

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Nutricionizam

Marijana Jurković
6841/N

**STABILNOST VITAMINA C U SOKOVIMA ŠIPKA
TRETIRANIM NETOPLINSKIM TEHNIKAMA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (HRZZ 3035) te „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima“ primjenom visokonaponskog pražnjenja“ (IP – 2016 – 06 – 1913)

Mentor: doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

STABILNOST VITAMINA C U SOKOVIMA ŠIPKA TRETIRANIM NETOPLINSKIM TEHNIKAMA

Marijana Jurković, 0058203950

Sažetak: Svrha ovog istraživanja bila je odrediti stabilnost vitamina C u sokovima šipka tretiranim netoplinskim tehnikama skladištenim 7 dana na 4°C. Sokovi su tretirani zasebno ultrazvukom i hladnom plazmom te kombinacijom tih dviju tehnika. Izvori varijacija bili su amplituda i vrijeme (za ultrazvuk), frekvencija i vrijeme (za hladnu plazmu) te svi ovi parametri za kombinirane tretmane. Rezultati svih tretmana uspoređeni su sa svježim i pasteriziranim sokovima (90 °C/1 min).

Dobiveni rezultati su statistički obrađeni te rezultati svih primijenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak (svježi sok) obzirom na sadržaj askorbinske kiseline pokazuju da među tretmanima, bilo toplinskim (pasterizacija) ili netoplinskim (ultrazvuk i hladna plazma, zasebno te kombinirano), nije bilo signifikantne razlike u sadržaju askorbinske kiseline u sokovima šipka. Ipak, pogledaju li se svi utjecaji netoplinskih tehnika ponaosob ili u kombinaciji, dobiveni rezultati pokazuju da svi izvori varijacija značajno doprinose stabilnosti vitamina C.

Ključne riječi: hladna plazma, sok, šipak, ultrazvuk, vitamin C

Rad sadrži: 31 stranica, 6 slika, 6 tablica, 92 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, doc. dr. sc. Tomislava Vukušić, dr. sc. Predrag Putnik, poslijedoktorand i dr. sc. Domagoj Gabrić, stručni suradnik

Datum obrane: 17. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Tehnology of Fruit and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

EFFECT OF NON-THERMAL TECHNOLOGIES ON VITAMIN C STABILITY IN POMEGRANATE JUICES

Marijana Jurković, 0058203950

Abstract: The aim of the study was to evaluate effects of non-thermal technologies on vitamin C stability in pomegranate juice during 7 days of storage at 4°C. The juices were treated separately with sonication and cold gas plasma and with a combination of those two technologies. Outcomes of separate and combined treatments were observed at different operating conditions: treatment time and amplitude for ultrasonic treatment and treatment time. All results were compared with fresh (untreated) and pasteurized pomegranate juices (90 °C/1 min).

Statistical analysis showed that there were no significant differences in the content of ascorbic acid in pomegranate juices between thermal treatments (pasteurisation) and non-thermal treatments (sonication and cold gas plasma, applied separately or combined). However, taking all influences of non thermal technologies (applied separately or combined) into account, the obtained results show that all sources of variations significantly contribute to the stability of vitamin C in pomegranate juices.

Keywords: cold plasma, juice, pomegranate, sonication, vitamin C

Thesis contains: 31 pages, 6 figures, 6 tables, 92 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

Technical support and assistance: PhD Anet Režek Jambrak, Associate Professor, PhD Tomislava Vukušić, Assistant professor, PhD Predrag Putnik, Assistant and PhD Domagoj Gabrić, Expert assistant

Defence date: July 17th, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Šipak (<i>Punica granatum</i> L.)	2
2.2. Kemijski sastav šipka	4
2.3. Biološki aktivni spojevi šipka.....	6
2.3.1. Fenolni spojevi u šipku.....	6
2.3.2. Vitamin C u šipku	9
2.4. Proizvodnja soka šipka	10
2.5. Primjena novih netermalnih tehnika u preradi soka šipka	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.2. Metode rada.....	14
3.2.1. Tretiranje soka šipka ultrazvukom visoke snage	15
3.2.2. Tretiranje soka šipka hladnom plazmom	15
3.2.3. Određivanje vitamina C u soku šipka.....	15
3.3. Statistička analiza.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Utjecaj ultrazvuka i hladne plazme zasebno na stabilnost vitamina C u soku šipka....	20
4.2. Utjecaj ultrazvuka i hladne plazme u kombinaciji na stabilnost vitamina C u soku šipka.....	22
5. ZAKLJUČCI	25
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Šipak (*Punica granatum* L.) je listopadna biljka koja botanički pripada obitelji *Punicaceae*, a danas je poznato oko 1000 vrsta kultiviranog šipka. Šipak je jedna od najstarijih poznatih jestivih voćaka koja potječe iz Centralne Azije i područja nekadašnje Perzije (današnji Iran). Plod šipka je bobičast, a njegov okus i veličina ovise o tome je li riječ o divljem ili pitomom šipku. Šipak se uzgaja zbog brojnih bioloških svojstava i terapijskih učinaka izrazito povoljnih za ljudsko zdravlje (antimikrobna, protuupalna, antioksidacijska, antikancerogena i imunosupresivna aktivnost, regulira metabolizam glukoze i lipida, preventivno djeluje na kronične i autoimune bolesti te aterosklerozu, koristi se u dijabetološkoj dijetoterapiji, protektivno na krvožilni sustav, ima terapijske učinke na kosu i kožu, koristi se pri mršavljenju i djeluje preventivno na dentalne bolesti).

Šipak se anatomski može podijeliti u nekoliko dijelova; sjemenka, sok, perikarp, list, cvijet, kora i korijen, a svaki od tih dijelova ima zanimljivu farmakološku aktivnost i kemijski sastav. Na kemijski odnosno nutritivni sastav i kvalitetu šipka utječu vrsta (kultivar), okolišni čimbenici, sazrijevanje, tretiranje nakon berbe te skladištenje. Sok šipka je vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva. Pokazano je da ukupnom antioksidacijskom kapacitetu šipka više doprinose hidrofilni (85%) u usporedbi sa lipofilnim bioaktivnim spojevima (15%). Od hidrofilnih antioksidanasa najzastupljeniji su fenolni spojevi i vitamin C, a od hidrofobnih karotenoidi. Fenolne spojeve u šipku čine: fenolne kiseline poput kafeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline, flavonoidi katehin, epikatehin i kvercetin, tanini podložni hidrolizi; galotanini (derivati galne kiseline), elagitanini (derivati elaginske kiseline), punikalagin i punikalin. Zajedno s fenolnim spojevima i ostalim antioksidacijskim sastojcima šipka, vitamin C pridonosi ukupnom antioksidacijskom kapacitetu šipka. Sok šipka veoma je popularan među potrošačima, a ujedno predstavlja vrijedan izvor različitih biološki aktivnih spojeva. Svježi sok šipka podložan je kvarenju, a daljnjom preradom poželjno je produljiti rok trajanja te istovremeno zadržati svu biološku vrijednost. Cilj prerade sokova visoke nutritivne i biološke vrijednosti usmjeren je na očuvanju nutritivne i biološke vrijednosti tijekom tretmana pa se zbog toga u novije vrijeme razmatraju nove netopinske tehnike procesiranja.

Stoga je svrha ovog istraživanja bila ispitati stabilnost vitamina C u sokovima šipka tretiranim netopinskim tehnikama (ultrazvuk i hladna plazma zasebno te u kombinaciji tih dviju tehnika) u usporedbi s pasterizacijom i svježim sokom šipka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Šipak (*Punica granatum L.*)

Šipak (*Punica granatum L.*) je listopadna biljka koja botanički pripada obitelji *Punicaceae*, a danas je poznato oko 1000 vrsta kultiviranog šipka (Levin, 1994). Latinski naziv šipka potječe od dvije riječi „Pomuni granatum“ što u prijevodu znači zrnata (granatum) jabuka (pomum) (Teixeira da Silva i sur., 2013). Drugi nazivi koji se koriste za šipak jesu: nar, pitomi šipak, mogranj, kalinka, granat, granat-jabuka, zrnata jabuka, uličar.

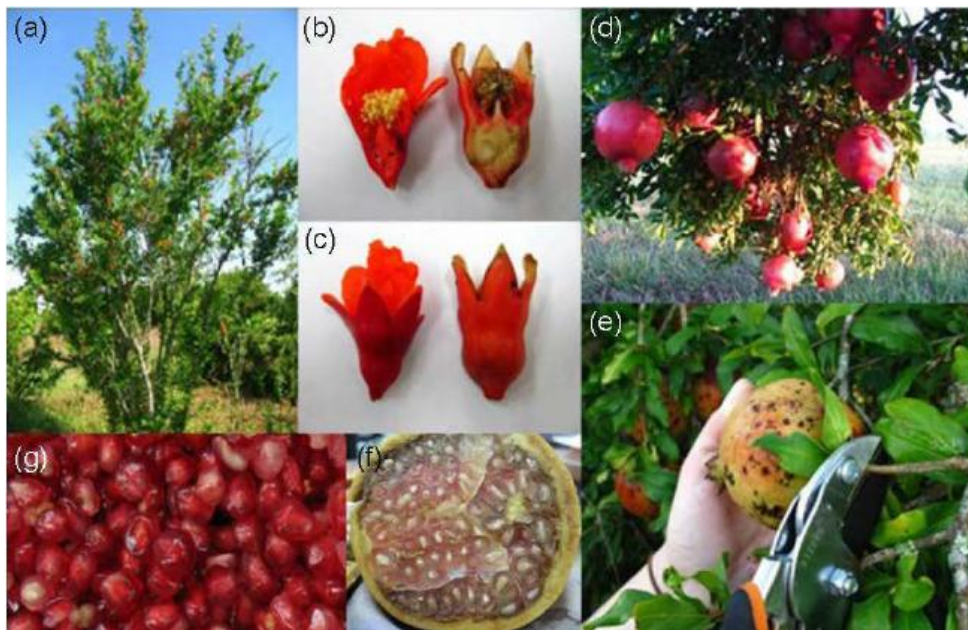


Slika 1. Šipak (*Punica granatum L.*) (Anonymus 1, 2017)

