

# Utjecaj „tehnologije preprekama“ na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode tijekom skladištenja

---

**Birkić, Anamaria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:159:266030>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Anamaria Birkić

**UTJECAJ „TEHNOLOGIJE  
PREPREKAMA“ NA STABILNOST  
ANTOCIJANA I  
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET  
U SOKOVIMA OD JAGODE  
TIJEKOM SKLADIŠTENJA**

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



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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za kemiju i tehnologiju voća i povrća te Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo koji su na bilo koji način sudjelovali i pomogli prilikom izrade ovog rada.*

*Najveću zahvalu dugujem svojoj divnoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević, na prihvaćenom mentorstvu, pruženoj pomoći, razumijevanju i susretljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na prenesenom znanju te na prijateljskim i stručnim savjetima koji će mi zasigurno biti od pomoći u daljnjem profesionalnom i osobnom razvoju.*

*Veliko hvala doktorandici Anici Bebek Markovinović, mag. ing., na pomoći, strpljenju i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada u laboratoriju.*

*Naposljetku, od srca zahvaljujem svojoj obitelji i bližnjima, koji su mi uvijek davali vjetar u leđa. Hvala vam na bezuvjetnoj podršci.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

### UTJECAJ „TEHNOLOGIJE PREPREKAMA“ NA STABILNOST ANTOCIJANA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET U SOKOVIMA OD JAGODE TIJEKOM SKLADIŠTENJA

*Anamaria Birkić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213025*

**Sažetak:** Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj tehnologije preprekama na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet (AOK) u sokovima od jagode tijekom skladištenja 7 dana pri 4 °C. Tehnologije pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka visoke snage (HPU) primijenjene su u različitom slijedu primjene i različitim vremenima obrade: PEF- 30 kV/cm, 100 Hz, 1,5-4,5 minute i HPU- amplituda 25 %, puls 50 %, 2,5-7,5 minuta. HPU+PEF tretman pokazao se povoljnijim konceptom prepreka jer je rezultirao većom stabilnošću antocijana i AOK. Tijekom skladištenja, veća stabilnost antocijana evidentirana je u sokovima tretiranim PEF+HPU tehnologijom, u usporedbi s HPU+PEF tretmanom. Neovisno o slijedu primjenjenih tehnologija, AOK je bio niži u sokovima skladištenim 7 dana. Kraća vremena obrade soka primjenjenim tehnologijama povoljnije djeluju na stabilnost antocijana i AOK u sokovima od jagode. Tehnologija preprekama s PEF i HPU tretmanima može se smatrati održivim konceptom za preradu funkcionalnih sokova od jagode s obzirom na stabilnost antocijana i AOK.

**Ključne riječi:** sok od jagode, tehnologija preprekama, antocijani, antioksidacijski kapacitet, skladištenje

**Rad sadrži:** 52 stranice, 1 slika, 6 tablica, 135 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing. i dr. sc. Višnja Stulić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (zamjenski član)

**Datum obrane:** 26. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### THE EFFECT OF "HURDLE TECHNOLOGY" ON ANTHOCYANIN STABILITY AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN STRAWBERRY JUICES DURING STORAGE

*Anamaria Birkić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213025*

**Abstract:** This work investigated the influence of hurdle technology on anthocyanin stability and antioxidant capacity (AOC) in strawberry juices during storage for 7 days at 4°C. Pulsed electric field (PEF) and high-power ultrasound (HPU) were used in different application sequences and with different processing times: PEF- 30 kV/cm, 100 Hz, 1.5-4.5 min and HPU- amplitude 25%, pulse 50%, 2.5-7.5 min. The HPU+PEF treatment was more favorable approach as it resulted in greater stability of anthocyanins and AOC. During storage, greater stability of anthocyanins was observed in the PEF+HPU treated juices. Regardless of the sequence of applied technologies, AOC was lower in juices stored for 7 days. Shorter processing times of applied technologies have a more favorable effect on the stability of anthocyanins and AOC in strawberry juices. Hurdle technology with PEF and HPU treatments can be considered as a sustainable approach for processing functional strawberry juices considering the stability of anthocyanins and AOC.

**Keywords:** *strawberry juice, hurdle technology, anthocyanins, antioxidant capacity, storage time*

**Thesis contains:** 52 pages, 1 figure, 6 tables, 135 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

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

#### **Reviewers:**

1. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Tomislav Bosiljkov, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 26<sup>th</sup>, 2023



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Jagoda kao funkcionalna hrana.....	2
2.2. Bioaktivni potencijal jagode.....	4
2.3. Prerada jagode u funkcionalni sok.....	6
2.4. Tehnologija preprekama u konzerviranju voćnih sokova .....	9
2.4.1. Primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja (engl. <i>Pulsed Electric Field</i> , PEF) u tehnologiji preprekama.....	10
2.4.2. Primjena tehnologije ultrazvuka visoke snage (engl. <i>High Power Ultrasound</i> , HPU) u tehnologiji preprekama .....	13
2.4.3. Utjecaj tehnologije preprekama na stabilnost bioaktivnih spojeva u soku od jagode .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Priprema soka od jagode .....	17
3.2.2. Obrada sokova od jagode tehnologijom preprekama .....	17
3.2.3. Postupak ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz uzoraka soka od jagode.....	20
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje monomernih antocijana .....	21
3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	24
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	26
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4.1. Utjecaj tehnologije preprekama na stabilnost antocijana u sokovima od jagode .....	31
4.2. Utjecaj tehnologije preprekama na antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode ..	36
5. ZAKLJUČCI .....	41
6. LITERATURA .....	42

# 1. UVOD

Danas potrošači sve više shvaćaju važnost uvođenja zdravih prehrambenih navika i vrlo često koriste svoju prehranu kao sredstvo za poboljšanje zdravlja i prevenciju različitih bolesti, tražeći hranu ili sastojke hrane čija se redovita konzumacija povezuje s različitim zdravstvenim dobrobitima. Zahvaljujući rastućoj svijesti potrošača i povećanom interesu za nutritivno bogatijom, funkcionalnom hranom, prehrambena industrija sve više teži minimalnom procesiranju hrane i implementaciji inovativnih tehnika obrade hrane koje omogućavaju zadržavanje senzorskih i nutritivnih značajki hrane uz istovremeno postizanje adekvatne razine sigurnosti hrane. Novi postupci i tehnologije intenzivno se razvijaju i uspješno se nameću kao alternativa klasičnoj toplinskoj obradi u procesima proizvodnje hrane. Osim toga, sve više se ispituje kombinirana primjena toplinskih i/ili netoplinskih tehnologija u konceptu „tehnologije preprekama“ (engl. *Hurdle concept*). Ova tehnologija zasniva se na sinergijskom učinku odabranog slijeda tehnologija koje se primjenjuju pri blažim uvjetima obrade s ciljem produljenja trajnosti i zadržavanja visokog stupnja kvalitete. Ipak, nove tehnologije još uvijek nisu u potpunosti zaživjele u industrijskoj primjeni, gdje se i dalje, unatoč svojim nedostacima, kao najisplativiji alat za osiguranje mikrobiološke ispravnosti hrane koristi toplinska obrada. Tehnološki problemi, ekonomska neizvjesnost, nepredvidljivo prihvaćanje od strane potrošača i nedostatak regulatornih aspekata među najvažnijim su problemima novih tehnologija koji moraju biti riješeni prije njihove opsežne primjene u različitim sektorima prehrambene industrije. Zahvaljujući velikom broju bioaktivnih spojeva, čiji su višestruki zdravstveni učinci znanstveno utvrđeni, jagoda (*Fragaria ananassa* x Duch.) i proizvodi na bazi jagode smatraju se funkcionalnom hranom. Budući da uobičajeni postupci prerade jagoda u različite proizvode uzrokuju degradaciju bioaktivnih spojeva te narušavanje senzorskih svojstava proizvoda, novi tehnološki postupci nameću se kao vrlo dobra alternativa tradicionalnim postupcima obrade, koja ima potencijal doprinijeti očuvanju izvornih karakteristika sirovine i poboljšati ukupnu kvalitetu proizvoda na bazi jagode.

Nastavno na navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tehnologije preprekama odnosno kombinirane primjene pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka visoke snage na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet soka od jagode. Uz varijacije u redosljedu primijenjenih tretmana, za svaku od tehnologija ispitan je utjecaj varijacije 3 različita vremena obrade, a po završenoj obradi, ispitan je i utjecaj skladištenja tijekom 7 dana pri 4 °C na promjene stabilnosti antocijana i antioksidacijskog kapaciteta u sokovima od jagode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. JAGODA KAO FUNKCIONALNA HRANA

Vrste iz roda jagoda (*Fragaria*) su višegodišnje, grmolike biljke niskog rasta koje pripadaju porodici Rosaceae i potporodici Rosoideae (Folta i Davis, 2006). Unutar ovog roda opisan je veliki broj genotipski i fenotipski različitih vrsta koje su se tijekom povijesti uzgajale u raznim dijelovima svijeta. Razlike među vrstama, ili unutar iste vrste, mogu se vidjeti na morfološkoj razini, u različitoj boji i obliku aheni te različitoj morfologiji vriježa i listova (Liston i sur., 2014). *Fragaria vesca* predstavljala je dominantnu vrstu u uzgoju jagoda u Europi sve do kraja 16. stoljeća kada su se počele uvoditi različite vrste jagoda iz Novog svijeta, pri čemu je uzgoj starijih, tradicionalnih vrsta postao ograničen na kućne vrtove (Hancock i sur., 2008). Trenutni ekonomski značaj svih ostalih vrsta iz roda *Fragaria* zajedno beznačajan je u usporedbi s vrstom *Fragaria x ananassa* Duch., koja u svjetskim razmjerima predstavlja najznačajniju vrstu među jagodastim voćem (engl. *berries*). U prilog tomu govore i FAO podaci prema kojima ukupna proizvodnja jagode u svijetu u 2021. godini premašuje 9 milijuna tona, dok ukupna proizvodnja u Republici Hrvatskoj za istu godinu iznosi 1960 tona (FAO, 2022).

Ova oktaploidna vrsta potomak je dviju novouvedenih vrsta porijeklom iz Amerike, *Fragaria virginiana* i *Fragaria chiloensis*. Nastala je kao njihov slučajni hibrid sredinom 18. stoljeća, kada su biljke *F. chiloensis* uvezene iz Čilea posađene u Francuskoj u blizini nasada vrste *F. virginiana* (Hummer i Hancock, 2009). Krupni i ukusni plodovi nove hibridne vrste jagode ubrzo su postale temelj za opsežan uzgoj i daljnju selekciju. Danas predstavljaju omiljeno voće širokom krugu potrošača te su kao takve tražene u svježem, ali i u prerađenom obliku kao smrznuti i sušeni plodovi ili u obliku sokova, džemova i želiranih proizvoda. Zahvaljujući atraktivnoj boji, aromi i okusu, često se dodaju i različitim mliječnim proizvodima (Cao i sur., 2012). Široki asortiman proizvoda na bazi jagode uspješno zadovoljava prehrambene potrebe potrošača, a uz nutritivnu vrijednost, zahvaljujući velikom broju bioaktivnih spojeva s višestrukim zdravstvenim učincima, jagode i proizvodi na njihovoj bazi smatraju se i funkcionalnom hranom (Bebek Markovinović i sur., 2023). Iako ne postoji jedinstvena definicija ovog pojma, hrana se može smatrati funkcionalnom ako uz osnovni nutritivni učinak pokazuje moguće blagotvorne učinke na zdravlje ljudi, ukoliko se redovito konzumira unutar raznolike prehrane (Granato i sur., 2017). Termin funkcionalna hrana može se odnositi na industrijski prerađenu ili prirodnu hranu u izvornom, sirovom obliku. Tržište funkcionalne hrane dobiva sve veći značaj na svjetskoj razini, pri čemu značajan utjecaj na rast

i širenje tržišta ima globalna ekonomska situacija. Stope rasta u dijelovima svijeta usporavaju se uslijed ekonomskih kriza i neizvjesnih gospodarskih vremena. Međutim, ključni čimbenik koji potiče cjelokupno tržište funkcionalne hrane u sljedećim godinama predstavlja rastuća svijest potrošača o važnosti pravilne prehrane u svrhu očuvanja zdravlja (Karelakis i sur., 2020).

Učinak bioaktivnih spojeva na ljudsko zdravlje kontinuirano se istražuje. Epidemiološki podaci potvrđuju da je visok unos prirodne funkcionalne hrane bogate bioaktivnim spojevima, poput specifičnog voća i povrća, povezan sa smanjenim rizikom od različitih kroničnih bolesti (Karasawa i Chakravarthi, 2018 ; Giampieri i sur., 2015). Zahvaljujući jedinstvenoj kombinaciji i sinergističkom djelovanju velikog broja različitih bioaktivnih spojeva, jagode su prepoznate kao funkcionalna hrana. Na zdravstvene dobrobiti i moguću prevenciju određenih kroničnih stanja uslijed njihove učestale konzumacije upućuju dokazi izneseni u brojnim studijama, prema kojima bioaktivni spojevi jagode pokazuju širok raspon bioloških aktivnosti (Afrin i sur., 2016). Istraživanjima provedenim na zdravim pojedincima utvrđeno je da konzumacija jagoda pozitivno utječe na endogeni antioksidacijski status koji ima potencijal poboljšati obranu organizma od kroničnih bolesti (Henning i sur., 2010). Redovita konzumacija jagoda bogatih antioksidansima može utjecati na poboljšanje antioksidacijskog statusa plazme i povećati antihemolitičku obranu eritrocita (Tulipani i sur., 2011). Nadalje, bioaktivni spojevi jagode potencijalno bi mogli ublažiti upalne promjene povezane s oksidativnim stresom. Prema istraživanju koje su proveli Edirisinghe i sur. (2011), konzumacija napitka na bazi jagode naspram placebo pripravka dovela je do značajnog smanjenja postprandijalnog<sup>1</sup> upalnog odgovora kod ispitanika s prekomjernom tjelesnom težinom (Edirisinghe i sur., 2011). Zdravstvene koristi povezane s konzumacijom jagoda proizašle iz brojnih istraživanja uključuju i njihovu potencijalnu ulogu u prevenciji određenih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i bolesti srca, određenih vrsta raka, dijabetesa, pretilosti te neurodegenerativnih bolesti (Giampieri i sur., 2013). Primjeri funkcionalnih proizvoda na bazi jagode, u kojima se jagode često kombiniraju s ostalim funkcionalnim sastojcima, uključuju sokove, fermentirane napitke, smoothije i jogurte, džemove i ostale želirane proizvode (Bebek Markovinović i sur., 2022a ; Ali i sur., 2021 ; Cervera-Chiner i sur., 2021 ; Zhao i sur., 2021; Kowaleski i sur., 2020 ; Barbosa i sur., 2017). Budući da potrošači sve više biraju prehrambene proizvode iznimne kvalitete s dodanom vrijednošću, zahvaljujući visokom udjelu bioaktivnih spojeva, jagoda je prepoznata kao vrijedna sirovina te je kao takva, dobro usklađena s rastućom potražnjom za funkcionalnom hranom na tržištu (Basu i sur, 2014).

