

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na polifenolne spojeve u smoothie-sokovima tijekom skladištenja

Salkić, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:158318>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMFBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKIRAD

**UTJECAJ VISOKOG
HIDROSTATSKOG TLAKA NA
POLIFENOLNE SPOJEVE U
SMOOTHIE-SOKOVIMA
TIJEKOM SKLADIŠTENJA**

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

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Primjena visokog hidrostatskog tlaka u proizvodnji funkcionalnih sokova na bazi voća i povrća“ (IP 2016-06-4006) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALE

Veliko hvala mojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Danijeli Bursać Kovačević, koja je spremno i stručno odgovarala na svako moje pitanje, ma koliko ono bilo glupo. Zaista je užitak bilo raditi s osobom koja istinski voli svoj posao i cijeni svakog studenta.

Zahvaljujem se i mag.ing. Marku Škegri, Darjanu Pipiću i kolegici Ani-Petri Kovač na vrlo ugodnoj atmosferi i prijateljskom okruženju prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebno hvala mojim Šumadincima, Marku, Jeleni i Priski, što su mi osigurali 5 godina smijeha, uživanja i radosti na fakultetu, što smo kroz sve nedaće, biokemije i ostale dogodovštine prolazili zajedno, a sve okrunili ponekom kavom uz puno smijeha i veselja.

Zahvaljujem se i mojim nesuđenim sestričnama, Nini i Maji, koje su mi uvijek davale najbolje akademske savjete i ukazale da su uistinu i svi ostali prošli kroz sito i rešet.

Iz sveg srca hvala mojim sestrama, Amri i Behiji, mojim najvećim idolima u životu, bez kojih danas ne bih bila ovo što jesam. Neizmjereno Vam hvala za svaki savjet, podršku, zagrljaj i lijepu riječ, ne samo tijekom mog studiranja već i tijekom cijelog mog života.

Hvala mojem dečku Vedranu, mojem ramenu za plakanje, najvećoj potpori i najvećoj ljubavi. Bez tebe ne bih uspjela završiti ovaj fakultet. Hvala ti što si baš uvijek vjerovao u mene i bodrio me na svakom koraku!

Veliko hvala mojim roditeljima koji su me naučili kako iz ničega stvoriti sve, kako uživati u plodovima svog rada, a na kraju svega ostati ponizan. Hvala Vam što ste mi omogućili sve na svijetu.

Svatko od Vas je na neki način doprinio ovom radu, direktno ili indirektno. Hvala Vam svima od srca za ovih 5 godina, što ste uvijek bili tu i što sam uvijek mogla na Vas računati. Bez Vas ovaj rad ne bi imao nikakav smisao te ga iz tog razloga posvećujem svima vama!

TEMELJA 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

UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA POLIFENOLNE SPOJEVE U SMOOTHIE-SOKOVIMA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Lidija Salkić, 1244/PI

Sažetak: Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj visokog hidrostatskog tlaka (VHT) na polifenolne spojeve (ukupne hidroksicimetne kiseline, ukupne flavonoide i ukupne flavonole) u smoothie-sokovima pripremljenim od sokova jabuke, mrkve i aronije, kaše indijanske banane te bademovog mlijeka tijekom 21 dana skladištenja pri 4 °C. Smoothie-sokovi su obrađeni VHT-om na sobnoj temperaturi pri tlakovima 350 i 450 MPa uz vrijeme tretiranja 5 i 15 min. Smoothie-sokovi su također obrađeni pasterizacijom (85 °C/7 minuta), dok je kontrolni uzorak predstavljao netretirani smoothie-sok. Unatoč tome što je pasterizacija rezultirala višim udjelima ukupnih flavonoida te nižim udjelima ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u usporedbi s kontrolnim uzorcima, VHT uzorci su generalno pokazali veću stabilnost svih spojeva tijekom skladištenja u usporedbi s pasteriziranim uzorcima. Rezultati ovog istraživanja su pokazali kako je VHT obrada perspektivna netermalna tehnologija obrade smoothie-sokova, pri čemu se tretman pri 450 MPa kroz 5 minuta pokazao najučinkovitijim za očuvanje istraživanih polifenolnih spojeva kroz period skladištenja od 21 dan.

Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak, smoothie-sok, pasterizacija, polifenoli, skladištenje

Rad sadrži: 60 stranica, 10 slika, 9 tablica, 89 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Marko Škegro, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 25. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

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

Lidija Salkić, 1244/PI

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of high hydrostatic pressure processing (HHPP) on polyphenols (total hydroxycinnamic acids, total flavonoids and total flavonols) of smoothies prepared from apple, carrot and chokeberry juice, paw-paw puree and almond milk during 21 days of storage at 4 °C. HHPP was carried out at room temperature under a pressure of 350 and 450 MPa during 5- and 15-min. Smoothies were also pasteurized (85 °C/7 minutes), while the control samples were untreated smoothies. Although pasteurization resulted in higher proportions of total flavonoids and lower proportions of total hydroxycinnamic acids and flavonols compared to control samples, HHPP samples generally showed greater stability of all polyphenols during storage compared to pasteurized samples. The results of this study revealed that HHPP treatment is a promising non-thermal processing technology suitable for smoothie treatment, whereas processing conditions at 450 MPa/5 minutes proved to be the most effective for preserving polyphenolic compounds through a 21-day storage period.

Keywords: high hydrostatic pressure processing, smoothie, pasteurization, polyphenols, storage

Thesis contains: 60 pages, 10 figures, 9 tables, 89 references

Original in Croatian

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

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Associate professor*

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

Reviewers:

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

Defence date: September 25th, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SMOOTHIE-SOKOVI	2
2.2. KEMIJSKI I NUTRITIVNI SASTAV SMOOTHIE-SOKOVA	3
2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI SMOOTHIE-SOKOVA	5
2.4. ODABRANE VOĆNE I POVRTNE VRSTE KAO SASTOJCI SMOOTHIE SOKOVA	8
2.4.1. Jabuka (<i>Malus domestica</i> L.)	8
2.4.2. Mrkva (<i>Daucus carota</i> L.)	9
2.4.3. Aronija (<i>Aronia melanocarpa</i> L.)	10
2.4.4. Indijanska banana (<i>Asimina triloba</i> L.)	11
2.5. TEHNOLOGIJA VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA (VHT)	12
2.5.1. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka	14
2.5.2. Perspektiva primjene tehnologije visokog hidrostatskog tlaka u industriji	15
2.5.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na nutritivni sastav sokova i smoothie-sokova	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI	19
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Priprema smoothie soka	20
3.2.2. Obrada smoothie sokova visokim hidrostatskim tlakom	21
3.2.3. Obrada smoothie sokova pasterizacijom	22
3.2.4. Izolacija polifenolnih spojeva iz smoothie sokova	23
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	24
3.2.6. Određivanje ukupnih flavonoida	28
4. RASPRAVA I REZULTATI	31
4.1. UKUPNI FLAVONOIDI	31
4.2. UKUPNI FLAVONOLI	34
4.3. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	35
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	41

1. UVOD

U novije vrijeme potrošači sve više zahtijevaju hranu visoke kvalitete te nutritivnog sastava gotovo identičnog neprerađenoj hrani, a sve s ciljem očuvanja zdravlja (Andrés i sur., 2016). Također, sve se više obraća pažnja i na sastav pojedinih proizvoda pa tako potrošači žele visoko kvalitetne namirnice, prirodnog okusa i arome bez dodanih aditiva ili konzervansa, ali s produljenim rokom trajanja (Rastogi, 2013). U nedostatku vremena za konzumaciju dovoljnih količina voća i/ili povrća, potrošači često posežu za njihovim proizvodima, poput sokova, napitaka, pića te smoothie-sokova (Bursać Kovačević, 2020).

Smoothie-sokovi se najčešće proizvode miješanjem različitih plodova svježeg voća i povrća uz dodatak neke tekuće komponente poput vode, jogurta ili mlijeka, a mogu se i obogaćivati različitim funkcionalnim dodacima (Gallina i sur., 2019; Žuntar i sur., 2020). U odnosu na klasične sokove, posjeduju veću nutritivnu, biološku i energetska vrijednost (Bhardwaj i Pandey, 2011), stoga je neophodno odabrati adekvatan tretman obrade koji će osim zdravstvene ispravnosti, u najvećoj mjeri ujedno i očuvati izvornu kvalitetu. Rezultati dosadašnjih istraživanja navode kako termalne tehnologije obrade mogu nepovoljno utjecati na senzorska i nutritivna svojstva proizvoda uslijed djelovanja povišenih temperatura (Bursać Kovačević i sur., 2015; Bursać, 2007). U novije se vrijeme sve više istražuje primjena inovativnih (ne)termalnih tehnologija obrade hrane koje će, osim zdravstvene ispravnosti, osigurati i zadržanu izvornu kvalitetu proizvoda. Neke od tehnologija koje se najviše istražuju u području obrade voća i povrća te njihovih proizvoda su visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje, ultrazvuk visoke snage, ultraljubičasto svjetlo te mikrovalovi (Putnik i sur., 2020; Bursać i sur., 2019; Putnik i sur., 2019). Među navedenim tehnologijama, visoki hidrostatski tlak (VHT) iznašao je i svoju industrijsku primjenu u proizvodnji i obradi proizvoda od voća i povrća. Iz toga se razloga primjena VHT-a nameće kao možebitna alternativa klasičnoj termalnoj obradi.

Sukladno svemu navedenom, cilj ovog rada je odrediti utjecaj tehnologije VHT-a, kao netermalne, te pasterizacije, kao termalne na sadržaj ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u smoothie-sokovima pripremljenim od soka od jabuke, mrkve i aronije, kaše indijske banane te bademovog mlijeka tijekom skladištenja od 21 dan na temperaturi od 4 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SMOOTHIE-SOKOVI

Voće i povrće je sastavni dio uobičajene prehrane te je značajan izvor nutrijenata poput vitamina, minerala i prehrambenih vlakana. Kako bismo zadovoljili dnevne potrebe, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporuča konzumiranje minimalno 400 g voća i povrća na dan, dok su u nekim zemljama poput Švedske i Finske preporuke i do 500 g na dan (EC, 2020). Najčešći nedostaci u prehrani odnose se upravo na nedovoljnu konzumaciju voća i povrća (Bursać Kovačević i sur., 2020). Neka istraživanja navode da se konzumiranjem pet ili više obroka voća i povrća dnevno smanjuju rizici oboljenja od infarkta miokarda za 15 % te da općenito dnevni unos od 600 g voća i povrća može reducirati pojavu koronarnih bolesti srca za 31 %, ishemijskog moždanog udara za 19 % (Borges i sur., 2010) te umanjiti razinu stresa i umora (Bhardwaj i Pandey, 2011).

Iako se uglavnom konzumira u svježem obliku, veliki je broj proizvoda dobiven preradom voća i povrća, a jedan od njih je i sve popularniji voćni obrok, tzv. smoothie-sok. Smoothie-sok podrazumijeva mješavinu različitih plodova svježeg voća i povrća uz dodatak neke tekuće komponente poput vode, jogurta ili mlijeka, bilo životinjskog ili biljnog podrijetla. Dobiva se postupkom mehaničkog brzog miješanja i usitnjavanja, stoga u odnosu na klasične sokove, smoothie-sokovi imaju veću nutritivnu, biološku i energetsku vrijednost (Bhardwaj i Pandey, 2011). Miješanjem odabranih vrsta svježih plodova voća i/ili povrća može se dizajnirati idealna kombinacija smoothie-soka, u kojoj su maskirane neke nepoželjne senzorske karakteristike pojedinog voća, odnosno povrća kao što su visoka kiselost i/ili smanjena slatkoća (Ribeiro i sur., 2018).

Smoothie-sokovi se na tržištu pojavljuju usporedno s izumom električnih miksera koji su postali pristupačni za široku kućnu upotrebu. Prvi električni mikser je osmislio i patentirao Stephen Poplawski 1922. godine u SAD-u. Prvi smoothie-sok se pojavio 1926. godine, također u SAD-u, a sastojao se od izmiksane cijele naranče i dodatnih tajnih sastojaka, koji su smanjivali kiselost. Od tada pa do danas, industrija smoothie-sokova sve više raste jer se ova vrsta sokova primarno smatra funkcionalnim proizvodima te postaju zamjena za obroke (Anonymous 1).

Potrošači sve više zahtijevaju minimalno procesirane proizvode koji zadržavaju svojstva svježeg voća i povrća kroz što dulji vremenski period (Putnik i sur., 2017). U ovom

kontekstu, konzumacija smoothie-sokova pripremljenih od voća i povrća je povezana sa zdravom i prirodnom prehranom (Hurtado i sur., 2019). Smoothie-sokovi su uglavnom dobro prihvaćeni od strane potrošača i njihova potražnja kontinuirano raste što se može pripisati promjenama potrošača u prehranbenim navikama, stilu života kao i njihovim osobnim preferencijama (Bhardway i Pandey, 2011). Samim time je i proizvodnja smoothie-sokova u porastu te je u zadnjih nekoliko godina ovaj segment prehrambene industrije imao najveći rast diljem svijeta (Morales-de la Peña i sur., 2016)

Jedan od ciljeva prehrambene industrije je proizvesti proizvode koje će potrošači asociirati s proizvodima koji sadrže praktički svježe oblike voća i/ili povrća, tj. s proizvodima koji su minimalno prerađeni i/ili obrađeni. Takvi proizvodi mogu biti zamjena dosad najčešće konzumiranim konvencionalnim proizvodima od voća i povrća, kao što su sokovi, džemovi i dr., obrađeni pasterizacijom, sterilizacijom ili blanširanjem. Ove tehnologije uslijed visokih temperatura obrade mogu nepovoljno utjecati na senzorska i nutritivna svojstva proizvoda (Bursać Kovačević i sur., 2015; Bursać, 2007). Stoga, glavni problem industrijske proizvodnje smoothie-sokova predstavlja održavanje kvalitete i stabilnosti tijekom skladištenja, obzirom su podložni mikrobiološkoj i enzimskoj razgradnji te oksidaciji (Hurtado i sur., 2019)

Obzirom da u Republici Hrvatskoj 65,5 % populacije starije od 15 godina konzumira manje od preporučenih 400 g voća i povrća na dan, veća konzumacija smoothie-sokova bi mogla pridonijeti i većoj konzumaciji voća i povrća (EC, 2016) te tako pozitivno doprinosti zdravstvenim učincima.

2.2. KEMIJSKI I NUTRITIVNI SASTAV SMOOTHIE-SOKOVA

Obzirom da smoothie-sokovi predstavljaju mješavinu različitih plodova voća i povrća, kemijski i nutritivni sastav pojedinih smoothie-sokova se može značajno razlikovati. Miješanjem različitih vrsta voća i povrća može se definirati senzorski privlačan proizvod s više pozitivnih učinaka na zdravlje potrošača (Teleszko i Wojdyło, 2014). Primjerice, u proizvodnji smoothie-soka od mandarine sorte Kinnow, dodaju se sok nara, indijskog ogrozda i đumbira radi poboljšanja okusa, arome i nutritivne vrijednosti. Preradom mandarine u sok se veliki udio aromatskih spojeva vrlo brzo degradira (Putnik i sur., 2017), stoga su dodani sokovi, pored poboljšanja harmoničnosti okusa, doprinijeli i većem udjelu vitamina C i minerala, čime su izravno poboljšali nutritivnu i senzorsku vrijednost smoothie-soka (Bhardway i Pandey, 2011).

Teleszko i Wojdyło (2014) su ispitale mogućnost primjene odabranih voćnih vrsta s uzgojnim područjem u Europskoj Uniji (EU) umjerene klimatske zone za proizvodnju smoothie-sokova. Voćne vrste su uključivale: jabuke (*Malus domestica* Borkh. cv. „Champion“), aroniju (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott cv. „Galicjanka“), brusnicu (*Vaccinium macrocarpon* L. cv. „Ben Lear“), crni ribizl (*Ribes nigrum* L. cv. Titania), šumsku borovnicu (*Vaccinium myrtillus* L.), plodove pasje ruže (*Rosa canina* L.), dunje (*Cydonia oblonga* Mill.), pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L. cv. „Aromatnaya“) i japansku dunju (*Chaenomeles japonica* L.). Od navedenih voćnih vrsta pripremljeno je 16 različitih receptura smoothie-sokova među kojima se nalaze 4 podgrupe sokova ovisno o sirovini koja prevladava u sastavu (smoothie-sokovi na bazi jabuke, dunje, aronije i crnog ribizla). Rezultati senzorske analize su pokazali da su smoothie-sokovi pripremljeni od bobičastog voća (brusnica, crni ribizl, aronija) te pasje ruže panelistima bili najprihvatljiviji. Smoothie-sokovi na bazi aronije i crnog ribizla su imali veći sadržaj polifenolnih spojeva u odnosu na ostale uzorke. Najzastupljeniji polifenolni spojevi su u gotovo svim uzorcima bili procijanidini (B3) izuzev uzoraka sokova iz grupacije crnog ribizla, gdje su dominantni bili antocijani. Najveće količine vitamina C određene su u smoothie-soku pripremljenom od soka crnog ribiza, soka pasje ruže i pirea borovnice (168.98 mg/100 g), a slične vrijednosti su zamijećene i u smoothie-soku pripremljenom od soka aronije, soka pasje ruže i pirea borovnice. Ovim istraživanjem je pokazano kako kemijski i nutritivni sastav smoothie-sokova značajno varira ovisno o vrsti prisutnog voća (Teleszko i Wojdyło, 2014).

Obzirom da se smoothie-sokovi pripremaju pretežno od voća i povrća, uglavnom su siromašni proteinima. Mehta i suradnici (2017) su formulirali smoothie-sok od mlijeka, soka mrkve, kaše manga i meda uz dodatak crnog slanutka (*Cicer arietinum* L.), koji je bogat proteinima. Dodatkom slanutka sadržaj proteina u smoothie-soku prelazi 11 g što se smatra visokim udjelom proteina po jednoj jedinici serviranja. Prema istraživanju, dodatkom listova biljke moringe (*Moringa oleifera* Lam.) (4,5 % lista) sadržaj proteina smoothie-soka sastavljenog od banane (13,5 %), ananasa (38,5 %) i jabuke (4,5 %) se povećao za približno 3,5 puta, a ustanovljeno je da su se i antioksidacijska svojstva povećala za otprilike 1,7 (određeno DPPH metodom), odnosno 4,4 puta (određeno FRAP metodom) u odnosu na uzorak bez dodatka listova moringe (Aderinola, 2018).

U zadnje vrijeme se sve više pribjegava smanjenju generiranja otpada od hrane u vidu promicanja održivog razvoja, a što je u skladu s Agendom 2030 (UN). Uglavnom se otpadna hrana ili nusproizvodi prehrambene industrije koriste kao stočna hrana ili gnojivo, ali se teži

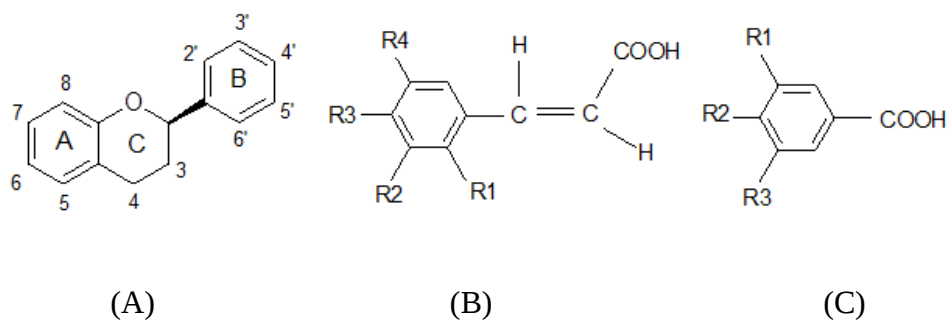
tome da se oni na neki način iskoriste i vrate u lanac proizvodnje prehrane (Zhu i sur., 2020). Jedan od primjera mogućeg korištenja nusproizvoda prehrambene industrije je lišće cikle koje je bogato fitokemikalijama i vlaknima te ima i visok antioksidacijski kapacitet. Nadalje, listovi cikle imaju i antimikrobna svojstva čime bi se potencijalno mogla izbjeći pasterizacija proizvoda u kojima je dodan njihov ekstrakt. Dodatkom alkoholnog ekstrakta lista cikle u količini od 6 % u smoothie-sokove od soka naranče (59 %), jabuke (15 %), mrkve (15 %) i stabljika cikle (5 %) sadržaj fenola se povećava za 50 % u odnosu na smoothie-sokove bez dodatka alkoholnog ekstrakta, a dolazi i do povećanja antioksidacijskog kapaciteta. Samim time ekstrakt lišća cikle ima veliki potencijal kao dodatak ljudskoj prehrani, uz istovremeno osiguravanje održive proizvodnje (Fernandez i sur., 2020).

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI SMOOTHIE-SOKOVA

Brojni znanstveni radovi potvrđuju da povećani unos voća i povrća poboljšava zdravlje te je povezano sa smanjenjem rizika od degenerativnih bolesti (Abountiolas i Nunes, 2017). Zdravstveni benefiti su povezani sa sadržajem bioaktivnih spojeva u voću i povrću pa upravo konzumacija smoothie-sokova povećava njihov dnevni unos (Casado, 2018).

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji broje više od 8,000 različitih kemijskih struktura (Bravo, 1998). Važna karakteristika polifenola je njihovo snažno antioksidacijsko djelovanje koje se iskazuje hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona. Nadalje, oni pokazuju protuupalno, antialergijsko i antikancerogeno djelovanje te su zbog tih karakteristika predmetom brojnih istraživanja (Jakobek i sur., 2008).

Osnovnu kemijsku strukturu polifenola čini aromatski prsten povezan s jednom ili više hidroksilnih grupa (Hidalgo i Almajano, 2017). Obzirom na strukturne karakteristike, polifenole možemo podijeliti u tri grupe: flavonoide, fenolne kiseline te neflavonoidne polifenole. Tako flavonoidi imaju opću strukturu difenilpropana ($C_6-C_3-C_6$) (Slika 1A), a ovu grupu polifenola čine šest podgrupa: antocijani, flavanoli, flavonoli, flavoni, flavanoni i izoflavoni (Pietta i sur., 2003). Antocijane, biljne pigmente crvenog, plavog i ljubičastog obojenja pronalazimo u raznom voću, pogotovo u bobičastom, flavanole marelicama, zelenom čaju i crnom vinu, flavonole u luku, poriluku i borovnicama, flavone u peršinu i celeru, flavanone u citrusima, a izoflavone u soji.



Slika 1. Kemijska struktura flavonoida (A), hidroksicimetnih (B) i hidroksibenzojevih kiselina (C)

Fenolne kiseline se dijele u dvije skupine obzirom na strukturne karakteristike: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te njihove derivate. Opća strukturna formula hidroksicimetnih kiselina (Slika 1B) je *trans*-fenil-3-propanska kiselina (C₆-C₃), a pojedine kiseline u toj skupini se razlikuju obzirom na supstituente na aromatskom prstenu te su u voću i povrću i njihovim proizvodima najzastupljenije *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska i klorogenska kiselina. S druge strane, u voću i povrću skupinu hidroksibenzojevih kiselina opće strukturne formule C₆-C₁ (Slika 1C) najčešće čine galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, elaginska i prokatehinska kiselina (Pietta i sur., 2003).

Obzirom da su sveprisutne u namirnicama biljnog porijekla, dnevni unos fenolnih kiselina iznosi 25 mg do 1 g/dan, ovisno o prehranbenim navikama potrošača (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). One se u namirnicama uglavnom pojavljuju kao konjugati ili esteri, osim u hrani prerađenoj zamrzavanjem, sterilizacijom ili fermentacijom (Manach i sur., 2004). Za pojedine vrste voća i povrća karakteristična je dominacija određenih fenolnih spojeva. Mattila i suradnici (2006) su u svom istraživanju određivali sadržaj fenolnih kiselina u pojedinom voću te su došli do zaključka da je kafeinska kiselina najzastupljenija u borovnicama, šljivama, trešnji i jabuci, siringinska u crnom grožđu, a ferulinska u citrusima. Također su dokazali da su u jabuci, osim kafeinske kiseline, prisutne i *p*-kumarinska te galna kiselina, ali se njihov sadržaj razlikuje obzirom na sorte. Breskva, nektarina, kruška, bijelo grožđe, rabarbara, banana i kivi su se pokazali siromašni na fenolnim kiselinama.

Općenito, polifenolni sastav smoothie-sokova će varirati ovisno o dodanim vrstama voća i/ili povrća, a vrlo je bitna i tekuća komponenta koja može imati utjecaj na biodostupnost polifenola. Tako se pokazalo da dodatak sojinog mlijeka smanjuje biodostupnost ukupnih polifenola iz jabučnog soka za 26,3 %, dok je kod sokova od grožđa i naranče biodostupnost

uvećana za 26,6 do 31,1 %, odnosno za 13,3 do 43,4 %. Slično povećanje biodostupnosti polifenola je zabilježeno i kod kravljeg mlijeka, dok ono nije promijenilo sadržaj kod soka od jabuke (Quan i sur, 2019).

Općenito, polifenoli su vrlo nestabilni spojevi podložni degradaciji (Volf i sur., 2013), a najveći utjecaj imaju termička obrada i vrijeme skladištenja (Bursać Kovačević i sur., 2019; Putnik i sur., 2019). Primjera radi, sok od kupine pasterizacijom može izgubiti i do 35 % ukupnih antocijana u odnosu na netretirani sok (Weber i Larsen, 2017). Nadalje, klasičnom termalnom obradom poput pasterizacije i sterilizacije dolazi do nepoželjnih promjena u senzoricima, teksturi i nutritivnim vrijednostima samog proizvoda (Keenan i sur., 2011). Stoga je mnogo istraživanja usmjereno na pronalazak alternativnih metoda obrade i/ili prerade hrane, koji bi isključili negativne utjecaje termalne obrade, uz istovremeno osiguranje izvorne kvalitete tijekom zadanog roka skladištenja (Kostelac i sur., 2020, Putnik i sur., 2018). U Tablici 1 dan je pregled znanstvenih istraživanja u primjeni netermalnih tehnologija obrade koje se najčešće koriste u obradi smoothie sokova te njihov utjecaj na stabilnost bioaktivnih spojeva.

Tablica 1. Pregled utjecaja netermalnih tehnologija obrade na bioaktivne spojeve smoothie-sokova

Uzorak	Tehnologija obrade	Bioaktivni spojevi	Zaključci	Referenca
Smoothie-sok: sok papaje (50,8%) + sok manga (19,3%) + infuzija stevije (29,9%)	Pulsirajuće električno polje (PEF): - visoko naponski pulsirajući generator, 40 kV–10 kA, elektrode površine 95 cm ² , broj pulseva 50-400 uz $\Delta t=2$ s Ultrazvuk (US): -ultrazvučni procesor 400 W, 24 kHz, amplituda 20-100%, dijametar sonde 14 mm, vrijeme obrade 20 i 160 s.	Ukupni fenoli i antocijani	- vitamin C je pokazao bolju stabilnost uslijed US tretmana (gubitak 9-16%) u usporedbi sa PEF tretmanom (gubitak 17-20%). - sadržaj ukupnih karotenoida bio je značajno veći u tretiranim uzorcima (US i PEF) u usporedbi s kontrolnim uzorkom. - US i PEF tehnologije su iznimno pozitivno djelovale na stabilnost antocijana.	Carbonell-Capella i sur., 2016
Smoothie-sok: Sok naranče (50 %) + sok papaje (13,5 %), sok dinje (13,5 %) + kaša mrkve (13 %) + obrano kravljje mlijeko (10 %)	Visoki hidrostatski tlak: - tlakovi od 450 i 600 MPa uz vrijeme obrade od 3 minute na temperaturi od 20 °C	Likopen, β -karoten i polifenoli	- poboljšana ekstrakcija likopena, β -karotena i polifenola u odnosu na netretirane uzorke - promjene bioaktivnih sastojaka tijekom skladištenja (45 dana na temperaturi od 4 °C su bile manje u odnosu na uzorke tretirane termalnim postupcima.	Andrés i sur., 2016.
Smoothie sok: Sok jabuke + sok brusnice (90:10)	<u>Tretiranje ultraljubičastim svjetlom (UV):</u> - energija od 5,3 J cm ⁻² ; 200-280 nm, 30 s <u>Pulsirajuće svjetlo visokog intenziteta (HILP):</u> - 360 μ s, energija 1,213 J cm ⁻² po pulsu, duljina cijevi 40 cm (2x20 cm), ukupna doza energije 3,3 J cm ⁻² uz protok od 20,8 mL min ⁻¹ <u>Manotermosonifikacija (MTS):</u> - amplituda 23 μ m, 20 kHz, 750 W, 4 bar, 58 °C, 8,4 min	Ukupni fenoli	- nema značajne promjene u sadržaju ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta kod kombinacija UV+HILP, UV+PEF i UV+MTS.	Caminiti i sur., 2011

2.4. ODABRANE VOĆNE I POVRTNE VRSTE KAO SASTOJCI SMOOTHIE SOKOVA

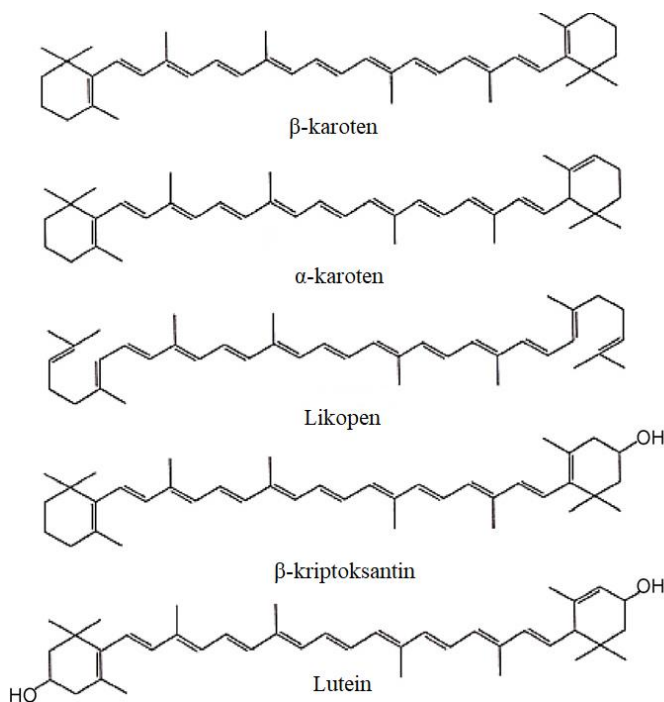
2.4.1. Jabuka (*Malus domestica* L.) se smatra jednom od najomiljenijih voćnih vrsta te je u većini zemalja dostupna za konzumaciju tijekom cijele godine (Łata i sur., 2009). U SAD-u se oko 39 % godišnje proizvodnje jabuka konzumira u svježem obliku, dok se preostalih 61

% prerađuje (Sinha, 2006). Obzirom na učestalost u prehrani, jedan su od glavnih izvora antioksidansa, prvenstveno flavonoida, dok vitamin C doprinosi svega 0,4 % antioksidacijskoj aktivnosti (Wolfe i sur., 2003). Sadržaj polifenola u jabukama uglavnom varira od 110 do 357 mg/100 g svježeg ploda (Wolfe i sur., 2003).

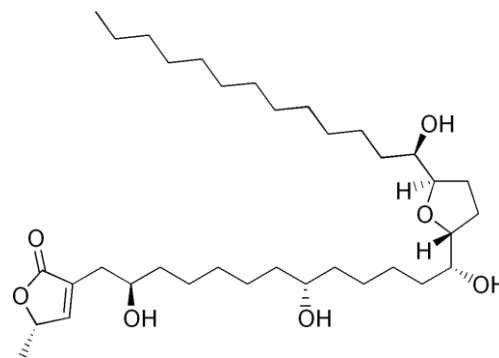
Pet je glavnih grupa polifenolnih podskupina identificirano u jabukama: hidroksicimetne kiseline (klorogenska kiselina), flavan-3-oli [(+)-katehin, (-)-katehin], antocijani (cijanidin-3-galaktozid), flavonoli (različiti glikozidi kvercentina) te dihidrohalkoni (floridzin) (Łata i sur., 2009). Brojna su istraživanja pokazala da kora jabuke sadrži više antioksidansa nego drugi dijelovi ploda (Henríquez i sur., 2010). Łata i suradnici (2009) ističu da oko 60 % polifenola u kori jabuke otpada na flavan-3-ole, dok su većina polifenola u mezokarpu jabuke, njih 56 %, procijanidini.

Mnoga istraživanja su pokazala kako prehrana bogata jabukama potencijalno može smanjiti rizik od bolesti poput prekomjerne težine i pretilosti, kardiovaskularnih bolesti te karcinoma. Iz ovih razloga, jabuka je vrlo poželjan sastojak smoothie-sokova, naročito ako se sok od jabuke ne bistri (Teleszko i sur., 2016).

2.4.2. Mrkva (*Daucus carota* L.) je glavno korjenasto povrće za uzgoj diljem svijeta te važan izvor karotenoida u zapadnjačkoj prehrani. Vrlo je dobar izvor antioksidansa, a uz to je β -karoten prekursor za sintezu vitamina A (Sharma i sur., 2012). Inače, karotenoidi su jedan od najučestalijih pigmenata u prirodi s više od 600 različitih kemijskih struktura (Stahl i Sies, 2003). Kemijska struktura u najučestalijih karotenoida u prirodi (Slika 2) sadrži polizoprenoidnu strukturu, odnosno dugačak konjugirani lanac s dvostrukim vezama i skoro bilateralno simetričan u odnosu na središnju dvostruku vezu. Karotenoidi se uglavnom razlikuju prema modifikaciji osnovne strukture i to najčešće ciklizacijom krajeva lanca ili umetanjem kisika (Rao i Rao, 2007).



Slika 2. Kemijske strukture karotenoida
(prema Rao i Rao, 2007)



Slika 3. Kemijska struktura acetogenina
(Anonymous 2, 2020)

Konzumacija karotenoida je u korelaciji sa smanjenim rizikom od nekoliko degenerativnih poremećaja, uključujući neke vrste karcinoma, kardiovaskularne i oftalmološke bolesti (Stahl i Sies, 2003). Pored najzastupljenijeg β -karotena (60-80 %), mrkva sadrži još i α -karoten (10-40 %) te lutein (1-5 %) (Chen i sur., 1995). Od polifenola, mrkva sadrži kafeinsku te izoklorogensku i klorogensku kiselinu te glikozide cijanidina. Nadalje, mrkva je također dobar izvor tiamina, riboflavina, folne kiseline te vitamina C (Leja i sur., 1997, Sharma i sur., 2012).

2.4.3. Aronija (*Aronia melanocarpa* L.) je u posljednje vrijeme veoma proučavana voćna vrsta obzirom je dokazano da sadrži značajno veće količine polifenolnih spojeva te veći antioksidacijski kapacitet od borovnice te američke i europske brusnice (Oszmiański i Wojdylo, 2005; Bursać Kovačević i sur., 2017). Fenolni spojevi izolirani iz aronije pokazuju antimutagena svojstva, a izolirani antocijani djeluju hepatoprotektivno jer smanjuju toksičnost i akumulaciju kadmija u jetri i bubrezima ispitivanih životinja. Također, aronija i njezin ekstrakt djeluju preventivno na rak debelog crijeva u *in vitro* istraživanjima, a uz to smanjuje i rizik od kardiovaskularnih bolesti (Kulling i Rawel, 2008).

Aronija je bogat izvor polimernih proantocijanidina, antocijana te fenolnih kiselina. Oszmiański i Wojdylo (2005) su utvrdili da 66 % polifenola u aroniji čine polimerni proantocijanidini. Inače, polimerni proantocijanidini se sintetiziraju u biljkama kao polimeri flavan-3-ola zajedno s antocijanima (He i sur., 2008). U aroniji su monomerne jedinice proantocijanidina uglavnom sastavljene od jedinica (-)-epikatehina. Nadalje, antocijani predstavljaju 25 % ukupnih fenola aronije pri čemu dominiraju četiri glikozida cijanidina od kojih je -galaktozid određen u najvećem udjelu, -3-glukozid, -3-arabinozid i -3-ksilozid (Bursać Kovačević i sur., 2016). Oszmiański i Wojdylo (2005) dalje ističu kako 7,5 % ukupnih fenola čine fenolne kiseline i to uglavnom klorogenska i neoklorogenska kiselina, a 1,3 % ukupnih fenola čine flavonoli i to mješavina različitih glikozida kvercentina poput kvercentin-3-rutinozida, kvercentin-3-galaktozida i kvercentin-3-glukozida.

2.4.4. Indijanska banana (*Asimina triloba* L.) je voćka iz porodice *Annonaceae*, karakteristična za istočni dio SAD-a. Plodovi su aromatičnog tropskog okusa, a najčešće se opisuje kao kombinacija banane, manga i ananasa (Nam i sur., 2018a). Potvrđeno je da je indijanska banana bogata polifenolima, vitaminom C, magnezijem, željezom, bakrom i manganom, kao i kalijem, riboflavinom, esencijalnim aminokiselinama, niacinom, kalcijem, fosforom i cinkom (Donno i sur., 2018). Doduše, mnoga istraživanja su pokazala kako kemijski sastav indijanske banane značajno varira ovisno o zrelosti ploda pa se tako najviše koncentracije pojedinih komponenata uglavnom zamjećuju u nezrelom plodu. Također, zrenjem se mijenjaju i fizikalna i senzorska svojstva ploda (Nam, 2018a).

Što se tiče polifenolnog sastava, Nam i suradnici (2018a) ističu epigalokatehin, epikatehin i *p*-kumarinsku kiselinu kao spojeve zastupljene u najvećim udjelima. Epigalokatehin i epikatehin pokazuju antioksidacijska, protuupalna i antikancerogena svojstva. S druge strane, indijanska banana sadrži i acetogenine, derivate dugolančanih masnih kiselina, koji se nalaze u svim dijelovima biljaka iz porodice *Annonaceae*. Osnovna gradivna jedinica acetogenina je alifatski lanac od 30-38 ugljikovih atoma koji sadrži terminalno vezan γ -laktonski prsten. Također sadrže brojne hidroksilne i keto skupine te jedan do dva tetrahidrofuranska prstena (Slika 3). Ovi spojevi pokazuju antikancerogena svojstva, ponajprije u istraživanjima raka prostate, debelog crijeva, jetre, gušterače, dojke i želuca (Nam i sur., 2018b). Obzirom da je koncentracija acetogenina najveća u nezrelom plodu indijanske banane, ona kao takva ima najviše potencijala kao funkcionalna hrana i prirodan izvor antikancerogenih spojeva (Nam i sur., 2018b).

2.5. TEHNOLOGIJA VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA (VHT)

Tijekom obrade visokim hidrostatskim tlakom, hrana je izložena tlakovima od 100-800 MPa, s ili bez primjene topline, u svrhu inaktivacije različitih vrsta patogenih bakterija, bakterija kvarenja, kvasaca, plijesni, virusa te spora kako bi se osigurala mikrobiološka sigurnost hrane. Kada se postigne željeni tlak, on na namirnicu djeluje u zadanom vremenskom roku (od nekoliko sekundi do nekoliko minuta) kako bi se osigurao zdravstveno ispravan proizvod (Balasubramaniam i sur., 2015). Ova metoda je pogodna za obradu tekućih i krutih namirnica, a najpogodnije su namirnice s nižom pH vrijednosti iz razloga što VHT pri sobnoj temperaturi ne uništava u potpunosti sporogene oblike patogena pa kisela sredina dodatno pruža zaštitu od njihove aktivacije (Balasubramaniam i sur., 2015; Rastogi, 2013). U Tablici 2 su prikazane prednosti i ograničenja primjene tehnologije visokog hidrostatskog tlaka.

Američka agencija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*, FDA) je 2009. godine odobrila upotrebu visokog hidrostatskog tlaka kao metode za komercijalno steriliziranje prethodno zagrijane hrane s nižim pH vrijednostima, a svega tri godine kasnije, 2012. godine, se na tržištu pojavljuju sokovi tretirani VHT-om. Obzirom su na VHT tretman najotporniji sojevi *E. coli* O157:H7, učinkovitost VHT tretmana je definirana postignutom stopom inaktivacije iznad 5-log redukcije. Nadalje, rezultati brojnih istraživanja su pokazala da sam tlak nije dovoljno efikasan za uništavanje sporogenih oblika bakterija, stoga se u novije vrijeme VHT kombinira s drugim tehnologijama kao jedna od tehnologija „preprekama“ (engl. *Hurdle concept*) (Putnik i sur., 2020). Ipak, uslijed brojnih prepreka i ograničenja (Tablica 2), većina industrije još uvijek nije uvrstila VHT kao jednu od metoda procesiranja hrane iako ona pokazuje značajne prednosti u odnosu na konvencionalne metode (Huang i sur., 2017).

Tablica 2. Prednosti i ograničenja obrade hrane visokim hidrostatskim tlakom (prema Balasubramaniam i sur., 2015; Huang i sur., 2017)

Utjecaji	Prednosti	Ograničenja
Hidrostatski tlak	• brz • trenutna ravnomjerna raspodjela tlaka kroz cijeli uzorak	• šaržna ili polukontinuirana operacija
Toplinska raspodjela	• minimalno ili smanjeno izlaganje toplini • trenutno povišenje temperature i posljedično hlađenje prilikom dekompresije	• korak predgrijavanja za proces tlakom potpomognutog termalnog procesiranja (PATP) • neravnomjerna raspodjela topline tijekom PATP
Fizikalna kompresija	• pogodno za namirnice s visokim sadržajem vode	• nije pogodno za proizvode koji sadrže dijelove s različitim stupnjevima kompresibilnosti
Rukovanje proizvodom	• pogodno za tekuće namirnice	• limitirana manipulacija uslijed šaržnog rada • nije pogodno za praškaste namirnice s malim udjelom vode kao ni proizvode s velikom količinom mjehurića zraka • ambalaža je limitirana na plastične materijale • većina proizvoda tretiranih VHT-om mora biti skladištena i distribuirana pod sniženim temperaturama jer pri sobnoj/višoj temperaturi nije dovoljno efikasan za uništavanje spora patogena poput <i>Clostridium botulinum</i>
Vrijeme procesiranja	• neovisno o veličini i obliku namirnice	
Funkcionalnost	• mogućnost formulacije novih proizvoda uslijed tlakom potpomognute denaturacije proteina, želatinizacije ugljikohidrata i kristalizacije masti	
Brzina procesa	• uz neka ograničenja tlaka i temperature tijekom procesa, primjena većih tlakova generalno pospješuje inaktivaciju mikroorganizama	• promjenjiva učinkovitost u inaktivaciji različitih enzima • primjena samog tlaka nije dovoljna za inaktivaciju bakterijskih spora
Prihvatljivost kod potrošača	• prihvatljivo kao fizikalni proces	• visoki troškovi opreme i šaržni rad • nedostatak propisa vezanih uz primjenu VHT-a na pojedine namirnice kao i nedostatak mikrobioloških kriterija

2.5.1. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka

Tretman visokim hidrostatskim tlakom se zasniva na tri fundamentalna principa: Le Chatelierov princip, izostatički (Pascalov) princip te princip mikroskopskog uređenja (Elamin i sur., 2015). Le Chatelierov princip govori da djelovanje povišenog tlaka na zatvoreni sustav favorizira one reakcije koje dovode do smanjenja volumena, dok se potiskuju one reakcije koje vode povećanju volumena (Rastogi, 2013). Upravo zato VHT utječe na one kemijske interakcije gdje je energija vezanja ovisna o udaljenosti atoma. Iz tog razloga VHT utječe na vodikove veze i van der Waalsove interakcije, dok na kovalentne veze nema utjecaja (Balasubramaniam i sur., 2015). Zahvaljujući takvome djelovanju, karakteristike namirnica poput okusa, arome, boje i nutritivnog sastava ostaju slične kao u netretiranim proizvodima (Rastogi, 2013). S druge strane, izostatički, tj. Pascalov princip govori da je raspodjela tlaka proporcionalna u svim dijelovima tretirane namirnice, neovisno o njezinom obliku ili veličini (Rastogi, 2013). S druge strane, hrana koja u sebi sadrži mjehuriće zraka nije pogodna za ovakav tretman jer može doći do narušavanja oblika uslijed različite kompresibilnosti vode i zraka (Balasubramaniam i sur., 2015). Princip mikroskopskog uređenja govori kako pri konstantnoj temperaturi, povećanje tlaka dovodi do povećanja stupnja uređenosti neke molekule (Elamin, 2015).

Uslijed djelovanja VHT-a dolazi do adijabatskog zagrijavanja, odnosno povišenja temperature unutar tretiranog uzorka. Intenzitet povišenja temperature ovisi o kompresibilnosti namirnice, njezinim toplinskim svojstvima, početnoj temperaturi i ciljanom tlaku. Tako povišenje temperature za svakih 100 MPa u namirnicama s visokim udjelom vode iznosi približno 3 °C, za losos 3,2 °C, a sojino ulje 12,01 °C (Balasubramaniam i sur., 2015).

Otpornost mikroorganizama na procesiranje VHT-om značajno ovisi o vrsti mikroorganizama pa tako blaži tretmani (400-600 MPa) pri sobnoj temperaturi ili nižoj su dostatni za inaktivaciju raznih patogenih bakterija i bakterija kvarenja, kvasaca, plijesni i virusa, dok su tretmani od 400-600 MPa uz povišenje temperature iznad 70 °C efikasni i za inaktivaciju bakterijskih spora. S druge strane, blagi tretman VHT-om (100-400 MPa) uz temperaturu od 20-50 °C može potaknuti germinaciju spora, čime će novonastale bakterijske stanice u vegetativnom obliku bivati manje otporne na tretman visokim tlakom (Balasubramaniam i sur., 2015).

Nadalje, Gram-pozitivne bakterije su otpornije na VHT tretman od Gram-negativnih bakterija, isto kao i bakterije u stacionarnoj fazi u odnosu na one u eksponencionalnoj fazi

rasta. Slično kao i kod toplinskih tretmana, red redukcije mikroorganizama je uvjetovan sastavom namirnice, njezinom pH vrijednošću te aktivitetom vode (Balasubramaniam i sur., 2015). Djelovanje VHT-a također ima utjecaj i na pH vrijednost namirnica pa tako povišenje tlaka za svakih 100 MPa snižava pH vrijednost soka od jabuke za 0,2. Povišenje ili sniženje pH vrijednosti je potrebno utvrditi za svaku namirnicu (Farkas i Hoover, 2000). Obzirom da pH vrijednost ima važnu ulogu u želatinizaciji, aktivnosti enzima, denaturaciji proteina i kinetici inaktivacije mikroorganizama, većina mikroorganizama se nije u stanju oporaviti od ovakvog pada pH vrijednosti (Balasubramaniam i sur., 2015).

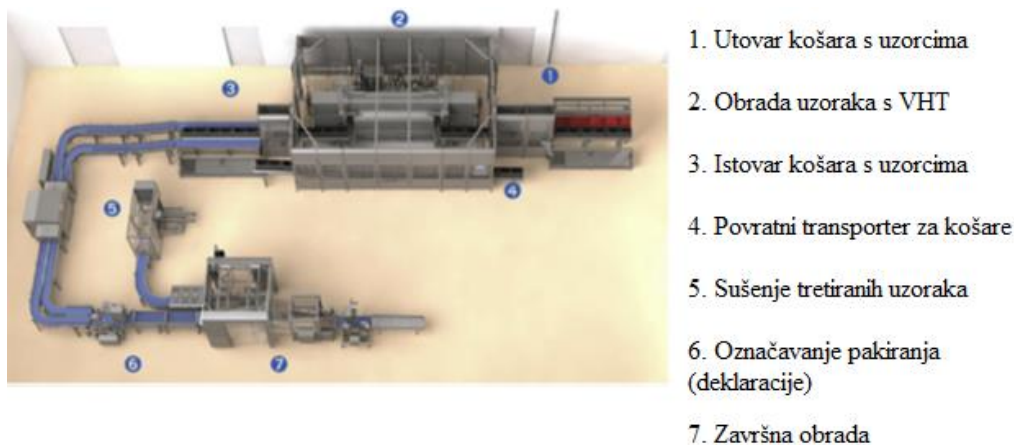
Namirnice koje se obrađuju visokim hidrostatskim tlakom se pakiraju u ambalažu prije tretmana te taj materijal mora imati svojstvo kompresibilnosti od minimalno 15 % pa tako u obzir dolaze samo plastični materijali. Važno je nadodati kako efekt obrade VHT-om ne ovisi o volumenu ili veličini pakovina pa se tako istovremeno mogu tretirati proizvodi različitih volumena. Također, primjena ovakve metode omogućuje plasiranje proizvoda na tržište bez dodanih konzervansa jer sam VHT omogućuje mikrobiološku sigurnost proizvoda (Huang i sur., 2017).

2.5.2. Perspektiva primjene tehnologije visokog hidrostatskog tlaka u industriji

U posljednje vrijeme su razni proizvođači opreme u SAD-u, Španjolskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu, Japanu i Kini razvili prikladnu opremu za obradu namirnica VHT-om za industrijske potrebe. To su vertikalni ili horizontalni tipovi VHT uređaja, ali zbog jednostavnijeg procesa punjenja i pražnjenja, u industriji se uglavnom koriste horizontalni tipovi (Slika 4). Većina industrija koja koriste VHT tehnologiju se nalazi u Sjevernoj Americi (54 %), Europi (25 %) i Aziji (12 %) (Huang i sur., 2017). Troškovi industrijskog postrojenja za VHT obradu približno iznose od 0,5 do 2,5 milijuna USD, ovisno o kapacitetu i rasponu radnih parametara, no smatra se da se kroz 2 do 3 godine proizvodnje uloženi trošak može opravdati. Svjetsko tržište hrane obrađene s VHT doseglo je 9,8 milijardi USD u 2015. godini, a pretpostavlja se da će do 2025. godine doseći 54,77 milijardi USD (Anonymous 3, 2015).

VHT tehnologijom se uglavnom obrađuju mesni i mliječni proizvodi, proizvodi od voća i povrća te razni tekući proizvodi i napici uz godišnju proizvodnju od približno 500.000 tona. Trenutno prvo mjesto u proizvodnji zauzimaju ready-to-eat mesni proizvodi, ali veliki potencijal pokazuju sokovi uslijed sve učestalije potražnje potrošača za konzumacijom

proizvoda sa što manje dodanih sastojaka i što manje procesiranja pa tako upravo u VHT sokovima proizvođači vide veliku ekonomsku priliku (Huang i sur., 2017).



Slika 4. Horizontalni sustav za obradu visokim hidrostatskim tlakom (Multivac Inc., Njemačka) (Huang i sur., 2017)

2.5.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na nutritivni sastav sokova i smoothie-sokova

Andrés i sur. (2016) su istraživali utjecaj VHT-a i pasterizacije na bioaktivne spojeve i antioksidacijsku aktivnost smoothie-soka pripremljenog od sokova naranče, papaje i dinje te kaše mrkve i sojinog mlijeka. Uzorci su tretirani tlakovima od 550 i 650 MPa na temperaturi od 20 °C tijekom 3 minute (VHT) te temperaturom od 80 °C kroz 3 minute (pasterizacija). Zabilježili su porast koncentracije ukupnih karotenoida u uzorcima tretiranim VHT-om u odnosu na netretirani uzorak (6 % za tretman pri 550 MPa i 7 % pri 650 MPa) što je vjerojatno posljedica djelovanja visokog tlaka na membrane biljnih stanica čime je omogućena veća ekstrakcija karotenoida. Kod pasteriziranih uzoraka primijećen je pad ukupnih karotenoida za 3 % u odnosu na netretirani uzorak.

Nadalje, polifenolni sastav ovakvog smoothie-soka uglavnom čine kafeinska kiselina, narirutin, hesperidin, *p*-kumarinska kiselina, klorogenska kiselina, daidzin te genistein. Kafeinska kiselina, narirutin i hesperidin nisu značajno promijenili svoju koncentraciju nakon tretmana VHT-om, dok je ostatak spojeva ostao stabilan. S druge strane, pasterizacija je značajno utjecala na gubitak klorogenske kiseline i to za 18 %.

Što se tiče sadržaja vitamina C, pad koncentracije od 6 % je zamijećen u pasteriziranim uzorcima, dok gotovo da i nije bilo razlike u koncentraciji netretiranih uzoraka i uzoraka tretiranih VHT-om, čime se potvrđuje pozitivan utjecaj VHT tehnologija na stabilnost ovog vitamina. Pad koncentracije vitamina C za 44 % u odnosu na nulti dan kod pasteriziranih uzoraka je zamijećen nakon skladištenja kroz period od 45 dana na temperaturi od 4 °C, što je dobar pokazatelj oksidativne razgradnje. Pad koncentracije vitamina C tijekom perioda skladištenja kod uzoraka tretiranih VHT-om iznosio je oko 43 % za obje vrijednosti tlaka.

Antioksidacijska aktivnost ovog smoothie-soka mjerena je FRAP i DPPH testom. U oba slučaja, testovi su pokazali rast antioksidacijske aktivnosti kod uzoraka tretiranih VHT-om u odnosu na netretirane uzorke (2,9 % VHT-550 i 6,6 % za VHT-650 kod FRAP, 3,8 % za VHT-550 i 5,4 % za VHT-650 kod DPPH). U oba slučaja je primijećen pad antioksidacijske aktivnosti kod pasteriziranih uzoraka u odnosu na netretirane uzorke.

Polydera i sur. (2005) su istraživali utjecaj VHT (600 MPa, 40 °C 4 min) i pasterizacije (80 °C, 60 s) na antioksidacijsku aktivnost soka od naranče (grčke sorte Navel). Antioksidacijska aktivnost uzorka (ABTS) tretirana VHT-om je duplo veća, nego ona u pasteriziranim uzorcima. Također, promatrali su i stabilnost antioksidacijske aktivnosti kroz period skladištenja od 1 do 3 mjeseca, ovisno o temperaturi skladištenja, čime su došli do zaključka da je VHT tretman od 600 MPa/40 °C/4 min optimalan za očuvanje antioksidacijske aktivnosti kroz period skladištenja u odnosu na pasterizaciju pri 80 °C/60 s. Obzirom da je za antioksidacijsku aktivnost soka od naranče najzaslužniji vitamin C, smanjenje antioksidacijske aktivnosti kroz period skladištenja je uzrokovano upravo njegovom degradacijom. U Tablici 3 dan je pregled literaturnih istraživanja gdje je praćen utjecaj VHT-a na bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet odabranih sokova i smoothie-sokova.

Tablica 3. Pregled utjecaja VHT-a na bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet sokova i smoothie-sokova

Uzorak	VHT tretman	Bioaktivni spojevi	Zaključak	Referenca
Sok crnog dudu (<i>Morus nigra</i> L.)	200-600 MPa 20 minuta 25 °C	Antocijani	Identificirana dva nova antocijana, pelargonidin-3-O-kumaroilglukozid (0,46 %) i delphinidin-3-O-kumaroilglukozid (5,8 %), u uzorcima tretiranim pri 200 MPa. Delphinidin-3-O-kumaroilglukozid je detektiran i pri 400 MPa u količini od 5,38 % dok pri 600 MPa nema detekcije novih antocijana	Engmann i sur., 2013
Smoothie-sok: rajčica (33 %), zelena paprika (17 %), celer (8,5 %), krastavac (4 %), mrkva (4 %), luk (4 %), limun (1,7 %), sol (1,7 %), ekstra djevičansko malinovo ulje (0,8 %) i voda	100-400 MPa 120-540 sekundi < 30 °C	Vitamin C Ukupni fenoli	Visoki stupanj zadržavanja vitamina C u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane. Nema značajne razlike u količini ukupnih fenola između tretiranih i netretiranih uzoraka	Barba i sur., 2010
Sok indijske jabuke (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	250-400 MPa 3-7 minuta 25 °C	Vitamin C Vodotopljivi polifenoli Antioksidacijski kapacitet	Nema promjene vitamina C u odnosu na netretirane uzorke Uzorci procesirani 3 i 5 minuta pokazuju porast hidrofilnih polifenola. Porast antioksidacijskog kapaciteta pri 250 MPa/3 min.	Queiroz i sur., 2010
Smoothie sok: kivi (33 %), mango (13,5 %), naranča (40 %), ananas (13,5 %). 75 % takvog soka je potom pomiješano sa šećerom (7,5 %) i kravljim, odnosno sojinim mlijekom (17,5 %).	400 MPa 5 minuta 40 °C	Vitamin C	Biodostupnost vitamina C u uzorcima tretiranim VHT-om se nije promijenila u odnosu na netretirane uzorke	Rodríguez-Roque i sur., 2015

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje eksperimentalnog dijela pripreme diplomskog rada korištene su sljedeće komercijalno dostupne sirovine:

- jabuka sorte „Zlatni Delišes“ (*Malus domestica* L. cv. Golden Delicious) (Fragaria d.o.o, Hrvatska);
- mrkva (*Daucus carota* L.) (iz trgovačke mreže);
- pasterizirani sok od aronije (*Aronia melanocarpa* L.) OPG-a Obitelj Maletić (Hrvatska);
- kaša indijanske banane (*Asimina triloba* L.);
- napitak od badema (Alpro, Danone, Belgija) (sastojci: voda, šećer, bademi (2 %), trikalcijev fosfat, morska sol, stabilizatori (karuba guma, gellan guma), emulgator (suncokretov lecitin), vitamini (riboflavin (B2), B12, E, D2) (Tablica 4).

Tablica 4. Nutritivni sastav bademovog napitka korištenog u pripremi smoothie sokova u 100 mL

Energija	102 kJ/24 kcal
Masti	1,1 g
zasićene	0,1 g
monozasićene	0,8 g
polinezasićene	0,2 g
Ugljikohidrati	3 g
šećeri	3 g
Vlakna	0,2 g
Bjelančevine	0,5 g
Sol	0,14 g
Vitamini	
vitamin D	0,75 µg
vitamin B2	0,21 mg
vitamin B12	0,38 µg
vitamin E	18,0 mg
Minerali	
kalcij	120 mg

Do trenutka pripreme smoothie sokova, jabuka, mrkva i napitak od badema su bili pohranjeni u hladnjaku na temperaturi od 4 °C, dok su se sok od aronije i kaša indijanske banane skladištili pri -18 °C i odmrzavali po potrebi neposredno prije pripreme uzorka. Od navedenih sirovina pripremljeni su smoothie sokovi koji su tretirani visokim hidrostatskim tlakom i klasičnim postupkom pasterizacije te su isti pohranjeni u hladnjak na 4 °C kroz sljedećih 7, 14, odnosno 21 dan, dok je netretirani uzorak predstavljao kontrolni uzorak (nulti dan).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema smoothie soka

Za proizvodnju soka od jabuke korišten je sokovnik za hladno prešanje TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 (300 W, brzine okretaja 80 rpm, promjera filtera 0,3 mm). Prije samog prešanja, jabuke su oprane, izrezane u četvrtine te su im uklonjene peteljke i sjemene lože. Za proizvodnju soka od mrkve korišten je sokovnik BOSCH MES 4000 snage 1000 W i promjerom filtra 0,5 mm, a mrkve su prije toga oprane, oguljene i narezane na komade približne duljine 3 do 5 cm. Sok od aronije, kao i kaša indijanske banane su neposredno prije pripreme smoothie sokova odmrznuti, a smoothie sokovi su potom pripremljeni miješanjem osnovnih sastojaka prema prethodno definiranoj recepturi (Tablica 5). Kako bi se poštivali zadani udjeli sastojaka prema recepturi, potrebni volumeni sokova od jabuke, mrkve, aronije te napitka od badema su izmjereni menzurom, dok je kaša indijanske banane izvagana na analitičkoj vagi KERN ABS. Svi sastojci su potom homogenizirani štapnim mikserom SIEMENS MQ 33001, snage 170 W u staklenoj čaši volumena 2 L. Pripremljeni smoothie sok prebačen je u adekvatne plastične bočice do vrha koje su potom podvrgnute tretmanu visokog hidrostatskog tlaka (jedna bočica volumena 500 mL i jedna bočica volumena 50 mL za svaku šaržu VHT tretmana), dok je smoothie sok predviđen za tretman pasterizacijom prebačen u staklene bočice volumena 500 mL. Uzorak smoothie soka koji nije podvrgnut niti jednom tretmanu (kontrolni uzorak), također je prebačen u plastičnu bočicu volumena 500 mL i odmah podvrgnut analizama.

Tablica 5. Receptura smoothie soka

Sastojak	Udio (%)
Sok od jabuke	50
Sok od mrkve	20
Sok od aronije	5
Indijanska banana	10
Bademovo mlijeko	15

3.2.2. Obrada smoothie sokova visokim hidrostatskim tlakom

Pripremljeni smoothie sok tretiran je visokim hidrostatskim tlakom (VHT) pomoću uređaja za obradu visokim hidrostatskim tlakom STANSED FLUID POWER (Velika Britanija) (Slika 5). Uzorci smoothie soka u plastičnoj boci (Slika 7A) se neposredno prije VHT tretmana vakumiraju u plastične vrećice u uređaju za vakuumiranje STATUS SV2000, kako tijekom VHT obrade ne bi došlo do ulaska tlačne tekućine u boce s uzorkom. Boce se potom postavljaju u radni cilindar te se započinje s tretmanima prema planu u Tablici 6.



Slika 5. Uređaj za obradu VHT-om STANSED FLUID POWER (Velika Britanija) (Burcar, 2019)

Tablica 6. Plan pokusa tretiranja smoothie sokova

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

3.2.3. Obrada smoothie sokova pasterizacijom

Pasterizacija smoothie sokova provedena je u šaržnom pasterizatoru (Slika 6) ukupne snage grijača 6 kW (2x3 kW) (PS-100, Oprema Ludbreg d.o.o. Hrvatska) prema režimu prethodno opisanom u literaturi za smoothie sokove: 85 °C tijekom 7 min (Hurtado i sur., 2019). Uzorci su obrađeni u zatvorenim staklenim bocama volumena 500 mL, koje su postavljene u vodenu kupelj uređaja (Slika 7B). Pasterizirani smoothie sokovi su prema planu pokusa (Tablica 6) podvrgnuti zadanim režimima skladištenja.



Slika 6. Šaržni pasterizator PS-100 (Burcar, 2019)



Slika 7. Uzorci smoothie sokova tretirani visokim hidrostatskim tlakom (A) i pasterizacijom (B)

3.2.4. Izolacija polifenolnih spojeva iz smoothie sokova

Aparatura i pribor:

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

- Odmjerna tikvica, volumena 25 mL
- Filter papir

Otapala i reagensi:

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

Postupak ekstrakcije:

U svim uzorcima smoothie sokova, bilo tretiranim VHT ili pasterizacijom, kao i kontrolnom uzorku, postupak ekstrakcije proveden je na isti način. Na analitičkoj vagi se u plastičnu kivetu odvaže približno 5 g ($\pm 0,0001$) smoothie soka te se dodaje 20 mL 96 %-tnog etanola. Uzorak s otapalom u plastičnoj kiveti se potom ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji frekvencije 40 kHz pri 50 °C tijekom 10 minuta. Po završetku ekstrakcije smjesa se pomoću staklenog lijevka i filter papira profiltrira u odmjernu tikvicu volumena 25 mL i nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake. Ekstrakt se potom prebaci u čistu plastičnu kivetu od 50 mL i skladišti na temperaturi od 4 °C do provedbe analiza.

3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip metode:

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 320 nm, odnosno 360 nm (Howard i sur., 2003).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Kvarcne kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf (1000 μ L i 5000 μ L)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 100 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete

- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Metanol, 100 %-tni
- Metanol, 80 %-tni
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} HCl (u 96 %-tnom etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L^{-1} HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake

- Standard klorogenske kiseline (100 mg L^{-1})

Priprema: 10 mg standarda klorogenske kiseline se odvažuje u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu te se potom tikvica nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg/L . Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina se apsorbancija mjeri na 320 nm, a za određivanje ukupnih flavonola se apsorbancija mjeri na 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima jednaki volumen ekstrakcijskog otapala (96 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca

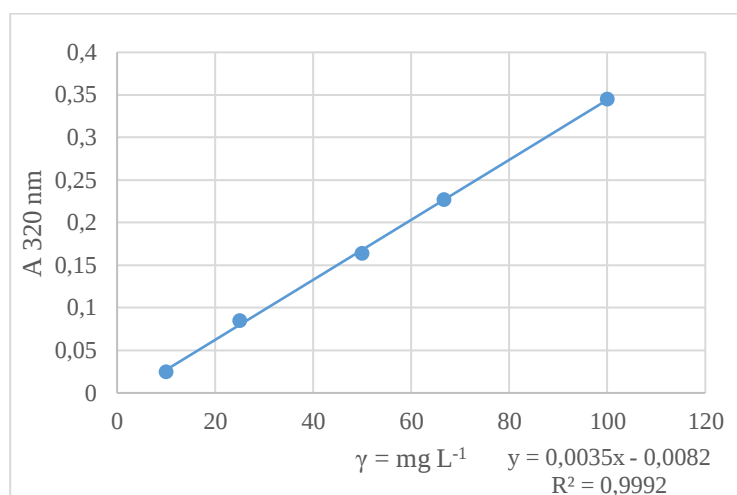
Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercentin.

a) Ukupne hidroksicimetne kiseline

Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline (100 mg L^{-1}) pripremljena su sljedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i $66,7 \text{ mg L}^{-1}$ na način da je iz početne alikvotne otopine redom otpipetirano 1, 2,5, 5 i $6,67 \text{ mL}$ u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopunjeno je 80%-tnim metanolom do oznake. U staklenu epruvetu je potom otpipetirano redom $250 \text{ }\mu\text{L}$ otopine standarda, $250 \text{ }\mu\text{L}$ $1 \text{ g L}^{-1} \text{ HCl}$ u 96 %-tnom etanolu i $4,55 \text{ mL}$ $2 \text{ g L}^{-1} \text{ HCl}$. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm .

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacrtava baždarni pravac (Slika 8) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije klorogenske kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm .

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \cdot X - 0,0082$$

gdje je:

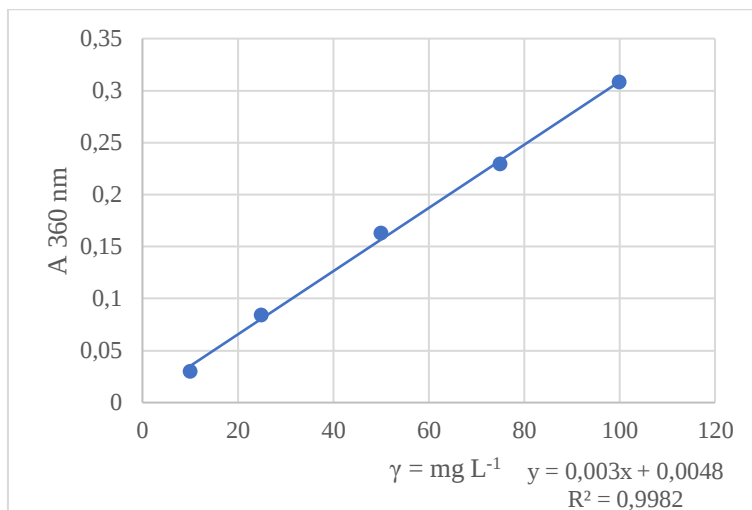
Y – apsorbancija pri 320 nm

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije

b) Određivanje ukupnih flavonola

Iz alikvotne otopine standarda kvercentina (100 mg L^{-1}) pripremljena su sljedeća razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25 i 50 mg L^{-1} na način da je iz početne alikvotne otopine redom otpipetirano 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopunjeno je 100 %-tnim metanolom do oznake. U staklenu epruvetu je potom otpipetirano redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacрта baždarni pravac (Slika 9) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije kvercentina (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 360 nm. Koncentracija ukupnih flavonola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje ukupnih flavonola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0031 \cdot X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm

X – koncentracija kvercentina (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.6. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete (100 i 1000 μL)
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi

- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Destilirana voda
- Aluminijski klorid, 10 %-tni

Priprema: 1 g aluminijskog klorida se otopi u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 1M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata se otopi u 10 mL destilirane vode i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom

- Standard kvercentina (100 mg L^{-1})

Priprema: 10 mg standarda kvercentina se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu te se potom tikvica nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom

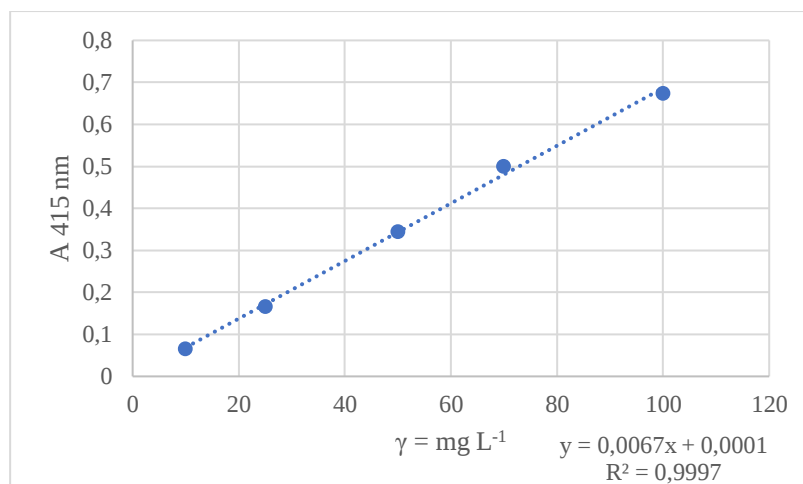
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 96 %-tni etanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje jednaki volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa stoji 30 minuta nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 415 nm.

Izrada baždarnog pravca

Iz alikvotne otopine standarda kvercentina (100 mg L^{-1}) pripremljena su sljedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1} na način da je iz početne alikvotne otopine redom otpipetirano 1, 2,5, 5 i 7,5 mL u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopunjeno je 100 %-tnim metanolom do oznake. U staklenu epruvetu se iz svake tikvice otpipetira 0,5 mL otopine standarda, zajedno s 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje jednaki volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa stoji 30 minuta nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacrtava baždarni pravac (Slika 10) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercentina (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm.

Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje ukupnih flavonoida

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0067 \cdot X + 0,0002$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm

X – koncentracija kvercentina (mg L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

4. RASPRAVA I REZULTATI

Svrha ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj tehnologije visokog hidrostatskog tlaka na stabilnost polifenolnih spojeva u smoothie-sokovima pripremljenim od sokova jabuke, mrkve i aronije, kaše indijanske banane te bademovog mlijeka kroz period skladištenja od 21 dan pri 4 °C. Obzirom na sastav smoothie-sokova, a koji podrazumijeva kombinaciju različitih vrsta voća te povrće i bademovo mlijeko, promatrani polifenolni spojevi uključivali su određivanje ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina, kako bi se što bolje utvrdila efikasnost ove tehnologije na stabilnost različitih podskupina polifenolnih spojeva. S ciljem procjene učinkovitosti netermalne tehnologije na nutritivnu kvalitetu gotovih proizvoda, smoothie sokovi su obrađeni klasičnim postupkom toplinske pasterizacije pri 85 °C tijekom 7 minuta, kakav se najčešće primjenjuje u industriji te su svi uzorci obrađeni pasterizacijom i visokim hidrostatskim tlakom uspoređeni s kontrolnim (netretiranim uzorkom). Svi rezultati prikazani su kao prosječne vrijednosti dvaju paralelnih određivanja $\pm$ standardna devijacija, dok je porast i/ili gubitak masenih udjela određenih polifenolnih spojeva iskazan u postocima.

4.1. UKUPNI FLAVONOIDI

Tablica 7 prikazuje izračunate masene udjele ukupnih flavonoida u netretiranom uzorku te pasteriziranim uzorcima, kao i uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja. Ako se usporedi sadržaj ukupnih flavonoida kontrolnog uzorka sa sadržajem pasteriziranih i uzorka tretiranih VHT-om kod nultog dana, može se zamijetiti povećanje masenog udjela kod pasteriziranog uzorka (15,9 %) te značajno smanjenje kod uzoraka tretiranih VHT-om (26,6 % za VHT 1, 34,8 % za VHT 2, 23,5 % za VHT 3 i 11,1 % za VHT 4). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjem Ma i sur. (2019) koji su za fermentirani sok od šipka utvrdili gubitke ukupnih flavonoida od 12,93 % do 20,21 % uslijed VHT tretmana pri 400, 500 i 600 MPa tijekom 10 min. U odnosu na pasterizirani uzorak, pad masenog udjela uzoraka tretiranih VHT-om iznosi redom 38,3 % (VHT 1), 45,2 % (VHT 2), 35,64 % (VHT 3) te 25,2 % (VHT 4) što je u prosjeku pad od 35,1 %. Povećanje masenog udjela kod pasteriziranog uzorka je u skladu s rezultatima istraživanja provedenom na soku od mandarine gdje je pasterizacija (65 °C/15 s, 85 °C/15 s, 92 °C/30 s) pogodovala povećanju koncentracije ukupnih flavonoida u odnosu na netretirani uzorak, dok tretman s VHT-om (150 MPa/15 s/68 °C) nije pokazao povećanje (Sentandreu i sur., 2019). Prema Jung i sur. (2013), veće vrijednosti VHT 3 i VHT 4 u odnosu na vrijednosti VHT 1 i VHT 2 su potencijalno posljedica povećanja tlaka čime se povećava propusnost

stanica što omogućuje oslobađanje veće količine ukupnih flavonoida. Niže vrijednosti masenog udjela ukupnih flavonoida u uzorcima tretiranim VHT-om (100, 200, 300, 400, 500 MPa/10 min) u odnosu na netretirani uzorak zabilježeni su i kod jagoda gdje je došlo do smanjenja sadržaja ukupnih flavonoida za 20-50 %, ovisno o tretmanu (Núñez-Mancilla i sur., 2013).

Ipak, u literaturi se mogu iznaći i primjeri koji navode kako VHT tretman može utjecati na povećanje bioaktivnih spojeva u tretiranoj namirnici. Primjerice, Sánchez-Moreno i sur. (2003) su sok od naranče tretirali prema sljedećem režimu: 100 MPa/60 °C/5 min, 350 MPa/30 °C/2,5 min i 400 MPa/40°C/1 min. Nakon tretmana su uzorci skladišteni na temperaturi od 4 °C kroz period od 10 dana te su analizirani 1., 3., 6. i 10. dan skladištenja. Uzorci su analizirani na koncentracije flavanona karakterističnih za naranču, naringenin i hesperidin, prije, neposredno nakon tretmana te nakon perioda skladištenja tretiranih uzoraka. Također, pomoću DPPH testa su određivali promjene u antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka. Zabilježen je rast količine naringenina pri 350 MPa, odnosno 400 MPa za 13, odnosno 12 % te količine hesperidina za 34, odnosno 22 %. Pretpostavka je da je do povećanja došlo uslijed povećane permeabilnosti stanične stijenke stanica tkiva naranče i otpuštanja fenola iz fenol-protein strukture kao posljedica djelovanja povišenog tlaka. Što se tiče antioksidacijske aktivnosti, nije zamijećen pad kod tretiranih uzoraka u odnosu na netretirane uzorke.

Tijekom perioda skladištenja sadržaj ukupnih flavonoida varira za svaki od uzoraka pa tako kod 7. dana skladištenja maseni udio pada kod pasteriziranog uzorka (24,6 %) i VHT 4 (6,7 %), a raste za VHT 1, VHT 2 i VHT 3 s tim da je najveća razlika kod uzorka VHT 2 gdje je došlo do povećanja za 47,4 %. 14.-og dana skladištenja je došlo do povećanja masenog udjela kod pasteriziranog uzorka i VHT 1 te pada kod VHT 2, VHT 3 i VHT 4. 21.-og dana skladištenja može se uočiti porast masenog udjela ukupnih flavonoida kod svih uzoraka izuzev uzorka VHT 1, gdje je došlo do pada masenog udjela za 23,5 % u odnosu na 14. dan.

Shen i sur. (2016) su zabilježili da je sadržaj ukupnih flavonoida kod pasteriziranog uzorka (100 °C/10 min) indijske žižule (*Ziziphus jujuba* Mill.) manji nakon skladištenja od 40 dana na temperaturi od 4 °C nego kod uzoraka tretiranih VHT-om (400, 500, 600 MPa/20 min), što je u skladu s rezultatima u Tablici 7.

Tablica 7. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (mg 100 g⁻¹) u kontrolnom, pasteriziranom te uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja

Tretman	Skladištenje (dani)			
	0	7	14	21
Kontrola	54,38 ± 4,06	/	/	/
Pasterizacija	64,67 ± 0,51	48,76 ± 8,14	53,87 ± 0,00	58,40 ± 5,59
VHT 1	39,90 ± 11,92	44,93 ± 4,59	51,60 ± 14,23	39,47 ± 4,07
VHT 2	35,44 ± 4,58	52,27 ± 5,62	38,49 ± 6,07	48,10 ± 11,61
VHT 3	41,62 ± 2,48	53,55 ± 13,16	36,49 ± 0,00	41,73 ± 3,06
VHT 4	48,36 ± 0,00	45,11 ± 2,52	33,16 ± 0,50	43,76 ± 5,55

*VHT 1 (350 MPa/5 min); VHT 2 (350 MPa/15 min); VHT 3 (450 MPa/5 min); VHT 4 (450 MPa/15 min)

Picouet i sur. (2016) su smoothie-sok načinjen od jabučnog i narančinog soka, kaše jagode, pulpe i soka jabuke te kaše banane tretirali VHT-om (350 MPa, 5 min) i blagom pasterizacijom (80 °C, 7 min) te skladištili u mraku pri 4 °C tijekom 21 dan. Utjecaj VHT-a i termičke pasterizacije uspoređen je obzirom na sadržaj vitamina C, flavonoide i ukupne fenole te mikrobiološku i enzimsku aktivnost (POD, PPO, PME). Rezultati za fizikalno-kemijske parametre i instrumentalnu boju upućuju na nižu stabilnost VHT smoothie-sokova u usporedbi s pasteriziranim uzorcima tijekom skladištenja što potvrđuje činjenicu da VHT ne može u potpunosti osigurati enzimsku inaktivaciju te da su po provedbi VHT-a mogući određeni oksidacijski procesi. VHT tretman je povoljnije djelovao na stabilnost vitamina C u usporedbi s pasterizacijom, no tijekom skladištenja, značajnije razlike u degradaciji za oba tretmana nisu uočene (65 % za VHT i 61 % za pasterizaciju). Autori pojašnjavaju da nižoj stabilnosti vitamina C u VHT uzorcima može doprinijeti zaostala enzimska aktivnost (POD, PPO, PME) (Perera 2007). Nadalje, ukupni sadržaj fenola i flavonoida nije se značajno razlikovao u uzorcima obiju tretmana u 0.-tom danu skladištenja. Flavonoidi su pokazali dobru stabilnost tijekom 21.-og dana skladištenja, neovisno o tipu tretmana. Ipak, sadržaj ukupnih fenola u VHT uzorcima se uslijed skladištenja smanjio za 26 %. Slične su rezultate potvrdili Keenan i sur. (2010) za voćne smoothie-sokove tretirane VHT-om i termičkom pasterizacijom uslijed 30 skladištenja pri 4 °C.

Sveukupno gledajući, najveća razlika u masenom udjelu nultog i 21. dana skladištenja je kod pasteriziranog uzorka gdje je došlo do smanjenja masenog udjela od 9,7 % te kod VHT 2 gdje se sadržaj ukupnih flavonoida povećao za 35,7 %. Kod VHT 1 i VHT 3 je sadržaj gotovo

jednak i nakon 21 dana, a VHT 4 bilježi blaži pad masenog udjela. Prema tome, može se zaključiti da VHT tretmani od 5 min, neovisno o tlaku (350 MPa vs. 450 MPa) bolje pogoduju stabilnosti ukupnih flavonoida u smoothie uzorcima.

4.2. UKUPNI FLAVONOLI

Tablica 8 prikazuje izračunate masene udjele ukupnih flavonola u netretiranom uzorku te pasteriziranim uzorcima i uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja. Iz tablice je vidljivo da je došlo do pada sadržaja flavonola u svim tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak i to redom 26,0 % za pasterizirani uzorak, 38,4 % za VHT 1, 45,7 % za VHT 2, 34,0 % za VHT 3 i 15,9 % za VHT 4. Pad sadržaja flavonola pasteriziranih uzoraka zabilježen je i kod kaše od jabuke gdje on iznosi približno 36,4 % u odnosu na nepasterizirane uzorke (Hallmann i Rembiałkowska, 2007). Pad koncentracije flavan-3-ol derivata kod jabuke sorte „Zlatni Delišeš“ zabilježili su i Fernández-Jalao i sur. (2018), ali samo kod španjolskih sorti, dok su talijanske pokazale značajan porast flavan-3-ol derivata pri tlakovima od 500 i 600 MPa pri 5 min/35 °C. Također navode kako procesiranje može dovesti do epimerizacije, degradacije i depolimerizacije oligomera i polimera flavan-3-ola na sastavne monomerne jedinice.

Tablica 8. Maseni udjeli ukupnih flavonola (mg 100 g⁻¹) u kontrolnom, pasteriziranom te uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja

		Skladištenje (dani)		
Tretman	0	7	14	21
Kontrola	40,96 ± 2,15	/	/	/
Pasterizacija	30,29 ± 3,16	31,70 ± 0,45	23,73 ± 4,31	15,99 ± 3,62
VHT 1	25,25 ± 7,86	30,82 ± 2,72	28,23 ± 0,11	19,48 ± 1,25
VHT 2	22,24 ± 4,30	25,99 ± 1,48	22,77 ± 0,23	19,95 ± 0,11
VHT 3	27,02 ± 1,99	23,35 ± 0,34	21,56 ± 2,11	22,58 ± 2,16
VHT 4	34,43 ± 4,65	26,88 ± 0,11	24,27 ± 0,11	21,45 ± 2,02

*VHT 1 (350 MPa/5 min); VHT 2 (350 MPa/15 min); VHT 3 (450 MPa/5 min); VHT 4 (450 MPa/15 min)

7.-og dana skladištenja primijećen je daljnji pad masenih udjela ukupnih flavonola u uzorcima VHT 3 i VHT 4, dok je do blažeg porasta došlo kod uzorka VHT 2 i pasteriziranog

uzorka, a VHT 1 bilježi porast od 22,1 %. 14.-og i 21.-og dana skladištenja vidljiv je pad kod svih uzoraka u odnosu na rezultate od prethodnog tjedna uz iznimku uzorka VHT 3 koji bilježi blagi porast od 4,7 % 21.-og dana skladištenja u odnosu na 14. dan. Pasini i sur. (2019) su u svojem radu određivali utjecaj vremena skladištenja i ambalažnog materijala na sadržaj flavonola u soku od grožđa tretiranog VHT-om pri 600 MPa/3 min. Neovisno o ambalažnom materijalu, primijetili su konstantni pad koncentracije flavonola kroz period skladištenja od 2, 4 i 6 mjeseci. Ovaj trend je vidljiv i u Tablici 8, uz iznimku 7.-og dana kod uzorka VHT 2 te 21.-og dana kod uzorka VHT 3.

Uspoređujući dobivene vrijednosti ukupnih flavonola za pasterizirane i VHT uzorke za nulti i 21. dan skladištenja, primjećuje se pad masenog udjela kod svih rezultata gdje je najznačajniji pad vrijednosti zabilježen kod pasteriziranog uzorka i on iznosi 47,2 %. Najbolje očuvanje ukupnih flavonola kroz 21 dan skladištenja postignuto je kod uzorka VHT 3 (450 MPa/5 min) gdje je očuvanje u odnosu na kontrolni uzorak 55,1 %.

4.3. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE

Tablica 9 prikazuje izračunate masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina u netretiranom uzorku te pasteriziranim uzorcima i uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja. Ukoliko usporedimo masene udjele ukupnih HCK kontrolnog uzorka s tretiranim uzorcima kod nultog dana skladištenja, možemo zamijetiti pad masenih udjela ukupnih HCK. Pad je nešto veći kod uzoraka tretiranih VHT-om nego kod pasteriziranog uzorka (pad udjela ukupnih HCK. Pad je nešto veći kod uzoraka tretiranih VHT-om nego kod pasteriziranog uzorka (pad udjela kod VHT 1 u odnosu na pasterizirani uzorak iznosi 22,4 %, 29,7 % za VHT 2 i 14,7 % za VHT 3 što je u prosjeku 21,9 %) izuzev uzorka pri tretmanu od 450 MPa kroz 15 minuta. Pad masenog udjela za pasterizirani uzorak iznosi 14 %, dok za uzorke tretirane VHT-om iznosi redom 32,3 %, 39,6 %, 26,6 % te 11,3 % u odnosu na kontrolni uzorak. Sukladno tome, najbolje očuvanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina je evidentirano pri tlaku od 450 MPa kroz tretman od 15 minuta. Sličan trend su primijetili Fernández-Jalao i sur. (2018) promatrajući utjecaj VHT-a na HCK u jabuci sorte „Zlatni Delišeš“. Zamijetili su značajan pad HCK, ali se taj pad smanjuje povećanjem tlakova pa je tako najveći pad kod tlaka od 400 MPa/5 min/35 °C (38 %), a najmanji kod 600 MPa/5 min/35 °C (14 %). Moguće objašnjenje ovakvog trenda uključuje razgradnju kompleksnim polifenolnih struktura uslijed djelovanja enzima

polifenoloksidaze i peroksidaze, a njihova aktivnost ovisi o parametrima VHT-a, kombinaciji VHT-a s temperaturom te o karakteristikama samog materijala.

Tablica 9. Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u kontrolnom, pasteriziranom te uzorcima tretiranim VHT-om tijekom skladištenja

		Skladištenje (dani)		
Tretman	0	7	14	21
Kontrola	$51,51 \pm 2,60$	/	/	/
Pasterizacija	$44,29 \pm 3,29$	$44,05 \pm 3,31$	$35,38 \pm 5,62$	$25,80 \pm 5,21$
VHT 1	$34,86 \pm 6,95$	$42,76 \pm 2,31$	$37,22 \pm 0,10$	$28,85 \pm 2,01$
VHT 2	$31,14 \pm 5,51$	$36,09 \pm 0,40$	$30,92 \pm 0,40$	$30,01 \pm 0,60$
VHT 3	$37,80 \pm 2,94$	$33,48 \pm 0,60$	$29,81 \pm 3,04$	$32,34 \pm 2,82$
VHT 4	$45,70 \pm 4,80$	$36,27 \pm 0,60$	$32,92 \pm 0,39$	$30,07 \pm 2,49$

*VHT 1 (350 MPa/5 min); VHT 2 (350 MPa/15 min); VHT 3 (450 MPa/5 min); VHT 4 (450 MPa/15 min)

S druge strane, Dereli i sur. (2015) su proučavali utjecaj pasterizacije na bioaktivne spojeve soka od mrkve te su zamijetili porast koncentracije HCK pri tretmanu $90 \text{ }^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$. Ističu da je porast moguć uslijed oslobađanja polifenolnih spojeva te istovremene inhibicije polifenol oksidaze. Sličan trend primjećuju i Herceg i sur. (2016) prilikom pasterizacije soka od šipka gdje se pasterizacijom sadržaj HCK povećao za 29,55 % u odnosu na netretirani uzorak.

Skladištenjem pasteriziranog uzorka kroz period od 7 dana gotovo i da nema promjene u koncentraciji ukupnih HCK u odnosu na nulti dan, što potvrđuje da su ukupne HCK stabilne u pasteriziranim uzorcima. Slične rezultate navode Wilkes i sur. (2014), koji su utvrdili minimalne promjene koncentracije ukupnih HCK prilikom pasterizacije soka od aronije, a također iznose kako je i koncentracija stabilna kroz period skladištenja od mjesec dana na sobnoj temperaturi.

Kod uzoraka tretiranih tlakom od 350 MPa je došlo do povećanja koncentracije ukupnih HCK i to za 22,7 % za tretman od 5 minuta te 15,9 % za tretman od 15 minuta u odnosu na nulti dan. Kod uzoraka tretiranih VHT-om od 450 MPa zabilježen je pad koncentracije za oba uzorka. Andrés i sur. (2016) primjećuju porast koncentracije *p*-kumarinske kiseline tijekom skladištenja tretiranog smoothie-soka (550 MPa/3 min) pripravljenog od soka od naranče, soka od papaje, soka od dinje, kaše mrkve i sojinog mlijeka u periodu od 45 dana pri temperaturi od $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ u odnosu na nulti dan. 14. dan je zabilježen pad masenih udjela HCK u svim uzorcima u

odnosu na 7. dan pa je tako najveći pad evidentiran za tretman 450 MPa/15 min (28 %), a slijedi ga pasterizirani uzorak (20,1 %). 21-og dana skladištenja došlo je do daljnjeg pada ukupnih HCK u svim uzorcima s tim da je najveći pad koncentracije u odnosu na 14. dan zabilježen kod pasteriziranog uzorka, dok je pad koncentracije znatno blaži kod uzorka tretiranih VHT-om.

Keenan i sur. (2011) su istraživali utjecaj skladištenja smoothie-sokova pripremljenih od jagode, jabuke, koncentriranog soka jabuke, banane i naranče na pojedine polifenolne spojeve pa tako ističu da su pasterizirani sokovi (70 °C/10 min) imali najveće koncentracije klorogenske kiseline koje su se značajno razlikovale u odnosu na uzorke tretirane VHT-om (450 MPa/1, 3, 5 min/ 20 °C), a povećanu koncentraciju pripisuju pospješenoj ekstrakciji uslijed povišene temperature. Nadalje, klorogenska kiselina je pokazala relativnu stabilnost tijekom skladištenja pasteriziranih uzoraka što djelomično odgovara rezultatima u Tablici 9.

S druge strane, koncentracija *p*-kumarinske kiseline pasteriziranih uzoraka se značajno smanjila u odnosu na netretirani uzorak (72,63 %) u prvih 10 dana skladištenja, ali je koncentracija 10.-og dana bila veća za 18,3 % u odnosu na 1. dan. Što se tiče uzoraka tretiranih VHT-om, njihova koncentracija je fluktuirala prvih 20 dana skladištenja, a 30. dan je zamijećen pad koncentracije u svim uzorcima u odnosu na nulti dan.

Ako se promotre vrijednosti masenih udjela HCK uzoraka kod nultog i 21.-og dana skladištenja, može se primijetiti pad kod svih uzoraka, ali je taj pad najizraženiji kod pasteriziranog smoothie-soka (41,7 %), a slijedi ga uzorak tretiran tretmanom 450 MPa/15 min (VHT 4) (34,2 %). Najmanja promjena masenih udjela HCK je zabilježena kod uzorka pri tretmanu 350 MPa/15 min (VHT 2) i ona iznosi svega 3,6 %. Kod tretmana 350 MPa/5 minuta (VHT 1) pad koncentracije iznosi 17,2 %, a kod 450/5 min (VHT 3) 14,5 %. Iz ovih vrijednosti možemo zaključiti kako je najpogodniji tretman za očuvanje ukupnih HCK tretman VHT-om od 350 MPa kroz 15 minuta (VHT 2), no treba imati u vidu da očuvanje ukupnih HCK ovisi o polifenolnom sadržaju tretiranog uzorka (Herceg i sur., 2016). Sveukupno najveće očuvanje ukupnih HCK postignuto je kod uzorka VHT 3 (450 MPa/5 min) gdje je 21. dan skladištenja sačuvano 62,8 % ukupnih HCK u odnosu na kontrolni uzorak.

Rezultati drugih znanstvenih istraživanja također navode da su u VHT uzorcima tijekom skladištenja evidentirani gubici različitih bioaktivnih spojeva, što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju. Smoothie-sokovi od naranče, limuna i mrkve tretirani su VHT-om (500 i 800 MPa, 5 min). U usporedbi s netretiranim uzorcima, uslijed

VHT tretmana promjene u količini karotenoida u smoothie-soku nisu zabilježene. Tek je neznatan pad koncentracije karotenoida zabilježen nakon skladištenja od 21 dan na 4 °C. Vitamin C bio je stabilniji u uzorcima tretiranim nižim tlakom (500 MPa) u usporedbi s uzorcima tretiranim višim tlakom (800 MPa) gdje je evidentiran gubitak od 4,5 %. Ipak, nakon 21-og dana skladištenja i u uzorcima tretiranim tlakom od 500 MPa došlo je do redukcije vitamina C za 16,7 %, dok je u uzorcima tretiranim tlakom od 800 MPa gubitak iznosio 19,1 % (Fernández García i sur., 2001).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. U smoothie sokovima, neovisno o tipu tretmana, u neznatno su većim udjelima određeni ukupni flavonoidi u odnosu na ukupne hidroksicimetne kiseline. Ukupni flavonoli prosječno čine 75 % udjela u sastavu ukupnih flavonoida.
2. Pasterizirani smoothie sokovi sadržavali su veće udjele ukupnih flavonoida od kontrolnog uzorka, dok su VHT uzorci sadržavali manje udjele ukupnih flavonoida u odnosu na kontrolni uzorak. Ipak, tijekom skladištenja, u pasteriziranim uzorcima došlo je do značajnog gubitka ukupnih flavonoida, dok su VHT tretmani od 5 min, neovisno o tlaku (350 MPa vs. 450 MPa) bolje pogodovali stabilnosti ukupnih flavonoida kroz period skladištenja od 21 dan.
3. Općenito gledajući, u odnosu na kontrolni uzorak, prosječni gubitak ukupnih flavonola nakon pasterizacije iznosio je 26,0 %, dok je nakon VHT tretmana prosječan gubitak iznosio 33,5 %. Unatoč tome, tijekom skladištenja su evidentirani veći gubiti ukupnih flavonola u pasteriziranim uzorcima pri čemu je najbolje zadržavanje ukupnih flavonola kroz 21 dan skladištenja u odnosu na kontrolni uzorak (55,1 %) postignuto je kod uzorka VHT 3 (450 MPa/5 min).
4. Gubitak ukupnih hidroksicimetnih kiselina bio je veći uslijed VHT tretmana u usporedbi s pasterizacijom. Nakon 21-og dana skladištenja, pasterizirani uzorci su sadržavali prosječno 41,7 % manje ukupnih hidroksicimetnih kiselina u odnosu na kontrolni uzorak. Najpogodniji tretman za očuvanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina nakon 21.-og dana skladištenja bio je VHT tretman pri 450 MPa tijekom 5 minuta pri čemu je sačuvano 62,8 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina u odnosu na kontrolni uzorak.
5. Sveukupno gledajući, VHT se pokazao kao pogodna metoda netoplijske obrade smoothie-sokova obzirom da je postignuto zadovoljavajuće očuvanje pojedinih podskupina polifenolnih spojeva. Može se zaključiti da je tretman VHT 3 (450 MPa

kroz 5 minuta) najbolje pogodovao stabilnosti istraživanih polifenolnih spojeva tijekom skladištenja.

6. LITERATURA

Abountiolas, M i Nunes, C.D. (2017) Polyphenols, ascorbic acid and antioxidant capacity of commercial nutritional drinks, fruit juices, smoothies and teas. *Int. J. Food Sci. Technol.* **53**, 188-198.

Aderinola, T.A. (2018) Nutritional, antioxidant and quality acceptability of smoothies supplemented with *Moringa oleifera* leaves. *Beverages*. **4**, 104-113.

Andrés, V, Villanueva, M.J, Tenorio, M.D. (2016). The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. *Food Chem.* **192**, 328–35.

Andrés, V., Mateo-Vivaracho, L., Villanueva, M.J., Tenorio, M.D. (2016) High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *LWT-Food Sci. Technol.* **69**, 123-130.

Anonymous 1 < <https://www.smoothiekingfranchise.com/articles/resources/downloadable-resources/the-evolution-of-the-smoothie-industry/> > Pristupljeno 25. veljače 2020.

Anonymous 2 < <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetogenin> > Pristupljeno 25. svibnja 2020

Anonymous 3 <https://www.visiongain.com/report/the-food-high-pressure-processing-hpp-technologies-market-forecast-2015-2025/> Pristupljeno 26. srpnja 2020.

Balasubramaniam, V.M., Martínez-Monteagudo, S.I., Gupta, R. (2015) Principles and application of high pressure–based technologies in the food industry. *Annu. Rev. Food Sci. T.* **6**, 435-462.

Barba, F.J, Esteve, M.J, Frigola, A. (2010) Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 10070–10075.

Bhardwaj, R.L. i Pandey, S. (2011) Juice Blends – A way of utilization of under-utilized fruits, vegetables and spices: A Review. *Cr. Rev. Food Sci.* **51**, 563-570.

Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., Crozier, A. (2010) Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3901-3909.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Burcar, D. (2019) Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu fizikalnih i mikrobioloških svojstava smoothieja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Bursać Kovačević, D., Bilobrk, J., Buntić, B., Bosiljkov, T., Karlović, S., Rocchetti, G., Lucini, L., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Putnik, P. (2019) High power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in cloudy apple juice during storage. *J. Food Process Pres.* **43**, e14023

Bursać Kovačević, D., Brdar, D., Fabečić, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Putnik, P. (2020) Strategies to Achieve a Healthy and Balanced Diet: Fruits and Vegetables as a Natural Source of Bioactive Compounds. U: *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability* (Barba, F.J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 51-88.

Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Putnik, P., Vukušić, T., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma, *Food Chem.* **212**, 323-331.

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.

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.

Caminiti, I.M, Noci, F., Munoz, A., Whyte, P., Morgan, D., Cronin, D.A. (2011) Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *J Food Chem.* **124**, 1387–1392.

Carbonell-Capella, J., Buniowska, M., Barba, F.J., Grimi, N., Vorobiev, E., Esteve, M., Frigola, A. (2016) Changes of antioxidant compounds in a fruit juice-Stevia rebaudiana blend processed by pulsed electric technologies and ultrasound. *Food Bioproc Tech.* **9**, 1159-1168.

Casado, N., Morante-Zarcelo, S., Perez-Quintanilla, D., Câmara, J.S., Sierra, I. (2018) Dispersive solid-phase extraction of polyphenols from juice and smoothie samples using hybrid mesostructured silica followed by ultra-highperformance liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 955-967.

Chen, B.H., Peng, H.Y., Chen, H.E. (1995) Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1912-1918.

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

Donno, D., Mellano, M.G., Cerutti, A.K., Beccaro, G.L. (2018) Nutraceuticals in alternative and underutilized fruits and functional food ingredients: Ancient species for new health needs. U: *Alternative and Replacement Foods*, Volume 17 (Holban, A.M. i Grumezescu, A.M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 261-282.

EC (2016) Consumption of fruit and vegetables in the EU. EC – European Commission, Bruxelles, <<https://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/7694616/3-14102016-BP-EN.pdf/1234ac94-27fd-4640-b9be-427a42d54881>> Pristupljeno 25. veljače 2020.

EC (2020) Fruit and Vegetables. EC – European Commission, Bruxelles, <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/fruit-vegetables#_efsadatabase> Pristupljeno 25. veljače 2020.

Elamin, W. M., Endan, J. B., Yosuf, Y. A., Shamsudin, R., Ahmedov, A. (2015) High pressure processing technology and equipment evolution. *J. Eng. Sci. Technol.* **85**, 75–83.

Engmann, N.F, Ma, Y., Ying, X., Qing, Y. (2013) Investigating the effect of high hydrostatic pressure processing on anthocyanins composition of mulberry (*Morus moraceae*) juice. *Czech J. Food Sci.* **31**, 72–80.

Farkas, D.F. i Hoover, D.G. (2000) High pressure processing. *J. Food Sci.* **65**, 47-64.

Fernández García, A., Butz, P., Bognàr, A., Tauscher, B. (2001) Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 290-296.

Fernandez, M.V., Bengardino, M., Jagus, R.J., Agüero, M.V. (2020) Enrichment and preservation of a vegetable smoothie with an antioxidant and antimicrobial extract obtained from beet by-products. *LWT-Food Sci. Technol.* **117**, 108622.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B. (2018) Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple ‘Golden Delicious’ from different geographical origin. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **51**, 20-31.

Gallina, D. A., Barbosa, P. P. M., Ormenese, R. D. C., Garcia, A. O. (2019) Development and characterization of probiotic fermented smoothie beverage. *Rev. Ciênc. Agron.* **50**, 378-386.

Hallmann, E., i Rembiałkowska, E. (2007) Influence of thermal processing on bioactive compounds content in apple puree prepared from organic fruits of old and new apple cultivars. *Pol. J. Nat. Sci.* **4**, 37-42.

He, F., Mu L., Yan G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang J., Reeves M.J., Duan, C.-Q. (2010) Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, **15**, 9057–9091.

Henríquez, C., Almonacid, S., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Cabezas, L., Simpson, R., Speisky, H. (2010) Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil. J. Agr. Res.* **70**, 523-536.

Herceg, Z., Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Režek Jambrak, A., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665-672.

Hidalgo, G.I. i Almajano, M. (2017) Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content and radical scavenging determination: a review. *Antioxid.* **6**, 7-34.

Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247.

Huang, H.W., Wu, S.J., Lu, J.K., Shyu, Y.T., Wang, C.Y. (2017) Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, **72**, 1-8.

Hurtado, A., Guàrdia, M.D., Picouet, P., Jofré, A., Bañón, S., Ros, J.M. (2019) Shelf-life extension of multi-vegetables smoothies by high-pressure processing compared with thermal treatment. Part I: Microbial and enzyme inhibition antioxidant status and physical stability. *J. Food Process. Preserv.* **43**. e14139.

Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., Lukačević, I. (2008) Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologia Croatica.* **14**, 13-26.

Jung, L., Lee, S.H., Kim, S., Ahn, J. (2013) Effect of high hydrostatic pressure on the quality-related properties of carrot and spinach. *Food Sci. Biotechnol.* **22**, 189-195.

Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B. K., Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**, 551–556.

Keenan, D.F., Brunton, N., Gormley, R., Butler, F. (2011) Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 601-607.

Keenan, D.F., Brunton, N., Gormley, R., Butler, F. (2011) Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 601-607.

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.

Kulling, S.E., i Rawel, H.M. (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* **74**, 1625-1634.

Łata, B., Tramoczynska, A., Paczesna, J. (2009) Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Sci. Hortic.* **121**, 176-181.

Leja, M., Marczek, A., Wojciechowska, R., Rożek, S. (1997) Phenolic metabolism in root slices of selected carrot cultivars. *Acta Physiol. Plant.* **3**, 319-325.

Ma, Y., Yin, X., Bi, X., Su, F., Liang, Z., Luo, M., Fu,D., Xing, Y., Che, Z. (2019) Physicochemical properties and bioactivecompounds of fermented pomegranate juice asaaffected by high-pressure processing and thermaltreatment. *Int. J. Food Prop.* **22**, 1250-1269.

Manach, C, Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**, 727-747.

Mattila, P., Hellström, J., & Törrönen, R. (2006). Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7193–7199.

Mehta, D., Sarhish Kumar, M.H., Sabikhi, L. (2017) Development of high protein, high fiber smoothie as a grab-and-go breakfast option using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 3859-3866.

Morales-de la Peña, M., Welte-Chanes, J., Martín-Belloso, O. (2016) Application of novel processing methods for greater retention of functional compounds in fruit-based beverages. *Beverages*. **2**, 14-26.

Nam, J.S., Park, S.Y., Lee, H.J., Lee, S.O., Jang, H.L., Rhee, Y.H. (2018b) Correlation between acetogenin content and antiproliferative activity of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp grown in Korea. *J. Food Sci.* **83**, 1430-1435.

Nam, J.S., Park, S.Y., Oh, H.J., Jang, H.L., Rhee, Y.H. (2018a) Phenolic profiles, antioxidant and antimicrobial activities of pawpaw pulp (*Asimina triloba* [L.] Dunal) at different ripening stages. *J. Food Sci.* **84**, 174-182.

Núñez-Mancilla, Y., Vega-Gálvez, A., Pérez-Won, M., Zura, L. García-Segovia, P., Di Scala, K. (2013) Effect of osmotic dehydration under high hydrostatic pressure on microstructure, functional properties and bioactive compounds of strawberry (*Fragaria vesca*). *Food Bioprocess. Technol.* **7**, 516-524.

Oszmiański, J. i Wojdyło, A. (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 809-813.

Pasini, F., Riciputi, Y., Fiorini, M., Caboni, M.F. (2019) Effect of the storage time and packaging material on the antioxidant capacity and phenols content of organic grape juice stabilized by high hydrostatic pressure. *Chem. Eng. Trans.* **75**, 235-240.

Perera, C. O. (2007). Minimal processing of fruits and vegetables. U: Handbook of Food Preservation (M. S. Rhaman, ured.), 2. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 137–148.

Picouet, P.A., Hurtado, A., Jofré, A., Bañon, S., Ros, J.M., Guàrdia, M.D. (2016) Effects of thermal and high-pressure treatments on the microbiological, nutritional and sensory quality of a multi-fruit smoothie. *Food Bioprocess. Technol.* **9**, 1219-1232.

Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L. (2003) Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. U: *Studies in Natural Products Chemistry*, Volume 28 (Atta-ur-Rahman), Elsevier Science, Amsterdam, str. 257-312.

Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taukis, P.S. (2005) Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chem.* **91**, 495-503.

Putnik, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., Bursać Kovačević, D. (2017) An integrated approach to mandarin processing: food safety and nutritional quality, consumer preference and nutrient bioaccessibility. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 1345-1358.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Herceg, K., Roohinejad, S., Greiner, R., Bekhit, A. E.-D., Levaj, B. (2017) Modelling the shelf-life of minimally-processed fresh-cut apples packaged in modified atmosphere using food quality parameters. *Food Control.* **81**, 55-64.

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

Putnik, P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., Bursać Kovačević, D. (2018) Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*, **7**, 106-122.

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**, 699-735.

Quan, W., Tao, Y., Qie, X., Zeng, M., Qin, F., Chen, J., He, Z. (2019) Effects of high-pressure homogenization, thermal processing, and milk matrix on the *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds in pomelo and kiwi juices. *J. Funct. Foods.* **64**, 103633.

Queiroz, C., Moreira C.F.F, Lavinas, F.C, Lopes, M.L.M, Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. (2010) Effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. *High Pressure Res.* **30**, 507–513.

Rao, A.V. i Rao, L.G. (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* **55**, 207-216.

Rastogi, N. K. (2013) Recent Developments in High Pressure Processing of Foods, Springer, Berlin, str. 1-7.

Rodríguez-Roque, M.J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M.P., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. (2015) Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *J. Funct. Foods.* **14**, 33–43.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, P. (2003) Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. *Eur Food Res. Technol.* **216**, 18-22.

Sentandreu, E., Stinco, C.M., Vicario, I.M., Mapelli-Brahm, P., Navarro, J.L., Meléndez-Martínez, A.J. (2020) High-pressure homogenization as compared to pasteurization as a sustainable approach to obtain mandarin juices with improved bioaccessibility of carotenoids and flavonoids. *J. Clean. Prod.* **262**, 121325.

Shahidi, F. i Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *J. Funct. Foods.* **18**, 220-297.

Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S., Attri, S. (2012) Chemical composition, functional properties and processing of carrot - a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 22-32.

Shen, J., Gou, Q., Zhang, Z., Wang, M. (2016) Effects of high hydrostatic pressure on the quality and shelf-life of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) pulp. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **36**, 166-172.

Sinha, N. K., (2006) Apples. U: Handbook of Fruits and Fruit Processing (Hui, Y.H.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 265-278.

Stahl, W. i Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345-351.
Teleszko, M. i Wojdyło, A. (2014) Bioactive compounds vs. organoleptic assessment of „smoothies“-type products prepared from selected fruit species. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 98-106.

Teleszko, M., Nowicka, P., Wojdyło (2016) Chemical, enzymatic and physical characteristic of cloudy apple juices. *Agr. Food Sci.* **25**, 34-43.

Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V.I. (2014) Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chem. pap.* **68**, 121-129.

Weber, F i Larsen, L.R. (2017) Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. *Food Res. Int.* **100**, 354-365.

Wilkes, K., Howard, L.R., Brownmiller, C., Prior, R. (2014) Changes in chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 4018-4025.

Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 609-614.

Zhu, Z., Gavahian, M., Barba, F.J., Roselló-Soto, E., Bursac Kovačević, D., Putnik, P., Denoy, G.I. (2020) Valorization of waste and by-products from the food industry through the use of innovative technologies. U: Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability, (Barba, F.J., Putnik, P., Bursac Kovačević, ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 249-266.

Žuntar, I., Petric, Z., Bursać Kovačević, D., Putnik, P. (2020) Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods*. **9**, 947-966.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Lidija Salkić