

# Razvoj funkcionalnih proizvoda na bazi rajčice uz dodatak rubisco proteina i praha masline

---

**Grgić, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:288513>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-30**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023

Nikolina Grgić

**RAZVOJ FUNKCIONALNIH  
PROIZVODA NA BAZI RAJČICE  
UZ DODATAK RUBISCO  
PROTEINA I PRAHA MASLINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj na Zavodu za opće programe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, te uz pomoć Josipe Dukić, mag. ing.



European  
Commission

Horizon 2020  
European Union funding  
for Research & Innovation

Ovaj rad napravljen je u sklopu projekta „FunTomP – Functionalized Tomato Products“ (PRIMA H2020 GA2032) inicijative PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area), te je financiran sredstvima programa Europske unije za istraživanje i inovacije, Horizon 2020 (Obzor, 2020).

## *ZAHVALA*

*Najprije se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na prenesenom znanju, vrijednim savjetima te stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem Josipi Dukić, mag. ing. na cijenjenoj pomoći prilikom izrade ovog rada, kao i svom uloženom vremenu i trudu.*

*Veliko hvala obitelji i prijateljima koji su mi bili bezuvjetna podrška tijekom cijelog studiranja. Hvala vam na razumijevanju i nesebičnoj potpori.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za opće programe  
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

## RAZVOJ FUNKCIONALNIH PROIZVODA NA BAZI RAJČICE UZ DODATAK RUBISCO PROTEINA I PRAHA MASLINE

*Nikolina Grgić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215995*

**Sažetak:** Razvijeni su funkcionalni sok i sos na bazi rajčice uz dodatak RuBisCO proteina i praha masline. Posljedično, funkcionalni dodaci RuBisCO protein i prah masline, dobiveni iz nusproizvoda i otpada prehrambene industrije, povećali su nutritivnu vrijednost proizvoda. Uzorci soka i sosa bili su tretirani tretmanom ultrazvuka visokog intenziteta (amplituda od 100 %, 3 min), toplinskim tretmanom (60 °C, 3 min) i *hot break* tretmanom (85 °C, 3 min). Uzorci su analizirani na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C. Ispitivan je utjecaj provedenih tretmana i vremena skladištenja na fizikalno-kemijske parametre i mikrobiološku stabilnost proizvoda. Tretmanom ultrazvuka postignuto je najveće povećanje koncentracije likopena u uzorcima soka (95,8 %) i sosa (55,3 %), klorofila *b* (87,8 %) u uzorku soka te ukupnih fenola u uzorku sosa (91,2 %). Istodobno, nakon tretmana ultrazvukom ostvarena je veća redukcija TPC-a (log 1,7 CFU/g za sok i log 2,0 CFU/g za sos) u usporedbi s toplinskim tretmanom. Također, vrijeme skladištenja imalo je najveći utjecaj na vrijednost °Brix-a, antioksidacijsku aktivnost te koncentraciju likopena.

**Ključne riječi:** *rajčica, funkcionalni dodaci, ultrazvuk visokog intenziteta, likopen, vrijeme skladištenja*

**Rad sadrži:** 62 stranice, 4 slike, 11 tablica, 89 literaturnih navoda, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** Josipa Dukić, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Verica Dragović Uzelac (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (član)
4. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 22. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of General Programmes**  
**Laboratory for sustainable development**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL TOMATO-BASED PRODUCTS WITH THE ADDITION OF RUBISCO PROTEIN AND OLIVE POWDER

*Nikolina Grgić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215995*

**Abstract:** Functional tomato-based juice and sauce with the addition of RuBisCO protein and tomato powder were developed. Consequently, functional ingredients RuBisCO protein and olive powder, obtained from food industry by-products and waste, increased the nutritional value of the products. Juice and sauce samples were treated with high power ultrasound (100 % amplitude, 3 min), thermal treatment (60 °C, 3 min), and *hot break* treatment (85 °C, 3 min). Samples were analyzed on the preparation day and after 7 days of storage at +4 °C. The influence of each treatment and storage time on physicochemical parameters and microbiological safety of juice and sauce was investigated. Ultrasound treatment resulted in the highest increase of lycopene in the juice sample (95,8 %) and the sauce sample (55,3 %), chlorophyll *b* (87,8 %) in the juice sample, and total phenols in the sauce sample (91,2 %). Furthermore, after ultrasound treatment, higher TPC reduction was recorded (log 1,7 CFU/g for juice and log 2,0 CFU/g for sauce) when compared to thermal treatment. Moreover, storage time had the highest effect on °Brix value, antioxidant activity, and lycopene concentration.

**Keywords:** *tomato, functional ingredients, high power ultrasound, lycopene, storage time*

**Thesis contains:** 62 pages, 4 figures, 11 tables, 89 references, 4 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Anet Režek Jambrak, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Josipa Dukić, MSc

#### **Reviewers:**

1. Verica, Dragović Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Sven, Karlović, PhD, Associate professor (member)
4. Jasenka, Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 22<sup>nd</sup>, 2023



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. RAJČICA</b> .....	2
2.1.1. Plod rajčice.....	2
2.1.1.1. Pigmenti u plodu rajčice.....	2
2.1.1.2. Fenolni spojevi u plodu rajčice .....	3
2.1.1.3. Prerada ploda rajčice .....	3
2.1.2. Sjemenka rajčice .....	4
2.1.3. List rajčice.....	5
<b>2.2. ISKORIŠTAVANJE INDUSTRIJSKIH NUSPROIZVODA</b> .....	5
2.2.1. Maslina.....	5
2.2.2. Šećerna repa .....	6
<b>2.3. ULTRAZVUK</b> .....	6
2.3.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta .....	7
<b>2.4. FIZIKALNI PARAMETRI</b> .....	8
<b>2.5. METODE ANALIZE UKUPNIH FENOLA, ANTIOKSIDACIJSKE     AKTIVNOSTI I BILJNIH PIGMENATA</b> .....	9
2.5.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	9
2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	10
2.5.3. Određivanje biljnih pigmenata .....	10
<b>2.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA</b> .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	13
3.1.1. Rajčica.....	13
3.1.2. RuBisCO protein i prah masline .....	13
3.1.3. Kemikalije .....	13
3.1.4. Uređaji.....	14
3.1.5. Laboratorijsko posuđe.....	14
<b>3.2. METODE</b> .....	15
3.2.1. Priprema funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice.....	15
3.2.1.1. Označavanje uzoraka .....	16
3.2.2. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta.....	17
3.2.3. Toplinski tretman .....	18
3.2.4. <i>Hot break</i> tretman .....	18
3.2.5. Fizikalni parametri .....	19

3.2.5.1. Određivanje pH vrijednosti .....	19
3.2.5.2. Određivanje električne vrijednosti .....	19
3.2.5.3. Određivanje °Brix-a.....	19
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	19
3.2.6.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije ukupnih fenola ekstrakcijskom metodom.....	20
3.2.6.2. Postupak određivanja koncentracije ukupnih fenola.....	20
3.2.6.3. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	20
3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	21
3.2.7.1. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	22
3.2.7.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	22
3.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biljnih pigmenata .....	23
3.2.8.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije biljnih pigmenata .....	23
3.2.8.2. Postupak određivanja koncentracije biljnih pigmenata.....	24
3.2.9. Mikrobiološka analiza.....	24
3.2.9.1. <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.2.9.2. Aerobne mezofilne bakterije .....	25
3.2.9.3. Plijesni.....	26
3.2.9.4. <i>Bacillus coagulans</i> .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA FIZIKALNE PARAMETRE.....</b>	<b>28</b>
4.1.1. Promjene fizikalnih parametara funkcionalnog soka na bazi rajčice.....	28
4.1.2. Promjene fizikalnih parametara funkcionalnog sosa na bazi rajčice .....	30
<b>4.2. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA KEMIJSKE PARAMETRE .....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Promjene kemijskih parametara funkcionalnog soka na bazi rajčice .....	32
4.2.1.1. Promjene koncentracije ukupnih fenola funkcionalnog soka na bazi rajčice ...	32
4.2.1.2. Promjene antioksidacijske aktivnosti funkcionalnog soka na bazi rajčice .....	34
4.2.1.3. Promjene koncentracije biljnih pigmenata funkcionalnog soka na bazi rajčice	35
4.2.2. Promjene kemijskih parametara funkcionalnog sosa na bazi rajčice.....	39
4.2.2.1. Promjene koncentracije ukupnih fenola funkcionalnog sosa na bazi rajčice....	39
4.2.2.2. Promjene antioksidacijske aktivnosti funkcionalnog sosa na bazi rajčice.....	40
4.2.2.3. Promjene koncentracije biljnih pigmenata funkcionalnog sosa na bazi rajčice	42
<b>4.3. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA MIKROBIOLOŠKU ANALIZU .....</b>	<b>46</b>
4.3.1. Rezultati mikrobiološke analize funkcionalnog soka na bazi rajčice .....	46

4.3.2. Rezultati mikrobiološke analize funkcionalnog sosa na bazi rajčice.....	49
4.3.3. Rezultati redukcije ispitivanih mikroorganizama u uzorcima funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice.....	51
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>63</b>

# 1. UVOD

Prehrambena industrija proizvodi ogromne količine otpada što se više ne može zanemariti, stoga je nužno okrenuti se održivoj proizvodnji hrane koja uključuje iskorištavanje poljoprivredno-prehrambenih nusproizvoda i otpada. Razvoj proizvoda koji sadrže funkcionalne sastojke dobivene iz otpada i nusproizvoda prehrambene industrije izazovna je prilika za održivu i kompetitivnu proizvodnju inovativne hrane. Uslijed rastućeg zanimanja za funkcionalnim sastojcima dobivenim iz otpada prerade voća i povrća, dostupan je velik broj preglednih članaka na tu temu (Alexandri i sur., 2022; Cano-Lamadrid i Artés-Hernández, 2022). Štoviše, sve je veća potražnja za održivim izvorima funkcionalnih dodataka koji sadrže fenolne spojeve (Sorrenti i sur., 2023) ili su bogati proteinima (Kamal i sur., 2021).

Rajčica je vrlo značajna za Mediteransko područje gdje je prisutna tendencija unaprjeđenja razvoja proizvoda na bazi rajčice. S ciljem poboljšanja kvalitete proizvoda na bazi rajčice, osnovnoj sirovini dodaju se funkcionalni sastojci. Dobivene proizvode nužno je obraditi kako bi im se produžila trajnost, a to se još uvijek postiže primjenom povišenih temperatura uslijed kojih dolazi do degradacije pojedinih bioaktivnih spojeva. Navedeni tretmani su konvencionalni i ne smatraju se održivim, stoga se nastoji pristupiti novim tehnikama obrade hrane. Jedna od novih tehnika obrade hrane je ultrazvuk visokog intenziteta. Međutim, postoji mali broj istraživanja u kojima su funkcionalni proizvodi na bazi rajčice tretirani istim.

Cilj ovog diplomskog rada bio je prikazati potencijal razvoja funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice uz dodatak RuBisCO proteina i praha masline. Uz to, opća svrha istraživanja bila je steći znanja o iskorištavanju otpada i nusproizvoda biljnog porijekla te mogućnosti primjene istih. Nadalje, istražen je i potencijal primjene ultrazvuka u razvoju funkcionalnih proizvoda. Funkcionalni sok i sok tretirani su *hot break* tretmanom, toplinskim tretmanom i tretmanom ultrazvuka visokog intenziteta, stoga je bilo potrebno usporediti utjecaj navedenih tretmana na kvalitetu proizvoda. Analizirani su utjecaji svakog od tretmana na fizikalne (pH vrijednost, °Brix-a, električna vodljivost) i kemijske parametre (koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost, koncentracija biljnih pigmenata) te na mikrobiološku stabilnost proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. RAJČICA

Rajčica (lat. *Solanum lycopersicum* L.), vrsta voća od velikog značaja iz porodice pomoćnica (lat. *Solanaceae*), jednako je cijenjena u svježem obliku, kao i u raznim prerađenim proizvodima. Uzgoj rajčice uglavnom zahtjeva toplu klimu i prisustvo više sunčeve svjetlosti kako bi narasli plodovi (Laranjeira i sur., 2022) koji mogu biti različitog oblika, veličine i boje. Na tržištu postoji velik broj domaćih sorti i kultivara rajčice. Osim svježe rajčice, prisutan je i širok raspon proizvoda na bazi rajčice koji su dobar izvor mikronutrijenata i bioaktivnih spojeva (Pinela i sur., 2022). Rajčica, a time i proizvodi od rajčice, najbogatiji su izvor likopena u ljudskoj prehrani koje karakterizira protuupalno, antialergijsko, antimikrobno, kardioprotektivno i antioksidativno djelovanje (Kurina i sur., 2021).

#### 2.1.1. Plod rajčice

Jedan od najvažnijih indikatora kvalitete i tehnoloških svojstava ploda rajčice je udjel suhe tvari (Kurina i sur., 2021). Udjel suhe tvari u plodu rajčice je 5,5 %, a preostali udio (94,5 %) čini voda. U suhoj tvari su najzastupljeniji ugljikohidrati s udjelom od 3,9 %. Većinu ugljikohidrata čine šećeri s udjelom od 2,6 %. Glavni predstavnici šećera su glukoza i fruktoza. Osim šećera, od ugljikohidrata se u plodu rajčice nalaze i vlakna s udjelom od 1,2 %. Proteini čine tek 0,9 % suhe tvari, dok lipidi 0,2 % suhe tvari. Od minerala, najzastupljeniji je kalij (237 mg/100 g), dok se od vitamina najviše ističe vitamin C (13,7 mg/100 g) (*United States Department of Agriculture, USDA*) (2019). Udjeli navedenih makro- i mikronutrijenata ovise o nekoliko faktora uključujući genetske značajke, uvjete okoliša, stupanj zrelosti i tretmane nakon berbe (Pinela i sur., 2022).

##### 2.1.1.1. Pigmenti u plodu rajčice

Kod rajčice, boju ploda koju možemo uočiti, kombinacija je različitih pigmenata među kojima su najzastupljeniji klorofil,  $\beta$ -karoten i likopen. Unos navedenih pigmenata putem hrane može doprinijeti očuvanju zdravlja i smanjenju rizika od razvoja pojedinih bolesti. Naime, posjeduju izražena poželjna svojstva poput protuupalnog, antioksidativnog i antimutagenog (Grace i sur., 2022; Jurić i sur., 2020). Dva glavna oblika klorofila prisutna u biljkama su klorofil *a*, plavo-zeleni pigment i klorofil *b*, žuto-zeleni pigment (Jurić i sur., 2020). Klorofil se u značajnim količinama nalazi u nezrelim rajčicama, a tijekom sazrijevanja rajčice smanjuje se

njegova koncentracija. To se odvija istovremeno s biosintezom i akumulacijom karotenoida. Najčešći karotenoidi prisutni u plodu rajčice su likopen i  $\beta$ -karoten (Kurina i sur., 2021). Likopen je pigment odgovoran za crvenu boju ploda rajčice i proizvoda na bazi rajčice. Brojna istraživanja dokazuju da se njegova koncentracija povećava nakon određenih tehnika obrade hrane kao što je toplinska obrada (Laranjeira i sur., 2022). Također, likopen je najvažniji antioksidans prisutan u zreloj rajčici predstavljajući 80-90 % ukupnih pigmenata (Trombino i sur., 2021). S druge strane,  $\beta$ -karoten je pigment odgovoran za karakterističnu narančastu boju voća i povrća, prekursor je vitamina A te ima značajan antioksidativni kapacitet. Neke studije navode kako toplinski tretman ne utječe na količinu  $\beta$ -karotena, dok druge upućuju na njegovo smanjenje ili čak povećanje nakon tretmana (Laranjeira i sur., 2022).

#### *2.1.1.2. Fenolni spojevi u plodu rajčice*

Osim značajnih pigmenata, rajčica je karakteristična i po prisutnosti različitih fenolnih spojeva. Fenolni spojevi mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije, a to su polifenoli i fenolne kiseline (Laranjeira i sur., 2022). Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji uglavnom djeluju kao atraktanti za oprašivače, uključeni su u zaštitu od UV svjetla i napada od patogena, te pridonose pigmentaciji ploda (Blainski i sur., 2013). Među polifenolima rajčice najzastupljeniji su flavanoni, flavonoli i antocijanini, a posebno spojevi iz navedenih skupina koji uključuju naringenin kalkan i kvarcetin. Također, flavonolni glikozidi poput rutina i kemferol-3-rutinozida značajni su za plod rajčice (Martí, 2016). Najzastupljenije fenolne kiseline su hidroksicimetne kiseline, odnosno kafeinska kiselina i klorogenska kiselina, te njezini derivati (Wu i sur., 2022). Međutim, sadržaj navedenih spojeva u rajčici uvjetovan je tehnikom uzgoja, genotipom i načinom skladištenja. S obzirom na to da su fenolni spojevi u većini voća i povrća vezani za stanične stijenke, tehnike obrade rajčice koje uzrokuju pucanje membrane ili stijenke povećavaju njihovu bioraspoloživost (Laranjeira i sur., 2022).

#### *2.1.1.3. Prerada ploda rajčice*

Industrijska prerada rajčice uključuje nekoliko koraka i razlikuje se ovisno o konačnom proizvodu koji se želi dobiti (Wu i sur., 2022). U nastavku teksta opisani su ključni koraci u preradi rajčice, odnosno proizvodnji soka i sosa od rajčice. Rajčice se nakon berbe transportiraju u pogon za preradu gdje se određuje njihova kvaliteta. Slijedi pranje rajčice koje predstavlja kritičnu kontrolnu točku u proizvodnji proizvoda od rajčice s niskim brojem mikroorganizama. Rajčice se obično gule prije daljnje prerade, a trenutno najčešće korištena metoda guljenja je

pomoću pare. U sljedećem koraku rajčice se usitnjavaju uslijed sjeckanja i drobljenja (Wu i sur., 2022). Zatim se mogu obrađivati *hot break* metodom pri 93-99 °C ili *cold break* metodom pri temperaturi od 77 °C i nižoj. *Hot break* metoda rezultira većom viskoznošću proizvoda kao što su *ketchup* i sos, dok je kod tretiranja soka *cold break* metodom bolje očuvanje okusa i boje, te je manja viskoznost proizvoda (Xu i sur., 2018; Wu i sur., 2022). Usitnjene i toplinski obrađene rajčice dovode se u ekstraktor ili sličan uređaj gdje se odstranjuju sjemenke i kožica. Slijedi proces deaeracije čija je svrha uklanjanje otopljenog zraka. Kod proizvodnje soka obavezno se provodi homogenizacija kako bi se povećala viskoznost i smanjilo odvajanje seruma. Međutim, ako konačni proizvod nije sok od rajčice, sok se koncentrira i dobiva se sos od rajčice ili sličan proizvod. U posljednjem koraku, proizvodi na bazi rajčice se aseptički pune, a to uključuje pasterizaciju, hlađenje i punjenje u sterilnu ambalažu (Wu i sur., 2022).

Nusproizvod prerade rajčice, poznat kao komina rajčice predstavlja oko 5-30 % glavnog proizvoda (Saini i sur., 2018). Komina rajčice sastoji se od sjemenki, kožice, vlakana i ostatka pulpe i trenutno se koristi kao stočna hrana i gnojivo ili se šalje na odlagalište. Međutim, još uvijek je bogata korisnim bioaktivnim spojevima kao što su karotenoidi i fenolni spojevi. (Bhatkar i sur., 2021; Trombino i sur., 2021). S obzirom na njihova antioksidativna i nutritivna svojstva, predloženi su brojni pristupi za valorizaciju neiskorištenih dijelova rajčice. Jedan od pristupa je obnavljanje i izolacija karotenoida koji se mogu koristiti u proizvodnji funkcionalne hrane i farmaceutskih ili kozmetičkih proizvoda (Trombino i sur., 2021). Istovremeno, važan je razvoj inovativnijih i održivijih pristupa kako bi se očuvala bioaktivna svojstva i smanjio negativan utjecaj na okoliš.

### 2.1.2. Sjemenka rajčice

Sjemenke rajčice su bogat izvor hranjivih tvari i funkcionalnih spojeva s važnim nutraceutskim svojstvima (Kumar i sur., 2021). Prema Benderska i sur. (2021), ulje sjemenki rajčice jedno je od najboljih jestivih ulja jer sadrži oko 80 % nezasićenih masnih kiselina i bogat je izvor bioaktivnih spojeva poput fosfatida, karotenoida i tokoferola. Također, iz sjemenki rajčice mogu se izolirati biljni proteini koji se uglavnom koriste kao dodatci prehrani (Benderska i sur., 2021). Osim što se sjemenke rajčice koriste za proizvodnju ulja i suplemenata, upotrebljavaju se i u pekarskim proizvodima. Mogu se homogenizirati u fini prah i primijeniti kao aktivni sastojak u razvoju funkcionalne hrane (Kumar i sur., 2022).