---

<sup>1</sup> Postprandijalni *prid.* - koji nastaje nakon obroka hrane, nakon jela

## 2.2. BIOAKTIVNI POTENCIJAL JAGODE

Funkcionalna svojstva ploda jagode proizlaze iz bogatog sastava bioaktivnih spojeva čiji se kumulativni učinak djelovanja odražava na promicanje zdravlja ljudi. Jedan od razloga zbog kojih se jagode smatraju vrijednim izvorom bioaktivnih spojeva su visoke razine vitamina C, čiji se sadržaj u svježim jagodama kreće u širokom rasponu od 20 do 90 mg na 100 g, ovisno o utjecaju različitih faktora (Tulipani i sur., 2008 ; Skupień i Oszmiański, 2004). Nadalje, jagode se smatraju jednim od najbogatijih prirodnih izvora folata, sa sadržajem oko 20 do 25 µg na 100 g svježeg voća. Uz prethodno navedene, jagode sadrže i druge vitamine, kao što su tiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, vitamin K, vitamin A i vitamin E, ali u mnogo manjim udjelima (Alvarez-Suarez i sur., 2014). Bioaktivnom potencijalu jagoda uvelike doprinosi veliki broj različitih fenolnih spojeva, od kojih većina pokazuje značajnu antioksidacijsku aktivnost (Giampieri i sur., 2015).

Osnovna kemijska struktura polifenolnih spojeva uključuje aromatski prsten s najmanje jednom hidroksilnom skupinom, a njihova struktura može varirati od jednostavnih molekula do složenih polimera. Prema osnovnoj kemijskoj strukturi, polifenolni spojevi mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: flavonoide i neflavonoidne polifenole (Durazzo i sur., 2019). Flavonoidi su najveća skupina polifenola i dijele se u 6 podrazreda (Forbes-Hernández i sur., 2014). Većinu fenolnih spojeva jagode predstavljaju upravo polifenoli iz skupine flavonoida, koji uključuju flavonole, flavanole i antocijane, koji predstavljaju najznačajnije polifenolne spojeve jagode. Flavonoli su u jagodama prisutni u malim udjelima, a uključuju kamferol i kvercetin (Newerli-Guz i sur., 2023). Većinu flavanola čine flavan-3-oli, koji su nakon antocijana najznačajniji fenolni spojevi u jagodama, a pronađeni su u monomernim (katehini) i polimernim oblicima koji se nazivaju kondenzirani tanini ili procijanidini (Alvarez-Suarez i sur., 2014 ; Aaby i sur., 2012). Uz antocijane i flavan-3-ole, među najzastupljenijim polifenolnim spojevima u jagodama su elagitanini, koji spadaju u skupinu hidroliziranih tanina. Jagode također sadrže niz fenolnih kiselina koje su prisutne u manjim udjelima u obliku derivata hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina. Među fenolnim kiselinama u plodovima jagoda najzastupljenije su *p*-kumarinska kiselina i elaginska kiselina (Aaby i sur., 2012 ; Skupień i Oszmiański, 2004).

Sadržaj polifenolnih spojeva u jagodama razlikuje se ovisno o različitim faktorima, među kojima su najznačajniji genotip, uvjeti uzgoja, stupanj zrelosti te uvjeti skladištenja nakon berbe (Giampieri i sur., 2012). Kao što je prethodno navedeno, kvantitativno najvažniji polifenolni spojevi jagoda su antocijani. Antocijani čine najveću skupinu pigmenata topljivih u vodi u biljnom svijetu. U prirodi se uglavnom pojavljuju u obliku glikozida, čiju osnovu čine

aglikoni koji se nazivaju antocijanidini (Forbes-Hernández i sur., 2014). Antocijanidini se rijetko mogu pronaći u prirodi kao slobodni aglikoni zbog svoje nestabilnosti, zbog čega su najčešće glikozilirani s jednom ili više molekula šećera. Najzastupljeniji antocijanidini u prirodi su pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin. Razlikuju se prema broju i položaju hidroksilnih i metilnih skupina vezanih na osnovnu strukturu antocijanidina koju čine dva aromatska prstena povezana centralnim piranskim prstenom (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Do danas je identificirano preko 600 strukturno različitih derivata antocijana koji se razlikuju prema supstituentima na osnovnim strukturama navedenih antocijanidina. Razlike u strukturi odgovarajućih antocijana posljedica su prirode i opsega glikozilacije te prisutnosti ili odsutnosti dodatnih acilnih skupina vezanih za šećere (Silva i sur., 2016 ; Zhang i sur., 2014). Antocijani jagode potječu od aglikona pelargonidina i cijanidina. U jagodama različitih sorti opisano je preko 25 različitih pigmenta antocijana (da Silva i sur., 2007). Prema Goiffon i sur. (1999) najzastupljeniji antocijani u jagodi su pelargonidin-3-glukozid (89-95 % ukupnog sadržaja antocijana) i cijanidin-3-glukozid (3,9-10,6 %).

Važno je naglasiti da su antocijani vrlo nestabilni spojevi, lako podložni razgradnji. Na stabilnost antocijana utječu supstituenti na B prstenu te stupanj glikozilacije i acilacije u molekuli antocijana. Općenito, hidroksilacija B prstena antocijanidina smanjuje stabilnost antocijana, dok metilacija povećava stabilnost (Wallace i Giusti, 2019). Glikozilacija i acilacija poboljšavaju njihovu strukturnu stabilnost (Zhang i sur., 2014). Uz kemijsku strukturu, na stabilnost antocijana utječu i čimbenici kao što su pH, temperatura, svjetlost, kisik, prisutnost enzima, metalnih iona, kopigmenata i sl. (Castañeda-Ovando i sur., 2009). U ovisnosti o pH, antocijani se mogu pojaviti u četiri različita kemijska oblika, koji pokazuju različitu stabilnost i obojenje: flavilijum kation, karbinol (pseudo)baza, kvinoidalna baza i halkonski oblik. Kationi flavilijum iona predstavljaju najstabilniju strukturu antocijana, odgovornu za narančasto-crvenu boju antocijana u kiselim uvjetima (Comandini i sur., 2008).

Ukupni antioksidacijski kapacitet voća pokazatelj je razine korisnih bioaktivnih spojeva prisutnih u voću, a samim time veže se uz zdravstvene učinke. Antioksidacijski kapacitet jagoda uvelike doprinosi njihovu nutritivnom značaju, a usko je povezan s prisutnošću spojeva koji neutraliziraju štetno djelovanje slobodnih radikala, poput vitamina C i polifenolnih spojeva (Giampieri i sur., 2012). Razine antioksidansa i antioksidacijski kapacitet u ekstraktima jagoda značajno variraju među genotipovima (Wang i sur., 2002). U istraživanju Tulipani i sur. (2008) ispitan je doprinos pojedinačnih bioaktivnih spojeva antioksidacijskom potencijalu u različitim kultivarima jagoda. Utvrđeno je da je vitamin C odgovoran za više od 30 %, dok antocijani doprinose s 25 do 40 % ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata jagode. U

manjoj mjeri, antioksidacijskom kapacitetu doprinose i derivati elaginske kiseline i flavonoli. Postoji pozitivna korelacija između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenolnih spojeva, posebice antocijana (Chaves i sur., 2017). Ukupni sadržaj antocijana u jagodi može varirati ovisno o nekoliko čimbenika, uključujući sortu, stupanj zrelosti, različite uvjete uzgoja, skladištenja i sl. (Bursać Kovačević i sur., 2015, Crecente-Campo i sur., 2012). Osim što su zaslužni za njihovu atraktivnu crvenu boju, pokazatelj su stupnja zrelosti plodova jagode (Octavia i Choo, 2017). Sadržaj antocijana povećava se tijekom dozrijevanja, što je utvrđeno analizom brojnih kultivara jagoda (Bebek Markovinović i sur., 2022b ; Aaby i sur., 2012). Pregled utjecaja različitih čimbenika na sadržaj antocijana u jagodama prikazan je tablici 1.

**Tablica 1.** Sadržaj antocijana u plodovima jagoda (*Fragaria ananassa* × Duch.) prema rezultatima znanstvenih istraživanja

Sadržaj antocijana [mg/100g svježih jagoda]	Čimbenici koji utječu na sadržaj antocijana u jagodama	Literatura
14,25 ± 2,09 – 23,05 ± 2,77	Sorta i uvjeti okoliša	Cervantes i sur., 2020
4,6 ± 0,3 – 38,5 ± 2	Skladištenje	Octavia i Choo, 2017
31 ± 8 - 41 ± 11	Sorta i lokalitet uzgoja	Zeliou i sur., 2018
16,96 – 18,07	Sorta i uvjeti uzgoja	Kobi i sur., 2018
2,09 ± 0,01 – 2,41 ± 0,01	Sorta	Ganhão i sur., 2019
15,67 ± 0,45 – 27,62 ± 0,94	Sorta	Chaves i sur., 2017
2,95 ± 0,29 – 16,14 ± 0,59	Sorta i stupanj zrelosti	Hwang i sur., 2019
0,04 – 30,33	Sorta i stupanj zrelosti	Minutti-López Sierra i sur., 2019
5,03 ± 0,08 – 16,64 ± 0,1	Sorta i lokalitet uzgoja	Kim i Shin, 2015
0,47 – 82,59	Sorta i uvjeti okoliša	Nowicka i sur., 2019

### 2.3. PRERADA JAGODE U FUNKCIONALNI SOK

Plodovi jagode najčešće se konzumiraju u svježem stanju. Međutim, jagode su voćna vrsta kratkog roka trajanja te ubrzo nakon berbe dolazi do degradacije nutritivne i senzorske kvalitete plodova, što pridonosi gubitku tržišne vrijednosti (Arend i sur., 2017). Kako bi se spriječili potencijalni gubici i iskoristila kvalitetna sirovina, zreli plodovi jagode se u vrlo kratkom roku trebaju adekvatno preraditi. Proizvodi od jagoda, baš kao i svježi plodovi, sadrže

značajan bioaktivni potencijal koji pruža višestruke zdravstvene dobrobiti, na što upućuju opsežni dokazi velikog broja studija o njihovim antioksidacijskim, protuupalnim, antihipertenzivnim i antiproliferativnim svojstvima (Basu i sur., 2014). Među širokim asortimanom proizvoda na bazi jagode posebno se ističu sokovi, koji se zbog svoje atraktivne boje, karakteristične arome i slatko-kiselkastog harmoničnog okusa mogu smatrati jednim od najpopularnijih voćnih sokova. Uz istaknute senzorske karakteristike, zahvaljujući relativno visokom sadržaju antocijana i vitamina C, sok od jagoda odlikuje se i visokim antioksidacijskim kapacitetom (Bebek Markovinović i sur., 2022a ; Cao i sur., 2012).

Prema Pravilniku o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN 48/2013), voćni sok je proizvod koji može fermentirati, ali je nefermentiran, a proizvodi se od jestivog dijela voća koje je zdravo, svježe ili konzervirano hlađenjem ili smrzavanjem jedne ili više vrsta voća pomiješanih zajedno. Voćni sok ima boju, aromu i okus karakterističan za voće od kojega potječe (Pravilnik, 2013). Proces proizvodnje soka od jagode započinje sortiranjem i pranjem svježih jagoda (Weber i Larsen, 2017). Ukoliko se jagode ne prerađuju u kratkom roku iza berbe, učestala je praksa da se svježi plodovi zamrzavaju i potom odmrzavaju prije daljnje prerade (Yildiz i sur., 2021a). Budući da proizvodnja voćnih sokova općenito zahtijeva dezintegraciju stanica voćnog tkiva kako bi se oslobodio stanični sok, sljedeći korak u proizvodnji je pasiranje, uz depektinizaciju enzimima. Enzimska obrada kaše koristi se kao uobičajena metoda za povećanje prinosa soka. Obično se primjenjuju pripravci koji sadrže enzime kao što su pektinaze ili celulaze, koji razgrađuju stanične stijenke oslobađajući vodu vezanu za stanice i povećavajući ekstrakciju soka (Radziejewska-Kubzdela, 2023 ; Weber i Larsen, 2017). S ciljem povećanja iskorištenja procesa proizvodnje soka, kaša jagoda dobivena pasiranjem može se tretirati i toplinski, a sve više se istražuju i mogućnosti primjene ultrazvuka tijekom obrade kaše (Radziejewska-Kubzdela, 2023). Nakon obrade, prešanjem dobivene kaše tekuća faza odvaja se od krute, a zatim slijede filtracija i pasterizacija dobivenog soka (Garzón i Wrolstad, 2006).

Prerada jagoda u sok relativno je zahtjevan proces koji uključuje nekoliko jediničnih operacija, a neke od njih uzrok su nepoželjnim promjenama koje mogu negativno utjecati na kvalitetu i funkcionalnost konačnog proizvoda. Tijekom obrade soka koriste se različiti toplinski tretmani kako bi se, uz inaktivaciju enzima iz voća i enzima dodanih tijekom procesa, osigurala zdravstvena ispravnost i produžio rok trajnosti proizvoda (Patras i sur., 2010). Budući da toplinski tretmani općenito uzrokuju degradaciju nutritivnih, senzorskih i fizikalno-kemijskih svojstava hrane, tijekom procesa proizvodnje soka od jagoda upravo pasterizacija soka predstavlja najznačajniji korak koji ima ključan utjecaj na konačnu kvalitetu proizvoda.



Toplinska obrada soka može uzrokovati promjenu boje te gubitak bioaktivnih spojeva (Sui i sur., 2016). Osim toga, toplinska obrada može rezultirati i smanjenjem antioksidacijske aktivnosti proizvoda (Patras i sur., 2009). Uz utjecaj toplinske obrade, uvjeti skladištenja također su od iznimne važnosti za senzorsku i nutritivnu kvalitetu soka tijekom skladištenja (Sui i sur., 2016). Negativan utjecaj prerade i skladištenja na sadržaj bioaktivnih tvari i stupanj antioksidacijske aktivnosti soka od jagode može smanjiti potencijalno blagotvorne učinke soka na zdravlje ljudi (Oszmiański i Wojdyło, 2009).

U istraživanju koje su proveli Klopotek i sur. (2005) ispitivane su promjene udjela bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta do kojih dolazi tijekom prerade jagoda u različite proizvode poput soka, nektara, pirea i vina. Sadržaj bioaktivnih tvari u proizvodima od jagode smanjivao se povećanjem koraka prerade, a posebice korištenjem toplinske obrade. Utvrđeno je da pasterizacija soka od jagode dovodi do smanjenja ukupnog sadržaja fenola, antocijana i vitamina C, čime se umanjuje nutritivna vrijednost i antioksidacijski kapacitet soka od jagode (Klopotek i sur., 2005). Gubitci bioaktivnih spojeva jagode veći su što je vrijeme termičke obrade proizvoda dulje. Prema istraživanju Hartmann i sur. (2008), gubitak antocijana tijekom proizvodnje soka od jagode iznosio je 9 % za kratkotrajnu toplinsku obradu u trajanju od 5 sekundi pri 85 °C (vruće punjenje u boce) i 21 % za dulju obradu u trajanju od 15 min na 85 °C (pasterizacija u staklenim bocama).

Atraktivna crvena boja proizvoda na bazi jagode jedan je od glavnih pokazatelja njihove kvalitete koji izravno utječe na prihvaćanje proizvoda od strane potrošača (Wang i sur., 2014). Međutim, boja ovih proizvoda izrazito je podložna promjenama, posebice tijekom skladištenja (Gössinger i sur., 2009). Promjene boje rezultat su kombinacije istovremene razgradnje pigmentata antocijana i blijeđenja crvene boje te stvaranja smeđih pigmentata uslijed enzimskih i/ili neenzimskih reakcija. Budući da se primjenom termičke obrade inaktiviraju enzimi koji degradiraju kvalitetu, u pasteriziranom soku od jagode posmeđivanje tijekom skladištenja prvenstveno je povezano s neenzimskim reakcijama koje uključuju razgradnju askorbinske kiseline, Maillardove reakcije i kiselinski kataliziranu razgradnju šećera (Buvé i sur., 2018). Prema rezultatima istraživanja koje su proveli Oszmiański i Wojdyło (2009), sokovi od jagoda skladišteni na tamnom mjestu tijekom 6 mjeseci pri različitim temperaturama pokazali su značajne razlike u sadržaju antocijana u odnosu na svježe sokove. Sokovi skladišteni pri 4 °C sadržavali su polovicu, dok su sokovi skladišteni pri 30 °C sadržavali tek oko desetine početne koncentracije antocijana. Bistri, mutni i kašasti sokovi proizvedeni od različitih kultivara jagoda skladišteni pri 4 °C imali su značajno veći antioksidacijski kapacitet naspram proizvoda skladištenih pri 30 °C (Oszmiański i Wojdyło, 2009).

