizvoda (De Ancos i sur., 2006). Kristalizacijom vode do koje dolazi prilikom zamrzavanja, smanjuje se aktivitet vode u biljnim stanicama što se negativno odražava na odvijanje biokemijskih reakcija s obzirom da funkcionalnost mnogih enzima ovisi o temperaturi (De Ancos i sur., 2006). Iako zamrzavanje ne možemo smatrati biocidnom mjerom, poprilično uspješno potiskuje mikrobni rast (De Ancos i sur., 2006). Problem zamrzavanja, odnosno kristalizacije vode unutar biljnog tkiva za prehrambenu industriju jest što ista nerijetko rezultira narušavanjem integriteta staničnih stjenki i konačno smekšanjem tkiva (De Ancos i sur., 2006). Rješenje je brzo zamrzavanje prilikom kojeg se formiraju manji kristalići leda koji u manjoj mjeri narušavaju staničnu strukturu i kvalitetu proizvoda (De Ancos i sur., 2006).

Avitabile-Leba i sur. (2006) prilikom proučavanja nekoliko sorti jagode navode kako su za industrijsku preradu idealni plodovi srednje veličine, žarko crvene boje s nešto tamnijom pulpom. Isto tako, nužan je preduvjet optimalna vrijednost topive suhe tvari, a u istom radu svi su uzorci pokazivali vrijednosti između 7 i 10 °Brix, što autori smatraju prihvatljivim za daljnju preradu (Avitabile- Leba i sur., 2006).

Česta je praksa da se prije same proizvodnje soka svježii plodovi jagode ili pasirani u pire, podvrgnu zamrzavanju ili čuvaju na temperaturi hladnjaka do daljnje obrade (Yildiz i sur., 2020; Buve i sur., 2017). Koraci u proizvodnji pirea uključuju pranje i sortiranje plodova, pasiranje, opcionalno dodatno filtriranje, inkubaciju pirea u spremnike prije pasterizacije te konačnu pasterizaciju (Teribia i sur., 2021). Pasiranje se odvija u kontroliranoj atmosferi dodatkom dušika kao inertnog plina čime se prevenira oksidacija proizvoda (Buve i sur., 2017). Nakon pasiranja obično slijedi ekstrakcija u ekstraktoru, a potom centrifugiranje i filtracija kako bi maksimalno izdvojile čvrste čestice od tekuće faze. Od presudne je važnosti da se punjenje

proizvoda u za to predviđenu ambalažu provede u aseptičnim i vakuumskim uvjetima. Ovim načinom minimalizira se odvijanje kisikom kataliziranih enzimskih reakcija, kontaminacija proizvoda te dulja stabilnost prilikom skladištenja (Yildiz i sur., 2020; Buve i sur., 2017).

Korak koji će u konačnici vjerojatno i najviše odrediti kvalitetu, ali i trajnost proizvoda jest pasterizacija. U prvom planu ona je nužna zbog osiguravanja mikrobiološke, a time i zdravstvene ispravnosti proizvoda. Pored toga, pasterizacijom se osigurava inaktivacija enzima odgovornih za promjenu boje proizvoda, a to su polifenol oksidaza i oksidoreduktaza do čijeg oslobađanja i djelovanja najčešće dolazi prilikom mehaničke obrade plodova (Teribia i sur., 2021). Razlog promjeni boje jest formiranje smeđih pigmenata (melanoidina), u ovom slučaju reakcijama kataliziranim gore navedenim enzimima u prisustvu kisika. Dotične reakcije poznate su kao reakcije enzimskog posmeđivanja (Teribia i sur., 2021; Buve i sur., 2017).

Također, degradacija crvene boje jagode i njenih proizvoda posljedica je i degradacije antocijana u slabije obojene produkte. Iako je za to dijelom odgovoran enzim antocijan- β -glukozidaza poznat i pod nazivom antocijanaza (Oren-Shamir, 2009), antocijani su termolabilni pigmenti, stoga se pasterizacija često negativno reflektira na boju soka (Bursać Kovačević i sur., 2016a; Bursać Kovačević i sur., 2016b). Suprotno reakcijama enzimskog posmeđivanja, reakcije neenzimskog posmeđivanja odnose se na degradaciju askorbinske kiseline i Maillardove reakcije te u određenoj mjeri i oksidacije i polimerizacije polifenola. Promjene boje uzrokovane neenzimatskim posmeđivanjem događaju se u većoj mjeri nakon pasterizacije i tijekom skladištenja te kao takve predstavljaju veliki izazov za prehrambenu industriju pri dugoročnom osiguranju kvalitete proizvoda (Teribia i sur., 2021; Buve i sur., 2017). Iz tog razloga, sve veću pažnju privlače nove ne-termalne metode pasterizacije proizvoda koje bi osim zahtjeva mikrobiološke ispravnosti, zadovoljile i sve veće zahtjeve potrošača za kvalitetnim proizvodima vodeći se pri tome očuvanjem senzorskih, ali i nutritivnih karakteristika.

Prema istraživanju Buve i sur. (2017) promjena boje tijekom skladištenja soka od jagode (20 °C tijekom 2 tjedna, 28 °C tijekom 32 tjedna, 35 °C tijekom 12 tjedana i 42 °C tijekom 8 tjedana, sve u odsustvu svjetla), smatra se kritičnim parametrom kvalitete te će upravo ona odrediti prihvatljivost proizvoda od strane potrošača. U prilog navedenom govore i drugi autori ističući kako je boja prva karakteristika koju će potrošači primijetiti i shodno tome prihvatiti odnosno odbiti proizvod (Gabrić i sur., 2018; Bursać i sur., 2007).

Aroma, koja je također neizostavna stavka senzorske karakterizacije soka od jagode, u istraživanju Buve i sur. (2017) nije se pokazala kritičnim čimbenikom prihvatljivosti proizvoda među ispitanicima. Potonje je u najmanju ruku zanimljivo s obzirom na činjenicu kako se pojedine komponente arome (npr. esteri i aldehidi) značajno mijenjaju pod utjecajem različitih

parametara skladištenja (npr. vrijeme i temperatura). Rezultati istraživanja Siegmunda i sur. (2001) pokazuju povećanje koncentracije nepoželjnih komponenata arome poput furfurala i dimetil sulfida tijekom skladištenja pri temperaturi 37 °C kroz šest mjeseci. Formiranje prvotno navedenog furfurala u korelaciji je s degradacijom askorbinske kiseline tijekom skladištenja. Koncentracija estera koji jagodi daju karakterističnu voćnu aromu s vremenom se očekivano smanjivala. Vrijednosti su mjerene svakih tjedan dana što otprilike odgovara uvjetima čuvanja od 2 mjeseca pri temperaturi 20 °C ± 2 °C, a već nakon 3 tjedna zabilježene su i značajne promjene u okusu gdje su ispitanici naveli gubitak svježeg, voćne arome karakteristične za jagodu. U konačnici, kao idealnu temperaturu skladištenja autori su naveli onu između 4-6 °C (Siegmund i sur., 2001).

Kako bi se gubici uslijed djevovanja temperature tijekom obrade voćnih sokova sveli na najmanju moguću mjeru, u posljednje se vrijeme sve više istražuje primjena inovativnih tehnologija obrade (npr. visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje i dr.). Što je i očekivano, obzirom da ove tehnologije omogućuju niže temperature obrade u usporedbi s pasterizacijom, bez narušavanja nutritivnih i senzorskih obilježja, a uz osiguranje zdravstvene ispravnosti (Škegro i sur., 2021; Kostelac i sur., 2020; Bursac Kovačević i sur., 2019).

2.1.4. Stabilnost fenolnih spojeva soka od jagode

Uloga polifenola jagode kao bioaktivnih spojeva s pozitivnim učincima na zdravlje s naglaskom na njihovu antioksidacijsku aktivnost već je pojašnjena ranije. S obzirom da se radi o izuzetno vrijednim spojevima s aspekta zdravlja potrošača, ali istovremeno jako nestabilnim, minimiziranje njihovih gubitaka predstavlja imperativ pri proizvodnji prehrambenih proizvoda, konkretno soka. Kako sam proces proizvodnje soka uključuje nekoliko koraka, a između ostalog i toplinsku obradu, koncentracija fenolnih spojeva u konačnom proizvodu može se značajno smanjiti. Pored uvjeta prerade, pozornost također treba obratiti i na uvjete skladištenja (Giampieri i sur., 2012).

Klopotek i sur. (2005) su uspoređivali koncentraciju ukupnih fenola i antocijana prilikom prerade jagoda u različite proizvode poput kaše, soka, nektara i voćnog vina. Izmjerena koncentracija ukupnih fenola u plodu jagode prije obrade iznosila je 257 ± 2 mg GAE (GAE, engl. *Gallic acid equivalents*) na 100 g svježeg mesa. Zanimljivo je kako je već mehanička obrada dovela do 15 % gubitka ukupnih fenola, a filtrirani sok nakon kompletne mehaničke obrade sadržavao je svega 50 % ukupnih fenola u odnosu na svježi plod. Pasterizacija pri temperaturi od 85 °C tijekom 5 minuta, koja je uslijedila nakon filtracije uzrokovala je daljnji

gubitak od 27,2 % ukupnog sadržaja fenola. Suprotan trend zabilježen je za koncentraciju antocijana koja se nakon inicijalne mehaničke obrade čak i povećala u odnosu na onu zabilježenu kod svježih plodova. Moguće objašnjenje pripisuje se procesu pasiranja tijekom kojeg dolazi do kontinuiranog otpuštanja antocijana iz staničnih struktura u usporedbi s cijelim plodovima koji se ne podvrgavaju značajnijoj mehaničkoj obradi koja bi dovela do oštećenja stanica i otpuštanja sadržaja. Ipak, udio antocijana u pasteriziranom soku je smanjen te je iznosio je 67 % od inicijalne količine od $42,2 \pm 0,3$ mg pelargonidin-3-glukozida na 100 g svježeg ploda (Klopotek i sur., 2005).

Piljac-Žegarac i sur. (2009) su ispitivali promjene u fenolnom sastavu različitih voćnih sokova hrvatskog tržišta pohranjenih na 4 °C tijekom 29 dana. Kako bi se postigli reprezentativni uvjeti slični onima u kućanstvu, sokovi su otvarani jednom dnevno i čuvani na tamnom mjestu. Bitno je naglasiti da se u ovom istraživanju koristio nektar od jagode s 40 % udjela voća u suhoj tvari. Inicijalna koncentracija ukupnih fenola u nektaru jagode iznosila je $1302,1 \pm 97,4$ mg GAE L⁻¹. Tijekom prvih 48 sati skladištenja pri 4 °C, koncentracija ukupnih fenola imala je uzlazni trend te je iznosila $1671,2 \pm 88,3$ mg GAE L⁻¹ što je porast od 28,35 % u odnosu na početne vrijednosti. Nakon 48 sati, uslijedilo je smanjenje koncentracije, da bi ista na posljednji dan mjerenja odnosno 29. dan skladištenja iznosila $1388,7 \pm 49,3$ mg GAE L⁻¹ što je za 6,65 % porast u odnosu na inicijalnu koncentraciju. Navedeni rezultati u pravilu sugeriraju povećanje ukupnog udjela polifenola u nektaru od jagode tijekom skladištenja, no autori navode kako je tijekom skladištenja vrlo izgledno došlo do formiranja određenih spojeva koji su reagirali s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je korišten u metodi određivanja, i time utjecali na konačan rezultat. Kao logičan zaključak navodi se kako skladištenje pri gore navedenim uvjetima nije dovelo do smanjenja sadržaja ukupnih fenola (Piljac-Žegarac i sur., 2009).

Uspoređujući koncentracije ukupnih antocijana u jagodama i soku od jagode, Verbeyst i sur. (2012) nisu zamijetili značajne razlike, a iste su iznosile $270,6 \pm 15,8$ ekvivalenata pelargonidin-3-glukozida (Eq. Pg-3-G) g⁻¹ u jagodama odnosno $272,8 \pm 38,9$ Eq Pg-3-G g⁻¹ u soku. Koncentracije ukupnih fenola u soku od jagode ($430,1 \pm 5,6$ μg GAE g⁻¹) značajnije su se smanjile u odnosu na one izmjerene u samim jagodama ($593,2 \pm 7,3$ μg GAE g⁻¹). Navedeni rezultati odnose se na sok proizveden pomoću kućnog ekstraktora tj. sokovnika. U radu su također ispitivane i koncentracije soka dobivenog enzimskom ekstrakcijom, no unatoč višem prinosu koncentracije antocijana i ukupnih fenola pratile su sličan trend kao i u prethodno navedenom postupku.