### 2.1.3. List rajčice

List rajčice sadrži velike količine fenolnih spojeva kao što su flavonoidi od kojih se posebno ističe rutin koji pokazuje visok potencijal za industrijsku primjenu. Može se koristiti kao dodatak prehrani ili u proizvodnji funkcionalne hrane i kozmetike (Junker-Frohn i sur., 2019). Prema istraživanju Papadaki i sur., (2022), iz lista rajčice mogu se ekstrahirati alkaloidni spojevi tomatidin i tomatin koji djeluju kao prirodni pesticidi i supstrati su za proizvodnju inovativnih polimernih filmova. Dokazano je da listovi rajčice sadrže značajnu količinu metabolita uključenih u zaštitu protiv abiotičkog i biotičkog stresa, te imaju važna terapijska svojstva. Štoviše, razvijen je održivi proces frakcioniranja glavnih biomolekula iz listova rajčice kombinacijom vodene ekstrakcije i membranskih procesa (Bazzarelli i sur., 2022).

## 2.2. ISKORIŠTAVANJE INDUSTRIJSKIH NUSPROIZVODA

Otpad i nusproizvodi dobiveni iz poljoprivredno-prehrambene industrije mogu biti jeftin izvor bioaktivnih spojeva koji se upotrebljavaju u funkcionalnim napitcima kao što je sok od rajčice (Routray i Orsat, 2019; Massini i sur., 2016). To može dovesti do brojnih pozitivnih ishoda uključujući ekonomičnost proizvodnog procesa i smanjenje zagađenja okoliša (Routray i Orsat, 2019). Iskorištavanje otpada biljnog podrijetla te formiranje nutritivno vrijednih sastojaka smatra se prilikom za održivu proizvodnju funkcionalnih dodataka te razvoj nove, funkcionalne hrane. Sastojci biljnog podrijetla dodavaju se u hranu i pića kako bi im se poboljšala nutritivna vrijednost, kao i senzorska svojstva (Massini i sur., 2016).

### 2.2.1. Maslina

Maslina (lat. *Olea europaea* L.), pripadnica porodice maslinovki (lat. *Oleaceae*), daje plodove koji se najčešće koriste za proizvodnju maslinovog ulja i stolnih maslina. Plodovi masline sastoje se pretežito od vode i lipida, a karakterizira ih visok udjel oleinske kiseline i prisutnost spojeva poput tokoferola i fenola. Također, sadrže značajnu količinu flavonoida, uglavnom luteolina, apigenina, rutina i antocijanina od kojih se neki mogu pronaći u maslinovom ulju (Guo i sur., 2018). Maslinovo ulje se proizvodi procesima ekstrakcije i to uglavnom prešanjem i centrifugiranjem. Pritom nastaju nusproizvodi kao što su komina i otpadna voda koji predstavljaju izvor visokovrijednih komponenti za proizvodnju funkcionalnih i drugih proizvoda (Foti i sur., 2022).

Sjemenke masline, nusproizvodi iz proizvodnje maslinovog ulja, sadrže nutritivne i



funkcionalne sastojke s potencijalnom vrijednošću za proizvodnju jestivog ulja, proteina i dodataka prehrani. Štoviše, imaju kompletan i dobro uravnotežen sastav masnih kiselina, brojne bioaktivne fitokemikalije, esencijalne aminokiseline i izvrstan su izvor dijetalnih vlakana (Maestri i sur., 2019).

Listovi masline predstavljaju najzastupljeniji otpad maslinarstva, a ekstrakt lista masline jedan je od najvrjednijih poluproizvoda otpada industrije maslinovog ulja. To je tamnosmeđa tekućina s visokim udjelom aktivnih tvari uključujući oleuropein koji je odgovoran za iznimna antioksidativna i antibakterijska svojstva ekstrakta lista masline (Selim i sur., 2022).

### 2.2.2. Šećerna repa

Šećerna repa (lat. *Beta vulgaris* L.), kultura iz porodice štirovki (lat. *Amaranthaceae*), građena je od zadebljalog korijena i lista. Upravo je korijen primarni razlog uzgoja šećerne repe jer se zbog visoke koncentracije saharoze koristi za proizvodnju konzumnog šećera. Prilikom proizvodnje šećera nastaju brojni nusproizvodi od kojih su glavni melasa i pulpa. Nusproizvodi se uglavnom upotrebljavaju za ishranu životinja ili kao sirovina za dobivanje alkohola i kvasca, dok melasa ima velik potencijal u proizvodnji biogoriva i biomolekula (Gonzalez i Björnsson, 2022).

Poznato je da list šećerne repe sadrži visok udjel proteina (19,4-22,8 % s.t.). Prema tome, može biti dobra sirovina za proizvodnju proteinskih koncentrata ili izolata. Iz lista šećerne repe ekstrahiran je i izoliran protein ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (engl. *Ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, RuBisCO). RuBisCO protein karakterizira prisutnost esencijalnih aminokiselina i uravnotežen aminokiselinski sastav te bolja funkcionalna svojstva u usporedbi s nekim komercijalno dostupnim biljnim proteinima (Akyüz i Ersus, 2021; Martin i sur., 2019). Potencijal RuBisCO proteina kao sastojka hrane očituje se u dobrom nutritivnom sastavu i probavljivosti u kombinaciji s niskom alergenošću i izvrsnim funkcionalnim svojstvima (Pearce i Brunke, 2023).

## 2.3. ULTRAZVUK

Netoplinska obrada hrane uključuje primjenu novih tehnika procesiranja hrane bez direktne upotrebe topline. Ultrazvuk pripada novim tehnologijama zajedno s pulsirajućim električnim poljem, visokim tlakom i hladnom plazmom. Glavna primjena ultrazvuka je u obradi mesa i procesima prijenosa mase kod voća i povrća (Arshad i sur., 2022). Također, ultrazvučni tretman

ima mogućnost smanjenja broja mikroorganizama na nižoj temperaturi od temperature konvencionalnog toplinskog tretmana uz kraće vrijeme tretiranja i bolju energetske učinkovitost (Arshad i sur., 2022; Starek i sur., 2021). Prema tome, ultrazvučna obrada hrane predstavlja jeftiniju i održiviju alternativu konvencionalnim metodama.

U usporedbi s konvencionalnim toplinskim tretmanima, obrada voćnih sokova djelovanjem ultrazvuka može omogućiti bolje očuvanje nutritivno vrijednih sastojaka, senzorskih svojstava i opće kvalitete gotovog proizvoda. Štoviše, moguće je povećanje antioksidacijske aktivnosti voćnih sokova koji posljedično imaju bolju stabilnost tijekom skladištenja. Unatoč brojnim prednostima, tretman ultrazvukom može izazvati razgradnju lipida, promjene u boji i viskoznosti te nastajanje netipičnih okusa i formiranje slobodnih radikala (Starek i sur., 2021).

Tretman ultrazvukom može se provoditi pomoću dvije vrste uređaja, a to su ultrazvučna kupelj (indirektno) i ultrazvučna sonda (direktno). Osnovni dijelovi ultrazvučnih uređaja su generator i ultrazvučni pretvarač. Generator proizvodi izmjeničnu električnu struju potrebne frekvencije ultrazvuka, dok ultrazvučni pretvarač, uglavnom piezoelektrični, pretvara električne impulse u energiju zvuka. Nastale mehaničke vibracije pojačavaju se na pojačalu te se ultrazvučni valovi sondom emitiraju u medij (Bhargava i sur., 2021).

S obzirom na intenzitet i frekvenciju ultrazvučnih valova, područje primjene ultrazvuka dijelimo na ultrazvuk niskog intenziteta (manji od  $1 \text{ W/cm}^2$ ) s valovima visoke frekvencije (veće od 100 kHz) i ultrazvuk visokog intenziteta (10 do  $1000 \text{ W/cm}^2$ ) s valovima niske frekvencije (20 do 100 kHz) (Bhargava i sur., 2021). Ultrazvuk niskog intenziteta najčešće se koristi za analizu fizikalno-kemijskih svojstva hrane. S druge strane, ultrazvuk visokog intenziteta primjenjuje se u različitim postupcima obrade hrane, uključujući inaktivaciju mikroorganizama (Chavan i sur., 2022; Bermudez-Aguirre i Niemira, 2022).

### 2.3.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta

U slučaju obrade hrane i konzerviranja, ultrazvuk može imati fizikalne i kemijske učinke na materijal ukoliko je isti tretiran ultrazvukom visokog intenziteta, odnosno ultrazvukom velike snage (Bermudez-Aguirre i Niemira, 2022). Kemijski učinak ultrazvuka je stvaranje slobodnih radikala  $\text{H}^+$  i  $\text{OH}^-$ . To se odvija tijekom razgradnje vode unutar oscilirajućih mjehurića. Suprotno od kemijskih, fizikalni učinci su brojni i složeni. Također, temelje se na kavitaciji s brojnim povezanim fenomenima, brzo mijenjajućim mehaničkim opterećenjima i ponekad staničnoj rezonanciji (Starek i sur., 2021).

Primarni mehanizam ultrazvuka visokog intenziteta zasniva se na akustičnoj kavitaciji i stvaranju na tisuće mjehurića nastalih uslijed širenja ultrazvučnih valova kroz tekući medij (Bermudez-Aguirre i Niemira, 2022). Djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta na tekućinu dolazi do naizmjeničnih ciklusa kompresije i ekspanzije molekula što utječe na njihovu udaljenost. Kada je udaljenost između molekula dovoljno velika, stvaraju se praznine, odnosno mjehurići koji konstantno rastu sve dok ne dostignu kritičnu veličinu koja ovisi o frekvenciji ultrazvučnog vala. Mjehurići se zatim snažno urušavaju uz pojavu mikropodručja s ekstremno visokim temperaturama (4200 do 4700 °C) i tlakovima (većim od 100 MPa) te šok valovima koji su posljedica prijelazne kavitacije. Nasuprot navedenom, stabilna kavitacija rezultira mikro strujanjem koje je praćeno visokim smicanjem (Chavan i sur., 2022).

Porast temperature i tlaka, stvaranje slobodnih radikala te rekombinacija ovih radikala s drugim molekulama i raspadanje makromolekula dio su mehanizma mikrobnе inaktivacije potpomognute ultrazvukom (Bermudez-Aguirre i Niemira, 2022). Stabilna kavitacija potiče eroziju stanične stijenke, a prijelazna kavitacija stvara pore, pri čemu dolazi do raspada stanične stijenke i oslobađanja citoplazmatskog sadržaja. Osim narušavanja stanične stijenke, dolazi i do termičke koagulacije proteina (Bermudez-Aguirre i Niemira, 2022). Sve to dovodi do letalnog učinka ultrazvuka, odnosno stanične smrti. Međutim, postoji mogućnost oporavljanja oštećenih stanica mikroorganizama tijekom skladištenja. Rješenje tomu može biti tehnologija preprekama koja kombinira ultrazvuk zajedno s drugim novim tehnikama obrade hrane ili postupaka poput smanjenja pH vrijednosti. Takav pristup može usporiti rast mikroorganizama ili uzrokovati njihovu smrt. Ako je oporavljanje uspješno spriječeno, mikrobnе stanice više neće moći rasti te se postiže veći stupanj inaktivacije i bolja mikrobiološka stabilnost proizvoda (Putnik i sur., 2020).

## **2.4. FIZIKALNI PARAMETRI**

Mjerenje sadržaja šećera, ili poznatije °Brix-a, osnovni je dio analize kvalitete prehrambenih proizvoda. Vrijednost jednog °Brix-a predstavlja 1 g saharoze u 100 g otopine (1 °Brix-a = 1 % šećera). Pritom, °Brix-a označava udio otopljenih šećera u tekućem mediju (Jaywant i sur., 2022). Može poslužiti za prikazivanje slatkoće nekog proizvoda ili za praćenje aktivnosti mikroorganizama u njemu (Sulaiman i sur., 2017; Magwaza i Opara, 2015). Danas su prisutne različite analitičke metode za mjerenje sadržaja šećera, poput kromatografije i kolorimetrije. Međutim, češće se koriste instrumentalne tehnike kao što hidrometar i refraktometar.

Refraktometar optički mjeri indeks refrakcije voća i povrća, te njihovih proizvoda, a rezultat prikazuje kao °Brix-a (Jaywant i sur., 2022; Magwaza i Opara, 2015).

Postizanje određene vrijednosti pH uobičajeni je postupak u brojnim procesima prerade i proizvodnje različitih proizvoda. Razlog tomu je značajan utjecaj pH na brojne spojeve, senzorske karakteristike proizvoda, ali i aktivnost mikroorganizama (Andrés-Bello i sur., 2013). S obzirom na to da je pH vrijednost soka rajčice između 4,1 i 4,35, u nekim slučajevima dodaje mu se limunska ili askorbinska kiselina. Dodatkom kiseline smanjuje se pH vrijednost soka, a time i smanjuje rizik od rasta bakterija koje stvaraju spore te uzrokuju probleme s kvalitetom i zdravstvenom ispravnosću proizvoda (Ağçam i sur., 2018). Vrijednost pH definira stupanj kiselosti ili bazičnosti određene otopine, a standardna metoda za mjerenje pH uključuje elektrokemijsko mjerenje pomoću pH-osjetljive staklene elektrode (Andrés-Bello i sur., 2013).

Uz mjerenje pH, najčešće korištena elektroanalitička tehnika je mjerenje električne vodljivosti koje se provodi primjenom konduktometra. Električna vodljivost definira se kao brzina prijenosa električnog naboja kroz otopinu, odnosno sposobnost otopine ili krutine da propušta električnu struju. Fenomen električne vodljivosti nastaje kretanjem iona ili elektrona kroz vodljivi sustav pod utjecajem električnog polja (Smedley, 2012). Osim jakosti električnog polja, na vrijednost električne vodljivosti utječe i temperatura, odnosno proces zagrijavanja. Istovremeno, ovisi o svojstvima prehrambenog proizvoda kao što su sastav, količina šećera i soli, te pH (Ghinea i sur., 2022).

## **2.5. METODE ANALIZE UKUPNIH FENOLA, ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I BILJNIH PIGMENATA**

### **2.5.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom**

Postoji nekoliko metoda za određivanje ukupnih fenola u biljkama, odnosno biljnim ekstraktima. U literaturi često susrećemo analizu fenolnih spojeva pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ili spektrofotometrije. Međutim, mnogi autori opisuju Folin-Ciocalteu metodu kao polaznu metodu za određivanje ukupnih fenola jer je jednostavna za izvođenje, jeftina i primjenjiva u rutinskim laboratorijskim analizama (Attard, 2013; Blainski i sur., 2013).

Folin-Ciocalteu reagens je žuta otopina fosfowolframove kiseline i fosfomolibdene kiseline koja reagira s fenolima stvarajući kromogene čija se prisutnost detektira spektrofotometrijski.

Točnije, u alkalnim uvjetima i u redoks reakciji nastaju plavo obojeni wolframov oksid i molibdenov oksid, a intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji ukupnih fenola (Lamuela-Raventós, 2018). Opisana reakcija temelji se na prijenosu elektrona, a sama metoda mjeri redukcijski kapacitet fenola koji djeluju kao antioksidansi. Osim toga, rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu metodom su u vrlo dobroj korelaciji s rezultatima dobivenim drugim metodama za određivanje fenola koje se koriste u analizi hrane i pića (Lamuela-Raventós, 2018).

### 2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Danas su prisutne brojne kemijske metode koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti, često u kombinaciji s automatiziranim i vrlo osjetljivim tehnologijama detekcije. Ovisno o mehanizmu kemijske reakcije, ove metode dijele se u dvije kategorije. Metode iz prve kategorije temelje se na mehanizmu prijenosa atoma (engl. *hydrogen atom transfer*, HAT metode), a iz druge kategorije na mehanizmu prijenosa elektrona slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim skupinama (engl. *single atom transfer*, SET metode) (Munteanu i Apetrei, 2021; Shahidi i Zhong, 2015).

Međutim, postoje i metode koje se općenito temelje na eliminaciji stabilnog kromofora kao što je 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH). Kod tih metoda spomenuti mehanizmi mogu imati različite uloge u različitim omjerima ovisno o reakcijskim uvjetima kao što su pH i otapalo (Munteanu i Apetrei, 2021). Dakle, DPPH metoda bazirana je na prijenosu elektrona i uključuje mehanizam prijenosa atoma vodika koji je samo marginalni reakcijski put u analizi. DPPH je stabilni kromogeni radikal tamnoljubičaste boje koji se neutralizira uslijed doniranja elektrona od strane antioksidansa (Shahidii i Zhong, 2015). Međutim, autori iz ranijih istraživanja navode da je prijenos atoma vodika s antioksidansa na DPPH polazna reakcija (Brand-Williams i sur. 1995). U svakom slučaju, reakcija je popraćena promjenom boje iz ljubičaste u žutu što je pokazatelj učinkovitosti, odnosno prisutnosti antioksidansa.

### 2.5.3. Određivanje biljnih pigmenata

Mnogi istraživači smatraju da je analiza biljnih pigmenata pravi analitički izazov jer su pigmenti često dio složenih struktura i/ili smjesa. Osim toga, tijekom pripreme uzorka može doći do kontaminacije ili djelomičnog gubitka pigmenata zbog njihove osjetljivosti. Unatoč tim izazovima, dostupan je velik broj metoda za brzo i precizno određivanje različitih biljnih pigmenata (Chazaux i sur., 2022; Schoefs, 2004).

Među najčešćim metodama ekstrakcije, koncentriranja i kvantificiranja pigmenta su ekstrakcija otapalom, centrifugiranje i UV/Vis spektroskopija (Carvalho i sur., 2021). Kvantitativno određivanje biljnih pigmenta uglavnom se temelji na mjerenju apsorbancije pomoću UV/Vis spektrofotometra, a iako se tehnika pokazala kao praktičnom i jednostavnom, preciznost mjerenja ovisi o brojnim faktorima. Neki od tih faktora su vrsta korištenog uređaja, točnost određivanja položaja maksimuma apsorbancije i točnost koeficijenta apsorbancije koji se koristi za izračun. Štoviše, točno mjerenje koncentracije određenog pigmenta zahtjeva da se isti otopi u otapalu za koji ima utvrđen specifični koeficijent apsorbancije jer okolina pigmenta, koja uključuje otapalo, može snažno utjecati na oblik spektra (Schoefs, 2004). Osim prikladnog otapala, spektrofotometrijska analiza uključuje i korištenje seta jednadžbi. Chazaux i sur. (2022) navode da različite jednadžbe mogu biti glavni izvor pogrešnog određivanja biljnih pigmenta, stoga je potrebno obratiti pozornost na njihov izbor.

## 2.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Mikroorganizmi kvarenja u svježem voću i povrću čine podlogu za pojavu različitih bolesti koje se prenose hranom. Štoviše, rajčica sadrži veliku količinu vode što ju čini osjetljivom na kvarenje uzrokovano prisutnošću i djelovanjem mikroorganizama koji se mogu inaktivirati adekvatnom obradom. Time se smanjuje rizik od oboljenja kod potrošača, ali i produžuje rok trajanja hrane uz očuvanje nutritivne vrijednosti. (Akdemir Evrendilek i sur., 2022; Kalsi i sur., 2022). Ključan korak postizanja mikrobiološke ispravnosti različitih proizvoda na bazi rajčice je pasterizacija, s time da se mikrobna kontaminacija može dogoditi u bilo kojem koraku proizvodnje. Nadalje, rast bakterija i plijesni može negativno utjecati i na organoleptička svojstva proizvoda na bazi rajčice. Zbog svega navedenog, proizvode je potrebno kontinuirano mikrobiološki kontrolirati.

Navedeni mikroorganizmi mogu djelovati u kiselim uvjetima i uključuju *Bacillus coagulans*, nepatogenu bakteriju odgovornu za uobičajeni tip kvarenja soka od rajčice koji pokazuje nekarakterističnu kiselost (Starek i sur., 2021). Iako je nepatogena, zbog sposobnosti povećanja pH vrijednosti kisele hrane može omogućiti klijanje preživjelih *Clostridium* spora (Starek i sur., 2021).

Među brojnim bakterijskim sojevima koji mogu biti odgovorni za kvarenje rajčice navodi se *Escherichia coli*, jedna od rijetkih bakterija s određenim graničnim vrijednostima, ali samo za nepasterizirane sokove od voća i povrća. Navedeno se nalazi u Zakonu o higijeni hrane i

mikrobiološkim kriterijima za hranu, a za oba proizvoda iznosi 100 CFU/g i 1000 CFU/g (NN 83/2022). Vrijednost 100 CFU/g odnosi se na graničnu vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim, dok vrijednost 1000 CFU/g označava dopuštenu graničnu vrijednost iznad koje se svi rezultati ne smatraju zadovoljavajućim.

Također, indikatorom kakvoće hrane smatra se količina aerobnih mezofilnih bakterija koja se može značajno razlikovati u proizvodima od voća i povrća. Količina aerobnih mezofilnih bakterija u soku od rajčice ovisi o higijenskim uvjetima proizvodnje, metodi uzgoja i sorti rajčice, te uvjetima skladištenja (Starek i sur., 2021).