## 2.4. TEHNOLOGIJA PREPREKAMA U KONZERVIRANJU VOĆNIH SOKOVA

U prehrambenoj industriji sve širu primjenu pri konzerviranju hrane pronalazi tehnologija preprekama (engl. *Hurdle concept*) koja podrazumijeva kombiniranu primjenu različitih procesnih prepreka u svrhu poboljšanja mikrobne stabilnosti, nutritivnih svojstava i kvalitete proizvoda (Petruzzi i sur., 2017). Prepreke predstavljaju različite antimikrobne čimbenike kojima se postiže konzervirajući učinak, a najčešće korištene prepreke pri konzerviranju hrane uključuju primjenu niske ili visoke temperature, manipulaciju aktivitetom vode, kiselost, redoks potencijal, primjenu kemijskih ili prirodnih konzervansa te primjenu kompetitivnih mikroorganizama (Putnik i sur., 2020 ; Dixit i sur., 2018). Ovaj inovativni pristup konzerviranju hrane temelji se na sinergističkom djelovanju nekoliko različitih čimbenika kojima se postiže željena kvaliteta hrane i minimiziraju neželjene promjene. Važno je naglasiti kako svaki od njih, primijenjen pojedinačno pri istoj koncentraciji ili intenzitetu djelovanja, ne bi mogao postići isti učinak (Herceg i sur., 2009). Učinak pojedine prepreke na hranu od najveće je važnosti za očuvanje hrane i prvenstveno ovisi o intenzitetu primijenjene prepreke. Intenzitet primijenjene prepreke u hrani mora biti dovoljno visok kako bi mogao doprinijeti osiguranju mikrobiološke stabilnosti hrane, a u isto vrijeme i dovoljno nizak kako bi se izbjeglo narušavanje kvalitete hrane (Putnik i sur., 2020). Drugim riječima, prepreke u hrani trebaju se primijeniti u optimalnom rasponu intenziteta ili koncentracija kako bi se postigli željeni učinci. Adekvatna kombinacija različitih čimbenika obrade primijenjenih u optimalnim dozama može biti izrazito dobar pristup za povećanje sigurnosti i kvalitete hrane bez primjene intenzivnih tretmana obrade hrane, a često uz nižu potrošnju energije i manji utjecaj na okoliš u odnosu na konvencionalne metode obrade (Jolvis Pou i Raghavan, 2020 ; Khan i sur., 2017). Međutim, primjena konzerviranja tehnologijom preprekama često je vremenski zahtjevna i ekonomski neisplativa, prvenstveno zbog visokih investicijskih troškova i kompleksnosti izvedbe koja zahtjeva obučeno osoblje. Nadalje, ograničavajući faktor za primjenu kombiniranih tretmana tehnologije preprekama u industriji predstavlja i nedostatak potrebnih regulatornih propisa (Aaliya i sur., 2021). Kod razvoja i primjene tehnologije preprekama, otegotnu okolnost može predstavljati i mogućnost razvoja rezistencije mikroorganizama. Naime, mikroorganizmi se ponekad mogu prilagoditi čimbenicima stresa iz okoliša razvijajući sustave prijenosa signala koji kontroliraju koordiniranu ekspresiju gena uključenih u stanične obrambene mehanizme, što može rezultirati popravljanjem nastalih oštećenja te stjecanjem rezistencije na određene prepreke (Gómez i sur., 2011). Stoga je, za uspješnu primjenu tehnologije preprekama u

konzerviranju hrane, od iznimne važnosti poznavati način djelovanja primijenjenih prepreka te ispitati kakav odgovor izazivaju kod mikroorganizama (Gómez i sur., 2011).

Zahvaljujući rastućoj svijesti potrošača i sve većoj potražnji za nutritivno vrijednom hranom, prehrambena industrija sve više se okreće minimalnom procesiranju hrane te razvoju novih, neinvazivnih tehnologija prerade hrane koje imaju potencijal poboljšati kvalitetu i sigurnost hrane, bez negativnih učinaka na senzorske i nutritivne značajke hrane (Gómez i sur., 2011). Suvremeni potrošači preferiraju voćne sokove sa svojstvima što sličnijim svježem voću, visoke nutritivne i funkcionalne kvalitete, produljenog roka trajanja i razumne cijene (Yildiz i sur., 2021b). Kako bi se izbjegle nepoželjne promjene uzrokovane uobičajenim postupcima prerade i postigla željena svojstva proizvoda, mogućnosti primjene tehnologije preprekama sve više se istražuju i u procesu proizvodnje voćnih sokova. Konzerviranje voćnog soka tehnologijom preprekama podrazumijeva istodobnu primjenu različitih pojedinačnih tretmana pri nižim intenzitetima, a zasniva se na primjeni novih kombinacija konvencionalnih čimbenika konzerviranja ili na kombiniranoj primjeni inovativnih tehnologija (Dixit i sur., 2018 ; Gómez i sur., 2011). U novije vrijeme sve veći naglasak stavlja se na kombiniranu primjenu inovativnih tehnologija obrade sokova u okviru tehnologije preprekama, prvenstveno zbog njihovog potencijala da uz postizanje mikrobne sigurnosti i stabilnosti proizvoda omoguće očuvanje željenih svojstava ishodišne sirovine (Putnik i sur., 2020). Neke od novih tehnologija čija se kombinirana primjena uvelike istražuje u tehnologiji voćnih sokova su tehnologija pulsirajućeg električnog polja, visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, hladna plazma, tehnologije temeljene na svjetlu jakog intenziteta i sl. Osim što se kombiniraju međusobno, pri konzerviranju voćnih sokova inovativne tehnologije često se primjenjuju i u kombinaciji s konvencionalnim metodama konzerviranja (Putnik i sur., 2020 ; Bevilacqua i sur., 2017). Za širok raspon voćnih sokova opsežno je istraživana primjena toplinske obrade u kombinaciji s različitim netoplinskim tehnologijama ili njihova kombinirana primjena s prirodnim antimikrobnim sredstvima (Dixit i sur., 2018).

#### 2.4.1. Primjena tehnologije pulsirajućeg električnog polja (engl. *Pulsed Electric Field*, PEF) u tehnologiji preprekama

Povećana potražnja za prehrambenim proizvodima visoke kvalitete usmjerila je istraživanja u području prehrambene tehnologije prema pronalasku novih alternativa postojećim procesima prerade. Tehnologija pulsirajućeg električnog polja relativno je nova tehnologija koja se koristi pri procesiranju hrane, a kojom se učinkovito postižu željeni utjecaji na namirnicu, uz minimalne gubitke senzorskih i nutritivnih karakteristika (Pallarés i sur.,

2020). Glavne komponente uređaja za procesiranje hrane PEF-om čine generator impulsa, sustav za upravljanje, komora za tretiranje i kontrolni sustav (Khan i sur., 2017). Procesiranje pulsirajućim električnim poljem uključuje primjenu električnog polja napona između 1 i 80 kV/cm u kratkotrajnim pulsevima (od  $\mu$ s do ms) na prehrambeni proizvod smješten u komori između dviju elektroda. Budući da tijekom procesa dolazi do neznatnog porasta temperature, PEF tretman se smatra netermalnim procesom. Temperature koje se razvijaju tijekom procesa obično ne prelaze 40 °C, a ukoliko je potrebno, standardnu opremu PEF uređaja moguće je nadograditi rashladnim sustavima (Gabrić i sur., 2018 ; Koubaa i sur., 2018). Uslijed izloženosti bioloških materijala djelovanju PEF-a, dolazi do promjene barijernih svojstava bioloških membrana u stanicama i do ubrzavanja transportnih procesa, što omogućuje primjenu tretmana za inaktivaciju prisutnih mikroorganizama i/ili kao dodatne operacije u određenim fazama proizvodnje za poboljšanje prijenosa mase kod procesa kao što su ekstrakcija, prešanje i sušenje (Pataro i Ferrari, 2020). Osnovni mehanizmi djelovanja PEF-a na staničnoj razini uključuju dielektrični raspad i elektroporaciju (Bahrami i sur., 2020). Elektroporacija uključuje stvaranje novih ili širenje postojećih pora uslijed niza kratkih, visokonaponskih impulsa (Arshad i sur., 2021). Tijekom PEF tretmana, elektroporacija membrane nastaje uslijed izlaganja bioloških stanica vanjskom električnom polju koje mora biti iznad kritične vrijednosti transmembranskog potencijala, čija se vrijednost razlikuje za svaki tip stanice (Arroyo i Lyng, 2016 ; Barba i sur., 2015). Kada razlika potencijala dosegne kritičnu vrijednost, stvaraju se pore u staničnoj membrani. Ovisno o uvjetima PEF tretmana, postižu se privremeni ili trajni učinci na propusnost membrane bioloških stanica, odnosno može doći do reverzibilne ili ireverzibilne elektroporacije, pri kojoj nastaje potpuno oštećenje membrane i posljedično dolazi do odumiranja stanice (Barba i sur., 2015).

Najznačajniju prednost PEF tehnologije u obradi namirnica predstavlja postizanje inaktivacije mikroorganizama pri nižim temperaturama u odnosu na konvencionalne metode pasterizacije, čime se omogućuje očuvanje bioaktivnih spojeva ishodišne sirovine (Zare i sur., 2023). Osim toga, PEF koristi manje količine energije i smatra se ekološki prihvatljivom i energetski visoko učinkovitom tehnologijom obrade hrane (Chacha i sur., 2021). Primjena PEF tehnologije opsežno je istraživana za čitav niz prehrambenih proizvoda. U svrhu osiguravanja mikrobiološke stabilnosti, PEF tehnologija najčešće se primjenjuje na tekućim namirnicama, među kojima se posebno ističe primjena PEF tretmana za postizanje stabilnosti voćnih sokova (Timmermans i sur., 2019). Budući da primjena PEF tretmana može značajno poboljšati prinos ekstrakcije različitih bioaktivnih spojeva iz prehrambenih materijala, PEF tehnologija nameće se kao izvrsna metoda za unaprjeđenje postojećih operacija u procesu proizvodnje voćnih

sokova, uz postizanje konačnog proizvoda visoke nutritivne kvalitete (Gabrić i sur., 2018 ; Elez-Martínez i sur., 2017). U istraživanjima Odriozola-Serrano i sur. (2008a, 2008b i 2009) zabilježen je visok stupanj zadržavanja antocijana u soku od jagode uslijed PEF tretmana. Slični rezultati zabilježeni su i u istraživanju Bebek Markovinović i sur. (2022c), gdje je uzevši u obzir utjecaj jakosti električnog polja (40 kV/cm vs. 50 kV/cm) utvrđeno da veća jakost električnog polja rezultira većim sadržajem antocijana, vjerojatno zbog povećane ekstrakcije antocijana iz matriksa uslijed PEF tretmana. Prema rezultatima istraživanja Yildiz i sur. (2021a), antioksidacijska aktivnost soka od jagode određivana DPPH metodom bila je značajno veća kod uzoraka soka tretiranog PEF-om ( $40,3 \pm 0,5 \%$ ) u odnosu na antioksidacijsku aktivnost termički pasteriziranih uzoraka soka od jagode ( $29,9 \pm 3,6 \%$ ).

Osim laboratorijskih izvedbi uređaja i pilot postrojenja, razvijeni su različiti komercijalni PEF sustavi za industrijsku primjenu (Blahovec i sur., 2017). Iako je PEF tehnologija vrlo dobro istražena i postoje industrijske izvedbe PEF sustava koji rade diljem svijeta, većina istraživanja provode se u laboratorijskim sustavima (Nowosad i sur., 2021). Razlog tomu su prvenstveno iznimno visoki investicijski troškovi koji ujedno predstavljaju i jednu od glavnih prepreka za opsežnu primjenu PEF-a na industrijskoj razini (Chacha i sur., 2021). Osim toga, regulatorni aspekti korištenja PEF tehnologije još uvijek nisu adekvatno definirani. U Europskoj uniji ne postoji zasebna legislativa kojom se regulira hrana procesirana PEF tehnologijom, već upotreba navedene tehnologije podliježe Uredbi (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i Vijeća o novoj hrani kao hrana koja je rezultat proizvodnog postupka koji se prije 15. svibnja 1997. nije upotrebljavao za proizvodnju hrane unutar Europske unije. Međutim, budući da primjena PEF-a u procesu proizvodnje najčešće ne uzrokuje značajne promjene u sastavu ili strukturi hrane koje utječu na njezinu nutritivnu vrijednost, metabolizam ili razinu nepoželjnih tvari, implementacija PEF tehnologije u proizvodni proces ne znači nužno da se proizvod može smatrati novom hranom (Nowosad i sur., 2021). Kao nedostatak ove tehnologije može se navesti da je primjena PEF tehnologije u svrhu postizanja inaktivacije mikroorganizama ograničena uglavnom na tekuće medije niske vodljivosti koji ne sadrže mjehuriće zraka. Prisutnost mjehurića zraka može uzrokovati nehomogenu PEF obradu, uz operativne i sigurnosne poteškoće (Zare i sur., 2023 ; Lasekan i sur., 2017). Korištenje PEF tretmana za konzerviranje čvrstih prehrambenih proizvoda u praksi se ne primjenjuje jer primjena impulsa električnog polja obično narušava mikrostrukturu namirnica. Međutim, PEF tretmani mogu se primijeniti kao dodatne operacije kod obrade čvrstih sirovina, najčešće s ciljem boljeg iskorištenja sirovina i generiranih nusproizvoda (Martín-Belloso i Soliva-Fortuny, 2011). Nadalje, tijekom PEF obrade neizbježno se odvijaju i različite elektrokemijske reakcije

koje mogu rezultirati kemijskim promjenama u prehrambenim proizvodima, korozijom i onečišćenjem elektroda te elektrolizom vode (Pataro i Ferrari, 2020). Osim toga, primjena ove tehnologije u svrhu pasterizacije ograničena je visokom otpornošću pojedinih mikrobnih vrsta i bakterijskih spora na djelovanje PEF-a (Bahrami i sur., 2020). Kako bi se doskočilo navedenom nedostatku, PEF tehnologiju je poželjno kombinirati s drugim procesima konzerviranja u okviru tehnologije preprekama kako bi se postigli željeni rezultati (Arroyo i Lyng, 2016). Pri konzerviranju voćnih sokova tehnologijom preprekama, PEF tehnologija primjenjuje se u kombinaciji s toplinskim tretmanima, antimikrobnim agensima ili pak s drugim inovativnim netermalnim procesima, poput ultrazvuka, visokog hidrostatskog tlaka i ultraljubičastog zračenja (de Carvalho i sur., 2018 ; Aadil i sur., 2018 ; Siemer i sur., 2014 ; Mosqueda-Melgar i sur., 2012 ; Noci i sur., 2008).