2.2. Tehnologija pulsirajućeg električnog polja (PEF) u konzerviranju voćnih sokova

Mogućnosti koje pravilna prehrana nudi u pogledu zdravstvenih beneficija i prevencije kroničnih nezaraznih bolesti, dovele su do povećanog interesiranja potrošača o nutritivnim vrijednostima konzumirane hrane pri čemu je poseban naglasak stavljen na namirnice biljnog podrijetla s obzirom da su iste nezaobilazni konstituent pravilne prehrane (Koubaa i sur., 2018; Elez-Martinez i sur., 2017). Imajući u vidu kako prerada i skladištenje namirnica može uvelike narušiti kvalitetu i prihvatljivost proizvoda, važnu ulogu prilikom odabira biljnih namirnica, voća i povrća specifično, igra njihova svježina (Elez-Martinez i sur., 2017; Odriozola-Serrano i sur., 2013). Ipak zbog ograničenja koja se u prvom planu odnose na rok trajanja, ali i dostupnost svježih namirnica, konzerviranje je neophodno, a kao najraširenija metoda koristi se termalna obrada (Koubaa i sur., 2018). Kako ista može narušiti senzorska i nutritivna svojstva proizvoda (Koubaa i sur., 2018; Odriozola-Serrano i sur., 2013), inovativne metode konzerviranja predložene su kao moguća alternativa koja bi istovremeno omogućila zdravstveno ispravan proizvod, ali i udovoljila zahtjevima potrošača za nutritivnom kvalitetom (Koubaa i sur., 2018).

Tehnologija pulsirajućeg električnog polja (eng. *Pulsed Electric Field, PEF*) nameće se kao potencijalno korisna metoda konzerviranja kojom je moguće ostvariti inaktivaciju patogenih mikroorganizama i enzima odgovornih za degradaciju kvalitete namirnica, a pri tome minimalno utjecati na nutritivni sastav proizvoda (Koubaa i sur., 2018). Osnovni princip rada ove tehnologije jest aplikacija visokog napona ($0,5-80 \text{ kV cm}^{-1}$) putem kratkih „impulsa“ (ms do ns) na hranu smještenu između dvije elektrode (Elez-Martinez i sur., 2017). Ovim načinom narušava se razlika membranskog potencijala mikroorganizama što posljedično dovodi i do narušavanja integriteta membrane odnosno formiranja pora (elektroporacija) i porasta permeabilnosti membrane (Koubaa i sur., 2018; Elez-Martinez i sur., 2017). Također, bitno je napomenuti da uslijed PEF tretmana, stvaranje pora u staničnoj membrani može biti reverzibilno i ireverzibilno. Jednom nastale ireverzibilne promjene, dovest će do konačnog raspada stanice (Gabrić i sur., 2018; Koubaa i sur., 2018).

Iako tijekom procesa zbog prijenosa energije dolazi do porasta temperature tretiranog uzorka, ona u pravilu ne prelazi $40 \text{ }^\circ\text{C}$, stoga se ova tehnologija ispituje kao alternativa termičkim postupcima obrade hrane (Salehi 2020; Koubaa i sur., 2018). Ipak primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja još uvijek je ograničena isključivo na tekući medij, pa je u fokusu mnogih istraživanja upravo njena primjena u svrhu konzerviranja voćnih i povrtnih sokova (Elez-Martinez i sur., 2017; Odriozola-Serrano i sur., 2013). Osim u svrhu

osiguravanja mikrobiološke ispravnosti sokova, gore opisani principi degradacije membrane mogu poslužiti i u svrhu ekstrakcije pojedinih bioaktivnih spojeva iz staničnih odjeljaka što ovoj nekonvencionalnoj metodi dodaje još jednu dimenziju unaprijeđena nutritivne kvalitete voćnih sokova (Koubaa i sur., 2018; Elez-Martinez i sur., 2017).

Učinkovitost PEF tehnologije ovisit će o nekoliko faktora poput jakosti električnog polja, duljini impulsa, frekvenciji impulsa, ukupnom vremenu procesiranja, polarnosti medija, ali i temperaturi procesiranja (Salehi, 2020). Isto tako, karakteristike samog soka poput pH vrijednosti, aktiviteta vode, ali i udjela topljive suhe tvari utjecat će na učinkovitost tretiranja i to u kontekstu mikrobne inaktivacije (Salehi, 2020). Također, električna konduktivnost (provodljivost) medija, u ovom slučaju soka, predstavlja još jedan bitan parametar PEF procesiranja (Salehi, 2020). Što je razlika u električnoj konduktivnosti između soka i mikrobne membrane veća, povećat će se i „strujanje“ iona preko membrane što za rezultat ima upravo slabljenje njezine strukture, pa je sam proces puno uspješniji (Salehi, 2020). Iz tog razloga tehnologija pulsirajućeg električnog polja puno je efektivnija u sokova s nižom električnom konduktivnošću (Salehi, 2020).

Iako PEF tehnologija predstavlja svojevrsnu inovaciju na području prehrambene industrije, ona ima i svoje nedostatke. Prethodno spomenuta mikrobna inaktivacija limitirana je na vegetativne stanice, što bi značilo da je problem rješavanja sporogenih mikroorganizama i dalje aktualan (Arshad i sur., 2020; Gabrić i sur., 2018). Ograničenja su također zabilježene kod sokova s visokim udjelom bjelančevina gdje zbog jakosti apliciranog električnog polja može doći do denaturacije proteina (Salehi, 2020; Kempkes, 2017), dok je slabija učinkovitost PEF procesiranja također zabilježena i kod sokova s višim sadržajem masti (Salehi, 2020). Poseban izazov predstavlja formiranje mjehurića zraka unutar tretiranog medija što nakon izlaganja visokom naponu dovodi do dielektričnog raspada (Arshad i sur., 2020; Gabrić i sur., 2018).

Sama izvedba uređaja za provođenje PEF tehnologije mora sadržavati izvor energije (visokog napona), komoru za tretiranje hrane, generator impulsa te sustav za kontrolu i nadziranje procesa (Arshad i sur., 2020; Kumar i sur., 2015). Otegotna okolnost za primjenu PEF tehnologije u komercijalne svrhe jest visoka cijena uređaja (Kempkes 2017; Kumar i sur., 2015). Prema nekim procjenama cijena jednog komercijalnog PEF uređaja s kapacitetom proizvodnje između 1000 i 10000 L h⁻¹ kreće se između 500 000 i 1 000 000 američkih dolara (Kumar i sur., 2015). Prvi PEF uređaj s komercijalnim potencijalom proizvela je kompanija „Diversified Technologies, Inc.“ za Sveučilište Ohio u SAD-u 2000. godine, a kapacitet proizvodnje mu je iznosio između 1000 i 5000 L h⁻¹ (Kumar i sur., 2015).

Prvi voćni sok proizveden PEF tehnologijom plasiran je na tržište SAD-a 2005. godine od strane „Genesis Juice Corporation“, a isti je odobrila američka FDA (engl. *Food and Drug Administration*) (Kempkes, 2017). Za primjer, u Europskoj uniji ne postoji zasebna legislativa kojom se regulira hrana procesirana PEF tehnologijom (Nowosad i sur., 2021).

Iako upotreba navedene tehnologije podliježe „Uredbi (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i vijeća o novoj hrani“, hrana proizvedena PEF tehnologijom ne može se smatrati „novom“ obzirom da proces proizvodnje ne utječe na značajne promjene njene kompozicije i strukture, nutritivne vrijednosti, metaboliziranja ili pojavu neželjenih tvari u istoj (Nowosad i sur., 2021).

Procjenjuje se da je od 2015. godine otprilike 100 različitih PEF uređaja u pogonu diljem svijeta od kojih je više od polovice namijenjeno za industrijsku upotrebu (Kempkes, 2017).

2.2.1. Primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) u obradi soka od jagode

Sok od jagode s obzirom na svoj nutritivni sastav predstavlja odličan supstrat za rast različitih bakterija, kvasaca i plijesni (Yildiz i sur., 2020). Od posebnog su značaja patogene bakterije poput *Escherichie Coli* O157:H7 ili *Salmonella spp.* čije je suzbijanje rasta popriličan izazov u svrhu očuvanja mikrobiološke stabilnosti soka (Yildiz i sur., 2020). Iako se potonje efektivno postiže termalnom pasterizacijom (72 °C, 15 s ili 63 °C, 30 min) istovremeno se degradira kvaliteta soka koja se očituje nutritivnim sastavom, organoleptičkim svojstvima, ali i prisustvom bioaktivnih spojeva (Yildiz i sur., 2020).

Yildiz i sur. (2020) uspoređivali su utjecaj tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) s konvencionalnom termalnom pasterizacijom (72 °C, 15s) na prisutnu mikrofloru soka (aerobne bakterije, kvasci, plijesni) i fizikalno-kemijska svojstva (pH, udio suhe tvari, ukupne kiseline). Pri uvjetima PEF procesiranja (35 kV cm⁻¹, 155 Hz, 27 μs) maksimalna temperatura tijekom trajanja cijelog procesa nije prelazila 46 °C. Nakon primjene PEF tehnologije broj ukupnih mezofilnih, aerobnih bakterija smanjen je s 3,1 ± 0,1 log CFU mL⁻¹ kod svježeg soka na 1,9 ± 0,1 log CFU mL⁻¹, dok je broj kvasaca i plijesni isto tako smanjen s inicijalnih 3,4 ± 0,0 log CFU mL⁻¹ na 1,8 ± 0,2 log CFU mL⁻¹. Rezultati su usporedivi s rezultatima termalne pasterizacije gdje je u oba slučaja broj smanjen na vrijednosti ispod 2 CFU mL⁻¹. Iako autori rezultate navode kao obećavajuće u pogledu primjene netermalne tehnologije na suzbijanje mikrobne populacije, iste nisu u skladu s FDA regulativom koja preporuča redukciju od 5 log (Yildiz i sur., 2020). Što se tiče fizikalno kemijskih svojstava, PEF tehnologija nije značajno

utjecala na udio ukupne suhe tvari, pH vrijednost kao ni udio kiselina, a niti se značajno razlikovala od termalne pasterizacije obzirom na rezultate.

Aguilo-Aguayo i sur. u seriji radova (2009a, 2009b, 2009c) proučavali su različite parametre kvalitete odnosno njihove promjene nastale tijekom skladištenja soka od jagode prethodno obrađenog PEF tehnologijom odnosno termalnom pasterizacijom. Od posebnog je interesa promjena boje, pojava neželjenih nusprodukta (hidroksimetilfurfural, HMF) i smanjenje viskoznosti kao posljedica djelovanja specifičnih enzima, ali i neoptimalnih uvjeta procesiranja (Aguilo-Aguayo i sur., 2009a).

Primjerice, prekomjerno formiranje HMF-a indikator je predugog izlaganja proizvoda termalnoj obradi, dok je smanjenje viskoznosti soka do koje dolazi razgradnjom pektinskih tvari posredstvom enzima pektinmetilesteraze (PME) i poligalakturonaze (PG) neprihvatljivo jer dovodi do narušavanja homogenosti soka i pojave taloga (Aguilo-Aguayo i sur., 2009a).

U usporedbi s termalnom pasterizacijom (90 °C, 30 s i 60 s), svjetlina (engl. *lightness*) soka obrađenog PEF tehnologijom (35 kV cm⁻¹, 1700 μs, 100 Hz) pokazala se značajno većom te je ista zadržana tijekom 63 dana skladištenja na temperaturi od 4 °C također iznad vrijednosti postignutih termalnom pasterizacijom (Aguila-Aguayo i sur., 2009a).