Prisutnost plijesni u hrani predstavlja ozbiljnu opasnost za njezinu sigurnost. U usporedni s bakterijama, smatra se da su plijesni otpornije prema primijenjenom postupku očuvanja mikrobiološke ispravnosti hrane, a tolerantnije su i prema kiselijem mediju. Razlog tomu je njihova građa, odnosno deblja stanična stijenka (Kalsi i sur., 2022; Lepaus i sur., 2023).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Rajčica

Za razvoj funkcionalnih proizvoda na bazi rajčice: (i) sok od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline (ii) sos od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline, polazna sirovina bila je rajčica sorte Volovsko srce. Rajčica je dobivena od tvrtke Ekoprom d.o.o. iz mjesta Bešlinec u Hrvatskoj.

#### 3.1.2. RuBisCO protein i prah masline

Funkcionalni dodatci, RuBisCO protein i prah masline, dobiveni su od projektnih partnera iz Turske. Dodani su u pripremljeni sok i sos od rajčice u udjelima po 2 %. Na uzorcima soka i sosa od rajčice s RuBisCO proteinom i prahom masline, odnosno funkcionalnih proizvoda na bazi rajčice proveden je tretman ultrazvukom visokog intenziteta, toplinski tretman i *hot break* tretman.

#### 3.1.3. Kemikalije

1. Destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. Limunska kiselina (Podravka d.d., Koprivnica, Hrvatska)
3. 50 %-tna otopina limunske kiseline

Priprema: Otopiti limunsku kiselinu u destiliranoj vodi u omjeru 1:2 (w/v)

4. 96 % -tni etanol (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
5. 70 % -tni etanol

Priprema: Odrediti volumen 96 %-tnog etanola iz jednadžbe  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , dodati potrebnu količinu 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu te nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

6. Aceton p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
7. Heksan (Honeywell Riedel-de-Haën, Seelze, Njemačka)
8. Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Burlington, SAD)
9. Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
10. Otopina A - 10 %-tna otopina Folin-Ciocalteu reagensa

Priprema: Dodati 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 90 mL destilirane vode u Falcon



epruvetu te promiješati.

11. Otopina B - 7,5 %-tna otopina natrijevog karbonata

Priprema: Kvantitativno prenijeti izvaganih 7,5 g natrijevog karbonata u odmjernu tikvicu od 100 mL, nadopuniti destiliranom vodom do oznake te promiješati.

12. Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, SAD)

13. DPPH (abcr GmbH, Karlsruhe, Njemačka)

14. Otopina DPPH

Priprema: Kvantitativno prenijeti izvaganih 2,4505 g DPPH u odmjernu tikvicu od 100 mL, nadopuniti destiliranom vodom do oznake te promiješati

15. Trolox®, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija)

### 3.1.4. Uređaji

1. Sokovnik Ultra Juice Merca ZC600 (Tefal, Rumilly, Francuska)

2. Homogenizator GEA Lab Homogenizer PandaPLUS 2000 (Gea Group, Düsseldorf, Njemačka)

3. Tehnička vaga Highland® Portable Precision Balances: HCB 1002 (Adam Equipment, Milton Keynes, Ujedinjeno Kraljevstvo)

4. Analitička vaga NBL.254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)

5. Refraktometar DHR 95 Handheld Refractometer (SCHMIDT + HAENSCH, Berlin, Njemačka)

6. pH-EC metar HI521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska)

7. Ručni homogenizator Tissue Master 125 Homogenizer with 10 mm Probe (OMNI International, Kennesaw, SAD)

8. Magnetska miješalica s mogućnošću zagrijavanja MS-H-S (Dlab, Peking, Kina)

9. Ultrazvučni aparat Q700CA Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)

10. Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

11. Vorteks uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)

12. UV-Vis Spektrofotometar UV-2600i s programskom podrškom LabSolutions UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japan)

### 3.1.5. Laboratorijsko posuđe

1. Pipetman Gilson (200 µL, 1000 µL, 5 mL)

2. Laboratorijska čaša (200 mL, 1000 mL)
3. Laboratorijska špatula
4. Plastična lađice za vaganje
5. Menzura (25 mL, 100 mL)
6. Odmjerna tikvica (25 mL, 100 mL, 200 mL)
7. Kapaljka
8. Stakleni lijevak
9. Falcon epruveta (15 mL, 50 mL)
10. Stalak za epruvete
11. Termometar
12. Sterilna čaša
13. Eppendorf epruveta
14. Kvarcna kiveta
15. Plastična kiveta
16. Plastična posuda

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Priprema funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice**

Priprema funkcionalnih proizvoda na bazi rajčice započeta je s pripremom rajčice, odnosno njezinih plodova. Plodovi rajčice stavljeni su u plastičnu posudu s vrućom vodom na nekoliko sekundi. Zatim su prebačeni u posudu s hladnom vodom kako bi se im lakše uklonila kožica. Rajčica s uklonjenom kožicom upotrijebljena je za dobivanje soka i sosa pomoću sokovnika Ultra Juice Meca ZC600. Željena gustoća soka i sosa od rajčice postignuta je regulacijom ručice na sokovniku na način da je udio pulpe u soku sveden na minimum, a u sosu na maksimum. Sok od rajčice dodatno je razrijeđen dodatkom 300 mL destilirane vode u 400 mL soka. Prije dodavanja funkcionalnih dodataka, sok i sos su homogenizirani pomoću uređaja GEA Lab Homogenizer PandaPLUS 2000 na 1000 bara. Proizvedeni sok i sos trebali su imati pH 4. Zadana vrijednost namještena je dodatkom 50 %-tne otopine limunske kiseline, a promjena pH vrijednosti praćena je pomoću pH-EC metra HI521-02. Kako bi se sok i sos obogatili funkcionalnim sastojcima, u njih je dodano 2 % praha masline i 2 % RuBisCo proteina. Uzorci funkcionalnih proizvoda su zatim homogenizirani pomoću ručnog homogenizatora Tissue Master 125 s 10 mm sondom pri 10000 rpm u trajanju od 30 sekundi.

Tako pripremljeni funkcionalni sok i sos na bazi rajčice raspodijeljeni su u laboratorijske čase po 100 mL nakon čega su bili podvrgnuti tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskom tretmanu ili *hot break* tretmanu. Dodatno, dio soka i sosa ostali su netretirani (kontrolni uzorci). Tretirani i netretirani uzorci soka i sosa raspodijeljeni su u Falcon epruvete tako da je u svaku epruvetu odmjereno po 10 mL uzorka. S obzirom na to da je određivanje fizikalnih parametara, ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti i biljnih pigmenata provedeno nultog i sedmog dana, jedan dio uzoraka analiziran je istog dana, a drugi je skladišten u hladnjaku na +4 °C. Sa svrhom provedbe mikrobiološke analize, u sterilne čase odmjereno je po 40 mL tretiranog i netretiranog uzorka koji su analizirani nultog i sedmog dana skladištenja na +4 °C.

### 3.2.1.1. Označavanje uzoraka

Pripremljeno je 4 uzorka soka i 4 uzorka sosa od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline. Točnije, 1 netretirani (kontrolni uzorak) i 3 tretirana uzorka soka, odnosno sosa. Oznake uzoraka i značenje oznaka navedene su u Tablici 1. U Tablici 2 navedene su dopunske oznake uzoraka, kao i njihovo značenje, a odnose se na vrijeme skladištenja.

**Tablica 1.** Oznake kontrolnih i tretiranih uzoraka te njihovo značenje

Oznaka uzorka	Značenje oznake
CJROP	Kontrolni - netretirani uzorak soka od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline
UJROP	Uzorak soka od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran ultrazvukom visokog intenziteta
TJROP	Uzorak soka od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran toplinskim tretmanom
HBJROP	Uzorak soka od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran <i>hot break</i> tretmanom
CSROP	Kontrolni - netretirani uzorak sosa od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline

**Tablica 1.** Oznake kontrolnih i tretiranih uzoraka te njihovo značenje - *nastavak*

USROP	Uzorak sosa od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran ultrazvukom visokog intenziteta
TSROP	Uzorak sosa od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran toplinskim tretmanom
HBSROP	Uzorak sosa od rajčice s dodatkom RuBisCO proteina i praha masline tretiran <i>hot break</i> tretmanom

**Tablica 2.** Dopunske oznake uzoraka i njihovo značenje

Dopunska oznaka uzorka	Značenje dopunske oznake uzorka
0. dan	Uzorak analiziran nultog dana skladištenja
7. dan	Uzorak analiziran sedmog dana skladištenja

### 3.2.2. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta

Proizvedenom funkcionalnom soku i sosu ispitivan je utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fizikalno-kemijske parametre i na mikrobiološku stabilnost. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta proveden je pomoću ultrazvučnog aparata Q700CA Sonicator s promjerom sonde od 12 mm. Vrijednost amplitude iznosila je 100 % koja se pokazala optimalnom u istraživanju koje je prethodilo ovom radu (Gavran, 2022).

Prije svega, odmjereno je 100 mL uzorka funkcionalnog soka, odnosno sosa u menzuru te je taj volumen prebačen u laboratorijsku čašu. Čaša s uzorkom je zatim stavljena u kućište ultrazvučnog aparata, a u uzorak je pravilno uronjena ultrazvučna sonda i termočlanak. Nakon što je kućište aparata zatvoreno, na LCD ekranu uneseni su parametri tretmana, odnosno amplituda i vrijeme. Amplituda je iznosila 100 %, a vrijeme trajanje tretmana postavljeno je na 3 minute. Ultrazvučni tretman je pokrenut te je na zaslonu praćen porast temperature uzorka. Kada je temperatura dosegla 60 °C, tretman je nakratko zaustavljen, a čaša s uzorkom je prebačena iz aparata u plastičnu posudu s vodom i ledom. Cilj je bio zaustaviti daljnji porast temperature. Čaša koja se nalazila u posudi vraćena je u kućište aparata, uronjena je sonda i nastavljen je ultrazvučni tretman. Ukupno vrijeme provedenog tretmana nakon postignute

temperature iznosio je 3 minute. Funkcionalni uzorak soka ili sosa tretiran ultrazvukom visokog intenziteta raspodijeljen je u dvije označene Falcon epruvete po 10 mL i dvije označene sterilne čaše po 40 mL.

### 3.2.3. Toplinski tretman

Druga vrsta tretmana provedena na uzorcima funkcionalnog soka i sosa bio je toplinski tretman pri temperaturi od 60 °C. Vrijeme trajanja tretmana bilo je također 3 minute. Toplinski tretman predstavlja konvencionalnu metodu pasterizacije koja se razlikuje od nekonvencionalnog postupka obrade hrane, kao što je tretman ultrazvukom. Prema tome, bilo je važno provesti toplinski tretman kako bi se mogli utvrdile razlike u utjecaju tretmana na analizirane parametre.

U laboratorijskoj čaši zagrijano je otprilike 200 mL vode što se postiglo pomoću magnetske miješalice s mogućnošću zagrijavanja MS-H-S. Za to vrijeme, u menzuru je odmjereno 100 mL uzorka funkcionalnog proizvoda i prebačeno u drugu čašu. Kada se voda dovoljno zagrijala, u čašu s vodom postavljena je čaša s uzorkom zajedno s termometrom. Na termometru je praćen porast temperature sve do 60 °C kada je započeto konstantno miješanje uzorka u trajanju od 3 minute. Nakon što su 3 minute prošle, čaša s uzorkom izvađena je iz zagrijane vode. Na kraju toplinskog tretmana, uzorak je raspodijeljen u Falcon epruvete i sterilne čaše. Po 10 mL tretiranog uzorka odvojeno je u dvije označene Falcon epruvete, a po 40 mL u dvije označene sterile čaše.

### 3.2.4. *Hot break* tretman

Uz toplinski tretman, još jedna vrsta konvencionalne pasterizacije provedene na uzorku funkcionalnog soka ili sosa je *hot break* tretman. To je tretman koji je proveden u dva koraka. U prvom koraku postignuta je temperatura pasterizacije od 85 °C koja je zadržana 3 minute, a u drugom koraku uzorak je hlađen u ledenoj vodi kroz 9 minuta.

U laboratorijsku čašu odmjereno je otprilike 200 mL vode te je sadržaj čaše zagrijan na magnetskog miješalici s mogućnošću zagrijavanja MS-H-S koja je namještena na 90 °C. Dok se voda zagrijavala, u menzuri je odmjereno 100 mL uzorka i prebačeno u drugu čašu. Pomoću termometra izmjerena je početna temperatura uzorka koja je trebala iznositi oko 20 °C. Čaša s uzorkom zatim je postavljena u vodu zagrijanu na 90 °C te je započeto miješanje. Uzorak je miješan oko 11 minuta. Kada je temperatura centra uzorka izmjerena termometrom dosegla

85 °C, započeto je miješanje od 3 minute. Nakon završetka prvog koraka, čaša s tretiranim uzorkom prebačena je u plastičnu posudu s hladnom vodom i ledom. Time je započet drugi korak *hot break* tretmana tijekom kojeg je uzorak konstantno miješan 9 minuta. Uzorak funkcionalnog soka, odnosno sosa tretiran *hot break* tretmanom raspodijeljen je u dvije označene Falcon epruvete po 10 mL i dvije označene sterilne čaše po 40 mL.

### 3.2.5. Fizikalni parametri

Osim što se vrijednost pH mjerila tijekom pripreme soka i sosa, navedeni fizikalni parametar, uz mjerenje električne vodljivosti i °Brix-a, određivao se i nakon toplinskog tretmana, *hot break* tretmana i tretmana ultrazvukom visokog intenziteta. Također, svi fizikalni parametri izmjereni su i tijekom sedmog dana skladištenja uzoraka.

#### 3.2.5.1. Određivanje pH vrijednosti

Netretiranom uzorku i tretiranim uzorcima funkcionalnog soka i sosa izmjerena je pH vrijednost pomoću pH-EC metra HI521-02. To je postignuto uranjanjem staklene elektrode u Falcon epruvetu s 10 mL uzorka. Mjerenje pH provedeno je pri sobnoj temperaturi.

#### 3.2.5.2. Određivanje električne vrijednosti

Električna vodljivost funkcionalnog sosa i sosa određena je pomoću elektrode za mjerenje električne vodljivosti, pri čemu se koristio pH-EC metar HI521-02. Sonda je uronjena u 10 mL uzorka koji se nalazi u Falcon epruveti, a rezultat prikazan na zaslonu uređaja izražen je u  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 3.2.5.3. Određivanje °Brix-a

Uzorcima funkcionalnog soka i sosa određeni su °Brix-a pomoću refraktometra DHR 95. Mjerenje je provedeno postavljanjem kapi uzorka na leće refraktometra nakon čega je na zaslonu uređaja prikazana izmjerena vrijednost.

### 3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u tretiranim i netretiranim uzorcima funkcionalnog soka ili sosa korištena je modificirana Folin-Ciocalteu metoda temeljena na metodi Singleton i Rossi (1965). Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije ukupnih fenola provedeno je pomoću spektrofotometra UV-Vis Spektrofotometar UV-2600i s programskom podrškom LabSolutions UV-Vis. Prije postupka mjerenja, ova metoda zahtijevala je pripremu

uzoraka i izradu baždarnog dijagrama.

#### *3.2.6.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije ukupnih fenola ekstrakcijskom metodom*

Na tehničkoj vagi HCB 1002 Balance odvagano je 2 g uzorka funkcionalnog soka ili sosa u Falcon epruvetu, dok je u menzuri odmjereno 15 mL 70%-tnog etanola. 70%-tni etanol pripremljen je na način opisan u potpoglavlju 3.1.3. Etanol je prebačen u epruvetu s uzorkom te je sadržaj epruvete homogeniziran s ručnim homogenizatorom Tissue Master 125 pri 14000 rpm u trajanju od 30 sekundi do 1 minute. Tako pripremljen uzorak postavljen je u centrifugu Eppendorf 5430 gdje je uz primjenu 5000 rpm nakon 5 minuta izdvojeni supernatant prenesen u novu Falcon epruvetu. Supernatant, odnosno uzorak dobiven ekstrakcijskom metodom upotrijebljen je za mjerenje nultog dana. Za mjerenje sedmog dana nanovo je ponovljen cijeli postupak na uzorcima koji su skladišteni na +4 °C u hladnjaku.

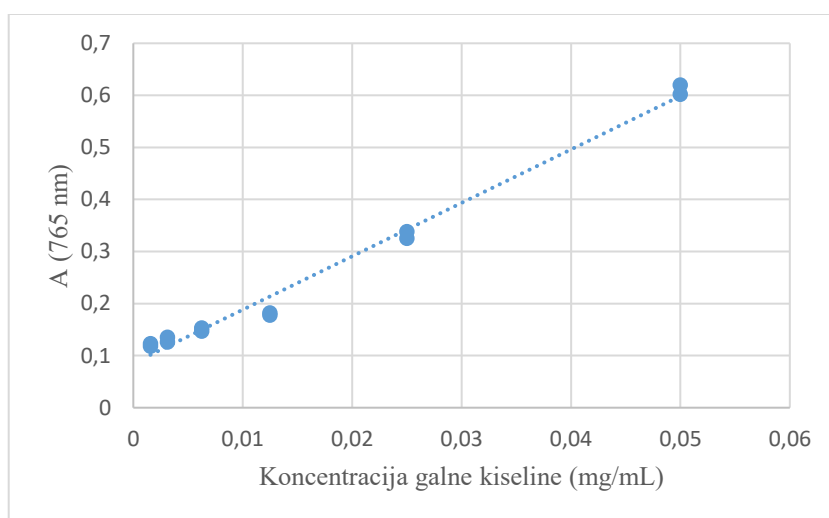
#### *3.2.6.2. Postupak određivanja koncentracije ukupnih fenola*

Određivanje koncentracije ukupnih fenola započeto je postavljanjem reakcijskih smjesa u dvije paralele. Prije toga, pripremljene su Otopina A i otopina B prema postupku objašnjenom u potpoglavlju 3.1.3. U Eppendorf epruvetu redom je otpipetirano 1000 µL otopine A, 200 µL prethodno promiješanog uzorka i 800 µL otopine B. Na jednak način pripremljena je slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala 200 µL 70%-tnog etanola. U oba slučaja, sadržaj Eppendorf epruvete promiješan je na vorteks uređaju MX-S te je zaštićen od svijetla. Odvijanje reakcije provedeno je u tami u trajanju od 30 minuta nakon čega su uzorci preneseni u centrifugu Eppendorf 5430 gdje su centrifugirani 5 minuta pri 5000 rpm. Nakon centrifugiranja je izdvojen supernatant koji je korišten za mjerenje apsorbancije u odnosu na slijepu probu pri 765 nm na UV/Vis spektrofotometru. Tijekom mjerenja su korištene kvarcne kivete. Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao mg EGK/ mL (ekvivalent galne kiseline, EGK) jer je kao standard korištena galna kiselina, a izračunata je pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama.

#### *3.2.6.3. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih fenola*

Za izradu baždarnog dijagrama prvo je bilo potrebno otopiti galnu kiselinu u 70 %-tnom etanolu u odmjerenoj tikvici. Time je dobivena standardna otopina galne kiseline koncentracije 0,1 mg/mL. Iz standardne otopine galne kiseline pripremljene su ostale otopine galne kiseline čije su koncentracije bile 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125 i 0,0015625 mg/mL. Slijedila je priprema reakcijskih smjesa u paralelama. U Eppendorf epruvetu redom je otpipetirano 1000

$\mu\text{L}$  otopine A, 200  $\mu\text{L}$  otopine galne kiseline poznate koncentracije i 800  $\mu\text{L}$  otopine B. Slijepa proba je umjesto otopine galne kiseline sadržavala 200  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola. Nakon vorteksiranja sadržaja epruvete slijedilo je odvijanje reakcije u tami kroz 30 minuta. Reakcijske smjese su zatim centrifugirane 5 minuta pri 5000 rpm. Na kraju centrifugiranja, supernatant je prebačen u kvarcne kivete. Kvarcne kivete sa supernatantom postavljene u UV/Vis spektrofotometar pomoću kojeg je izmjerena apsorbancija pri 765 nm. Izmjerene apsorbancije (ordinata) i poznate koncentracije galne kiseline (apscisa) služile su za izradu baždarnog dijagrama (Slika 1) u programu Microsoft Excel 365.



**Slika 1.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Dobivena je jednadžba pravca pomoću koje su izračunate nepoznate koncentracija ukupnih fenola u uzorcima funkcionalnog soka i sosa:

$$y = 10,263x + 0,0855 \quad R^2 = 0,9885 \quad [1]$$

gdje je  $y$  izmjerena vrijednost apsorbancije otopine galne kiseline,  $x$  poznata koncentracija otopine galne kiseline izražena u mg/mL, a  $R^2$  koeficijent determinacije.