#### 2.4.2. Primjena tehnologije ultrazvuka visoke snage (engl. *High Power Ultrasound*, HPU) u tehnologiji preprekama

U novije vrijeme, primjena ultrazvuka pobuđuje sve veći interes prehrambene industrije. Zahvaljujući širokom frekvencijskom rasponu i različitim učincima akustičnih valova koji se pripisuju određenim frekvencijama, ova tehnologija uspješno je pronašla svoju primjenu u brojnim procesima u prehrambenoj industriji (Singla i Sit, 2021 ; Gallo i sur., 2018). Rasponi zvuka koji se koriste u prehrambenoj industriji mogu se podijeliti na ultrazvučne valove niskog intenziteta, s frekvencijama iznad 100 kHz, te ultrazvuk visoke snage (HPU), s frekvencijama između 18–100 kHz, koji uzrokuje fizičke, mehaničke i kemijske promjene na hrani (Margean i sur., 2020). Ultrazvuk niskog intenziteta uglavnom se koristi kao nedestruktivna analitička tehnika za kontrolu kvalitete i praćenje procesa, dok se tretiranjem hrane ultrazvukom visokog intenziteta uspješno pospješuju određeni procesi te u konačnici postiže bolja kvaliteta i sigurnost prerađene hrane. Neke od mogućnosti primjene ultrazvuka u obradi hrane uključuju emulgiranje, homogenizaciju, otplinjavanje, konzerviranje hrane i poboljšanu ekstrakciju aktivnih sastojaka iz prehrambenih proizvoda (Gallo i sur., 2018). Uređaji za tretiranje hrane ultrazvukom u osnovi se sastoje od tri dijela, a to su generator, ultrazvučni pretvarač i sustav za produkciju ultrazvuka. Generator se koristi za transformaciju standardne električne energije u električnu energiju na ultrazvučnoj frekvenciji, koju zatim pretvarači pretvaraju u ultrazvučne valove. U industrijskoj primjeni najčešće se upotrebljavaju dvije vrste pretvarača, magnetostriksijski i piezoelektrični (Yao i sur., 2020 ; Dolas i sur., 2019). Ultrazvučna energija predaje se procesu pomoću sustava za produkciju koji su najčešće izvedeni u obliku ultrazvučne

kupelji ili sonde (Bhargava i sur., 2021). Osnovni mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta predstavlja akustična kavitacija. Kada se ultrazvuk širi kroz bilo koji medij, on izaziva niz kompresija i ekspanzija. Takve izmjenične promjene tlaka uzrokuju stvaranje, rast i u konačnici implozivni kolaps mjehurića, uslijed čega se oslobađa veća količina energije (Tiwari, 2015). Uslijed implozije kavitacijskih mjehurića spontano nastaju slobodni radikali i vodikov peroksid te se stvaraju mikropodručja visoke temperature i tlaka. Navedene pojave uzrokuju strukturne i funkcionalne promjene na staničnim membranama koje mogu dovesti do inaktivacije mikroorganizama u tretiranim namirnicama (Swamy i sur., 2018). Budući da se postizanje mikrobiološke inaktivacije pripisuje i ostalim čimbenicima osim razvoja topline, ultrazvuk se također smatra netermalnim procesom obrade hrane (Kentish i Feng, 2014).

Ultrazvuk je sigurna i ekološki prihvatljiva tehnologija čijom se primjenom uspješno postižu i poboljšavaju različiti procesi u prehrambenoj industriji (Bhargava i sur., 2021). Primjena HPU tretmana predstavlja obećavajući pristup za konzerviranje hrane bez štetnih učinaka na nutritivna i senzorska svojstva hrane (Khandpur i Goate, 2016). U preradi sokova, HPU tretman može se koristiti ne samo za inaktivaciju mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje, već i kao učinkovit i ekološki prihvatljiv tretman za poboljšanje nutritivne vrijednosti sokova u smislu bolje ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Margean i sur., 2020). Rezultati istraživanja Dubrović i sur. (2011) ukazali su da je uslijed HPU tretmana soka od jagode (20 kHz, 40 °C, 3 min) zadržano 98 % početnog sadržaja ukupnih antocijana. U istraživanju Tiwari i sur. (2008) ispitivan je utjecaj HPU tretmana na degradaciju antocijana u soku od jagode pri različitim amplitudama (40-100 %) i vremenu (2-10 min) pri konstantnoj frekvenciji od 20 kHz. Autori su ukazali na blago povećanje (<1,0 %) antocijana u soku od pri niskoj amplitudi i kraćem vremenu, dok su više amplitude i dulje vrijeme tretmana (>5 min) uzrokovali degradaciju antocijana. Prema rezultatima istraživanja Yildiz i sur. (2021a) antioksidacijska aktivnost soka od jagode određivana DPPH metodom značajno se povećala uslijed HPU tretmana ( $39,6 \pm 1,9$  %) u odnosu na antioksidacijsku aktivnost termički pasteriziranih uzoraka soka od jagode ( $29,9 \pm 3,6$  %). Slični rezultati zabilježeni su i u drugim istraživanjima, a povećanje antioksidacijske aktivnosti pripisuje se povećanoj sposobnosti ekstrakcije spojeva s antioksidacijskim djelovanjem uslijed HPU tretmana (Wang i sur., 2019).

Kako bi se postigla adekvatna razina mikrobiološke inaktivacije tijekom HPU tretmana, hranu je potrebno izlagati akustičnim valovima visokog intenziteta kroz dulje vrijeme. Produljeno vrijeme obrade može dovesti do povećanog stvaranja slobodnih radikala koji će brzo stupiti u interakciju s organskim spojevima što potencijalno može narušiti kvalitetu konačnog proizvoda (Chavan i sur., 2022 ; Bhargava i sur., 2021). Osim toga, otpornost

različitih mikroorganizama na HPU tretmane varira, pri čemu je rezistencija bakterijskih spora na djelovanje ultrazvučnih valova veća od vegetativnih oblika mikroorganizama (Kentish i Feng, 2014). U većini slučajeva, kada se primjenjuje samostalno, HPU ne omogućuje postizanje adekvatnog stupnja smanjenja broja mikroorganizama (Barba i sur., 2017). Stoga se ova tehnologija pri obradi voćnih sokova često koristi u kombinaciji s toplinskim tretmanima, antimikrobnim agensima i inovativnim procesima poput visokog hidrostatskog tlaka, PEF-a i pulsirajućeg svjetla, čime se učinkovitost tretmana povećava, a istovremeno omogućuju blaži uvjeti obrade kojima se izbjegava degradacija nutrijenata i kvalitete (Ma i sur., 2020 ; Zhu i sur., 2017 ; Khandpur i Goate, 2016 ; Ferrario i sur., 2015 ; Ferrante i sur., 2007). Tijekom posljednjih godina, izvedba HPU tehnologije razvila se od laboratorijskih prototipova do potpuno operativnih komercijalnih izvedbi uređaja. Iako HPU predstavlja obećavajuću tehnologiju za prehrambeno-procesnu industriju, oprema za HPU tretmane za sada se izrađuje isključivo po narudžbi za pojedinačnu upotrebu, što povećava troškove implementacije ove tehnologije u industriji (Chavan i sur., 2022 ; Bates i Patist, 2010). Otežana dostupnost uređaja industrijskih kapaciteta, investicijski rizik i nedovoljna istraženost tržišta glavni su razlozi zbog kojih HPU tehnologija još uvijek nije uspješno pronašla značajnije mjesto u industrijskoj proizvodnji voćnih sokova (Dolas i sur., 2019). Iako su brojna istraživanja ukazala na potencijal primjene HPU tehnologije u svrhu konzerviranja hrane, ne postoji posebna regulativa bilo koje regulatorne agencije koja bi odobrila primjenu HPU tehnologije u navedenu svrhu, što dodatno otežava opsežnu primjenu ove tehnologije u industriji (Nunes i sur., 2022).

#### 2.4.3. Utjecaj tehnologije preprekama na stabilnost bioaktivnih spojeva u soku od jagode

Kombinacija inovativnih, netermalnih metoda u okviru tehnologije preprekama obećavajući je pristup za očuvanje kvalitete voćnih sokova. Međutim, primjena PEF i HPU kao kombinirane tehnologije preprekama još uvijek nije dovoljno istražena kao alternativa konvencionalnim metodama konzerviranja voćnih sokova, unatoč rezultatima istraživanja koji impliciraju da ove tehnologije imaju sinergijski potencijal za poboljšanje kvalitete sokova (Putnik i sur., 2020). Pojedinačna primjena PEF i HPU tehnologije u obradi soka od jagode obuhvaćena je prijašnjim istraživanjima, pri čemu su obje tehnologije uz optimalne varijacije parametara pokazale veliki potencijal za očuvanje kvalitete ishodišne sirovine i proizvodnju funkcionalne hrane na bazi soka od jagoda (Bebek Markovinović i sur., 2022a ; Bebek Markovinović i sur., 2022c). Uslijed nedostatka sustavnih studija, utjecaj kombinirane primjene ovih tretmana na kvalitetu i sigurnost soka od jagode još uvijek nije dovoljno istražen.



Aadil i sur. (2018) istraživali su kombinirani učinak PEF i HPU tretmana na bioaktivne spojeve i mikrobnu stabilnost soka od grejpa. Sok je najprije obrađen PEF tretmanom (20 kV/cm, 1kHz, 600  $\mu$ s) pri kontinuiranom protoku od 80 mL/min kroz komoru za tretman u PEF sustavu, a potom HPU tretmanom (600 W, 28 kHz i 30 min) u ultrazvučnoj kupelji. Rezultati ove studije ukazuju na značajno povećanje ukupnih antocijana tijekom HPU ( $1,47 \pm 0,05$  mg/L) i PEF tretmana pojedinačno ( $1,58 \pm 0,03$  mg/L) u usporedbi s kontrolom ( $1,37 \pm 0,03$  mg/L), a najveći sadržaj antocijana u soku od grejpa postignut je tijekom njihove kombinirane primjene ( $1,68 \pm 0,09$  mg/L). Osim toga, primijećeno je značajno povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta i antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH metodom. DPPH aktivnost povećala se od  $32,80 \pm 0,04$  % (kontrola) na  $39,65 \pm 0,04$  % za HPU,  $38,74 \pm 0,05$  % za PEF i  $48,78 \pm 0,05$  % za kombinirani PEF + HPU tretman. Najviša razina antioksidacijske aktivnosti primijećena uslijed PEF + HPU tretmana najvjerojatnije je posljedica sinergističkog djelovanja ovih tretmana koji su doveli do povećanja razine fenolnih spojeva u soku od grejpa (Aadil i sur., 2018).

U istraživanju Hosseinzadeh Samani i sur. (2020) ispitivan je utjecaj kombinacije PEF (5–10 kV/cm, 5–35 s) i HPU (100–200 W, 3–5 min) tretmana na inaktivaciju mikroorganizama i kvalitetu soka od višnje. Sadržaj antocijana, izražen u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida, u netretiranom uzorku iznosio 376 mg C3G/L, dok je sadržaj antocijana nakon kombinirane primjene PEF i HPU iznosio 368 mg C3G/L. Zbog nepovoljnog utjecaja visoke temperature uslijed toplinske obrade primijećena je veća degradacija antocijana, pri čemu je sadržaj antocijana nakon konvencionalne pasterizacije (70 °C, 1 min) iznosio 351 mg C3G/L (Hosseinzadeh Samani i sur., 2020).

Medina-Meza i sur. (2016) su proveli PEF (25 kV, 600 Hz, 66  $\mu$ s), HPU (24 kHz, 400 W, 20 min) i kombiniranu obradu PEF + HPU (25 kV, 600 Hz, 66  $\mu$ s + 24 kHz, 400 W, 20 min) pirea od malina i borovnica, proučavajući učinke na bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet. Povećanje sadržaja antocijana opaženo je kod pirea od borovnica podvrgnutom PEF-u odnosno kombiniranom tretmanu, s povećanjem od 9 odnosno 30 %. Sadržaj antocijana u pireu od malina značajno je porastao samo uslijed primijene PEF tretmana (za 15 %), dok je HPU tretman pokazao negativan učinak, smanjujući sadržaj antocijana za 33 %, odnosno za 44 % kada je primijenjen nakon PEF-a. Na temelju dobivenih rezultata autori zaključuju kako je elektroporacija važnija od kavitacije u ekstrakciji antocijana. DPPH metodom utvrđeno je da je sveukupni utjecaj i PEF-a i HPU-a kao netermalnih tehnologija na antioksidacijsku aktivnost nizak, što ukazuje na visok stupanj očuvanja bioaktivnih spojeva uslijed tretmana (Medina-Meza i sur. 2016).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada ispitan je utjecaj tehnologije preprekama na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet u soku od jagoda tijekom nultog i sedmog dana skladištenja pri 4 °C.

#### 3.1. MATERIJALI

Za pripremu soka od jagode u eksperimentalnom dijelu rada korištene su jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.) sorte 'Albion', nabavljene putem tvrtke Jagodar-HB d.o.o. (Donja Lomnica, Zagrebačka Županija). Svježe jagode dopremljene su u Laboratorij, gdje su im odstranjene peteljke, nakon čega su jagode oprane i posušene staničevinom. Ovako pripremljene jagode skladištene su u plastičnim posudicama u zamrzivaču pri -18 °C. Dan prije provedbe pokusa, jagode su premještene iz zamrzivača u hladnjak (4 °C) kako bi se odmrznule i neposredno prije tretmana preradile u sok.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Priprema soka od jagode

Za pripremu soka od jagode korišten je sokovnik za hladno prešanje Kuvings B6000 (VerVita d.o.o., Hrvatska) snage 240 W, brzine okretaja 60 o/min i promjera filtera 0,2 mm. Princip rada sokovnika zasniva se na sporo rotirajućem mehanizmu koji omogućava lagan pritisak voćnog tkiva pomoću vijka izrađenog od ULTEM-a® (polieterimid) na sita uređaja. Na ovaj način osigurava se kontinuirano prešanje soka koji protječe u prihvatnu posudu.

##### 3.2.2. Obrada sokova od jagode tehnologijom preprekama

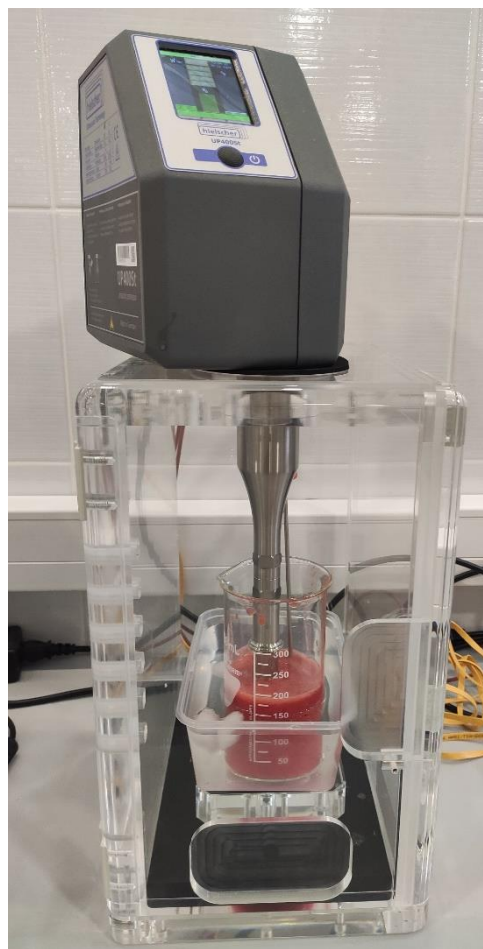
Uzorci soka od jagode obrađeni su primjenom tehnologije preprekama odnosno kombiniranom primjenom tehnologija pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka visoke snage (HPU) uz varijacije redoslijeda primjene tehnologija prema unaprijed definiranom planu pokusa (tablica 2), a nastavno na optimirane procesne parametre svake od primijenjenih tehnologija u prijašnjim istraživanjima (Bebek Markovinović i sur., 2022a; Bebek Markovinović i sur., 2022c).