U prilog termalnoj pasterizaciji ne idu ni rezultati indeksa posmeđivanja kao ni količina nastalog HMF. PEF tehnologija nije značajno povišala indeks posmeđivanja u odnosu na kontrolni uzorak za razliku od termalne pasterizacije, a iako je količina nastalog HMF bila nešto veća od kontrolnog uzorka, njegovo formiranje je i dalje značajno manje nakon PEF tehnologije u usporedbi s termalnom pasterizacijom. Objašnjenje koje autori navode jest gubitak pigmenata antocijana tijekom termalne obrade uz napomenu kako PEF proces malo vjerojatno utječe na njihovu koncentraciju zbog čega je i boja kod dotičnog načina obrade bila bolje zadržana. Dodatno, pasterizacija pri 90 °C tijekom 60 sekundi u usporedbi s provedenom tijekom 30 sekundi dovela je do povišenja HMF za 17 % (Aguila-Aguayo i sur., 2009a). Rezidualna aktivnost PME u istom istraživanju najviše je smanjena posredstvom PEF tehnologije (13 %), a tijekom prvog tjedna skladištenja (4 °C) vrijednosti su dodatno pale na 6 % i kao takve ostale do kraja skladištenja (63 dana). Za usporedbu, vrijednost izmjerena neposredno nakon termalne pasterizacije pri 90 °C tijekom 30 sekundi iznosila je 48 %, odnosno 22,2 % tijekom 60 sekundi. Trend opadanja rezidualne aktivnosti enzima najslabije je izražen kod kraćeg trajanja pasterizacije, a vrijednosti su otprilike izjednačile tek pred sam kraj skladištenja (oko 60. dana) gdje su postigle vrijednost od oko 10 %. S industrijske točke gledišta, sok se smatra komercijalno stabilnim ukoliko je rezidualna aktivnost enzima ispod 10 %, a PEF procesiranjem te vrijednosti su ostvarene i zadržane tijekom čitavog vremena skladištenja

(Aguilo-Aguayo i sur., 2009a). Rezidualna aktivnost PG ipak nije u potpunosti reducirana, no i dalje je bila manja primjenom PEF tehnologije (73.3 %) u usporedbi s pasterizacijom pri 60 s (76,2 %) i 30 s (96,8 %) (Aguilo-Aguayo i sur., 2009a).

Slični rezultati zabilježeni su od istih autora pri nešto drugačijim uvjetima PEF procesiranja (35 kV cm⁻¹, 1000 μs, 100 -250 Hz) gdje je rezidualna aktivnost PME u soku od jagode također reducirana na 10 % uz i ovoga puta na PEF otporniju PG čija je rezidualna aktivnost smanjena na svega 75 % (Aguilo-Aguayo i sur., 2009b).

S druge strane, aktivnost enzima lipoksigenaze i beta-glukozidaze smatra se ključnom u formiranju i promjeni koncentracije pojedinih spojeva arome u soku od jagode (Aguilo-Aguayo i sur., 2009c). Za karakteristični „svježi“ miris jagode odgovorni su pojedini aldehidi i alkoholi čije je nastajanje katalizirano lipoksigenazom, dok je beta-glukozidaza odgovorna za otpuštanje estera i furanona iz njihove glukozidne forme u kojoj se nalaze unutar stanice. Ipak ukoliko koncentracija navedenih nositelja arome dosegne previsoke koncentracije uslijed djelovanja enzima, formiranje nepoželjne, intenzivne arome je neminovno (Aguilo-Aguayo i sur., 2009c).

Upravo su Aguilo -Aguayo i sur. (2009c) ispitivali promjenu aktivnosti navedenih enzima kao i promjenu arome tijekom skladištenja (56 dana, 4 °C) soka od jagode nakon primjene PEF tehnologije (35 kV cm⁻¹, 1700 μs, 100 Hz) u usporedbi s tradicionalnom pasterizacijom (90 °C, 60 s i 30 s). Rezidualna aktivnost lipoksigenaze nakon PEF tretmana (66,7 %) bila je značajno viša u odnosu na aktivnost (45,3 %) nakon pasterizacije (90 °C, 30 s) i 37,7 % nakon pasterizacije (90 °C, 60 s). Navedena aktivnost lipoksigenaze nakon PEF tretmana održana je do 21 dana skladištenja. Nakon toga aktivnost je pala ispod vrijednosti zabilježenih nakon pasterizacije od 30 s koje su se primjerice održale do kraja skladištenja. Dva tjedna nakon pasterizacije od (90 °C, 60 s), aktivnost lipoksigenaze je pala na svega 13,1 % i takva ostala do kraja skladištenja. Još uvijek su prisutne nedoumice oko toga treba li se postići kompletna inaktivacija lipoksigenaze obzirom na uključenost u proizvodnju specifičnih aromatskih spojeva pa se nameće mišljenje kako je upravo iz tih razloga poželjna minimalna aktivnost kod sokova koji će se skladištiti dulje vrijeme (Aguilo-Aguayo i sur., 2009c).

Kod beta-glukozidaze zabilježen je suprotan trend, pa je neposredno nakon tretiranja njena aktivnost porasla i to nakon PEF tretmana za 15,6 %, pasterizacije (90 °C, 30 s) 4,1 % i pasterizacije (90 °C, 60 s) 7.9 %. Navedeni fenomen objašnjava se mogućim formiranjem većeg broja aktivnih mjesta enzima ili povećanjem onih već postojećih. Ipak, PEF tretman zadržao je veću aktivnost beta-glukozidaze nakon 21 dana skladištenja u usporedbi s pasterizacijom (Aguilo-Aguayo i sur., 2009c).

2.2.2. Utjecaj tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na stabilnost bioaktivnih spojeva soka od jagode

Prema rezultatima Odriozola-Serrano i sur. (2008a) primjena PEF tehnologije (35 kV cm^{-1} , $1700 \text{ }\mu\text{s}$, 100 Hz) dovela je do porasta koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline u soku od jagode sa $0,0039 \text{ mg mL}^{-1}$ na $0,0043 \text{ mg mL}^{-1}$ što je porast od 10 %. Sličan trend pratila je i koncentracija elaginske kiseline čiji rast (za prosječno 26-36 %) ipak nije zabilježen neposredno nakon primjene PEF tretmana već unutar prvih tjedana skladištenja soka ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) nakon čega je uslijedio pad do kraja skladištenja (56 dana, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Ipak, izmjerene konačne koncentracije elaginske kiseline nakon skladištenja i dalje su bile prosječno za 10 % veće u netretiranom uzorku soka u usporedbi s PEF-tretiranim sokovima (Odriozola-Serrano i sur., 2008a). Iako se sadržaj *p*-kumarinske kiseline smanjio tijekom skladištenja u istom radu, autori zaključno navode kako je sadržaj spomenutih fenolnih kiselina bolje zadržan tijekom skladištenja (56 dana, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) nakon primjene PEF tehnologije u odnosu na klasičnu pasterizaciju ($90 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 s ili 30s). Udio ukupnih antocijana ipak je statistički značajno smanjen nakon PEF tretmana u odnosu na svježi sok od jagode ($0,00381 \text{ mg mL}^{-1}$ vs. $0,00395 \text{ mg mL}^{-1}$). Gledajući pojedinačne antocijane, koncentracija cijanidin-3-glukozida značajno je porasla tijekom prva tri tjedna skladištenja soka što se povezuje s mogućom pojačanom aktivnošću β -glukozidaze (Aguilo-Aguayo i sur., 2009c; Odriozola-Serrano i sur., 2008), za razliku od pelargonidin-3-glukozida i pelargonidin-3-rutinozida, čija je koncentracija imala konstantan padajući trend tijekom skladištenja (Odriozola-Serrano i sur., 2008).

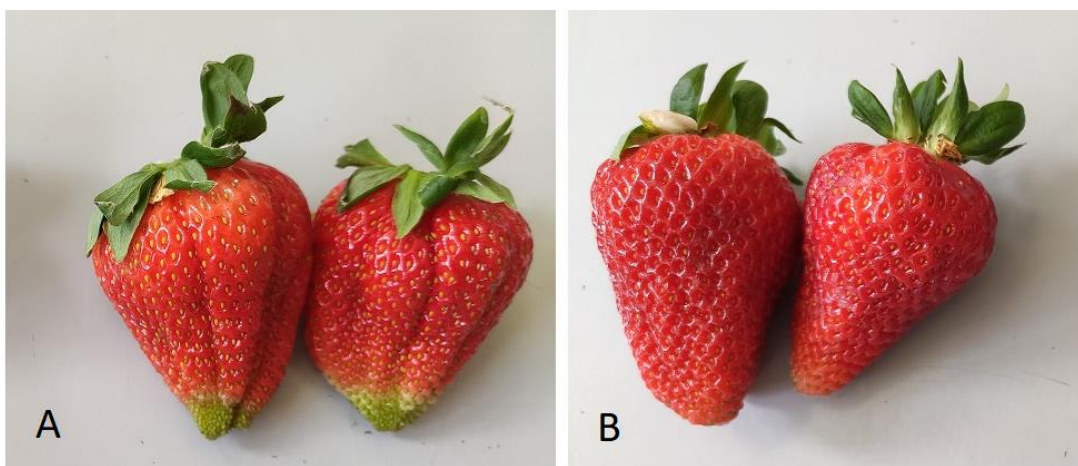
Isti autori u jednom od sljedećih radova prikazuju 83-102 % uspješnost zadržavanja koncentracije ukupnih antocijana nakon PEF obrade soka od jagode ovisno o primijenjenim uvjetima (35 kV cm^{-1} , $1000 \text{ }\mu\text{s}$, 50-250 Hz, monopolarni ili bipolarni impulsi) (Odriozola-Serrano i sur., 2009a).

Generalno, primjena PEF tretmana nije dovela do većih promjena u fenolnom sastavu ostalih sokova poput naranče, jabuke, borovnice, rajčice, mrkve ili mliječno-voćnih pića (Elez-Martinez i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

U ovom diplomskom radu za izradu eksperimentalnog dijela, odnosno za pripremu soka od jagode korištene su jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.) sorte Albion nabavljene putem tvrtke Jagodar-HB d.o.o. (Donja Lomnica, Zagrebačka Županija) ubrane u dva stadija zrelosti: 75 % dozreli plodovi (Zrelost 1, Z1) te 100 % dozreli plodovi (Zrelost 2, Z2) (slika 1). Topljiva suha tvar (% Brix) za Z1 jagode iznosila je 9,0 %, dok je za Z2 jagode izmjerena vrijednost 9,7 %. Izmjerene pH vrijednosti za Z1 i Z2 jagode iznosile su 3,28 i 3,43. Po dopremanju jagoda u Laboratorij, plodovima su odstranjenje peteljke, te su oprane, posušene staničevinom te pohranjene u plastične vrećice i skladištene pri -18 °C.



Slika 1. Plodovi jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.) sorte Albion u dva stadija zrelosti: 75 % dozreli plodovi (A) i 100 % dozreli plodovi (B) (*vlastita fotografija*)

Neposredno prije tretmana pulsirajućim električnim poljem (PEF), jagode su odmrznute te je od njih pripremljen mutni sok.

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema soka od jagode

Za pripremu soka od jagode korišten je sokovnik na hladno prešanje Kuvings B6000 (VerVita d.o.o., Hrvatska) prema patentiranoj tehnologiji J.M.C.S. (Juicer Module Comprising System), snage 240 W, brzine okretaja 60 o/min i promjera filtera 0,2 mm. Princip rada sokovnika zasniva se na sporo rotirajućem mehanizmu koji omogućava lagan pritisak voća na sita od Ultema® (polieterimid), koji je siguran i ekološki prihvatljiv materijal, a čime se osigurava kontinuirano prešanje.

3.2.2. Obrada sokova od jagode pulsirajućim električnim poljem (PEF)

Uzorci mutnog soka od jagode (100 mL) tretirani su pulsirajućim električnim poljem (HVG60/1 PEF, Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) prema definiranom planu pokusa (tablica 2). Uređaj se sastoji od tri jedinice, magna control unit, visokonaponski izvor napajanja i visokonaponski generator impulsa. Magna control unit dio je uređaja koji generira upravljačke impulse za visokonaponski sistem i kontrolira ispravnost uređaja. Visokonaponski izvor napajanja dio je uređaja zadužen za pretvorbu ulaznog izmjeničnog napona napajanja 230 V u istosmjerni napon u rasponu od 1 do 60 kV. Visokonaponski generator impulsa dobiveni visoki napon popušta na izlaz u obliku impulsa zadanih parametara. Razmak između elektroda iznosio je 2 cm, dok je trajanje pulsa iznosilo 0,5 μ s. Tijekom PEF tretmana temperatura je mjerena infracrvenim termometrom (InfraRed Thermometer, PCE-777, PCE Instruments, UK) i nije prelazila 26,4 °C.