### 3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost tretiranih i netretiranih uzoraka funkcionalnog soka i sosa određena je DPPH metodom. Točnije, prema metodi Brand-Williams i sur. (1995), ali s modifikacijama kako je bilo navedeno u uputama partnera projekta. Mjerenje je provedeno pomoću UV-Vis spektrofotometra UV-2600i s programskom podrškom LabSolutions UV-Vis, a tomu je prethodila priprema uzorka i izrada baždarnog dijagrama. Uzorci za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljeni su metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.6.1



### 3.2.7.1. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

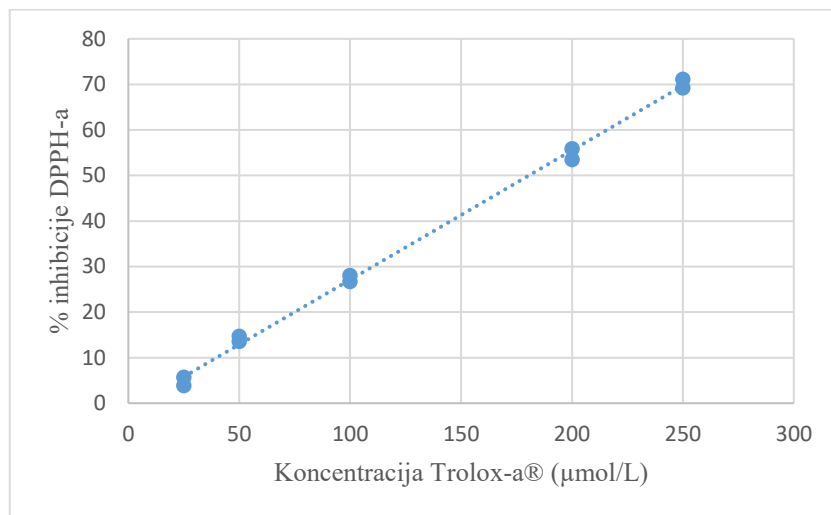
Prvo je bilo potrebno pripremiti otopinu DPPH-a kako je navedeno je u potpoglavlju 3.1.3. Zatim je u Eppendorf epruvete otpipetirano 1850  $\mu\text{L}$  otopine DPPH-a i 150  $\mu\text{L}$  prethodno promiješanog uzorka. Za slijepu probu je umjesto uzorka otpipetirano 150  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola. Reakcijske smjese pripremljene su u paralelama, a slijepa proba ih je imala 3. Sve reakcijske smjese su nakon pipetiranja promiješane na vorteks uređaju. Reakcija se zatim odvijala 30 minuta u tami. Slijedilo je spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 515 nm, a za mjerenje su korištene plastične kivete. Očitavanje apsorbancije svakog uzorka i slijepa probe provedeno je 3 puta, a konačna vrijednost apsorbancije iskazana je kao srednja vrijednost. Dobivene vrijednosti apsorbancije unesene su u formulu za izračunavanje postotka inhibicije DPPH-a:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} - a = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100 \quad [2]$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija slijepa probe, a  $A_1$  apsorbancija uzorka. Nakon izračuna postotka inhibicije DPPH-a, antioksidacijska aktivnost određena je iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama i izražena kao  $\mu\text{mol ET/ L}$  (ekvivalent Trolox-a, ET).

### 3.2.7.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje antioksidacijske aktivnosti

U odmjernim tikvicama pripremljene su otopine Trolox-a čije su koncentracije iznosile 25, 50, 100, 200 i 250  $\mu\text{mol/L}$ . Priprema otopina Trolox-a poznatih koncentracija uključivala je otapanje Trolox-a u 96 %-tnom etanolu. Slijedilo je postavljanje reakcija u paralelama tako što se u Eppendorf epruvete pipetiralo 1850  $\mu\text{L}$  otopine DPPH-a i 150  $\mu\text{L}$  otopine Trolox-a određene koncentracije, dok je u slijepu probu umjesto otopine Trolox-a pipetirano 150  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola. Nakon pipetiranja, sadržaj epruvete promiješan je na Vortex uređaju i odložen na tamno mjesto. Uzorci za mjerenje apsorbancije bili su zaštićeni od svjetla tijekom odvijanja reakcije koje je trajalo 30 minuta nakon čega su prebačeni u plastične kivete. Plastične kivete s uzorcima postavljene su u UV/Vis spektrofotometar pomoću kojeg je uzorcima izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 515 nm. Dobivene apsorbancije uvrštene su u formulu za izračunavanje postotka inhibicije DPPH-a [2], a izračunate vrijednosti unesene su u program Microsoft Excel 365. Iz izračunatog postotka inhibicije DPPH-a (ordinata) i poznatih koncentracija otopine Trolox-a (apscisa), konstruiran je baždarni dijagram (Slika 2).



**Slika 2.** Baždarni dijagram ovisnosti postotka inhibicije DPPH-a o koncentraciji Trolox-a®

Dobivena je jednačba pravca baždarnog dijagrama:

$$y = 0,2841x - 1,3067 \quad R^2 = 0,9975 \quad [3]$$

gdje je  $y$  postotak inhibicije DPPH-a,  $x$  koncentracija otopine Trolox-a izraženu u  $\mu\text{mol/L}$ , a  $R^2$  koeficijent determinacije.

### 3.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije biljnih pigmenata

Koncentracija biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog soka i sosa određena je prema metodi Nagata i Yamashita (1992), a prema uputama partnera projekta. Mjerenje koncentracije provedeno je na UV-Vis spektrofotometru UV-2600i s programskom podrškom LabSolutions UV-Vis. Biljni pigmenti čiji se sadržaj određivao su klorofil  $a$ , klorofil  $b$ , likopen i  $\beta$ -karoten. Njihova apsorbancija mjerena je na 4 različite valne duljine i u isto vrijeme zahvaljujući softverskom programu spektrofotometra koji to omogućava. Mjerenju apsorbancije prethodila je priprema uzorka koja je jednaka za sve ispitivane pigmente, odnosno isti uzorak korišten je za sva 4 mjerenja.

#### 3.2.8.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije biljnih pigmenata

Određivanje sadržaja biljnih pigmenata započeto je izdvajanjem supernatanta ekstrakcijskom metodom. Na tehničkoj vagi odvagano je 1 g uzorka funkcionalnog soka ili sosa u Falcon epruvetu. U epruvetu s uzorkom dodano je 10 mL prethodno pripremljenog otapala koji se sastoji od acetona i heksana u omjeru 2:3. Slijedila je homogenizacija smjese s ručnim homogenizatorom Tissue Master 125 na 10000 rpm u trajanju od 30 sekundi do 1 minute. Nakon

određenog vremena došlo je do razdvajanja smjese u dvije različite faze pri čemu je gornja, organska faza korištena za određivanje koncentracije biljnih pigmenata.

### 3.2.8.2. Postupak određivanja koncentracije biljnih pigmenata

Supernatant nastao ekstrakcijskom metodom izdvojen je pomoću pipetmana Gilson u plastičnu kivetu. Kiveta s ekstrahiranim pigmentima postavljena je u UV/Vis spektrofotometar na kojem je mjerena apsorbancija ispitivanih pigmenata. Apsorbancije pigmenata mjerene su pri valnim duljinama od 663, 645, 505 i 453 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala smjesu acetona i heksana u omjeru 2:3. Na svakom uzorku provedeno je 5 mjerenja, a konačna vrijednost apsorbancije je iskazana kao srednja vrijednost svih mjerenja. Za računanje koncentracije pojedinih biljnih pigmenata korištena su zadane jednadžbe:

$$\text{Klorofil } a = 0,999 * A_{663} - 0,0989 * A_{645} \quad [4]$$

$$\text{Klorofil } b = -0,328 * A_{663} + 1,77 * A_{645} \quad [5]$$

$$\text{Likopen} = -0,0458 * A_{663} + 0,204 * A_{645} + 0,372 * A_{505} - 0,0806 * A_{453} \quad [6]$$

$$\beta - \text{karoten} = 0,216 * A_{663} - 1,22 * A_{645} - 0,304 * A_{505} + 0,452 * A_{453} \quad [7]$$

gdje su  $A_{663}$ ,  $A_{645}$ ,  $A_{505}$ ,  $A_{453}$  izmjerene apsorbancije pri valnim duljinama od 663, 645, 505 i 453 nm. Nakon uvrštavanja izmjerenih vrijednosti apsorbancija u jednadžbe, dobivene su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, likopena i  $\beta$ -karotena. Koncentracije ispitivanih pigmenata izražene su kao mg/100 mL uzorka.

### 3.2.9. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološku analizu uzoraka funkcionalnog soka i sosa odradio je akreditirani laboratorij, odnosno Odjel za mikrobiologiju hrane i predmeta opće uporabe. Odjel je smješten u Centru za kontrolu namirnica Prehrambenog-biotehnološkog fakulteta gdje su uzorci dostavljeni 0. i 7. dana skladištenja u označenim sterilnim plastičnim čašama s čepom na navoj.

Analize kontrolnih i tretiranih uzoraka provedene su prema standardnim ISO metodama koje su jedinstvene za svaki mikroorganizam. Za mikrobiološko ispitivanje korišten je 1,0 g uzorka, a rezultat analize izražen je u CFU/g uzorka. Analize su započete pripremom osnovnog razrjeđenja ( $10^{-1}$ ) uzorka gdje je korištena puferirana peptonska voda pripremljena u omjeru 1:10. Nakon toga, svaka vrsta mikroorganizma uzgojena je na posebnoj hranjivoj podlozi i pod određenim parametrima inkubacije. Iz rezultata analize izračunata je redukcija pojedinih

mikroorganizama pomoću jednadžbe:

$$\text{redukcija mikroorganizma} = \frac{N}{N_0} \quad [8]$$

gdje je  $N$  koncentracija mikroorganizma u tretiranom uzorku, a  $N_0$  koncentracija mikroorganizma u kontrolnom uzorku. Redukcija ispitivanog mikroorganizma izražena je u log CFU/g.

### 3.2.9.1. *Escherichia coli*

Ispitivanje prisutnosti bakterije *E. coli* u uzorcima provedeno je prema metodi HRN ISO 1664-2:2001. Za uzgoj je upotrijebljen Trypton žučni X-glukuronid (TBX) agar. Priprema ove hranjive podloge započeta je otapanjem 20 g triptona, 1,5 g žučnih soli, 75 g BCIG-a (5-brom-4-klor-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronat) i 9 g agara u 1 L destilirane vode. Za potpuno otapanje svih tvari bilo je potrebno kuhati hranjivi medij uz konstantno miješanje. Vrući medij je zatim presipan u epruvete ili bočice, steriliziran u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121 °C te ohlađen na 47-50 °C kako bi medij ostao tekući. U Petrijevu zdjelicu odmjereno je 1 mL prethodno razrijeđenog uzorka te 15 mL pripremljenog TBX agara. Sadržaj zdjelice je promiješan, ohlađen te inkubiran pri 44 °C na 24 h. Na kraju provedene metode miješanja uzorka s tekućim agarom (engl. *Pour plate*), količina soja *E. coli* određena je brojanjem kolonija.

### 3.2.9.2. *Aerobne mezofilne bakterije*

Analiza aerobnih mezofilnih bakterija (engl. *Total plate count*, TPC) u uzorcima provedena je prema metodi HRN EN ISO 4833-1:2013. Za uzgoj aerobnih mezofilnih bakterija upotrijebljen je Plate count agar (PCA). Priprema ove hranjive podloge uključivala je otapanje 5 g triptona, 2,5 g ekstrakta kvasca, 1 g glukoze i 12 g agara u 1 L destilirane vode. Hranjivi medij je zatim kuhan uz konstantno miješanje pri čemu su otopljeni svi prisutni sastojci. Vrući medij je presipan u epruvete ili bočice, steriliziran u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121 °C te ohlađen na 44-47 °C. U Petrijevu zdjelicu odmjereno je 1 mL prethodno razrijeđenog uzorka te 15 mL pripremljenog PCA agara. Sadržaj zdjelice je promiješan, ohlađen te inkubiran pri 30 °C na 72 h. Prema potrebi, prije inkubacije dodan je sloj sterilnog agara na površinu inokuliranog uzorka. Na kraju provedene metode miješanja uzorka s tekućim agarom (engl. *Pour plate*), količina aerobnih mezofilnih bakterija određena je brojanjem kolonija.

### 3.2.9.3. Plijesni

Analiza plijesni (engl. *Total mold count, TMC*) u uzorcima provedena je prema metodi HRN ISO 21527-1:2012. Za uzgoj plijesni upotrijebljen je Dikloran-Rose Bengal-kloramfenikolni (DRBC) agar čiji je sastav naveden u Prilogu 1. Navedene kemikalije su potpuno otopljene u 1 L destilirane vode što je postignuto miješanjem i naknadnim kuhanjem. Tako pripremljena smjesa sterilizirana je u autoklavu na 15 minuta pri 121 °C. Sterilizirana hranjiva podloga je zatim izlivena u Petrijeve zdjelice te ohlađena na dovoljno nisku temperaturu kako bi agar prešao u kruto stanje. Slijedilo je provođenje metode razmazivanja 1 mL uzorka po površini krute hranjive podloge (engl. *Spread plate*) te inkubacija plijesni pri 25 °C u trajanju od 105 h. Na kraju su brojane kolonije.

### 3.2.9.4. *Bacillus coagulans*

Analiza bakterije *Bacillus coagulans* u uzorcima provedena je prema metodi koju je opisalo Američko društvo za mikrobiologiju. Za uzgoj je upotrijebljen de Man, Rogosa i Sharpe (MRS) agar te Triptikaza-sojin agar (TSA). Sastav MRS agara prikazan je u Prilogu 2 te je prema njemu pripremljena hranjiva podloga, odnosno navedene kemikalije otopljene su u destiliranoj vodi uz dodatak 1 mL Tween 80 nakon čega je volumen dopunjen vodom do 1 L. S druge strane, priprema TSA agara, uključivala je otapanje 15 g triptonskog peptona, 5 g Phytone™ peptona, 5 g natrijevog klorida i 15 g agara u 1 L destilirane vode. Obje hranjive podlogu su zatim kuhane sve dok se svi sastojci nisu u potpunosti otopili. Nakon kuhanja, podloge su autoklavirane pri 121 °C na 15 minuta, izlivena u Petrijeve zdjelice te ohlađene. Zatim je provedena metoda razmazivanja 1 mL uzorka po površini krute hranjive podloge (engl. *Spread plate*). Uzorak je nanesen na MRS agar s ciljem određivanja koncentracije *Bacillus coagulans*, a na TSA agar s ciljem potvrđivanja prisutnosti tog soja (na MRS agaru rastu nespecifične kolonije). Na kraju je provedena inkubacija pri 30 °C u trajanju od 72 do 105 h nakon čega su kolonije pobrojane.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu razvijeni su funkcionalni sok i sos na bazi rajčice uz dodatak RuBisCO proteina i praha masline. Funkcionalni dodaci dobiveni su iz otpada prerade masline, odnosno šećerne repe te je istražen njihov utjecaj na povećanje nutritivne vrijednosti proizvoda. Svaki uzorak funkcionalnog proizvoda tretiran je jednim od tri ispitivana tretmana. To su tretman ultrazvukom visokog intenziteta pri amplitudi od 100 %, temperaturi od 60 °C i vremenom trajanja od 3 minute, toplinski tretman pri 60 °C i vremenom trajanja od 3 minute i *hot break* tretman pri 85 °C i vremenom trajanja od 3 minute. Ultrazvuk predstavlja zelenu tehniku obrade hrane te doprinosi održivosti proizvoda, stoga je ispitivana njegova primjena u razvoju funkcionalnog soka i sosa. Također, analiziran je utjecaj pojedinih tretmana na fizikalne (pH, električna vodljivost, °Brix-a) i kemijske parametre (koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost, koncentracija biljnih pigmenata) te na mikrobiološku ispravnost proizvoda. S obzirom na vrstu provedenog tretmana, utvrđena je stabilnost i zdravstvena ispravnost proizvoda tijekom skladištenja.

Vrijednosti pH i električne vodljivost izmjerene su pomoću pH-EC metra, a °Brix-a uz primjenu refraktometra. Rezultati mjerenja prikazani su grafički (Slika 3 i 4).

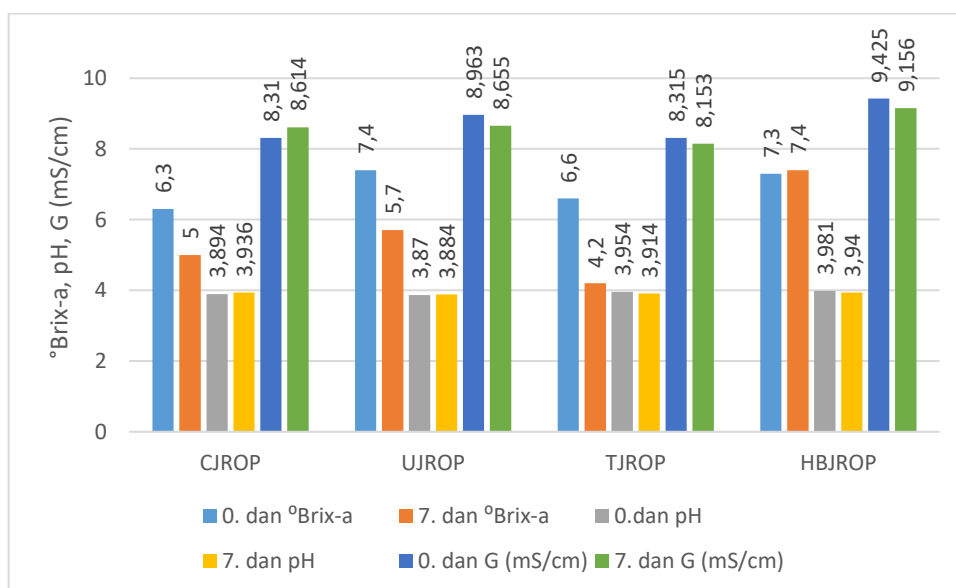
Određivanje ukupnih fenola provedeno je prema modificiranoj Folin-Ciocalteu metodi, mjerenjem apsorbancije pri 765 nm. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je modificirana DPPH metoda, pri čemu je apsorbancija mjerena pri 515 nm. Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija, a antioksidacijska aktivnost kao srednja vrijednost šest paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Mjerenje apsorbancije biljnih pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b*, likopen,  $\beta$ -karoten) provedeno je istodobno pri valnim duljinama od 663, 645, 505 i 645 nm. Koncentracije biljnih pigmenata izračunate su korištenjem seta jednadžbi te su izražene kao srednje vrijednosti pet paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Sva mjerenja provedena su spektrofotometrijski, a rezultati su prikazani tablično (Tablica 3 - 8).

Mikrobiološka analiza (*E. coli*, aerobne mezofilne bakterije, plijesni, *Bacillus coagulans*) funkcionalnih proizvoda provedena je prema standardiziranim ISO metodama. Rezultati mikrobiološke analize prikazani su tablično (Tablica 9 i 10). Iz rezultata analize izračunat je log redukcije pojedinih mikroorganizama (aerobne mezofilne bakterije i plijesni) čiji su rezultati također prikazani tablično (Tablica 11).

## 4.1. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA FIZIKALNE PARAMETRE

### 4.1.1. Promjene fizikalnih parametara funkcionalnog soka na bazi rajčice

Rezultati određivanja fizikalnih parametara kontrolnih, netretiranih i tretiranih uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice prikazani su grafički na Slici 3. Kontrolom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom izmjereni su pH vrijednost, električna vodljivost (G) i °Brix-a. Fizikalni parametri uzoraka izmjereni su na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.



**Slika 3.** Grafički prikaz rezultata mjerenja fizikalnih parametara uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Kod svih tretiranih uzoraka funkcionalnog soka povećana je vrijednost °Brix-a, a najveće povećanje (17,5 %) uočeno je kod UJROP uzorka. Tijekom ultrazvučne kavitacije nastaju šok valov i visoko smicanje koji oštećuju staničnu stijenku i tkivo voća što rezultira difuzijom vode u stanice ploda. Osim toga, nekoliko istraživanja su pokazala da učinci prijenosa mase nastalih uslijed kavitacije ubrzavaju difuziju čime se povećava količina otopljenih tvari (Nadeem i sur., 2018). Djelovanjem ultrazvuka dolazi i do migracije makromolekula iz stanica u sok, posebno spojeva šećera (Kahraman i Feng, 2021). Sve navedeno opravdava veću vrijednost °Brix-a UJROP uzorka u odnosu na kontrolni uzorak. Dobiveni rezultati prikazani na Slici 3 u skladu su s rezultatima iz sličnih istraživanja. Povećanje °Brix-a uočeno je kod uzoraka soka od breskve tretiranih ultrazvukom pri amplitudi od 100 % i temperaturi od 60 °C i toplinskim tretmanom

pri 70 °C u trajanju od 10 minuta (Baltacioğlu, 2022). Nadalje, vrlo slično povećanje °Brix-a nakon *hot break* tretmana (80 °C, 5 min) uočeno je kod uzoraka soka od grožđa (Silva i sur., 2019). Vrijednost °Brix-a povećava se porastom temperature, a razlog tomu može biti porast koncentracije soka uzrokovan isparavanjem vode (Baltacioğlu, 2022). Za razliku od tretmana, skladištenje je imalo značajniji utjecaj na vrijednost °Brix-a. Jedina iznimka je HBJROP uzorak kod kojeg je nakon sedam dana skladištenja zabilježena gotovo jednaka vrijednost. Kod svih drugih uzoraka primijećeno je značajno smanjenje, posebno u TJROP uzorku kod kojeg je zabilježeno smanjenje od 36,4 %. Smanjenje vrijednosti °Brix-a tijekom skladištenja dokazali su Kahraman i Feng (2021) na uzorcima soka od mrkve i grožđa tretiranim ultrazvukom pri istim parametrima. Razlog je fermentacija šećera koja se odvija tijekom skladištenja (Nadeem i sur., 2018). Slično je opaženo i kod uzoraka soka od šećerne trske pasteriziranih pri 65 °C gdje je ova pojava direktno povezana s djelovanjem mikroorganizama (Dhansu i sur., 2023) koji koriste šećer za svoj rast tako što ga fermentiraju (Lepaus i sur., 2023).

Vrijednost pH kod svih tretiranih uzoraka soka kreće se u rasponu od 3,87 do 3,95 te je slična kontrolnom uzorku. Utjecaj ultrazvuka na pH soka je oprečan te se povezuje sa stvaranjem novih kemijskih spojeva u soku kao posljedica djelovanja ultrazvuka (Kahraman i Feng, 2021). Međutim, smatra se da efekt kavitacije nije dovoljan za povećanje koncentracije H<sup>+</sup> iz soka od rajčice. Prema tome, nakon tretmana ne dolazi do značajnih promjena pH voćnih sokova, uključujući sok od rajčice na kojem je primijenjena hidrodinamička kavitacija (Cruz i sur., 2023; Kalsi i sur., 2022; Vigneshwaran i sur., 2022). Očuvanje ovog fizikalnog parametra u uzorcima soka od naranče i mrkve, osim nakon tretmana ultrazvukom pri 60 °C i vremenom trajanja od 5 i 10 minuta, zabilježeno je i nakon toplinskog tretmana pri 90 °C u trajanju od 30 sekundi (Lepaus i sur., 2023). Do značajnih promjena nije došlo ni kod uzorka soka od grožđa poslije *hot break* tretmana (Silva i sur., 2019). Vrijednosti pH između svih uzoraka analiziranih nultog i sedmog dana skladištenja razlikovale su se neznatno. U soku od šećerne trske također nije došlo do promjene pH vrijednosti tijekom skladištenja (Dhansu i sur., 2023). Kao razlog autori navode antioksidacijsku aktivnost soka, kao i moguće smanjenje mikrobne aktivnosti. Sukladno svemu navedenom, dobiveni rezultati pH vrijednosti prikazani na Slici 3 u skladu su s rezultatima iz sličnih istraživanja.

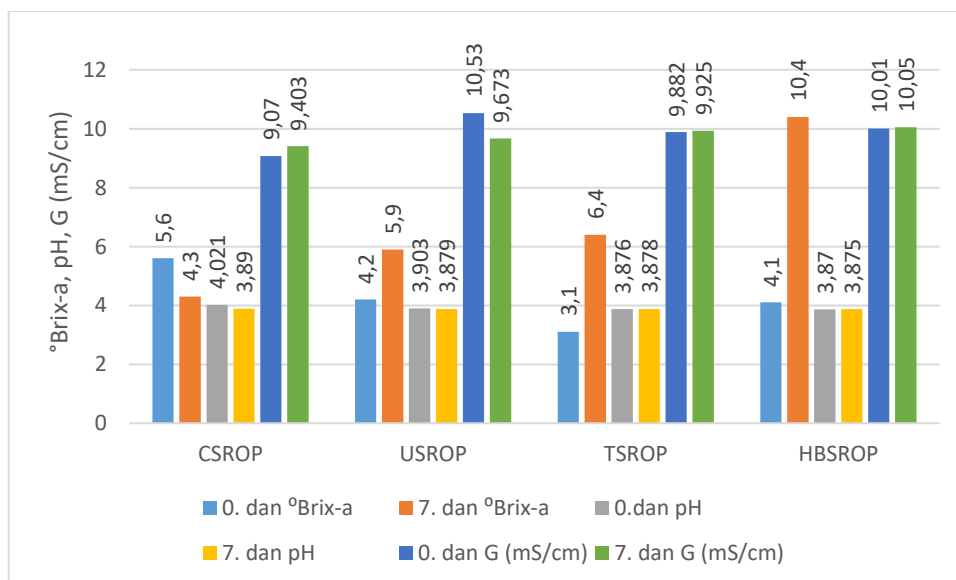
Električna vodljivost soka uvjetovana je procesom zagrijavanja, točnije temperaturom (Ghinea i sur., 2022), te je bila veća kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak. Najveće povećanje uočeno je kod HBJROP uzorka kod kojeg je ujedno primijenjena i



najviša temperatura. U skladu s time, u istraživanju Ghinea i sur. (2022) navedena je veća vrijednost električne vodljivosti soka od jabuke pasteriziranog pri 90 °C, u odnosu na hladno prešani. Porast električne vodljivosti nakon tretmana ultrazvukom uočena je i kod soka od grejpa (Aadil i sur., 2013). Autori smatraju da je to posljedica povećanja sadržaja vitamina i minerala u tretiranom soku. S druge strane, kod svih tretiranih uzoraka zabilježeno je blago smanjenje električne vodljivosti tijekom skladištenja. Dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjem Aadil i sur. (2014) u kojem je prijavljen pad električne vodljivosti ultrazvučno tretiranog soka od grejpa (28 kHz, 20 °C, 30 min) tijekom skladištenja. U istom istraživanju smanjenje je opravdano degradacijom nutrijenata odgovornih za električnu vodljivost.

#### 4.1.2. Promjene fizikalnih parametara funkcionalnog sosa na bazi rajčice

Rezultati određivanja fizikalnih parametara uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice prikazani su grafički na Slici 4. Netretiranim uzorcima i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom izmjereni su pH vrijednost, električna vodljivost i °Brix-a. Fizikalni parametri uzoraka izmjereni su na dan pripreme te nakon skladištenja pri +4 °C u trajanju od 7 dana.



**Slika 4.** Grafički prikaz rezultata mjerenja fizikalnih parametara uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Kod svih tretiranih uzoraka sosa zabilježene su manje vrijednosti °Brix-a u odnosu na kontrolni uzorak. Smanjenje °Brix-a nakon tretmana ultrazvukom može se pripisati mogućem padu u razgradnji organskih kiselina i sadržaja stanične stijenke kao rezultat smanjenog

metabolizma voća i inaktivacije enzima (Kalsi i sur., 2022). Razlog smanjenja može biti i odvijanje kemijskih reakcija kao što su hidroliza, oksidacija i Maillard-ove reakcije koje dovode do degradacije šećera (Silva i sur., 2020). Do navedenih reakcija može doći i primjenom povišenih temperatura što opravdava smanjenje °Brix-a kod TSROP i HBSROP uzoraka. Međutim, rezultati prikazani na Slici 4 nisu u skladu s rezultatima iz sličnih istraživanja. Tretman ultrazvukom visoke snage (286-312 W, 35 kHz) u kojem je temperatura držana ispod 65 °C ne uzrokuje značajne promjene °Brix-a u uzorcima pulpe rajčice (Oboulbiga i sur., 2020). Neznačajne promjene prijavljene su i tijekom fizikalne analize uzorka sosa od jagode tretiranog toplinskim tretmanom pri 65 °C, kao i uzorka pulpe rajčice tretirane pri 85 °C (Oboulbiga i sur., 2020; Sulaiman i sur. 2017). Nadalje, smanjenje °Brix-a tijekom skladištenja opaženo je kod kontrolnog uzorka, a isti trend zabilježen je i kod netretirane pulpe rajčice (Oboulbiga i sur., 2020). S druge strane, povećanje °Brix-a 7. dana skladištenja u odnosu na 0. dan opaženo je kod svih tretiranih uzoraka. Najveći porast primijećen je kod HBSROP uzorka (153,7 %), a najmanje promjene vrijednosti među svim tretiranim uzorcima u USROP uzorku. U svakom slučaju, promjene °Brix-a mogu biti uzrokovane različitim kemijskim reakcijama uključujući hidrolizu, oksidaciju, fermentaciju i raspadanje kemijskih spojeva (Oboulbiga i sur., 2020).

Dobiveni rezultati prikazani na Slici 4 pokazuju da je maksimalna pH vrijednost (4,021) postignuta kod kontrolnog uzorka te da je pH blago pala nakon pojedinih tretmana, s time da su uočene promjene neznatne. Također, ne postoje značajnije razlike između tretiranih uzoraka u kojima se pH kreće u rasponu od 3,870 do 3,903. Slični rezultati dobiveni su u istraživanjima u kojima je ispitan utjecaj tretmana ultrazvukom i toplinskog tretmana na pH vrijednost uzoraka sosa od jagode i pulpe rajčice (Oboulbiga i sur., 2020; Cheng i sur., 2014). Najmanji utjecaj tretmana na smanjenje pH uočen je kod USROP uzorka. Međutim, kod istog uzorka zabilježen je blagi pad pH vrijednosti tijekom skladištenja, dok su u ostalim tretiranim uzorcima vrijednosti ostale jednake. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima iz prethodnih istraživanja prema kojima ne dolazi do promjene pH vrijednosti toplinski tretiranog uzorka sosa od jagode (65 °C, 15 min) tijekom 7 dana skladištenja pri 3 °C, kao i uzorka pulpe rajčice (85 °C, 15 min) skladištene do 45 dana (Oboulbiga i sur., 2020; Sulaiman i sur. 2017). Najveća promjena, odnosno pad pH vrijednosti prisutan je kod kontrolnog, netretiranog uzorka. Prema Lepaus i sur. (2023), pad pH vrijednosti i °Brix-a u kontrolnom uzorku razlog je mikrobne aktivnosti do koje dolazi uslijed fermentacije šećera ili značajnih enzimskih promjena.

Kod svih tretiranih uzoraka uočena je veća električna vodljivost u usporedni s kontrolnim

uzorkom, a najveće povećanje očituje se kod USROP uzorka. Značajan porast električne vodljivosti zabilježen je u ranije spomenutim uzorcima sosa od jagode, uspoređujući ih s kontrolnim uzorkom. Pritom su uzorci bili tretirani ultrazvukom visoke snage različitog intenziteta (amplituda od 10, 30 i 50 %) i trajanja (10, 20 i 30 min) te pasterizacijom pri 90 °C (Cheng i sur., 2014). Uzroci povećanja električne vodljivosti mogu biti strukturalne promjene makromolekula i olakšano oslobađanje minerala tijekom provođenja tretmana (Cheng i sur., 2014). Primjetno povećanje električne vodljivosti tijekom skladištenja zabilježeno je samo kod kontrolnog uzorka, dok TSROP i HBSROP uzorci imaju gotovo jednake vrijednosti prije i nakon skladištenja. Suprotno tomu, kod USROP uzorka uočeno je smanjenje. Navedena pojava u skladu je s prethodnim istraživanjima u kojima je objašnjen utjecaj vremena skladištenja na pad električne vodljivosti. Smatra se da je razlog smanjenja električne vodljivosti degradacija nutrijenata do koje dolazi uslijed skladištenja (Aadil i sur., 2014).

## 4.2. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA KEMIJSKE PARAMETRE

### 4.2.1. Promjene kemijskih parametara funkcionalnog soka na bazi rajčice

#### 4.2.1.1. Promjene koncentracije ukupnih fenola funkcionalnog soka na bazi rajčice

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice prikazani su u Tablici 3. Koncentracija ukupnih fenola izmjerena je u kontrolom uzorku i u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 3.** Rezultati mjerenja koncentracije ukupnih fenola u uzorcima funkcionalnog soka na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	Ukupni fenoli (mg EGK/mL)	
	Vrijeme skladištenja	
	0. dan	7. dan
CJROP	0,035 ± 0,002	0,035 ± 0,000
UJROP	0,034 ± 0,002	0,037 ± 0,000
TJROP	0,034 ± 0,001	0,035 ± 0,002
HBJROP	0,037 ± 0,002	0,040 ± 0,001

\*EGK-ekvivalent galne kiseline

Nakon provođenja ultrazvučnog tretmana, koncentracija ukupnih fenola nije se značajno promijenila u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Navedeno zapažanje podudara se s istraživanjem Lepaus i sur. (2023) u kojem ultrazvučni tretman ne uzrokuje značajne promjene koncentracije ukupnih fenola u uzorcima soka od naranče i mrkve. Iako kavitacija nastala djelovanjem ultrazvuka može pojačati ekstrakciju polifenolnih spojeva, značajnije promjene istih ovise o amplitudi i temperaturi tretmana te vrsti uzorka (Lepaus i sur., 2023; Baltacıoğlu, 2022). To je dokazano u istraživanju Baltacıoğlu (2022) u kojem je koncentracija ukupnih fenola u uzorcima soka od breskve tretiranih pri 60 °C i amplitudi od 100 % manja u odnosu na kontrolni uzorak. Autori navode da je pad koncentracije ukupnih fenola uzrokovan kombiniranim učinkom visoke temperature i visoke amplitude. Točnije, kao rezultat povećanja broja mikro mjehurića i slobodnih radikala nastalih primjenom visoke amplitude, smanjuje se količina bioaktivnih spojeva. Nakon toplinskog tretmana zabilježena je minimalna promjena ukupnih fenola. Iako povišena temperatura može uzrokovati raspadanje fitokemikalija, a time i ukupnih fenola (Dhansu i sur., 2023), u TJROP uzorku nije potvrđen negativan utjecaj topline na iste. Važno je napomenuti da između svih uzoraka, HBJROP uzorak ima najveću koncentraciju ukupnih fenola prije i nakon skladištenja. Povećanje ukupnih fenola može biti posljedica poboljšanja njihove dostupnosti za ekstrakciju, inaktivacije polifenol oksidaze ili oslobađanja polifenola vezanih na vlakna (Dhansu i sur., 2023). Najučinkovitiju ekstrakciju bioaktivnih spojeva, uključujući fenole, nakon *hot break* tretmana, potvrđuje i kemijska analiza soka od grožđa (Silva i sur., 2019). Navedena analiza pokazala je da je koncentracija ukupnih fenola u uzorku soka od grožđa tretiranog *hot break* tretmanom (80 °C, 5 min) veća za 238,2 % u odnosu na uzorak dobiven *cold press* metodom (sobna temperatura).

Kod kontrolnog uzorka nije došlo do promjene koncentracije ukupnih fenola tijekom skladištenja. S druge strane, kod svih tretiranih uzoraka uočen je blagi porast. Isti trend prijavljen je i u prethodnom istraživanju kod uzoraka soka od rajčice tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom te skladištenih 7 dana pri +4 °C (Gavran, 2022). Ova pojava može se opravdati rastom mikroorganizama, stimulacijom aktivnosti enzima uključenih u biosintezu polifenola te nastajanjem novih spojeva koji mogu reagirati s Folin-Ciocalteu reagensom (Oboulbiga i sur., 2020). Međutim, povećanje ukupnih fenola u tretiranim uzorcima nije bilo očekivano s obzirom na to da je proturječno dokazanim tvrdnjama da se tijekom skladištenja zbiva degradacija bioaktivnih spojeva, odnosno njihovo smanjenje (Lepaus i sur., 2023).

#### 4.2.1.2. Promjene antioksidacijske aktivnosti funkcionalnog soka na bazi rajčice

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice prikazani su u Tablici 4. Kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom, antioksidacijska aktivnost izmjerena je nultog dana i nakon sedam dana skladištenja na +4 °C.

**Tablica 4.** Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima funkcionalnog soka na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost (μmol ET/L)	
	Vrijeme skladištenja	
	0. dan	7. dan
CJROP	69,951 ± 2,217	43,143 ± 2,229
UJROP	61,274 ± 2,720	55,701 ± 0,876
TJROP	60,283 ± 2,948	48,304 ± 0,483
HBJROP	64,039 ± 2,036	56,471 ± 2,164

\*ET-ekvivalent Trolox-a

Prema dobivenim rezultatima iz Tablice 4, najveća antioksidacijska aktivnost ostvarena je u kontrolnom uzorku. Kontrolni uzorak je netretirani uzorak te na njemu nije primijenjen proces zagrijavanja koji može uzrokovati gubitak nutritivnih svojstava te antioksidacijske aktivnosti uslijed primjene povišene temperature (Vigneshwaran i sur., 2022). Dakle, kod svih tretiranih uzoraka zabilježena je manja antioksidacijska aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak. Štoviše, obrada soka pomoću ultrazvuka rezultirala je primjetnim smanjenjem antioksidacijske aktivnosti. Sličan negativan učinak ultrazvuka uočen je i kod uzoraka funkcionalnog soka od naranče s dodatkom prebiotika (1% ksilooligosaharida). Pritom su uzorcima bili tretirani ultrazvukom snage 300, 600, 900 i 1200 W u trajanju od 10 minuta, a postotak pada antioksidacijske aktivnosti povećavao se porastom primijenjene snage (Silva i sur., 2020). Međutim, u nedavnim istraživanjima primijećen je različit učinak ultrazvuka na vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka soka od naranče i mrkve te soka od smokve u odnosu na kontrolni uzorak (Cruz i sur., 2023; Lepaus i sur., 2023). Autori navedenih istraživanja utvrdili su da na smanjenje, odnosno povećanje vrijednosti ne utječu samo intenzitet tretmana, vrijeme njegovog trajanja i temperatura, već i vrsta soka. Miljković i sur. (2022) uočili su manju

antioksidacijsku aktivnost toplinski tretiranog soka od rajčice (100 °C, 5 min) u odnosu na netretiranu rajčicu. Navode kako je toplinski tretman vjerojatno odgovoran za djelomično raspadanje spojeva koji posjeduju antioksidacijsku aktivnost. Također, smanjenje antioksidacijske aktivnosti primijećeno je u uzorcima pulpe rajčice tretirane *cold break* tretmanom pri 60-75 °C i *hot break* tretmanom pri 85-95°C (Kelebek i sur., 2017). Sukladno svemu navedenom, dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima iz sličnih istraživanja.

Analizom rezultata dobivenih prije i nakon skladištenja uočen je značajan pad antioksidacijske aktivnosti koji je najizraženiji kod kontrolnog uzorka. Iako kontrolni uzorak pokazuje znatno veću stabilnost kada su u pitanju ukupni fenoli, rezultati antioksidacijske aktivnosti upućuju na bolju stabilnost tretiranih uzoraka u odnosu na netretirani uzorak. Slični rezultati zabilježeni su i u soku od jabuke gdje je primijećeno značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C. Kao mogući razlog smanjenja autori navode izraženu tendenciju polifenola polimerizaciji. Posebno kada stupanj polimerizacije dosegne kritičnu vrijednost, povećana molekularna kompleksnost smanjuje dostupne hidroksilne skupine za DPPH radikale, što dovodi do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta (Bursać Kovačević i sur., 2019).

#### 4.2.1.3. Promjene koncentracije biljnih pigmenata funkcionalnog soka na bazi rajčice

Rezultati određivanja koncentracije biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog soka na bazi rajčice prikazani su u Tablici 5. Netretiranom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom izmjerene su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, likopena i  $\beta$ -karotena. Navedene koncentracije izmjerene su uzorcima nultog i sedmog dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 5.** Rezultati mjerenja koncentracije biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog soka na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	Klorofil <i>a</i> (mg/100 mL)		Klorofil <i>b</i> (mg/100 mL)		Likopen (mg/100 mL)		β-karoten (mg/100 mL)	
	Vrijeme skladištenja							
	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan
CJROP	0,155 ± 0,000	0,127 ± 0,000	0,098 ± 0,001	0,104 ± 0,001	0,095 ± 0,000	0,096 ± 0,000	-0,062 ± 0,000	-0,072 ± 0,001
UJROP	0,159 ± 0,001	0,152 ± 0,001	0,184 ± 0,002	0,123 ± 0,001	0,186 ± 0,000	0,221 ± 0,000	-0,126 ± 0,001	-0,067 ± 0,000
TJROP	0,151 ± 0,000	0,125 ± 0,001	0,117 ± 0,000	0,131 ± 0,002	0,113 ± 0,000	0,082 ± 0,001	-0,075 ± 0,000	-0,096 ± 0,001
HBJROP	0,143 ± 0,000	0,130 ± 0,001	0,099 ± 0,000	0,129 ± 0,001	0,093 ± 0,000	0,080 ± 0,001	-0,066 ± 0,000	-0,091 ± 0,000

Rezultati određivanja koncentracije biljnih pigmenata prikazani u Tablici 5 pokazuju da se kod tretiranih uzoraka pojavilo blago povećanje, odnosno smanjenje koncentracije klorofila *a*. Blago povećanje u odnosu na kontrolni uzorak uočeno je kod UJROP uzorka. Veća koncentracija klorofila *a* nakon ultrazvučnog tretmana (30 kHz, 60 °C, 20 min) zabilježena je i kod uzoraka soka od špinata u istraživanju Manzoor i sur. (2021). Autori istog istraživanja poboljšanu ekstrakciju klorofila *a* tijekom tretmana ultrazvukom objašnjavaju ultrazvučno potaknutom hidratacijom, bubrenjem, te posljedično proširenjem pora na staničnoj stijenci. Također, u soku od špinata tretiranog toplinskim tretmanom pri 60 °C određena je veća koncentracija klorofila *a* u odnosu na netretirani uzorak, s time da je povećanje neznajno (Manzoor i sur., 2021). S druge strane, kod TJROP i HBJROP uzoraka uočeno je blago smanjenje koncentracije klorofila *a* koje je izraženije kod HBJROP uzorka. Smanjenje klorofila *a* nakon toplinskog, odnosno *hot break* tretmana može se povezati s prirodom samog pigmenta. Klorofil je lipofilni pigment poznat po svojoj toplinskoj nestabilnosti tijekom obrade i skladištenja. Na njega utječu toplina, svjetlost, kisik i enzimi, te se lako pretvara u odgovarajući feofitin (Grace i sur., 2022). Navedeni utjecaji objašnjavaju primjetno manju koncentraciju klorofila *a* u svim uzorcima skladištenih 7 dana na +4°C. Najmanji pad koncentracije zabilježen je u UJROP uzorku. Djelovanjem ultrazvuka može se postići bolje očuvanje klorofila od oksidacije tijekom skladištenja u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Arfaoui i sur., 2022), ali i preostalim tretiranim uzorcima.