Uređaj za pulsirajuće električno polje HVG60/1 PEF (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (slika 1. A) sastoji od tri jedinice: magna control jedinice, visokonaponskog izvora napajanja i visokonaponskog generatora impulsa. Magna control jedinica kontrolira ispravnost uređaja i

generira upravljačke impulse za visokonaponski sustav. Visokonaponski izvor napajanja vrši pretvorbu ulaznog izmjeničnog napona od 230 V u istosmjerni napon u rasponu od 1 do 60 kV. Visokonaponski generator impulsa propušta ulazni visoki napon na izlaz u obliku impulsa zadanih parametara. Prije početka tretmana, uređaj se podese prema zadanim parametrima. Uzorci su tretirani su pri 100 Hz, naponu od 30 kV/cm, širini pulsa od 1  $\mu$ s u vremenu od 1,5; 3 i 4,5 minute. Udaljenost između elektrode uzemljenja i visokonaponske elektrode iznosila je 2,5 cm. Obje elektrode izvedene su od nehrđajućeg čelika. Tijekom PEF tretmana temperatura je mjerena infracrvenim termometrom InfraRed Thermometer PCE-777 (PCE Instruments, UK).



A



B

**Slika 1.** Uređaj za pulsirajuće električno polje HVG60/1 PEF (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (A) i ultrazvučni procesor visoke snage Hielscher UP400St, 400 W, 24 Hz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka) (B)

Uređaj za ultrazvuk visoke snage Hielscher UP400St, 400 W, 24 Hz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka) (slika 1. B) sastoji se od digitalnog ultrazvučnog procesora, sonotrode izrađene od titana DN22 (546 mm<sup>2</sup>) i postolja od nehrđajućeg čelika, a smješten je unutar kutije za zaštitu od buke izrađene od akrilnog stakla. Maksimalna snaga ultrazvučnog procesora UP400St iznosi 400 W, amplituda je podesiva od 20 do 100 %, puls od 10 do 100 %, a vrijeme tretiranja određuje se ručno u rasponu od 0,1 sekunde do 99 dana. Prije početka tretmana, uređaj se podesi prema zadanim parametrima. Uzorci su tretirani pri amplitudi 25 % i pulsu 50 % u vremenu od 2,5; 5 i 7,5 minuta. Uređaj sadrži i digitalni termometar za mjerenje temperature uzorka prije, tijekom i nakon tretmana. Uzorci sokova od jagode volumena oko 200 mL tretirani su u staklenoj čaši volumena 300 mL koja je tijekom tretmana uronjena u hladnu vodenu kupelj s ledom kako bi se tijekom HPU tretmana smanjio utjecaj temperature.

**Tablica 2.** Plan pokusa tretiranja sokova od jagode tehnologijom preprekama

Uzorak	Skladištenje (dani)	Tretman	Tretman 1	Tretman 2
1	0	Kontrolni uzorak	/	/
2	0	PEF + HPU	30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 2,5 min
3	0		30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 5 min
4	0		30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 7,5 min
5	0		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 2,5 min
6	0		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 5 min
7	0		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 7,5 min
8	0		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 2,5 min
9	0		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 5 min
10	0		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 7,5 min
11	0	HPU + PEF	A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
12	0		A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
13	0		A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min
14	0		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
15	0		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
16	0		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min

**Tablica 2.** Plan pokusa tretiranja sokova od jagode tehnologijom preprekama – nastavak

17	0		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
18	0		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
19	0		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min
20	7	Kontrolni uzorak	/	/
21	7	PEF + HPU	30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 2,5 min
22	7		30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 5 min
23	7		30 kV, 100 Hz, 1,5 min	A25%, puls 50, 7,5 min
24	7		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 2,5 min
25	7		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 5 min
26	7		30 kV, 100 Hz, 3 min	A25%, puls 50, 7,5 min
27	7		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 2,5 min
28	7		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 5 min
29	7		30 kV, 100 Hz, 4,5 min	A25%, puls 50, 7,5 min
30	7	HPU + PEF	A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
31	7		A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
32	7		A25%, puls 50, 2,5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min
33	7		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
34	7		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
35	7		A25%, puls 50, 5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min
36	7		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 1,5 min
37	7		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 3 min
38	7		A25%, puls 50, 7,5 min	30 kV, 100 Hz, 4,5 min

Kontrolni uzorak – netretirani uzorak soka; PEF – sok tretiran pulsirajućim električnim poljem; HPU – sok tretiran ultrazvukom visoke snage; PEF+HPU – redosljed tretiranja sokova tehnologijom preprekama, prvotno PEF, a zatim HPU tehnologijom; HPU+PEF – redosljed tretiranja sokova tehnologijom preprekama, prvotno HPU, a zatim PEF tehnologijom; A – amplituda ultrazvuka.

### 3.2.3. Postupak ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz uzoraka soka od jagode

#### Aparatura i pribor:

- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)

- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Pipeta, volumena 10 mL
- Mikropipeta Eppendorf, volumena 5000  $\mu$ L
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom, volumena 50 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice, volumena 50 mL

*Otapala:*

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

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

Postupak ekstrakcije: Odvaž se 5 g uzorka soka od jagode (s točnošću  $\pm$  0,01) u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom volumena 50 mL te se nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (1 % mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 15 min. Po provedenoj ekstrakciji, uzorci se profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL, nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake te skladište pri 4 °C do provedbe analiza (Bursać Kovačević i sur., 2016).

#### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje monomernih antocijana

*Princip određivanja:* Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu, pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorpcija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj dužini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (Lee i sur., 2005).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska)
- Staklena čaša
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipeta, volumena 10 mL
- Menzura, volumena 100mL i 1000 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL

*Otapala i reagensi:*

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

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

- Klorovodična kiselina 37 % (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Kalij klorid 99,0 - 100,5 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)
- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 1,86 g kalijeva klorida (KCl) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te se doda 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podesi na vrijednost 1,0 ( $\pm$  0,05) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 10 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrij acetat anhidrid 99 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Njemačka)

- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvažuje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te se doda 930 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 4,5 ( $\pm 0,05$ ) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 35 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Priprema uzorka: Određivanje monomernih antocijana provedeno je iz ekstrakata koji su pripremljeni na način opisan u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja: Reakcija se postavlja u staklenim epruvetama na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme po dvije epruvete i označe se oznakama pufera (npr. za isti uzorak se na jednu epruvetu napiše pH 1, a na drugu pH 4,5). U svaku se epruvetu potom otpipetira po 1 mL pripremljenog ekstrakta, a potom se u jednu epruvetu nadoda 4 mL pufera pH 1, a u drugu 4 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu.

Izračunavanje:

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$X \text{ (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [1]$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za pelargonidin-3-glukozid  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_{10}$  = 468,8 g/mol)

DF = faktor razrjeđenja

$10^3$  = faktor za preračunavanje g u mg

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za pelargonidin-3-glukozid = 31600 L/mol cm u otapalu 1 % HCl / MeOH)

l = debljina kivete (1 cm)



### 3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

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

#### *Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL i 500 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Staklena čaša, stakleni lijevak, stakleni štapić
- Plastična lađica za vaganje, špatula

#### *Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) 0,5 mM u 100 %-tnom metanolu (v/v)

Priprema: 0,1 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim

metanolom u odmjernoj tikvici od 500 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnom u zatvorenoj tikvici.

- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) 0,02 M

Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 500 mg Trolox u plastičnoj ladici za vaganje. Odvaga se kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Trolox potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja: Postupak određivanja provodi se prema metodi za određivanje AA u ekstraktima gloga (Shortle i sur., 2014). U epruvetu se otpipetira 1,5 mL ekstrakta te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 4,5 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzorka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izračunavanje:

*Izrada baždarnog pravca za Trolox (0,5 mM DPPH)*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Od 0,02 M otopine Trolox pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 125; 150; 200; 400 i 600  $\mu$ M na način da se redom otpipetira 156; 187,5; 250; 500 i 750  $\mu$ L u odmjerne tikvice od 25 mL te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U epruvetu se otpipetira 1,5 mL odgovarajuće otopine Trolox te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 4,5 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa

sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz 100 %-tni metanol kao slijepu probu.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtana se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbanacije na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen DPPH metodom.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,0037x + 2,3781 \quad [2]$$

gdje je:

y – apsorbanacija pri 517 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

*Princip određivanja:* FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks ferotripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996).

*Aparatura i pribor:*

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Električna vodena kupelj Grant (JBN5, Cambridge, UK)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice, volumena 10, 25 mL, 100 mL i 1 L

- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklena čaša
- Plastična lađica za vaganje, špatula

*Otapala i reagensi:*

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9\%$  (Honeywell, Riedel-de-Haën<sup>TM</sup>, Francuska)
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 1 mM

Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina,  $\geq 99,8\%$  (Honeywell, Fluka<sup>TM</sup>, Seelze, Njemačka)

- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaže se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Napomena: Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja: U staklene epruvete redom se otpipetira 600 µL ekstrakta i 4500 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran.

Izračunavanje:

*Izrada baždarnog pravca za Trolox*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 10; 25; 50; 100; 125 i 150 µM na način da se redom otpipetira 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 3,125; 3,75 i 5 mL u odmjerne tikvice od 25 mL, te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 600 µL otopine standarda i 4500 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje 100 %-tni metanol.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacрта se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad [3]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 593 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom IBM SPSS (ver. 24). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su: (i) vrijeme obrade PEF tretmanom (1,5; 3 i 4,5 min), (ii) vrijeme obrade HPU tretmanom (2,5; 5 i 7,5 min) i (iii) vrijeme skladištenja (0 i 7 dana). Zavisne varijable su: (i) monomerni antocijani ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ ), (ii) DPPH vrijednosti ( $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ ) te (iii) FRAP vrijednosti ( $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ ). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  standardna greška prosjeka.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U provedenom istraživanju ispitivan je utjecaj kombinacije PEF i HPU tretmana u okviru tehnologije preprekama na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode sorte 'Albion'. Sokovi od jagode tretirani su kombiniranom primjenom PEF i HPU tehnologija, uz varijacije u redoslijedu primijenjenih tretmana (PEF+HPU i HPU+PEF). Svaka od tehnologija u konceptu preprekama primijenjena je u varijaciji 3 različita vremena obrade te su po završenoj obradi svi uzorci sokova skladišteni tijekom 7 dana pri 4 °C. Dobiveni rezultati obrađeni su multivarijantnom analizom varijance te su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna pogreška prosjeka (tablice 3 do 6).

#### 4.1. UTJECAJ TEHNOLOGIJE PREPREKAMA NA STABILNOST ANTOCIJANA U SOKOVIMA OD JAGODE

Rezultati multivarijantne analize o utjecaju tehnologije preprekama i uvjeta skladištenja na stabilnost antocijana u sokovima od jagode sorte 'Albion' prikazani su u tablicama 3 i 4. Prosječna vrijednost antocijana dobivena analizom 36 uzoraka soka tretiranih prvotno PEF, a potom HPU tehnologijom iznosila je  $18,26 \pm 0,03$  mg/100 g, dok je prosječna vrijednost antocijana u sokovima tretiranim obrnutim redoslijedom tehnologija (HPU+PEF) iznosila  $18,89 \pm 0,03$  mg/100 g. Dobiveni rezultati ukazuju da stabilnosti antocijana bolje pogoduje ukoliko se najprije primjenjuje HPU, a potom PEF tretman, što može biti posljedica većeg oštećenja stanica izazvanog HPU tretmanom (kao prvom preprekom) kroz fenomen kavitacije, što može uzrokovati povećanu osjetljivost na naknadni PEF tretman i poboljšanu ekstrakciju antocijana. U istraživanju Medina-Meza i sur. (2016) pire od malina i borovnica obrađivan je kombiniranom primjenom tretmana isključivo redoslijedom tretmana najprije PEF, a zatim HPU. Ovaj redoslijed tretmana odabran je na temelju pretpostavke kako elektroporacija uzrokuje manja oštećenja staničnih membrana u usporedbi s kavitacijom tijekom HPU tretmana, tijekom kojeg se membrane više oštećuju (Medina-Meza i sur., 2016). Budući da, prema dosadašnjim saznanjima, ne postoje prethodno provedene studije u kojima se uspoređivao utjecaj redoslijeda primjene kombiniranih PEF i HPU tretmana na stabilnost antocijana u sokovima od jagode niti drugim sokovima, dobivene rezultate nije moguće usporediti s rezultatima drugih istraživanja, što ostavlja prostor za daljnje proučavanje utjecaja redoslijeda primjene navedenih tretmana u tehnologiji preprekama. Dobivene prosječne vrijednosti antocijana dobro su usklađene s rezultatima dvaju istraživanja Bebek Markovinović i sur. (2022a i 2022b), u kojima je sadržaj antocijana za svježe sokove od jagode sorte 'Albion' iznosio  $17,84 \pm 0,31$  odnosno  $22,08 \pm 0,47$  mg/100 mL.

Skladištenjem soka od jagode pri 4 °C tijekom 7 dana došlo je do povećanja udjela antocijana u sokovima tretiranim prvo PEF, a zatim HPU tehnologijom, dok je kod sokova tretiranih obrnutim redoslijedom tehnologija primijećen suprotan trend odnosno smanjenje udjela antocijana. Budući da skladištenje općenito nepovoljno utječe na stabilnost antocijana, smanjenje udjela antocijana za vrijeme skladištenja sokova tretiranih HPU+PEF tehnologijom u skladu je s očekivanjima. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Tiwari i sur. (2008), koji su u soku od jagode tretiranim HPU tehnologijom utvrdili gubitak antocijana od 10 % tijekom 10 dana skladištenja na 4 °C. Nadalje, slične rezultate potvrđuju i istraživanja Bebek Markovinović i sur. (2022a) gdje je skladištenje soka u trajanju od 7 dana imalo



statistički značajan učinak na smanjenje sadržaja antocijana u HPU tretiranim sokovima. Gubitak antocijana tijekom skladištenja može se pripisati oksidaciji, kao i reakcijama kondenzacije antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Iako povećanje udjela antocijana tijekom skladištenja predstavlja pomalo neočekivanu pojavu, isti trend uočen je i u istraživanju Bebek Markovinović i sur. (2022c) gdje su sokovi od jagoda tretirani PEF tehnologijom tijekom skladištenja imali povećan sadržaj antocijana (29,63 mg/100 mL) u odnosu na sadržaj antocijana na početku skladištenja (27,35 mg/100 mL). Pozitivan utjecaj skladištenja na sadržaj bioaktivnih spojeva poput antocijana moguće je objasniti njihovom naknadnom ekstrakcijom odnosno istjecanjem citoplazme iz oštećenih stanica tijekom perioda skladištenja (Bebek Markovinović i sur., 2022c).

Promatrajući utjecaj vremena procesiranja tijekom PEF tretmana na stabilnost antocijana pri konstantnim vrijednostima jakosti električnog polja i frekvencije, može se uočiti postojanje statistički značajnih razlika među različitim vremenima obrade. Kod tretmana u kombinaciji PEF+HPU, uz PEF tretiranje od 3 min, uočena je najveća stabilnost antocijana, dok su pri kraćem i duljem vremenu PEF tretmana antocijani ostali očuvani u manjoj mjeri. S druge strane, rezultati multifaktorske analize PEF tretmana u kombinaciji HPU+PEF pokazuju da se produljenjem PEF tretmana smanjuje stabilnost antocijana. U istraživanju Odriozola-Serrano i sur. (2008b) sadržaj antocijana u sokovima od jagode značajno je ovisio o vremenu obrade i jakosti električnog polja primijenjenog tijekom PEF obrade uzoraka, pri čemu su kraće vrijeme tretmana i veća jakost električnog polja doveli do veće retencije antocijana. Prema rezultatima istraživanja Bebek Markovinović i sur. (2022c) vrijeme trajanja PEF tretmana nije pokazalo značajan učinak na sadržaj antocijana u sokovima od jagode, dok je povećanje vremena tretmana s 3 min na 6 min negativno utjecalo na sadržaj flavonola i kondenziranih tanina, što ukazuje na moguću degradaciju određenih bioaktivnih spojeva pri duljem tretmanu. Međutim, utjecaj pojedinačnih faktora poput trajanja tretmana na promjene antocijana teško se može objasniti zbog složenosti kemijskih reakcija koje se odvijaju u složenim sustavima poput voćnih sokova tijekom obrade PEF-om (Odriozola-Serrano i sur., 2009).

Promatrajući isključivo utjecaj trajanja HPU tretmana u tehnologiji preprekama tijekom PEF+HPU tretmana, tretman od 5 min rezultirao je najvećom stabilnošću antocijana, dok je vrijeme trajanja tretmana od 7,5 min rezultiralo najmanjom stabilnošću antocijana. Tijekom obrnutog redoslijeda tretmana, utjecaj vremena HPU procesiranja na stabilnost antocijana pokazuje da se produljenjem HPU tretmana smanjuje stabilnost antocijana. Tiwari i sur. (2008) u svom istraživanju potvrdili su značajan učinak vremena tretmana na smanjenje sadržaja antocijana u sokovima od jagoda tretiranih HPU-om. Slični rezultati zabilježeni su i u

istraživanju koje su proveli Bebek Markovinović i sur. (2022a), gdje je dulje trajanje HPU tretmana (10 min u odnosu na 5 min) također imalo negativan učinak na sadržaj antocijana u sokovima od jagode. Povećanje sadržaja antocijana pri kraćim vremenima tretmana može biti posljedica poboljšane ekstrakcije pigmenata iz suspendirane pulpe, dok bi razgradnja antocijana tijekom dulje HPU obrade mogla biti povezana s oksidacijskim reakcijama, potaknutim interakcijom sa slobodnim radikalima nastalim tijekom procesiranja (Tiwari i sur., 2008).

Učinci tehnologije preprekama u kombinaciji PEF+HPU proučavani su kombiniranjem različitih vremena izloženosti uzoraka PEF i HPU tehnologiji. Značajne razlike u utjecaju na stabilnost antocijana u sokovima od jagode mogu se uočiti uslijed najkraćeg vremena trajanja PEF tretmana (1,5 min) uz varijacije u trajanju HPU tretmana od 2,5; 5 i 7,5 min. Prema dobivenim rezultatima, najbolji učinak ovih dviju tehnologija postignut je tretmanom 1,5 min PEF + 2,5 min HPU, dok dulje trajanje HPU tretmana kao sekundarne prepreke negativno utječe na stabilnost antocijana. Međutim, uz vrijeme trajanja prvotnog PEF tretmana od 3 min i iste varijacije u trajanju naknadnog HPU tretmana, stabilnost antocijana prati nešto drugačiji trend. U ovom slučaju, dulje trajanje HPU tretmana (5 i 7,5 min) pokazuje bolji utjecaj na stabilnost antocijana u odnosu na kraći HPU tretman (2,5 min). Ovi rezultati ukazuju da je bolja sinergija utjecaja ovih dviju tehnologija na ekstrakciju i stabilnost antocijana postignuta pri duljim HPU tretmanima. Nadalje, pri trajanju PEF tretmana od 4,5 min uz varijacije u trajanju HPU tretmana, najbolji utjecaj na stabilnost antocijana pokazala je kombinacija 4,5 min PEF + 5 min HPU.

Rezultati postignuti tehnologijom preprekama primijenjenom u obrnutoj kombinaciji (HPU+PEF) pri konstantnom trajanju prvotnog HPU tretmana od 2,5 min, uz varijacije u trajanju naknadnog PEF tretmana (1,5 – 4,5 min), ukazuju da dulje trajanje PEF tretmana nepovoljno utječe na stabilnost antocijana. Najpovoljniji utjecaj na stabilnost antocijana pokazuje kombinacija 2,5 min HPU + 1,5 min PEF. Sličan trend uočen je i pri najduljem trajanju prvotnog HPU tretmana od 7,5 min uz jednake varijacije u trajanju naknadnog PEF tretmana, gdje je stabilnosti antocijana u najvećoj mjeri pogodovao tretman 7,5 min HPU + 1,5 min PEF. Međutim, pri trajanju prvotnog HPU tretmana od 5 min uz jednake varijacije u trajanju naknadnog PEF tretmana nije uočena statistički značajna razlika u utjecaju različitih vremena trajanja naknadnog PEF tretmana na stabilnost antocijana u sokovima od jagode.

**Tablica 3.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama u kombinaciji PEF + HPU na stabilnost antocijana u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	Antocijani (mg/100g)
<b>Skladištenje</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
0 dana	18	17,72±0,04 <sup>b</sup>
7 dana	18	18,81±0,04 <sup>a</sup>
<b>PEF</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
1,5 min	12	18,49±0,05 <sup>b</sup>
3 min	12	18,93±0,05 <sup>a</sup>
4,5 min	12	17,37±0,05 <sup>c</sup>
<b>HPU</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
2,5 min	12	18,12±0,05 <sup>b</sup>
5 min	12	19,03±0,05 <sup>a</sup>
7,5 min	12	17,64±0,05 <sup>c</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
1,5 min + 2,5 min	12	19,01±0,06 <sup>a</sup>
1,5 min + 5 min	12	18,51±0,06 <sup>b</sup>
1,5 min + 7,5 min	12	17,96±0,06 <sup>c</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b>p=0,05<sup>†</sup></b>
3 min + 2,5 min	12	18,71±0,10 <sup>b</sup>
3 min + 5 min	12	19,17±0,10 <sup>a</sup>
3 min + 7,5 min	12	18,90±0,10 <sup>a,b</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
4,5 min + 2,5 min	12	16,64±0,08 <sup>b</sup>
4,5 min + 5 min	12	19,42±0,08 <sup>a</sup>
4,5 min + 7,5 min	12	16,05±0,08 <sup>c</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	18,26±0,03

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

**Tablica 4.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama u kombinaciji HPU + PEF na stabilnost antocijana u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	Antocijani (mg/100g)
<b>Skladištenje</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
0 dana	18	19,61±0,04 <sup>a</sup>
7 dana	18	18,17±0,04 <sup>b</sup>
<b>HPU</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
2,5 min	12	19,48±0,05 <sup>a</sup>
5 min	12	18,79±0,05 <sup>b</sup>
7,5 min	12	18,40±0,05 <sup>c</sup>
<b>PEF</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
1,5 min	12	19,28±0,05 <sup>a</sup>
3 min	12	18,91±0,05 <sup>b</sup>
4,5 min	12	18,48±0,05 <sup>c</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
2,5 min + 1,5 min	12	19,80±0,05 <sup>a</sup>
2,5 min + 3 min	12	19,63±0,05 <sup>b</sup>
2,5 min + 4,5 min	12	19,02±0,05 <sup>c</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b>p=0,18<sup>‡</sup></b>
5 min + 1,5 min	12	18,91±0,17 <sup>a</sup>
5 min + 3 min	12	18,58±0,17 <sup>a</sup>
5 min + 4,5 min	12	18,87±0,17 <sup>a</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b>p≤0,01<sup>†</sup></b>
7,5 min + 1,5 min	12	19,13±0,07 <sup>a</sup>
7,5 min + 3 min	12	18,51±0,07 <sup>b</sup>
7,5 min + 4,5 min	12	17,54±0,07 <sup>c</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	18,89±0,03

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

## 4.2. UTJECAJ TEHNOLOGIJE PREPREKAMA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET U SOKOVIMA OD JAGODE

U ovom radu, uz utjecaj tehnologije preprekama i uvjeta skladištenja na stabilnost antocijana u sokovima od jagode, promatran je i njihov utjecaj na antioksidacijski kapacitet. Antioksidacijski kapaciteti u uzorcima sokova od jagode određivani su DPPH i FRAP metodom. Korištenje nekoliko različitih metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti omogućuje bolji uvid i usporedbu antioksidacijskog kapaciteta između uzoraka, prvenstveno zbog različitih kemijskih mehanizama na kojima se zasnivaju različite metode te različitih mehanizama djelovanja antioksidansa (Ozgen i sur., 2006).

Rezultati dobiveni multivarijantnom analizom prikazani su u tablicama 5 i 6. Prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerena DPPH metodom za uzorke sokova tretirane prvotno PEF, a potom HPU tehnologijom iznosila je  $293,93 \pm 0,09$   $\mu\text{mol}/100$  g, dok je kod sokova tretiranih obrnutim redoslijedom tehnologija iznosila  $290,24 \pm 0,11$   $\mu\text{mol}/100$  g. Suprotan trend zabilježen je kod FRAP metode, gdje je za uzorke sokova tretirane prvotno PEF, a potom HPU tehnologijom prosječna vrijednost iznosila  $852,41 \pm 5,42$   $\mu\text{mol}/100$  g, a kod sokova tretiranih obrnutim redoslijedom tehnologija  $926,18 \pm 5,51$   $\mu\text{mol}/100$  g. Rezultati koji se odnose na antioksidacijsku aktivnost istih uzoraka mjereni različitim metodama za određivanje antioksidacijske aktivnosti mogu se ponekad razlikovati zbog različite osjetljivosti ovih metoda na iste bioaktivne spojeve voća (Hartmann i sur., 2008). Rezultati dobiveni FRAP metodom ukazuju da je antioksidacijskom kapacitetu vjerojatno više pogodovao slijed tretmana HPU+PEF, što je u suglasju s prethodno utvrđenim trendom prema kojemu i stabilnosti antocijana bolje pogoduje ukoliko se najprije primjenjuje HPU, a potom PEF tretman.

Promatrajući utjecaj skladištenja pri 4 °C, rezultati analize uzoraka sokova tretiranih tehnologijom preprekama u kombinaciji PEF+HPU ukazuju na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta mjenog DPPH i FRAP metodom za 4 % odnosno 3 % nakon sedmog dana skladištenja. Smanjenje antioksidacijskog kapaciteta primjetno je i u uzorcima sokova tretiranim obrnutim redoslijedom tehnologija. Smanjenje antioksidacijskog kapaciteta tijekom skladištenja povezano je s izrazitom tendencijom polifenola da stupaju u reakcije polimerizacije, kojima se smanjuje dostupnost hidroksilnih skupina. Kada stupanj polimerizacije dosegne kritičnu vrijednost, povećana molekularna kompleksnost i steričnost smanjuju raspoloživost hidroksilnih skupina DPPH radikalima, što posljedično dovodi do opadanja antioksidacijskog kapaciteta (Pinelo i sur., 2004). U istraživanju Odriozola-Serrano i sur. (2008a) antioksidacijski kapacitet soka od jagode tretiranog PEF tehnologijom također

pokazuje opadajući trend tijekom skladištenja na 4 °C. Nakon skladištenja 7 dana na 4 °C, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta mjerene DPPH i ABTS metodom bile su više u tretiranim sokovima u usporedbi sa svježim sokom, iako je svježi sok od jagode u početku imao najveći antioksidacijski kapacitet. Stoga autori konstatiraju da prerada ne igra važnu ulogu samo u dobivanju sigurnih i stabilnih sokova, već također pomaže u održavanju njihovog antioksidacijskog potencijala tijekom skladištenja (Odriozola-Serrano i sur., 2008a). Nasuprot utvrđenom opadajućem trendu, Yildiz i sur. (2021b) u svojem istraživanju izvijestili su o povećanju antioksidacijske aktivnosti u ranim fazama skladištenja za sokove od jagode tretirane različitim postupcima, uključujući sokove obrađene ultrazvukom i PEF-om. Porast antioksidacijske aktivnosti popraćen je i porastom ukupnih fenola u ranim fazama skladištenja, dok se antioksidacijska aktivnost obrađenih uzoraka soka od jagoda smanjila u kasnijim fazama skladištenja u skladu sa smanjenim sadržajem ukupnih fenola i antocijana (Yildiz i sur. 2021b).

Promatrajući samo PEF tretman u tehnologiji preprekama u kombinaciji PEF+HPU, može se uočiti postojanje statistički značajnih razlika između antioksidacijskih kapaciteta uzoraka tretiranih tijekom različitih vremena. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom kod PEF tretmana u kombinaciji PEF+HPU, ukazuje da je dulje trajanje PEF tretmana rezultiralo najvećim antioksidacijskim kapacitetom, dok je antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom najveća pri trajanju tretmana od 3 min. S druge strane, prema rezultatima dobivenim DPPH metodom za obrnutu kombinaciju tretmana, najdulje trajanje PEF tretmana (5 min) rezultiralo je najvećim antioksidacijskim kapacitetom. Za antioksidacijsku aktivnost uzoraka određivanu FRAP metodom nije utvrđen statistički značajan utjecaj vremena trajanja PEF tretmana. Dobiveni rezultati oprečni su rezultatima istraživanja Odriozola-Serrano i sur. (2008a) u kojemu su autori primijetili značajno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta soka od jagode s povećanjem vremena trajanja PEF tretmana (100 - 2000  $\mu$ s) i jakosti električnog polja (20 - 35 kV/cm).

Promatrajući isključivo utjecaj vremena procesiranja HPU tehnologijom tijekom PEF+HPU tretmana, antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom najviša je tijekom najduljeg vremena tretmana (7,5 min), dok su rezultati dobiveni FRAP metodom suprotni te ukazuju da je antioksidacijska aktivnost tijekom najduljeg vremena HPU tretmana najmanja. Pozitivni učinci produljenog vremena tretmana ultrazvukom uočeni su i u istraživanju koje su proveli Zou i Hou (2017) na uzorcima soka borovnice, uz intenzitet ultrazvuka od 0,5 W/cm<sup>2</sup> i frekvenciju 40 kHz tijekom 20, 40 i 60 min. Povećanje antioksidacijske aktivnosti tijekom produljenog vremena ultrazvučnog tretmana moguće je pripisati povećanju sadržaja polifenolnih spojeva, uslijed njihovog povećanog otpuštanja u sok od borovnice (Zou i Hou,

2017). Tijekom obrnute kombinacije tretmana, trajanje HPU tretmana od 5 min pokazalo je najbolji utjecaj na antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom, dok je antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom najviša tijekom najkraćeg vremena tretmana (2,5 min). Gubitak antioksidacijske aktivnosti uslijed duljeg trajanja HPU tretmana prvenstveno se može pripisati smanjenom sadržaju polifenolnih spojeva nakon tretmana ultrazvukom. Slobodni radikali generirani akustičnom kavitacijom potencijalno mogu oksidirati polifenolne spojeve, čime bi se uvelike smanjio njihov doprinos antioksidacijskom kapacitetu sokova (Bursać Kovačević i sur., 2019).

Pri trajanju PEF tretmana od 1,5 min uz varijacije u trajanju HPU tretmana od 2,5; 5 i 7,5 min, uočene su značajne razlike u utjecaju na antioksidacijsku aktivnost u sokovima od jagode mjerenu DPPH metodom. Prema dobivenim rezultatima, najbolji učinak ovih dviju tehnologija postignut je tretmanom 1,5 min PEF + 7,5 min HPU, dok kraće trajanje HPU tretmana odnosno kombinacija tretmana 1,5 min PEF + 2,5 min HPU rezultira najmanjim antioksidacijskim kapacitetom. Nadalje, uz dulje vrijeme trajanja prvotnog PEF tretmana (3 min) i iste varijacije u trajanju naknadnog HPU tretmana, najbolji utjecaj na antioksidacijski kapacitet određivan DPPH metodom pokazale su kombinacije tretmana s najkraćim i najduljim trajanjem naknadnog HPU tretmana. Za antioksidacijsku aktivnost određivanu FRAP metodom nije utvrđen statistički značajan utjecaj kod prethodno navedenih uzoraka. Tehnologija preprekama u kombinaciji najduljeg trajanja PEF tretmana (4,5 min) uz varijacije u trajanju HPU tretmana, pokazala je bolji utjecaj na antioksidacijsku stabilnost određivanu FRAP metodom pri kraćim vremenima naknadnog HPU tretmana. U ovom slučaju, rezultati dobiveni DPPH metodom ne pokazuju statistički značajan utjecaj varijacija vremena naknadnog HPU tretmana na antioksidacijsku aktivnost tretiranih uzoraka.

Pri konstantnom trajanju prvotnog HPU tretmana od 2,5 min i varijacije u trajanju naknadnog PEF tretmana od 1,5; 3 i 4,5 min, najkraće trajanje naknadnog PEF tretmana pokazalo je nepovoljniji utjecaj na antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom u odnosu na dulje PEF tretmane. Nasuprot tomu, pri trajanju prvotnog HPU tretmana od 5 min uz jednake varijacije u trajanju naknadnog PEF tretmana, rezultati ukazuju da trajanje PEF tretmana od 1,5 min bolje utječe na antioksidacijski kapacitet u odnosu na dulje naknadne PEF tretmane. Pri trajanju prvotnog HPU tretmana od 7,5 min nije uočena statistički značajna razlika u utjecaju različitih vremena trajanja naknadnog PEF tretmana na antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom. Za redosljed tretmana HPU+PEF u okviru tehnologije preprekama, rezultati dobiveni DPPH metodom ne pokazuju statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost tretiranih uzoraka ni za jednu kombinaciju različitih vremena trajanja tretmana.

**Tablica 5.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama u kombinaciji PEF + HPU na antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	DPPH ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )
<b>Skladištenje</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p = 0,02^\dagger</math></b>
0 dana	18	299,30 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	866,54 $\pm$ 7,66 <sup>a</sup>
7 dana	18	288,57 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	838,29 $\pm$ 7,66 <sup>b</sup>
<b>PEF</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>
1,5 min	12	292,77 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	830,50 $\pm$ 9,38 <sup>b</sup>
3 min	12	294,69 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	879,81 $\pm$ 9,38 <sup>a</sup>
4,5 min	12	294,34 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	846,92 $\pm$ 9,38 <sup>b</sup>
<b>HPU</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>
2,5 min	12	293,54 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	854,81 $\pm$ 9,38 <sup>a</sup>
5 min	12	293,62 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	877,46 $\pm$ 9,38 <sup>a</sup>
7,5 min	12	294,64 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	824,96 $\pm$ 9,38 <sup>b</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p = 0,78^\ddagger</math></b>
1,5 min + 2,5 min	12	290,94 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	840,84 $\pm$ 17,48 <sup>a</sup>
1,5 min + 5 min	12	293,09 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	825,53 $\pm$ 17,48 <sup>a</sup>
1,5 min + 7,5 min	12	294,30 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	825,14 $\pm$ 17,48 <sup>a</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p = 0,09^\ddagger</math></b>
3 min + 2,5 min	12	294,94 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	836,05 $\pm$ 19,66 <sup>a</sup>
3 min + 5 min	12	293,64 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	895,61 $\pm$ 19,66 <sup>a</sup>
3 min + 7,5 min	12	295,48 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	907,78 $\pm$ 19,66 <sup>a</sup>
<b>PEF + HPU</b>		<b><math>p = 0,36^\ddagger</math></b>	<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>
4,5 min + 2,5 min	12	294,75 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	887,54 $\pm$ 9,99 <sup>a</sup>
4,5 min + 5 min	12	294,13 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	911,25 $\pm$ 9,99 <sup>a</sup>
4,5 min + 7,5 min	12	294,15 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	741,97 $\pm$ 9,99 <sup>b</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	293,93 $\pm$ 0,09	852,41 $\pm$ 5,42

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



**Tablica 6.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama u kombinaciji HPU + PEF na antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode

Izvori varijacija	n	DPPH ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )
<b>Skladištenje</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p = 0,03^\dagger</math></b>
0 dana	18	292,86 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	940,18 $\pm$ 7,79 <sup>a</sup>
7 dana	18	287,62 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	913,44 $\pm$ 7,79 <sup>b</sup>
<b>HPU</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>
2,5 min	12	289,81 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	961,62 $\pm$ 9,54 <sup>a</sup>
5 min	12	290,96 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	905,76 $\pm$ 9,54 <sup>b</sup>
7,5 min	12	289,95 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	913,06 $\pm$ 9,54 <sup>b</sup>
<b>PEF</b>		<b><math>p \leq 0,01^\dagger</math></b>	<b><math>p = 0,28^\ddagger</math></b>
1,5 min	12	290,12 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	931,60 $\pm$ 9,54 <sup>a</sup>
3 min	12	289,70 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	934,81 $\pm$ 9,54 <sup>a</sup>
4,5 min	12	290,91 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	914,03 $\pm$ 9,54 <sup>a</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b><math>p = 0,82^\ddagger</math></b>	<b><math>p = 0,05^\dagger</math></b>
2,5 min + 1,5 min	12	289,55 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	918,05 $\pm$ 16,33 <sup>b</sup>
2,5 min + 3 min	12	289,79 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	981,50 $\pm$ 16,33 <sup>a</sup>
2,5 min + 4,5 min	12	290,08 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	985,32 $\pm$ 16,33 <sup>a</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b><math>p = 0,82^\ddagger</math></b>	<b><math>p = 0,02^\dagger</math></b>
5 min + 1,5 min	12	290,87 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	951,30 $\pm$ 13,70 <sup>a</sup>
5 min + 3 min	12	289,88 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	883,21 $\pm$ 13,70 <sup>b</sup>
5 min + 4,5 min	12	292,14 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	882,76 $\pm$ 13,70 <sup>b</sup>
<b>HPU + PEF</b>		<b><math>p = 0,82^\ddagger</math></b>	<b><math>p = 0,10^\ddagger</math></b>
7,5 min + 1,5 min	12	289,93 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	925,44 $\pm$ 19,10 <sup>a</sup>
7,5 min + 3 min	12	289,42 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	939,74 $\pm$ 19,10 <sup>a</sup>
7,5 min + 4,5 min	12	290,50 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	874,00 $\pm$ 19,10 <sup>a</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	290,24 $\pm$ 0,11	926,18 $\pm$ 5,51

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

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Sok od jagode može se smatrati funkcionalnom hranom obzirom na visok udio antocijana i značajan antioksidacijski kapacitet.
2. Razmotri li se slijed primijenjenih tehnologija, na stabilnost antocijana bolje utječe redoslijed tretmana HPU+PEF u odnosu na PEF+HPU. Isti trend pokazuju i rezultati vezani uz antioksidacijsku aktivnost dobiveni FRAP metodom.
3. Skladištenjem sokova od jagode pri 4 °C tijekom 7 dana došlo je do povećanja udjela antocijana u sokovima tretiranim prvo PEF, a zatim HPU tehnologijom, dok je kod sokova tretiranih obrnutim redoslijedom tehnologija primijećeno smanjenje udjela antocijana. Rezultati analize utjecaja skladištenja na antioksidacijski kapacitet uzoraka ukazuju na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta neovisno o primijenjenom redoslijedu tretmana.
4. Kombinacije PEF+HPU i HPU+PEF tretmana u konceptu tehnologije preprekama primijenjene u varijaciji 3 različita vremena obrade generalno pokazuju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) i različite trendove s obzirom na utjecaj različitih vremena tretmana na stabilnost antocijana i antioksidacijske aktivnosti. Ipak, uočeno je da kraći tretmani obrade povoljnije utječu na stabilnost antocijana i antioksidacijski kapacitet u sokovima od jagode.
5. Tehnologija preprekama, kao inovativni koncept prerade, s odabranim tehnologijama PEF i HPU može se smatrati održivom tehnologijom koja ima široku perspektivu primjene u preradi funkcionalnih sokova od jagode.

## 6. LITERATURA

Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G (2012) Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits: composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem* **132**, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>

Aadil RM, Zeng XA, Han Z, Sahar A, Khalil AA, Rahman UU, i sur. (2018) Combined effects of pulsed electric field and ultrasound on bioactive compounds and microbial quality of grapefruit juice. *J Food Process Pres* **42**, e13507. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13507>

Aaliya B, Valiyapeediyekkal Sunooj K, Navaf M, Parambil Akhila P, Sudheesh C, Ahmad Mir S, i sur. (2021) Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: A synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. *Food Res Int* **147**, 110514. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110514>

Afrin S, Gasparini M, Forbes-Hernandez TY, Reboredo-Rodriguez P, Mezzetti B, Varela-López A, i sur. (2016) Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J Agr Food Chem* **64**, 4435–4449. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857>

Ali MR, Mohamed RM, Abdelmaksoud TG (2021) Functional strawberry and red beetroot jelly candies rich in fibers and phenolic compounds. *Food Syst* **4**, 82-88. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-82-88>

Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, i sur. (2014) One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J Nutr Biochem* **25**(3), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.002>

Arend GD, Adorno WT, Rezzadori K, Di Luccio M, Chaves VC, Reginatto FH, i sur. (2017) Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. *J Food Eng* **201**, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.014>

Arroyo C, Lyng JG (2016) Pulsed Electric Fields in Hurdle Approaches for Microbial Inactivation. U: Miklavcic D (ured.) Handbook of Electroporation. Springer International, Berlin, str. 1-30. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1\\_190-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_190-1)

Arshad RN, Abdul-Malek Z, Roobab U, Munir MA, Naderipour A, Qureshi MI, i sur. (2021) Pulsed electric field: A potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends Food Sci Tech* **111**, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.041>

Bahrami A, Baboli ZM, Schimmel K, Jafari SM, Williams L (2020) Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products. *Trends Food Sci Tech* **96**, 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.009>

Barba FJ, Koubaa M, do Prado-Silva L, Orlie V, de Souza Sant’Ana A (2017) Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends Food Sci Tech* **66**, 20-35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.011>

Barba FJ, Parniakov O, Pereira SA, Wiktor A, Grimi N, Boussetta N, i sur. (2015) Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Res Int* **77**, 773 – 798. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>

Barbosa BT, Rodrigues JF, Bastos SC (2017) Sensory optimization of nutritionally enriched strawberry yogurt. *Brit Food J*, **119**, 301-310. <https://doi.org/10.1108/BFJ-08-2016-0370>

Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ (2014) Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>

Bates D, Patist A (2010) Industrial applications of high power ultrasonics in the food, beverage and wine industry. U: Doona CJ (ured.) Case Studies in Novel Food Processing Technologies, 1. izd., Woodhead Publishing, Kalifornija, str. 119–138. <https://doi.org/10.1533/9780857090713.2.119>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Bičanić P, Brdar D, Duralija B, Pavlić B, i sur. (2022a) A Chemometric Investigation on the Functional Potential in High Power Ultrasound (HPU) Processed Strawberry Juice Made from Fruits Harvested at two Stages of Ripeness. *Molecules* **28**, 138. <https://doi.org/10.3390/molecules28010138>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Bosiljkov T, Kostelac D, Frece J, Markov K, i sur. (2023) 3D Printing of Functional Strawberry Snacks: Food Design, Texture, Antioxidant Bioactive Compounds, and Microbial Stability. *Antioxidants* 2023, **12**, 436. <https://doi.org/10.3390/antiox12020436>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić I, i sur. (2022b) Chemometric Valorization of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the Production of Functional Juice: The Impact of Physicochemical, Toxicological, Sensory, and Bioactive Value. *Foods* **11**, 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Stulić V, Batur L, Duralija B, Pavlić B, i sur. (2022c) The Application and Optimization of HIPEF Technology in the Processing of Juice from Strawberries Harvested at Two Stages of Ripeness. *Foods* **11**, 1997. <https://doi.org/10.3390/foods11141997>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Bevilacqua A, Petrucci L, Perricone M, Speranza, B, Campaniello D, Sinigaglia M, i sur. (2018) Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: Overview and advances. *Compr Rev Food Sci F* **17**, 2–62. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12299>

Bhargava N, Mor RS, Kumar K, Sharanagat VS (2021) Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>

Blahovec J, Vorobiev E, Lebovka N (2017) Pulsed Electric Fields Pretreatments for the Cooking of Foods. *Food Eng Rev* **9**, 226–236. <https://doi.org/10.1007/s12393-017-9170-x>

Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>

Bursać Kovačević D, Bilobrk J, Buntić B, Bosiljkov T, Karlović S, Rocchetti G, i sur. (2019) High-power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in

cloudy apple juice during storage. *J Food Process Pres* **43**, e14023. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14023>

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

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

Buvé C, Kebede BT, De Batselier C, Carrillo C, Pham HT, Hendrickx M, i sur. (2018) Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. *J Food Eng* **216**, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.002>

Cao X, Bi X, Huang W, Wu J, Hu X, Liao X (2012) Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innov Food Sci Emerg* **16**, 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.008>

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MD, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galan-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem* **113**, 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

Cervantes L, Ariza MT, Miranda L, Lozano D, Medina JJ, Soria C, i sur. (2020) Stability of fruit quality traits of different strawberry varieties under variable environmental conditions. *Agronomy* **10**, 1242. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091242>

Cervera-Chiner L, Barrera C, Betoret N, Seguí L (2021) Impact of sugar replacement by non-centrifugal sugar on physicochemical, antioxidant and sensory properties of strawberry and kiwifruit functional jams. *Heliyon* **7**, e05963. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05963>

Chacha JS, Zhang L, Ofoedu CE, Suleiman RA, Dotto JM, Roobab U, i sur. (2021) Revisiting Non-Thermal Food Processing and Preservation Methods—Action Mechanisms, Pros and Cons: A Technological Update (2016–2021). *Foods* **10**, 1430. <https://doi.org/10.3390/foods10061430>

Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK (2022) Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. *Foods* **11**, 122. <https://doi.org/10.3390/foods1101012>

Chaves VC, Calvete E, Reginatto FH (2017) Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars. *Sci Hortic-Amsterdam* **225**, 293-298. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.013>

Comandini P, Blanda G, Cardinali A, Cerretani L, Bendini A, Caboni MF (2008) CZE separation of strawberry anthocyanins with acidic buffer and comparison with HPLC. *J Sep Sci* **31**, 3257–3264. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800199>

Crecente-Campo J, Nunes-Damaceno M, Romero-Rodríguez MA, Vázquez-Odériz ML (2012) Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound

determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch, cv Selva). *J Food Compos Anal* **28**, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.004>

da Silva FL, Escribano-Bailón MT, Pérez Alonso JJ, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Sci Technol* **40**, 374-382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>

de Carvalho RJ, de Souza GT, Pagán E, García-Gonzalo D, Magnani M, Pagán R (2018) Nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil in combination with mild heat, pulsed electric fields (PEF) and high hydrostatic pressure (HHP) as an alternative to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices. *Innov Food Sci Emerg* **48**, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.004>

Dixit Y, O’Sullivan C, Cullen PJ, Tiwari BK (2018) Hurdle technologies for fruit juices. U: Rajauria G, Tiwari B (ured.) *Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 539–554. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00027-8>

Dolas R, Saravanan C, Kaur BP (2019) Emergence and era of ultrasonic's in fruit juice preservation: A review. *Ultrason sonochem* **58**, 104609. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.026>

Dubrović I, Herceg Z, Režek Jambrak A, Badanjak M, Dragović-Uzelac V (2011) Effect of High Intensity Ultrasound and Pasteurization on Anthocyanin Content in Strawberry Juice. *Food Technol Biotech* **49**, 196-204. <https://hrcak.srce.hr/69461>

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

Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, Sandhya K, Ellis CL, Tadapaneni R, i sur. (2011) Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *Br J Nutr* **106**, 913–922. <https://doi.org/10.1017/S0007114511001176>

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

FAO (2022) FAOSTAT statistical database, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Pristupljeno: 17. travnja 2023.