Tablica 2. Plan pokusa tretiranja sokova od jagode

Šifra uzorka	Sok od jagode	Skladištenje (dani)	Tretman	Jakost električnog polja (kV)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme tretiranja (min)
1	Z1	0	KONTROLA	0	0	0
2	Z1	0	PEF	40	100	3
3	Z1	0	PEF	40	200	3
4	Z1	0	PEF	40	100	6
5	Z1	0	PEF	40	200	6
6	Z1	0	PEF	50	100	3
7	Z1	0	PEF	50	200	3
8	Z1	0	PEF	50	100	6
9	Z1	0	PEF	50	200	6
10	Z2	0	KONTROLA	0	0	0
11	Z2	0	PEF	40	100	3
12	Z2	0	PEF	40	200	3
13	Z2	0	PEF	40	100	6
14	Z2	0	PEF	40	200	6
15	Z2	0	PEF	50	100	3
16	Z2	0	PEF	50	200	3
17	Z2	0	PEF	50	100	6
18	Z2	0	PEF	50	200	6
19	Z1-7	7	KONTROLA	0	0	0
20	Z1-7	7	PEF	40	100	3
21	Z1-7	7	PEF	40	200	3
22	Z1-7	7	PEF	40	100	6
23	Z1-7	7	PEF	40	200	6
24	Z1-7	7	PEF	50	100	3
25	Z1-7	7	PEF	50	200	3
26	Z1-7	7	PEF	50	100	6
27	Z1-7	7	PEF	50	200	6
28	Z2-7	7	KONTROLA	0	0	0
29	Z2-7	7	PEF	40	100	3
30	Z2-7	7	PEF	40	200	3
31	Z2-7	7	PEF	40	100	6
32	Z2-7	7	PEF	40	200	6
33	Z2-7	7	PEF	50	100	3
34	Z2-7	7	PEF	50	200	3
35	Z2-7	7	PEF	50	100	6
36	Z2-7	7	PEF	50	200	6

Z1 – sok od jagoda zrelosti 75 %; Z2 – sok od jagoda zrelosti 100 %; Z1-7 – sok od jagoda zrelosti 75 % skladišten 7 dana; Z2-7 – sok od jagoda zrelosti 75 % skladišten 7 dana; KONTROLA – netretirani uzorak soka; PEF – sok tretiran pulsirajućim električnim poljem

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti u sokovima od jagode

Određivanje se temelji na direktnom očitavanju pH vrijednosti na digitalnom pH-metru (AOAC, 2000).

Aparatura i pribor

- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland)
- staničevina
- pufer otopine pH 4,01 i pH 7,0

Postupak mjerenja

Prije svakog seta mjerenja pH metar je baždaren puferkim otopinama (pH 4,01 i pH 7,0) pri sobnoj temperaturi. Elektroda se prije početka mjerenja, te između svakog mjerenja, ispiru destiliranom vodom i posuši staničevinom. Mjerenje pH vrijednosti provodi se uranjanjem elektrode u čašicu sa sokom od jagode te direktnim očitavanjem pH vrijednosti na ekranu uređaja. Mjerenja u svim uzorcima provedena su u paralelnim određivanjima.

3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari (% Brix) u sokovima od jagode

Određivanje se temelji na direktnom očitavanju topljive suhe tvari na digitalnom refraktometru (AOAC, 2000).

Aparatura i pribor

- digitalni refraktometar (ATAGO PAL-3, Atago Co., LTD, Tokyo, Japan)
- staklene čašice volumena 50 mL
- staničevina
- Mikropipeta Eppendorf 1000 μ L

Postupak mjerenja

Prije početka svakog mjerenja refraktometar je potrebno baždariti prema destiliranoj vodi na nultu vrijednost pri 20 °C. Mikropipetom se otpipetira 0,3 mL uzorka koji se izravno

nanese na staklenu prizmu uređaja te se pritiskom na tipku „start“ izravno očita vrijednost topljive suhe tvari. Mjerenja u svim uzorcima provedena su u paralelnim određivanjima.

3.2.5. Postupak ekstrakcije ukupnih fenola u sokovima od jagode

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Centrifuga (Thermo Scientific™, Megafuge™ 16R, Kalkberg, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL

Otapala:

- Mravlja kiselina 98 % p. a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Metanol za HPLC $\leq 99,9$ % (Honeywell, Riedel-de-Haën™, Francuska)
- 1%-tna mravlja kiselina u 80%-tnom metanolu (v/v)

Priprema: 80 %-tni metanol se pripremi tako da se 800 mL metanola prenese se u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake. U drugu odmjernu tikvicu od 1 L otpipetira se 10 mL mravlje kiseline i nadopuni do oznake prethodno pripremljenim 80 %-tnim metanolom.

Postupak ekstrakcije: Ekstrakcija se provodi prema modificiranoj metodi iz literature (Bursać Kovačević i sur., 2016a). Otpipetira se 5 mL uzorka soka od jagode u plastičnu falkonicu od 50 mL te se nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (1% mravlja kiselina u 80%-tnom metanolu, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri $T=50$ °C C i $t=15$ min. Po provedenoj ekstrakciji, uzorci se centrifugiraju pri 10 000 rpm/10 min, a potom se supernatanti profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake.

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih fenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom modifikacije 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:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200 μ L i 1000 μ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL, 1000 mL
- Staklena čaša volumena 200 mL
- Staklena menzura od 100 mL i 1 L
- Stakleni lijevak, filter papir

Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: Odvažuje se 75 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čaši te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5-102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Kina)

- Otopina standarda galne kiseline 5 g L^{-1}

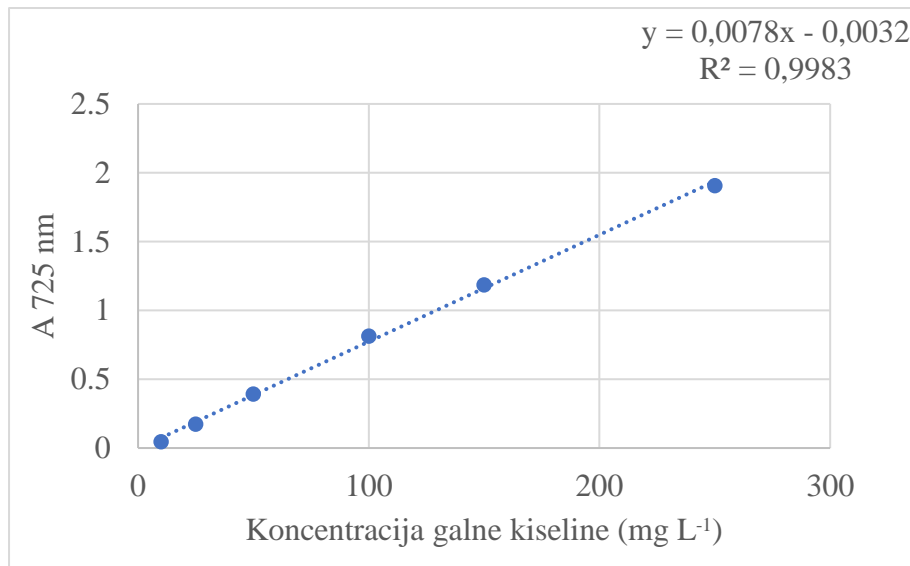
Priprema: Odvažuje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja: U epruvetu se otpipetira redom 400 μL ekstrakta, koji je razrijeđen 2x (200 μL ekstrakta + 200 μL ekstrakcijskog otapala), 400 μL F.C. reagensa (koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm. Određivanje se provodi u paraleli, a kao slijepa proba koristi se ekstrakcijsko otapalo.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca odvažuje se 500 mg galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline (5 g L^{-1}) rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira redom 50, 125, 250, 500, 750 i 1250 μL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se ista 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 (w/v). Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 3).



Slika 3. Baždarni pravac za standard galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0078x - 0,0032$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

3.2.7. Obrada podataka

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 21). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su zrelost jagode, vrijeme skladištenja, te PEF procesni parametri (jakost električnog polja, frekvencija i vrijeme tretiranja). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija, dok su rezultati multivarijantne analize prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja \pm standardna greška prosjeka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju sokovi od jagode sorte 'Albion' iz dva tipa zrelosti (75 % vs. 100 %) su tretirani PEF tehnologijom te su uspoređeni obzirom na tip zrelosti jagode i PEF procesne parametre tijekom skladištenja od 7 dana pri 4 °C. U svim uzorcima određena je topljiva suha tvar (%) i pH vrijednost te je provedeno spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, a svi dobiveni rezultati obrađeni u MS Excel programu prikazani su grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija (slike 2 do 5). Svi rezultati obrađeni su također i multivarijantnom analizom te su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja \pm standardna greška (tablice 3 do 5).

4.1. Utjecaj zrelosti jagoda i režima skladištenja na topljivu suhu tvar, pH vrijednost i masene udjele ukupnih fenola u sokovima od jagode

Rezultati multivarijantne analize o utjecaju zrelosti jagode i skladištenja na topljivu suhu tvar (%), pH i masene udjele ukupnih fenolnih spojeva u sokovima od jagode koji nisu tretirani PEF tehnologijom (kontrolni uzorci) prikazani su u tablici 3. Prema dobivenim rezultatima udio topljive suhe tvari (% Brix) kontrolnih uzoraka soka dobivenog iz jagode 75 % zrelosti (Z1) iznosi $6,15 \pm 0,03$ % i značajno se razlikuje od vrijednosti kontrolnih uzoraka soka od jagode 100 % zrelosti (Z2) koje iznose $8,03 \pm 0,03$ %. Potonji rezultati (Z2) iako usporedivi, nešto su viši od onih Yildiza i sur. (2021) koji pokazuju inicijalnu vrijednost od $7,85 \pm 0,07$ % Brix u soku od jagode komercijalne zrelosti. Odriozola-Serrano i sur. (2008), iako ne navode stupanj zrelosti jagoda korištenih u proizvodnji soka, navode vrijednosti od $7,8 \pm 0,1$ % koji su u suglasju s onima Yildiza i sur. (2021), no i dalje nešto manje od dobivenih rezultata u ovom istraživanju. Dotični radovi evidentiraju i pH vrijednosti netretiranih sokova od jagode koji iznose $3,45 \pm 0,22$ (Odriozola-Serrano i sur., 2008) i $3,5 \pm 0,0$ (Yildiz i sur., 2021), a kao takvi bliski su rezultatima dobivenih u ovom istraživanju koji za Z2 sok iznose $3,53 \pm 0,01$ % Brix. Sokovi od jagode Z1 imali su značajno nižu pH vrijednost u usporedbi sa Z2 sokovima. Tranziciju od tehnološke do konzumne zrelosti jasno prati porast topljive suhe tvari kao i pH vrijednosti. Kako je topljiva suha tvar u prvom redu određena udjelom šećera i organskih kiselina, njen porast se jednostavno može objasniti porastom udjela ukupnih šećera u plodu uz istovremeno smanjenje udjela organskih kiselina odnosno rastom pH vrijednosti (Sturm i sur., 2003).

Za razliku od stupnja zrelosti koji doprinosi pozitivnom trendu gore navedenih fizikalno-kemijskih parametara, utjecaj skladištenja na iste evidentno je popraćen negativnim trendom. Ipak, dok rezultati ovog istraživanja ukazuju na statistički značajno smanjenje topljive suhe tvari i pH tijekom sedmodnevnog skladištenja (tablica 3), isto nije slučaj kod Yildiza i sur. (2021). Vrijednosti od $7,80 \pm 0,00$ % Brix te pH od $3,46 \pm 0,04$ izmjerene na sedmi dan skladištenja dotičnog rada nisu statistički značajno manje u odnosu na prije navedene inicijalne vrijednosti ($7,85 \pm 0,07$ % Brix te pH $3,5 \pm 0,0$) (Yildiz i sur., 2021). Elez-Martinez i sur. (2006) primijetili su sličan trend proučavajući iste parametre u soku od naranče, a kao potencijalno objašnjenje nameće se razmnožavanje mikroorganizama tijekom skladištenja čija konzumacija šećera prisutnih u soku posljedično smanjuje udio topljive suhe tvari, a istovremeno povećava udio kiselosti tj. smanjuje pH soka što je posljedica nusproizvoda bakterijskog metabolizma.

Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u kontrolnim uzorcima nakon sedam dana skladištenja ($96,02 \pm 1,7$ mg GAE/100 mL soka) predstavlja porast od preko 33 % u odnosu na inicijalno izmjerene vrijednosti ($63,55 \pm 1,77$ mg GAE/100 mL soka). Stabilnost fenolnih spojeva u pravilu negativno korelira s vremenom skladištenja, pa je primijećeni porast neuobičajen, no ne i izniman. Primjerice, Teleszko i sur. (2016) porast koncentracije elaginske kiseline tijekom skladištenja argumentiraju hidrolizom elagitanina što se u konačnici može odraziti na porast koncentracije ukupnih fenola. Također, Yildiz i sur. (2021) navode mogućnost reakcije oksidiranih fenola i generiranja novih reducirajućih spojeva koji reakcijom s Folin–Ciocalteu reagensom daju „lažno“ povišene vrijednosti ukupnih fenola. Uspoređujući rezultate ukupnih fenola u ovisnosti o zrelosti jagode primjećuje se razlika od 15% u korist Z1 što potvrđuje literaturne zapise o većoj zastupljenosti polifenola u nepotpuno zrelim plodovima (Giampieri i sur., 2012; Pineli i sur., 2011).