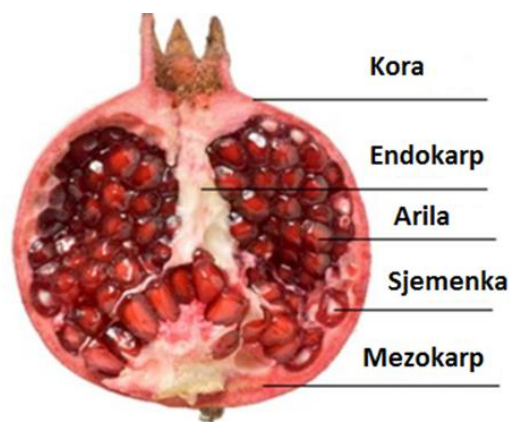
Šipak je jedna od najstarijih poznatih jestivih voćaka koja potječe iz Centralne Azije i područja nekadašnje Perzije (današnji Iran). Kultivacija divljeg šipka započinje oko 3000. i 4000. godine prije Krista u sjevernom Iranu i Turskoj (Lye, 2008) od kuda se širi u druge regije. Kultivacija se kasnije proširila na antički Egipat, Indiju, Mali Aziju, Sjevernu Afriku i obalu Mediterana. Španjolski kolonizatori su u 16. i 17. stoljeću uzgajanje šipka proširili na Srednju Ameriku, Meksiko i Južnu Ameriku (LaRue, 1980). Na našim područjima šipak raste u Dalmaciji i zapadnoj Hercegovini. Zanimljiva je činjenica da je u brončanom dobu narod na području današnje Albanije kultivirao šipak neovisno o drugim narodima, a jedan od dokaza je stara riječ *Shegë* koja se danas u Albaniji koristi za naziv šipka, a ne postoji niti u jednom drugom jeziku (Xhuveli, 2012).

Prema podacima iz 2013. godine, ukupna godišnja proizvodnja šipka približno iznosi 1,5 milijuna tona. U proizvodnji prednjače Iran i Indija te Španjolska i SAD (Teixeira da Silva i sur., 2013). Povijest korištenja šipka u ljekovite svrhe seže još u davnine, a spominje se u Starom zavjetu Biblije, Kuranu i babilonskom Talmudu gdje se opisuje kao sveto voće koje donosi plodnost, obilje i dobar izgled (Cravatto i sur., 2010). U ajurvedskoj medicini se koristio kao antiparazitski agens, tonik za krv, protiv dijareje i čireva te afti (Julie, 2008).

Plod šipka je bobičast, a njegov okus i veličina ovise o tome je li riječ o divljem ili pitomom šipku. Plod pitomog šipka je veći i teži od ploda divljeg šipka, a također ima i veće svjetlocrvene sjemenke višekutnog oblika veličine 8-12 mm. Kora je crvenkaste boje, a može biti pomiješana sa svjetložutim i zelenkastim tonovima. Arilna ovojnica sjemenke je boje rubina (Xhuveli, 2012). Različiti dijelovi šipka prikazani su na Slici 2. Dijelovi unutrašnjosti nara prikazani su na Slici 3.



Slika 2. Različiti dijelovi šipka. (a) Grm šipka. Vanjski (b) i unutarnji (c) dio cvijeta. (d) Potpuno zreo plod. (e) Berba šipka. (f) Unutrašnjost šipka. (g) Sjemenke obavijene arilnom ovojnicom (Maclean i sur., 2014)



Slika 3. Unutrašnjost ploda nara (Kalaycioğlu i Erim, 2016)

Šipak se uzgaja zbog brojnih bioloških svojstava i terapijskih učinaka izrazito povoljnih za ljudsko zdravlje (Julie, 2008). Među ostalim ima antimikrobnu, protuupalnu, antioksidacijsku, antikancerogenu i imunosupresivnu aktivnost. Na jetru djeluje protektivno regulirajući metabolizam glukoze i lipida (Bagri i sur., 2009) pa tako preventivno djeluje na kronične i autoimune bolesti te se koristi u dijabetološkoj dijetoterapiji (Julie, 2008). Također ima preventivne učinke na pojavu ateroskleroze, a time djeluje protektivno na krvožilni sustav (Karasu i sur., 2012, Shema-Didi i sur., 2012). Ima terapijske učinke na kosu i kožu, koristi se pri mršavljenju i djeluje preventivno na dentalne bolesti (Miguel i sur., 2010).

Sjemenke unutar crvene arilne ovojnice šipka se mogu konzumirati svježe, a također se koriste kao sastojci salata i ostalih jela te se od njih radi ulje. Osim toga, od šipka rade se sokovi, sirupi, vino, ocat, džemovi, čaj, proizvodi za njegu tijela, koristi se kao sastojak energetskih pločica i dodataka prehrani. Kora se stoljećima koristila, primjerice u Albaniji, kao tekstilni pigment (Mitrushi, 1955).

2.2. Kemijski sastav šipka

Šipak se anatomski može podijeliti u nekoliko dijelova; sjemenka, sok, perikarp, list, cvijet, kora i korijen, a svaki od tih dijelova ima zanimljivu farmakološku aktivnost i kemijski sastav. Na kemijski odnosno nutritivni sastav i kvalitetu šipka utječu vrsta (kultivar), okolišni čimbenici, sazrijevanje, tretiranje nakon berbe te skladištenje (Schwartz i sur., 2009). Osnovni kemijski sastav nara izražen na 100g jestivog dijela prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav jestivog dijela ploda nara (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2011)

NUTRIJENT	UDIO U JESTIVOM DIJELU PLODA
Voda (g)	77,93
Energija (kcal)	83,00
Proteini (g)	1,67
Masti (g)	1,17
Ugljikohidrati (g)	18,70
Ukupni šećeri (g)	13,67
Vlakna (g)	4,00
Pepeo (g)	0,53
Vitamin C (mg)	10,20

Folati (µg)	38,00
Pantotenska kiselina (mg)	0,38
Niacin (mg)	0,30
Vitamin E (mg)	0,60
Vitamin K (µg)	16,40
Kolin (mg)	7,60
Željezo (mg)	0,30
Kalcij (mg)	10,00
Magnezij (mg)	12,00
Kalij (mg)	236,00
Natrij (mg)	3,00
Fosfor (mg)	36,00
Cink (mg)	0,35
Selen (µg)	0,50

Jestivi dijelovi šipka od kojih se dobiva sok u svom sastavu imaju vodu (85 %), organske kiseline (limunska, jabučna, galna, askorbinska), jednostavne šećere čiji je udio 10 % (glukoza, fruktoza i saharoza), 1,5 % pektina, vitamine, polisaharide, polifenole, minerale te razne biološki aktivne komponente (terpeni, alkaloidi, fitosteroli). Za sok od nara pronađeno je da sadrži organske kiseline poput limunske (1 g/L) i askorbinske u koncentraciji 7mg/L (El-Nemr i sur.,1990). Osim navedenih kiselina, u većoj koncentraciji se nalazi i jabučna kiselina dok su oksalna, jantrarna i fumarna kiselina prisutne u manjoj količini (Mirdehghan i sur., 2007). Kemijski sastav različitih dijelova šipka utječe na dobrobiti koje donosi ljudskom zdravlju.

U perikarpu, lišću i cvijetu šipka nalaze se fenoli (flavonoidi i tanini) jedinstveni za šipak. Osim fenola, u perikarpu se također nalaze i kompleksni polisaharidi. Perikarp ploda divljeg šipka bogatiji je flavonoidima i taninima od perikarpa pitomog šipka (Ozcal i Dinc, 1993). Perikarp također sadrži kompleksne polisaharide (Jahfar i sur., 2003). Kora nara je važan izvor bioaktivnih spojeva, poput fenola, flavonoida, elagitanina i proantocijanidina, minerala i kompleksnih polisaharida (Jahfar i sur., 2003).

Sjemenke šipka sadrže triacilglicerole (oleinska, linolna, palmitinska i stearinska kiselina) koji tvore ulje, a u ulju je također prisutan visok udio puncične kiseline (C18:3-9cis, 11trans, 13cis) dugolančana polinezasićena masna kiselina. Ulje sjemenki šipka sadrži

fitosterole, a u jako malim količinama steroide i cerebrozide, a također se nalaze i lignini koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti (Lansky i Newman, 2007). U sastav sjemenki također ulaze i alfa- i gama- tokoferoli te fosfolipidi (Pande i Akoh, 2009).

2.3. Biološki aktivni spojevi šipka

Šipak ima brojne zdravstvene dobrobiti zahvaljujući svom kemijskom sastavu, pri čemu je pokazano da su različiti dijelovi ploda poput lista, kore, soka i sjemenki bogat izvor različitih fitonutrijenata. Pokazano je da ukupnom antioksidacijskom kapacitetu šipka više doprinose hidrofilni (85%) u usporedbi sa lipofilnim bioaktivnim spojevima (15%). Od hidrofilnih antioksidanasa najzastupljeniji su fenolni spojevi i vitamin C, a od hidrofobnih karotenoidi. Vrijedan su izvor fitoestrogena 17β -estradiola, koji je strukturno sličan estrogenu, a pokazano je da smanjuje hormonski utjecaj endogenih estrogena (Sreekumar i sur., 2010). Ukupni udio polifenola izražen ekvivalentima galne kiseline (GAE) na 100g u sjemenkama iznosi 89,2 mg, u pulpi taj udio iznosi 164,4 mg, u kori je 311,3 mg, a u lišću 359,6 mg (Pande and Akoh, 2009). Polifenolni spojevi u šipku od najvećeg su značaja, a zaslužni su za boju, okus, teksturu, antioksidacijsku (Hernandez i sur., 1999) i antibakterijsku aktivnost (Negi i Jayaprakasha, 2003).

2.3.1. Fenolni spojevi u šipku

Fenolni spojevi su skupina organskih aromatskih spojeva koje čine jedna ili više hidroksilnih grupa vezana na aromatski prsten, a ovisno o broju aromatskih prstenova od kojih se sastoje i skupinama vezanim na prstenove dijele se na flavonoide i fenolne kiseline (Shahidi i Naczka, 2004). Flavonoidi su velika grupa fenolnih spojeva koji se sastoje od dva aromatska prstena koji mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozilirani. Dijele se u šest skupina: flavoni, flavanoli, izoflavoni, flavonoli, flavan-3-oli, antocijanidini i antocijani. Ukupni udio flavonoida u šipku kreće se između 8,23 i 23,99 mg ekvivalenta kvercetina/100mg. Fenolne kiseline, u ovisnosti o strukturi, se dijele na hidroksibenzenske i hidroksicimetne (Stalikas, 2007).