Prethodna istraživanja dokazali su poboljšanu ekstrakciju, a time i dostupnost klorofila *b* iz voća i povrća, te sokova od njih, primjenom ultrazvuka (Manzoor i sur., 2021; Braniša i sur., 2014). Naime, u soku od špinata tretiranog ultrazvukom (30 kHz, 600 W, 60 °C, 20 min) postotak povećanja koncentracije klorofila *b* u odnosu na netretirani sok iznosio je 25,0 % (Manzoor i sur., 2021). Navedeno je u skladu s dobivenim rezultatima, gdje je u odnosu na kontrolni uzorak značajno veća (87,8 %) koncentracija klorofila *b* uočena kod UJROP uzorka. Pritom, razlog je isti kao i za povećanje koncentracije klorofila *a*. Veću koncentraciju klorofila *b* u odnosu na kontrolni uzorak imao je i TJROP uzorak, s time da je uočeno povećanje značajno manje u usporedbi s UJROP uzorkom. Slične rezultate dobili su Manzoor i sur. (2021) tijekom ispitivanja utjecaja ultrazvuka i toplinskog tretmana na klorofil *b* u uzorcima soka od špinata. Minimalna promjena klorofila *b* postignuta je kod HBRJOP uzorka u kojem je koncentracija tog pigmenta gotovo jednaka netretiranom uzorku. Nadalje, usporednom rezultata dobivenih 0. i 7. dana, uočen je različit utjecaj skladištenja na klorofil *b*. Dok se u jednom tretiranom uzorku



smanjuje (UJROP), u preostalim tretiranim uzorcima (TJROP i HBJROP) i kontrolnom uzorku se povećava. Razlog smanjenja koncentracije klorofila tijekom skladištenja može biti njegova kemijska nestabilnost te osjetljivosti na oksidaciju (Grace i sur., 2022). S obzirom na navedeno, povećanja u preostalim uzorcima nisu u skladu s očekivanjem.

Dobiveni rezultati iz Tablice 5 podudaraju se s rezultatima drugih autora koji su u svojim istraživanjima dokazali pozitivan utjecaj obrade ultrazvukom na bioraspoloživost likopena iz kore i pulpe rajčice te soka od rajčice (Manzoor i sur., 2023; Starek i sur., 2021; Tovar-Pérez i sur., 2020). Štoviše, koncentracija likopena u UJROP uzorku bila je 95,8 % veća u odnosu na kontrolni uzorak. Ova pojava može se povezati s kavitacijom koja uzrokuje mehaničko oštećenje i povećanu propusnost membrane kromoplasta, čineći likopen dostupnijim (Manzoor i sur., 2023). Primjetno povećanje koncentracije likopena, ali manje od prethodnog uzorka, zabilježeno je kod TJROP uzorka. Sličan utjecaj toplinskog tretmana opažen je i tijekom kemijske analize toplinski obrađenog soka od rajčice kojem je izmjerena značajno veća koncentracija likopena u odnosu na svježu rajčicu (Miljković i sur., 2022). Iznimka dokazima da primijenjeni tretman ili povišena temperatura uzrokuje bolju dostupnost likopena je HBJROP uzorak. Zapravo, *hot break* tretman rezultirao je neznatnim promjenama. Neznatne promjene uočene su i kod kontrolnog uzorka tijekom skladištenja, dok su primjetno manju stabilnost likopena pokazali svi tretirani uzorci. Kod UJROP uzorka primijećen je porast, a sličan trend zabilježen je kod pulpe rajčice tretirane ultrazvukom pri amplitudi od 60 % i trajanju od 10 minuta (Tovar-Pérez i sur., 2020). Navedeno nije u skladu s istraživanjem Starek i sur. (2021) u kojem su prijavljene neznčajne promjene koncentracije likopena u uzorcima soka od rajčice tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta ( $28 \text{ W cm}^{-2}$  i  $40 \text{ W cm}^{-2}$ , 2, 5 i 10 min), kao i pad koncentracije u kontrolnom uzorku. Suprotno UJROP uzorku, kod preostalih tretiranih uzoraka (TJROP i HBJROP), uočen je pad koncentracije likopena nakon skladištenja. Razlog tomu može biti degradacija likopena uzrokovana svjetlošću, kisikom ili aktivnošću enzima, posebno polifenol oksidaze (Lepaus i sur., 2023).

Sve vrijednosti koncentracije  $\beta$ -karotena su negativne te upućuju na ograničenja korištenja predloženih seta jednadžbi za izračun koncentracije proučavanih biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog soka na bazi rajčice. Problematično određivanje  $\beta$ -karotena pomoću iste metode kao i u ovom istraživanju uočili su Braniša i sur. (2014) kod uzorka jagode, a kao glavni razlog naveli su preklapanje apsorpcijskih vrpca karotenoida s apsorpcijskih vrpca klorofila.

## 4.2.2. Promjene kemijskih parametara funkcionalnog sosa na bazi rajčice

### 4.2.2.1. Promjene koncentracije ukupnih fenola funkcionalnog sosa na bazi rajčice

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice prikazani su u Tablici 6. Koncentracija ukupnih fenola izmjerena je u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom na dan pripreme te nakon skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 6.** Rezultati mjerenja koncentracije ukupnih fenola u uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	Ukupni fenoli (mg EGK/mL)	
	Vrijeme skladištenja	
	0. dan	7. dan
CSROP	0,034 ± 0,001	0,040 ± 0,002
USROP	0,065 ± 0,001	0,041 ± 0,002
TSROP	0,035 ± 0,002	0,037 ± 0,002
HBSROP	0,038 ± 0,001	0,039 ± 0,000

\* EGK-ekvivalent galne kiseline

Rezultati iz Tablice 6 pokazuju kako je ultrazvučnim tretmanom postignuto značajno povećanje (91,2 %) koncentracije ukupnih fenola sosa od rajčice u odnosu na kontrolni uzorak. Isti trend zabilježen je tijekom analize sosa od jagode gdje je djelovanjem ultrazvuka pri 20 kHz i 35 W povećana koncentracija ukupnih fenola za 9,1 % nakon 30 minuta i 12,1 % nakon 60 minuta tretmana, u usporedbi s netretiranim sosom (Tsikrika, 2022). Uzrok ovog povećanja može biti otpuštanje vezanih polifenola praćeno poboljšanom brzinom prijenosa mase i mehaničkim oštećenjem staničnih stijenki zbog stvaranja kavitacijskih mjehurića (Tsikrika, 2022). Kod TSROP uzorka koncentracija ukupnih fenola nije značajno promijenjena, a kod HBSROP uzorka uočen je blagi porast u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Sličan utjecaj *hot break* tretmana na koncentraciju ukupnih fenola imao je funkcionalni sok na bazi rajčice spomenut ranije. Piazza i sur. (2022) u svojem istraživanju navode moguće razloge pozitivnog djelovanja pasterizacije na ukupne fenole. Dakle, porast može biti povezan s visokom temperaturom koja uzorkuju oštećenje stanične stijenke i posljedično pojačanu ekstrakciju vezanih fenola, slično kao kod ultrazvuka. Povećanje može biti i posljedica stvaranja nekih

redukcijskih spojeva tijekom zagrijavanja te odvijanja Maillard-ove reakcije u kojoj nastaju melanoidini i druge molekule.

Primjetan pad koncentracije ukupnih fenola tijekom skladištenja uočen je kod USROP uzorka. Gubitak fenola može biti posljedica njihove neenzimske i enzimске razgradnje koju mogu ubrzati hidroksilni radikali nastali uslijed tretmana ultrazvukom (Sulaiman i sur., 2017). Skladištenje uzoraka tretiranih novim tehnikama može imati i pozitivan utjecaj na ukupne fenole tijekom skladištenja. To su dokazali Oboulbiga i sur. (2020) na uzorcima pulpe rajčice tretirane ultrazvukom i mikrovalovima. Za razliku od USROP uzorka, kod kontrolnog uzorka zabilježeno je povećanje ukupnih fenola tijekom skladištenja. Isti trend, ali primjetno blaži, prate TSROP i HBSROP uzorci. Mogući razlozi ove pojave navedeni su u potpoglavlju 4.2.1.1. jer svi tretirani uzorci funkcionalnog soka na bazi rajčice također imaju veće vrijednosti koncentracije ukupnih fenola nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

#### 4.2.2.2. Promjene antioksidacijske aktivnosti funkcionalnog sosa na bazi rajčice

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice prikazani su u Tablici 7. Kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom izmjerena je antioksidacijska aktivnost na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 7.** Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost (μmol ET/L)	
	Vrijeme skladištenja	
	0. dan	7. dan
CSROP	46,185 ± 2,359	52,683 ± 1,999
USROP	27,733 ± 0,195	58,790 ± 4,369
TSROP	68,389 ± 1,963	52,128 ± 3,188
HBSROP	74,138 ± 3,265	54,938 ± 3,889

\*ET-ekvivalent Trolox-a

U odnosu na kontrolni uzorak, kod USROP uzorka uočeno je značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti. Tretman ultrazvukom izaziva sličan, ali neznačajan pad antioksidacijske aktivnosti uzoraka sosa od jagode kojeg autori opravdavaju gubitkom vitamina

C, antiocijanina i ostalih polifenola (Tsikrika, 2022; Sulaiman i sur., 2017) . Također, poznato je da antioksidacijska aktivnost može biti posljedica kombiniranog učinka različitih spojeva koji djeluju sinergistički ili antagonistički. Primjer su pojedini spojevi iz skupine flavonoida za koje je prijavljeno prooksidativno djelovanje (Tsikrika, 2022), što može objasniti opaženi pad. Suprotno USROP uzorku, kod TSROP i HBSROP uzoraka zabilježeno je povećanje antioksidacijske aktivnosti. Isti trend ne prate uzorci sosa od jagode nakon toplinskog tretmana pri 65 °C i paste od rajčice nakon *hot break* tretmana pri 85-95 °C. Naime, kod navedenih uzoraka prijavljeno je smanjenje antioksidacijske aktivnosti (Kelebek i sur., 2017; Sulaiman i sur., 2017). Međutim, Rivero i sur. (2022) u svojem istraživanju dobili su znatno veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ketchup-u i sosu od rajčice obrađenih na temperaturi od 90 do 100 °C tijekom 15 minuta, u odnosu na netretirani uzorak. Pozitivan utjecaj toplinskog tretmana objašnjen je povećanjem bioraspoloživosti glavnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem, a to su likopen i drugi karotenoidi. U istom istraživanju daljnji porast u ketchup-u rezultat je dodatka sastojaka tijekom proizvodnje koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Sličan učinak dobiven je dodatkom maslinovog ulja u udjelima po 5 i 10 % i primjenom temperature od 95 °C tijekom proizvodnje sosa na bazi rajčice (Tomaš i sur., 2019). Prema tome, može se smatrati da su prisutnost praha masline i povišena temperatura pozitivno djelovali na antioksidacijsku aktivnost proizvoda u ovom istraživanju.

Rezultati prikazani u Tablici 7 pokazuju da je skladištenje uzrokovalo primjetno povećanje, odnosno smanjenje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti svih uzoraka. Povećanje vrijednosti ostvareno je u kontrolnom i USROP uzorcima, s time da je kod USROP uzorka značajnije. Slično je zabilježeno i kod uzorka rajčice tretiranog ultrazvukom frekvencije 25 kHz u trajanju od 2 min. Razlozi tomu su uklanjanje kisika uslijed tretmana koje može osigurati bolju stabilnost antioksidacijske aktivnosti tijekom skladištenja te povećanje fenolnih spojeva i askorbinske kiseline (Lu i sur., 2020; Sulaiman i sur., 2017). S druge strane, smanjenje antioksidativne vrijednosti nakon skladištenja uočeno je kod TSROP i HBSROP uzoraka. Isti trend primijećen je u istraživanju Sulaiman i sur. (2017) kod toplinski tretiranog uzorka sosa od jagode. Pritom je navedeno da razgradnja spojeva s antioksidacijskom aktivnosti ovisi o parametrima tretmana i uvjetima skladištenja, a mogu se razgraditi aerobno ili anaerobno, uz djelovanje enzima ili bez njih.

#### 4.2.2.3. Promjene koncentracije biljnih pigmenata funkcionalnog sosa na bazi rajčice

Rezultati određivanja koncentracije biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice prikazani su u Tablici 8. Netretiranom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom izmjerene su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, likopena i  $\beta$ -karotena. Koncentracije su izmjerene na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 8.** Rezultati mjerenja koncentracije biljnih pigmenata u uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

	<b>Klorofil <i>a</i> (mg/100 mL)</b>		<b>Klorofil <i>b</i> (mg/100 mL)</b>		<b>Likopen (mg/100 mL)</b>		<b>β-karoten (mg/100 mL)</b>	
Uzorak	Vrijeme skladištenja							
	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan
CSROP	0,194 ± 0,000	0,201 ± 0,001	0,089 ± 0,000	0,130 ± 0,001	0,197 ± 0,000	0,096 ± 0,000	-0,024 ± 0,000	-0,048 ± 0,000
USROP	0,170 ± 0,000	0,158 ± 0,000	0,102 ± 0,000	0,102 ± 0,000	0,306 ± 0,000	0,221 ± 0,000	-0,019 ± 0,000	-0,012 ± 0,000
TSROP	0,200 ± 0,000	0,139 ± 0,000	0,088 ± 0,000	0,102 ± 0,000	0,294 ± 0,000	0,082 ± 0,001	-0,009 ± 0,000	-0,027 ± 0,00
HBSROP	0,162 ± 0,000	0,132 ± 0,001	0,093 ± 0,000	0,103 ± 0,000	0,228 ± 0,000	0,080 ± 0,001	-0,033 ± 0,000	-0,044 ± 0,000

Za razliku od uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice, kod uzoraka sosa uočene su primjetno različite koncentracije klorofila *a*. Istovremeno, razlike u rezultatima pripisuju se primijenjenom tretmanu. Smanjenje vrijednosti koncentracije klorofila *a* opaženo je nakon tretmana ultrazvukom (12,4 %) i *hot break* tretmana (16,5 %) gdje je više izraženo. Kada su klorofili dugotrajno izloženi povišenoj temperaturi, osobito klorofil *a*, pretvaraju se u feofitin, maslinasto-smeđi spoj koji se dalje raspada na pirofeofitin u procesu dekarboksilacije ili na feoforbide, spojeve koji se mogu raspasti na bezbojne molekule te utjecati na boju proizvoda (Jurić i sur., 2020). Opisana pojava može objasniti najveći pad vrijednosti HBSROP uzorka kod kojeg je primijenjena najviša temperatura i najduže vrijeme tretiranja. U odnosu na kontrolni uzorak, jedino je kod TSROP uzorka postignuta veća koncentracija klorofila *a*. Navedeno zapažanje u skladu je s istraživanjem Tomaš i sur. (2019) u kojem povišena temperatura i dodatak maslinovog ulja u sosu od rajčice pozitivno utječu na prinos navedenog pigmenta. Kod svih tretiranih uzoraka zabilježena je manja koncentracija klorofila *a* nakon sedam dana skladištenja u usporedbi s nultim danom, s time da je smanjenje najmanje kod USROP uzorka. Dobiveni rezultati mogu se povezati s kemijskom nestabilnošću klorofila *a* koji se lako raspada djelovanjem topline, kisika, kiselina i enzima (Jurić i sur., 2020). Isti trend ne prati kontrolni uzorak kod kojeg je zabilježeno povećanje koncentracije nakon 7 dana skladištenja. Razlog tomu može biti izostanak djelovanja topline koja je primijenjena na svim tretiranim uzorcima.

Najveća koncentracija klorofila *b* ostvarena je nakon tretman ultrazvukom, a sličan trend zabilježen je kod funkcionalnog soka na bazi rajčice. Uz to, pregledom literature može se potvrditi povećana ekstrakcija ovog pigmenta uslijed djelovanja ultrazvuka. Štoviše, povećanje postignuto nakon tretmana ultrazvukom (5 ciklusa: puls 30 s, pauza 10 s) praćeno mehaničkom obradom kod uzoraka jagode iznosilo je 110,0 %, a kod uzoraka marelice 40,2 % u odnosu na uzorke koji su obrađeni samo mehanički (Braniša i sur., 2014). S druge strane, gotovo nepromijenjene koncentracije ostvarene su toplinskim i *hot break* tretmanom. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Jurić i sur. (2020) u kojem je navedeno da je klorofil *b* toplinski najstabilniji oblik klorofila. Nakon skladištenja, koncentracija klorofila *b* bila je slična kod svih tretiranih uzoraka. Najveća koncentracija opažena je kod kontrolnog uzorka, čak i u usporedbi sa svim uzorcima na dan pripreme. Osim u kontrolnom, koncentracija klorofila *b* povećana je i u TSROP i HBSROP uzorcima. Povećanje koncentracije klorofila *b* nakon 7. dana skladištenja nije u skladu s poznatom kemijskom nestabilnošću pigmenta. Međutim, tretman ultrazvukom

može smanjiti oksidaciju kisikovih radikala, kao i aktivnost enzima uključenih u katabolizam klorofila, poput klorofilaze i Mg-dekelataze (Mu i sur., 2020). Navedeno opravdava jednaku koncentraciju klorofila *b* određenog tijekom 0. i 7. dana skladištenja u USROP uzorku.

Najveća koncentracija likopena među uzorcima zabilježena je u USROP uzorku. Dobiveni rezultati upućuju na pozitivan utjecaj tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na dostupnost likopena iz funkcionalnog sosa na bazi rajčice. Štoviše, djelovanjem ultrazvuka dovelo je do povećanja koncentracije likopena u sosu od 55,3 %. Tijekom tretmana ultrazvukom dolazi do razbijanja staničnih stijenki te slabljenja veze između likopena i tkiva voća što rezultira povećanjem bioraspoloživosti likopena iz rajčice (Lu i sur., 2020; Tovar-Pérez i sur., 2020; Oliveira i sur., 2015). Osim toga, likopen je stabilan na temperaturama ispod 100 °C (Oliveira i sur., 2015) što dodatno potvrđuju preostali tretirani uzorci, TSROP i HBSROP kod kojih je također zabilježena veća koncentracija likopena u odnosu na kontrolni uzorak. Pozitivan utjecaj povišene temperature na likopen dokazan je i na sosu od rajčice s dodatkom maslinovog ulja (Tomaš i sur., 2019). Porasti se mogu obrazložiti djelovanjem povišene temperature koja ne samo da razara membranu kromoplasta gdje su karotenoidi smješteni, već i omogućuje denaturaciju proteina te raspad kompleksa protein-karotenoid što pomaže njihovom otpuštanju (Tomaš i sur., 2019). Nakon sedmodnevnog skladištenja, kod svih uzoraka zabilježen je značajan pad koncentracije likopena koji je najmanje izražen kod USROP uzorka. Ranija istraživanja o djelovanju skladištenja na stabilnost likopena iz rajčice potvrđuju minimalne promjene u uzorcima tretiranim ultrazvukom (Lu i sur., 2020; Tovar-Pérez i sur., 2020). U svakom slučaju, Farneti i sur. (2012) navode da pad koncentracije likopena tijekom skladištenja na niskoj temperaturi može biti uzrokovan fragmentacijom likopena. Naime, likopen ulazi u reakciju s reaktivnim atomom kisika ( $O_2^{\cdot -}$ ) te peroksilnim radikalom ( $ROO^{\cdot}$ ) što rezultira nastankom spojeva poput acetona, metilheptanona, leavulinskog aldehida i glioksala. Isti autori prijavili su smanjenje koncentracija likopena u kontrolnom uzorku rajčice i uzorcima rajčice tretiranih toplinskim tretmanom (40, 45 i 50 °C, 2, 5 i 10 min) tijekom 20-dnevnog skladištenja pri +4 °C.