Tablica 3. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju zrelosti jagode i skladištenja na topljivu suhu tvar (%), pH i masene udjele ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE 100 mL⁻¹ soka) u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	Topljiva suha tvar	pH	UF
<i>Zrelost jagode</i>		$p \leq 0,05^\dagger$	$p \leq 0,05^\dagger$	$p \leq 0,05^\dagger$
75%	4	$6,15 \pm 0,03^b$	$3,38 \pm 0,01^b$	$85,18 \pm 1,77^a$
100%	4	$8,03 \pm 0,03^a$	$3,53 \pm 0,01^a$	$74,38 \pm 1,77^b$
<i>Skladištenje</i>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,02^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
0 dana	4	$7,20 \pm 0,03^a$	$3,48 \pm 0,01^a$	$63,55 \pm 1,77^b$
7 dana	4	$6,98 \pm 0,03^b$	$3,43 \pm 0,01^b$	$96,02 \pm 1,77^a$
Prosječna vrijednost	8	$7,09 \pm 0,02$	$3,41 \pm 0,01$	$79,78 \pm 1,5$

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$

U--ukupni fenoli

4.2. Utjecaj zrelosti jagoda, režima skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na topljivu suhu tvar i pH vrijednost sokova od jagode

Na slici 2 su prikazane srednje vrijednosti \pm standardne devijacije za rezultate topljive suhe tvari (TSS) i pH sokova od jagode tretiranih PEF tehnologijom u nultom danu skladištenja. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je prosječna topljiva suha tvar netretiranih sokova bila neznatno niža u usporedbi s PEF tretiranim uzorcima. Odriozola-Serrano i sur. (2008) su u netretiranim sokovima od jagode odredili $7,2 \pm 0,2$ % Brix, što je niža vrijednost od rezultata topljive suhe tvari dobivene za sokove nižeg stupnja zrelosti Z1 i višeg stupnja zrelosti Z2. Mosqueda-Melgar i sur. (2012) su također u svom radu potvrdili da se topljiva suha tvar sokova od jagode ($7,0 \pm 0,01$ % Brix) nije značajno mijenjala nakon tretmana PEF tehnologijom. Ipak, neznatni porast topljive suhe tvari utvrđen je za toplinski obrađene sokove od jagode ($7,4 \pm 0,2$ % Brix). Nadalje, slično kao što su i plodovi jagode zrelosti Z2 imali veće udjele topljive suhe tvari u odnosu na plodove jagoda nižeg stupnja zrelosti Z1, isti trend je očekivano zadržan i u sokovima od jagode tretiranim PEF tehnologijom.

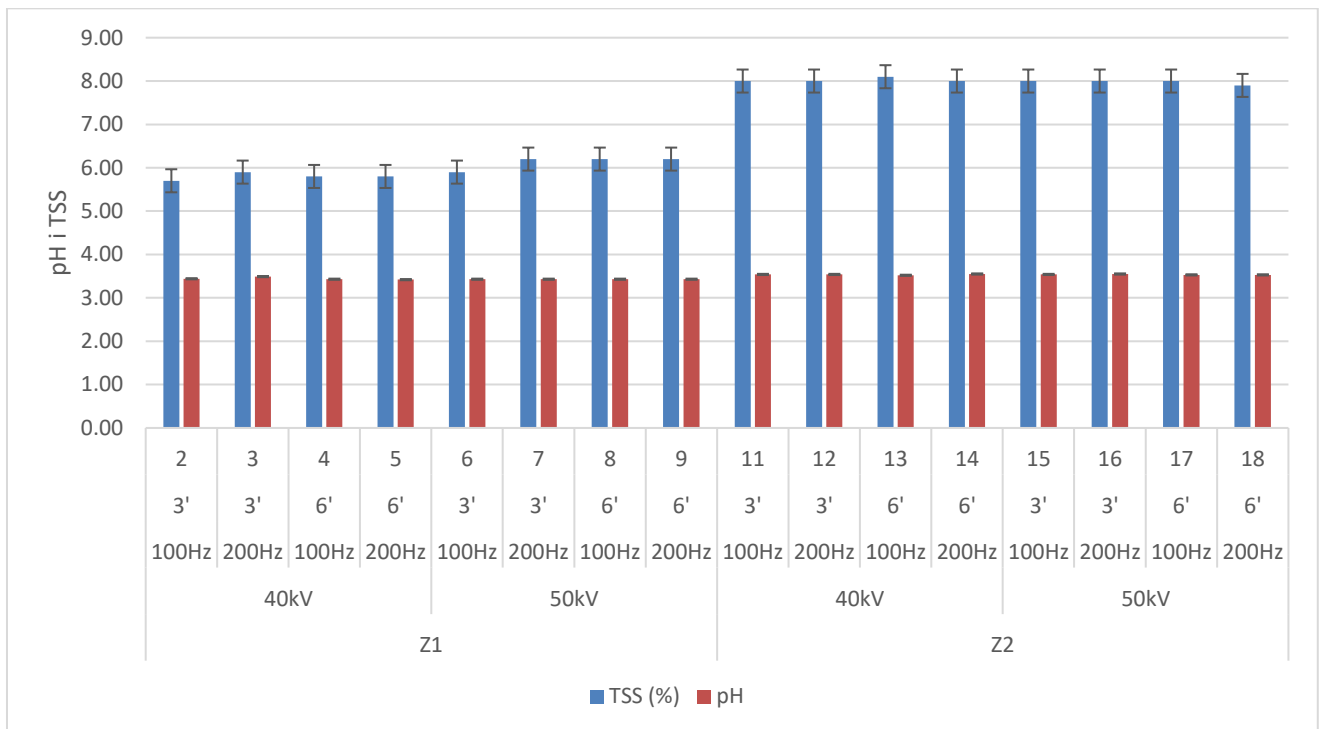
Yildiz i sur. (2020) su u netretiranim sokovima od jagode izmjerili pH vrijednost $3,50 \pm 0,01$ dok je pH vrijednost u PEF tretiranim sokovima iznosila od 3,45 do 3,48. Lagani porast pH vrijednosti u sokovima od jagode višeg stupnja zrelosti u odnosu na one sa nižim stupnjem zrelosti, potvrđen je i statističkom obradom rezultata (tablica 4). Dotični trend porasta pH vrijednosti i topljive suhe tvari koji proporcionalno korelira sa stupnjem zrelosti ploda, istovjetan je onom kod kontrolnih uzoraka. Ipak, valja naglasiti da su apsolutne vrijednosti tretiranih uzoraka niže od kontrolnih.

Primjerice, udio suhe tvari kontrolnih uzoraka Z1 uzoraka u prosjeku je čak 5,7 % veći od PEF tretiranih uzoraka Z1 soka. Iako literaturni navodi (Yildiz i sur., 2021) sugeriraju suprotno tj. ne postojanje značajnog utjecaja PEF tretmana na smanjenje udjela topljive suhe tvari u soku od jagode, nužno je istaknuti oprez prilikom takve interpretacije rezultata. Jedna od prepreka koja stoji na putu usporedbi svježeg sa tretiranim sokom jest izostanak homogene distribucije uzoraka u planu pokusa. U tom kontekstu, validnost usporedbe jednog kontrolnog uzorka (broja) sa većim brojem tretiranih, svakako može biti potencijalno pristrana.

Na slici 3, koja prikazuje srednje vrijednosti topljive suhe tvari i pH tretiranih sokova od jagode tretiranih PEF tehnologijom u sedmom danu skladištenja, također je razvidno da su veće vrijednosti topljive suhe tvari određene u sokovima od jagode Z2 u usporedbi sa sokovima jagode zrelosti Z1. U istom su odnosu i pH vrijednosti tj. veće vrijednosti primjetne su u Z2

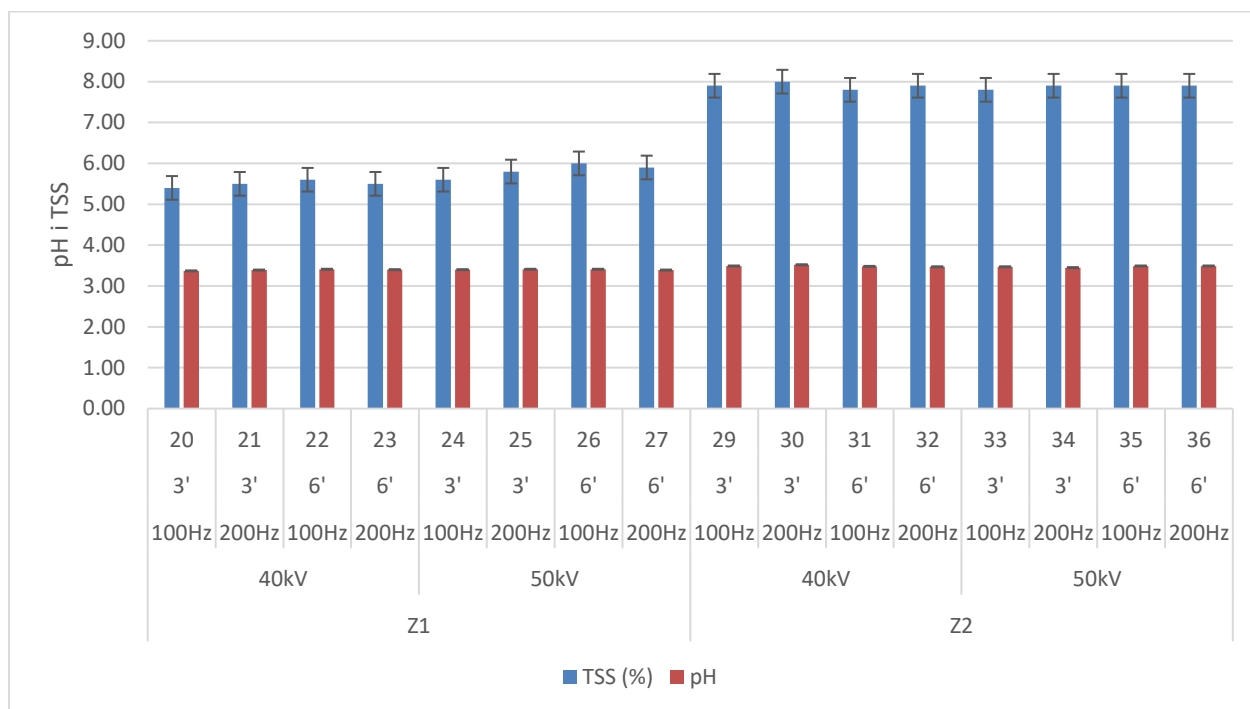
tretiranim uzorcima u odnosu na Z1 tretirane uzorke, na što jasno upućuje i statistička analiza detaljno raščlanjena u tablici 4.

Konkretan grafički prikaz ipak nije reprezentativan za argumentiranje utjecaja vremena, frekvencije i jakosti električnog polja na do sada diskutirane fizikalno-kemijske parametre soka. Ipak, promatrajući rezultate za oba termina skladištenja, primjetan je porast topljive suhe tvari prilikom primjene električnog polja jakosti 50 kV u odnosu na 40 kV. Ta razlika pokazala se i statistički značajnom, a rezultati se mogu očitati iz tablice 4.



Uzorci od 2 do 18 = prema planu pokusa u tablici 2; 3' i 6' = vrijeme tretiranja (min); 100 i 200 Hz = frekvencija; 40 i 50 kV = jakost električnog polja; Z1 = sok od jagode zrelosti 75 %; Z2 = sok od jagode zrelosti 100 %; TSS = topljiva suha tvar (%)

Slika 2. Rezultati mjerenja topljive suhe tvari (TSS) i pH sokova od jagode tretiranih PEF tehnologijom u nultom danu skladištenja



Uzorki od 20 do 36 = prema planu pokusa u tablici 2; 3' i 6' = vrijeme tretiranja (min); 100 i 200 Hz = frekvencija; 40 i 50 kV = jakost električnog polja; Z1 = sok od jagode zrelosti 75 %; Z2 = sok od jagode zrelosti 100 %; TSS = topljiva suha tvar (%)

Slika 3. Rezultati mjerenja topljive suhe tvari (TSS) i pH sokova od jagode tretiranih PEF tehnologijom u sedmom skladištenja

Razmotre li se fizikalno-kemijski parametri u PEF-tretiranim sokovima razvidno je da, kao i u netretiranim sokovima od jagode, topljiva suha tvar i pH vrijednost značajno viša u sokovima Z2 u odnosu na sokove Z1 (tablica 4). Tijekom skladištenja došlo je do značajnog smanjenja topljive suhe tvari, dok se pH vrijednost sokova nije značajno mijenjala.