Ferrante S, Guerrero S, Alzamora S (2007) Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *J Food Protect* **70**, 1850–1856. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.8.1850>

Ferrario M, Alzamora SM, Guerrero S (2015) Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiol* **46**, 635–642 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.017>

Folta, KM, Davis TM (2006) Strawberry Genes and Genomics. *Crit Rev Plant Sci* **25**, 399-415. <https://doi.org/10.1080/07352680600824831>

- Forbes-Hernández TY, Giampieri F, Gasparrini M, Mazzoni L, Quiles JL, Alvarez-Suarez JM, i sur. (2014) The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol* **68**, 154-182. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.017>
- Gabrić D, Barba FJ, Roohinejad S, Gharibzahedi SMT, Radojčin M, Putnik P, i sur. (2018) Pulsed electric fields as an alternative to thermal processing for preservation of nutritive and physicochemical properties of beverages: A review. *J Food Process Eng* **41**, e12638. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12638>
- Gallo M, Ferrara L, Naviglio D (2018) Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. *Foods* **7**, 164. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- Ganhão R, Pinheiro J, Tino C, Faria H, Gil MM (2019) Characterization of nutritional, physicochemical, and phytochemical composition and antioxidant capacity of three strawberry “*Fragaria × ananassa* Duch.” cultivars (“Primoris”, “Endurance”, and “Portola”) from Western Region of Portugal. *Foods* **8**, 682. <https://doi.org/10.3390/foods8120682>
- Garzón G, Wrolstad R (2006) Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *J Food Sci* **67**, 1288-1299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10277.x>
- Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, i sur. (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct* **6**, 1386–1398. <https://doi.org/10.1039/c5fo00147a>
- Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Romandini S, Bompadre S, Diamanti J, i sur. (2013) The potential impact of strawberry on human health. *Nat Prod Res* **27**, 448–455. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706294>
- Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Goiffon J, Mouly PP, Gaydou EM (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal Chim Acta* **382**, 39-50. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00756-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00756-9)
- Gómez PL, Welti-Chanes J, Alzamora SM (2011) Hurdle technology in fruit processing. *Annu Rev Food Sci T* **2**, 447–465. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133619>
- Gössinger M, Moritz S, Hermes M, Wendelin S, Scherbichler H, Halbwirth H, i sur. (2009) Effects of processing parameters on colour stability of strawberry nectar from puree. *J Food Eng* **90**, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.018>
- Granato D, Nunes DS, Barba FJ (2017) An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends Food Sci Tech* **62**, 13 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.010>
- Hancock JF, Sjulín TM, Lobos GA (2008) Strawberries. U: Hancock JF (ured.) Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics, Springer, Dordrecht, Nizozemska, str. 393–437. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9-13>

- Hartmann A, Patz CD, Andlauer W, Dietrich H, Ludwig M (2008) Influence of processing on quality parameters of strawberries. *J Agr Food Chem* **56**, 9484-9489. <https://doi.org/10.1021/jf801555q>
- Henning SM, Seeram NP, Zhang Y, Li L, Gao K, Lee RP, i sur. (2010) Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *J Med Food* **13**, 116–122. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0048>
- Herceg Z, Režek Jambrak, A, Rimac Brnčić S, Krešić G (2009) Procesi konzerviranja hrane - Novi postupci. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 51-52.
- Hosseinzadeh Samani B, Behruzian A, Khoshtaghaza MH, Behruzian M, Ansari Ardali A (2020) The investigation and optimization of two combined pasteurization methods of ultrasonic-pulse electric field and hydrodynamic-pulse electric field on sour cherry juice using RSM-TOPSIS. *J Food Process Pres* **44**, e14700. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14700>
- Hummer KE, Hancock JF (2009) Strawberry Genomics: Botanical History, Cultivation, Traditional Breeding, and New Technologies. U: Folta KM, Gardiner SE (ured.) Genetics and Genomics of Rosaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 6. izd., Springer, New York, str. 413-435. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_20)
- Hwang H, Kim J, Shin Y (2019) Influence of ripening stage and cultivar on physicochemical properties, sugar and organic acid profiles, and antioxidant compositions of strawberries. *Food Sci Biotechnol* **28**, 1659-1667. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00610-y>
- Jolvis Pou KR, Raghavan V (2020) Recent Advances in the Application of High Pressure Processing-Based Hurdle Approach for Enhancement of Food Safety and Quality. *J Biosyst Eng* **45**, 175–187. <https://doi.org/10.1007/s42853-020-00059-6>
- Karasawa MG, Chakravarthi M (2018) Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Nat Prod Bioprospect* **8**, 335–346. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6>
- Karelakis C, Zevgitis P, Galanopoulos K, Mattas K (2020) Consumer Trends and Attitudes to Functional Foods. *J Int Food Agribus* **32**, 266 - 294. <https://doi.org/10.1080/08974438.2019.1599760>
- Kentish S, Feng H (2014) Applications of power ultrasound in food processing. *Annu Rev Food Sci T* **5**, 263-284. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>
- Khan I, Tango CN, Miskeen S, Lee BB, Oh D (2017) Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control* **73**, 1426-1444. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>
- Khandpur P, Gogate PR (2016) Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrason Sonochem* **29**, 337 – 353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.008>
- Kim Y, Shin Y (2015) Antioxidant profile, antioxidant activity, and physicochemical characteristics of strawberries from different cultivars and harvest locations. *J Korean Soc Appl Bi* **58**, 587-595. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0085-z>



Klopotek Y, Otto K, Böhm V (2005) Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agr Food Chem* **53**, 5640-5646. <https://doi.org/10.1021/jf047947v>

Kobi HB, Martins, MC, Silva PI, Souza JL, Carneiro JCS, Heleno FF, i sur. (2018) Organic and conventional strawberries: Nutritional quality, antioxidant characteristics and pesticide residues. *Fruits* **73**, 39-47. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.1.5>

Koubaa M, Barba FJ, Bursać-Kovačević D, Putnik P, Santos MD, Queirós RP, i sur. (2018) Pulsed electric field processing of fruit juices. U: Rajauria G, Tiwari B (ured.) *Fruit Juices*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 437-449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00022-9>

Kowaleski J, Quast LB, Steffens J, Lovato F, dos Santos LR, da Silva SZ, i sur. (2020) Functional yogurt with strawberries and chia seeds. *Food Biosci* **37**, 100726. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100726>

Lasekan O, Ng S, Azeez S, Shittu R, Teoh L, Gholivand S (2017) Effect of Pulsed Electric Field Processing on Flavor and Color of Liquid Foods. *J Food Process Pres* **41**, e12940. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12940>

Lee J, Durst R, Wrolstad R (2005) AOAC official method 2005.02: Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. U: Horowitz H (ured.) *Official methods of analysis of AOAC International*, 18 izd., AOAC, Washington D.C., str. 37-39.

Liston A, Cronn R, Ashman TL (2014) *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *Am J Bot* **101**, 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>

Ma T, Wang J, Wang L, Yang Y, Yang W, Wang H, i sur. (2020) Ultrasound-Combined Sterilization Technology: An Effective Sterilization Technique Ensuring the Microbial Safety of Grape Juice and Significantly Improving Its Quality. *Foods* **9**, 1512. <https://doi.org/10.3390/foods9101512>

Margean A, Lupu MI, Alexa E, Padureanu V, Canja CM, Cocan I, i sur. (2020) An overview of effects induced by pasteurization and high-power ultrasound treatment on the quality of red grape juice. *Molecules* **25**, 1669. <https://doi.org/10.3390/molecules25071669>

Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R (2011) Pulsed electric fields processing basics. U: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas GV, Balasubramaniam VB, Dunne CP, Farkas DF, Yuan JT (ured.) *Nonthermal processing technologies for food*, 1.izd., Wiley-Blackwell, New York, str. 155–175. <https://doi.org/10.1002/9780470958360.ch11>

Medina-Meza IG, Boioli P, Barbosa-Cánovas GV (2016) Assessment of the Effects of Ultrasonics and Pulsed Electric Fields on Nutritional and Rheological Properties of Raspberry and Blueberry Purees. *Food Bioprocess Tech* **9**, 520–531. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1642-5>

Minutti-López Sierra P, Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G, Meza-Márquez OG (2019) Chemical composition and antioxidant capacity in strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) by FT-MIR spectroscopy and chemometrics. *CYTA-J Food* **17**, 724-732. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1645211>

- Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O (2012) Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food Bioprod Process* **90**, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.03.004>
- Newerli-Guz J, Śmiechowska M, Drzewiecka A, Tylingo R (2023) Bioactive Ingredients with Health-Promoting Properties of Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). *Molecules* **28**, 2711. <https://doi.org/10.3390/molecules280627>
- Noci F, Riener J, Walkling-Ribeiro M, Cronin DA, Morgan DJ, Lyng JG (2008) Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *J Food Eng* **85**, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.011>
- Nowicka A, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Fecka I (2019) Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chem*, **270**, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.015>
- Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R (2021) The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J Food Sci Tech Mys* **58**, 397-411. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>
- Nunes BV, da Silva CN, Bastos SC, de Souza VR (2022) Microbiological inactivation by ultrasound in liquid products. *Food Bioprocess Tech* **15**, 2185–2209. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02818-z>
- Octavia L, Choo WS (2017) Folate, ascorbic acid, anthocyanin and colour changes in strawberry (*Fragaria × annanasa*) during refrigerated storage. *LWT - Food Sci Technol*, **86**, 652-659. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.049>
- Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2008a) Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Eur Food Res Technol* **228**, 239-248. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0928-5>
- Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Gimeno-Añó V, Martín-Belloso O (2008b) Kinetic study of anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in strawberry juices treated by high-intensity pulsed electric fields. *J Agr Food Chem* **56**, 8387–8393. <https://doi.org/10.1021/jf801537f>
- Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009) Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice. *LWT - Food Sci Technol* **42**, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.008>
- Oszmiański J, Wojdyło A (2009) Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. *Eur Food Res Technol*, **228**, 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0971-2>
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ Jr, Scheerens JC, Miller AR (2006) Modified 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-

diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J Agr Food Chem* **54**, 1151–1157. <https://doi.org/10.1021/jf051960d>

Pallarés N, Tolosa J, Gavahian M, Barba FJ, Mousavi-Khaneghah A, Ferrer E (2020) The potential of pulsed electric fields to reduce pesticides and toxins. U: Barba FJ, Parniakov O, Wiktor A (ured.) Pulsed electric fields to obtain healthier and sustainable food for tomorrow, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 141-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816402-0.00007-0>

Pataro G, Ferrari G (2020) Limitations of pulsed electric field utilization in food industry. U: Barba FJ, Parniakov O, Wiktor A (ured.) Pulsed electric fields to obtain healthier and sustainable food for tomorrow, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 283-310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816402-0.00013-6>

Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, Butler F (2009) Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov Food Sci Emerg* **10**, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>

Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci* **21**, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>

Petruzzi L, Campaniello D, Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A (2017) Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Compr Rev Food Sci F* **16**, 668–691. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12270>

Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M., J., Nicoli, M., C. (2004) Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. *J Agr Food Chem* **52**, 1177–1180. <https://doi.org/10.1021/jf0350515>

Pravilnik (2013) Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. Narodne novine 48, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_04\\_48\\_941.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html) Pristupljeno: 10. lipnja 2023.

Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* **53(10)**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Putnik P, Pavlič B, Šojić B, Zavadlav S, Žuntar I, Kao L, i sur. (2020) Innovative Hurdle Technologies for the Preservation of Functional Fruit Juices. *Foods* **9**, 699. <https://doi.org/10.3390/foods9060699>

Radziejewska-Kubzdela E (2023) Effect of Ultrasonic, Thermal and Enzymatic Treatment of Mash on Yield and Content of Bioactive Compounds in Strawberry Juice. *Appl Sci* **13**, 4268. <https://doi.org/10.3390/app13074268>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Siemer C, Toepfl S, Heinz V (2014) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy–I. Influence of process- and

product parameters. *Food Control* **39**, 163–171.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.025>

Silva VO, Freitas AA, Maçanita AL, Quina FH (2016) Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. *J Phys Org Chem* **29**, 594–599.  
<https://doi.org/10.1002/poc.3534>

Singla M, Sit N (2021) Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrason Sonochem* **73**, 105506.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105506>

Skupień K, Oszmiański J (2004) Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur Food Res Technol* **219**, 66–70.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>

Sui X, Bary S, Zhou W (2016) Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. *Food Chem* **192**, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.021>

Swamy GJ, Muthukumarappan K, Asokapandian S (2018) Ultrasound for fruit juice preservation U: Rajauria G, Tiwari B (ured.) Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis, 1.izd., Academic Press, Cambridge, str. 451 – 461.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00023-0>

Timmermans R, Mastwijk H, Berendsen L, Nederhoff A, Matser A, Van Boekel M, i sur. (2019) Moderate intensity Pulsed Electric Fields (PEF) as alternative mild preservation technology for fruit juice. *Int J Food Microbiol* **298**, 63–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.015>

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC-Trend Anal Chem* **71**, 100 – 109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Tiwari BK, O'Donnell CP, Patras A, Brunton N, Cullen PJ (2008) Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. *Eur Food Res Technol* **228**, 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0982-z>

Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Busco F, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2011) Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food chem* **128**, 180–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.025>

Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CH, i sur. (2008) Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agr Food Chem* **56**, 696–704. <https://doi.org/10.1021/jf0719959>

Wallace TC, Giusti MM (2019) Anthocyanins—Nature's Bold, Beautiful, and Health-Promoting Colors. *Foods* **8**, 550. <https://doi.org/10.3390/foods8110550>

Wang J, Wang J, Ye J, Vanga SK, Raghavan V (2019) Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control* **96**, 128–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.007>

- Wang Z, Zhang M, Wu Q (2014) Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. *LWT - Food Sci Technol* **60**, 1174-1178. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.015>
- Wang SY, Zheng W, Galletta GJ (2002) Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J Agr Food Chem* **50**, 6534-6542. <https://doi.org/10.1021/jf020614j>
- Weber F, Larsen LR (2017) Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. *Food Res Int* **100**, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.033>
- Yao Y, Pan Y, Liu S (2020) Power Ultrasound and Its Applications: A State-of-the-art Review, *Ultrason Sonochem* **62**, 104722 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104722>
- Yildiz S, Pokhrel PR, Unluturk S, Barbosa-Cánovas GV (2021a) Changes in Quality Characteristics of Strawberry Juice After Equivalent High Pressure, Ultrasound, and Pulsed Electric Fields Processes. *Food Eng Rev* **13**, 601–612. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09250-z>
- Yildiz S, Pokhrel PR, Unluturk S, Barbosa-Canovas GV (2021b) Shelf-life extension of strawberry juice by equivalent ultrasound, high pressure, and pulsed electric fields processes. *Food Res Int* **140**, 110040. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110040>
- Zare F, Ghasemi N, Bansal N, Hosano H (2023). Advances in pulsed electric stimuli as a physical method for treating liquid foods. *Phys Life Rev* **44**, 207–266. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2023.01.007>
- Zeliou K, Papisotiropoulos V, Manoussopoulos Y, Lamari FN (2018) Physical and chemical quality characteristics and antioxidant properties of strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) in Greece: Assessment of their sensory impact. *J Sci Food Agri* **98**, 4065-4073. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8923>
- Zhang Y, Butelli E, Martin C (2014) Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **19**, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.011>
- Zhao Z, Wu X, Chen H, Liu Y, Xiao Y, Chen H, i sur. (2021) Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. *PeerJ* **9**, e11974. <https://doi.org/10.7717/peerj.11974>
- Zhu J, Wang Y, Li X, Li B, Liu S, Chang N, i sur. (2017) Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on *Escherichia coli* O157: H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrason Sonochem* **37**, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.017>
- Zou Y, Hou X (2017) Sonication enhances quality and antioxidant activity of blueberry juice. *Food Sci Tech-Brazil* **37**, 599–603. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.27816>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Anamaria Birkić

Vlastoručni potpis