Fenolne spojeve u šipku čine: fenolne kiseline poput kafeinske, p-kumarinske i ferulinske kiseline, flavonoidi katehin, epikatehin i kvercetin, tanini podložni hidrolizi; galotanini (derivati galne kiseline), elagitanini (derivati elaginske kiseline), punikalagin i punikalin. Strukture značajnijih fenolnih spojeva prikazani su na Slici 4. Ukupni udio polifenola izražen ekvivalentima galne kiseline (GAE) na 100g u sjemenkama iznosi 89,2 mg, u pulpi taj udio

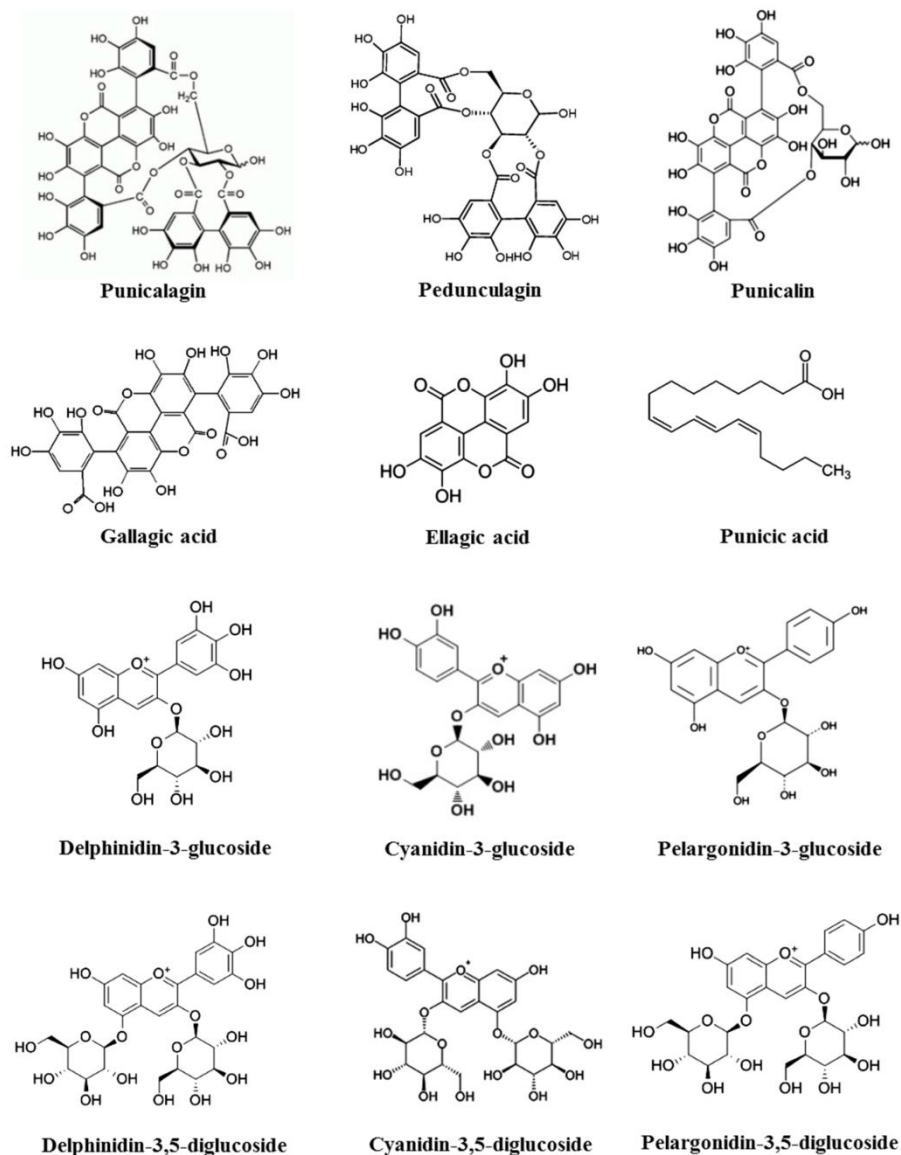
iznosi 164,4 mg, u kori je 311,3 mg, dok je u lišću određeno 359,6 mg (Pande and Akoh, 2009).

Kora sadrži najveći udio tanina podložnih hidrolizi, a taj udio iznosi 4792.3 - 6894.8 mg/100g (Pande and Akoh, 2009). Tanini podložni hidrolizi, elagitanini i galotanini, čine glavninu sastava kore i perikarpa nara dok je najznačajniji tanin punikalagin (Fischer i sur., 2011, Mena i sur., 2011, Qu i sur., 2012, Gil i sur., 2000). U istraživanju Di Nunzio i sur. (2013) ispitivan je ukupni sastav polifenola i antioksidacijska aktivnost različitih kultivara šipka. Odabrani su sokovi tri kultivara šipka iz Španjolske, Izraela i Turske. Udio elaginske kiseline određen je u koncentracijama: 253, 244 i 168 mg/L dok je udio tanina podložnih hidrolizi bio 609, 564 i 434 mg/L. Punikalagin A i B u šipku iz Španjolske određeni su u koncentracijama: 14,3 i 31,5 mg/L. U drugom istraživanju pokazano je da udio punikalagina varira između 149,85 i 1042,93 mg/L u sokovima šipka iz četiri regije u Kini (Li i sur., 2015). Sastav punikalagina u sokovima od šipka nije samo pod utjecajem metode ekstrakcije, štoviše, na sastav punikalagina u šipku utječe kultivar (Akhavan i sur., 2015).

Ljudski organizam ne apsorbira tanine, već se oni hidroliziraju do elaginske kiseline koja se također slabo apsorbira, ali elaginska kiselina se metabolizira crijevnim bakterijama te tako doprinosi zdravstvenim benefitima na ljudsko zdravlje koje imaju metaboliti fenolnih spojeva (Cerdà i sur., 2005, Seeram i sur., 2005).

Neka istraživanja potvrđuju da je sok od šipka jedan od važnijih izvora antocijana odgovornih za karakterističnu intenzivnu crvenu boju soka (Fischer i sur., 2011, Gil i sur., 2000, Alighourchi i sur., 2008). U istraživanju Mousavinejad i sur. (2009) određivao se ukupni fenolni sastav i antioksidacijska aktivnost osam kultivara šipka iz Irana. Antioksidacijska aktivnost soka od šipka direktno je povezana s ukupnim udjelom polifenolnih spojeva. Ispitivan je udio glavnih antocijana odgovornih za boju soka nara i udio elaginske kiseline. Delfinidin-3,5-diglikozid je određen u najvećoj koncentraciji (372–5301 mg/L), zatim je slijedio cijanidin-3,5-diglikozid (242–2361 mg/L) te delfinidin-3-glikozid (49–1042 mg/L) i pelargonidin-3,5-diglikozid (7-90mg/L). Ukupna koncentracija svih kvantificiranih antocijana iznosila je između 815 i 654830 mg/L. Značajne razlike bile su prisutne u udjelu elaginske kiseline u različitim kultivarima. Taj udio je iznosio između 7 i 160 mg/L. Koncentracija ukupnih tanina određena je u rasponu od 150 do 320 mg/L. U istraživanju Mena i sur. (2011) ispitivan je, među ostalim, ukupni sastav polifenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost, udio punikalagina, ukupni udio antocijana i elaginske kiseline u 15 kultivara nara iz

Španjolske. Ukupni udio elaginske kiseline određen je između 3,6 i 153 mg/L dok je ukupni udio punikalagina bio između 1,4 i 44 mg/L. Udio antocijana bio je između 34 i 1075 mg/L.



Slika 4. Fenolni spojevi u šipku od značajne fiziološke važnosti (Sharma i sur., 2017)

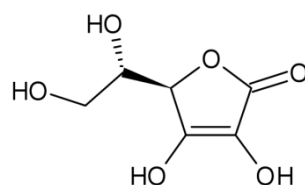
Taj udio antocijana i elaginske kiseline je relativno niži od udjela određenom u kultivarima šipka iz Irana u prethodno navedenom istraživanju Mousavinejad i sur. (2009). Ova razlika u rezultatima moguća je zbog razlika u agroekološkim čimbenicima uzgoja šipka.

Sastav fenolnih spojeva u soku od šipka uvjetovan je vrstom (kultivarom), agronomskim i klimatskim uvjetima, vremenom sazrijevanja i metodama za ekstrakciju soka (Gundogdu i sur., 2012, Viuda-Martos i sur., 2010, Rajasekar i sur., 2012, Legua i sur., 2012,

Fischer i sur., 2013, Boročov-Neori i sur., 2011) dok aktivnost fenolnih spojeva ovisi ponajviše o njihovoj kemijskoj strukturi (Gil i sur., 2000).

2.3.2. Vitamin C u šipku

Askorbinska kiselina, kao reducirani oblik vitamina C, lako predaje dva atoma vodika s elektronima i pritom postaje dehidroaskorbinska kiselina (oksidirani oblik) koja nema antioksidacijsko svojstvo vitamina. Zbog antioksidacijskih svojstava, proizvođači hrane ju često dodaju kao konzervans jer sprečava posmeđivanje i doprinosi udjelu vitamina C u namirnici. Vitamin C se može dodavati kao antioksidans u obliku limunovog soka kao prirodna zamjena za sintetski oblik (E300) (Marti i sur., 2001).



Slika 5. Kemijska struktura askorbinske kiseline (Anonymus 2, 2017)

Dodatak soka od limuna u sok šipka može djelovati preventivno na reakcije posmeđivanja i degradaciju pigmenata odgovornih za crvenu boju soka šipka (Özkan, 2002). Međutim, askorbinska kiselina nepovoljno utječe na stabilnost antocijana. Ukupni udio antocijana u soku šipka, pomiješanog sa sokom limuna u određenim omjerima, nakon kraćeg vremena skladištenja, smanjuje se u usporedbi s početnim udjelom (Pérez-Vicente i sur., 2004). Što je udio dodanog soka limuna veći, veća je i degradacija antocijana u soku šipka (Özkan, 2002). Smanjenje početnog udjela vitamina C usko je povezano sa smanjenjem udjela antocijana. Najznačajniji proces degradacije vitamina C u soku šipka događa se tijekom prvih sedam dana skladištenja kada udio vitamina C padne za oko 50% od početne vrijednosti, ali u daljnjim periodima skladištenja prisutna je retencija vitamina C (Gonzlez-Molina i sur., 2009). Uzrok tim promjenama može se pripisati kondenzaciji antocijana s askorbinskom kiselinom (Poei-Langston i Wrolstad, 1981), ali uzrok mogu biti i degradacijski produkti askorbinske kiseline (dehidroaskorbinska kiselina, furfurali i vodikov preoksid) koji nastaju nakon kraćeg vremena skladištenja (Özkan, 2002). Dodatak askorbinske kiseline u sok šipka ne doprinosi značajnijim benefitima jer ona degradira već unutar 96 sati, a time uzrokuje i degradaciju antocijana koji su sami po sebi izvrsni antioksidansi te nema potrebe

dodavati askorbinsku kiselinu kao dodatni antioksidans. Askorbinska kiselina se nije pokazala značajnom prilikom očuvanja crvene boje soka, štoviše nakon tri mjeseca skladištenja soka šipka s dodanom askorbinskom kiselinom i soka šipka bez dodane askorbinske kiseline pri 5 °C boja oba soka bila je ista (Marti i sur., 2001).

Zajedno s fenolnim spojevima i ostalim antioksidacijskim sastojcima šipka, vitamin C pridonosi ukupnom antioksidacijskom kapacitetu šipka. Pripada skupini vitamina topljivih u vodi te lako degradira ovisno o tipu prerade, vremenu skladištenja, temperaturi, svjetlosti, prisutnosti kisika, metala i drugih tvari. U hrani se najčešće određuje oksidometrijskom titracijom s 2,6-diklorfenolindofenolom i HPLC metodom, a također se može određivati kolorimetrijskim i fluorometrijskim metodama (Rodriguez-Bernaldo i sur., 2006).

Rezultati istraživanja Dumlu i Gurkan (2007) potvrdili su visok udio vitamina C u različitim vrstama šipka, a taj udio varira između 312 mg i 1050 mg na 100g jestivog dijela. Zanimljivo je da je osim pulpe, vitamin C pronađen i u kori šipka, a taj udio varira ovisno o vrsti i području iz kojeg potječe. Primjerice, rezultati nekih istraživanja pokazuju da šipak iz Indije ima signifikantno veći udio vitamina C u usporedbi s onim iz Omana i Egipta (Opara i sur., 2009). Ipak, rezultati nekih istraživanja potvrđuju da neovisno o vrsti i regiji u kojoj se šipak uzgaja, kora sadrži veći udio vitamina C nego pulpa. Ta razlika može biti čak do 49,23% (vrsta šipka pod nazivom „Ruby“) i 41,89% (bijeli nar iz Indije), a razlike u udjelima mogu biti i manje (19.64% i 22.08%) što je svojstvenije za ostale vrste šipka (vrste šipka pod nazivom Wonderful, Spanish Sweet, Mollar, Ak-anar). S obzirom na veći udio vitamina C u kori, kora ima veću antioksidacijsku aktivnost od pulpe šipka (Li i sur., 2006, Guo i sur., 2003, Singh i sur., 2002).

Također, rezultati nekih studija pokazuju da na udio vitamina C utječe, primjerice i način sušenja. Kora šipka može se sušiti na suncu ili u sušionicama. Veća retencija vitamina C pokazala se u slučaju sušenja kore na suncu najvjerojatnije zbog sporijeg i postepenog gubitka vlage, niže temperature i dužeg vremena sušenja za razliku od sušenja u sušionicama pri visokoj temperaturi u kratkom vremenu (Vega-Galvez i sur., 2008). Osim toga, brzo sušenje kore pri visokoj temperaturi uzrokuje i degradaciju vitamina C (Timoumi i sur., 2007).

2.4. Proizvodnja soka šipka

Prema Pravilniku o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN 48/2013), voćni sok je proizvod dobiven od jestivog dijela voća, a karakterizira ga boja, aroma i okus karakterističan za voće od kojega potječe.

Sok šipka veoma je popularan među potrošačima, a ujedno predstavlja vrijedan izvor različitih biološki aktivnih spojeva pa jedna čaša ovog soka sadrži čak 40% RDA vrijednosti za dnevni unos vitamina C stoga se sok od šipka se može uzeti u obzir kao funkcionalna hrana (Du i sur., 1975).

Svježi sok šipka je podložan kvarenju, a daljnjom preradom poželjno je produljiti rok trajanja te istovremeno zadržati svu biološku vrijednost. Danas se u preradi najčešće koriste procesi koji uključuju visoku temperaturu, međutim reakcije poput degradacije pigmenata (karoteonida i antocijana) i reakcije posmeđivanja (Maillardove reakcije, enzimsko posmeđivanje i oksidacija askorbinske kiseline) nepoželjne su za gotovi sok šipka, obzirom da utječu na nutritivna i senzorska obilježja soka (Ibarz i sur., 2003).

Kako bi se prevazišle ove prepreke u preradi, pronalaze se nova rješenja vezana za toplinski tretman pa se sokovi često, poradi korekcije boje i okusa, miješaju sa različitim sokovima poput soka od limuna kako bi se posmeđivanje svelo na najmanju mjeru (Mena i sur., 2013). Uzevši sve u obzir, osim osiguranja mikrobiološke stabilnosti, cilj prerade sokova visoke nutritivne i biološke vrijednosti usmjeren je prema očuvanju nutritivne i biološke vrijednosti tijekom tretmana pa se zbog toga u novije vrijeme razmatraju nove netoplinke tehnike procesiranja (Barba i sur., 2015).

2.5. Primjena novih netermalnih tehnika u preradi soka šipka

Neka od novijih rješenja tj. potencijalno alternativne metode najčešće korištenoj pasterizaciji uključuju primjenu visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka, mikrovalova, omskog zagrijavanja te hladne plazme, a sve sa ciljem da mogu udovoljiti zahtjevima kupaca za prirodnom, svježom i sigurnom hranom (Barbosa-Canovas i sur., 1998, Tiwari i sur. 2009).

Uporaba ultrazvuka je danas naveliko prisutna u farmaceutskoj, kozmetičkoj i kemijskoj industriji. Ultrazvuk je mehanički val koji se prenosi putem elastičnog medija, a od zvučnog vala razlikuje se svojom frekvencijom, koja uključuje raspon od 20kHz do 10MHz. Glavni fizički parametri koji karakteriziraju ultrazvučni val su snaga (W), frekvencija (Hz) i valna duljina (cm) (Mason i sur., 2005). Upravo zbog širokog raspona frekvencija i snage, ultrazvuk ima različite efekte što mu osigurava široku primjenu. Mehanizam ultrazvuka u tekućem mediju poput soka uglavnom je vezan uz mehanički efekt prouzročen impolzijama

kavitacijskih mjehurića (McClements, 1995)., a također je značajan i toplinski indeks ultrazvuka koji se definira kao omjer akustičke snage proizvedene u ultrazvučnom pretvorniku i snage potrebne za zagrijavanje materijala koji se obrađuje za 1 °C (Režek Jambrak, 2008).

Utjecaj ultrazvuka na fizikalno-kemijski i fenolni sastav soka od šipka ispitivali su u svom istraživanju Alighourchi i sur. (2013). Ispitivane su amplitude 50, 75 i 100% i vremena 0, 3, 6 i 9 min. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se koncentracija antocijana u soku uslijed tretmana ultrazvukom smanjila za 0.38-9.75%, dok se sadržaj ukupnih fenola uvećao za prosječno 5.40 - 42.52%. U novijem istraživanju ultrazvuk se pokazao kao dobra tehnika za izolaciju bioaktivnih spojeva pomoću ultrazvuka pri čemu su dobiveni ekstrakti osušeni raspršivanjem te na koncu enkapsulirani (Kaderides i sur., 2015).

Hladna (netoplinska) plazma se sve više primjenjuje u prehrambenoj industriji uključujući i suhu dezinfekciju površine hrane (mesa, piletine i puretine, ribe i svježih povrtnih proizvoda), granula i čestica hrane (sušenog mlijeka, biljaka i začina) te proklijalih sjemenki. Ne-termalne ravnotežne plazme, čija primjenjena snaga potječe od elektrona, stvaraju se korona pražnjenjem, svjetlećim pražnjenjem, pražnjenjem u obliku svjetlosnog luka, kapacitetno spojenim pražnjenjem, induktivno spojenim pražnjenjem, valovima zagrijane plazme itd. Metoda hladne plazme ima inaktivacijske učinke na mikrobe poput *L. monocytogenes* i *Salmonelle* (Song i sur., 2009, Fernandez i Thompson, 2012). Ova tehnologija je također uspješno primijenjena za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala, ali i za njihovu funkcionalnu modifikaciju kako bi imala željena svojstva. Yun i sur. (2010) su u svom radu pokazali da je atmosferska plinska plazma efikasna u inaktivaciji *L. monocytogenes* i primjenjiva na jednokratnim spremnicima za hranu. Kroz zadnjih nekoliko godina skupio se niz podataka o utjecaju ne-termalne plazme na inaktivaciju mikroorganizama na površinama abiotskih materijala kao što su sintetske membrane i staklo. Neke od važnijih primjena su u: tretmanu sirovih i sušenih proizvoda, kontroli biofilmova i dekontaminaciji procesiranih površina, površinskoj dekontaminaciji jaja, sterilizaciji ambalažnog materijala, tretmanu otpadne vode (Misra i sur., 2011).

U novije vrijeme sve veću pažnju istraživača privlači tehnika tretiranja hladnom plazmom za koju su već rezultati nekih istraživanja pokazali da pozitivno djeluje na parametre boje i stabilnost polifenolnih spojeva u sokovima šipka, aronije i višnje maraske (Garofulić Elez i sur., 2015, Misra i sur., 2011, Bursać-Kovačević i sur., 2016, Herceg i sur., 2016).

U istraživanju Bursać-Kovačević i sur. (2016) ispitivan je utjecaj tretmana hladnom plazmom na udio antocijana i promjenu boje u mutnom soku šipka. Promatrani su sljedeći parametri: vrijeme tretiranja soka hladnom plazmom (3,5, 7 min), volumen tretiranog soka (3, 4, 5 cm³) i protok plazme 0.75, 1, 1.25 dm³/min). Najveća stabilnost antocijana utvrđena je pri vremenu tretiranja 3 minute u volumenu soka 5 cm³ i protoku plazme u iznosu 0,75 dm³. Zanimljivo je da je sadržaj antocijana uslijed tretmana hladnom plazmom bio veći za prosječno 30%. Razlog uvećanju može biti pucanje staničnih membrana uslijed generiranja rekativnih čestica pri čemu se iz vakuola oslobađaju antocijani i prelaze u ekstracelularni prostor (Kobzev i sur., 2013). Drugi mogući razlog povećanja udjela antocijana je njihova stabilnost koja proizlazi iz njihove kemijske strukture. Glikolizirani spojevi, poput diglikoliziranih antocijana delfinidina i cijanidina, manje su podložni degradaciji prilikom tretmana hladnom plazmom od njihovih neglikoliziranih oblika (Grzegorzewski i sur., 2011). Osim udjela antocijana, praćena je i promjena boje tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni netretirani uzorak. Rezultati su pokazali da na promjenu boje ne utječu vrijeme tretiranja i volumen uzorka, ali intezitet boje opada s povećanjem protoka plazme. Vizulanih razlika u boji između tretiranih uzoraka i kontrolnog netretiranog uzorka gotovo i nije bilo. Ukupno gledajući, ovo istraživanje pokazalo je da tretiranje mutnog soka od nara hladnom plazmom ima pozitivne učinke na stabilnost antocijana i promjenu boje.

Rezultati još jednog istraživanja (Herceg i sur., 2016) potvrđuju pozitivan utjecaj hladne plazme na stabilnost neobojenih fenolnih spojeva u soku šipka. Ispitivao se utjecaj tretmana hladnom plazmom na polifenolni sastav soka šipka. U ovom istraživanju uspoređen je utjecaj hladne plazme sa pasterizacijom na stabilnost fenolnih spojeva u soku šipka. Nakon pasterizacije udio polifenolnih spojeva porastao je za 29,55% dok je nakon tretiranja hladnom plazmom taj udio u prosjeku porastao za 33,03%. Uvjeti u kojima je tretman hladnom plazmom približno jednak učinku pasterizacije s obzirom na stabilnost polifenolnih spojeva su: vrijeme tretiranja hladnom plazmom od 5 min u volumenu 4cm³ i pri protoku plazme 0,75 dm³/min.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovom radu korišten je mutni sok šipka dobiven hladnim prešanjem na sokovniku Vervita PRO (Kuvings, Korea). Plodovi šipka nabavljeni su u trgovačkoj mreži, a sok je pripremljen od arila neposredno prije tretmana.

3.2. Metode rada

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka i hladne plazme, pojedinačno i kombinirano, na stabilnost vitamina C u mutnom soku šipka tijekom nultog i sedmog dana skladištenja pri 4°C prema planu pokusa prikazanom u Tablici 2. Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc). Također, radi usporedbe netoplinskih vs. toplinskih tehnika pripremljen je i pasterizirani sok šipka, a pasterizacija je provedena u termostatoranoj kupelji rotavapora (Büchi B-490, Švicarska) pri režimu 90 °C tijekom 1 min.

Tablica 2. Plan pokusa tretiranja soka šipka

Uzorci	Oznaka uzorka	ULTRAZVUK		PLAZMA	
		Amplituda (%)	Vrijeme (min)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (min)
Svježi sok	SS	/	/	/	/
Pasterizirani sok	PS	/	/	/	/
Kombinirani tretmani	1	75	2,5	60	2,5
	2	75	2,5	60	5
	3	75	2,5	90	2,5
	4	75	2,5	90	5
	5	75	5	60	2,5
	6	75	5	60	5
	7	75	5	90	2,5
	8	75	5	90	5
	9	100	2,5	60	2,5
	10	100	2,5	60	5
	11	100	2,5	90	2,5
	12	100	2,5	90	5
	13	100	5	60	2,5
	14	100	5	60	5
	15	100	5	90	2,5
	16	100	5	90	5
Ultrazvuk	UZ-1	75	2,5	/	/
	UZ-2	75	5	/	/
	UZ-3	100	2,5	/	/
	UZ-4	100	5	/	/
Plazma	P-1	/	/	60	2,5
	P-2	/	/	60	5
	P-3	/	/	90	2,5
	P-4	/	/	90	5

3.2.1. Tretiranje soka šipka ultrazvukom visoke snage

Za tretiranje soka šipka ultrazvukom korišten je ultrazvučni procesor SONICATOR S-4000 (Misonix Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD). Karakteristike ovog procesora su: maksimalna izlazna snaga 600 W, frekvencija 20 kHz, strujni napon 100-240 V te frekvencija strujne mreže 50-60 Hz. Sok šipka (200 mL) tretiran je ultrazvukom visokog intenziteta pri amplitudama: 90 i 120 μm (75% i 100%), raspona snage od 10-600 W, koja je direktno kontrolirana amplitudom te frekvencije od 20 kHz prema planu pokusa (Tablica 2.). Na uređaju je podešeno: (i) pulse on time = 1 min te (ii) pulse off time = 15 sec. Korištena je ultrazvučna sonda promjera 12,7 mm koja je uronjena u čašu s uzorkom do dubine dva promjera iste od dna čašice (2,5 cm). Na ultrazvučnom procesoru priključen je termočlanak (model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd., Leighton Buzzard LU7 4AD, UK) kojim se mjeri porast temperature uzorka tijekom tretmana i isti je uvijek bio uronjen u staklenu čašu sa uzorkom prilikom tretiranja. Temperatura tijekom ultrazvučnog tretmana nije prelazila 51 °C.

3.2.2. Tretiranje soka šipka hladnom plazmom

Za tretiranje soka šipka hladnom plazmom korištena je tekućinska plazma s mjehurićima. Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Strujni krug se sastoji od visokonaponskog napajanja, kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 M Ω , rotirajuće sklopke tzv. „spark – gap“ komore spojene na elektromotor s regulatorom frekvencije te kontrolne jedinice napajanja. Korišten je reaktor volumena 300 mL, zatvoren s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-točka, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom (igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3,81 cm) te elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika. Kroz igličnu elektrodu je upuhivan argon (4 L/min) koji je omogućio miješanje uzorka te samo pražnjenje u mjehurićima.

3.2.3. Određivanje vitamina C u soku šipka

Princip:

Vitamin C se u soku šipka određuje visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) prema metodi iz literature (Lee i Coates, 1999). Da bi se osigurala dobra efikasnost HPLC analize, potrebno je odabrati adekvatan način ekstrakcije vitamina C s obzirom da je podložan oksidaciji. Istraživanja su pokazala da metafosforna kiselina omogućava efikasniju ekstrakciju askorbinske kiseline time što sprečava njenu oksidaciju na način da inaktivira

prisutnu oksidazu u stanicama (Del Caro i sur., 2004, Franke i sur., 2004) u odnosu na druge kiseline za ekstrakciju (Hernandez i sur., 2006). Vitamin C u soku šipka potrebno je najprije ekstrahirati, a zatim slijedi određivanje, identifikacija te izračunavanje udjela.

Materijali i metode:

Aparatura i pribor:

1. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
2. Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
3. Centrifuga (HETTICH, ROTOFIX 32)
4. pH metar Mettler Toledo Seven easy
5. HPLC Varian ProStar System opremljen sa: ProStar Solvent Delivery Modulom 230, injektorom Rheodyne 7125, detektorom Prostar 330 UV/VIS – Photodiode Array Detector (PDA)
6. Filtri za pokretnu fazu, Nylon 66 Membranes; 0,45 μm , 47 mm Diameter, Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
7. Kolona, Nucleosil C-18, 5 μm , 250 x 4,6 mm I.D., Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
8. Predkolona Nucleosil C-18, 5 μm , 10 x 4,6 mm I.D., Supelco, Supelco Park, Bellefonte, USA
9. Odmjerne tikvice, volumena 10, 50 i 100 mL
10. Pipete volumena 10 mL
11. Mikropipete volumena 100 μL i 1000 μL
12. Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Metafosforna kiselina, kristalići kiseline
2. Metafosforna kiselina, 2,5 %-tna

Priprema: 2,5 g kristalića metafosforne kiseline otopi se u destiliranoj vodi i nadopuni do oznake u odmjerneoj tikvici volumena 100 mL. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku.

3. Fosforna kiselina, 85 %-tna

4. Kalij dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), 25 mM, pH 3,0

Priprema: 3,4 g kalijeveg dihidrogenfosfata otopi se u redestiliranoj vodi te nadopuni do oznake redestiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1 L. Pripremljenu otopinu potrebno je podesiti na pH 3,0 dodatkom par kapi fosforne kiseline (85%-tne).

4. Standard askorbinske kiseline, C=100 mg/L

Priprema: Odvaži se 5 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te pomoću redestilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL, a potom se do oznake nadopuni redestiliranom vodom.

Ekstrakcija askorbinske kiseline

Ekstrakcija je provedena neposredno po provedenom tretmanu, na način da je u plastičnu kivetu volumena 50 mL otpipetirano 2 mL soka i 7 mL 2,5 %-tne metafosforne kiseline. Uzorci se potom centrifugiraju pri 5000 rpm/10 min i supernatant se dekantira u odmjerne tikvice volumena 10 mL te nadopuni se s 2,5 %-tnom metafosfornom kiselinom do oznake. Dobiveni ekstrakt služi za kromatografsko određivanje, a prije kromatografske analize profiltira se kroz 0,45 µm filtar (Whatman International Ltd., Kent, UK).

Analiza askorbinske kiseline primjenom HPLC uz UV/Vis PDA detekciju

Određivanje askorbinske kiseline u pripremljenim ekstraktima provodi se visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) uz UV/Vis PDA detekciju.

Princip određivanja askorbinske kiseline primjenom HPLC-a temelji se na izokratskoj eluciji. U tu svrhu koristi se jedna mobilna faza kalij dihidrogenfosfat (25 mmol/L) podešen na pH 3,0. Prije korištenja potrebno je mobilnu fazu odzračiti na ultrazvučnoj kupelji (10 min).

Uvjeti kromatografskog određivanja askorbinske kiseline:

Kolona:	Nucleosil 100-5C18, 5µm (250 × 4,6 mm I.D.)
Pokretna faza:	Kalij dihidrogenfosfat (25 mmol/L), pH 3,0
Protok:	1 mL/min
Detektor:	UV/VIS/PDA
Temperatura:	22 °C
Vrijeme trajanja:	15 min

Injektirani volumen: 20 μ L
Vrijeme uravnoteženja kolone: 2 min

Identifikacija askorbinske kiseline

Identifikacija askorbinske kiseline provodi se usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (t_R) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom karakterističnih UV/VIS spektara. Askorbinska kiselina se identificira i kvantificira pri 245 nm. Kvantitativna vrijednost askorbinske kiseline izračuna su iz jednadžbe baždarnog pravca standarda.

Kvantifikacija askorbinske kiseline

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina standarda askorbinske kiseline u koncentraciji od 100 mg/L. Od te otopine askorbinske kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvota standardne otopine askorbinske kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake redestiliranom vodom. Koncentracije askorbinske kiseline u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Sva priređena razrijeđenja kromatografski se analiziraju. Iz površine pikova i masenih koncentracija spojeva u Exellu se nacrtu baždarni pravac i izračuna pripadajuća jednadžba pravca. Koncentracija askorbinske kiseline izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca: $Y = 641418 \times X$, $R^2 = 0,9999$ (Y – površina pika pri 245 nm, X – koncentracija askorbinske kiseline (mg/L)).

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = X \left(\frac{mg}{L} \right) \times \frac{V_{ekstrakta} (mL)}{V_{uzorka} (mL)}$$

$V_{ekstrakta}$ = konačni volumen ekstrakta (10 mL)

V_{uzorka} = volumen soka uzetog za ekstrakciju (2 mL)

Koncentracije vitamina C izražene su kao mg askorbinske kiseline po litri soka ($mg \text{ mL}^{-1}$).

3.3. Statistička analiza

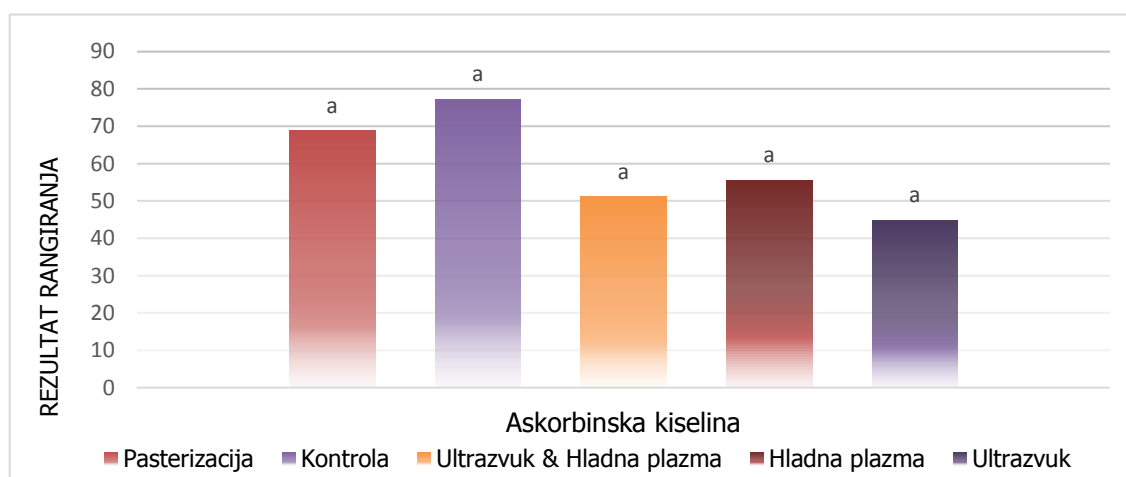
Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey

HSD testom. Izvori varijacija su amplituda i vrijeme (za ultrazvuk), frekvencija i vrijeme (za hladnu plazmu) te svi ovi parametri za kombinirane tretmane kao i vrijeme skladištenja (nulti i sedmi dan). Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitana je stabilnost vitamina C u sokovima šipka tretiranih ultrazvukom i hladnom plazmom, zasebno i kombinirano neposredno po provedenom tretmanu te tijekom 7 dana skladištenja pri 4 °C. Radi usporedbe netoplinskih i toplinskih tehnika pripremljen je i pasterizirani sok od šipka, a pasterizacija je provedena u termostatiranoj kupelji rotavapora pri režimu 90 °C tijekom 1 min te su svi uzorci uspoređeni sa kontrolnim (netretiranim) uzorkom.

Rezultati rangiranja dobivenih rezultata svih primjenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak (svježi sok) obzirom na sadržaj askorbinske kiseline (Slika 1) pokazuju da među tretmanima, bilo toplinskim (pasterizacija) ili netoplinskim (ultrazvuk i plazma, ponaosob te kombinirano), značajnije razlike na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka nije bilo. Stoga, napravljena je multifaktorska analiza varijance kako bi se izvori varijacija sagledali pojedinačno i u danim kombinacijama te tako razmotrila stabilnost vitamina C u tretiranim sokovima šipka.



*a – prosjeci sa istim slovom međusobno se signifikantno ne razlikuju ($p \leq 0.05$)

Slika 6. Rangiranje primijenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak obzirom na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka})

4.1. Utjecaj ultrazvuka i hladne plazme zasebno na stabilnost vitamina C u soku šipka

U Tablici 3. prikazani su rezultati utjecaj parametara ultrazvuka na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka ($\text{mg}/\text{mL}_{\text{soka}}$). Pojedinačni izvori varijacija su amplituda (75% vs. 100%), vrijeme tretiranja (2.5 vs. 5min) i dani skladištenja (nulti i 7. dan). Prosječna koncentracija vitamina C u sokovima šipka tretiranih ultrazvukom iznosila je 0,55 $\text{mg}/\text{mL}_{\text{soka}}$.

Dobiveni rezultati pokazuju da povećanje amplitude ultrazvuka značajno doprinosi stabilnosti vitamina C u sokovima šipka. Prilikom tretiranja sokova ultrazvukom veće amplitude (100%) pokazalo se sokovi šipka sadržavaju značajno veću koncentraciju vitamina C (0,55 $\text{mg}/\text{mL}_{\text{soka}}$) u odnosu na tretman nižom amplitudom (75%). Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Abid i sur. (2014) gdje je pokazano da primjena većih amplituda (90% i 60%) daje veće iskorištenje askorbinske kiseline od primjene niže amplitude (30%) prilikom tretiranja soka od jabuke. Uzrok tome je veći učinak kavitacije koja proporcionalno ovisi o primjenjenoj amplitudi te se njome uklanja više kisika otopljenog u soku. Time je oksidacija askorbinske kiseline prisutna u manjoj mjeri te je prisutan veći udio vitamina C (Cheng i sur., 2007).

Tablica 3. Utjecaj parametara ultrazvuka na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka ($\text{mg}/\text{mL}_{\text{soka}}$)

Ispitivani parametri	n	Askorbinska kiselina
Amplituda		$p \leq 0.01^{\dagger}$
75 %	8	0.54 ± 0.00^a
100 %	8	0.55 ± 0.00^b
Vrijeme tretiranja		$p = 1.00^{\ddagger}$
2.5 min	8	0.55 ± 0.00^a
5 min	8	0.55 ± 0.00^a
Skladištenje		$p \leq 0.01^{\dagger}$
0 dana	8	0.05 ± 0.00^a
7 dana	8	1.05 ± 0.00^b
Prosječna vrijednost	16	0.55 ± 0.07

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Tiwari i sur. (2008) ipak navode suprotne rezultate. U njihovom istraživanju pokazalo se da primjena veće amplitude (100%) daje manje iskorištenje od primjene niže amplitude (40%) prilikom tretiranja soka od jagode. Autori navode da je moguć uzrok tome termoliza ili

oksidacija askorbinske kiseline koja je izražena u većoj mjeri prilikom tretiranja soka većom amplitudom (Hart i Henglein, 1985, Riesz i sur., 1985, von Sonntag i sur., 1999).

Vrijeme tretiranja soka šipka (2,5 vs. 5 minuta) nije značajno utjecalo udio vitamina C u sokovima šipka te je prosječna koncentracija vitamina C iznosila 0,55 mg/mL_{soka}. Međutim, u istraživanju Abid i sur. (2013) dulje vrijeme tretiranja soka od jabuke (60 i 90 minuta) dalo je bolje iskorištenje od kraćeg vremena tretiranja (30 minuta) pri konstantnoj amplitudi (70%). Autori navode da je ultrazvuk netoplinska metoda koja ne dovodi do termolize askorbinske kiseline te nastala kavitacija uklanja otopljeni kisik te tako neće doći do oksidacije askorbinske kiseline pa je zbog toga njezin udio veći (Cheng i sur., 2007). Za razliku od toga, Tiwari i sur. (2008) navode kako dulji tretman ipak daje slabije iskorištenje jer prilikom duljeg tretmana (10 minuta) može doći do značajnije termolize i oksidacije askorbinske kiseline u odnosu na kraći tretman (5 minuta) (Hart i Henglein, 1985, Riesz i sur., 1985, von Sonntag i sur., 1999).

Skladištenje soka šipka signifikantno utječe na udio vitamina C. Koncentracija vitamina C bila je niža na početku (0,05 mg/mL_{soka}) od koncentracije nakon sedmog dana skladištenja (1,05 mg/mL_{soka}) na 4°C. Mogući uzrok tome je razgradnja kompleksnih struktura askorbata tijekom skladištenja. Druga istraživanja (Tiwari i sur., 2009, Abid i sur., 2014) navode kako dulje skladištenje daje manje iskorištenje vitamina C te da brzina degradacije vitamina C ovisi u uvjetima skladištenja (temperatura), pakiranju i metodama prerade soka (Kabasakalis i sur., 2009, Kennedy i sur., 1992).

U Tablici 4. prikazani su rezultati utjecaja parametara hladne plazme na koncentraciju askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka}). Pojedinačni izvori varijacija su: frekvencija plazme (60 vs. 90 Hz), vrijeme tretiranja (2.5 vs. 5 min) i dani skladištenja (nulti i 7. dan). Prosječna koncentracija vitamina C u sokovima šipka tretiranih hladnom plazmom iznosila je 0,64 mg/mL_{soka} što je za 14.06% više u odnosu na koncentracije vitamina C u sokovima šipka tretiranih ultrazvukom.

Nadalje, frekvencija plazme značajno utječe na udio vitamina C u soku šipka. Tretiranje soka šipka većom frekvencijom plazme (90 Hz) rezultiralo je većom stabilnošću vitamina C (0,7 mg/mL_{soka}) u odnosu na sokove šipka tretirane nižom frekvencijom (60 Hz) (0,57 mg/mL_{soka}).

Promotri li se utjecaj vremena tretiranja, dobiveni rezultati pokazuju da je veća koncentracija vitamina C (0,67 mg/mL_{soka}) određena pri dužem tretiranju soka plazmom (5

minuta), nego kod kraćeg tretiranja (2,5 minuta) gdje je koncentracija prosječno iznosila 0,6 mg/mL_{soka}.

Tablica 4. Utjecaj parametara hladne plazme na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka})

Ispitivani parametri	n	Askorbinska kiselina
Frekvencija plazme		$p \leq 0.01^{\dagger}$
60 Hz	8	0.57 ± 0.00^a
90 Hz	8	0.70 ± 0.00^b
Vrijeme tretiranja		$p \leq 0.01^{\dagger}$
2.5 min	8	0.60 ± 0.00^a
5 min	8	0.67 ± 0.00^b
Skladištenje		$p \leq 0.01^{\dagger}$
0 dana	8	0.05 ± 0.00^a
7 dana	8	1.22 ± 0.00^b
Prosječna vrijednost	16	0.64 ± 0.00

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Vrijeme skladištenja, kao i kod sokova tretiranih ultrazvukom, značajno je utjecalo na koncentraciju vitamina C u sokovima šipka tretiranih hladnom plazmom. Rezultati pokazuju da je u sokovima 7. dan skladištenja koncentracija vitamina C iznosila 1,22 mg/mL_{soka}, dok je koncentracija na početku iznosila 0,05 mg/mL_{soka}.

4.2. Utjecaj ultrazvuka i hladne plazme u kombinaciji na stabilnost vitamina C u soku šipka

U Tablici 5A. prikazani su rezultati utjecaja kombiniranih tretmana ultrazvuka i hladne plazme na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka}). Pojedinačni izvori varijacija su dani skladištenja (nulti i 7.), vrijeme tretiranja ultrazvukom (2.5 i 5 min), amplituda ultrazvuka (75 i 100 %) te frekvencija hladne plazme (60 i 90 Hz).

Dobiveni rezultati pokazuju da frekvencija hladne plazme značajno utječe na koncentraciju vitamina C u tretiranim sokovima šipka. Prilikom tretiranja soka u nultom danu, pokazalo se da niža frekvencija plazme (60 Hz) neovisno o amplitudi ultrazvuka i vremenu tretiranja ultrazvukom utječen na značajno veće koncentracije vitamina C u sokovima šipka. Nakon sedmog dana skladištenja rezultati pokazuju da uz frekvenciju plazme i amplituda ultrazvuka značajno doprinosi stabilnosti vitamina C te su pri nižoj amplitudi (75%), neovisno o vremenu tretiranja i pri nižoj frekvenciji (60 Hz), koncentracije vitamina C u sokovima šipka

bile značajno veće u usporedbi sa sokovima tretiranim pri višoj amplitudi ultrazvuka (100%) i pri višoj frekvenciji plazme (90 Hz).

Tablica 5A. Utjecaj kombiniranih tretmana ultrazvuka i frekvencije hladne plazme na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka})

Dani skladištenja	Ultrazvuk		Hladna plazma	Askorbinska kiselina
	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Frekvencija (Hz)	
0	75	2.5	60	0.07±0.00 ^a
			90	0.06±0.00 ^b
		5	60	0.06±0.00 ^a
			90	0.05±0.00 ^b
	100	2.5	60	0.07±0.00 ^a
			90	0.06±0.00 ^b
		5	60	0.05±0.00 ^a
			90	0.04±0.00 ^b
7	75	2.5	60	1.48±0.01 ^a
			90	0.99±0.01 ^b
		5	60	1.00±0.00 ^a
			90	0.99±0.00 ^b
	100	2.5	60	0.97±0.01 ^a
			90	1.21±0.01 ^b
		5	60	0.91±0.00 ^a
			90	1.13±0.00 ^b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

U Tablici 5B. prikazan je utjecaj kombiniranih tretmana ultrazvuka i hladne plazme na koncentraciju askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka}). Pojedinačni izvori varijacija su dani skladištenja (nulti i 7. dan), vrijeme tretiranja ultrazvukom (2.5 i 5 min), amplituda ultrazvuka (75 i 100 %) te vrijeme tretiranja soka hladnom plazmom (2.5 i 5 min).

U nultom danu, dobiveni rezultati pokazuju da neovisno o amplitudi ultrazvuka i vremenu tretiranja soka ultrazvukom, dulje vrijeme tretiranje soka šipka hladnom plazmom (5 min) rezultira većim koncentracijama vitamina C u usporedbi sa sokovima kraće tretiranim hladnom plazmom (2,5 min).

Nakon sedmog dana skladištenja pokazalo se da pri nižoj amplitudi ultrazvuka (75%) i pri kraćem vremenu tretiranja soka šipka hladnom plazmom (2,5 min) dolazi do veće stabilnosti vitamina C u sokovima šipka. Obrnuto, tretiranjem sokova šipka višom

amplitudom ultrazvuka (100%) uz duže vrijeme tretiranje hladnom plazmom ostvarena je značajno veća stabilnost vitamina C u ispitivanim sokovima šipka

Tablica 5B. Utjecaj kombiniranih tretmana ultrazvuka i vremena tretiranja hladnom plazmom na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka (mg/mL_{soka})

Dani skladištenja	Ultrazvuk		Hladna plazma	Askorbinska kiselina
	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Vrijeme tretiranja (min)	
0	75	2.5	2.5	0.06±0.00 ^a
		5	5	0.07±0.00 ^b
			2.5	0.05±0.00 ^a
	100	5	5	0.07±0.00 ^b
			2.5	0.06±0.00 ^a
		5	5	0.05±0.00 ^b
7	75	2.5	2.5	1.25±0.01 ^a
		5	5	1.22±0.01 ^b
			2.5	1.00±0.00 ^a
	100	2.5	5	0.99±0.00 ^b
			2.5	1.03±0.01 ^a
		5	5	1.16±0.01 ^b
		2.5	5	0.89±0.00 ^a
		5	5	1.32±0.01 ^b

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Dobiveni rezultati pokazuju da kombinacija netoplinskih tehnika ultrazvuka i hladne plazme doprinosi dobroj stabilnosti vitamina C u sokovima šipka tijekom skladištenja.

Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da istraživanja kombiniranih netoplinskih tehnika ultrazvuka i hladne plazme na voćnim sokovima do sad nisu objavljena, stoga dobivene rezultate nije moguće usporediti sa literaturnim referencama. Ipak, rezultati istraživanja Gonzalez-Molina i sur. (2009) su pokazali da sok šipka sadrži vrlo niske koncentracije vitamina C (<6 mg/100 mL) te da uslijed skladištenja od 7 dana dolazi do gubitka od 50%.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- I. Rezultati rangiranja dobivenih rezultata svih primijenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak (svježi sok) obzirom na sadržaj askorbinske kiseline pokazuju da među tretmanima, bilo toplinskim (pasterizacija) ili netoplinskim (ultrazvuk i hladna plazma, zasebno te kombinirano), nije bilo signifikantne razlike na sadržaj askorbinske kiseline u sokovima šipka
- II. Što se tiče zasebnih tretmana ultrazvukom i hladnom plazmom, dobiveni rezultati pokazuju da tretman hladnom plazmom pridonosi većoj stabilnosti vitamina C u sokovima šipka ($c = 0,64 \text{ mg/mL}_{\text{soka}}$) u odnosu na tretman ultrazvukom ($c = 0,55 \text{ mg/mL}_{\text{soka}}$)
- III. Kombinacija netoplinskih tehnika ultrazvuka i hladne plazme doprinosi dobroj stabilnosti vitamina C u sokovima šipka tijekom skladištenja

6. LITERATURA

- Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M.M., Hu B. (2014) Qualitative assessment of sonicated apple juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN 1745-4549.
- Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M.M., Hu B., Lei S., Zhang X., Zeng X. (2013) Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* **20**: 1182–1187.
- Akhavan H., Barzegar M., Weidlich H., Zimmermann B. F. (2015) Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction. *Journal of Chemistry* **2015**: 1-7.
- Alighourch, H., Barzegar M., Abbasi S. (2008) Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology* **227**: 881–887.
- Alighourchi H. R., Barzegar M., Sahari M. A., Abbasi, S. (2013) Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant capacity of pomegranate juices. *International Food Research Journal* **20**: 1703-1709.
- Anonymus 1, <http://ibalkan.net/2016/01/11/29260/>
Pristupljeno 10. 03. 2017.
- Anonymus 2, <http://thescienceofacne.com/vitamin-c/vitamin-c-structure-2/>
Pristupljeno 27. 03. 2017.

- Bagri P., Ali M., Aeri V., Bhowmik M., Sultana S. (2009) Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* **47**: 50-54.
- Barba F.J., Brianceau S., Turk M., Boussetta N., Vorobiev E. (2015) Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food and Bioprocess Technology* **8**: 1139–1148.
- Barbosa-Canovas G. V., Pothakamury U. R., Palou E., Swanson B. G. (1998) Non thermal preservation of foods. New York: Marcel Dekker.
- Borochoy-Neori H., Judeinstein S., Harari M., Bar-Ya'akov I., Patil B. S., Lurie S., Holland D. (2011) Climate effects on anthocyanin accumulation and composition in the pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit arils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 5325–5334.
- Bursać Kovačević D., Gajdoš Kljusurić J., Putnik P., Vukušić T., Herceg Z., Dragović-Uzelac V. (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. *Food Chemistry* **212**: 323–331.
- Cerdá B., Espín J. C., Parra S., Martínez P., Tomás-Barberán F. A. (2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora in healthy humans. *European Journal of Nutrition* **43**: 205–220.
- Cravatto G., Boffa L., Genzini L., Garella D. (2010) Phytotherapeutics: An evaluation of the potential of 1000 plants. *Journal of Clinical Pharmacology* **35**: 11-4.
- Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M. (2004) Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry* **84**: 99–105.
- Di Nunzio M., Toselli M., Verardo V., Caboni M. F., Bordoni A. (2013) Counteraction of oxidative damage by pomegranate juice: influence of the cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 3565–3573.
- Du C. T., Wang P. L., Francis F. J. (1975) Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. *Journal of Food Science* **40**: 417–418.
- Dumlu M. U., Gurkan E. (2007) Elemental and nutritional analysis of *Punica granatum* from Turkey. *Journal of Medicinal Food* **10**: 392–395.
- El-Nemr S. E., Ismail I. A. Ragab, M. (1990) Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Nahrung* **7**: 601-606.
- Fernandez A., Thompson A. (2012) The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment. *Food Research International* **45**: 678-684.
- Fischer U.A., Carle R., Kammerer D.R. (2011) Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS. *Food Chemistry* **127**: 807–821.
- Fischer U.A., Carle R., Kammerer D.R. (2013) Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry* **138**: 1800–1809.

- Franke A.A., Custer L.J., Arakaki C., Murphy S.P. (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**: 1–35.
- Garofulić Elez I., Režek Jambrak A., Milošević S., Dragović Uzelac V., Zorić Z., Herceg Z. (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT—Food Science and Technology* **62**: 894-900.
- Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4581-4589.
- González-Molina E., Moreno D.A., García-Viguera C. (2009) A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry* **115**: 1364–1372.
- Grzegorzewski F., Ehlbec, J., Schlüter O., Kroh L. W., Rohn S. (2011). Treating lamb's lettuce with a cold plasma – Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. *LWT – Food Science and Technology* **44**: 2285–2289.
- Gündogdu M., Yılmaz H. (2012) Organic acid, phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars and selected genotypes. *Scientia Horticulturae* **143**: 38–42.
- Guo C., Yang J., Wei J., Li Y., Xu J., Jiang Y. (2003) Antioxidant activities of peel and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* **23**: 1719– 1792.
- Hart E. J., Henglein A. (1985) Free radical and free atom reactions in the sonolysis of aqueous iodide and formate solutions. *Journal of Physical Chemistry* **89**: 4342–4347.
- Herceg Z., Bursać Kovačević D., Gajdoš Kljusurić J., Režek Jambrak A., Zorić Z., Dragović Uzelac V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chemistry* **190**: 665–672.
- Hernandez F., Melgarejo P., Tomas-Barberan F.A., Artes F. (1999) Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology* **210**: 39–42.
- Hernandez F., Melgarejo P., Tomas-Barberan F.A., Artes F. (1999) Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology* **210**: 39–42.
- Hernandez Y., Lobo G.M., Gonzalez M. (2006) Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* **96**: 654–664.
- Jahfar M., Vijayan K.K., Azadi P. (2003) Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Research Journal of Chemistry and Environment* **7**: 43–50.
- Julie J. (2008) Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alternative Medicine Review* **13**: 123-144.
- Kabasakalis V., Siopidou D., Moshatou E. (2000) Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry* **70**: 325–328.

- Kaderides K., Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2015) A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*
- Kalaycıoğlu Z., Bedia Erim F. (2016) Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry* **221**: 496–507.
- Karasu C., Cumaoglu A., Gurpinar R. A., Kartal M., Kovacicova L., Milackova I., Stefek M. (2012) Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. *Interdisciplinary Toxicology* **5**: 15–20.
- Kennedy J. F., Rivera Z. S., Lloyd L. L., Warner F. P., Jumel K. (1992) L-ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen. *Food Chemistry* **45**: 327–331.
- Kobzev E. N., Kireev G. V., Rakitskii Yu. A., Martovetskaya I. I., Chugunov V. A., Kholodenkon V. P., Khramov M. V., Akishev Yu. S., Trushkin N. I., Grushin M. E. (2013) Effect of Cold Plasma on the E. coli Cell Wall and Plasma Membrane. *Applied Biochemistry and Microbiology* **49**: 144-149.
- Lansky E.P., Newman R.A. (2007) Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 177-206.
- LaRue J.H. (1980) Growing Pomegranates in California. University of California Division of Agricultural Sciences. Leaflet 245 9, http://ucanr.edu/sites/Pomegranates/files/1228_04.pdf Pristupljeno 21. ožujka 2017.
- Lee H.S., Coates G.A. (1999) Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chemistry* **65**: 165-168.
- Legua P., Melgarejo P., Abdelmajid H., Martínez J. J., Martínez R., Ilham H., Hafida H., Hernández F. (2012) Total phenols and antioxidant capacity in 10 Moroccan pomegranate varieties. *Journal of Food Science* **77**: 115–120.
- Levin G.M. (1994) Pomegranate (Punica granatum) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter* **97**: 31–37.
- Li X., Wasila H., Liu L., Yuan T., Gao Z., Zhao B., Ahmad I. (2015) Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chemistry* **175**: 575–584.
- Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S. (2006) Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* **96**: 254–260.
- Lye C. (2008) Pomegranate: preliminary assessment of the potential for an Australian industry. Rural Industries Research and Development Corporation of Australian Government. RIRD C publication number 08/ 153
- MacLean D., Martino K., Scherm H., Horton D. (2014) Pomegranate Production. University of Georgia Cooperative Extension Circular 997.
- Marti N., Perez-Vicente A., Garcia-Viguera C. (2001) Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**: 217-221.
- Mason T.J., Riera E., Vercet A., Buesa Lopez P. (2005) U:Emerging Technologies for Food Processing,(Sun, D.W.) *Academic Press* 323.
- McClements D.J.(1995) *Trends Food Science Technology*. **6**: 293.

- Mena P., García-Viguera C., Navarro-Rico J., Moreno D. A., Bartual J., Saura D., Martí N. (2011) Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 1893–1906.
- Mena P., Vegara S., Marti N., Garcia-Viguera C., Saura D., Valero M. (2013) Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Food Chemistry* **141**: 2122–2129.
- Miguel M.G., Neves M. A., Antunes M. D. (2010) Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review *Journal of Medicinal Plants Research* **4**: 2836-2847.
- Mirdehghan S.H., Rahemi M. (2007) Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae* **111**: 120–127.
- Misra N. N., Tiwari B. K., Raghavarao K. S. M. S., Cullen P. J. (2011) *Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens*, School of food science and environmental health, Dublin.
- Mitrush I. (1955) Druret dhe Shkurret e Shqiperise. Tirane, 242–245.
- Mousavinejad G., Emam-Djomeh Z., Rezaei K., Khodaparast M. H. H. (2009) Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry* **115**: 1274–1278.
- Negi P. S., Jayaprakasha G. K., Jena B. S. (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* **80**: 393–397.
- Negi P. S., Jayaprakasha G. K., Jena B. S. (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry* **80**: 393–397.
- Opara L.U., Al-Ani M.R., Al-Shuaibi Y. S. (2009) Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food and Bioprocess Technology* **2**: 315–321.
- Ozcal N., Dinc S. (1993) Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. *Eczacılık Fakultesi Dergisi* **22**: 21–29.
- Özkan M. (2002) Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry* **78**: 499–504.
- packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 639–644.
- Pande G., Akoh C.C. (2009) Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia- grown pomegranate cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9427-9436.
- Pérez-Vicente A., Serrano P., Abellán P., García-Viguera C. (2004) Influence of
- Poei-Langston M. S., Wrolstad R. E. (1981) Color degradation in an ascorbic acid–anthocyanin–flavanol model system. *Journal of Food Science* **46**: 1218–1236.
- Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjim za konzumaciju (2013) *Narodne novine* **48** (NN 48/2010)
- Qu W., Breksa A.P., Pan Z., Maa H. (2012) Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry* **132**: 1585–1591.

- Rajasekar D., Akoh C.C., Martino K.G., MacLean D.D. (2012) Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia. *Food Chemistry* **133**: 1383 - 1393.
- Režek Jambrak A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno biotehnoški fakultet, Disertacija, Zagreb.
- Riesz P., Berdhal D., Christman C. L.(1985) *Environmental Health Perspectives* **64**: 233–252.
- Schwartz E., Tzulker R., Glazer I., Bar-Ya’Akov I., Wiesman Z., Tripler E., Bar-Ilan I., Fromm H., Borochoy-Neori H., Holland D., Amir R. (2009) Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions’ fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9197-9209.
- Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G., Heber, D. (2005) In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **16**: 360-367.
- Shahidi E., Naczk M. (2004) Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Effects. CRC Press, Boca Raton.
- Sharma P., McClees S.F., Afaq F. (2017) Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules* **22**: 177-195.
- Shema-Didi L., Sela S., Ore L., Shapiro G., Geron R., Moshe G., Kristal B. (2012) One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: A randomized placebo-controlled trial. *Free Radical Biology & Medicine* **53**: 297–304.
- Singh R. P., Chidambara Murthy K. N., Jayaprakasha G. K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel and seed extract using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 81–86.
- Song H.P., Kim B., Choe Ho J., Jung S., Moon Se Y., Choe W., Jo C. (2009) Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* **26**: 432-436.
- Sreekumar S., Sithul H., Muraleedharan P., Azeez J.M., Sreeharshan S. (2010) Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International* **2014**: 1-12.
- Stahkas C.D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**: 3268-3295.
- Teixeira da Silva J.A., Rana T.S., Narzary D., Verma N., Meshram D.T., Ranade S.A. (2013) Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae* **160**: 85-107.
- Timoumi S., Mihoubi D., Zagrouba F. (2007) Shrinkage, vitamin C degradation and aroma losses during infra-red drying of apple slices. *LWT—Food Science and Technology* **40**: 1648–1654.
- Tiwari B. K., O'Donnell C. P., Cullen P. J. (2009) Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology* **20**: 137–145.

- Tiwari B.K., O' Donnell P.O., Patras A., Cullen P.J. (2008) Anthocyanin and Ascorbic Acid Degradation in Sonicated Strawberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 10071–10077.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2011), <http://ndb.nal.usda.gov/> Pristupljeno 23. ožujka 2017.
- Vega-Galvez A., Lemus-Mondaca R., Bilbao-Sainz C., Fito P., Andres A. (2008) Effect of air drying temperature on the quality of rehydrated dried red bell pepper (var. Lamuyo). *Journal of Food Engineering* **85**: 42–50.
- Viuda-Martos M., Perez-Alvarez J.A., Sendra E., Fernandez-Lopez J. (2013) In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process. *Journal of Food Processing and Preservation* **37**: 772-776.
- von Sonntag C., Mark G., Tauber A., Schuchmann H. P. (1999) *Advances in Sonochemistry* JAI Press: London **5**: 109-132.
- Xhuveli L. (2012) Albania, the domestication country for pomegranate (*Punica granatum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **59**: 1605–1610.
- Yun H., Kim B., Jung S., Kruk Z. A., Kim D. B., Choe W., Jo C. (2010) Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminium foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control* **21**: 1182-1186.