Tablica 4. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju zrelosti jagode i skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na topljivu suhu tvar (%) i pH vrijednost sokova od jagode

Izvori varijacija	n	Topljiva suha tvar (%)	pH
<i>Zrelost jagode</i>		$p \leq 0,05^\dagger$	$p \leq 0,05^\dagger$
75%	32	$5,82 \pm 0,01^b$	$3,44 \pm 0,01^b$
100%	32	$7,92 \pm 0,01^a$	$3,51 \pm 0,01^a$
<i>Skladištenje</i>		$p \leq 0,05^\dagger$	$p = 0,22^\ddagger$
0 dana	32	$6,97 \pm 0,01^a$	$3,48 \pm 0,01^a$
7 dana	32	$6,78 \pm 0,01^b$	$3,46 \pm 0,01^a$
<i>Jakost električnog polja</i>		$p \leq 0,05^\dagger$	$p = 0,41^\ddagger$
40 kV	32	$6,82 \pm 0,01^b$	$3,46 \pm 0,01^a$
50 kV	32	$6,92 \pm 0,01^a$	$3,48 \pm 0,01^a$
<i>Frekvencija</i>		$p = 0,39^\ddagger$	$p = 0,23^\ddagger$
100 Hz	32	$6,86 \pm 0,01^a$	$3,46 \pm 0,01^a$
200 Hz	32	$6,89 \pm 0,01^a$	$3,48 \pm 0,01^a$
<i>Vrijeme tretiranja</i>		$p = 0,31^\ddagger$	$p = 0,21^\ddagger$
3 min	32	$6,85 \pm 0,01^a$	$3,48 \pm 0,01^a$
6 min	32	$6,89 \pm 0,01^a$	$3,46 \pm 0,01^a$
Prosječna vrijednost	64	$6,87 \pm 0,01$	$3,47 \pm 0,01$

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$

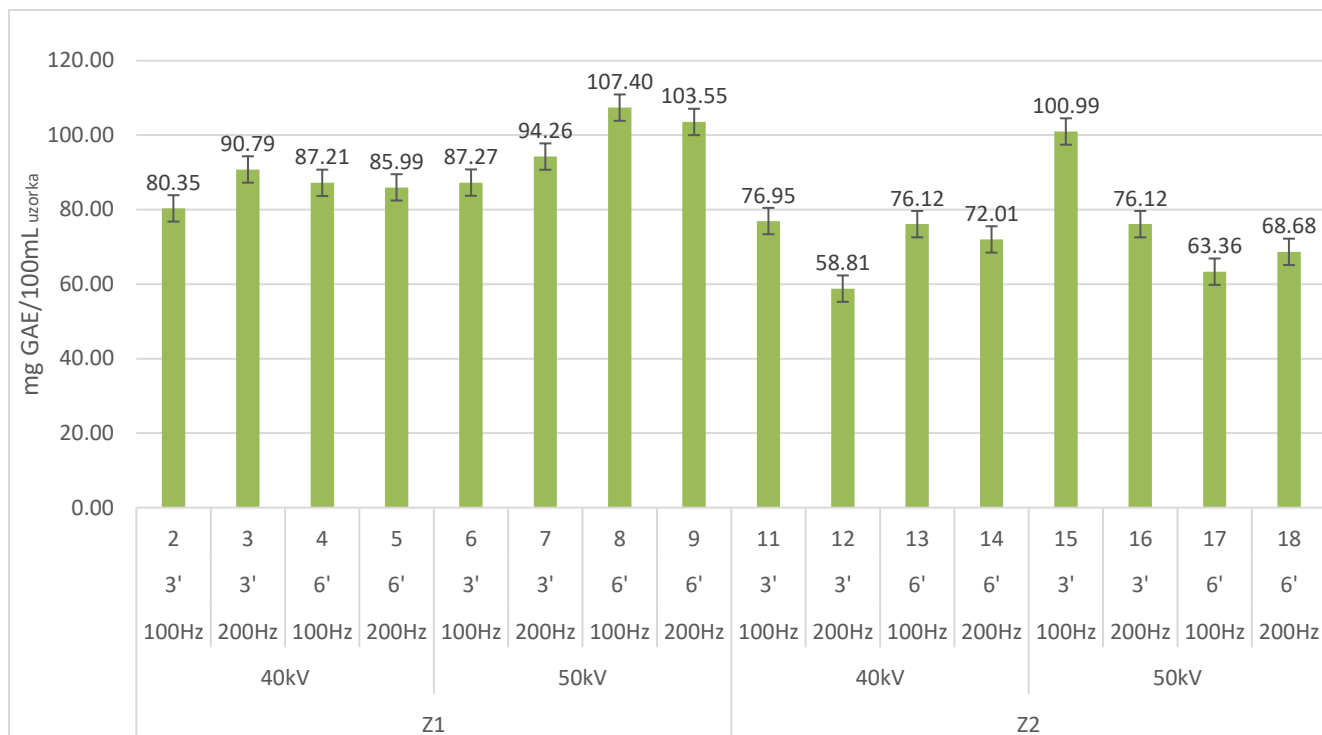
Saddoza i sur. (2012) su u sokovima jagoda utvrdili promjene u pH vrijednosti tijekom skladištenja. Naime, početna pH vrijednost od 3,2 je tijekom sedmodnevnog skladištenja pri sobnoj temperaturi porasla do vrijednosti pH 3,6, a nakon 2 tjedna ova vrijednost je iznosila 4,0. Porast pH vrijednosti tijekom skladištenja u sokovima od jagode autori pojašnjavaju mogućim porastom udjela alkohola kao posljedice kvarenja (Saddoza i sur., 2012).

Frekvencija, kao ni vrijeme tretiranja, nisu pokazali statistički značajne utjecaje na topljivu suhu tvar i pH sokova, no jakost električnog polja pokazala se statistički značajnom na udio topljive suhe tvari. Povećanje jakosti električnog polja, u ovom slučaju za 10 kV, može doprinijeti izraženijoj elektroporaciji staničnih membrana, a time i većoj ekstraktibilnosti pojedinih staničnih komponenti čime se može objasniti značajan porast udjela topljive suhe

tvori nakon PEF tretmana (Salehi, 2016). Ipak, iako heterogeni, literaturni navodi ne idu u prilog našim rezultatima obzirom da isti sugeriraju tek minimalan utjecaj različitih parametara PEF tretiranja na dotična fizikalno-kemijska obilježja soka od jagode (Yildiz i sur., 2021; Gabrić i sur., 2018; Salehi 2016).

4.3. Utjecaj zrelosti jagoda, režima skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na masene udjele ukupnih fenola u sokovima od jagode

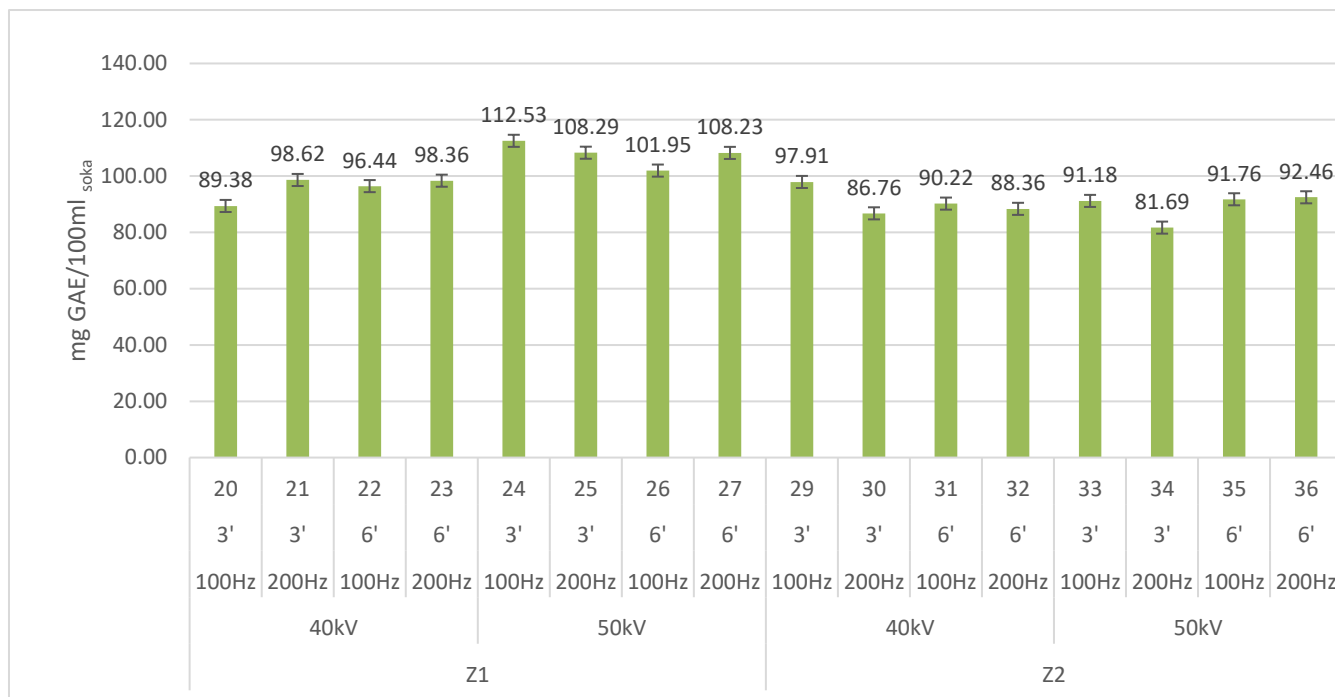
Slika 4 prikazuje masene udjele ukupnih fenola u uzorcima sokova od jagode zrelosti Z1 i Z2 u nultom danu skladištenja. Raspon masenih udjela u ispitivanim sokovima od jagode obiju zrelosti iznosio je od 58,81 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka} do 107,40 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}. Najveće vrijednosti izmjerene su u uzorcima 8 i 9 te su iznosile 107,4 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka} odnosno 103,55 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}, dok su najniže vrijednosti izmjerene za uzorke 12 (58,81 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}) i 17 (63,36 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}). Dobiveni rezultati su viši od rezultata za sokove od jagode proizvedene od sorte 'Camarosa' tretirane PEF tehnologijom (100 Hz, 35 kV cm⁻¹) u kojim je prosječni maseni udio ukupnih fenola iznosio 47,3 mg 100 mL⁻¹_{soka} (Odriozola-Serrano i sur., 2008). Općenito su u literaturi pronađene niže vrijednosti za udjele ukupnih fenola u jagodama različitih sorti kao što su 'Aromas', 'Camarosa', 'Diamante', 'Medina', i 'Ventana' (od 21,5 do 53 mg 100 mL⁻¹_{soka}) (Hernaz i sur., 2007), stoga je odabir sortimenta jagode u proizvodnji soka od jagode iznimno važan čimbenik. Razlike u sadržaju ukupnih fenola u sokovima mogu se osim sortnim razlikama pripisati i razlikama u tehnikama uzgoja (Häkkinen i Törrönen, 2000.), uvjetima obrade te skladištenja (Spanos i Wrolstad, 1992). Yildiz i sur. (2020) su odredili više vrijednosti ukupnih fenola za netretirane sokove od jagoda (137,8 ± 0,9 mg 100 mL⁻¹_{soka}) u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, no nije poznata sorta jagode od koje su sokovi proizvedeni.



Uzorci od 2 do 18 = prema planu pokusa u tablici 2; 3' i 6' = vrijeme tretiranja (min); 100 i 200 Hz = frekvencija; 40 i 50 kV = jakost električnog polja; Z1 = sok od jagode zrelosti 75 %; Z2 = sok od jagode zrelosti 100 %; TSS = topljiva suha tvar (%)

Slika 4. Maseni udjeli ukupnih fenola tretiranih PEF tehnologijom uzoraka u nultom danu skladištenja (mg GAE 100 mL⁻¹_{soka})

Rezultati masenih udjela ukupnih fenola izmjereni nakon sedam dana skladištenja (slika 5) već na prvi pogled indiciraju porast u odnosu na nulti dan i to za oba tipa uzoraka, Z1 i Z2. Najveće vrijednosti izmjerene su u uzorcima 24 (112,50 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}) i 25 (108,29 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}), a najniže vrijednosti određene su uzorcima sokova 34 (81,69 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}) i 30 (86,76 mg GAE 100 mL⁻¹_{soka}). Ovdje se može primijetiti da je u uzorcima sokova od jagode Z2 tretiranih PEF tehnologijom nakon 7 dana skladištenja došlo do značajnijeg porasta udjela ukupnih fenola u usporedbi sa sokovima od jagode zrelosti Z1.