Kao što je to slučaj kod funkcionalnog soka na bazi rajčice, sve vrijednosti koncentracije  $\beta$ -karotena u uzorcima netretiranog i tretiranog funkcionalnog sosa su negativne, iz istog razloga navedenog u potpoglavlju 4.2.1.3. Dakle, dobivene vrijednosti posljedica su interferencije  $\beta$ -karotena s drugim spojevima koji apsorbiraju svjetlost na istoj valnoj duljini. To vodi k nedostacima korištenja seta jednadžbi za izračun usporedivih količina biljnih pigmenta u



uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice.

### 4.3. UTJECAJ PROVEDENIH TRETMANA I VREMENA SKLADIŠTENJA NA MIKROBIOLOŠKU ANALIZU

#### 4.3.1. Rezultati mikrobiološke analize funkcionalnog soka na bazi rajčice

Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih, netretiranih i tretiranih uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice prikazani su u Tablici 9. Kontrolom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskim tretmanom i *hot break* tretmanom određene su koncentracije bakterija *E. coli*, *Bacillus coagulans*, aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni. Mikrobiološka analiza provedena je na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 9.** Rezultati mikrobiološke analize uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)		TPC (CFU/g)		TMC (CFU/g)		<i>Bacillus coagulans</i> (CFU/g)	
	Vrijeme skladištenja							
	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan
CJROP	<10	<10	5,0*10 <sup>2</sup>	1,0*10 <sup>4</sup>	1,0*10 <sup>2</sup>	1,0*10 <sup>2</sup>	<10	<10
UJROP	<10	<10	<10	1,0*10 <sup>4</sup>	<10	<10	<10	<10
TJROP	<10	<10	20	10	<10	<10	<10	<10
HBJROP	<10	<10	1,0*10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10	<10	<10

\*TPC-aerobne mezofilne bakterije; TMC-plijesni

Koncentracija bakterija *E. coli* i *Bacillus coagulans* u svim uzorcima bila je manja od 10 CFU/g te se može smatrati da nisu bile prisutne ni u jednom analiziranom uzorku. Kontrolni uzorak nije bio kontaminiran ovim bakterijama, stoga iste nisu pronađena ni u tretiranim uzorcima, kao ni nakon 7 dana skladištenja. U Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/2022), definirane su granične vrijednosti za *E. coli* u nepasteriziranim sokovima od voća i povrća. Granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim je 100 CFU/g, a dopuštena granična vrijednost iznad koje se svi rezultati ne smatraju zadovoljavajućim je 1000 CFU/g. Međutim, kriterij nije naveden za pasterizirane, tretirane sokove. S obzirom na to da je određena koncentracija *E. coli* manja od 10 CFU/g u CJROP uzorku, proizvedeni funkcionalni sok na bazi rajčice zadovoljava kriterije

iz navedenog zakona. Međutim, kriterij za za *Bacillus coagulans*, kao ni za druge ispitivane mikrobiološke parametre čija analiza slijedi u tekstu ne postoji.

Tretman ultrazvukom visokog intenziteta rezultirao je primjetnom redukcijom TPC-a (1,7 log CFU/g) u funkcionalnom soku na bazi rajčice. Koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija bila je manja od 10 CFU/g te se može pretpostaviti da su svi ispitivani mikroorganizmi uspješno inaktivirani tijekom provedbe tretmana. Dobiveni rezultati u skladu su s nedavnim istraživanjem Lepaus i sur. (2023) u kojem je postignuta značajna redukcija TPC-a (1,38 log CFU/mL) u uzorku soka od naranče i mrkve primjenom termosonifikacije, odnosno kombiniranim djelovanjem ultrazvuka (110 W, 40 kHz, 10 min) i povišene temperature (60 °C). Značajna inaktivacija aerobnih mezofilnih bakterija može biti rezultat različitih fizikalno-kemijskih procesa nastalih uslijed pojave kavitacije. Kavitacija uzrokuje lokalizirano povećanja tlaka i temperature, stvaranje i oslobađanje slobodnih radikala, te narušavanje funkcije stanične membrane (Manzoor i sur., 2023; Kalsi i sur., 2022; Manzoor i sur., 2021). Nešto manja redukcija (1,4 log CFU/g) u usporedbi s prethodnim uzorkom postignuta je kod TJROP uzorka. Inaktivacija toplinskim tretmanom pripisuje se povišenoj temperaturi koja uzorkuju pucanje stanične membrane i raspadanje staničnih organela što dovodi do oštećenja stanica bakterije (Manzoor i sur., 2021). Smanjenje TPC-a, uz očuvanje kvalitete proizvoda, može se ostvariti i pri višim temperaturama što dokazuju rezultati analize soka od šećerne trske tretiranog pri 80-85 °C u trajanju od 5 ili 10 minuta (Dhansu i sur., 2023). Međutim, kod HBJROP uzorka zabilježena je veća koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija u odnosu na kontrolni uzorak. Ova pojava mogla bi se objasniti dužom manipulacijom uzorka ili kontaminacijom bakterijama u zadnjem koraku provedbe tretmana, tijekom hlađenja. Do neočekivanih rezultata moglo je doći i greškom analitičara s obzirom na to da je isti uzorak nakon 7 dana skladištenja imao koncentraciju aerobnih mezofilnih bakterija manju do 10 CFU/g. Slično smanjenje zabilježeno je i kod TJROP uzorka, dok je koncentracija u kontrolnom i UJROP uzorku veća nakon 7 dana skladištenja u odnosu na dan pripreme. Promjena je bila očekivana za kontrolni uzorak, ali za uzorak tretiran ultrazvukom nije s obzirom na to da je koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija na dan pripreme bila manja od 10 CFU/g. Međutim, ultrazvuk visokog intenziteta može uzrokovati ireverzibilno oštećenje stanica bakterija (Starek i sur., 2021). Oporavak stanica ovisi o fazi rasta u kojoj su bakterije bile tijekom provedbe tretmana. Bakterije imaju ukupno četiri faze raste, a to su lag faza, eksponencijalna faza, stacionarna faza i faza odumiranja. U eksponencijalnoj fazi rasta stanice bakterija su najaktivnije te se počinju dijeliti, ali su i više

osjetljive na nepovoljne uvjete iz okoline u usporedbi s bakterijama u preostalim fazama rasta (Gao i sur., 2013). To potvrđuje istraživanje Starek i sur. (2021) u kojem se aerobne mezofilne bakterije nisu razvile u uzorku soka od rajčice tretiranog ultrazvukom (40 W cm<sup>-2</sup>, 37-52 °C, 10 min) ni nakon 10 dana skladištenja pri 4 °C. Prema tome, moglo bi se zaključiti da su aerobne mezofilne bakterije u UJROP uzorku bile u manje osjetljivoj fazi rasta što im je omogućilo oporavljanje tijekom skladištenja.

Najveća koncentracija plijesni zabilježena je u kontrolnom uzorku, dok je ostala jednaka u svim tretiranim uzorcima te je postignuti log redukcije iznosio 1,0 CFU/g. Uzimajući u obzir da je koncentracija manja od 10 CFU/g, može se zaključiti da plijesni nisu bile prisutne u tretiranim uzorcima. Rezultati prikazani u Tablici 9 podudaraju se s rezultatima drugih autora koji su u svojim istraživanjima dokazali da se pomoću ultrazvuka može postići značajno manja koncentracija plijesni u odnosu na kontrolni uzorak. Naime, u uzorku soka od guave tretiranog ultrazvukom (40 kHz, 200 W, 20 °C, 2 min) redukcija TMC-a iznosila je 1,7 log CFU/mL, a u uzorku ultrazvučno tretiranog soka od naranče i mrkve (40 kHz, 110 W, 60 °C, 10 min) redukcija je bila 1,4 log CFU/mL (Lepaus i sur., 2023; Kalsi i sur., 2022). Nadalje, Manzoor i sur. (2021) uspjeli su proizvesti ultrazvučno tretiran (30 kHz, 600 W, 60 °C, 20 min) sok od špinata u kojem plijesan nije detektirana. Pritom je koncentracija plijesni prije tretmana bila 4,3\*10<sup>3</sup> CFU/mL. Isti autori navode da kiselost soka generira osmotski tlak zajedno s određenim reakcijama te pojačava učinak kavitacija na promjenu strukture stanica plijesni. Budući da toplinski tretman i *hot break* tretman uzrokuju redukciju TMC-a (log 1,0 CFU/g) u uzorcima funkcionalnog soka, ova pojava može se povezati s učinkom povišene temperature. Dakle, izloženost visokoj temperaturi vodi slabljenju stanične membrane te posljedično smrti mikroorganizma (Lepaus i sur., 2023). Slično je zapaženo u soku od špinata koji je tretiran pri 60 °C (Manzoor i sur., 2021), te u soku od šećerne repe u kojem je tretman parom pri 80-85 °C značajno ograničio rast plijesni (Dhansu i sur., 2023). Pozitivan učinak primijenjenog tretmana nastavio se tijekom jednotjednog skladištenja, odnosno koncentracije plijesni sedmog dana skladištenja bile su jednake kao i na dan pripreme. Također, isti mikrobiološki parametar ostao je nepromijenjen u kontrolnom uzorku. Prema nekim autorima, primjetan rast koncentracije plijesni u tretiranim uzorcima javlja se tek nakon dužeg vremena skladištenja soka, te je manji u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Dhansu i sur., 2023; Lepaus i sur., 2023).

#### 4.3.2. Rezultati mikrobiološke analize funkcionalnog sosa na bazi rajčice

Rezultati mikrobiološke analize funkcionalnog sosa nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta, toplinskog tretmana i *hot break* tretmana, kao i netretiranog uzorka, nalaze se u Tablici 10. Kontrolnom, netretiranom uzorku i tretiranim uzorcima određene su koncentracije bakterija *E. coli*, *Bacillus coagulans*, aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni. Navedene koncentracije određene su na dan pripreme te nakon 7 dana skladištenja pri +4 °C.

**Tablica 10.** Rezultati mikrobiološke analize uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice nakon 0. i 7. dana skladištenja

Uzorak	<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)		TPC (CFU/g)		TMC (CFU/g)		<i>Bacillus coagulans</i> (CFU/g)	
	Vrijeme skladištenja							
	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan	0. dan	7. dan
CSROP	<10	<10	1,0*10 <sup>3</sup>	1,0*10 <sup>4</sup>	<10	10	<10	<10
USROP	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10
TSROP	<10	<10	20	20	<10	<10	<10	<10
HBSROP	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

\*TPC-aerobne mezofilne bakterije; TMC-plijesni

Kao što je to slučaj s funkcionalnim sokovima na bazi rajčice, bakterije *E. coli* i *Bacillus coagulans* nisu bile prisutne ni u jednom uzorku sosa na bazi rajčice. Koncentracija navedenih bakterija u kontrolnom uzorku, a time i u svim tretiranim uzorcima bila je manja od 10 CFU/g. Isti rezultat ostvaren je i u svim uzorcima nakon 7. dana skladištenja na +4 °C.

Dobiveni rezultati iz Tablice 10 pokazuju da je kontrolni uzorak imao najveću koncentraciju aerobnih mezofilnih bakterija, dok su svi tretirani uzorci imali značajno manju. Kontrolni uzorak je jedini uzorak na kojem nije bio primijenjen niti jedan postupak koji je mogao rezultirati značajnijom redukcijom ispitivanih mikroorganizama. Prema tome, dobiveni rezultati u skladu su s očekivanim. Kao i u prethodnom slučaju, tretman ultrazvukom visokog intenziteta značajno je smanjio koncentraciju aerobnih mezofilnih bakterija u analiziranom uzorku. Štoviše, koncentracija je bila manja od 10 CFU/g, a redukcija je iznosila log 2,0 CFU/g. Vigneshwaran i sur. (2022) navode da se tijekom termosonifikacije stvaraju nepovoljni uvjeti visoke temperature i tlaka uslijed kolapsa mjehurića mikro veličine uz pojavu turbulencije, sila smicanja i visoke

energije. Sve navedeno može se povezati s inaktivacijom ispitivanih bakterija. Kod TSROP uzorka zabilježena je manja redukcija TPC-a u usporedbi s preostalim tretiranim uzorcima te je iznosila  $\log 1,7$  CFU/g. Sulaiman i sur., (2017) smatraju da se većina mikroorganizama zaslužnih za kvarenje hrane inaktivira tijekom izlaganja temperaturi od  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  za što je dovoljno nekoliko minuta, dok se veća redukcija TPC-a može se postići primjenom viših temperatura. To je dokazano kod HBSROP uzorka u kojem je koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija bila manja od 10 CFU/g. Tijekom skladištenja, jedina promjena uočena je kod kontrolnog uzorka u kojem je porasla koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija, kao što je bilo očekivano. Kontrolni uzorak predstavlja netretirani uzorak koji je podložan ubrzanom rastu mikroorganizama, a primjena ultrazvuka i povišene temperature odgađaju njihov rast (Lepaus i sur., 2023). Dakle, u svim tretiranim uzorcima sosa koncentracije ispitivane skupine bakterija ostale su nepromijenjene. Sos od jagode tretiran ultrazvukom (24 kHz,  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min), visokim tlakom (600 MPa,  $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min) i toplinskim tretmanom ( $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min) također je ostao mikrobiološki stabilan, čak tijekom 30 dana skladištenja što je povezano s konstantnom vrijednosti pH i  $^{\circ}\text{Brix}$ -a. U sosu od jagode nije došlo do pada pH vrijednosti, odnosno  $^{\circ}\text{Brix}$ -a kojeg inače uzrokuju mikroorganizmi. Naime, mikroorganizmi koriste šećer za svoj rast, fermentiraju ga i stvaraju kiseline te se posljedično povećava kiselost sosa (Lepaus i sur., 2023; Sulaiman i sur., 2017). Sukladno tomu, dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima iz sličnih istraživanja.

Kod svih analiziranih uzoraka uočena je ista koncentracija plijesni, uključujući kontrolni. Pritom je koncentracija bila manja od 10 CFU/g te se može zaključiti da plijesni nisu bile prisutne ni u jednom uzorku. Za razliku od nultog dana, rezultati dobiveni sedmog dana otkrivaju promjene u CSROP i USROP uzorcima. Štoviše, promjene u navedenim uzorcima odnose se na blagi porast koncentracije plijesni. Iako plijesni mogu predstavljati veći problem od bakterija, povoljni uvjeti tijekom skladištenja koji uključuju nisku temperaturu i nisku pH vrijednost mogu doprinijeti smanjenju rasta i aktivnosti plijesni (Dhansu i sur., 2023; Sulaiman i sur., 2017). S obzirom na to da ih nije bilo u kontrolnom uzorku na dan pripreme, pojava plijesni u istom, ali i u USROP uzorku nakon skladištenja može se objasniti naknadnom kontaminacijom. Dakle, do rasta plijesni došlo je zbog loše manipulacije uzorkom nakon provedenog tretmana ili korištenja neadekvatne ambalaže, kao i nesterilne opreme i posuđa tijekom analize.

4.3.3. Rezultati redukcije ispitivanih mikroorganizama u uzorcima funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice

**Tablica 11.** Rezultati redukcije aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni u tretiranim uzorcima funkcionalnog soka i sosa na bazi rajčice

	<b>Redukcija TPC-a (log CFU/g)</b>	<b>Redukcija TMC-a (log CFU/g)</b>		<b>Redukcija TPC-a (log CFU/g)</b>	<b>Redukcija TMC-a (log CFU/g)</b>
Uzorak	Vrijeme skladištenja		Uzorak	Vrijeme skladištenja	
	0. dan			0. dan	
UJROP	1,7	1,0	USROP	2,0	**
TJROP	1,4	1,0	TSROP	1,7	**
HBJROP	*	1,0	HBSROP	2,0	**

\*TPC-aerobne mezofilne bakterije; TMC-plijesni; \*-objašnjenje u tekstu; \*\*-objašnjenje u tekstu

S obzirom na to da je koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija u HBJROP uzorku bila veća u odnosu na kontrolni uzorak (Tablica 9), nije bilo moguće odrediti redukciju TPC-a u navedenom uzorku\*, odnosno dobije se negativna vrijednost. Prema tome, nije moguće odrediti koji tretman je najuspješniji između svih provedenih tretmana. S druge strane, koncentracija plijesni jednaka je u svim tretiranim uzorcima (Tablica 9), stoga im je jednaka i vrijednost redukcije koja iznosi log 1,0 CFU/g. Vrijednosti redukcije TPC-a i TMC-a u uzorcima funkcionalnog soka prikazane su u Tablici 11.

Dobiveni rezultati iz Tablice 11 otkrivaju da tretman ultrazvukom visokog intenziteta i *hot break* tretman rezultiraju jednakom redukcijom TPC-a (log 2,0 CFU/g) u uzorcima funkcionalnog sosa na bazi rajčice. Vrijednost redukcije TPC-a u preostalom, TSROP uzorku je manja (1,7 CFU/g), stoga se može zaključiti da je toplinski tretman manje učinkovit u inaktivaciji aerobnih mezofilnih bakterija. Međutim, nije bilo moguće odrediti redukciju TMC-a s obzirom na to da je koncentracija plijesni u svim uzorcima sosa bila manja od 10 CFU/g\*\*.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Razvojem soka i sosa na bazi rajčice uz dodatak RuBisCO proteina i praha masline, funkcionalnih dodataka dobivenih iz nusproizvoda i otpada prehrambene industrije, povećana je nutritivna vrijednost proizvoda.
2. Tretmanom ultrazvuka visokog intenziteta postignuto je najveće povećanje koncentracije likopena (95,8 %) i klorofila *b* (87,8 %) u uzorku soka te najveće povećanje koncentracije likopena (55,3 %) i ukupnih fenola (91,2 %) u uzorku sosa, u usporedbi s uzorcima tretiranim toplinskim i *hot break* tretmanom.
3. Sedmodnevno skladištenje pokazalo se značajnim za antioksidacijsku aktivnost te koncentraciju klorofila *a*, klorofila *b* i likopena, a posebno u uzorcima soka gdje je rezultiralo značajnim smanjenjem antioksidacijske aktivnosti te u uzorcima sosa u kojima je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije likopena.
4. Mikrobiološkom analizom utvrđeno je da patogene bakterije *Escherichia coli* i *Bacillus coagulans* nisu bile prisutne (<10 CFU/g), dok je u kontrolnima uzorcima soka i sosa određena najveća koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni, s iznimkom kontrolnog uzorka sosa u kojem rast plijesni nije utvrđen (<10 CFU/g).
5. Djelovanjem ultrazvuka ostvarena je veća redukcija TPC-a u uzorku soka (log 1,7 CFU/g) te u uzorku sosa (log 2,0 CFU/g) u usporedbi s toplinskim tretmanom, a oba tretmana, kao i *hot break* tretman rezultirali su jednakom redukcijom TMC-a u uzorku soka (log 1,0 CFU/g).
6. Povećanje koncentracije aerobnih mezofilnih bakterija nakon skladištenja utvrđeno je u kontrolnim uzorcima soka i sosa, a do „oporavka“ bakterija tijekom skladištenja došlo je u uzorku soka tretiranog ultrazvukom.
7. Analizom rezultata fizikalnih parametara utvrđen je značajan utjecaj tretmana ultrazvukom, toplinskog tretmana i *hot break* tretmana na °Brix-a i električnu vodljivost uzoraka soka i sosa, dok je pH vrijednost ostala gotovo nepromijenjena.
8. Do najvećeg smanjenja °Brix-a uslijed skladištenja (36,4 %) došlo je kod uzorka soka tretiranog toplinskim tretmanom, dok je najveće povećanje (153,7 %) °Brix-a pokazao uzorak sosa tretiran *hot break* tretmanom.

## 6. LITERATURA

Aadil RM, Zeng XA, Abbasi AM, Khan MS, Khalid S, Jabbar S, Abid M (2014) Influence of power ultrasound on the quality parameters of grapefruit juice during storage. *Sci Lett* **3**, 6-12.

Aadil RM, Zeng XA, Han Z, Sun DW (2013) Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem* **141**, 3201-3206. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008>

Ağçam E, Akyıldız A, Dündar B (2018) Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices. U: Rajauria G, Tiwari BK (ured.) *Fruit Juices*, Elsevier, Amsterdam, str. 309-339.

Akdemir Evrendilek G, Bodruk A, Eker ME, Acar F (2022) Processing of ketchup by a pilot-scale ultrasonication system: Effects on quality properties and microbial inactivation. *Food Sci Technol Int*, 10820132221096900. <https://doi.org/10.1177/10820132221096900>

Akyüz, Ersus, S (2021) Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chem* **335**, 127673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127673>

Alexandri M, Kachrimanidou V, Papapostolou H, Papadaki A, Kopsahelis N (2022) Sustainable Food Systems: The Case of Functional Compounds towards the Development of Clean Label Food Products. *Foods* **11**, 2796. <https://doi.org/10.3390/foods11182796>

Andrés-Bello A, Barreto-Palacios V, García-Segovia P, Mir-Bel J, Martínez-Monzó J (2013) Effect of pH on Color and Texture of Food Products. *Food Eng Rev* **5**, 158-170. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9067-2>

Arfaoui M, Boulares M, Bezzezi A, Ayachi S, Ghrab M, Jouini NE i sur. (2022). Effect of the enrichment with natural antioxidants obtained by maceration or ultrasound-assisted extraction from olive leaves on organic extra virgin olive oil. *Riv Ital Sostanze Grasse* **99**, 131-140.

Arshad RN, Abdul-Malek Z, Roobab U, Ranjha MMAN, Režek Jambrak A, Qureshi MI, i sur. (2022) Nonthermal food processing: A step towards a circular economy to meet the sustainable development goals. *Food Chem X* **16**, 100516. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100516>

Attard E (2013) A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sci* **8**, 48-53. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0107-3>

Baltacıoğlu H (2022) Thermosonication of peach juice: investigation of PPO and POD activities, physicochemical and bioactive compounds changes, and development of FT-IR-based



chemometric models for the evaluation of quality. *Int J Food Sci Tech* **57**, 1688-1697. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15536>

Bazzarelli F, Mazzei R, Papaioannou E, Giannakopoulos V, Roberts MR, Giorno L (2022) Biorefinery of Tomato Leaves by Integrated Extraction and Membrane Processes to Obtain Fractions That Enhance Induced Resistance against *Pseudomonas syringae* Infection. *Membranes* **12**, 585. <https://doi.org/10.3390/membranes12060585>

Benderska O, Bessarab A, Shutyuk V, Iegorov B, Kashkano M (2021) Biological value of by-products of tomato processing. *J Food Sci Tech Ukraine* **15**, 28-36. <https://doi.org/10.15673/fst.v15i1.1972>

Bermudez-Aguirre D, Niemira BA (2022) Pasteurization of Foods with Ultrasound: The Present and the Future. *Appl Sci* **12**, 10416. <https://doi.org/10.3390/app122010416>

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

Bhatkar NS, Shirkole SS, Mujumdar AS, Thorat BN (2021) Drying of tomatoes and tomato processing waste: a critical review of the quality aspects. *Dry Technol* **39**, 1720-1744. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1910832>

Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP (2013) Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* **18**, 6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* **28**, 25-30.

Braniša J, Jenisová Z, Porubská M, Jomová K, Valko M (2014) Spectrophotometric determination of chlorophylls and carotenoids. An effect of sonication and sample processing. *J Microbiol, Biotechnol Food Sci* **2021**, 61-64.

Bursać Kovačević D, Bilobrk J, Buntić B, Bosiljkov T, Karlović S, Rocchetti G, i sur. (2019) High-power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in cloudy apple juice during storage. *J Food Process* **43**, e14023. <http://doi.org/10.1111/jfpp.14023>

Cano-Lamadrid M, Artés-Hernández F (2022) By-Products Revalorization with Non-Thermal

Treatments to Enhance Phytochemical Compounds of Fruit and Vegetables Derived Products: A Review. *Foods* **11**, 59. <https://doi.org/10.3390/foods11010059>

Carvalho GC, de Camargo BAF, de Araújo JTC, Chorilli M (2021) Lycopene: From tomato to its nutraceutical use and its association with nanotechnology. *Trends Food Sci Tech* **118**, 447-458. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.015>

Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK (2022) Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. *Foods* **11**, 122. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>

Chazaux M, Schiphorst C, Lazzari G, Caffarri S (2022) Precise estimation of chlorophyll a, b and carotenoid content by deconvolution of the absorption spectrum and new simultaneous equations for Chl determination. *Plant J* **109**, 1630-1648. <https://doi.org/10.1111/tpj.15643>

Cheng XF, Zhang M, Adhikari B (2014) Changes in quality attributes of strawberry purees processed by power ultrasound or thermal treatments. *Food Sci Technol Res* **20**, 1033-1041. <http://doi.org/10.3136/fstr.20.1033>

Cruz JMda, Ramos AS, Corrêa RF, Sanches EA, Campelo PH, Kinupp VF, i sur. (2023) Thermal Treatment and High-Intensity Ultrasound Processing to Evaluate the Chemical Profile and Antioxidant Activity of Amazon Fig Juices. *Processes* **11**, 408. <https://doi.org/10.3390/pr11020408>

Dhansu P, Ram B, Singh AK, Tomar SK, Karuppaiyan R, Kumar R, i sur. (2023) Different Treatments for Sugarcane Juice Preservation. *Foods* **12**, 311. <https://doi.org/10.3390/foods12020311>

Farneti B, Schouten RE, Woltering EJ (2012) Low temperature-induced lycopene degradation in red ripe tomato evaluated by remittance spectroscopy. *Postharvest Biol Tec* **73**, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.008>

Foti P, Pino A, Romeo FV, Vaccalluzzo A, Caggia C, Randazzo CL (2022) Olive pomace and pâté olive cake as suitable ingredients for food and feed. *Microorganisms* **10**, 237. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020237>

Gavran M (2022) Optimiranje parametara ultrazvučne obrade soka i sosa rajčice, te utjecaj na fizikalna svojstva i mikrobiološku ispravnost (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Ghinea C, Prisacaru AE, Leahu A (2022) Physico-chemical and sensory quality of pasteurized apple juices extracted by blender and cold pressing juicer. *Ovidius University Annals Chem* **33**, 84-93. <https://doi.org/10.2478/auoc-2022-0012>
- Gonzalez MNG, Björnsson L (2022) Life cycle assessment of the production of beet sugar and its by-products. *J Clean Prod* **346**, 131211. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131211>
- Grace MH, Hoskin RT, Hayes M, Iorizzo M, Kay C, Ferruzzi MG, i sur. (2022) Spray-dried and freeze-dried protein-spinach particles; effect of drying technique and protein type on the bioaccessibility of carotenoids, chlorophylls, and phenolics. *Food chem* **388**, 133017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133017>
- Guo Z, Jia X, Zheng Z, Lu X, Zheng Y, Zheng, B, Xiao J (2018) Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review. *Phytochem Rev* **17**, 1091-1110. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9526-0>
- Jaywant SA, Singh H, Arif KM (2022) Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors* **22**, 2290. <https://doi.org/10.3390/s22062290>
- Junker-Frohn LV, Lück M, Schmittgen S, Wensing J, Carraresi L, Thiele B, i sur. (2019) Tomato's green gold: bioeconomy potential of residual tomato leaf biomass as a novel source for the secondary metabolite rutin. *ACS omega* **4**, 19071-19080. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01462>
- Jurić S, Jurić M, Król-Kilińska Ż, Vlahoviček-Kahlina K, Vinceković M, Dragović-Uzelac V, i sur. (2020) Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods. *Food Rev Int* **38**, 1735-1790. <http://doi.org/10.1080/87559129.2020.1837862>
- Kahraman O, Feng H (2021) Continuous-flow manothermosonication treatment of apple-carrot juice blend: Effects on juice quality during storage. *Food Sci Tech* **137**, 110360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110360>
- Kelebek H, Selli S, Kadiroğlu P, Kola O, Kesen S, Uçar B, i sur. (2017) Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process, *Food Chem* **220**, 31-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.190>
- Kalsi BS, Singh S, Alam MS (2022) Influence of ultrasound processing on the quality of guava juice. *J Food Process Eng*, e14163. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14163>

- Kamal H, Le C, Salter AM, Ali A (2021) Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities. *Compr Rev Sci Food Saf* **20**, 2455-2475. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>
- Kumar M, Chandran D, Tomar M, Bhuyan DJ, Grasso S, Sá AGA, i sur. (2022) Valorization Potential of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed: Nutraceutical Quality, Food Properties, Safety Aspects, and Application as a Health-Promoting Ingredient in Foods. *Horticulturae* **8**, 265. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030265>
- Kumar M, Tomar M, Bhuyan DJ, Punia S, Grasso S, Sá AGA, i sur. (2021) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed: A Review on Bioactives and Biomedical Activities. *Biomed Pharmacother* **142**, 112018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112018>
- Kurina, AB, Solovieva AE, Khrapalova IA, Artemyeva AM (2021) Biochemical composition of tomato fruits of various colors. *Vavilov J Genet Breed*, **25**, 514-527. <https://doi.org/10.18699/VJ21.058>
- Lamuela-Raventós RM (2018) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. U: Apak R, Capanoglu E, Shadidi F (ured.) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent Trends and Application, John Wiley & Sons Ltd., Oxford, str. 107–115.
- Laranjeira T, Costa A, Faria-Silva C, Ribeiro D, de Oliveira JMPF, Simões S, Ascenso A (2022) Sustainable Valorization of Tomato By-Products to Obtain Bioactive Compounds: Their Potential in Inflammation and Cancer Management. *Molecules* **27**, 1701. <https://doi.org/10.3390/molecules27051701>
- Lepaus BM, Santos AKPdO, Spaviero AF, Daud PS, de São José JFB (2023) Thermosonication of Orange-Carrot Juice Blend: Overall Quality during Refrigerated Storage, and Sensory Acceptance. *Molecules* **28**, 2196. <https://doi.org/10.3390/molecules28052196>
- Lu C, Ding J, Park HK, Feng H (2020) High intensity ultrasound as a physical elicitor affects secondary metabolites and antioxidant capacity of tomato fruits. *Food Control* **113**, 107176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107176>
- Maestri D, Barrionuevo D, Bodoira R, Zafra, A, Jiménez-López J, Alché JDD (2019) Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europaea* L.) seeds. *J Food Sci Tech* **56**, 4359-4370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03904-5>

- Magwaza LS, Opara UL (2015) Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. *Sci Hort* **184**, 179-192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>
- Manzoor MF, Murtaza A, Aadil RM, Ali A, Goksen G, Li J, i sur. (2023) Sustainable emerging sonication processing: Impact on fungicide reduction and the overall quality characteristics of tomato juice. *Ultrason Sonochem* **94**, 106313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106313>
- Manzoor MF, Xu B, Khan S, Shukat R, Ahmed N, Imran M, i sur. (2021) Impact of high-intensity thermosonication treatment on spinach juice: Bioactive compounds, rheological, microbial, and enzymatic activities. *Ultrason Sonochem* **78**, 105740. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105740>
- Martí R, Roselló S, Cebolla-Cornejo J (2016) Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers* **8**, 58. <https://doi.org/10.3390/cancers8060058>
- Martin AH, Castellani O, de Jong GA, Bovetto L, Schmitt C (2019) Comparison of the functional properties of RuBisCO protein isolate extracted from sugar beet leaves with commercial whey protein and soy protein isolates. *J Sci Food Agr* **99**, 1568-1576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9335>
- Massini L, Rico D, Martín-Diana AB, Barry-Ryan C (2016) Quality markers of functional tomato juice with added apple phenolic antioxidants. *Beverages* **2**, 4. <https://doi.org/10.3390/beverages2010004>
- Miljković VM, Momčilović MZ, Zvezdanović JB, Gajić IL, Mrmošani JM, Mihajlov-Krstev T (2022) Carotenoid and flavonoid levels, antioxidant activity and antimicrobial properties of tomato grown in Serbia. *J Food Nutr Res* **61**, 402-414.
- Mu Y, Feng Y, Wei L, Li C, Cai G, Zhu T (2020) Combined effects of ultrasound and aqueous chlorine dioxide treatments on nitrate content during storage and postharvest storage quality of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem* **333**, 127500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127500>
- Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nadeem M, Ubaid N, Qureshi TM, Munir M, Mehmood A (2018) Effect of ultrasound and

chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrason Sonochem* **45**, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>

Oboulbiga EB, Parkouda C, Savadogo B, Traore K, Traore AS, Dicko MH (2020) Changes in physicochemical properties and bioactive compounds of tomato pulp submitted to different processing techniques. *Afr J Food Sci* **14**, 330-335. <https://doi.org/10.5897/AJFS2020.1998>

Oliveira VS, Rodrigues S, Fernandes FA (2015) Effect of high power low frequency ultrasound processing on the stability of lycopene. *Ultras Sonochem* **27**, 586-591. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.016>

Papadaki S, Panagiotopoulou M, Pekakis P, Thanassoulia I, Krokida M, Symeonidou P (2022) Innovative Functional Plastic Films as Cover for Stonewool Grow Blocks and Their Effect on Tomato Hydroponic Cultivation. *Chem Proc* **10**, 56. <https://doi.org/10.3390/IOCAG2022-12328>

Paunescu IC, Paunescu IA, Marmandiu A (2016) Studies on the quality of canned vegetables-Tomato sauce and tomato paste-Obtained in a specialized unit. *J Biotechnol* **231**, S45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.172>

Pearce FG, Brunke JE (2023) Is now the time for a Rubiscuit or Ruburger? Increased interest in Rubisco as a food protein. *J Exp Bot* **74**, 627-637. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac414>

Piazza L, Picchi V, Cortellino G, Faoro F, Masseroni E, Girotto F (2022) Effect of high frequency ultrasound pre-treatment on nutritional and technological properties of tomato paste. *Food Sci Technol Int* **28**, 180-189. <http://doi.org/10.1177/10820132211003788>

Pinela J, Barros L, Petropoulos SA (2022) Editorial: Advances in tomato and tomato compounds research and technology. *Front Nutr* **9**, 1018498. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1018498>

Putnik P, Pavlić B, Šojić B, Zavadlav S, Žuntar I, Kao L, i sur. (2020) Innovative hurdle technologies for the preservation of functional fruit juices. *Foods* **9**, 699. <https://doi.org/10.3390/foods9060699>

Rivero AG, Keutgen AJ, Pawelzik E (2022) Antioxidant Properties of Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as Affected by Cultivar and Processing Method. *Horticulturae* **8**, 547. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060547>

- Routray W, Orsat V (2019) Agricultural and Food Industry By-Products: Source of Bioactive Components for Functional Beverages. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) *Nutrients in Beverages*, Elsevier, Amsterdam, str. 543-589.
- Saini, RK, Moon SH, Keum YS (2018) An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids. *Food Res Int* **108**, 516-529. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.003>
- Schoefs B (2004) Determination of pigments in vegetables. *J Chromatogr A* **1054**, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.105>
- Selim S, Albqmi M, Al-Sanea MM, Alnusaire TS, Almuhayawi MS, AbdElgawad H, i sur. (2022) Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Front Nutr* **9**, 1008349. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008349>
- Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Silva GG, Dutra MDCP, de Oliveira JB, Rybka ACP, Pereira GE, dos Santos Lima M. (2019) Processing methods with heat increases bioactive phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices. *J Food Biochem* **43**, e12732. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12732>
- Silva EK, Arruda HS, Pastore GM, Meireles MAA, Saldana MD (2020) Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. *Ultrason sonochem* **63**, 104942. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104942>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158.
- Smedley SI (2012) *The interpretation of ionic conductivity in liquids*, Springer, New York.
- Sorrenti V, Burò I, Consoli V, Vanella L (2023) Recent Advances in Health Benefits of Bioactive Compounds from Food Wastes and By-Products: Biochemical Aspects. *Int J Mol Sci* **24**, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms24032019>
- Starek A, Kobus Z, Sagan A, Chudzik B, Pawłat J, Kwiatkowski M., i sur. (2021) Influence of ultrasound on selected microorganisms, chemical and structural changes in fresh tomato juice. *Sci Rep* **11**, 3488. <http://doi.org/10.1038/s41598-021-83073-8>

- Sulaiman A, Farid M, Silva FVM (2017) Strawberry puree processed by thermal, high pressure, or power ultrasound: Process energy requirements and quality modeling during storage. *Food Sci Technol Int* **4**, 293-309. <http://doi.org/10.1177/1082013216685485>
- Tomaş M, Sağdıç O, Çatalkaya G, Karıncaoğlu DK, Güven EÇ (2019) Effects of cooking and extra virgin olive oil addition on bioaccessibility of carotenes in tomato sauce. *Turk J Agric For* **43**, 478-484. <https://doi.org/10.3906/tar-1801-127>
- Tovar-Pérez EG, Aguilera-Aguirre S, López-García U, Valdez-Morales M, Ibarra-Zurita AK, Chacón-López A (2020) Effect of ultrasound treatment on the quality and contents of polyphenols, lycopene and rutin in tomato fruits. *Czech J Food Sci* **38**, 20–27. <https://doi.org/10.17221/189/2019-CJFS>
- Trombino S, Cassano R, Procopio D, Di Gioia ML, Barone E (2021) Valorization of Tomato Waste as a Source of Carotenoids. *Molecules* **26**, 5062. <https://doi.org/10.3390/molecules26165062>
- Tsikrika K, Chu BS, Bremner DH, Lemos A (2022) Effect of ultrasonic treatment on enzyme activity and bioactives of strawberry puree. *Int J Food Sci Technol* **57**, 1739-1747. <http://doi.org/doi:10.1111/IJFS.15550>
- USDA (2019) FoodData Central. USDA – United States Department of Agriculture. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170457/nutrients> Pristupljeno 18. listopada 2022.
- Vigneshwaran G, More PR, Arya SS (2022) Non-thermal hydrodynamic cavitation processing of tomato juice for physicochemical, bioactive, and enzyme stability: Effect of process conditions, kinetics, and shelf-life extension. *Curr Res Food Sci* **5**, 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.025>
- Wu X, Yu L, Pehrsson PR (2022) Are Processed Tomato Products as Nutritious as Fresh Tomatoes? Scoping Review on the Effects of Industrial Processing on Nutrients and Bioactive Compounds in Tomatoes. *Adv Nutr* **13**, 138-151. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab109>
- Xu Q, Adyatni I, Reuhs B (2018) Effect of Processing Methods on the Quality of Tomato Products. *Food Nutr Sci* **9**, 86-98. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.92007>



Zakon (2022) Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 83, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022\\_07\\_83\\_1248.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022_07_83_1248.html) Pristupljeno 13. ožujka 2023.

## 7. PRILOZI

### Prilog 1. Sastav DRBC agara

Tvar	Koncentracija (g/L)
Enzim iz mesa ili biljnog tkiva (pepton)	5
D-glukoza	10
Monokalijev fosfat	1
Magnezijev sulfat	0,5
Dikloran	0,002
Rose bengal boja	0,025
Kloramfenikol	0,1
Agar	12-15
Dikloran	0,002

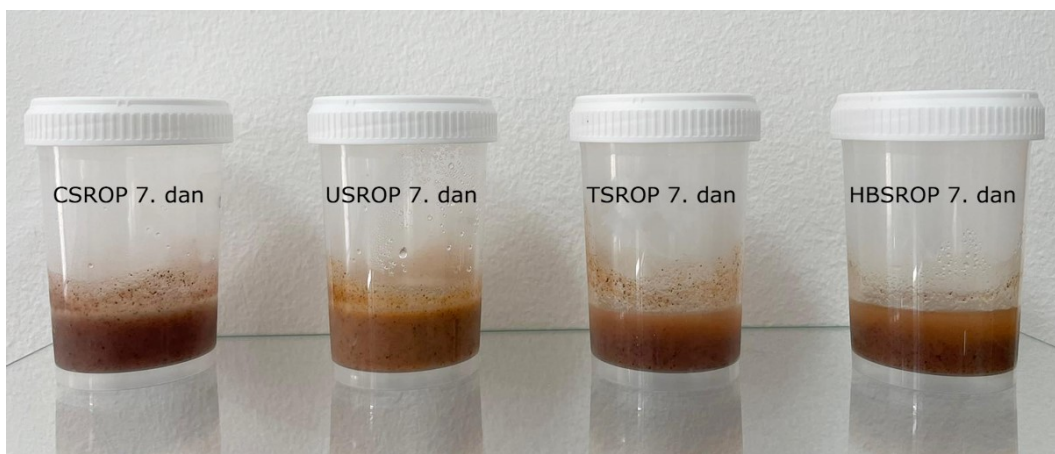
### Prilog 2. Sastav MRS agara

Tvar	Koncentracija (g/L)
Univerzalni pepton	10
Mesni ekstrakt	5
Kvašćev ekstrakt	5
D-glukoza	20
Dikalijev fosfat	2
Diamonijev hidrogen citrat	2
Natrijev acetat	5
Magnezijev acetat	0,1
Manganov sulfat	0,05
Agar	12
Diaminijev hidrigen citrat	2

**Prilog 3.** Prikaz kontrolnog uzorka i tretiranih uzoraka funkcionalnog soka na bazi rajčice skladištenih na 7 dana pri +4 °C



**Prilog 4.** Prikaz kontrolnog uzorka i tretiranih uzoraka funkcionalnog sosa na bazi rajčice skladištenih na 7 dana pri +4 °C



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis