

Stabilnost fenolnih spojeva sokova šipka tretiranih netoplinskim tehnikama

Kresoja, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:606141>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Željka Kresoja
848/ USH

**STABILNOST FENOLNIH
SPOJEVA SOKOVA ŠIPKA
TRETIRANIH NETOPLINSKIM
TEHNIKAMA**

Ovaj rad izrađen je u okviru projekata “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) financiranih sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, višeg asistenta i dr. sc. Domagoja Gabrića, stručnog suradnika.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo koji su pomogli prilikom izrade ovog rada. Posebno i od srca zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na vodstvu, strpljenju, pristupačnosti, izdvojenom vremenu i znanju koje je prenijela prilikom izrade ovog rada. Hvala joj na znanstveno-stručnim savjetima, velikoj podršci i razumijevanju, posebice na prijateljstvu. Kažu da te učitelj uzima za ruku, otvara ti um, a dira ti srce i to je upravo ono što je moja mentorica postigla.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama, posebno Andrei i Marini, na podršci, zajedničkom učenju i zabavnim trenucima zbog kojih je tijekom studiranja protekao lakše i veselije. Zahvaljujem se Bojanu, mojoj ljubavi, na velikoj podršci za svaki postignuti uspjeh.

Na kraju, najveća HVALA mojim najmilijima, Mami, Tati i bratu Nenadu što su uz mene u svim životnim situacijama. Uz vašu bezuvjetnu ljubav, jednostavnost i podršku malo toga je neostvarivo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA SOKOVA ŠIPKA TRETIRANIH NETOPLINSKIM TEHNIKAMA

Željka Kresoja, 848/ USH

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati stabilnost ukupnih fenola i monomernih antocijana mutnih sokova od šipka tretiranih netoplinskim tehnikama te rezultate usporediti sa svježim i pasteriziranim sokovima tijekom 7 dana skladštenja na 4 °C. Sokovi od šipka tretirani su: (i) ultrazvukom uz variranje amplitude (75 i 100 %) i vremena tretiranja (2,5 i 5 min) te (ii) hladnom plazmom uz variranje frekvencije (60 i 90 Hz) i vremena tretiranja (2,5 i 5 min), kao i u kombinaciji svih ovih parametara prema punom faktorskom planu pokusa. Pasterizacija je provedena pri 90 °C/1 min. Ukupni fenoli i antocijani određeni su spektrofotometrijski. Za razliku od monomernih antocijana, pasterizacija nije značajno utjecala na stabilnost ukupnih fenola, dok su netermalne tehnike utjecale na značajno smanjenje udjela ukupnih fenola i monomernih antocijana u odnosu na pasterizirani i netretirani sok. Kombinirani tretman ultrazvuka i hladne plazme kao i tretman hladnom plazmom zasebno značajno je povoljnije djelovao na stabilnost ukupnih fenola u usporedbi sa ultrazvukom, dok su na stabilnost monomernih antocijana sve netoplinske tehnike zasebno i u kombinaciji jednako djelovale.

Ključne riječi: sok od šipka, monomerni antocijani, ukupni fenoli, ultrazvuk, hladna plazma

Rad sadrži: 53 stranica, 9 slika, 8 tablica, 105 literaturna 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: *doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Predrag Putnik, viši asistent*

dr. sc. Domagoj Gabrić, stručni suradnik

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. Izv. prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*
4. Doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić (zamjena)*

Datum obrane: 20. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE EFFECT OF NON-THERMAL TECHNOLOGIES ON THE STABILITY OF POLYPHENOLICS IN POMEGRANATE JUICE

Željka Kresoja, 848/ USH

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of non-thermal technologies on the stability of total phenols and monomeric anthocyanins in pomegranate juices and to compare results with pasteurized and non-treated juices during 7 days storage at 4 °C. Pomegranate juices were treated with ultrasound and cold plasma, separately and then in combination of both treatments. Experiment was designed to investigate the effect of ultrasound operating conditions (75 and 100 %; treatment time 2,5 and 5 min) and plasma operating conditions (60 and 90 Hz; treatment time 2,5 and 5 min) alone and in combination according to full factorial design. Pomegranate juices were pasteurized at 90 °C/1 min. Total phenolic content and monomeric anthocyanins content were spectrophotometrically determined. Obtained results revealed that pasteurization did not significantly influenced stability of total phenols, while stability of monomeric anthocyanins were lower in pasteurized than in non-treated juices. Furthermore, when applied alone, non-thermal technologies significantly reduced concentration of total phenols and monomeric anthocyanins in compare to pasteurized and non-treated juice. Ultrasound and cold plasma treatments in combinations, as well as cold plasma treatment alone, exhibited greater stability of total phenols in comparison to ultrasound treatment alone. With respect to monomeric anthocyanins stability, all non-thermal technologies, alone or in combination, significantly reduced monomeric anthocyanins stability.

Keywords: pomegranate juice, monomeric anthocyanins, total phenols, ultrasound, cold plasma

Thesis contains: 53 pages, 9 figures, 8 tables, 105 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD Predrag Putnik, postdoc*

PhD Domagoj Gabrić, Expert assistant

Reviewers:

1. PhD *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
3. PhD *Anet Režek Jambrak*, Associate Professor
4. PhD *Tomislava Vukušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 20 July 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. Fenolni spojevi šipka.....	5
2.3.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva	5
2.3.2. Flavonoidi u šipku	6
2.3.3. Fenolne kiseline u šipku	9
2.4. Sok od šipka.....	12
2.4.1. Proizvodnja soka od šipka.....	12
2.4.2. Utjecaj proizvodnje sokova na stabilnost bioloških spojeva u šipku	13
2.5. Netoplinke metode prerade.....	15
2.5.1. Ultrazvuk kao netoplinška metoda prerade	16
2.5.1.1. Primjena ultrazvuka u preradi proizvoda od šipka	17
2.5.2. Hladna plazma kao netoplinška metoda prerade	19
2.5.2.1. Primjena hladne plazme u preradi proizvoda od šipka	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Materijali.....	22
3.2. Metode rada.....	22
3.2.1. Tretiranje soka od šipka ultrazvukom visoke snage	23
3.2.2. Tretiranje soka od šipka hladnom plazmom.....	24
3.2.3. Postupak ekstrakcije.....	24
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	25
3.2.5. Određivanje monomernih antocijana	28
3.2.6. Statistička analiza	30
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1. Utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana	32
4.2. Utjecaj hladne plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana.....	34
4.3. Utjecaj kombiniranih tretmana na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana	36
4.3.1. Utjecaj amplitude i vremena tretiranja ultrazvukom te frekvencije plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana.....	36
4.3.2. Utjecaj amplitude i vremena tretiranja ultrazvukom te vremena tretiranja plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana.....	39
5. ZAKLJUČCI.....	44
6. LITERATURA.....	45

1. UVOD

Funkcionalnom hranom smatraju se namirnice koje uz osnovnu nutritivnu vrijednost imaju i pozitivan utjecaj na opće zdravlje ljudi ili sudjeluju u smanjenju rizika razvoja pojedinih bolesti. Prehrana koja uključuje redovitu konzumaciju soka od šipka povezuje se sa smanjenjem rizika kroničnih i degenerativnih bolesti poput određenih vrsta raka, kardiovaskularnih bolesti te Alzheimerove bolesti i dr. Također sok od šipka predstavlja značajan izvor vitamina C (jedna čaša soka od šipka zadovoljava 40 % preporučene dnevne doze) te fenolnih spojeva koji imaju izrazita antioksidativna svojstva. Izuzetni sastav soka od šipka, koji je bogat polifenolnim spojevima, najvećim dijelom antocijanima i hidroliziranim taninima, čini ga voćnim sokom sa najvećom antioksidacijskom aktivnosti. Brojni su znanstveni radovi dokazali da sok šipka ima značajno veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s drugim voćnim sokovima, a i veći antioksidacijski kapacitet od zelenog čaja i crnog vina. Zbog svega navedenog šipak se svrstava u kategoriju super voća, a sok šipka u kategoriju funkcionalne hrane. Sok od šipka često se dodaje u druge vrste voćnih sokova u svrhu povećanja nutritivne i biološke vrijednosti. Budući da je sezona berbe šipka kratka, a sok je podložan brzom kvarenju, nužna je termička obrada soka kako bi mu se produljila trajnost. Ovaj način očuvanja trajnosti uobičajena je metoda tretiranja voćnih sokova, iako visoke temperature uzrokuju promjenu boje soka, degradaciju antocijana, askorbinske kiseline i drugih vrijednih spojeva, što dovodi do značajnog smanjenja nutritivne i biološke vrijednosti proizvoda te narušavanja senzorskih karakteristika. U novije vrijeme, u prehrambenoj industriji postoji veliki interes za razvijanjem novih netermičkih metoda tretiranja voćnih sokova koji će očuvati što veću biološku vrijednost soka te istovremeno osigurati poželjna senzorska svojstva. Posljednjih desetak godina, kao dobra alternativa za konvencionalne postupke obrade voćnih sokova, pokazale su se netermičke metode poput ultrazvuka, hladne plazme, visokog hidrostatskog tlaka, pulsirajućeg električnog polja i drugih. Novim postupcima, od kojih se neki već komercijalno primjenjuju dok su drugi još u fazi ispitivanja, zajedničko je da se tretiranje provodi na znatno nižim temperaturama, dobivaju se proizvodi bolje kakvoće, trajanje postupaka je kraće te se postiže ušteda energije.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj ultrazvuka i hladne plazme na stabilnost biološki aktivnih spojeva u soku šipka pri čemu su određivani slijedeći parametri: (i) ukupni fenoli i (ii) monomerni antocijani.

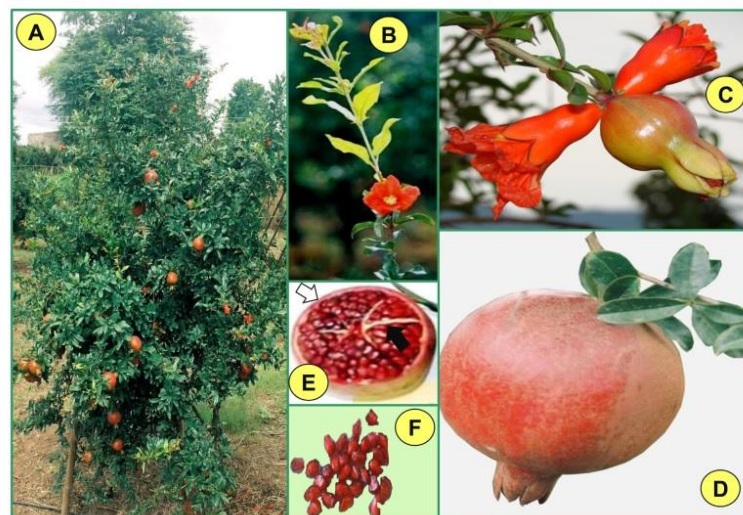
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Šipak (*Punica granatum* L.)

Šipak (*Punica granatum* L.), nar ili morganj naziv je za biljku iz reda *Myrtales*, porodice *Lythraceae* te roda *Punica*. Naziv je izveden od latinskih riječi "pomum" što znači jabuka i riječi "granatus" kao sjemenast. Smatra se da potiče iz centralnog dijela Azije, točnije sa područja današnjeg Irana, odakle se proširio ostatkom svijeta. Svrstava se među najstarije jestivo voće, a spominje se čak i u Bibliji i Kuranu. Danas se sadi diljem svijeta, prvenstveno u tropskim i subtropskim klimatskim uvjetima (Da Silva i sur., 2013).

Najveći proizvođači šipka su Mediteranske zemlje, a prate ih Azijske zemlje. Također, uzgaja se u Australiji, Južnoj Americi, južnoj Africi te u SAD-u. Godišnje se u svijetu proizvede oko dva milijuna tona šipka (Kalaycıoğlu i Erim, 2016). U našim krajevima se uzgaja na području južne Dalmacije te u pograničnim dijelovima s Hercegovinom, iako je proizvodnja mala.

Šipak je skromnih zahtjeva u uzgoju i daje visoke prinose. Raste u obliku grma visine 5 do 10 metara ili manjeg drva visine 1 do 2 metra. Ima zvonolike cvjetove crveno-šipkančaste boje, a plod je okruglog oblika, obložen korom žute, šipkančaste do crvene boje. Unutar ploda nalazi se jestivi dio voća koji čine zrna, a plod ih prosječno sadrži oko 600 (Slika 1.) (Da Silva i sur., 2013).



Slika 1. Šipak (*Punica granatum* L.): (A) grm šipka; (B) cvijet šipka; (C) plod u razvoju; (D) zreli plod šipka; (E) unutrašnjost ploda; (F) arile (Da Silva i sur., 2013)

Plod šipka konzumira se u svježem stanju, a u prehrambenoj industriji koristi se kao sirovina za proizvodnju sokova, džemova, vina i octa. Do danas je poznato 500 različitih, globalno rasprostranjenih sorti šipka, a tek oko 50 se komercijalno uzgaja (Da Silva i sur., 2013). Kemijski sastav i biološka vrijednost šipka ovise o varijetetu, geografskom položaju i klimi uzgoja te o stupnju zrelosti ploda (Kalaycıoğlu i Erim, 2016).

Proizvodna vrijednost šipka je velika radi toga što su svi dijelovi ploda (kora, arile, sjemenke), ali i pojedini dijelovi stabla, bogati biološki aktivnim spojevima, što ih osim za proizvodnju prehrambenih proizvoda čini upotrebljivima i u druge svrhe. Svi dijelovi stabla (lišće, cvjetovi, korijen) stoljećima se koriste u medicini. U Ayurvedskoj medicini koristi se kao antiparazitsko sredstvo, sredstvo za sprječavanje dijareje i ublažavanje simptoma čira na želucu. U doba antike, šipak se koristio za bojanje tekstila, dok se boja iz lišća koristila kao tinta za pisanje. Njegova vrijednost prepoznata je u kozmetičkoj industriji gdje pojedini dijelovi biljke, te ekstrakti različitih dijelova šipka, čine sastav mnogih krema za lice (Da Silva i sur., 2013).

Ovo voće je prihvaćeno kao jedinstveno zbog visokog sadržaja vitamina, polifenola i dijetalnih vlakana, te izuzetno visokog antioksidacijskog kapaciteta. Visokoj antioksidacijskoj aktivnosti pridonosi značajna količina polifenola, od kojih su u šipku i njegovu soku najzastupljeniji antocijani, elaginska kiselina, hidrolizirani tanini te mnogi drugi. Na temelju dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da je šipak voće čiji biološki aktivni spojevi mogu značajno doprinijeti prevenciji različitih bolesti. Za navedene antioksidanse iz šipka i njegova soka u brojnim se istraživanjima dokazalo kako imaju antibakterijsko, antivirusno, antikancerogeno i druga pozitivna djelovanja na zdravlje (Kalaycıoğlu i Erim, 2016).

Broj znanstvenih istraživanja o šipku, proizvodnji sokova, džemova i ostalih proizvoda dobivenih od šipka, tijekom godina se konstantno povećava. Ispituju se raznovrsne metode prerade i obrade ploda te svih njegovih dijelova u proizvode s ciljem da se najvećoj mjeri očuvaju senzorska, a osobito nutritivna i biološka vrijednost te produlji trajnost proizvoda (Da Silva i sur., 2013).

2.2. Kemijski sastav šipka

Kemijski sastav šipka uglavnom varira te ovisi o faktorima poput sorte šipka, geografskom položaju, klimi, stupnju zrelosti ploda te o načinu uzgoja, što je prikazano u Tablici 1. Plod se sastoji od kore, arila i sjemenki, od kojih se svaki dio može koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama zbog svog bogatog nutritivnog i biološkog sastava.

Arile predstavljaju jestivi dio ploda šipka, a sadrže prosječno 80 % soka i 20 % sjemenki. Sok se pak sastoji od 85 % vode i 10 % ukupnih šećera (glukoze, fruktoze, sukroze) te 1,5 % pektina, organskih kiselina (askorbinska, limunska, jabučna), masnih kiselina (konjugirana linolna, linolenska), aminokiselina (prolin, valin, metionin) i drugih bioaktivnih spojeva (Akpinar-Bayizit, 2012). Sjemenke šipka vrijedan su izvor vrlo rijetke konjugirane masne kiseline, punične kiseline (ω -5 dugolančana polinezasićena masna kiselina) koje u sastavu sjemenke ima do 20 %, a kojoj su pripisana protuupalna i antitumorska djelovanja, jer smanjuje stvaranje proupalnih prostagladnina (Grossmann i sur., 2010).

U istraživanju Al-Maiman i Ahmad (2002) dokazano je da udjel mineralnih tvari u soku također ovisi o sorti šipka te o agro-klimatskim uvjetima. Prema rezultatima ovog istraživanja, u soku, ali i sjemenkama šipka, najzastupljeniji su minerali kalij, kalcij, natrij, a prema udjelima ih prate magnezij, fosfor i željezo.

Tablica 1. Kemijski sastav jestivog dijela ploda šipka (Akpinar-Bayizit, 2012)

<i>Sastojak</i>	<i>Količina / 100 g ploda</i>
Voda	72,6-86,4 %
Proteini	0,05-1,6 %
Masti	0,01-0,9 %
Vlakna	3,4-5,0 %
Ugljikohidrati	15,4-19,6 %
Kalcij	3,0-12,0 mg
Fosfor	8,0-37,0 mg
Željezo	0,3-1,2 mg
Magnezij	9,0 mg
Vitamin C	4,0-14,0 mg

2.3. Fenolni spojevi šipka

Zahvaljujući osebujnom biološkom sastavu i visokom antioksidacijskom kapacitetu šipka i njegovih proizvoda rezultati brojnih znanstvenih istraživanja potvrdili su njihove pozitivne zdravstvene učinke, stoga je i interes potrošača za konzumacijom ovog voća i njegovih proizvoda značajno uvećan (Kalaycıoğlu i Erim, 2016). Markh i Lysoger (1973) objavili su da šipak u svom sastavu sadrži prosječno 0,22–1,05 % polifenola.

2.3.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima. Nalazimo ih u sjemenkama, pokožici voća i povrća, žitaricama, kori drveća, lišću i cvijeću, te u gotovo svim vrstama začinskog i aromatskog bilja. Njihova je uloga u biljnom tkivu raznolika, poput fiziološke uloge zaštite od UV zračenja, pigmentacije, obrambenog mehanizma spram patogena, privlačenje oprašivača i drugo. Također, važnu ulogu imaju u nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti, a u plodovima šipka, kao i soku od šipka, doprinose intenzivnom crvenom obojenju. Poznat je pozitivan utjecaj fenolnih spojeva na zdravlje zbog njihove antioksidacijske aktivnosti te sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (Corrandini i Nicoletti, 2013).

Identificirano je više od 8000 različitih struktura fenolnih spojeva u biljnom tkivu. U soku šipka Mena i sur. (2012) identificirali su preko 70 različitih spojeva, od čega su primjenom UHPLC-MSⁿ tehnike po prvi puta opisali strukture za 21 polifenolni spoj u šipku. Osnovnu kemijsku strukturu fenolnih spojeva čine 2 aromatska prstena (A i B) povezana pomoću 3 atoma ugljika, tako tvoreći treći prsten C, na koje može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Ignat i sur., 2011). Osim vezanih hidroksilnih skupina, fenoli mogu biti metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima, oligosaharidima, esterificirani i acilirani s kiselinama (Kazazić, 2004).

Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva povezuje se upravo s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala (Kazazić, 2004). Ovisno o kemijskoj strukturi, fenolni spojevi dijele se na flavonoide i fenolne kiseline. Prema rezultatima istraživanja Gómez-Caravaca (2013) u sadržaju ukupnih fenola šipka, flavonoidi su zastupljeni u udjelu od 1,6-23,6 %, a fenolne kiseline i elagitanini s udjelima 16,4 do 65,8 %. Sadržaj fenolnih spojeva u plodovima i sokovima od šipka dobro je istražen te se u Tablici 2.

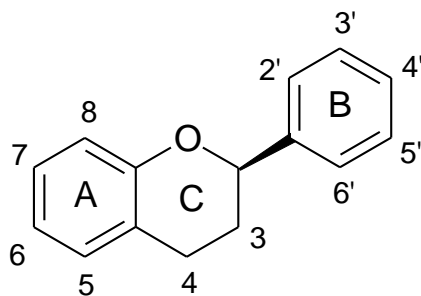
nalaze podaci o sadržaju ukupnih fenola u sokovima od šipka preuzeti iz znanstvenih radova objavljenih od 2010. do 2016. godine. Unatoč tome što sadržaj fenola u sokovima šipka značajno varira ovisno o sorti, uvjetima uzgoja i načinu prerade, može se zaključiti da je sok od šipka visokovrijedan funkcionalan proizvod (Kalaycıoğlu i Erim, 2016), koji u usporedbi sa nekim voćnim sokovima, ima i do 20 % veći antioksidacijski kapacitet (Seeram i sur., 2008).

Tablica 2. Sadržaj ukupnih fenola u sokovima šipka prema rezultatima iz znanstvenih publikacija (2010.-2016.)

Broj ispitanih sorti	Zemlja podrijetla	Ukupni fenoli (mg GAE/L soka)	Referenca
12	Iran	2960-9850	Tehrani i sur. (2010)
76	Turska	1080-9449	Çalışkan i Bayazıt (2012)
10	Maroko	410,1-834,3	Legua i sur. (2012)
18	Izrael, Španjolska, Turska, Iran, Tunis, Italija	580-2551,3	Gomez-Caravaca i sur. (2013)
18	Maroko	1385-9476	Hmid i sur. (2013)
6	Indija	876,2-1536,2	Kaur i sur. (2014)
6	Španjolska	88,5-173,2	Melgarejo-Sánchez i sur. (2015)
19	Španjolska	90-145	Legua i sur. (2016)

2.3.2. Flavonoidi u šipku

Flavonoidi su podskupina fenolnih spojeva, a do danas je identificirano više od 6400 različitih struktura. Osnovnu strukturu flavonoida čine dva hidroksibenzenska prstena (A i B) koje spaja piranski prsten (C) koji sadrži kisik (Slika 2.). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena (Macheix i sur., 1990; Harborne, 1988). Prema topljivosti dijele se na lipofilne i hidrofilne (Harborne i Baxter, 1999), a najčešće su prisutni u obliku O- i C- glikozida (Harborne, 1994). Oko 90 % flavonoida iz biljaka nalazi se u obliku glikozida. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3-, a rjeđe u položaju 7-. Šećer koji je najčešće glikozidno vezan jest glukoza, no mogu biti prisutni i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Kazazić, 2004)

Flavonoidi se ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena dijele u brojne podskupine (Harborne i Baxter, 1999):

- | | |
|------------------|------------------|
| ○ Flavonoli | ○ Flavani |
| ○ Flavoni | ○ Flavanoni |
| ○ Antocijanidini | ○ Procijanidini |
| ○ Izoflavoni | ○ Dihidrohalkoni |
| ○ Flavanoli | |

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako svi dijelovi ploda šipka, jestivi (arile) i nejestivi (kora), obiluju fenolnim spojevima. Najznačajniju skupinu fenolnih spojeva u šipku čine antocijani, hidrolizirani tanini, flavoni, flavonoli i flavan-3-oli te fenolne kiseline kao što je primjerice elaginska kiselina i njeni derivati (Sengul i sur., 2014). Kod ploda šipka 26 do 30 % ukupne mase čini kora, koja je također izuzetno bogata fenolnim spojevima poput flavonoida (antocijani, katehini i drugi) i hidroliziranih tanina (punikalagin, elaginska kiselina i drugi). Ovi spojevi većinom su koncentrirani u kori ploda, ali nalazimo ih i u soku šipka te kao takvi doprinose s 92 % ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti šipka (Ismail i sur., 2012).

Zanimljivo je da je ruski travar G. I. Glubokov 1996. godine patentirao lijek od osušene kore šipka kojim se uspješno liječe stanja poput dijareje, salmoneloze, čira na želucu, disbakterioze crijeva te kolitis. U procesu liječenja koristi se uvarak od suhih kora šipka u omjeru 1:20 te se isti ispija svaki drugi dan tijekom 7 dana (Anonymus 1, 2014).

Antocijani (Slika 4. (A)) predstavljaju od 20 do 82 % ukupnog fenolnog sastava u sokovima od šipka (Bursać Kovačević i sur., 2016), a ujedno su odgovorni za njihovu intenzivnu crvenu boju (Alighourchi i sur., 2008). To su vrlo osjetljivi i nestabilni spojevi te njihovu stabilnost narušavaju brojni čimbenici poput uvjeta prerade, pH, temperature, svjetla, prisutnosti različitih i drugih fenolnih spojeva, iona metala, šećera, askorbinske kiseline,

kisika i dr. (Turfan i sur, 2011). U biljkama, pa tako i u šipku, nalazimo ih u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer. Najčešći šećer koji se pojavljuje je glukoza, a ona povećava topljivost i kemijsku stabilnost antocijana (Jackson, 2008). Od antocijanidina, u soku šipka uglavnom su zastupljeni cijanidini i delfinidini, a za njihovu nestabilnost odgovorna je njihova nukleofilna kemijska struktura (Bursać Kovačević i sur., 2016). Prema istraživanju Alighourchi i Barzegar (2009) veću stabilnost pokazuju antocijani u obliku diglukozida u odnosu na monoglukozide. U istraživanju Vegara i sur. (2014) u soku šipka najveći udio imao je cijanidin-3-glukozid (60,43 mg/L), a najmanji udio pelargonidin-3,5-diglukozid (2,19 mg/L). Casano i suradnici (2011) odredili su u soku šipka najveći udio cijanidin-3,5-diglukozida (46,95 mg/100 mL), a najmanji udio pelargonidin-3,5-diglukozida (5,0 mg/100 mL). U radu Cam i sur. (2009) određeno je u sokovima, dobivenim iz osam sorti šipka, da sadržaj antocijana varira u širokom rasponu između 8,1 i 36,9 mg/100 mL ukupnih antocijana. Da sadržaj antocijana u sokovima šipka izravno ovisi o tipu sorte potvrdili su i Mousavinejad i sur. (2009). Rezultati ovog istraživanja navode da su u sokovima šipka najzastupljeniji antocijani delfinidin-3,5-diglukozid (372-5301 mg/mL) i cijanidin-3,5-diglukozid (242-2361 mg/mL), a potom delfinidin-3-glukozid (49-1042 mg/mL) i pelargonidin-3,5-diglukozid (7-90 mg/mL). Pregled sadržaja ukupnih antocijana prema rezultatima iz znanstvenih publikacija od 2009. do 2016. dat je u Tablici 3.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih antocijana u sokovima šipka prema rezultatima iz znanstvenih publikacija (2009.-2016.)

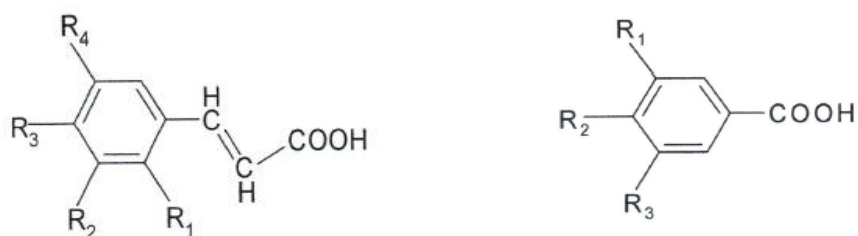
Broj ispitanih sorti	Zemlja podrijetla	Ukupni antocijani (mg/L soka)	Referenca
8	Iran	2380-9300	Mousavinejad i sur. (2009)
7	Turska	81-369	Çam i sur. (2009)
8	Čile	168-1328	Sepúlveda i sur. (2010)
9	Tunis	11-178	El Kar i sur. (2011)
15	Španjolska	34-1075	Mena i sur. (2011)
1	Hrvatska	152.26 ± 11.34	Bursać Kovačević i sur. (2016)

Osim antocijana, plod šipka i sok šipka sadrže i druge spojeve iz skupine flavonoida kao što su flavan-3-oli (katehin, epikatehin, epigalokatehin i njihove derivate) koji su prisutni samo u aglikonskom obliku, te flavone i flavonole (Wang i sur., 2010). U istraživanju Cuccioloni i sur. (2009) utvrđeno je da su katehin (Slika 4.(B)), epikatehin i elaginska kiselina

najzastupljeniji flavonoidi u endokarpu i mezokarpu šipka, u udjelima od 2,8-6,28 i 8,54-15,36 g/100 g suhog ekstrakta. Katehin i epikatehin nisu pronađeni u arilama šipka, dok je elaginska kiselina pronađena u svim dijelovima šipka, no u nižim koncentracijama u soku (Cuccioloni i sur., 2009).

2.3.3. Fenolne kiseline u šipku

Obzirom na razliku u kemijskoj strukturi, fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve C₆-C₁ i hidroksicimetne kiseline (C₆-C₃) te njihove derivate. Razlika u strukturi posljedica je stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Slika 3.) (Macheix i sur., 1990).



Slika 3. Kemijske strukture hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (Macheix i sur., 1990)

Hmid i sur. (2013) potvrdili su prisustvo nekoliko fenolnih kiselina u soku šipka, poput hidroksibenzojevih, elaginske i galne te hidroksicimetnih, kafeinske i ferulinske. Uz navedene, Herceg i sur. (2016) u soku šipka identificirali su još i protokatehinsku, klorogensku te *p*-kumarinsku kiselinu.

Elaginska kiselina (Slika 4.(D)) je dimerni derivat galne (hidroksibenzojeve) kiseline koja se nalazi u biljnim vakuolama u tri oblika: 1) u slobodnoj formi kao elaginska kiselina; 2) u obliku derivata elaginske kiseline; 3) vezana kao vodotopljivi elagitanin (Amakura i sur., 2000). Elaginska kiselina ima jako antioksidacijsko djelovanje zbog prisutnosti više hidroksilnih skupina i svoje kemijske građe te može donirati elektron s vodikovog atoma i neutralizirati slobodne radikale (Nicoli i sur., 1999). Osim antioksidacijskog, dokazano je i antikancerogeno djelovanje, odnosno sprječavanje rasta tumorskih stanica na način da inducira apoptozu te inhibira proliferaciju tumorskih stanica (Ismail i sur., 2012).

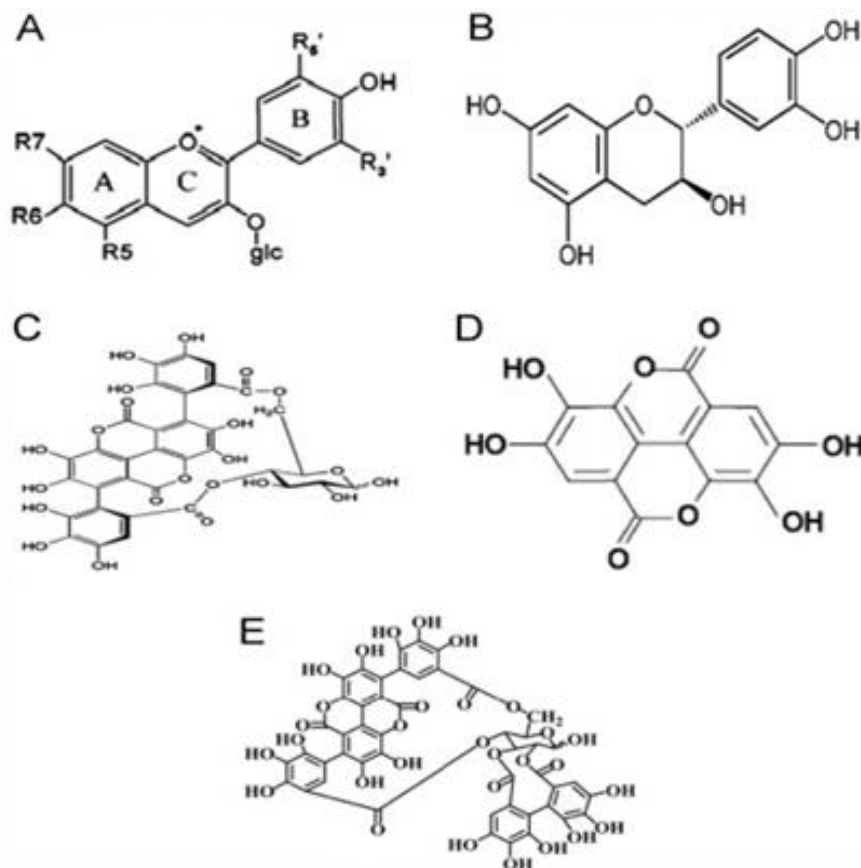
Elaginska kiselina je jedan od najvažnijih spojeva u kori šipka (Tehranifar, 2011), zastupljena je u svim dijelovima ploda šipka, a u soku arila nalazi se u nešto nižim koncentracijama (Cuccioloni i sur., 2009). Herceg i sur. (2016) navode da

elaginske kiseline u svježem soku šipka ima prosječno 20,81 mg/L soka, dok je galna zastupljena u nešto višoj koncentraciji te iznosi 22,87 mg/L.

U već ranije spomenutom radu, Hmid i sur. (2013) su odredili u soku dobivenom iz arila, prisutstvo elaginske kiseline s prosječnim vrijednostima između 70,4 mg/L i 95 mg/L soka. Slične rezultate u svom istraživanju potvrdili su Mousavinejad i sur. (2009), koji navode da u svježem soku od arila, koncentracija elaginske kiseline iznosi prosječno od 7 do 160 mg/L soka. U sjemenkama šipka određeni su i derivati elaginske kiseline poput: 3,3'-di-O-metilelaginske kiseline i 4,4'-di-O-metilelaginske kiseline (Gil i sur., 2000).

Punikalagini (Slika 4.(E)) su kompleksni derivati elaginske kiseline i pripadaju skupini hidroliziranih tanina tako da se nazivaju i elagitaninima (Landete, 2011). Elagitanini su velika skupina polifenolnih spojeva i spadaju u skupinu hidroliziranih tanina. Osim u šipku, elagitanini su naširoko prisutni i u drugom voću, orašastim plodovima, sjemenkama (Xie i sur, 2013). Od svih poznatih postojećih elagitanina, u šipku je najzastupljeniji punikalagin te punikalina (Slika 4.(C)) (Zhang i sur., 2009).

Kora šipka obilan je izvor punikalagina i punikalina, a u arilama ih nema ili su prisutan u vrlo niskim koncentracijama. Komercijalno prisutni sokovi šipka uglavnom sadrže srednje do visoke koncentracije punikalagina što je rezultat razlike u preradi soka i promjena tijekom skladištenja (Vegara i sur., 2014), odnosno vjerojatno vodotopljivi punikalagini tijekom mehaničkog prešanja ploda, prelaze iz kore u sok. Herceg i sur. (2016) u svom su istraživanju u svježem soku šipka odredili prosječne koncentracije dvaju derivata punikalagina, punikalagin 1 i 2 u vrijednosti od 8,66 mg/L. Mena i sur. (2011) su odredili da u soku šipka sadržaj ukupnih punikalagina varira između 1,4 do 44 mg/L soka, a sadržaj elaginske kiseline i derivata od 3,6 do 153 mg/L soka, dok su Vegara i sur. (2014) u soku dobivenom iz tri različite sorte šipka odredili sadržaj punikalagina u vrijednostima od 503,70 do 762,85 mg/L soka te elaginsku kiselinu u koncentracijama od 268,67 do 389,64 mg/L soka.



Slika 4. Kemijske strukture najvažnijih fenolnih spojeva u šipku (A) antocijani; (B) katehini; (C) punikalin; (D) elaginska kiselina; (E) punikalagin (Ismail i sur., 2012)

Galna kiselina, elaginska kiselina i punikalagin posjeduju antibakterijska svojstva, a posebno utječu na enterogene bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, ali i *Vibrio cholerae* (Ismail i sur., 2012). Osim antibakterijskog, poznat je antikancerogeni, antiviralni i anti-alergijski učinak te protektivno djelovanje na probavni i imuno sustav (da Silva i sur., 2013). Zbog gore navedenih karakteristika šipka i njegova soka, te sve veće osvještivosti o važnosti uravnotežene i raznolike prehrane, proteklih godina interes za kupnjom i konzumacijom soka šipka se povećava.

2.4. Sok od šipka

2.4.1. *Proizvodnja soka od šipka*

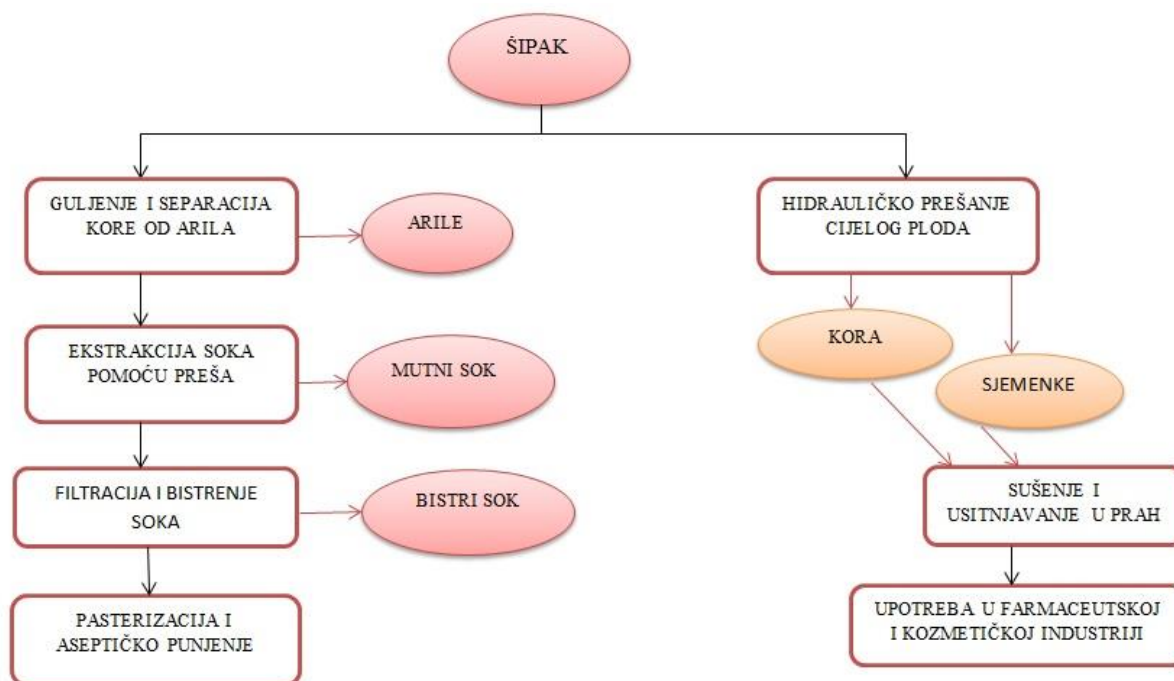
Proizvodnja voćnih sokova predstavlja perspektivnu granu prehrambene industrije sa trendom stalnog porasta, a voćni sokovi mogu se opisati kao polidisperzni sustavi koji se međusobno razlikuju po veličini čestica voćnog tkiva i njihovoj topljivosti u vodi sa prosječnim sadržajem topljive suhe tvari od oko 11 % (Ashurst i Hargitt, 2009).

Prema važećoj zakonskoj regulativi u Republici Hrvatskoj voćni sok proizvodi se od jestivog dijela voća koje je zdravo, svježe ili konzervirano hlađenjem ili smrzavanjem i to od jedne ili više vrsta pomiješanih zajedno, a pri tom ima boju, aromu i okus karakterističan za sok od voća od kojega potječe (Pravilnik NN 48/13).

Shematski prikaz proizvodnje soka od šipka prikazan je na Slici 5. Sok od šipka može se proizvesti prešanjem cijelog ploda šipka ili na način da se prije ekstrakcije, arile separiraju od kore u posebnim uređajima. Slijedeći korak je ekstrakcija soka pomoću mehaničkih ili hidrauličkih, odnosno najčešće membranskih preša te se tada dobiva mutni sok. Sok od šipka sadrži u manjoj količini i koloidne pektinske tvari, kao i proteine, stoga se najčešće podvrgava bistrenju i filtraciji jer bi tijekom skladištenja moglo doći do zamućenja. Postupak bistrenja također doprinosi i boljim senzorskim obilježjima soka, obzirom na visok sadržaj tanina, koji se uslijed bistrenja smanjuje (Vardin i sur., 2003). Iz soka koji je prošao bistrenje moguće je još proizvesti i ocat, vino, džem, koncentrirani sok ili nektar od šipka, a još jedan novi popularni 'ready-to-eat' proizvod su arile, očišćene od kore, pakirane u modificiranoj atmosferi. Po završetku bistrenja i filtracije sok se termički obrađuje pasterizacijom te se aseptički puni u odgovarajuću ambalažu (Slika 5.) (Dhinesh i Ramasamy, 2016). U svrhu uklanjanja suspendiranih i koloidno dispergiranih čestica za sok od šipka najčešće se koriste membranski procesi mikrofiltracije (MF), dok se za separaciju koloida i makromolekula relativne molekularne mase veće od 500 koriste procesi ultrafiltracije (UF) (Girard i sur., 2000). Voćni sokovi konzerviraju se isključivo fizičkim postupcima primjenom visokih temperatura tj. pasterizacijom. Pasterizacijom s temperaturama od 75 do 100 °C u kratkom vremenskom intervalu uništavaju se vegetativni oblici mikroorganizama i inaktiviraju enzimi, a sastav, okus i prehrambena vrijednost namirnice ostaju nepromijenjeni.

2.4.2. Utjecaj proizvodnje sokova na stabilnost bioloških spojeva u šipku

Alper i sur. (2005) ispitivali su utjecaj pasterizacije na kvalitetu različitih sokova od šipka, pa se tako pasterizacijom udio ukupnih antocijana umanjio za 13,1 % u mutnom te za 19,8 % u filtiranom soku od šipka. U radu Turfan i sur. (2011) ispitivan je utjecaj procesa bistrenja i pasterizacije na boju soka od šipka i sadržaj antocijana. Bistrenje je uzrokovalo gubitak od 4 %, dok je pasterizacijom gubitak antocijana iznosio od 8 do 14 %. Ipak, bistrenje soka doprinijelo je povećanju parametara boje (L, a, b, C), a pasterizacija ih je očekivano znatno umanjila.



Slika 5. Shematski prikaz proizvodnje soka od šipka (Dhinesh i Ramasamy, 2016)

Vegara i sur. (2013a) ispitivali su utjecaj bistrenja i pasterizacije na stabilnost antocijana u soku od šipka. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da se bistrenjem sadržaj monomernih antocijana smanjuje, ali da istovremeno raste antioksidacijski kapacitet soka. Pasterizacija pri 65 °C/30 s i 90 °C/5 s značajno smanjuje udio polimernih, ali povećava udio monomernih antocijana. Autori su potvrdili da je ipak temperatura skladištenja najznačajniji faktor koji utječe na stabilnost antocijana u soku od šipka (Vergara i sur., 2013b). Sokovi šipka skladišteni 7 dana na 25 °C značajno su brže promijenili boju tijekom skladištenja u usporedbi sa sokovima skladištenim pri 5 °C. Općenito, uz hladni režim skladištenja (do 5 °C), sokovi tretirani pri nižim temperaturama (65 °C/30 s i 90 °C/5 s)

pokazuju dobru mikrobiološku stabilnost tijekom 120 dana skladištenja što potvrđuje da se „konzerviranjem preprekama“ (toplinski tretman uz hladni lanac čuvanja) može produžiti trajnost proizvoda.

Mena i sur. (2013) ispitivali su utjecaj različitih toplinskih tretmana (65, 80 i 90 °C tijekom 30 i 60 s) soka od šipka na stabilnost boje, biološki aktivnih spojeva te mikrobiologiju. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da pasterizacija značajno ne utječe na sadržaj ukupnih fenola, punikalagina i elaginske kiseline u soku od šipka, dok se sadržaj antocijana kao i antioksidacijski kapacitet značajno smanjio u odnosu na netretirane sokove. Sukladno tome, u tretiranim sokovima izmjerene su više a^* te niže b^* vrijednosti parametara boje. Nadalje, toplinski tretman (65 °C/30 s) soka od šipka uz skladištenje pri niskim temperaturama pokazao se učinkovit u inaktivaciji mikroorganizama te bi se kao takav mogao koristiti u svrhu konzerviranja preprekama.

Vegara i sur. (2014) istraživali su stabilnost antocijana tijekom prerade i skladištenja komercijalnih sokova od šipka te su utvrdili da je sadržaj antocijana u svježem neprerađenom soku iznosio $159,05 \pm 71,07$ mg/L, dok se preradom i skladištenjem značajan dio antocijana gubi te u konačnici udio iznosi svega $58,50 \pm 17,13$ mg/L. Industrijski faktori koji utječu na stabilnost antocijana uključuju različite tehnološke operacije u preradi soka te temperaturu skladištenja, kemijsku strukturu antocijana, pH, količinu askorbinske kiseline, šećera, svjetla i metala (Cavalcanti i sur., 2011).

Sok šipka bogat je antocijanima, derivatima elaginske kiseline kao i hidroliziranim taninima, a rezultati istraživanja potvrđuju da je antioksidacijski kapacitet soka od šipka veći ukoliko je sok proizveden od cjelovitog ploda, a ne samo od zrna. Ispitivanjem korejskog tržišta utvrđeno je da od ispitivana 62 različita voćna soka, najčešće konzumirana od strane potrošača, sok od šipka pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet (Kim i sur., 2014). Nadalje, sok od šipka pronašao je svoju primjenu i kao sredstvo za poboljšanje boje raznih prehrambenih proizvoda (Al-Maiman i Ahmad, 2002). U novije vrijeme ispituje se i primjena suvremenih metoda sušenja soka od šipka poput sušenja raspršivanjem gdje se upotrebom različitih nosača (npr. arapske gume i CapsulaTM=1:1) dobiju stabilni i nutritivno visokovrijedni prahovi ovog soka koji se kao takvi dalje mogu upotrebljavati u proizvodnji funkcionalne hrane (de Araujo Santiago i sur., 2016).

U prehrambenoj industriji, kod proizvodnje soka od šipka, kora čini najveći dio otpada. Ekstrakti dobiveni iz kore mogu se koristiti za dobivanje funkcionalnih proizvoda. Tako se u znanstvenom radu Salgado i sur. (2012) pokazalo da dodatak od 0,5 % ekstrakta kore, poboljšava antioksidacijski kapacitet drugih sokova, kao što su sok od rajčice i sok od

šipka. Primjer još jednog takvog proizvoda je sladoled u koji su dodani mikroinkapsulirani fenolni spojevi izolirani iz kore šipka (elaginska kiselina, punikalagin) (Cam i sur., 2014). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da dodatak 0,5 do 1 % fenolnih spojeva u sladoled je u odnosu na kontrolni uzorak imao značajno veću antioksidativnu aktivnost, a senzorska svojstva takvog funkcionalnog proizvoda su ostala nepromijenjena (Cam i sur., 2014).

2.5. Netoplinske metode prerade

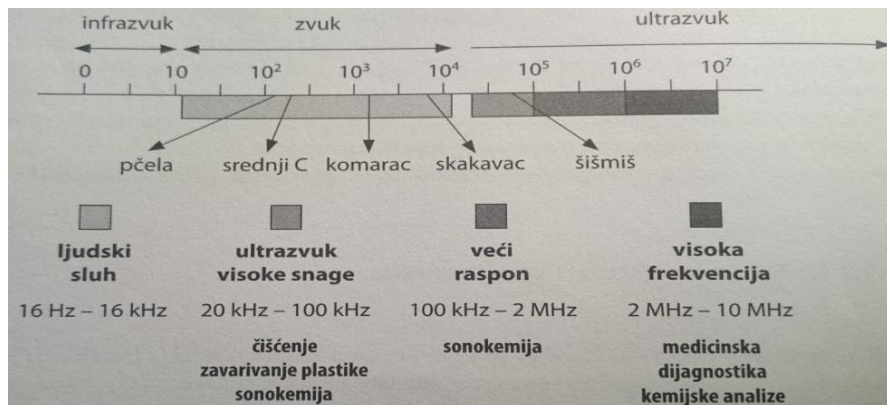
U posljednje vrijeme mnoga se istraživanja usmjeravaju na razvoj novih postupaka obrade hrane koji omogućuju minimalnu obradu hrane sa ciljem dobivanja proizvoda visoke nutritivne i biološke vrijednosti. Istovremeno, nove sklonosti potrošača, okrenutih prema organskoj i prirodnoj te minimalno prerađenoj hrani nameću nove izazove i znanstvenicima i prehrambenoj industriji te tako otvaraju put razvoju i implementaciji najnovijih tehnologija, kao što su netoplinske metode prerade, tehnologija konzerviranja preprekama (engl. *hurdles technology*), mikroenkapsuliranje, bioprocene tehnologije itd. U netoplinske metode prerade ubraja se primjena visokog tlaka, pulsirajućeg električnog polja i svjetlosti visokog intenziteta, promjenljivog magnetskog polja, ultrazvuka, hladne plazme, ionizirajućeg zračenja, i dr. Cilj navedenih postupaka je dobivanje proizvoda veće nutritivne vrijednosti i produžene trajnosti, a trajanje tehnoloških postupaka je kraće te se postiže ušteda energije u usporedbi sa dosadašnjim konvencionalnim metodama. Ipak, zajedničko svim navedenim postupcima je da se tretiranje proizvoda provodi na sobnoj temperaturi, odnosno dolazi do neznatnog povišenja temperature, te sam proces traje kratko vrijeme (Herceg i sur., 2009).

2.5.1. Ultrazvuk kao netopliniska metoda prerade

Za preradu hrane ultrazvukom postoji veliko zanimanje jer je prijenos akustične energije do prehrambenog proizvoda trenutačan i prostire se kroz cijeli volumen proizvoda. Navedena činjenica znači skraćanje vremena tretiranja proizvoda i manja potrošnja energije. Ultrazvuk se često koristi u laboratorijskim uvjetima, a u industrijskim se primjenjuje pri emulgiranju, inaktivaciji mikroorganizama i enzima, ubrzavanju kemijskih reakcija, pospješivanju procesa ekstrakcije i sl. (Herceg i sur., 2009).

Pod ultrazvukom podrazumijevamo zvučni val sa frekvencijama višima od praga osjetljivosti ljudskog uha (16–18 kHz) (Slika 6.). Ultrazvuk u prehrambenoj industriji općenito se može podijeliti prema upotrijebljenim rasponima zvuka na: (i) dijagnostički ultrazvuk – ultrazvučni valovi niskog intenziteta (frekvencije 1 do 10 MHz), odnosno visoke frekvencije i niske energije i (ii) ultrazvuk visoke snage – ultrazvučni valovi visokog intenziteta (frekvencije 20 do 100 kHz), odnosno niske frekvencije i visoke snage. Ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji prolaze, a primjenjuje se u analitičke svrhe određivanja sastava, strukture i viskoznosti hrane. Također, može se rabiti i za površinsko čišćenje hrane, emulgiranje, pospješivanje ekstrakcije, filtraciju itd. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta, zbog velike snage kojom djeluju na materijal, uzrokuju fizička oštećenja materijala, ubrzavanje reakcija, a može se koristiti i za uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009).

Važna pojava, tijekom tretiranja tekućeg materijala ultrazvukom je kavitacija. Kavitacija znači nastajanje mjehurića pare unutar tekućine u području u kojemu je tlak tekućine manji od tlaka njene pare. Djelovanjem ultrazvuka niskog inteziteta nastaje tzv. stabilna kavitacija, odnosno mjehurići vibriraju unutar stabilne kavitacije uzrokujući jaka mikrostrujanja u tekućem mediju. Zbog prolaska ultrazvuka visokog intenziteta kroz tekući medij, nastaje tzv kratkotrajna ili prijelazna kavitacija. Kod ove pojave veličina mjehurića snažno oscilira i povećava se, sve dok ne dođe do implozije mjehurića (Herceg i sur., 2009).



Slika 6. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

Osim kavitacije, tijekom prolaska ultrazvuka kroz kranu mogući su i drugi učinci poput zagrijavanja. Zagrijavanje nastaje kao rezultat snažnog sudaranja molekula oko mjehurića (implozije) te nastaju "mikropodručja" sa ekstremno visokom temperaturom i tlakom. No zbog malog volumena zagrijane tekućine u odnosu na ukupni volumen, navedene točke brzo nestaju. Još neki od mogućih pojava tijekom tretiranja uzroka sa ultrazvukom su: kompresija i širenje, turbulencija i strukturne promjene (Herceg i sur., 2009).

Jedan od najzanimljivijih područja za hranu je ultrazvuk visokog intenziteta sa niskim frekvencijama. Mikroorganizmi i enzimska inaktivacija zvučnim valovima u kombinaciji s temperaturom, tlakom i drugim čimbenicima očuvanja hrane pokazali su pozitivne učinke. Dodatna prednost proizvoda prerađenih ultrazvukom su pozitivne promjene u teksturi, prinosu i očuvanje boje. Primjena ultrazvuka pruža mogućnost korištenja za pasterizaciju proizvoda poput mlijeka, voćnih sokova i drugih tekućih namirnica (Feng i sur., 2011).

2.5.1.1. Primjena ultrazvuka u preradi proizvoda od šipka

Dosadašnja istraživanja primjene ultrazvuka u proizvodnji voćnih sokova pokazuju minimalan utjecaj na senzorska svojstva sokova i na bioaktivne komponente poput vitamina C, fenola, antocijana i drugih (Abdullah i Ling Chin, 2014). Istraživanja su dokazala da upotreba ultrazvuka u proizvodnji voćnih sokova: (i) povećava prinos soka (Lieu i Le, 2010); (ii) ne utječe na smanjivanje sadržaja askorbinske kiseline (Abid i sur., 2014); (iii) ne utječe na promjenu boje soka (Dubrović i sur., 2011) i (iv) inaktivira enzime koji utječu negativno na promjenu boje soka (Wu i sur., 2008). U istraživanju Dubrović i sur. (2011) sok od jagode tretiran je ultrazvukom pri zadanim uvjetima (20 kHz, 40 °C/3 min, 12 mm

promjera sonde) te rezultati pokazuju da ultrazvuk nije imao utjecaja na boju soka, a 98 % sadržaja ukupnih antocijana se zadržalo u soku nakon tretmana.

Alighourchi i sur. (2013) ispitali su utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih antocijana, ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet u soku od šipka te su utvrdili da se sadržaj antocijana povećao za 0,44 do 7,32 %, a ukupni fenoli za 5,4 do 42,52 % pri amplitudi 100 %, vremenu tretiranja 9 min i promjeru sonde 19 mm.

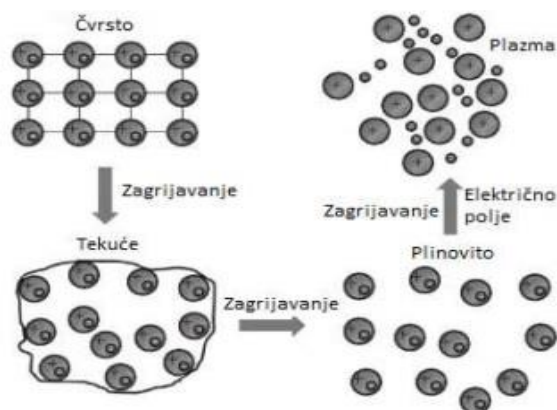
Porast ukupnih fenola u soku od grožđa tretiranim ultrazvukom (28 kHz, 20 °C, 30 - 90 min), dokazali su Aadil i sur. (2013) te se pretpostavlja da je mogući razlog toga pucanje staničnih stijenki uslijed kavitacije. Tiwari i sur. (2009) pokazali su da tretiranje soka od kupina ultrazvukom rezultira zadržavanjem 95 % ukupnih antocijana u soku. Uvjeti tretiranja soka od kupina bili su sljedeći: frekvencija 20 kHz, vrijeme 10 min, amplituda 100 % te 19 mm promjer sonde (Tiwari i sur., 2009). Istraživanje Pala i sur. (2015) također ukazuje na zadržavanje 89 do 92 % ukupnog sadržaja monomernih antocijana nakon tretmana ultrazvukom u soku od šipka pri amplitudi 50 % i vremenu tretiranja do 30 min i amplitudama 75 i 100 % do 18 min te promjeru sonde 19 mm. Nakon tretiranja dužim od 18 min pri navedenim uvjetima utvrđen je značajan gubitak antocijana (Pala i sur., 2015), a pretpostavlja se da do toga dolazi uslijed kavitacije i nastanka slobodnih radikala (Tiwari i sur., 2009). U istom istraživanju i pri jednakim uvjetima tretiranje soka od šipka ultrazvukom nije imalo značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola (Pala i sur., 2015).

Prednosti primjene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su prepoznate jer skraćuju trajanje postupka, smanjuje se potrošnja energije i kemikalija u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju te su dobiveni veći prinosi punikalagina i elaginske kiseline iz ekstrakta kore šipka (Kazemi i sur., 2016). Kaderides i sur. (2015) dokazali su da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom povećava prinos ukupnih fenola iz ekstrakta kore šipka, no još važnije da trajanje postupka je kraće i više od 20 puta u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju. Pan i sur. (2012) u svom istraživanju usporedili su primjenu konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute pulsirajućim i kontinuiranim ultrazvukom na ekstrakt dobiven od suhe kore šipka te rezultati pokazuju da primjena ekstrakcije potpomognute pulsirajućim ultrazvukom (5 s tretiranje, 5 s pauza) je povećala antioksidacijski kapacitet za 22 %, dok se trajanje postupka smanjilo za 87 %. Ekstrakcija potpomognuta kontinuiranim ultrazvukom također je dala veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi sa konvencionalnom ekstrakcijom, no pulsirajućim ultrazvukom je potrošnja energije bila 50 % manja (Pan i sur., 2012). Slične rezultate u svom radu dobili su Lantzouraki i sur. (2015) te dokazali kako ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je rezultirala većim antioksidacijskim kapacitetom u odnosu na

primjenu konvencionalne ekstrakcije na soku od šipka, dok se koncentracija ukupnih fenola u istim uvjetima nije bitno promijenila.

2.5.2. Hladna plazma kao netoplinska metoda prerade

Plazma se smatra jednim od četiri osnovna stanja tvari, pri čemu su ostala tri čvrsto, tekuće i plinovito. Jednako kao i plin, nema definirani oblik ili volumen, osim ako nije zatočena u određenom spremniku (Chu i Lu, 2014), a sastoji se od slobodnih elektrona, pozitivnih iona i neutralnih čestica (Schlüter, 2013). Dovođenjem topline krutoj tvari, povećava joj se kinetička energija, dolazi do razaranja temeljne strukture krute tvari, te pri temperaturi tališta, prelazi u tekućinu. Daljnjim zagrijavanjem takvog sustava, tekućina prelazi u plin pri temperaturi vrelišta, a molekule u plinu se razdvajaju na atome (disociraju) primjenom jako visoke energije poput električnog pražnjenja, te tada nastaje plazma. Plazma se, dakle, može stvoriti zagrijavanjem plina, a djelovanjem topline na materiju odvija se prijelaz stanja vidljiv na Slici 7. (Chu i Lu, 2014).



Slika 7. Prikaz prijelaza stanja materije primjenom topline (Chu i Lu, 2014)

Budući da se plazma sastoji od elektrona, pozitivnih iona i neutralnih čestica, moguće ju je opisati prema više kriterija, i to prema temperaturi, stupnju ionizacije, termodinamičkoj ravnoteži i drugim faktorima (Chu i Lu, 2014). Prema temperaturi pri kojoj se primjenjuju, plazme se dijele na hladne i vruće. Za vruću plazmu se kaže da se nalazi u stanju termodinamičke ravnoteže, a to znači da je temperatura svih čestica (iona, elektrona i neutralnih čestica) u plazmi jednaka. Koristi se još izraz lokalna termodinamička ravnoteža (eng. *LTE – local thermodynamic equilibrium*). Suprotno vrućoj plazmi, kod hladne plazme temperatura elektrona mnogo je viša od temperature iona i neutralnih čestica pa se još i naziva

netermalna, odnosno neravnotežna plazma (eng. *non-local thermodynamic equilibrium plasma*). Temperatura elektrona može iznositi i nekoliko desetaka tisuća Kelvina, no teže čestice ostaju na sobnoj temperaturi. Stoga je temperatura ovih plazmi nerijetko samo malo viša od sobne temperature (Ercegović Ražić i Čunko, 2009). S obzirom na tlak neutralnog plina u kojem se kreću ionizirane čestice u odnosu na atmosferski tlak, plazmu možemo podijeliti u skupine: (1) niskotlačnih, (2) visokotlačnih i (3) plazme atmosferskog tlaka (Rahman i sur., 2014). U niskotlačnoj plazmi, zbog male gustoće, srednji slobodni put čestica je kratak i sukladno tome je frekvencija sudara izuzetno niska, gotovo zanemariva. Koriste se u proizvodnji poluvodiča (Chu i Lu, 2014).

U prehrambenoj industriji se ova tehnika sve više primjenjuje, a o njenim mogućnostima primjene provode se mnoga istraživanja. Do sada je prepoznata njena visoka učinkovitost u inhibiciji ili inaktivaciji mikroorganizama, pogotovo suha dezinfekcija površine hrane poput svježeg voća i povrća ili mesa, gdje su toplinske metode neprimjenjive. Ova tehnologija je također uspješno primijenjena za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala (Schlüter, 2013).

2.5.2.1. Primjena hladne plazme u preradi proizvoda od šipka

U proizvodnji voćnih sokova, dobro je poznata činjenica da pasterizacija narušava senzorska i nutritivna svojstva konačnih proizvoda dok bi niže temperature (niže od 70 °C) tretiranja hladnom plazmom mogle doprinijeti očuvanju biološki aktivnih spojeva, a u isto vrijeme osigurati mikrobiološku sigurnost. Primjena hladne plazme u proizvodnji voćnih sokova predstavlja tehniku koja služi za osiguranje mikrobiološke sigurnosti, no i smanjenje degradacije polifenola. Kao takva, prepoznata kao potencijalna netermalna tehnologija za unaprjeđenje kvalitete voćnih sokova (Elez Garofulić i sur., 2015).

U istraživanju Herceg i sur. (2016), uspoređivao se udio fenolnih spojeva u soku od šipka koji je bio tretiran klasičnom pasterizacijom (80 °C/2 min) i hladnom plazmom. Rezultati su pokazali da je na udio fenolnih spojeva u soku od šipka pozitivno utjecala i pasterizacija kao i tretman hladnom plazmom. U usporedbi s netretiranim sokom, uslijed pasterizacije, udio fenolnih spojeva porastao je za 29,55 %, dok je uslijed tretmana hladnom plazmom taj porast iznosio od 14,95 do 48,99 %. Porast sadržaja fenola uslijed porasta temperature već je ranije zabilježen (Gerard i Roberts, 2004; Odriozola-Serrano i sur., 2008). Za moguće pojašnjenje autori navode da se porastom temperature pospješuje ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog

materijala, obzirom je većina fenolnih spojeva preko šećera povezana sa staničnom stijenkom, a uz porast temperature, dolazi do dezintegracije veza polifenola i staničnih stijenki (Khoddami i sur., 2013).

Nadalje, porast koncentracije elaginske kiseline u plazma tretiranom soku od šipka u odnosu na netretirani pojašnjava se činjenicom da se tijekom tretiranja hladnom plazmom generira velik broj kemijski reaktivnih čestica za koje se pretpostavlja da imaju dovoljnu energiju za razaranje kovalentnih veza te tako potiču brojne lančane reakcije koje mogu utjecati na dezintegraciju stanične stijenske te depolimerizaciju i hidrolizu elagitanina (Herceg i sur., 2016). U radu Bursać Kovačević i sur. (2016) pokazano je da tretiranje hladnom atmosferskom plazmom pozitivno utječe i na stabilnost antocijana kao i boju soka od šipka. U odnosu na netretirani uzorak, uzorak tretiran hladnom plazmom imao je 21 do 35 % veći sadržaj ukupnih antocijana. Razlog povećanju sadržaja antocijana jest pucanje staničnih stijenki, čime se povećao prinos ekstrakcije, a drugi mogući razlog je sama kemijska struktura antocijana. Naime, u soku od šipka dominiraju diglukozidi cijanidina i delfinidina, a poznato je da su diglukozidi stabilniji od monoglikozida, kao i aglikonskih oblika (Grzegorzewski i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovom istraživanju korišten je mutni sok od šipka dobiven hladnim prešanjem na sokovniku Vervita PRO (Kuvings, Korea). Posebnost ovog sokovnika očituje se u tehnologiji sporog prešanja sa najvišom brzinom prešanja do 60 rpm. Plodovi šipka nabavljeni su u trgovačkoj mreži, a sok je pripremljen neposredno prije tretmana. Suha tvar soka, mjerena digitalnim refraktometrom (ATAGO, PAL) iznosila je 15,50 %, dok je pH vrijednost soka mjerena na pH-metru iznosila 3,44 (Mettler Toledo Seven easy).

3.2. Metode rada

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

Tablica 4. Plan pokusa tretiranja soka od šipka

Uzorci	OZNAKA UZORKA	ULTRAZVUK		PLAZMA	
		Amplituda	t (min)	Frekvencija	t (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 od šipka ultrazvukom visoke snage

U svrhu tretiranja soka od šipka ultrazvukom visoke snage upotrijebljen je ultrazvučni procesor SONICATOR S-4000 (Misonix Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD). Značajke procesora su sljedeće: 600 W maksimalne izlazne snage, frekvencije 20 kHz, 100-240 V strujnog napona, 50-60 Hz frekvencija strujne mreže. Pripremljeni sok od 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, u vremenu od 2 i 2,5 minuta. Na uređaju je podešeno: (i) pulse on time = 1 min te (ii) pulse off time = 15 sec.

Uzorci su tretirani pojedinačno (UZ1-UZ4) te kombinirano (1-16) prema planu pokusa u Tablici 4. 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). Za svakih 30 minuta rada, potrebno je 10 min hlađenja uređaja, dok je za svakih 6 sati rada potrebno promijeniti nastavak na sondi. 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 od šipka hladnom plazmom

Za tretiranje soka od šipka hladnom plazmom korištena je tekućinska plazma s mjehurićima. Uzorci su tretirani pojedinačno (P1-P4) te kombinirano (1-16) prema planu pokusa u Tablici 4. Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Strujni krug se sastoji se od visokonaponskog napajanja, kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 MΩ, 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. Postupak ekstrakcije

Ekstrakcija je provedena neposredno po provedenom tretmanu, na način da je u plastičnu kivetu volumena 50 mL otpipetirano 2 mL soka i 7 mL 1 % mravlje kiseline u 80 %-tnom metanolu (v/v) te se smjesa ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka) pri 50 °C tijekom 10 min. Po završetku ekstrakcije smjesa se

pomoću staklenog lijevka prelije u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Ovaj ekstrakt skladišti se pri +4 °C do provedbe analiza, pri čemu se prethodno profiltrira (Whatman International Ltd., Kent, UK).

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode: Određivanje ukupnih fenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL i 2 mL
6. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
7. Staklene epruvete, stalak za epruvete
8. Plastična lađica za vaganje
9. Mikropipete Eppendorf volumena 100 mL i 1000 mL
10. Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

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

3. Standard galne kiseline

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

Priprema uzorka:

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u potpoglavlju 3.5.3. Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti ekstrakcijskim otapalom (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu) u omjeru 1:5.

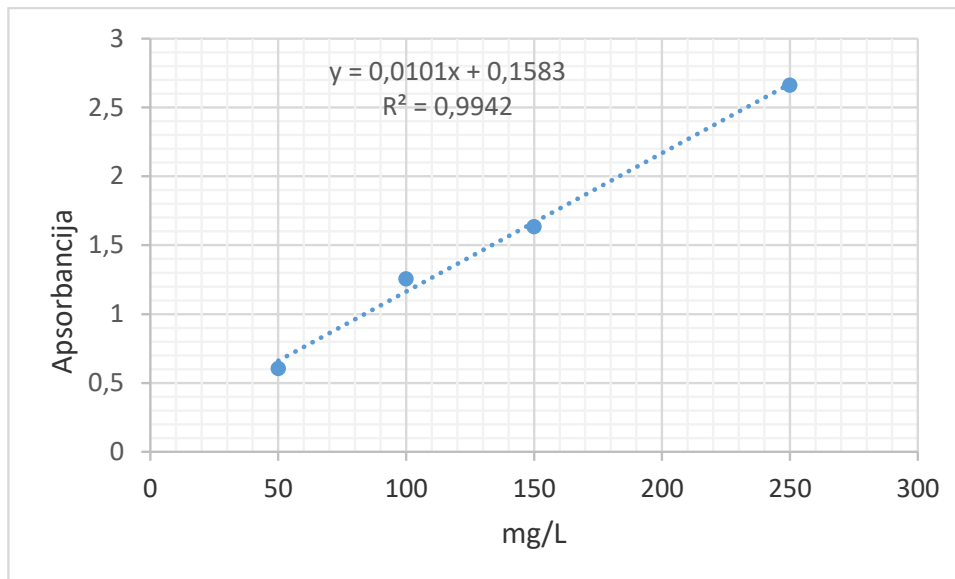
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 500 μL ekstrakta (koji je prethodno razrijeđen 5X), 2,5 mL F.C. reagensa (koji je prethodno 10x razrijeđen) te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 15 minuta pri $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneji tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 500 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen) te nakon nekoliko minuta 2 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci se potom termostatiraju 15 minuta pri $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Račun:

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0101X + 0,1583$$

$$R^2 = 0,9942$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 765 nm

X = koncentracija galne kiseline (mg/L)

R² = koeficijent determinacije

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

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

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

FD = faktor razrijeđenja (eng. *dilution factor*) (5)

Koncentracije ukupnih fenola (C) izražene su kao mg ekvivalenti galne kiseline po litri soka (mg GAE/L).

3.2.5. *Određivanje monomernih antocijana*

Princip metode:

Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorbanacija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj dužini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC 2005.02).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Analitička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
4. pH metar Mettler Toledo Seven easy
5. Staklena čaša, volumena 1 L i 100 mL
6. Staklene epruvete, stalak za epruvete
7. Mikropipeta, volumena 1000 μ L
8. Menzura, volumena 1 L
9. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. 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 destiliranom vodom, te se doda 980 mL destilirane vode i odvažuje 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 6,3 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom, te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

2. 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 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom, te se doda 960 mL destilirane 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 20 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere destiliranom vodom, te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema uzorka:

Obzirom su sokovi od šipka bili mutni, određivanje je provedeno iz ekstrakata koji su pripremljeni kao što je opisano u potpoglavlju 3.5.3. Za potrebe određivanja monomernih antocijana ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti ekstrakcijskim otapalom (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu) u omjeru 1:5.

Postupak određivanja:

Reakcija se postavlja u staklenim epruветama na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme i označe po dvije staklene epruvete. U svaku se epruветu otpipetira po 1 mL ekstrakta, a potom se u jednu epruветu otpipetira 4 mL pufera pH 1.0 te u drugu 4 mL pufera pH 4.5. Nakon 15 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama, mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Račun:

Koncentracija monomernih antocijana u ekstraktu soka od šipka (X) izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$X \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

gdje je:

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

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 g/mol)

DF = faktor razrijeđenja

10^3 = faktor za preračunavanje g u mg

ϵ = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid 26900 L/mol cm)

l = debljina kivete (1 cm).

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

gdje je:

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

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

FD = faktor razrijeđenja (eng. *dilution factor*) (5)

Koncentracije monomernih antocijana (C) izražene su kao mg ekvivalenti cijanidin-3-glukozida po litri soka (mg GAE/L).

3.2.6. 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 tretmana) 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 \pm STDEV.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka i hladne plazme, zasebno i kombinirano, na stabilnost ukupnih fenola i monomernih antocijana u mutnom soku šipka neposredno po provedenom tretmanu te tijekom skladištenja. 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.

Ovo poglavlje podijeljeno je u tri podpoglavlja, a u svakome od njih je prikazan utjecaj ultrazvuka i plazme, kao i vremena skladištenja na stabilnost ukupnih fenola i monomernih antocijana.

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni te su na temelju dobivenih rezultata određeni statistički signifikantni utjecaji ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana u sokovima šipka (Tablica 5, 6, 7 i 8).

4.1. Utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana

Tablica 5. Utjecaj parametara ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana u sokovima šipka (mg/L_{soka})

Ispitivani parametri	n	Ukupni fenoli	Monomerni antocijani
Amplituda		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
75 %	8	127,31±0,39 ^a	22,07±0,10 ^a
100 %	8	156,54±0,39 ^b	23,43±0,10 ^b
Vrijeme tretiranja		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
2,5 min	8	128,83±0,39 ^a	22,26±0,10 ^a
5 min	8	155,10±0,39 ^b	23,24±0,10 ^b
Skladištenje		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
0 dana	8	162,42±0,39 ^a	24,47±0,10 ^a
7 dana	8	121,50±0,39 ^b	21,03±0,10 ^b
Prosječna vrijednost	16	141,91±0,28	22,75±0,01

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

Prosječna vrijednost ukupnih fenola u sokovima šipka tretiranih ultrazvukom iznosi 141,91±0,28 mg/L_{soka}, dok prosječna vrijednost monomernih antocijana iznosi 22,75±0,01 mg/L_{soka} (Tablica 5.). Prijašnje studije pokazale su da sadržaj ukupnih fenola u soku od šipka značajno varira ovisno o lokaciji uzgoja, sortimentu te klimatskim prilikama, stoga se u literaturi pronalazi širok raspon koncentracija od 88,5 do 9850 mg/L (Tehranifar i sur., 2010; Melgarejo-Sánchez i sur., 2015), što je u skladu i sa dobivenim vrijednostima u ovom istraživanju. Također, i antocijani značajno variraju u ovisnosti gore navedenih parametara tako da se u literaturi mogu naći vrijednosti za sadržaj ukupnih antocijana od 11 do 9300 mg/L (El Kar i sur., 2011; Mousavinejad i sur., 2009). Prosječna vrijednost sokova šipka tretiranih ultrazvukom u skladu je s literaturnim navodima El Kar i sur. (2011) koji su u sokovima devet sorti šipka odredili sadržaj ukupnih antocijana od 11 do 178 mg/L_{soka}.

Ako se razmotri utjecaj amplitude (75 % i 100 %) dobiveni rezultati pokazuju da je i sadržaj ukupnih fenola, kao i monomernih antocijana značajno bio veći uz primjenu amplitude od 100 %. Ovi rezultati se mogu usporediti sa rezultatima istraživanjem Tiwarija i sur. (2009) koji su sok od kupine tretirali ultrazvukom amplitudama od 40 do 100 %, u trajanju do 10 min te je najveći prinos ukupnih antocijana dobiven pri najvećoj amplitudi 100 % i vremenu od 10 min, a gdje je zadržavanje ukupnih antocijana u soku nakon tretiranja iznosila 95 %.

Ako se gleda utjecaj vremena tretiranja dobiveni su značajno veći sadržaji ukupnih fenola i monomernih antocijana nakon tretiranja sokova kroz 5 min. Ipak, u literaturi se mogu pronaći i rezultati koji ne pokazuju značajan utjecaj ultrazvučnog tretiranja na sadržaj ukupnih fenola pa su tako Pala i sur. (2015) u svom istraživanju tretirali su ultrazvukom sok od šipka amplitudama 50, 75 i 100 % u trajanju od 6 do 30 min, a dobiveni rezultati pokazuju kako različite amplitude i vrijeme tretiranja nisu imali značajnog utjecaja na povećanje koncentracije ukupnih fenola. Međutim, istraživanje Zafra-Rojas i sur. (2013) na soku od kruške tretiranim ultrazvukom pri amplitudi 80 % i vremenima od 3, 5 i 8 min rezultiralo je značajnim povećanjem sadržaja ukupnih fenola u soku u odnosu na kontrolni uzorak uslijed porasta vremena tretiranja. Rezultati Alighourchi i sur. (2013) također su u skladu s ovim rezultatima. Autori su sok od šipka ultrazvučno tretirali amplitudama 50, 75 i 100 % u vremenima 3, 6 i 9 min te bilježe porast ukupnih fenola (5,40-42,52 %) i ukupnih antocijana pri amplitudama 100 % i vremenu od 9 min (0,38-9,75 %) (Alighourchi i sur., 2013). Autori predlažu kao objašnjenje da je do povećanja koncentracije ukupnih fenola došlo zbog pucanja staničnih stijenki uslijed kavitacije te da se povećanje događa kod mutnih, ali ne i kod bistrih sokova (Zafra-Rojas i sur, 2013). Ipak, Chitgar i sur. (2016) utvrdili su pad antocijana za 3,36 % u soku od žutike uslijed tretmana ultrazvukom pri amplitudi 100 % tijekom 15 minuta. Sadilova i sur. (2007) pad koncentracije antocijana pojašnjavaju stvaranjem hidroksilnih radikala uslijed kavitacije te vezanje istih na centralni prsten strukture antocijana čime se stvaraju nestabilne strukture halkona.

Poznato je da su biološki aktivni spojevi nestabilni tijekom skladištenja uslijed čega dolazi do njihove degradacije čime se može značajno narušiti biološka vrijednost gotovog proizvoda. Skladištenje sokova kroz 7 dana značajno je utjecalo na smanjenje ukupnih fenola te monomernih antocijana. Jednake rezultate dobili su i Vegara i sur. (2014) koji su istraživali stabilnost antocijana tijekom prerade i skladištenja komercijalnih sokova od šipka te utvrdili da se sadržaj antocijana nakon 7 dana skladištenja smanjio gotovo za tri puta u odnosu na svježi sok. Ipak, isti autori naglašavaju kako najvažniji čimbenik koji utječe na stabilnost fenola i antocijana u soku šipka je temperatura skladištenja (Vegara i sur., 2013b).

4.2. Utjecaj hladne plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana

Tablica 6. Utjecaj parametara hladne plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana u sokovima šipka (mg/L_{soka})

Ispitivani parametri	n	Ukupni fenoli	Monomerni antocijani
Frekvencija plazme		p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]
60 Hz	8	141,15±0,51 ^a	23,30±0,22 ^a
90 Hz	8	210,72±0,51 ^b	26,86±0,22 ^b
Vrijeme tretiranja		p=0,04 [†]	p=0,43 [‡]
2.5 min	8	185,22±0,51 ^a	24,95±0,22 ^a
5 min	8	166,74±0,51 ^b	25,21±0,22 ^a
Skladištenje		p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]
0 dana	8	199,04±0,51 ^a	25,86±0,22 ^a
7 dana	8	152,96±0,51 ^b	24,30±0,22 ^b
Prosječna vrijednost	16	175,95±0,36	25,08±0,16

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na p ≤ 0,01

Prosječne vrijednosti ukupnih fenola u sokovima šipka tretiranih hladnom plazmom iznose 17,59±0,36 mg/L_{soka}, odnosno 25,08±0,16 mg/L_{soka} u slučaju monomernih antocijana. Usporede li se ovi rezultati sa rezultatima ultrazvukom tretiranih sokova od šipka, sadržaj ukupnih fenola u sokovima tretiranim hladnom plazmom bio je za 19,35 %, a sadržaj monomernih antocijana za 9,29 % viši u odnosu na ultrazvuk.

Ukoliko se razmotri utjecaj frekvencije na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana, može se vidjeti da je veći sadržaj istih dobiven pri frekvenciji 90 Hz (210,72±0,51 mg/L_{soka} i 26,86±0,22 mg/L_{soka}) nego pri 60 Hz. Nadalje, veće koncentracije ukupnih fenola dobivene su tretiranjem u trajanju 2,5 min (185,22±0,51 mg/L_{soka}), dok vrijeme tretiranja nije imalo značajan utjecaj na koncentraciju monomernih antocijana u sokovima šipka.

Slično kao i za sokove tretirane ultrazvukom, i u sokovima tretiranim hladnom plazmom tijekom skladištenja došlo je do značajnog gubitka ukupnih fenola i monomernih antocijana. Do danas je objavljen mali broj znanstvenih radova i saznanja o nutritivnim svojstvima hrane tretirane hladnom plazmom, iako postoje radovi o utjecaju hladne plazme na svježe voćne plodove. Jedan od takvih je rad Ramazzina i sur. (2015) koji su ispitali utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava hladne plazme na biološku vrijednost kivija. Svježe rezano voće kivija tretirali su hladnom plazmom 10 i 20 min te analizirali koncentracije ukupnih fenola, klorofila i karotenoida odmah nakon tretiranja te nakon 4 dana skladištenja u kontroliranim uvjetima

(10 °C i 95 % relativna vlažnost). Rezultati su ukazali na pad koncentracije ukupnih fenola za 30 % nakon 4 dana skladištenja.

U istraživanju Hercega i sur. (2016) uspoređivana je pasterizacija sa tretmanom soka od šipka sa hladnom plazmom te su određene koncentracije ukupnih fenolnih spojeva te koncentracije fenolnih spojeva pojedinačno (elaginska, ferulinska, klorogenska kiselina, punikalagin, katehin). Koncentracija ukupnih fenola pasteriziranog soka iznosila je 127,02 mg/L_{soka}, a soka tretiranog hladnom plazmom pri različitim vremenima od 112,70 do 139,81 mg/L_{soka}, čime se može zaključiti da obje tehnike pozitivno utječu na udio fenolnih spojeva u soku šipka. Autori navode da variranje vremena tretiranja sokova i volumena uzoraka nije značajno utjecalo na koncentracije ukupnih fenola u usporedbi sa pasteriziranim sokovima.

4.3. Utjecaj kombiniranih tretmana na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana

4.3.1. Utjecaj amplitude i vremena tretiranja ultrazvukom te frekvencije plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana

Prema detaljnom pregledu literature do sada nisu pronađena znanstvena istraživanja s tematikom utjecaja kombiniranih netermalnih tehnologija poput ultrazvuka i hladne plazme na stabilnost biološki aktivnih spojeva u soku šipka, no usporedbom rezultata prikazanih u Tablicama 5. i 6. sa rezultatima prikazanim u Tablici 7. može se generalno zaključiti da kombinirani netermalni tretmani povoljno utječu na stabilnost istraživanih spojeva u soku šipka pa je tako sadržaj ukupnih fenola iznosio presječno od 114,31 do 323,03 mg/L, a sadržaj monomernih antocijana od 18,16 do 35,85 mg/L. Bhat i sur. (2011) u svom istraživanju o utjecaju ultrazvučnog tretmana na kvalitetu soka od limete navode da se uslijed ultrazvučnog tretmana, osim povećanja sadržaja biološki aktivnih spojeva zbog pucanja staničnih membrana i učinkovitije ekstrakcije, također i generira veći broj hidroksilnih radikala (OH•), koji se mogu vezati na *-o* i *-p* pozicije nekondenziranog benzenskog prstena te tako doprinjeti i većoj antioksidacijskoj aktivnosti ultrazvučno tretiranog soka.

Sagleda li se istovremeno utjecaj parametara ultrazvuka (amplituda, vrijeme tretiranja) te frekvencija hladne plazme (60 i 90 Hz) dobiveni rezultati pokazuju da je pri nultom danu skladištenja, neovisno o amplitudi i vremenu tretiranja, sadržaj ukupnih fenola bio značajno veći uz frekvenciju 90 Hz, a jednak trend uočen je i kod monomernih antocijana (Tablica 7).

Obrnut utjecaj frekvencije hladne plazme zabilježen je nakon 7 dana skladištenja i to pri amplitudi 75 % gdje je viši sadržaj ukupnih fenola kao i monomernih antocijana, neovisno o vremenu tretiranja, određen u sokovima tretiranim pri frekvenciji 60 Hz. Zanimljivo je da nakon 7 dana skladištenja uz amplitudu 100 % niti jedan od ovih parametara nije značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola, dok je neovisno o vremenu tretiranja, baš kao i za nulti dan, sadržaj monomernih antocijana bio veći pri tretiranju frekvencijom 90 Hz. Chitgar i sur. (2016) navode da tijekom hladnog skladištenja (4 °C) soka od žutike, bilo da je tretiran ultrazvukom ili termički pasteriziran, degradacija antocijana slijedi kinetiku prvog reda te da se uslijed tretmana ultrazvukom smanjuje koncentracija otopljenog kisika u sokovima, što je ključni parametar stabilnosti ovih sokova tijekom skladištenja. Autori navode da su nakon 40 dana hladnog skladištenja gubici antocijana za ultrazvučne tretmane 70 %/15 min, 100 %/10 min te 100 %/15 min iznosili redom 14,67, 17,82 i 18,25 %.

U istraživanju Tiwari i sur. (2009) ispitivan je utjecaj ultrazvuka na sadržaj antocijana u soku od grožđa pri različitim amplitudama (24,4–61,0 μm) i vremenu do 10 min te konstantnoj frekvenciji (20 kHz). Rezultati pokazuju da se sa povećanjem amplitude i vremena tretiranja soka od grožđa, smanjivao sadržaj monomernih antocijana. Slično ovome istraživanju, Dubrović i sur. (2011) su u sokovima od jagode pri najmanjoj amplitudi od ispitivanih (60, 90 i 120 μm) i najkraćem vremenu tretiranja (3, 6 i 9 min) dobili najveće koncentracije antocijana.

Stoga, rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju da se pravilnim odabirom parametara ultrazvuka, kao i hladne plazme, može osigurati zadovoljavajuća stabilnost biološki aktivnih spojeva.

Tablica 7. Utjecaj kombiniranih tretmana ultrazvuka i frekvencije hladne plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana u sokovima šipka (mg/L_{soka})

Dani skladištenja	Ultrazvuk		Hladna plazma		Ukupni fenoli	Monomerni antocijani	
	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Frekvencija (Hz)				
0	75	2,5	60		230,51±0,85 ^a	35,85±0,19 ^a	
			90		323,03±0,85 ^b	26,53±0,19 ^b	
		5	60		283,84±2,92 ^a	24,12±0,08 ^a	
			90		214,01±2,92 ^a	27,29±0,08 ^b	
		100	2,5	60		233,33±0,58 ^a	26,33±0,12 ^a
				90		243,85±0,58 ^a	32,12±0,12 ^b
	5		60		204,36±0,22 ^a	25,22±0,17 ^a	
			90		246,10±0,22 ^b	27,58±0,17 ^b	
	7	75	2,5	60		212,62±0,35 ^a	29,52±0,13 ^a
				90		180,94±0,35 ^b	19,81±0,13 ^b
			5	60		193,81±0,79 ^a	20,04±0,04 ^a
				90		190,17±0,79 ^a	19,83±0,04 ^b
100			2,5	60		175,22±0,50 ^a	19,42±0,10 ^a
				90		156,34±0,50 ^a	24,19±0,10 ^b
		5	60		114,31±0,75 ^a	18,16±0,09 ^a	
			90		140,18±0,75 ^a	22,65±0,09 ^b	

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

4.3.2. Utjecaj amplitude i vremena tretiranja ultrazvukom te vremena tretiranja plazme na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana

Sagleda li se kombinirani utjecaj parametara ultrazvuka i vremena tretiranja hladnom plazmom dobiveni rezultati pokazuju da je u ispitivanim sokovima šipka prosječan sadržaj ukupnih fenola iznosio od 100,44 do 303,82 mg/L, dok je sadržaj monomernih antocijana određen u rasponu od 17,81 do 32,06 mg/L (Tablica 8.) što je približno slično udjelima određenim pri različitim parametrima ultrazvuka uz različite frekvencije plazme.

Usljed kombiniranog tretmana, utjecaj vremena tretiranja hladnom plazmom značajno je više utjecao na sadržaj monomernih antocijana, no ukupnih fenola. Razvidno je da je u nultom danu analiza i amplitudi 75 % vrijeme tretiranja hladnom plazmom od 2,5 min rezultiralo višim udjelima monomernih antocijana u usporedbi s 5 min, dok je obrnut trend zabilježen pri amplitudi 100 % gdje su značajno viši udjeli monomernih antocijana određeni u sokovima šipka tretiranim 5 min. Nakon 7 dana skladištenja, neovisno o amplitudi ultrazvuka, svi sokovi tretirani hladnom plazmom u trajanju 5 min sadržavali su značajno više udjele monomernih antocijana u usporedbi sa sokovima tretiranim 2,5 min. Pankaj i sur. (2017) tretirali su hladnom plazmom sok od grožđa (*Vitis vinifera* cv. Thompson) te su utvrdili da porastom vremena tretiranja dolazi do značajnih gubitaka ukupnih fenola i flavonoida. Autori pojašnjavaju da se uslijed tretmana hladnom plazmom, uz cijeli niz reaktivnih čestica, također generira i ozon koji se veže na aromatsku strukturu fenolnih spojeva te na taj način uzrokuje degradaciju. Ipak, autori su zaključili da uslijed tretmana hladnom plazmom, neovisno o vremenu tretiranja, dolazi do porasta koncentracije flavonola u soku od grožđa. Ovaj fenomen autori pojašnjavaju ugradnjom novonastalih hidroksilnih čestica u aromatsku strukturu fenola čime se pojačava njihova stabilnost (Aadil i sur., 2013).

Promotri li se sadržaj ukupnih fenola uslijed ove kombinacije tretmana dobiveni rezultati pokazuju da je vrijeme tretiranja hladnom plazmom imalo značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola pri slijedećim ultrazvučnim tretmanima: (i) amplituda 75 % tijekom 2,5 min te (ii) amplituda 100 % tijekom 5 min, neovisno o danu skladištenja (Tablica 8). Drugim riječima, uz amplitudu 75 % stabilnost ukupnih fenola je veća ukoliko su u kombiniranim tretmanima i ultrazvuk i hladna plazma korišteni po 2,5 min dok su uz amplitudu 100 % veću stabilnost pokazali sokovi šipka tretirani svakom ponasob tehnikom u trajanju od 5 min. Stoga, prema rezultatima iz Tablice 8. vidljivo je da su najveće koncentracije ukupnih fenola u sokovima šipka određene pri amplitudi 75 %, vremenu tretiranja ultrazvukom 2,5 min i

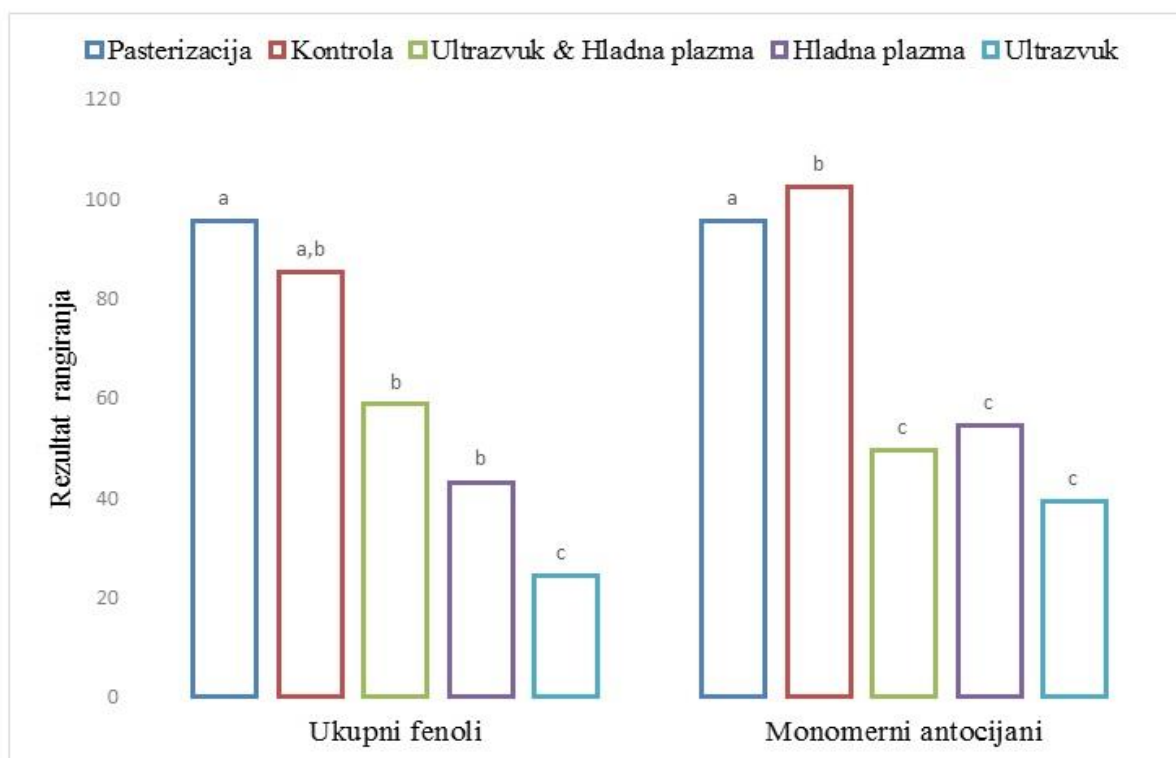
vremenu tretiranja hladnom plazmom 2,5 min ($303,82 \pm 0,85$ mg/L_{soka}), a pri jednakim uvjetima određena je i najveća koncentracija monomernih antocijana ($32,06 \pm 0,19$ mg/L_{soka}).

Općenito gledajući, skladištenje sokova šipka tijekom 7 dana pri 4 °C, neovisno o kombinaciji parametara ultrazvuka ili hladne plazme rezultiralo je padom koncentracije antocijana i ukupnih fenola. Smanjenje koncentracije antocijana nakon skladištenja tijekom 7 dana je očekivano s obzirom da je poznato kako različiti tehnološki procesi i skladištenje utječu na stabilnost antocijana (Cavalcanti i sur., 2011). Razlog je nestabilnost antocijana, što rezultira prvenstveno degradacijom i polimerizacijom monomernih antocijana (Somers i Evans, 1986). Slično pokazuju i rezultati istraživanja Vegara i sur. (2014) koji su ispitali utjecaj prerade i skladištenja na stabilnost antocijana u sokovima šipka te su ustanovili da je temperatura značajniji čimbenik od vremena skladištenja sa značajnim doprinosom stabilnosti biološki aktivnih spojeva.

Tablica 8. Utjecaj kombiniranih tretmana ultrazvuka i vremena tretiranja hladnom plazmom na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana u sokovima šipka (mg/L_{soka})

Dani skladištenja	Ultrazvuk		Hladna plazma	Ukupni fenoli	Monomerni antocijani
	Amplituda (%)	Vrijeme tretiranja (min)	Vrijeme tretiranja (min)		
0	75	2,5	2,5	303,82±0,85 ^a	32,06±0,19 ^a
			5	249,69±0,85 ^b	30,33±0,19 ^b
		5	2,5	264,70±2,92 ^a	26,10±0,08 ^a
	100	2,5	5	233,01±2,92 ^a	25,31±0,08 ^b
			5	230,55±0,58 ^a	27,41±0,12 ^a
		5	2,5	246,48±0,58 ^a	31,04±0,12 ^b
7	75	2,5	5	210,54±0,22 ^a	25,29±0,17 ^a
			5	240,02±0,22 ^b	27,51±0,17 ^b
		2,5	2,5	192,65±0,35 ^a	24,96±0,13 ^a
	100	2,5	5	201,04±0,35 ^b	24,38±0,13 ^b
			5	196,84±0,79 ^a	20,07±0,04 ^a
		5	2,5	187,11±0,79 ^a	19,8±0,040 ^b
	2,5	2,5	169,35±0,50 ^a	20,50±0,10 ^a	
		5	162,23±0,50 ^a	23,10±0,10 ^b	
	5	2,5	100,44±0,75 ^a	17,81±0,09 ^a	
		5	154,10±0,75 ^b	22,99±0,09 ^b	

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



Slika 9. Rangiranje primjenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak obzirom na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana ($\text{mg/L}_{\text{soka}}$) u sokovima šipka

Prema rezultatima rangiranja primjenjenih tretmana u odnosu na netretirani uzorak (svježi sok) obzirom na sadržaj ukupnih fenola i monomernih antocijana (Slika 9.) vidljivo je da pasterizacija nije imala značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola u usporedbi sa kontrolnim uzorkom. Značajno niži sadržaj ukupnih fenola dobiven je uslijed kombiniranog tretmana te tretmana hladnom plazmom, dok je najniži udio ukupnih fenola određen u sokovima šipka tretiranih ultrazvukom. Ipak, rezultati istraživanja Santhirasegaram i sur. (2013) pokazuju da je pasterizacija u usporedbi sa ultrazvučnim tretmanom rezultirala većim gubicima polifenola i karotenoida u sokovima manga. Autori rezultate tumače uspješnom ultrazvučnom inaktivacijom različitih enzima u soku koji bi destabilizirali biološki aktivne spojeve.

Rangiranje primjenjenih tretmana na sadržaj monomernih antocijana pokazuje da svi primjenjeni tretmani značajno umanjuju sadržaj antocijana u sokovima šipka te je stoga svježi sok sadržavao najveći udio ovih spojeva. Usporedi li se toplinski tretman s netoplinskim tretmanima, dobiveni rezultati pokazuju da je u pasteriziranom soku zadržan najveći udio antocijana. Nadalje, sve primjenjene netermalne tehnike, pojedinačno ili kombinirano,

rezultirale su značajno nižim sadržajem antocijana u usporedbi sa pasteriziranim ili kontrolnim uzorkom. Zaključno, značajne razlike u sadržaju monomernih antocijana obzirom na primjenjenu netermalnu tehniku nisu zabilježene. Turfan i sur. (2011) su ispitivali promjenu boje i stabilnost antocijana tijekom proizvodnje soka od šipka te rezultati njihovog istraživanja upućuju da su gubici antocijana nakon pasterizacije iznosili 8–14 % za mutni te 13–19 % za bistre sokove od šipka što ukazuje da su mutni sokovi od šipka, obzirom na toplinsku obradu, stabilniji od bistrih. U istraživanju Alper i sur. (2005) ispitan je utjecaj pasterizacije na kvalitetu mutnih sokova od šipka te rezultati pokazuju da je pasterizacija utjecala na gubitak ukupnih antocijana 13,1 %. Saikia i sur. (2015) usporedili su utjecaj pasterizacije i ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u 5 različitih vrsta voćnih sokova (od ananasa, lubenice, crne šljive, karambole i ličija (azijske trešnje)). Rezultati pokazuju da je kod svih vrsta sokova ultrazvuk imao utjecaja na porast sadržaja ukupnih flavonoida u usporedbi sa pasterizacijom, dok je na ukupne fenole ultrazvuk različito utjecao na određene vrste tretiranih sokova. Obzirom na dobivene rezultate, ovi autori zaključuju kako je tretman određenih vrsta sokova ultrazvukom dobra zamjena za pasterizaciju (Saikia i sur., 2015).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Pasterizacija, kao termalni tretman, nije značajno utjecala na sadržaj ukupnih fenola, dok je sadržaj monomernih antocijana u pasteriziranim sokovima šipka bio značajno niži u usporedbi sa netretiranim sokovima, no istovremeno značajno viši u usporedbi sa sokovima tretiranim netermalnim tehnikama (ponaosob ili u kombinaciji).
2. Sokovi od šipka, tretirani samo ultrazvukom, sadržavali su značajno niži udio ukupnih fenola u usporedbi sa kontrolnim i pasteriziranim te sokovima tretiranim hladnom plazmom ili kombinacijom ultrazvuka i hladne plazme.
3. Sadržaj monomernih antocijana u sokovima šipka tretiranih netermalnim tehnikama, ponaosob ili u kombinirano, nije se značajno razlikovao, no bio je značajno niži u usporedbi sa pasteriziranim ili kontrolnim uzorkom.
4. Neovisno o primjenjenoj tehnici, toplinskoj ili netoplinskoj, sadržaj ukupnih fenola kao i monomernih antocijana u sokovima šipka značajno se smanjio tijekom 7 dana skladištenja na 4 °C.

6. LITERATURA

1. Aadil, R. M., Zeng, X.-A., Han, Z., Sun, D. W. (2013) Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem.* **141**, 3201 – 3206.
2. Abdullah, N., Ling Chin, N. (2014) Application of Thermosonication Treatment in Processing and Production of High Quality and Safe-to-Drink Fruit Juices. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2**, 320 – 327.
3. Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. A., Zeng, X. (2014) Thermosonication as a Potential Quality Enhancement Technique of Apple Juice. *Ultrason. Sonochem* **21**, 984-990.
4. Akpinar-Bayazit, A., Ozcan, T., Yilmaz-Ersan, L. (2012) The Therapeutic Potential of Pomegranate and Its Products for Prevention of Cancer. U: Cancer prevention- From Mechanisms to Translational Benefits. [online] (Georgakilas, A. G., ured.), InTech Europe, Rijeka, str. 331-372, <<http://www.intechopen.com/books/cancer-prevention-from-mechanisms-to-translational-benefits>>. Pristupljeno 20. veljače 2017.
5. Alighourchi, H., Barzegar, H., Abbasi, S. (2008) Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *Eur Food Res Technol.* (objavljeno online 11. prosinca 2007.). doi: 10.1007/s00217-007-0799-1
6. Al-Maiman, S.A., Ahmad, D. (2002) Changes in Physical and Chemical Properties during Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Maturation. *Food Chem* **76**, 437-441.
7. Alper, N., Savaş Bahceçi, K., Acar, J. (2005) Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice. *J. Food Process. Preserv.* **29**, 357-368.
8. Amakura, Y., Okada, M., Sumiko, T., Tonogai, Y. (2000) High-performance liquid
9. Anonymus 1 (2014) How to use pomegranate for treating numerous diseases, <<http://www.healthcareaboveall.com/how-to-use-pomegranate-peel-for-treating-numerous-diseases/>>. Pristupljeno 24. travnja 2017.
10. AOAC Official Method (2005) Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines.
11. Ashurst, P., Hargitt, R. (2009) Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved, Woodhead Publishing, Cambridge.

12. Bhat, R., Bt Che Kamaruddin, N. S., Min-Tze, L., Karim, A. A. (2011) Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 1295–1300.
13. 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.
14. Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedišić, 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.
15. Çaliskan, O., Bayazit, S. (2012) Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Sci. Hort.* **147**, 81–88.
16. Cam, M., Hıslıl, Y., Durmaz, G. (2009) Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.* **112**, 721–726.
17. Cam, M., İçyer, N. C., Erdogan, F. (2014) Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Sci. Technol.* (objavljeno online siječanj 2014.). doi: 10.1016/j.lwt.2013.09.011
18. Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E. (2011) Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *J. Food Eng.* **107**, 366–373
19. Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. A. (2011) Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res. Int.* **44**, 499–509.
20. Chitgar, M. F., Aalami, M., Maghsoudlou, Y. (2016) Comparative Study on the Effect of Heat Treatment and Sonication on the Quality of Barberry (*Berberis Vulgaris*) Juice. *J. Food Process. Preserv.* (objavljeno online 04. srpnja 2016). doi: 10.1111/jfpp.12956
21. Chu, P. K., Lu, X. (2014) *Low temperature plasma technology: Methods and applications*, CRC Press – Taylor & Francis Group, London.
22. Corradini, D., Nicoletti, I. (2013) Changes in Phenolic Compounds. U: Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification (Mencarelli, F., Tonutti, P., ured.) John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, str. 105-119.
23. Coseteng, M. Y., Lee, C. Y. (1987) Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* **52**, 985-988.
24. Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Sparapani, L., Spina, M., Eleuteri, A. M., Fioretti, E., Angeletti, M. (2009) Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia* **80**, 301–305.

25. Da Silva, J.A., Rana, S. T., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D. T., Ranade, S. A. (2013) Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Sci. Hort.* **160**, 85- 107.
26. de Araujo Santiago, M. C. P., Nogueira, R. I., Paim, D. R. S. F., Gouvêa, A. C. M. S., Godoy, R. L. O., Peixoto, F. M., Pacheco, S., Freitas, S. P. (2016) Effects of encapsulating agents on anthocyanin retention in pomegranate powder obtained by the spray drying process. *LWT - Food Sci. Technol.* **73**, 551-556.
27. Dhinesh, K. V., Ramasamy, D. (2016) Pomegranate Processing and Value Addition: Review. *J. Food Process Technol.* (objavljeno online 02. veljače 2016). doi:10.4172/2157-7110.1000565
28. 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. Biotechnol.* **49**, 196-204.
29. El Kar, C., Ferchichi, A., Attia, F., Bouajila, J. (2011) Pomegranate (*Punica granatum*) juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *J. Food Sci.* **76**, 795–800.
30. Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., Herceg, Z. (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT – Food Sci. Technol.* **62**, 894–900.
31. Ercegović Ražić, S. E., Čunko, R. (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme. *Tekstil* **58**, 55-74.
32. Feng, H., Gustavo, V., Barbosa- Canovas, W. J. (2011) Ultrasound technologies for food and bioprocessing. USA.
33. Gerard, K. A., Roberts, J. S. (2004) Microwave heating of apple mash to improve Juice yield and quality. *LWT – Food Sci. Tech.* **37**, 551–557.
34. 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. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4581–4589.
35. Girard, B., Fukumoto, L. R., Koseoglu, S. S. (2000) Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. *Cr. Rev. Biotechn.* **20**, 109-175.
36. Gomez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Caboni, M. F. (2013) Determination of the Major Phenolic

Compounds in Pomegranate Juices by HPLC-DAD-ESI-MS.
J. Agric. Food Chem. **61**, 5328-5337.

37. Grossmann, M. E., Mizuno, N. K., Schuster, T., Cleary, M. P. (2010) Punicic acid is an ω -5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int. J. Oncol.* **36**, 421-426.
38. Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., Schluter, O. (2010) Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chem.* **122**, 1145–1152.
39. Harborne, J. B. (1988) The flavonoids: recent advances. U: *Plant Pigments*, (Goodwin, T.W., ured.), Academic Press, London, UK, str. 299-343.
40. Harborne, J. B. (1994) The Flavonoids. Advances in Research Since, Chapman & Hall, London, UK.
41. Harborne, J. B., Baxter, H. (1999) The Handbook of Natural Flavonoids. (John Wiley, ured.), Chichester.
42. Herceg, Z., Bursac Kovačević, D., Gajdoš Ključurić, J., Režek Jambrak, A., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665-672.
43. Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S. (2009) Procesi konzerviranja hrane, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb.
44. Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., Mehinagic, E. (2013) Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arab. J. Chem.* (objavljeno online 2. studenog 2013). doi: 10.1016/j.arabjc.2013.10.011
45. Hong, M. Y., Seeram, N. P., Heber, D. (2008) Pomegranate and its polyphenols downregulate gene expression of androgen synthesizing enzymes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 848–855.
46. Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
47. Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012) Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J. Ethnopharmacol.* **143**, 397–405.
48. Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.
49. Kaderides, K., Goula, A. M., Adamopoulos, K. M. (2015) A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and

- encapsulation. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **31**, 204-215. doi: 10.1016/j.ifset.2015.08.006
50. Kalaycıoğlu, Z., Bedia Erim, F. (2016) Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chem.* (objavljeno online 19. listopada 2016). doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.084
51. Kaur, C., Pal, R. K., Kar, A., Gadi, C., Sen, S., Kumar, P., Chandra, R., Jaiswal, S., Khan, I. (2014) Characterization of antioxidants and hypoglycemic potential of 32 pomegranate grown in India: a preliminary investigation. *J. Food Biochem.* **38**, 397–406.
52. Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279- 290.
53. Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., Hamid, A. A. (2016) Optimization of Pulsed Ultrasound-Assisted Technique for Extraction of Phenolics from Pomegranate Peel of Malas Variety: Punicalagin and Hydroxybenzoic Acids. *Food Chem.* **206**, 156-166. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.017
54. Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375.
55. Kim, D. B., Shin, G. H., Lee, Y. J., Lee, J. S., Cho, J. H., Baik, S. O., Lee, O. H. (2014) Assessment and comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of commonly consumed beverages in Korea. *Food Chem.* **151**, 58–64.
56. Landete, J. M. (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res. Int.* **44**, 1150–1160.
57. Lansky, E. P., Newman, R. A. (2007) *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* **109**, 177-206.
58. Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., Proestos, C. (2015) Comparison of the Antioxidant and Antiradical Activity of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) by Ultrasound-Assisted and Classical Extraction. *Anal. Lett.* (objavljeno online 08. Svibnja 2015). doi: 10.1080/00032719.2015.1038550
59. Legua, P., Forner-Giner, M. Á., Nuncio-Jáuregui, N., Hernández, F. (2016) Polyphenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of nineteen pomegranate fruits: A rich source of bioactive compounds. *J. Funct. Foods* **23**, 628-636.
60. 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. *J. Food Sci.* **77**, 115–120.

61. Lieu, L. N., Le, V. V. M. (2010) Application of Ultrasound in Grape Mash Treatment in Juice Processing. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 273 – 279.
62. Maas, J. L., Galletta, G. J., Stoner, G. D. (1991) Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: A review. *Hort. Sci.* **26**, 10–14.
63. Macheix, J. J, Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
64. Markh, A. T., Lysogar, T. A. (1973) *Izv. Vyssh. Uchebn. Pishch. Technol.* **2**, 36–38.
65. Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, J. J., Legua, P., Martínez, R., Hernández, F., Melgarejo, P. (2015) Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones. *Sci. Hort.* **182**, 65–72.
66. 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. *J. Sci. Food Agr.* **91**, 1893–1906.
67. 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 Chem.* **141**, 2122-2129.
68. Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Hossein Haddad Khodaparast, M. (2009) Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* **115**, 1274–1278.
69. Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* **10**, 94–100.
70. Niketić-Aleksić G. (1988) Tehnologija bezalkoholnih pića, Naučna knjiga, Beograd.
71. Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. (2008) 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.
72. Pala, Ç. U., Zorba, N. N., Özcan G. J. (2015) Microbial Inactivation and Physicochemical Properties of Ultrasound Processed Pomegranate Juice. *Food Prot.* **78**, 531-539. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-290
73. Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G., McHugh, H. T. (2012) Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason. Sonochem.* **19**, 365–372. doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.05.015

74. Pankaj, S. K., Wan, Z., Colonna, W., Keener, M. K. (2017) Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *J. Sci. Food Agr.* (objavljeno online 08. ožujka 2017). doi: 10.1002/jsfa.8268
75. Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. J., Nicoli, M. C. (2005) Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* **92**, 109-117.
76. Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (2013) *Narodne novine* **48**, Zagreb.
77. Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.
78. Rahman, Z., Rahman, H., Rahman, A. (2014) Classification and Generation of Atmospheric Pressure Plasma and Its Principle Applications. *Int. J. Math. Phys. Sci. Res.* **2**, 127 – 146.
79. Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P. (2015) Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biol Technol.* **107**, 55-65.
80. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. i Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* **22**, 375- 383.
81. Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F. C. (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1461–1471.
82. Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1461–1471.
83. Saikia, S., Mahnot, N. K., Mahanta, C. L. (2015) A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Sci. Technol. Int.* (objavljeno online 19. srpnja 2015). doi: 10.1177/1082013215596466
84. Salgado, J. M., Ferreira, T. R. B., Biazotto F., de O., Dias, C. T. dos S. (2012) Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. *Plant Foods Hum. Nutr.* **67**, 39–43.

85. Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C. (2013) Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrason. Sonochem.* (objavljeno online 07. ožujka 2013). doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.02.005
86. Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K., Holzhauser, T., Knorr, D., Eisenbrand, G. (2013.) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 920 – 927.
87. Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1415–1422.
88. Sengul, H., Surek, E., Nilufer-Erdil, D. (2014) Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Res.Int.* **62**, 1069–1079.
89. Sepúlveda, E., Sáenz, C., Peña, Á., Robert, P., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2010) Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Chil. J. Agric. Res.* **70**, 50–57.
90. Somers, T. C., Evans, M. E. (1986) Evolution of red wines. Ambient influences on color composition during early maturation. *Vitis* **25**, 31–39.
91. Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., Jahan Bakhsh, V. (2011) High potential of agroindustrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Ind. Crop. Prod.* **34**, 1523– 1527.
92. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., Vazifeshenas, M. R. (2010) Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci. Hort.* **126**, 180–185.
93. Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J. (2009) Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *J. Food Eng.* **93**, 166-171.
94. Turfan, O., Türkyılmaz, M., Yemis, O., Özkan, M. (2011) Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chem.* **129**, 1644–1651.
95. Vardin, H. i Fenerciog˘lu, H. (2003) Study on the development of pomegranate juice processing technology: Clarification of pomegranate juice. *Nahrung* **47** (5), 300–303.

96. Vegara, S., Martí, N., Lorente, J., Coll, L., Streitenberger, S., Valero, M., Saura, D. (2014) Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. 'Mollar' fruit juices processed at industrial scale. *Food Chem.* (objavljeno online 01. listopada 2013). doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.122
97. Vegara, S., Mena, P., Marti, N., Saura, D., Valero, M (2013b) Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 592-596.
98. Vegara, S., Mena, P., Marti, N., Saura, D., Valero, M. (2013a) Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices . *Food Chem.* **141**, 1630-1636.
99. Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010) Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotech.* **4**, 77-87.
100. Whale, W. J. K., Brown, I., Rotondo, D., Heys, D. S. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. U: Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors (Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B., ured.), Landes Bioscience, Austin, Texas.
101. Wu, J., Gamage, T. V., Vilkhuk, K. S., Simons, L. K., Mawson, R. (2008) Effect of Thermosonication on Quality Improvement of Tomato Juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **9**, 186-195.
102. Xie, L., Roto, A. V., Bolling, W. B. (2013) Characterization of Ellagitannins, Gallotannins, and Bound Proanthocyanidins from California Almond (*Prunus dulcis*) Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 12151-12156.
103. Yiu, H., Wai-Kit, N., Rogers, R. (2001) Meat Science and Applications. CRC Press.
104. Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, E., Ramirez-Moreno, L., Villanueva-SSnchez, J., Alanis-Garcia, E. (2013) Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 1283-1288.
105. Zhang, Y., Krueger, D., Durst, R., Lee, R., Wang, D., Seeram, N. (2009) International multidimensional authenticity specification (IMAS) algorithm for detection of commercial pomegranate juice adulteration. *J. Agricul. Food Chem.* **57**, 2550–2557.

Internet stranice:

Slika 1:

<http://www.tuscany-diet.net/2014/02/22/anthocyanins-definition-structure-ph/>