Uzorci od 20 do 36 = prema planu pokusa u tablici 2; 3' i 6' = vrijeme tretiranja (min); 100 i 200 Hz = frekvencija; 40 i 50 kV = jakost električnog polja; Z1 = sok od jagode zrelosti 75 %; Z2 = sok od jagode zrelosti 100 %; TSS = topljiva suha tvar (%)

Slika 5. Maseni udjeli ukupnih fenola tretiranih PEF tehnologijom uzoraka u sedmom danu skladištenja (mg GAE 100 mL⁻¹_{soka})

Kako bi se utvrdio statistički značajan utjecaj svih izvora varijacija eksperimenta na sadržaj ukupnih fenola potrebno je provesti multifaktorsku analizu varijance čiji rezultati o utjecaju zrelosti jagode i skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva u sokovima od jagode su prikazani u tablici 5.

Promotri li se utjecaj zrelosti, kao i u usporedbi svježih plodova jagode, vidljivo je da su i PEF tretirani sokovi od jagoda zrelosti 75 % rezultirali većim udjelom ukupnih fenola od sokova od jagode 100 %-tne zrelosti. Mazur i sur. (2014) su istraživali utjecaj zrelosti (skoro zrela = djelomično crvena, zrela = crvena, potpuno zrela = tamno crvena) i sortimenta ('Blink', 'Polka' i 'Senga Sengana') na boju i kemijski sastav jagoda te njihovu prihvatljivost za preradu u džem. Autori su zaključili da na udio ukupnih fenola nisu utjecali niti stupanj zrelosti, kao niti tip sortimenta jagode. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ipak su bliži zaključcima radova Tulipanija i sur. (2018) te Shina i sur. (2008) koji su utvrdili značajan pad koncentracije ukupnih fenola tijekom dozrijevanja plodova jagode, no mjerne točke zrelosti nisu bile iste kao u istraživanju Mazura i sur. (2014).

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva PEF tretiranih uzoraka u usporedbi s kontrolnim, neovisno o uvjetima tretiranja, u prosjeku za oko 10 % više. U tom pogledu, rezultati su u suglasju s literaturnim navodima koji ukazuju na povećanje udjela ukupnih fenolnih spojeva primjenom PEF tehnologije u voćnim sokovima (Gabrić i sur., 2018; Barba i sur., 2012). Navedeni fenomen se i u ovom slučaju objašnjava elektroporacijom i disrupcijom membrana staničnih struktura što potom dovodi do uspješnije ekstrakcije fenolnih spojeva (Gabrić i sur., 2018).

Porast udjela polifenolnih spojeva za 11 % u sokovima od grejpa tretiranim PEF tehnologijom (80 mL min^{-1} , 1 kHz, 20 kVcm^{-1} , $600 \mu\text{s}$) u odnosu na kontrolni netretirani sok utvrdio je u svom istraživanju Aadil i sur. (2007). Interesantno je da su autori ostvarili još bolji učinak i povećanje udjela polifenolnih spojeva u soku od grejpa za 15 % kad su PEF tehnologiju povezali sa tehnologijom ultrazvuka (600 W, 28 KHz, 30 min) te sok obradili tzv. tehnologijom preprekama (engl. *Hurdle concept*). U novije se vrijeme sa svrhom produženja trajnosti i zadržavanja kvalitete soka upravo se ispituje kombinacija toplinskih i/ili netoplinskih tehnologija pri čemu se tehnologije primjenjuju određenim slijedom kako bi svaka pri neinvazivnim („blažim“) uvjetima obrade dala najbolje rezultate u smislu produženja roka valjanosti, senzorske i nutritivne kvalitete (Putnik i sur., 2020).

Ipak, u literaturi se pojavljuju i suprotni navodi u radu autora Ortega-Rivas (2007) koji su utvrdili značajno smanjenje udjela ukupnih fenola u sokovima od jagode i jabuke po provedenom PEF tretmanu u usporedbi s kontrolnim netretiranim sokovima. Autori ovaj trend pojašnjavaju činjenicom da uslijed PEF tretmana može doći do nepotpune inaktivacija enzima poput polifenoloksidaze. Aktivni ostaci ovog enzima mogu tijekom vremena katalizirati naknadnu oksidaciju fenolnih spojeva te time prouzročiti njihovu značajnu redukciju.

Promatrajući parametre procesiranja korištene u ovom istraživanju očito je kako ni vrijeme tretiranja, kao ni frekvencija, nemaju statistički značajan utjecaj na maseni udio fenolnih spojeva, no statistički značajna razlika postoji u ovisnosti o primijenjenoj jakosti električnog polja. U ovom slučaju, maseni udio polifenolnih spojeva približno je 10 % veći nakon primijenjenog napona od 50 kV u odnosu na 40 kV. Pregledom literature, najčešće korišten napon iznosio je 35 kV, dok je varirani parametar bila frekvencija koja je iznosila od 50 Hz do 250 Hz, stoga se u literaturi teško iznalazi usporedba PEF tretiranja u ovisnosti o jakosti električnog polja (Odrizola-Serrano i sur., 2009a; Odrizola-Serrano i sur., 2008).

Tablica 5. Rezultati multifaktorske analize varijance o utjecaju zrelosti jagode i skladištenja te procesnih parametara tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva ($\text{mg GAE } 100 \text{ mL}^{-1}_{\text{soka}}$) u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	Ukupni fenoli
<i>Zrelost jagode</i>		$p \leq 0,05^\dagger$
75%	32	$96,91 \pm 0,70^a$
100%	32	$82,08 \pm 0,70^b$
<i>Skladištenje</i>		$p \leq 0,01^\dagger$
0 dana	32	$83,16 \pm 0,70^b$
7 dana	32	$95,88 \pm 0,70^a$
<i>Jakost električnog polja</i>		$p \leq 0,05^\dagger$
40 kV	32	$85,89 \pm 0,70^b$
50 kV	32	$93,12 \pm 0,70^a$
<i>Frekvencija</i>		$p = 0,27^\ddagger$
100 Hz	32	$90,68 \pm 0,70^a$
200 Hz	32	$88,31 \pm 0,70^a$
<i>Vrijeme tretiranja</i>		$p = 0,99^\ddagger$
3 min	32	$89,49 \pm 0,70^a$
6 min	32	$89,51 \pm 0,70^a$
Prosječna vrijednost	64	$89,50 \pm 0,50$

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$

Ipak, polifenolni spojevi se uvelike razlikuju prema molekularnoj masi kao i kemijskoj strukturi što je posljedica složenog biosintetskog metabolizma koji uključuje hidroksilaciju, metoksilaciju i glikolizaciju (Day i Mumper, 2010). Stoga je utjecaj PEF tehnologije na molekularnu strukturu jedan od glavnih relevantnih čimbenika u pogledu njegovog utjecaja na fenolne spojeve. Obzirom voćni sokovi pretežno sadrže niskomolekularne polifenolne spojeve, utjecaj PEF tehnologije na njihovu stabilnost uglavnom je manje evidentan (Agcam i sur., 2014).

Statistički značajno veći udio polifenolnih spojeva nakon sedam dana skladištenja u skladu je s rezultatima istraživanja Yildiza i sur. (2021). U dotičnom radu korištena je jakost

električnog polja od 35 kV i frekvencija od 155 Hz, a maseni udjeli ukupnih fenola na nulti dan skladištenja iznosili su $145 \pm 1,5$ mg GAE $100 \text{ mL}^{-1}_{\text{soka}}$ što je u prosjeku 6 % manje u odnosu na $153,8 \pm 20,5$ mg GAE $100 \text{ mL}^{-1}_{\text{soka}}$ zabilježenih nakon sedam dana (Yildiz i sur., 2021). Autori i u ovom slučaju porast ukupnih fenola pripisuju mogućnosti formiranja novih spojeva nastalih degradacijom prisutnih kompleksnih polifenolnih struktura i njihovoj reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom.

Slično, Odriozola-Serrano i sur. (2008) su ispitali utjecaj PEF tretmana (širina pulsa 4 μs , 100 Hz, 35 kV cm^{-1} , vrijeme tretiranja 1700 μs) na kvalitetu sokova od jagode skladištenih 56 dana pri 4 °C. Autori su utvrdili u PEF tretiranim sokovima veće udjele antocijana, elaginske i *p*-kumarinske kiseline u odnosu na netretirane uzorke.

U konačnici, na temelju obrađenih rezultata u ovom istraživanju, može se sumirati kako u kontekstu povećanja masenog udjela ukupnih fenola u soku od jagode, prednost valja dati sirovini nižeg stupnja zrelosti (75 % zrelosti) zbog industrijske praktičnosti. Isto tako, ispitivani parametri PEF tretmana sugeriraju nadmoćnost većeg primijenjenog napona dok su se vrijeme tretiranja i frekvencija pokazali čimbenicima bez značajnijeg utjecaja. Pored spomenutih neposrednih tehnoloških faktora, sedmodnevno skladištenje uzoraka također se pokazalo statistički značajnim te je dovelo do povećanja masenih udjela fenolnih spojeva.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i rasprave ovoga istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Kontrolni uzorci soka od jagode zrelosti Z2 imali su značajno veći udio topljive suhe tvari, značajno veću pH vrijednost te značajno niži udio ukupnih fenola u odnosu na kontrolne uzorke soka od jagode zrelosti Z1. Sedmodnevno skladištenje kontrolnih uzoraka soka od jagode pri temperaturi 4 °C, dovelo je do značajnog smanjenja udjela topljive suhe tvari i pH vrijednosti te značajnog povišenja udjela ukupnih fenola.
2. Tretirani uzorci soka od jagode zrelosti Z1 imali su značajno niži udio topljive suhe tvari i pH vrijednost u odnosu na tretirane uzorke soka od jagode zrelosti Z2. Tretirani uzorci sokova obiju zrelosti skladišteni sedam dana pri temperaturi 4 °C imali su značajno niže udjele topljive suhe tvari dok se pH vrijednosti nisu značajno razlikovale u odnosu na nulti dan skladištenja.
3. Jakost električnog polja od 50 kV pokazala se jedinim statistički značajnim parametrom tehnologije pulsirajućeg električnog polja te je utjecala na značajno povećanje udjela ukupnih fenola u odnosu na jakost od 40 kV.
4. Tretirani uzorci soka od jagode zrelosti Z1 imali su značajno viši udio ukupnih polifenola u odnosu na sok od jagode zrelosti Z2. Neovisno o stupnju zrelosti, skladištenje tretiranih uzoraka sedam dana pri temperaturi 4 °C dovelo je do statistički značajnog povišenja udjela ukupnih fenola.
5. Općenito se može zaključiti da tehnologija pulsirajućeg električnog polja povoljno utječe na stabilnost ukupnih fenola u sokovima od jagode tijekom sedmodnevnog skladištenja pri temperaturi 4 °C, te da su jagode nižeg stupnja zrelosti Z1 također pogodne za proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova, stoga bi u daljnjim istraživanjima trebalo ispitati senzorske značajke ovih proizvoda.

6. LITERATURA

Agcam E, Akyildiz A, Evrendilek GA (2014) Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. *Food Chem* **143**, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.115>

Aguilo-Aguayo I, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso, O (2009a) Changes in quality attributes throughout storage of strawberry juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Food Sci Technol* **42**, 813-818. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.008>

Aguilo-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2009b) Changes in viscosity and pectolytic enzymes of tomato and strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields. *Int J Food Sci Tech* **44**, 2268-2277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02068.x>

Anonymous 1 <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=4bf49f997b04dcacdfbd637db9aa5839&ty=HTML&h=L&mc=true&n=pt21.2.101&r=PART#se21.2.101_19 > Pristupljeno 22. lipnja 2021

AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

Arshad RN, Abdul-Malek Z, Munir A, Buntat Z, Ahmad MH, Jusoh YMM, El-Din Bekhit A, Roobab U, Manzoor MF, Aadil RM (2020) Electrical systems for pulsed electric field applications in the food industry: An engineering perspective. *Trends Food Sci Technol* **104**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.008>

Avitabile-Leva A, Martinelli A, Leiss M, Castagnoli GF, Maestrelli A (2006) Selection of new strawberry varieties suitable for processing – Cultivar effects on the quality of strawberry sorbet. *Acta Hort* **708**, 559-564. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.708.100>

Barba FJ, Jager H, Meneses N, Esteve MJ, Frigola A, Knorr D (2012) Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innov Food Sci Emerg Technol.* **14**, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.004>

Benton D, Young HA (2019) Role of fruit juice in achieving the 5-a-day recommendation for fruit and vegetable intake. *Nutr Rev* **77(11)**, 829-843. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz084>

Bursać D, Vahčić N, Levaj B, Dragović-Uzelac V, Biško A (2007) The influence of cultivar on sensory profiles of fresh and processed strawberry fruits grown in Croatia. *Flavour Fragr. J.* **22**, 512-520. <https://doi.org/10.1002/ffj.1833>

Bursać Kovačević D, Bilobrk J, Buntić B, Bosiljkov T, Karlović S, Rocchetti G, Lucini L, Barba FJ, Lorenzo JM, Putnik P (2019) High power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in cloudy apple juice during storage. *J. Food Process Preserv* e14023. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14023>

Bursać Kovačević D, Brdar D, Fabečić P, Barba FJ, Lorenzo JM, 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 FJ, Putnik P, Bursać Kovačević D, (ured.) 1 izd., Academic Press, str. 51-88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817226-1.00002-3>

Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Putnik P, Vukušić T, Herceg Z, Dragović-Uzelac V (2016a) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. *Food Chem* **212**, 323-331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.192>

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016b) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem* **190**, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Vahčić N, Skendrović Babojelić M, Levaj B (2015) Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chem* **181**, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>

Bursać Kovačević D, Vahčić N, Levaj B, Dragović-Uzelac V (2008) The effect of cultivar and cultivation on sensory profiles of fresh strawberries and their purées. *Flavour and Fragr J* **23**, 323-332. <https://doi.org/10.1002/ffj.1886>

Buve C, Kebede BT, De Batselier C, Carrillo C, Pham HTT, Hendrickx M, Grauwet T, Van Loey A (2017) Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. *J Food Eng* **216**, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.002>

Carr AC, Maggini S (2017) Vitamin C and immune function. *Nutrients* **9(11)**, 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>

Cassani L, Tomadoni B, Moreira MR, Agüero MV, (2018) Improving quality parameters of functional strawberry juices: Optimization of prebiotic fiber enrichment and geraniol treatment. *Food and Bioprocess Technol* **11**, 2110-2124. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-018-2170-x>

Crecente-Campo J, Nunes-Damaceno M, Romero-Rodriguez MA, Oderiz-Vasquez ML (2012) Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch, cv Selva). *J Food Compos Anal* **28(1)**, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.004>

Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, Botting NP, Kay CD (2013) Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *Am J Clin Nutr* **97(5)**, 995-1003. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.049247>

Day J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

De Ancos B, Sanchez-Moreno C, De Pascual-Teresa S, Cano MP (2006) Fruit Freezing Principles. U: Handbook of Fruits and Fruit Processing Hui YH, Barta J, Cano MP, Gusek TW, Sidhu JS, Sinha NK (ured.) Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, str. 59-80. <https://doi.org/10.1002/9780470277737.ch4>

de Araujo FF, Farias DP, Neri-Numa IA, Pastore GM (2021) Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chem* **338**, 127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>

Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E, Santini A (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res* **33**, 2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>

Elez-Martínez P, Soliva-Fortuny RC, Martín-Belloso O (2006) Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment. *Eur Food Res Technol* **222**, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0073-3>

Elez-Martinez P, Odriozola-Serrano I, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2017) Effects of pulsed electric fields processing strategies on health-related compounds of plant-based foods. *Food Eng Rev* **9(3)**, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12393-017-9162-x>

Fierascu RC, Temocico G, Fierascu I, Ortan A, Babeau NE (2020) Fragaria genus: Chemical composition and biological activities. *Molecules* **25(3)**, 498. <https://doi.org/10.3390/molecules25030498>

Gabrić D, Barba F, Roohinejad S, Gharibzahedi SMT, Radojčin M, Putnik P, Bursać-Kovačević D (2018) 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)**, e12638. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12638>

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battionio M (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28(1)**, 9-19. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706294>

Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol* **11(3)**, 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Häkkinen SH, & Törrönen AR (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res Int* **33(6)**, 517-524. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)

Hernanz D, Recamales AF, Melendez-Martinez AJ, Gonzales-Miret ML, Heredia FJ (2007) Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *J Agric Food Chem* **55(5)**, 1846-1852. <https://doi.org/10.1021/jf063189s>

Horačková Š, Rokytová K, Bialasova K, Klojdova I, Slukova M (2018) Fruit juices with probiotics – New type of functional foods. *Czech J Food Sci* **36(4)**, 284–288. <https://doi.org/10.17221/39/2018-CJFS>

Kader AA (1999) Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Hort* **485**, 203–208. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.485.27>

Kempkes MA (2017) Industrial Pulsed Electric Field Systems. U: Handbook of Electroporation Miklavčić D, (ured.) Springer, Cham. str. 1-21.

Klopotek Y, Otto K, Bohm V (2005) Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **53(14)**, 640-646. <https://doi.org/10.1021/jf047947v>

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. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.005>

Koubaa M, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Putnik P, Santos MD, Queiros RP, Moreira SA, Inacio RS, Fidalgo LG, Saraiva JA (2018) Pulsed electric field processing of fruit juices.

U: Fruit Juices – Extraction, Composition, Quality and Analysis, Rajauria G, Tiwari BK, (ured.) Academic Press, str. 437-449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00022-9>

Krga I, Dragan M (2019) Anthocyanins: From sources and bioavailability to cardiovascular health benefits and molecular mechanisms of action. *J Agric Food Chem* **67(7)**, 1771-1783. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06737>

Kumar Y, Kumar Patel K, Kumar V (2015) Pulsed electric field processing in food technology. *Int J Eng Stud Tech Approach* **1(2)**, 6-16.

López-Pedrouso M, Bursać Kovačević D, Oliveira D, Putnik P, Moure A, Lorenzo JM, Domínguez H, Franco D (2020) *In vitro* and *in vivo* Antioxidant Activity of Anthocyanins. U: Lorenzo JM, Barba FJ, Munekata P (ured.) Anthocyanins - antioxidant properties, sources and health benefits. Nova Science Publishers Inc., New York, str. 169-204.

Lorenzo JM, Munekata PE, Putnik P, Bursać Kovačević D, Muchenje V, Barba FJ (2018) Sources, Chemistry and Biological Potential of Ellagitannins and Ellagic Acid Derivatives. U: Atta-ur-Rahman (ured.) Studies in Natural Product Chemistry, Elsevier, str. 189-221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00006-1>

Milosavljević DM, Mutavdžić DR, Radotić K, Milivojević JM, Maksimović VM, Dragišić Maksimović JJ (2020) Phenolic profiling of 12 strawberry cultivars using different spectroscopic methods. *J Agric Food Chem* **68**, 4346-4354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07331>

Morales-de la Peña M, Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O (2011) Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit. juice-soymilk beverages during refrigerated storage. *Food Chem* **129**, 982–990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.058>

Mosqueda-Melgar J, Elez-Martinez P, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O (2008) Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid

foods: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48(8)**, 747-759.
<https://doi.org/10.1080/10408390701691000>

Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R (2021) The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J Food Sci Technol* **58**, 397-411.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>

Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Gimeno-Ano V, Martin-Belloso O (2008) Kinetic study of anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in strawberry juices treated by high-intensity pulsed electric fields. *J Agric Food Chem* **56**, 8387–8393.
<https://doi.org/10.1021/jf801537f>

Odriozola-Serrano I, Aguilo-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2013) Pulsed electric fields processing effects on quality and health-related constituents of plant-based foods. *Trends Food Sci Technol* **29**, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.003>

Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O (2009b) Carotenoid and phenolic profile of tomato juice processed by high intensity pulsed electric fields compared to conventional thermal treatments. *Food Chem* **112**, 258–266.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.087>

Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2008a) Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Eur Food Res Technol* **228(2)**, 239-248.
<https://doi.org/10.1007/s00217-008-0928-5>

Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009a) Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice. *Food Sci Technol* **42**, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.008>

Oren-Shamir M (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci* **177**, 310-316.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.015>

Ortega-Rivas E (2007) Processing effects for safety and quality in some non-predominant food technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47(2)**, 161-173. <https://doi.org/10.1080/10408390600626560>

Pandey V, Sharma RM, Yamdagni R, Dubey AK, Jadhav TU (2019) Introduction. U: Strawberries - Production, Postharvest, Management and Protection, Sharma MR, Yamdagni R, Dubey AK, Pandey V, (ured.) CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 1-16.

Pavić M (2019) Određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta u biološkim uzorcima. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište u Osijeku-Odjel za kemiju.

Piljac-Žegarac J, Valek L, Martinez S, Belščak A (2009) Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chem* **113**, 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.048>

Pineli LLO, Moretti CL, dos Santos MS, Campos AB, Brasileiro AV, Cordova AC, Chiarello MD (2011) Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *J Food Compost Anal* **24(1)**, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.004>

Pravilnik (2013) Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. Narodne Novine 48, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html Pristupljeno 21. kolovoza 2021.

Putnik P, Pavlić 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(6)**, 699. <https://doi.org/10.3390/foods9060699>

Saddozai AA, Raza S, Saleem SA (2012) Microbial count and shelf life of strawberry juice. *Pakistan J Agric Res* **25(3)**, 218-223.

Salehi F (2020) Physico-chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by pulsed electric field: A review. *Int J Food Prop* **23(1)**, 1036-1050. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1775250>

Sandhu AK, Miller MG, Thangthaeng N, Scott TM, Shukit-Kale B, Edirisinghe I, Burton-Freeman B (2018) Metabolic fate of strawberry polyphenols after chronic intake in healthy older adults. *Food Funct* **9**, 96-106. <https://doi.org/10.1039/c7fo01843f>.

Sapei L, Hwa L (2014) Study on the kinetics of vitamin C degradation in fresh strawberry juices. *Procedia Chem* **9**, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.008>

Shin Y, Ryu J A, Liu R H, Nock J F, Watkins CB (2008) Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. *Postharvest Biol Tec* **49(2)**, 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.008>

Siegmund B, Derler K, Pfannhauser W (2001) Changes in the aroma of a strawberry drink during storage. *J Agric Food Chem* **49(7)**, 3244-3252. <https://doi.org/10.1021/jf010116u>

Sood M, Dogra Bandral J (2019) Composition, Quality and Uses. U: Strawberries - Production, Postharvest, Management and Protection, Sharma MR, Yamdagni R, Dubey AK, Pandey V, (ured.) CRC Press, str. 23-30.

Spanos GA, Wrolstad RE (1992). Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. *J Agric Food Chem* **40(9)**, 1478-1487. <https://doi.org/10.1021/jf00021a002>

Sturm K, Koron D, Štampar F (2003) The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chem* **83(3)**, 417-422. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00124-9)

Škegro M, Putnik P, Bursać Kovačević D, Kovač AP, Salkić L, Čanak I, Frece J, Zavadlav S, Ježek D (2021) Chemometric Comparison of High-Pressure Processing and Thermal

Pasteurization: The Nutritive, Sensory, and Microbial Quality of Smoothies. *Foods* **10(6)**, 1167. <https://doi.org/10.3390/foods10061167>

Teleszko M, Nowicka P, Wojdyło A (2016) Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. *J Food Compost Anal* **54**, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.009>

Teribia N, Buve C, Bonerz D, Aschoff J, Hendrickx M, Van Loey A (2021) Impact of processing and storage conditions on color stability of strawberry puree: The role of PPO reactions revisited. *J Food Eng* **294**, 110402. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110402>

Tulipani S, Mezzeti B, Capocasa F, Bompadre F, Beekwilder J, de Vos CHR, Capanoglu E, Bovy A, Battino M (2008) Antioxidants, phenolic compounds and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem* **56(3)**, 696-704. <https://doi.org/10.1021/jf0719959>

Verbeyst L, Hendrickx M, Van Loey A (2012) Characterisation and screening of the process stability of bioactive compounds in red fruit paste and red fruit juice. *Eur Food Res Technol* **234**, 593-605. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1667-1>

Yildiz S, Pokhrel PR, Unluturk S, Barbosa-Canovas GV (2020) Changes in quality characteristics of strawberry juice after equivalent high pressure, ultrasound, and pulsed electric fields processes. *Food Eng Rev* **13(5)**, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09250-z>

Yildiz S, Raj Pokhrel P, Unluturk S, Barbosa-Canovas GV (2021) Shelf life extension of strawberry juice by equivalent ultrasound, high pressure, and pulsed electric fields processes. *Food Res Int* **140**, 110040. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110040>

Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUKA BATUR izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis