

# Utjecaj „tehnologije preprekama“ na stabilnost polifenolnih spojeva u sokovima od jagode tijekom skladištenja

---

Jambrović, Maja

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:159:856946>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Maja Jambrović

**UTJECAJ „TEHNOLOGIJE  
PREPREKAMA“ NA STABILNOST  
POLIFENOLNIH SPOJEVA U  
SOKOVIMA OD JAGODE  
TIJEKOM SKLADIŠTENJA**

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



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

## ZAHVALA

*Veliko hvala izv.prof.dr.sc. Danijeli Bursać Kovačević na prihvaćanju mentorstva, susretljivosti, svakom savjetu i razgovoru tijekom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem i asistentici mag. ing. Anici Bebek Markovinović na pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Najviše od svega zahvaljujem se svojim roditeljima i bratu Mateju koji su uvijek bili tu za mene, u najsretnijim i najtežim trenucima! Hvala što ste vjerovali da ću uspjeti kada je bilo teško i kada sam sumnjala u samu sebe i svoje mogućnosti. Zbog vas i vaše podrške sam postala ono što sam danas. Veliko hvala upućujem i ostatku svoje obitelji, posebno teti Neni bez čije informatičke opreme ovaj rad ne bi napisan.*

*Hvala mojim kolegicama koje su mi postale prijateljice za cijeli život, Ana Mariji i Mihaeli, što su ovaj dio mog životog puta učinile ljepšim i zabavnijim, što su mi bile podrška u teškim trenucima i pružile mi motivacija za dalje. Hvala za svaku kavu, razgovor i smijanje do suza. Bez vas studiranje ne bi bilo toliko zabavno! Hvala mojim prijateljicama, što su bile tu za mene i pružale mi podršku!*

*Hvala dragom Bogu na svemu i na svakoj uslišanoj molitvi!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ „TEHNOLOGIJE PREPREKAMA“ NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE TIJEKOM SKLADIŠTENJA

*Maja Jambrović, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058210616*

**Sažetak:** Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj tehnologije preprekama u kombinaciji pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka visoke snage (HPU), ovisno o redoslijedu primjene, kao i trajanju obrade, na stabilnost polifenolnih spojeva u sokovima od jagode tijekom skladištenja 7 dana/4 °C. Sokovi su podvrgnuti kombinaciji tretmana PEF (30 kV cm<sup>-1</sup>, 100 Hz; 1,5 - 4,5 min) i HPU (amplituda 25 %, puls 50 %; 2,5 - 7,5 min). Slijed primjenjenih tehnologija značajno utječe na stabilnost polifenolnih spojeva te je HPU+PEF slijed bolji odabir u usporedbi s PEF+HPU. Također, slijed tehnologija HPU+PEF pogodovao je boljoj stabilnosti polifenolnih spojeva u 0. danu skladištenja u odnosu na PEF+HPU. Kraće trajanje tretmana obiju tehnologija, neovisno o slijedu primjene, pozitivno je utjecao na veću stabilnost ukupnih fenola. U zaključku, tehnologija preprekama u odabiru PEF i HPU tehnologija pri optimalnim uvjetima je pokazala obećavajuće rezultate u području primjene održive prerade funkcionalnih sokova od jagode.

**Ključne riječi:** *tehnologija preprekama, pulsirajuće električno polje, ultrazvuk visoke snage, bioaktivni spojevi, sok od jagode*

**Rad sadrži:** 59 stranica, 8 slika, 9 tablica, 103 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### THE INFLUENCE OF HURDLE TECHNOLOGY ON THE STABILITY OF POLYPHENOL COMPOUNDS IN STRAWBERRY JUICES DURING STORAGE

*Maja Jambrović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210616*

**Abstract:** The aim of this work was to investigate the influence of hurdle technology in combination of pulsed electric field (PEF) and high-power ultrasound (HPU), depending on order of application and duration on stability of polyphenols in strawberry juices during storage for 7 days/4 °C. Juices were subjected to PEF (30 kV cm<sup>-1</sup>, 100 Hz; 1.5-4.5 min) and HPU (amplitude 25 %, pulse 50 %; 2.5-7.5 min). The sequence of technologies has significant impact on stability of polyphenols, and HPU+PEF is the better choice compared to PEF+HPU. Moreover, HPU+PEF favored a better stability of polyphenols at 0th day of storage compared to PEF+HPU. The shorter treatment time of both technologies, regardless of sequence of application, had positive effect on higher stability of total phenols. In conclusion, when PEF and HPU technologies were selected under optimal conditions, the hurdle technology showed promising results in the application field of sustainable processing of functional strawberry juices.

**Keywords:** *hurdle technology, pulsed electric fields, high power ultrasound, bioactive compounds, strawberry juice*

**Thesis contains:** 59 pages, 8 figures, 9 tables, 103 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

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

#### **Reviewers:**

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

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



Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. NETOPLINSKE TEHNOLOGIJE U OBRADI VOĆNIH SOKOVA.....	2
2.2. TEHNOLOGIJA PREPREKAMA (engl. <i>Hurdle concept</i> ) – NOVI PRISTUP ZA POBOLJŠANU KVALITETU I SIGURNOST HRANE.....	3
2.3. TEHNOLOGIJA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) U TEHNOLOGIJI PREPREKAMA.....	4
2.4. TEHNOLOGIJA ULTRAZVUKA VISOKE SNAGE (HPU) U TEHNOLOGIJI PREPREKAMA.....	6
2.5. JAGODA KAO FUNKCIONALNA HRANA.....	7
2.5.1. Funkcionalni sok od jagode .....	11
2.5.2. Stabilnost polifenolnih spojeva soka od jagode.....	13
2.6. UTJECAJ TEHNOLOGIJE PREPREKAMA NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKU OD JAGODE .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE RADA.....	17
3.2.1. Priprema soka od jagode.....	17
3.2.2. Obrada sokova od jagoda „tehnologijom preprekama“ u kombinaciji pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka visoke snage (HPU).....	18
3.2.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva.....	21
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	22
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje kondenziranih tanina.....	24
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakta tretiranih uzorka soka od jagode.....	25
3.2.7. Statistička obrada rezultata .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>29</b>

4.1 UTJECAJ TRETMANA PEF + HPU NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE.....	29
4.2. UTJECAJ TRETMANA HPU + PEF NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE.....	37
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Jagode su jedna od omiljenijih voćnih vrsta među potrošačima zbog svojih primamljivih senzorskih karakteristika, niskokalorične su, te su bogat izvor bioaktivnih spojeva kao što su polifenoli koji povoljno utječu na zdravlje potrošača i mogu pomoći u prevenciji različitih tipova oboljenja. Zbog svog kemijskog sastava i visokog udjela vode, jagode su kratkog roka trajanja te dozrijevaju u svega nekoliko tjedana u našem području, a kako bi se mogle konzumirati tijekom cijele godine potrebno ih je zamrznuti ili preraditi u sokove, pekmeze ili želirane proizvode.

Voćni sokovi nakon proizvodnje prolaze i proces pasterizacije kako bi se osigurala mikrobiološka kvaliteta i produljio rok trajanja tijekom skladištenja. Izlaganjem voćnih sokova povišenim temperaturama dolazi do narušavanja senzorskih svojstava, ali i degradacije bioaktivnih spojeva koji proizvodu osiguravaju „funktionalni“ značaj. Sve je više znanstvenih istraživanja usmjereno na primjenu netoplinskih tehnologija u obradi voćnih sokova s ciljem proizvodnje mikrobiološki sigurnih proizvoda s produljenim rokom trajanja, koji su minimalno procesirani uz očuvana izvorna senzorska i nutritivna svojstva. Tehnologija preprekama kombinira različite prepreke (npr. pH, aktivitet vode ( $a_w$ ), inovativne tehnologije kao što su ultrazvuk visoke snage (engl. *High Power Ultrasound, HPU*) i pulsirajuće električno polje (engl. *Pulsed Electric Field, PEF*) te dr. koje mikroorganizmi ne mogu „prijeći“ te se primjenom ove tehnologije može osigurati zdravstvena ispravnost, uz očuvanje nutritivne i biološke vrijednosti. Iako ovaj tehnološki koncept još nije implementiran u industrijski sektor, rezultati najnovijih istraživanja obećavaju širu primjenu i inovativni pristup u očuvanju kvalitete voćnih proizvoda u skladu s kružnim gospodarstvom.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj tehnologije preprekama tj. kombinacije ultrazvuka visoke snage i pulsirajućeg električnog polja u ovisnosti o slijedu primjene (PEF + HPU i HPU + PEF) i vremenu obrade na stabilnost polifenolnih spojeva u sokovima od jagode. Stabilnost polifenolnih spojeva ispitana je i u sokovima skladištenim 7 dana pri 4 °C kako bi se utvrdio potencijal odabrane tehnologije preprekama u proizvodnji funkcionalnog soka od jagode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. NETOPLINSKE TEHNOLOGIJE U OBRADI VOĆNIH SOKOVA

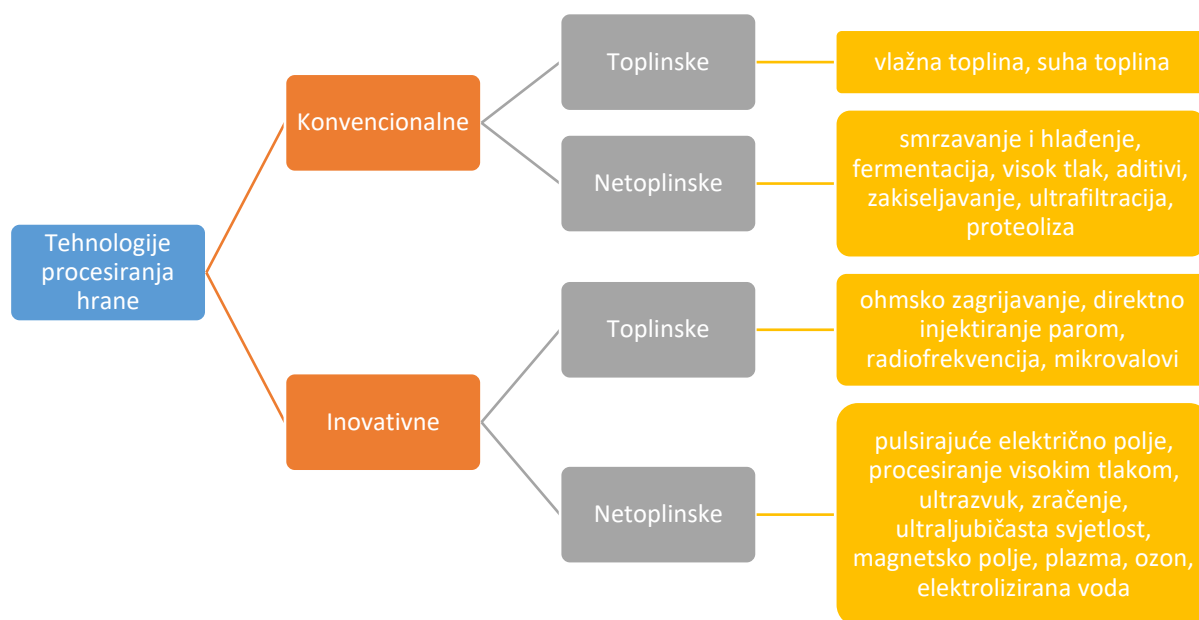
Poznato je da prehrana bogata voćem i povrćem ima pozitivan učinak na zdravlje i opće stanje ljudi zbog djelovanja raznih sastojaka od kojih se sastoje, kao što su polifenoli, karotenoidi, tokoferoli, vitamini, minerali, dijetalna vlakna i drugi (Bursać Kovačević i sur., 2020). Zadnjih je godina konzumacija voća i povrća u padu te se veća konzumacija sve više promovira zbog njihove dobrobiti na zdravlje populacije od strane vlada država i ne-vladinih organizacija, a kao primjer može se navesti Europska Unija tj. Republika Hrvatska u kojoj Ministarstvo poljoprivrede u suradnji s drugim ministarstvima i organizacijama donosi Nacionalnu strategiju za provedbu Školske sheme voća i povrća te mlijeka i mliječnih proizvoda od školske godine 2023./2024. do školske godine 2028./2029. koja promiče uravnoteženu prehranu i zdrave prehrambene navike djece u vrtićima i školama (Ministarstvo poljoprivrede, 2023). Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje dnevnu konzumaciju od 5 porcija voća i povrća (WHO, 2003). Prema provedenim istraživanjima koji su objavili Eurostas i Hrvatski zavod za javno zdravstvo, u Republici Hrvatskoj u 2019. godini 1 od 4 osobe odnosno 28 % ispitanika se izjasnilo da ne konzumira voće ili povrće svakodnevno, a samo 10 % ih je konzumiralo preporučenih 5 porcija ili više svakoga dana. U prosjeku je 62 % ispitanika reklo je da je jelo između 1 i 4 porcije voća i povrća dnevno (HZJZ, 2021).

U svijetu se u zadnjih par godina svježe voće i povrće sve više konzumira u obliku cijedenih sokova, *smoothie* napitaka te fermentiranih pića (Škegro i sur., 2021). Kvaliteta voćnih sokova ovisi o fizikalnim, organoleptičkim, mikrobiološkim aspektima i enzimskoj aktivnosti. Rok trajanja proizvoda može biti skraćen zbog djelovanja enzima kao što su peroksidaze, polifenol oksidaze,  $\beta$ -glukozidaze i drugi, ali i rasta mikroorganizama i/ili oksidacijskih reakcija. Kako bi se inaktivirali enzimi, ali i osigurala zdravstvena ispravnost, voćni sokovi se tradicionalno konzerviraju toplinskom obradom (Iqbal i sur., 2019). Visoka temperatura ipak negativno djeluje na bioaktivni sastav, ali i na parametre boje te senzorska obilježja, stoga zadnjih nekoliko godina raste interes za primjenom netoplinskih načina konzerviranja (Putnik i Bursać Kovačević, 2021). U netoplinske postupke ubrajaju se tretmani visokim tlakom (engl. *High Pressure Processing, HPP*), hladna atmosferska plazma, obrada inertnim plinom, membranski procesi, zračenje, PEF, HPU i dr. Iako se netoplinski tretmani čine manje invazivnim od toplinskih, sam učinak ovisi o matriksu hrane koja se obrađuje (Alves Filho i sur., 2016), te je stoga potrebno odabrati najprikladniji netoplinski postupak uz validirane uvjete prerade kako bi se zadržali svi hranjivi sastojci i izvorna organoleptička svojstva (Koutchma i sur., 2016).

## **2.2. TEHNOLOGIJA PREPREKAMA (engl. *Hurdle concept*) – NOVI PRISTUP ZA POBOLJŠANU KVALITETU I SIGURNOST HRANE**

Danas su kvaliteta i sigurnost hrane kako za proizvođače, tako i za potrošače, vrlo važne stavke u proizvodnji i manipulaciji hranom jer opasnosti koje se mogu prenositi hranom uzrokuju velike gospodarske gubitke proizvođačima, trgovačkim lancima pa i samim kupcima. Prehrambena industrija ulaže velike napore kako bi sigurnost hrane svela na najveću moguću razinu (Jurica i sur., 2021). Prilikom rješavanja problema povezanih sa sigurnošću hrane prehrambena industrija se oslanja na konvencionalne, ali i novije tehnologije vodeći pri tom računa na njihov utjecaj na kvalitetu hrane, hranjive sastojke te njezina organoleptička svojstva. Opasnosti koje narušavaju sigurnost hrane dijele se na fizičke, kemijske i biološke. U biološke opasnosti se ubrajaju patogene bakterije, virusi, paraziti i gljivice, a predstavljaju najznačajnije opasnosti jer kod ljudi uzrokuju većinu bolesti koje se prenose putem hrane (Khan i sur., 2016). Određeni mikroorganizmi u hrani izazivaju negativne promjene hrane tj. uzrokuju kvarenje hrane, a mogu proizvoditi i opasne toksine. Neke od konvencionalnih tehnika čuvanja hrane (slika 1) su smrzavanje, hlađenje, smanjenje aktiviteta vode poput sušenja, pasterizacije, fermentacije te dodataka antimikrobnih sredstava. Također, sve više se primjenjuju inovativne tehnologije procesiranja hrane kao što su ohmsko zagrijavanje, zračenje, mikrovalovi i drugo, a utvrđeno je da mogu poboljšati sigurnost i produljiti rok trajanja uz minimalno narušavanje izvorne kvalitete.

Potrošači su danas sve više zainteresirani za minimalno procesirane proizvode bez aditiva, poboljšane sigurnosti i dužeg roka trajanja, uz zadržavanje bioloških i funkcionalnih svojstava (Granato i sur., 2019). Zbog tih činjenica, prehrambena industrija kombinira različite tehnologije u preradi hrane odnosno koristi takozvani koncept „tehnologije preprekama“ primjenjujući točno definirani slijed procesnih prepreka koje prisutni mikroorganizmi ne mogu „prijeći“ (Herceg i sur., 2009). Cilj primjene „tehnologije preprekama“ jest istovremeno poboljšanje nutritivne i senzorske kvalitete te poboljšanje sigurnosti hrane (Rahman, 2015). Glavna prednost uporabe „tehnologije preprekama“ koju čine kombinacije različitih tehnologija ogleda se u sinergističkom učinku različitih mehanizama kojima se postiže konzervirajući učinak (Rahman, 2015). Neke od uspješnijih kombinacija različitih tehnologija protiv patogenih mikroorganizama i mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje su: PEF i toplinski procesi, visoki tlak i toplinski procesi, ozon i toplinski procesi, UV svjetlo i radio frekvencija, mikrovalovi i  $\gamma$ -zračenje itd. (Khan i sur., 2016). Kombinacijom prepreka svaki se pojedinačni proces može provoditi u znatno blažim uvjetima nego kada bi se primjenjivao zasebno, a dobiveni proizvod se može smatrati mikrobiološki stabilnim jer prisutni mikroorganizmi ne mogu prevladati prepreke (Putnik i sur., 2020).



**Slika 1.** Konvencionalne i inovativne tehnologije procesiranja hrane (prema Khan i sur., 2016)

### 2.3. TEHNOLOGIJA PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA (PEF) U TEHNOLOGIJI PREPREKAMA

PEF je netoplinska tehnologija obrade hrane kojoj je jedna od značajki inaktivacija mikroorganizama i enzima, a može poslužiti kao alternativa toplinskoj pasterizaciji (García-García i sur., 2015). Također, može se koristiti i za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog i/ili animalnog materijala (Koubaa i sur., 2018). Uobičajeno se koristi za tretiranje tekućih proizvoda kao što su voćni sokovi, mliječni proizvodi, tekuća jaja i alkoholna pića (Dziadek i sur., 2019). Ovisno o primijenjenim procesnim parametrima, kao što su snaga električnog polja ili broj pulseva, djelovanje PEF-a može uzrokovati različite efekte i stoga se koristiti u različite svrhe (Gabrić i sur., 2017; Yu i sur., 2015). Električno polje ovisi o električnom potencijalu, razmaku između elektroda i obliku vala, te širini pulsa. Također, tretman PEF-om ovisi o parametrima reaktora i medija koji se tretira. Hrana koja se nalazi između dviju elektroda se izlaže kratkim pulsevima ( $< 10$  ms) električnog polja visokog napona ( $0,1 - 50$  kV  $\text{cm}^{-1}$ ). Iako mehanizam djelovanja na staničnoj razini još uvijek nije pouzdano definiran, najučestalije objašnjenje mehanizma je potkrijepljeno fenomenom elektroporacije i elektropermeabilnosti stanične membrane pri čemu dolazi do pojave oštećenja membrane nastajanjem (i)reverzibilnih ruptura kao rezultat djelovanja vanjskog električnog polja (Salehi, 2020a; Herceg i sur., 2009). PEF inducira elektrokemijske reakcije bioloških makromolekula tako što dolazi do polarizacije i promjene u njihovoj mikrostrukturi i funkcijskim svojstvima. Dolazi do povećanja propusnosti membrane što je posljedica destabilizacije

lipidnog dvosloja i proteinskih kanala nastajanjem nanopora (Kostelac i sur., 2020). Istraživanja usmjerena na ispitivanje utjecaja pulsirajućeg električnog polja visokog intenziteta (engl. *High Intesity Pulsed Electric Field, HIPEF*) na redukciju mikroorganizma pokazuju da je utjecaj sličan utjecaju toplinske pasterizacije tj. dolazi do njihovog uništenja, no za razliku od pasterizacije, pri HIPEF tretmanu degradacija arome, vitamina i drugih nutrijenata je evidentna u znatno nižem stupnju (Espachs-Barroso i sur., 2003). Provedena su i istraživanja utjecaja PEF tretmana na stabilnost enzima u voćnim sokovima te su zabilježeni rezultati inaktivacije različitih enzima u soku od jagode, jabuke, lubenice i citrusnim sokovima (Roobab i sur., 2022).

Rezultati nekih studija koje su upotrebljavale PEF tijekom proizvodnje soka ukazuju da njegovo djelovanje može rezultirati većim udjelom vitamina i polifenolnih spojeva u usporedbi s konvencionalnim postupcima proizvodnje (Nowosad i sur., 2021). Također, u usporedbi s drugim toplinskim tehnologijama obrade, neke od prednosti PEF-a su skraćeno vrijeme procesiranja, niža temperatura procesiranja, poboljšana ekstrakcija polifenola i dr. (Salehi, 2020a). Ipak, ekonomičnost PEF tretmana u industriji sokova još uvijek je u razmatranju. Prema industrijskim procjenama, ukupni trošak za pasterizaciju jedne litre soka iznosi oko 0,04 \$, dok za obradu PEF-om iznosi oko 0,056 \$, no trošak varira ovisno o proizvodu koji se obrađuje i primijenjenim procesnim parametrima (Sampedro i sur., 2013).

Sok od jagode tretiran HIPEF-om pokazuje zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta od 75 do 100 % u odnosu na netretirani sok čiji antioksidacijski kapacitet iznosi 38,5 %, a mjerenje se provodilo DPPH metodom (Odriozola-Serrano i sur., 2009). Procesiranje PEF-om ne samo da može osigurati mikrobiološku sigurnost i stabilnost sokova u usporedbi s toplinskim tretmanima procesiranja, već se mogu osigurati i proizvodi s višim udjelom antioksidacijskih spojeva (Narendar i sur., 2018). HIPEF tretmanom može se sačuvati prvotna boja soka od jagode te reducirati njezino posmeđivanje tijekom skladištenja u odnosu na sokove tretirane konvencionalnim načinom (Aguiló-Aguayo i sur., 2009).

PEF ipak djeluje samo na vegetativne stanice mikroorganizama, dok njegovo djelovanje na spore nije učinkovito (Kempkes, 2017), a kako bi se postigla zadovoljavajuća sigurnost proizvoda PEF se može kombinirati s drugim procesima konzerviranja. PEF je moguće kombinirati s manotermosonifikacijom, toplinom uz dodatak antimikrobnih aditiva, bakteriocinima, UV svjetlom, ultrazvukom itd. (Putnik i sur., 2020). Zaključno, PEF ima sve veći utjecaj u proizvodnji voćnih sokova kao učinkovita netoplinska, čista i zelena tehnologija za proizvodnju sokova s očuvanom izvornom bojom, senzorskim i nutritivnim svojstvima te poboljšanom sigurnosti i stabilnosti (Roobab i sur., 2022). U skladu s HACCP propisima o sokovima (21 CFR 120) Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) (2021), PEF se može koristiti za komercijalnu pasterizaciju sokova. Prerađivači sokova moraju

osigurati adekvatne sanitarne uvjete i dobru proizvođačku praksu (engl. *Good Manufacturing Practice, GMP*) tijekom proizvodnje sokova tretiranih PEF-om. Tretman treba zadovoljiti standard izvedbe koji rezultira redukcijom mikrobne populacije od 5 log prema najotpornijem patogenu koji je prisutan u soku. Smanjenje od 5 log može se postići isključivo PEF-om ili kombinacijom s drugim tehnologijama smještenim u istom objektu.

## **2.4. TEHNOLOGIJA ULTRAZVUKA VISOKE SNAGE (HPU) U TEHNOLOGIJI PREPREKAMA**

U zadnjem desetljeću provodi se sve veći broj istraživanja o primjeni ultrazvuka visoke snage u obradi hrane. HPU se ubraja u grupu inovativnih netoplinskih tehnologija u obradi hrane, a uvrštava se i u zelenu tehnologiju jer nema štetnog utjecaja na okoliš. U prehrambenoj industriji koriste se dvije vrste ultrazvuka: ultrazvuk visoke snage i niske frekvencije, te ultrazvuk niske snage i visoke frekvencije. Raspon frekvencije HPU je od 16 do 100 kHz. Mehanizam djelovanja HPU temelji se na pojavi kavitacije koja može dovesti do fizikalnih i kemijskih promjena materijala.

U tekućem mediju djelovanjem HPU nastaje longitudinalni val te dolazi do naizmjenične promjene tlaka, odnosno faze kompresije i ekspanzije (Herceg i sur., 2009) što dovodi do pojave kavitacije. Prilikom kavitacije dolazi do formiranja mjehurića plina u mediju čiji volumen iz ciklusa u ciklus raste do kritične veličine. U trenutku kada se dosegne kritična veličina dolazi do kondenzacije pare i implozije mjehurića te se molekule sudaraju velikom brzinom prilikom čega nastaju tzv. šok valovi. Šok valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa). Nastajanje kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) i okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) (Brnčić i sur., 2009). HPU se primjenjuje u eliminaciji mikroorganizama, a njegov učinak se zasniva na narušavanju strukture stanica, lokalnom zagrijavanju i stvaranju slobodnih radikala (Dubrović, 2012). Ultrazvuk može poboljšati konzistenciju soka (prividnu viskoznost), boju, bolje prihvaćanje proizvoda sa aspekta sensorike od strane potrošača te stabilnost bioaktivnih spojeva (Rojas i sur., 2017).

Procesiranje ultrazvukom ima mnogo potencijala u obradi voćnih sokova npr. od jabuke, naranče, jagode i breskve jer njegovom primjenom dolazi do inaktivacije enzima kao što su poligalakturonaze i polifenol oksidaze, produljuje se rok trajanja i poboljšava kvaliteta (Salehi, 2020b). Princip enzimske inaktivacije opisan je s dva moguća mehanizma: (i) degradacija polimera zbog kavitacije (Grönroos i sur., 2004) i (ii) fenomen nestabilnosti koji se javlja zbog vezanja slobodnih radikala na supstrat enzima što rezultira nestabilnošću enzima i gubitkom njegove aktivnosti (Cruz i sur., 2006). Slobodni radikali



nastali zbog sonolize vode „napadaju“ određena mjesta kao što su disulfidne veze koje destabiliziraju konformaciju enzima i mogu oksidirati ostatke aminokiselina kao što su triptofan, tirozin, histidin i cistein koji su odgovorni za katalitičku aktivnost i stabilnost enzima (Cheng i sur., 2013.; Terefe i sur., 2009). Kavitacija uzrokuje promjene temperature, tlaka i povećava smični stres u enzimskom okruženju što rezultira razgradnjom vodikovih i van der Waalsovih veza i posljedično gubitkom aktivnosti enzima (Islam i sur., 2014.; Sala i sur., 1995).

Šimunek i sur. (2013) u svom su istraživanju utvrdili kako ultrazvukom (snaga: 600 W, frekvencija: 20 kHz, amplituda: 60, 90 i 120  $\mu\text{m}$ , temperatura: 20, 40 i 60 °C, vrijeme: 3, 6 i 9 min) tretirani sok i nektar od jabuke imaju bolju senzorsku prihvatljivost od onih tretiranih pasterizacijom (temp. 80 °C u vremenu od 2 min). Prema rezultatima istraživanja Tomadoni i sur. (2017) primjena HPU nije utjecala na fizikalno-kemijske parametre soka od jagode te njegova primjena nije djelovala destruktivno na antioksidacijske spojeve u soku od jagode. Provedene studije ukazuju da HPU tretman (40 kHz, 250 W, 4 °C, 20 min) ne utječe na parametre boje voća i povrća, već ono može spriječiti gubitak boje tijekom skladištenja (Lafarga i sur, 2019).

Ultrazvuk se pokazao učinkovitim u postizanju smanjenja mikroorganizama za  $10^5$  tj. 5 log decimalne mikrobne redukcije prema regulativi FDA za voćne sokove, stoga se može smatrati alternativom za pasterizaciju (Patil, 2009). Ipak, tretman ultrazvukom može imati i neke negativne posljedice po kvalitetu voćnih sokova, stoga rezultati novijih istraživanja upućuju da se može kombinirati s nekim drugim tehnologijama (Mahmoud i sur., 2022). Kombinirati se mogu tradicionalne metode konzerviranja kao što je djelovanje povišene temperature i/ili tlaka te dodatak antimikrobnih aditiva, ali je i sve učestalija kombinacija s novijim netoplinskim metodama kao što su ultraljubičasto svjetlo i pulsirajuće svjetlo, PEF, HPP i drugi (Granato i sur., 2019)

## 2.5. JAGODA KAO FUNKCIONALNA HRANA

Jagoda (*Fragaria ananassa* × Duch.) je poznata kao „kraljica voća“ te je njezin uzgoj raširen po cijelom svijetu. Njezini plodovi bogat su izvor hranjivih tvari kao što su šećeri, bioaktivni spojevi, vitamini i minerali što ju svrstava u voćnu vrstu s funkcionalnim svojstvima. Među potrošačima omiljena je voćna vrsta zbog svog privlačnog izgleda (crvene boje), slatkog okusa i bogate arome. Pripada u porodicu *Rosaceae*-a. Niskokalorična je sa svega 32 kcal 100 g<sup>-1</sup> te sadrži preko 80 % vode. Prema nutritivnoj bazi podataka USDA-a (engl. *United States Department of Agriculture*) 100 g svježih jagoda sadrži 90,8 g vode, 7,96 g ugljikohidrata, 4,86 g šećera i 59,6 mg vitamina C (USDA, 2022). Među jagodastim voćem, jagoda je bogat izvor nekoliko nutritivnih i nenu nutritivnih bioaktivnih spojeva, koji su uključeni u različite učinke na zdravlje i prevenciju bolesti. Mnoštvo studija ispitivalo je dobiti

konzumiranja jagoda, poput prevencije upalnih stanja i oksidacijskog stresa, smanjenja poremećaja povezanih s pretilošću i rizika od srčanih bolesti, te zaštite od raznih vrsta raka (Afrin i sur., 2016).

Osim vitamina C ( $58 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), jagoda u svom sastavu sadrži i vitamine iz drugih skupina kao što su vitamin A ( $12 \text{ IU } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), vitamini B kompleksa i vitamin K ( $2,20 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda) (USDA, 2022). Plodovi jagoda su izvor i organskih kiselina kao što su oksalna kiselina, sukcininska kiselina ( $24,27 \pm 1,81 - 59,53 \pm 2,92 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), a u najvišem udjelu su pronađene jabučna ( $159,80 \pm 2,84 - 266,65 \pm 0,30 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda) i limunska kiselina ( $522,40 \pm 1,5 - 711,45 \pm 2,11 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda) (Urün i sur., 2017). Organske kiseline doprinose stabilizaciji boje plodova jagode za koju su odgovorni antocijani. Također, rezultati nedavnih studija pokazuju kako su jagode izvor folata ( $46 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda) (Miller i sur., 2019).

Polifenolni spojevi (tablica 1) zastupljeni u jagodi su flavonoidi od kojih su najzastupljeniji antocijani, a prisutni su i flavonoli i flavanoli, zatim hidrolizirani tanini kao što su elagitanini i kondenzirani tanini. Od fenolnih kiselina koje jagode sadržavaju značajne su su hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te glukozidi elaginske kiseline koji se prevode u elaginsku kiselinu (Giampieri i sur., 2012). Na sadržaj polifenolnih spojeva u jagodi utječu genotip, način uzgoja, zrelost plodova, vrijeme berbe, uvjeti skladištenja i drugi čimbenici (Skrovankova i sur., 2015), a u tablici 2 su prikazana neka od provedenih istraživanja. Jagode su dobar izvor magnezija ( $13 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), fosfora ( $24 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), kalija ( $153 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda), kalcija ( $16 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  svježih jagoda) (Wang i sur., 2019), bakra i željeza (Miller i sur., 2019).

**Tablica 1.** Polifenolni sastav jagode (prema Skrovankova i sur., 2015)

<b>Flavonoli</b>		<b>Antocijani</b>		<b>Fenolne kiseline i hidrolizirani tanini</b>
<b>Kempferol glikozidi</b>	kempferol-kumaroil-glukozid	<b>Cijanidin glikozidi:</b>	cijanidin-3-glukozid	elaginska kiselina i njezini glikozidi elagitanini galna kiselina galotanini kafeinska kiselina p-kumarinska kiselina i kumaroil glikozidi
	kempferol-3-glukozid		cijanidin-3-rutinozid	
	kempferol-glukoronid		cijanozid-3-galaktozid	
	kempferol-3-malonilglukozid		cijanidin-3-malonilglukozid	
<b>Kvercetin glikozidi</b>	kvercetin-3-glukoronid	<b>Pelargonidin glikozidi</b>	pelargonidin-3-glukozid	
	kvercetin-3-malonilglukozid		perlagonidin-3-arabinozid	
	kvercetin-3-rutinozid-rutin		perlagonidin-3-malonilglukozid	
	kvercetin-3-glukozid		perlagonidin-3-malilglukozid	
			perlargonidin-3-rutinozid	
			perlagonidin-3-galatkozid	
			perlagonidin-3-arabinozid	
		<b>Peonidin glikozidi</b>	peonidin-3-glukozid	

**Tablica 2.** Istraživanja o utjecaju raznih faktora na udio bioaktivnih spojeva u jagodama

Kratki opis istraživanja	Ukupni polifenoli (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> )	Antocijani (C-3-G mg 100 g <sup>-1</sup> )	Referenca
<b>Karakterizacija nutritivnog, fizikalno-kemijskog i fitokemijskog sastava te antioksidacijskog kapaciteta triju kultivara jagode iz zapadne regije Portugala: 'Portola', 'Primoris' i 'Endurance'</b>	Portola 605,698 ± 28,118 Primoris 942 ± 96 Endurance 1314 ± 89	Portola 2,18 ± 0,02 Primoris 2,09 ± 0,01 Endurance 2,411 ± 0,009	Ganhão i sur. (2019)
<b>Istraživanje polifenolnog profila u 12 kultivara jagode uzgojenih u Srbiji ('Roxana', 'Arosa', 'Joly', 'Alba', 'Asia', 'Alba') i Italiji ('Jeny', 'Laetitia', 'Garda', 'Primy', 'Albion', 'Capri', 'Irma') koristeći različite spektrometrijske metode.</b>	Albion 0,71 ± 0,010 Capri 0,69 ± 0,05 Joly 0,88 ± 0,09 Alba 0,49 ± 0,03 Roxana 0,49 ± 0,04 Arosa 0,71 ± 0,04 Asia 0,66 ± 0,00 Laetitia 1,07 ± 0,03 Garda 0,54 ± 0,04 Primy 0,54 ± 0,01 Irma 0,46 ± 0,01	Albion 6,35 ± 0,47 Capri 3,08 ± 0,12 Joly 14,48 ± 0,30 Alba 5,28 ± 0,91 Roxana 10,62 ± 0,11 Arosa 7,30 ± 0,30 Asia 9,59 ± 0,76 Laetitia 12,10 ± 0,58 Garda 4,67 ± 0,09 Primy 4,75 ± 0,08 Irma 5,52 ± 0,20	Milosavljević i sur. (2020)
<b>Istraživanje utjecaja kultivara ('Aromas', 'Camarosa', 'Diamante', 'Medina', 'Ventana'), načina i uvjeta uzgoja (s i bez cirkulacije hranjivih tvari) na kemijski sastav jagode.</b>	Ukupne fenolne kiseline (g kg <sup>-1</sup> ): Aromas 48,1 ± 11,1 Camarosa 44,6 ± 13,5 Diamante 59,8 ± 24,5 Medina 52,6 ± 22,4 Ventana 84,4 ± 36,3  Ukupni flavonoli (g kg <sup>-1</sup> ): Aromas 24,4 ± 7,2 Camarosa 31,0 ± 10,4 Diamante 19,3 ± 6,1 Medina 22,2 ± 9,9 Ventana 31,0 ± 7,9	Ukupni antocijani (mg kg <sup>-1</sup> ) Aromas-139,4 ± 18,3 Camarosa 140,9 ± 35,9 Diamante 83,3 ± 1,9 Medina 116,2 ± 32,3 Ventana 96,7 ± 25,1	González-Domínguez i sur. (2020)

GAE- ekvivalent galne kiseline; C-3-G- cijanidin-3-glukozid

Pojam funkcionalne hrane prvi put se pojavio u Japanu osamdesetih godina prošlog stoljeća, ali se njezino značenje često pogrešno tumačilo jer u većini zemalja ona nije zakonski definirana (Ye i sur., 2018). Granato i sur. (2019) su funkcionalnu hranu definirali kao hranu koja je industrijski prerađena ili je u svom prirodnom obliku, koja ako se redovito konzumira u raznolikoj prehrani pojedinca ima potencijalno pozitivne učinke na zdravlje. Da bi se neka hrana mogla svrstati pod definiciju funkcionalne hrane potrebno je dokazati njezine zdravstvene učinke tj. provesti klinička i druga istraživanja kako bi

se dobili eksperimentalni dokazi, na primjer toksikološki učinak, kojim bi se utvrdilo njezino funkcionalno djelovanje i sigurnost (Granato i sur., 2018). Funkcionalna hrana utječe na zdravlje čovjeka te može umanjiti rizik od nezaraznih bolesti zbog svojeg nutritivnog sastava. Osim same definicije funkcionalne hrane, važni kriteriji za uvođenje određene tvrdnje o funkcionalnosti pojedinog sastojka ili hrane kao oznake na hrani su i sigurnost hrane, jednostavna i laka dostupnost bez potrebe za liječničkim receptom, te dokazi o zdravstvenim benefitima ako ju pojedinac redovito konzumira u sklopu svoje uravnotežene i raznolike prehrane.

U novije vrijeme, sve se više istražuje primjena različitih funkcionalnih dodataka hrani, kao što su prebiotici, probiotici, sinbiotici, polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*, *PUFAs*) i antioksidansi (Granato i sur., 2019). Funkcionalna hrana i njezin razvoj, poboljšanje već postojećih i razvoj novih formulacija i tehnika prerade trenutno predstavljaju ključni segment razvoja u prehrambenoj industriji. Zadnja dva desetljeća ulažu se veliki naponi u istraživanju i razvoju inovativnih tehnologija prerade (npr. HPU, PEF, mikrovalovi, i dr.) kao alternativa konvencionalnim postupcima u preradi hrane (Granato i sur., 2019; Bursać Kovačević i sur., 2018) jer primjena visoke temperature može imati negativan utjecaj na stabilnost bioaktivnih spojeva i bioraspodivnost hranjivih tvari. Inovativne i ekološki prihvatljive tehnologije doprinose boljem očuvanju izvornih komponenata u biljnom materijalu, njihovom uporabom zabilježen je manji utrošak energije, a svakako se ističu dobrom učinkovitošću na mikrobnu redukciju te predstavljaju i veliki potencijal u iskorištavanju nusproizvoda (Putnik i sur., 2017).

### 2.5.1. Funkcionalni sok od jagode

Potrošači su sve osvješteniji o zdravlju i dobrobiti zdrave i raznovrsne prehrane te zadnjih godina sve više traže visoko nutritivne i kvalitetne prehrambene proizvode koji su što više nalik svježem voću i povrću te hranu bez dodataka kemijskih aditiva čime se potražnja za nepasteriziranim voćnim sokovima povećava. Popularnost sokova može se pripisati i stavu da su oni jedan od bržih načina kojima se može zadovoljiti dnevna potreba za voćem zbog njihove jednostavne konzumacije. Shodno tome, sok od jagoda je postao sve popularniji na tržištu, ne samo zbog senzorskih obilježja, već i zbog nutritivnog sastava te kao vrijedan izvor bioaktivnih spojeva koji ga svojim sinergističkim i kumulativnim učinkom čine važnim u promicanju zdravlja ljudi i prevenciji bolesti (Cassani i sur., 2018), što ga svrstava u skupinu funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Također, jagode su jedan od popularnijih dodataka mliječnim proizvodima kao što su jogurti s okusom jagode i komadićima jagode, sladoledi od jagode, *smoothie* napici od jagode, *frappe* od jagode i drugi. Ekstrakt jagode se može koristiti kao sastojak funkcionalne hrane i dodatak prehrani u kombinaciji s drugim ekstraktima (Nile i Park, 2014). U svom su istraživanju Cassani i sur. (2018) bili usmjereni na poboljšanje funkcionalnosti soka od jagode te su

ga obogaćivali prebiotičkim vlaknima (inulin i oligofruktoza) i konzervirali primjenom ultrazvuka (frekvencija: 40 kHz, snaga: 180 W, vrijeme: 0, 15 i 30 min) i geraniola (0; 0,15 i 0,30  $\mu\text{L mL}^{-1}$  soka). Kombinacijom tretmana geraniolom s prebionicima pokazala se kao učinkoviti način za kontrolu izvorne mikroflore pri čemu se je produljio rok trajanja soka čuvanog u hladnjaku što može poslužiti kao alternativa dosadašnjem načinu konzerviranja u prehrambenoj industriji, a poboljšala se je i nutritivna kvaliteta soka. Balthazar i sur. (2019) u svojoj studiji su razvijali novi funkcionalni fermentirani napitak proizveden od poluobranog ovčjeg mlijeka i pulpe jagode uz dodatak komercijalnih prebiotika. Rezultati ovog istraživanja potiču daljnja tehnološka i senzorska istraživanja kako bi se proizveli novi, inovativni i funkcionalni proizvodi. Chen i sur. (2023) istraživali su utjecaj fermentacije soka od jagode pomoću bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus acidophilus*) na boju i fenolne spojeve tj. na antioksidacijsko djeovanje. Obje vrste bakterija mliječne kiseline su rasle u soku od jagode te su imale značajan utjecaj na promjenu karakteristika soka (povećanje udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti, smanjenje udjela ukupnih antocijana i ukupnih flavonoida, poboljšanje svojstva boje antocijana čineći sok narančastim).

Potencijalni zdravstveni učinci jagoda prema brojnim kliničkim istraživanjima uključuju različita djelovanja kao što su: protuupalno, antikancerogeno, antioksidacijsko, antimikrobno, neuropotektivno i antimetaboličko, te zaštitu od kardiovaskularnih bolesti i pomoć u borbi protiv pretilosti (Afrin i sur., 2016). Polifenolni spojevi iz jagode mogu djelovati na slobodne radikale tako što suzbijaju njihovo nastajanje. Također mogu promijeniti ekspresiju gena uključenih u metabolizam, preživljavanje i proliferaciju stanica te pružaju antioksidacijsku obranu i zaštitu od mogućih oštećenja DNK (Yildiz i sur., 2020).

Svježe jagode imaju kratak rok skladištenja zbog velike brzine disanja te se njihova kvaliteta može narušiti i rukovanjem, transportom te skladištenjem (Bebek Markovinović i sur., 2022b). Stoga je česta praksa prije same prerade u sok, plodove jagode zamrznuti ili skladištiti u hladnom lancu do daljnje prerade (Yildiz i sur., 2020). Tehnologija proizvodnje soka od jagode započinje pranjem sirovine, zatim slijede procesi homogenizacije plodova i depektinizacije, pasiranja, filtracije i deaeracije, a završni proces uključuje pasterizaciju. Pasterizacijom se osigurava zdravstvena ispravnost i inaktivacija enzima, odgovornih za degradaciju boje, a to su polifenol oksidaza i oksidoreduktaza (Teribia i sur., 2021a). Degradacija crvene boje soka od jagode posljedica je degradacije antocijana, koji su termolabilni pigmenti, te sam proces pasterizacije s tog aspekta ima i negativan utjecaj na boju i nutritivnu kvalitetu soka (Bursać Kovačević i sur., 2016a; Bursać Kovačević i sur., 2016b), no promjena boje može biti i posljedica djelovanja enzima antocijan- $\beta$ -glukozidaza prilikom čega nastaju slabije obojani produkti (Oren-Shamir, 2009). Osim navedenih enzimatskih reakcija posmeđivanja, na promjenu boje utječu i

reakcije neenzimskog posmeđivanja koje se odnose se na degradaciju askorbinske kiseline i Maillardove reakcije te oksidacija i polimerizacija polifenola, a one se najviše događaju nakon pasterizacije i tijekom skladištenja (Teribia i sur., 2021). Prema istraživanju Ubede i sur. (2014) pasterizacija pirea od jagode negativno je utjecala na sadržaj etilnih estera, viših alkohola, ketona i terpena što je rezultiralo gubitkom voćne arome. Osim prerade, učinak skladištenja jednako je važan u smislu kvalitete te je nedavnim istraživanjem procijenjen učinak skladištenja na hlapljive spojeve sokova od jagoda. Dobiveni rezultati ističu da je tijekom skladištenja došlo do razgradnje nekih hlapljivih tvari poput estera, heksanala i linaloola, dok su nastali spojevi poput dimetil sulfida, benzaldehida, butan-2,3-diona ili octene kiseline koji negativno utječu na aromu skladištenog proizvoda (Teribia i sur., 2021b). Optimalne sorte jagoda za industrijsku preradu i proizvodnju soka i pirea su one s većim udjelom suhe tvari, dobre arome, čvrstog mesa i žarko crvene boje (Dubrović, 2012) jer o njihovoj selekciji, uz proces pasterizacije i skladištenja, uveliko ovisi i aroma te okus finalnog proizvoda (Teribia i sur., 2021b).

#### 2.5.2. Stabilnost polifenolnih spojeva soka od jagode

Slabiji transfer nutrijenata tijekom mehaničkog cijedenja ili prešanja soka te visok stupanj degradacije bioaktivnih sastojaka tijekom pasterizacije predstavljaju velike izazove proizvođačima sokova (Wang i sur., 2019). Odriozola i sur. (2008) su u svom istraživanju zabilježili značajan utjecaj temperature tj. procesa pasterizacije (90 °C, 30 s i 60 s) na smanjenje ukupnih fenola i antocijana. U pasteriziranom soku vrijednost ukupnih fenola (43,6 mg 100 mL<sup>-1</sup>) manja je od vrijednosti u netretiranom soka (47,3 mg 100 mL<sup>-1</sup>) te onom podvrgnutog HIPEF tretmanu, a vrijednosti ukupnih antocijana pasteriziranog (36,2 – 38,0 mg 100 mL<sup>-1</sup>) i HIPEF tretiranog soka su bile približno slične (38,1 mg 100 mL<sup>-1</sup>), ali niže u odnosu na netretirani sok (39,5 mg 100 mL<sup>-1</sup>). Tijekom skladištenja od 56 dana na temperaturi od 4 °C došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih fenola za oko 50 % (HIPEF - 24,1 mg 100 mL<sup>-1</sup>, pasterizacija - 21,5 mg 100 mL<sup>-1</sup>) i ukupnih antocijana za oko 60 % kod soka tretiranog HIPEF tretmanom (16,6 mg 100 mL<sup>-1</sup>) te oko 65 % kod soka tretiranog pasterizacijom (14,3 - 12,6 mg 100 mL<sup>-1</sup>). Nakon 14 dana skladištenja do najvećeg smanjenja udjela ukupnih fenola i ukupnih antocijana došlo je kod netretiranog soka, a najmanje kod soka tretiranog HIPEF tretmanom.

U istraživanju kojeg su proveli Klopotek i sur. (2005) uspoređivana je koncentracija ukupnih fenola i antocijana tijekom prerade jagode u različite proizvode. U svježim jagodama koncentracija ukupnih fenola iznosila je 257 ± 2 mg ekvivalenata galne kiseline (engl. *gallic acid equivalents*, GAE) 100 g<sup>-1</sup> uzorka. U proizvodnji soka od jagode najveći utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola imao je proces pasterizacije (85 °C u trajanju od 5 min) te je u pasteriziranom soku došlo do njihovog značajnog smanjenja (35,6 ± 0,5 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>). Ipak, prilikom mehaničke obrade voća, već je zabilježen gubitak

fenola od 15 %. Koncentracija ukupnih antocijana se za razliku od ukupnih fenola tijekom prerade jagode povećala te je nakon mehaničke obrade tj. cijedenja soka ona iznosila  $101,9 \pm 4,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Mogući razlog tome je kontinuirano otpuštanje antocijana iz staničnih struktura zbog oštećenja stanica i ispuštanja staničnog sadržaja tijekom mehaničke obrade. No, udio antocijana u pasteriziranom soku je smanjen i iznosi  $42,2 \pm 0,3 \text{ mg pelargonidin-3-glukozida na } 100 \text{ g svježeg ploda}$ . Osim povišene temperature, na stabilnost antocijana utječu i svjetlost, kisik, pH vrijednost i enzimska aktivnost (Cortez i sur, 2017).

Yildiz i sur. (2021) su provodili istraživanje o produljenju roka trajanja soka od jagode različitim tehnologijama obrade. Koncentracija ukupnih fenola u svježem soku od jagode iznosila je  $137,8 \pm 0,9 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , a vrijednosti koncentracija izmjerenih odmah nakon pasterizacije, obrade ultrazvukom, HPP-om i PEF-om iznosile su kako slijedi:  $132,2 \pm 1,7$ ;  $137,6 \pm 1,9$ ;  $143,5 \pm 2,8$ ;  $145 \pm 1,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ . Tijekom skladištenja soka od jagode na tamnom mjestu ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 42 dana) došlo je do smanjenja koncentracije fenola kod svih uzoraka već nakon 7 dana skladištenja. Uzorci tretirani PEF-om i HPP-om pokazuju veće koncentracije ukupnih fenola tijekom skladištenja, a najmanju vrijednost imaju pasterizirani uzorci. Zaostala enzimska aktivnost polifenol oksidaze predstavlja moguće objašnjenje kojim se tumači pad koncentracije fenolnih spojeva tijekom skladištenja. Također, u istraživanju se pratila i stabilnost antocijana čije koncentracije su iskazane kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida (Pg-3-G). U netretiranom soku koncentracija ukupnih antocijana iznosila je  $15,3 \pm 2,6 \text{ mg Pg-3-G L}^{-1}$ . HPP tretman ( $176,67 \pm 1,73 \text{ mg Pg-3-G L}^{-1}$ ) i PEF tretman ( $179,21 \pm 8,47 \text{ mg Pg-3-G mg L}^{-1}$ ) značajno su utjecali na povećanje udjela ukupnih antocijana odmah nakon tretiranja. Ipak, koncentracija antocijana se smanjivala tijekom skladištenja, a kao mogući razlozi toga su oksidacija i kondenzacija antocijana, dok kod uzoraka tretiranih ultrazvukom do smanjenja koncentracije antocijana može doći i zbog djelovanja zaostalih enzima.

## **2.6. UTJECAJ TEHNOLOGIJE PREPREKAMA NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKU OD JAGODE**

Konzerviranje hrane i pića tehnologijom preprekama sve se više istražuje kako bi se zaobišli toplinski postupci konzerviranja koji mogu nepovoljno djelovati po kvalitetu gotovog proizvoda. Na soku od jagode provedeno je u zadnjih 5 godina svega nekoliko istraživanja utjecaja tehnologije preprekama.

Utjecaj kombinacije ultrazvuka (frekvencija: 40 kHz, snaga: 180 W, vrijeme: 0, 15 i 30 min) i prirodnih antimikrobnih aditiva (geraniol (0; 0,15 i 0,3  $\mu\text{L mL}^{-1}$  soka od jagode) i ekstrakt nara (0, 180 i 360  $\mu\text{L mL}^{-1}$  soka od jagode)) na mikrobnu, senzorsku i nutritivnu kvalitetu soka od jagode proučavali su Tomadoni i sur. (2019). Nakon tretmana sok od jagode bio je skladišten 14 dana na temperaturi od



5 °C. Ovom kombinacijom uspješno se smanjio broj mikroba (kvasca, plijesni i psihrotrofnih bakterija), pri čemu geraniol predstavlja najznačajniju prepreku za mikrobe. Također se je poboljšao i antioksidacijski kapacitet. Povećanje DPPH u uzorcima tretiranim ultrazvukom može bit uzrokovano otpuštanjem antioksidacijskih spojeva kroz stijenku stanice kao posljedica kavitacije (Cheng i sur., 2007), ali duljim tretiranjem ultrazvukom dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Dodatak geraniola ima negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost, ali on nije toliko značajan, dok ekstrakt nara zbog svog sastava [elaginska kiselina (35 %), galna kiselina (19 %), punikalagin A (10 %), punikalagin B (5 %) i kofeinska kiselina (2 %)] ima značajan utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Opažen je sinergistički utjecaj ultrazvuka i ekstrakta nara na povećanje udjela ukupnih fenola u soku od jagode. Kombinacijom navedenih prepreka i njihovom optimizacijom moguće je postići produljenje roka trajanja i zdravstvenu sigurnost proizvoda uz minimalan utjecaj na senzorsku kvalitetu.

Jedno od nekoliko istraživanja tehnologije preprekama na komponente i svojstva soka od jagode (sorta 'Rania') proveli su i Mehta i Yadav (2019), koji su u svojem istraživanju promatrali utjecaj kombinacije atmosferske hladne plazme (engl. *atmospheric cold plasma, ACP*) i hidrotermalnog tretmana na bioaktivne spojeve i mikrobiološku sigurnost. Sok od jagode bio je podvrgnut tretmanu ACP (pri izlaznom naponu od 60 kV, ulazni napon 260 V) u vremenskom periodu od 10 i 15 minuta te hidrotermalnom tretmanu u autoklavnoj komori pri 121 °C i tlaku od 68947,5728 Pa u vremenu od 10 minuta. U kontrolnim uzorcima prosječan udio ukupnih fenolnih spojeva iznosio je  $35 \pm 0,2$  g kg<sup>-1</sup> GAE. Kombinacijom ACP u trajanju od 10 minuta i hidrotermalnog tretmana došlo je do povećanja koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva, a uzorci tretirani tim tretmanom ujedno imaju i najveći udio fenolnih spojeva u odnosu na druga provedena mjerenja ( $52 \pm 0,3$  g kg<sup>-1</sup> GAE). ACP oštećuje staničnu stijenku biljaka što može omogućiti bolje prodiranje radikala i otpuštanje polifenola (Bursać Kovačević i sur., 2016a; Bursać Kovačević i sur., 2016b). Također, povišena temperatura može utjecati na povećanje ekstrakcije vezanih polifenola (Garofulić i sur., 2015). U uzorcima tretiranim samo hidrotermalnim tretmanom zabilježen je udio ukupnih fenolnih spojeva u iznosu od  $47 \pm 0,2$  g kg<sup>-1</sup> GAE te kombinacijom tretmana ACP u trajanju od 15 min i hidrotermalnog tretmana u iznosu od  $47 \pm 0,1$  g kg<sup>-1</sup> GAE. Uzorci tretirani samo ACP tretmanom imaju najmanji udjel ukupnih fenola ( $39 \pm 0,1$  -  $42 \pm 0,1$  g kg<sup>-1</sup> GAE). U uzorcima soka od jagode tretiranim kombinacijom ACP i hidrotermalnog tretmana nije zabilježen rast bakterijskih kolonija u odnosu na kontrolne uzorke, ali je potrebna daljnja optimizacija kako bi se ovi tretmani mogli provoditi i u industriji.

Emamifar i Mohamadizadeh (2020) proučavali su utjecaj ultrazvuka i antimikrobnog nano-ZnO pakiranja na kvalitetu svježeg soka od jagode (*Fragaria X ananassa* Duch., sorte 'Parous') tijekom hladnog skladištenja od 35 dana. Uzorci soka od jagode su bili podvrgnuti ultrazvuku (snaga: 400 W,

frekvencija: 24 kHz, vrijeme: 4 i 12 min, ) te su pakirani u ambalažu od polietilena niske gustoće (engl. *low density polyethylen, LDPE*) s nanočesticama ZnO i bez nanočestica, a kontrolni uzorak je bio netretirani svježi sok jagode pakiran u ambalažu bez ZnO. Tretman ultrazvukom značajno je utjecao na smanjenje mikrobne populacije u soku od jagode u odnosu na netretirani sok. Također, djelovanje ultrazvuka uz antimikrobno pakiranje ima sinergistički efekt na usporavanje mikrobnog rasta tijekom skladištenja. Nadalje, nano pakiranje i ultrazvuk u trajanju od 12 minuta najviše su usporili rast mikroba. Autori navode kako je tijekom tretmana ultrazvukom došlo do značajnog povećanja udjela ukupnih fenolnih spojeva u tretiranim uzorcima soka od jagode (220,56 - 248,23 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup>) u odnosu na netretirane (197,42 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup>), te su također zabilježene veće vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva tijekom dužeg vremeskog perioda tretiranja i skladištenja u odnosu na netretirani sok. Nadalje, pakiranje s nanočesticama utjecalo je na smanjenje degradacije ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima podvrgnutima ultrazvuku. No, tijekom skladištenja na 4 °C u trajanju od 35 dana došlo je do značajnog smanjena udjela ukupnih fenola u svim uzorcima. Autori su naveli kako je uporaba ultrazvuka i pakiranja s nanočesticama ZnO pokazala sinergistički efekt u reduciranju mikrobne populacije i enzimske aktivnosti, te je poboljšala fizikalno-kemijske parametre kvalitete soka od jagode tijekom hladnog skladištenja od 35 dana.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom radu je ispitan utjecaj PEF i HPU tretmana na biološku kvalitetu sokova od jagode. Sokovi su proizvedeni od jagoda (*Fragaria x ananassa* Duch.), sorte 'Albion', proizvođača Jagodar-HB d.o.o. (Donja Lomnica, Zagrebačka županija). Po dopremanju jagoda u laboratorij, odstranjene su im peteljke, oprane su, posušene staničevinom, te su do provedbe eksperimenta skladištene na -18 °C hermetički zatvorene u plastičnim posudama. Dan prije provedbe eksperimenta, jagode su podvrgnute odmrzavanju na način da su premještene u hladnjak na 4 °C kako bi sutradan bile spremne za prerađu u sok.

#### 3.2. METODE RADA

##### 3.2.1. Priprema soka od jagode

Za pripremu soka od jagode korišten je sokovnik Kuvings B6000 (VerVita d.o.o., Hrvatska) (slika 2) snage 240 W, brzine okretaja 60 o min<sup>-1</sup>, kapaciteta 400 mL i promjera filtera 0,2 mm. Sok se proizvodi tehnologijom hladnog prešanja, uz vršenje laganog pritiska voćnog tkiva na sita pomoću sporo rotirajućeg vijka tako što izduženi gornji dio vijka reže voće, a donji dio ga pritišće uz stijenke sita, prilikom čega prostor između sita i vijka postaje sve manji, te se protiskuje sok. Vijak i sita su izrađeni od ULTEM<sup>®</sup> materijala (polieterimid) koji je siguran, čvrst i ekološki prihvatljiv. Za potrebe eksperimenta pripremljeno je približno 4,5 L soka od jagode.

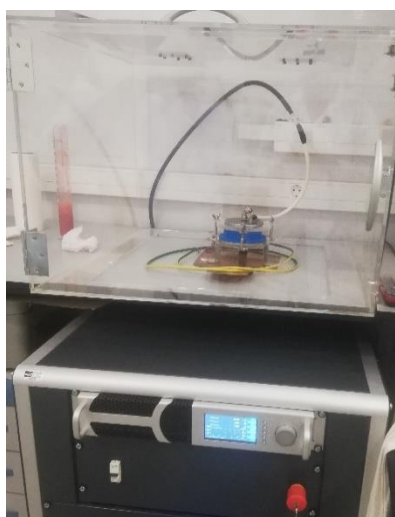


**Slika 2.** Proizvodnja soka hladnim prešanjem na sokovniku Kuvings B6000 (*vlastita fotografija*)

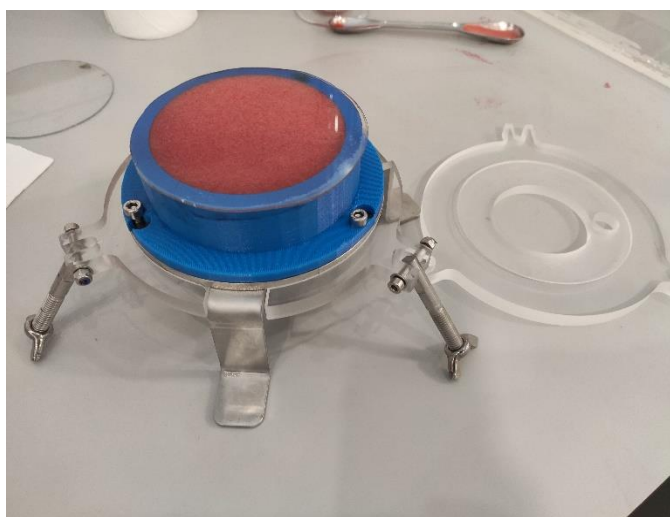
### 3.2.2. Obrada sokova od jagoda „tehnologijom preprekama“ u kombinaciji pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka visoke snage (HPU)

Pripremljeni sok od jagode tretiran je tehnologijom preprekama u kombinaciji tretmana PEF i HPU prema planu pokusa (tablica 3), u skladu s optimiranim procesnim parametrima svake od primijenjenih tehnologija u obradi sokova od jagode prema prijašnjim istraživanjima (Bebek Markovinović i sur., 2022a; Bebek Markovinović i sur., 2022b). Svakom pojedinom režimu obrade podvrgnuto je 200 mL soka. Uzorak broj 1 predstavlja kontrolni uzorak koji nije tretiran, a služi za usporedbu učinka tehnologije preprekama. Prema planu pokusa prvih 9 uzoraka najprije se podvrgava PEF obradi, a zatim HPU tretmanu, dok se u preostalim 9 uzoraka soka od jagode prvo proveo HPU tretman, a zatim PEF tretman, kako bi se utvrdio mogući utjecaj redoslijeda tretmana na stabilnost polifenolnih spojeva, obzirom da ove dvije tehnologije djeluju različitim mehanizmima. Nakon provedenih tretmana, dio sokova koristi se za provedbu ekstrakcije polifenolnih spojeva, dok se preostali dio tretiranih sokova skladišti 7 dana pri temperaturi od 4 °C.

Tretman pulsirajućeg električnog polja provodi se na uređaju HVG60/1 PEF (Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (slika 3 (A)). Uzorak soka postavlja se u reaktor volumena 200 mL [slika 3 (B)] koji se postavlja u kućište uređaja između dvije elektrode, te se provode tretmani prema planu pokusa (tablica 3). Razmak između elektroda bio je 2,5 cm. Prije i neposredno nakon tretmana provodi se mjerenje temperature soka od jagode pomoću infracrvenog termometra InfraRed Thermometer PCE-777 (PCE Instruments, UK).



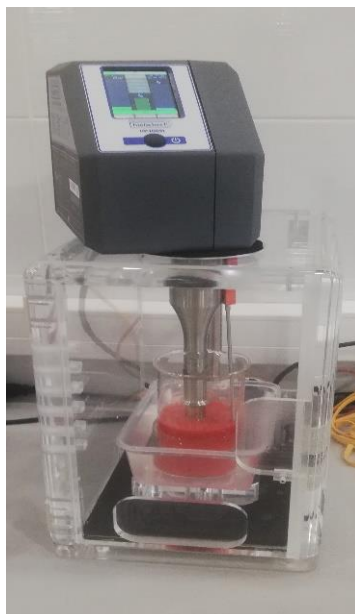
A



B

**Slika 3.** Tretman soka od jagode pulsirajućim električnim poljem (A) i PEF reaktor (B) (vlastita fotografija)

Uzorci soka bili su podvrgnuti djelovanju ultrazvuka visoke snage (UP400St, 400 W, 24 Hz, Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka) (slika 4) pri sljedećim parametrima: amplituda 25 % i puls 50 %, dok je vrijeme tretiranja bio promjenjivi parametar, a sve prema planu pokusa (tablica 3). Uređaj UP400St čine digitalni ultrazvučni procesor, sonda (546 mm<sup>2</sup>), postolje od nehrđajućeg čelika te kutija za zaštitu od buke izrađene od akrilnog stakla i termometar. Svaki uzorak soka od jagode (volumena 200 mL) tretiran je u staklenoj čaši od 400 mL koja se nalazila u hladnoj vodenoj kupelji s ledom kako bi utjecaj temperature na rezultate bio minimalan. Prije samog tretmana evidentirana je temperatura uzorka soka od jagode, dok su tijekom tretmana praćene frekvencija i snaga, a nakon provedenog tretmana, evidentirane su energija te temperatura u uzorcima soka od jagode.



**Slika 4.** Tretman soka od jagode ultrazvukom visoke snage (*vlastita fotografija*)

**Tablica 3.** Plan pokusa tretiranja soka od jagode tehnologijom preprekama

Uzorak	Skladištenje (dani)	Tretman	Tehnologija 1	Tehnologija 2
1	0	<b>Kontrolni uzorak</b>	/	/
2	0	<b>PEF + HPU</b>	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
3	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 5 min
4	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
5	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
6	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 5 min
7	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
8	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
9	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 5 min
10	0		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
11	0	<b>HPU + PEF</b>	A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
12	0		A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
13	0		A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min
14	0		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
15	0		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
16	0		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min
17	0		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
18	0		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
19	0		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min
20	7	<b>Kontrolni uzorak</b>	/	/
21	7	<b>PEF + HPU</b>	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
22	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 5 min
23	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
24	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
25	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 5 min
26	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
27	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 2,5 min
28	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 5 min
29	7		30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min	A 25 %, puls 50, 7,5 min
30	7	<b>HPU + PEF</b>	A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
31	7		A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
32	7		A 25 %, puls 50, 2,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min
33	7		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
34	7		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
35	7		A 25 %, puls 50, 5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min
36	7		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 1,5 min
37	7		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 3 min
38	7		A 25 %, puls 50, 7,5 min	30 kV cm <sup>-1</sup> , 100 Hz, 4,5 min

Kontrolni uzorak - netretirani uzorak soka od jagode; PEF +HPU – režim tehnologije preprekama pri čemu se najprije provodi tretman pulsirajućim električnim poljem, a zatim tretman ultrazvukom visoke snage; HPU + PEF – režim tehnologije preprekama pri čemu se najprije provodi tretman ultrazvukom visoke snage, a zatim tretman pulsirajućim električnim poljem; A – amplituda.

### 3.2.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Izolacija polifenolnih spojeva iz kontrolnog i tretiranih sokova od jagode provodi se pomoću ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (engl. *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE).

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5 L, 860 W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Pipeta, volumena 5 mL i 10 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 500 mL
- Mikropipeta Eppendorf, od 5000  $\mu$ L
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom, volumena 50 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične epruvete falkon, volumena 50 mL

Otapala:

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

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

Postupak ekstrakcije: Ekstrakcija se provodi uz neke preinake prema radu Bursać Kovačević i sur. (2016b). Na analitičkoj vagi odvaži se 5,0 g tretiranog uzorka soka od jagode u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom te se pomoću menzure nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (1 % mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu, v/v). Zatim se provede ekstrakcija tako pripremljene smjese u ultrazvučnoj kupelji u vremenu od 15 min i pri temperaturi od 50 °C. Nakon ekstrakcije slijedi filtriranje ekstrahiranog uzorka pomoću filter papira u odmjerne tikvice volumena 25 mL, nakon čega se nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake. Ekstrakti se skladište na temperaturi 4 °C do provedbe analiza. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je na ukupno 38 uzoraka, pri čemu se ekstrakcija polifenolnih spojeva u sokovima od jagode za 19 uzoraka vršila odmah po završetku obrade tehnologijom preprekama, dok se za preostalih 19 uzoraka tretiranog soka ekstrakcija provodila nakon 7 dana skladištenja.

### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom modifikacije spektrofotometrijske metode koja se temelji na obojanoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018).

#### Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, od 200  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklena čaša volumena 50 mL i 200 mL
- Staklena menzura od 100 mL i 500 mL
- Tresilica mini Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)

#### Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Bezvodni natrijev karbonat (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

*Priprema:* 7,5 %-tna otopina natrijeva karbonata pripremi se tako da se 75 g bezvodnog natrijeva karbonata odvaže u staklenoj čaši, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5 - 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Kina)
- Otopina standarda galne kiseline 5 g L<sup>-1</sup>



*Priprema:* Na analitičkoj vagi se odvažuje 500 mg galne kiseline u plastičnu lađicu za vaganje te se kvantitativno prenese s 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u zadanom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema ekstrakta tretiranog soka od jagode koji se koristi u dolje opisanoj analizi navedena je u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu se otpipetira redom 400  $\mu\text{L}$  ekstrakta (koji se prije provedbe određivanja ukupnih fenola razrijedi s ekstrakcijskim otapalom 2x (200  $\mu\text{L}$  ekstrakta + 200  $\mu\text{L}$  ekstrakcijsko otapalo)), 400  $\mu\text{L}$  F.C. reagensa (koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata te se sve zajedno promiješa pomoću tresilice Vortex. Reakcijska smjesa stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi te se zatim mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto uzorka koristi ekstrakcijsko otapalo (1 % mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu). Mjerenja se za sve uzorke provode u paraleli.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se otopina standarda galne kiseline kao što je opisano ranije u tekstu potpoglavlja 3.2.4. Od te otopine galne kiseline ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) naprave se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se otpipetira redom 50, 125, 250, 500, 750 i 1250  $\mu\text{L}$  alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150, 250  $\text{mg L}^{-1}$ . Iz svake tikvice otpipetira se 400  $\mu\text{L}$  otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 400  $\mu\text{L}$  F.C. reagensa (koji je 5x razrijeđen) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata (w/v). Priprema slijepa probe je po istom principu, ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Uzorci stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se provodi mjernje apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm.

Baždarni dijagram se nacrtava iz dobivenih vrijednosti apsorbancija pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na x osi (apcisa) koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na y osi (ordinata) izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca može se odrediti koncentracija ukupnih fenola.

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad [1]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

### 3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje kondenziranih tanina

Načelo određivanja kondenziranih tanina tj. polimernih proantocijanidina zasniva se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom pri čemu nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Pipete, volumena, 5 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL i 250 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL i 250 mL
- Tresilica mini Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC  $\leq$  99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- Vanilin, 99 % (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

*Priprema:* 1 %-tne metanolne otopine vanilina odvija se tako što se 2,5 g vanilina odvaže u odmjernu tikvicu od 250 ml i nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Priprema:* Najprije se u odmjernu tikvicu od 100 mL doda malo 100 %-tnog metanola, a zatim se u malim obrocima dodaje 26,04 mL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te se tikvica do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

Priprema ekstrakta tretiranog soka od jagode koji se koristi u ovoj analizi navedena je u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja kondenziranih tanina vanilin metodom provodi se tako što se najprije u staklenu epruvetu otpipetira 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, zatim 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL ekstrakta. Uzorci se pripremaju u paraleli. Sve skupa se promiješa pomoću tresilice Vortex te se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega se vrši mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 500 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, pri čemu se ne koristi ekstrakt već otapalo za ekstrakciju (1 % mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu, v/v).

Izrada baždarnog pravca: Pripremi se alikvotna otopina standarda katehina (5 g L<sup>-1</sup>) tako što se 500 mg standarda katehina odvaže u plastičnoj lađici za vaganje te s 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, otopi u navedenom volumenu i nadopuni metanolom do oznake. Od tako napravljene otopine pripreme se razrijeđenja od 10, 30, 60, 90 i 120 mg L<sup>-1</sup> na način da se otpipetira redom: 50, 150, 300, 450 i 600 µL alikvotne otopine standarda katehina u odmjerne tikvice od 25 mL i do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom. U staklene epruvete se otpipetira 1 mL priređenih otopina standarda, 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ostavi se stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi te se izmjere apsorbancije pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima metanol.

Baždarni pravac se nacrtava pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije katehina (mg L<sup>-1</sup>), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 500 nm. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija polimernih proantocijanidina .

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad [2]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 500 nm

x- koncentracija katehina (mg L<sup>-1</sup>)

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakta tretiranih uzorka soka od jagode

Metoda određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola provodi se prema Howard i sur. (2003), a provodi se u etalnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se mjeri apsorbancija intenziteta obojenja pri valnim duljinama 320 nm (ukupne hidroksicimetne kiseline) i 360 nm (ukupni flavonoli).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene i kvarcne kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000  $\mu\text{L}$  i 5000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL i 500 mL
- Staklena čaša od 50 mL i 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Tresilica mini Vortex PV-1 (Grant Instruments Ltd., Cambs, Engleska)

*Otapala i reagensi:*

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
  - Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u 96 % etanolu (v/v)

*Priprema:* 0,227 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline otpipetira se pomoću mikropipete volumena 1000  $\mu\text{L}$  u odmjernu tikvicu od 100 mL te do oznake nadopuni 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična otopina 2 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u vodi (v/v)

*Priprema:* Klorovodična otopina 2 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u vodi pripremi se tako da se u odmjernu tikvicu od 500 mL otpipetira 2,27 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina 600 mg  $\text{L}^{-1}$
- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Standard klorogenske kiseline koncentracije 600 mg  $\text{L}^{-1}$

Priprema ekstrakta tretiranog soka od jagode koji se koristi u opisanim analizama navedena je u potpoglavlju 3.2.3.

Postupak određivanja: Za provedbu reakcije u staklenu epruvetu se otpipetira 250  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 250  $\mu\text{L}$  1 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g  $\text{L}^{-1}$  HCl. Slijepa proba se priredi na isti način osim

što se ne koristi ekstrakt, već isti volumen otapala za ekstrakciju (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu). Najprije se mjeri apsorbancija za određivanje ukupnih flavonola pri valnoj duljini 360 nm u staklenim kivetama, a zatim se mjeri apsorbancija pri 320 nm koristeći kvarcne kivete za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Svaki uzorak pripremljen je u paraleli.

Izrada baždarnog pravca: Za izračunavanje ukupnih flavonola upotrebljava se jednadžba baždarnog pravca za kvercetin, dok se kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu.

Za izradu baždarnog pravca za kvercetin se najprije pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji  $600 \text{ mg L}^{-1}$  na način da se odvaži 60 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici te se pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese i otopi u odmjerne tikvici volumena 100 mL te se do oznake nadopuni metanolom. Zatim se iz alikvotne otopine standarda kvercetina ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) prirede razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i  $500 \text{ mg L}^{-1}$  tako da se iz otopine alikvota otpipetira u odmjerne tikvice od 25 mL redom: 0,416; 1,042; 2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5; 16,666 i 20,833 mL te se nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom  $250 \mu\text{L}$  otopine standarda,  $250 \mu\text{L}$   $1 \text{ g L}^{-1}$  HCl u 96 % etanolu i  $4,55 \text{ mL}$   $2 \text{ g L}^{-1}$  HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm u staklenim kivetama.

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad [3]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 360 nm,

x – koncentracija kvercetina ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Izrada baždarnog pravca klorogenske kiseline se sastoji od pripreme alikvotne standardne otopine klorogenske kiseline koncentracije  $600 \text{ mg L}^{-1}$  na način da se u plastičnu lađicu odvaži 60 mg standarda klorogenske kiseline te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi s 30 mL 100 %-tnog metanola te se nadopuni do oznake metanolom. Iz tako pripremljene alikvotne otopine prirede se razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i  $500 \text{ mg L}^{-1}$  na način da se otpipetira redom: 0,416; 1,042;

2,083; 3,125; 4,166; 6,25; 8,333; 12,5 i 20,833 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 25 mL. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1 g L<sup>-1</sup> HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g L<sup>-1</sup> HCl. Priprema za slijepu probu je ista, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm u kvarcnim kivetama.

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad [4]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 320 nm,

x – koncentracija klorogenske kiseline (mg L<sup>-1</sup>).

### 3.2.7. Obrada podataka

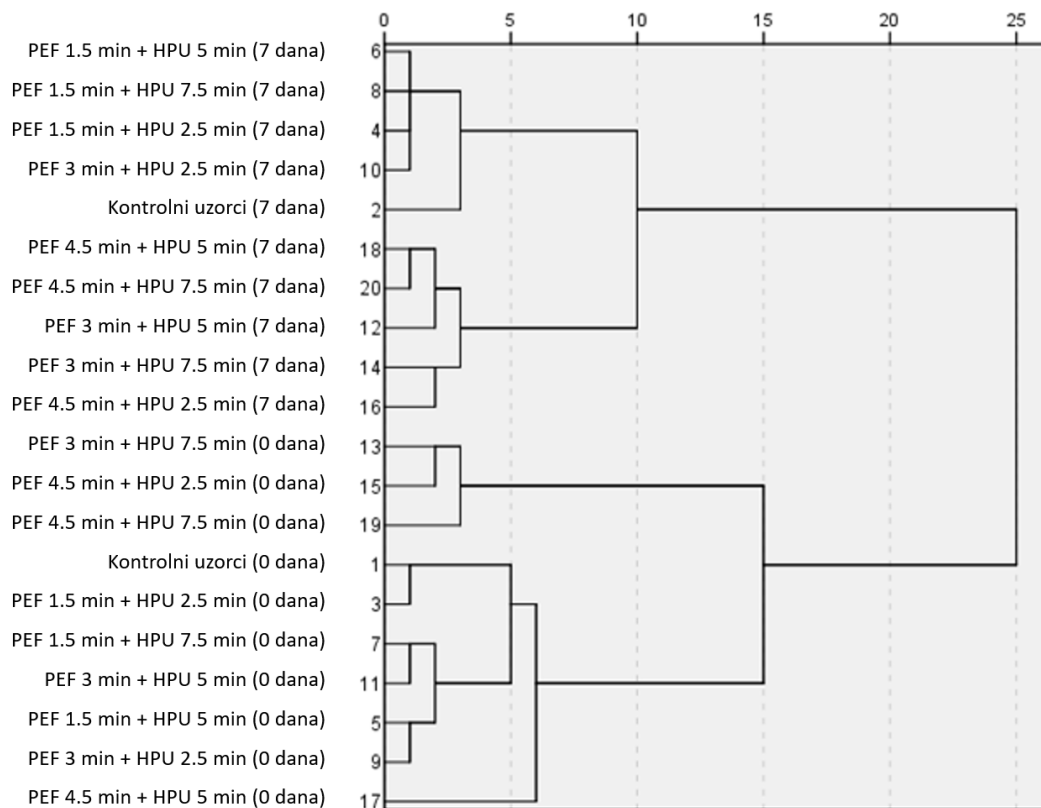
Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom IBM SPSS (ver. 24), a eksperimentalni crteži izrađeni su u Statgraphics Centurion® (StatPoint Technologies, Inc, VA, USA). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su: (i) vrijeme obrade PEF tretmanom (1,5; 3 i 4,5 min), (ii) vrijeme obrade HPU tretmanom (2,5; 5 i 7,5 min) i (iii) vrijeme skladištenja (0 i 7 dana). Zavisne varijable su: (i) ukupni fenoli (mg 100 g<sup>-1</sup>), (ii) hidroksicimetne kiseline (mg 100 g<sup>-1</sup>), (iii) flavonoli (mg 100 g<sup>-1</sup>) i (iv) kondenzirani tanini (mg 100 g<sup>-1</sup>). Rezultati multivarijantne analize prikazani kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  standardna greška prosjeka. Pearsonov koeficijent je korišten za procjenu korelacije između parova kontinuiranih varijabli. Ward klaster analiza je korištena za mjerenje standardiziranih sličnosti uzoraka. Kruskal Wallis test je korišten kao neparametrijska analiza. Razine značajnosti za odbacivanje nulte hipoteze u svim testovima bile su  $\alpha \leq 0,05$ .

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu ispitan je utjecaj tehnologije preprekama u kombinaciji tehnologija PEF i HPU na stabilnost ukupnih fenola, flavonola, hidroksicimetnih kiselina i kondenziranih tanina u sokovima od jagode prije i nakon sedmodnevnog skladištenja na 4 °C. Rezultati i rasprava podijeljeni su prema slijedu primjene odabranih tehnologija, pri čemu se prvotno proveo pokus s tretmanima PEF + HPU, a zatim pokus sa obrnutim slijedom tehnologija, HPU + PEF.

### **4.1. UTJECAJ TRETMANA PEF + HPU NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE**

S ciljem dobivanja maksimalnog broja informacija iz eksperimentalnih podataka, u obradi i interpretaciji dobivenih rezultata primjenjena je kemometrija koja koristi relevantne matematičke i statističke modele i analize (Granato i sur., 2018). Ward klasterova analiza je prema standardiziranim sličnostima [ukupni fenoli ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), hidroksicimetne kiseline ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), flavonoli ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) i kondenzirani tanini ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ )] provedena na svim uzorcima sokova od jagode te su dobiveni sljedeći rezultati: uzorci najbliži kontrolnim uzorcima na 0. dan skladištenja su uzorci koji su tretirani PEF-om u trajanju od 1,5 minute i HPU-om u trajanju od 2,5 minute. Prema ranije navedenoj analizi dobiveni rezultati nakon 7. dana skladištenja su pokazali kako tretirani uzorci najbližijih udjela polifenolnih spojeva kontrolnim uzorcima su oni tretirani PEF-om u trajanju od 1,5 minute i HPU-om u vremenskom trajanju od 2,5 do 7,5 minuta. Dodatno, uzorci slični kontrolnom uzorku bili su i oni tretirani PEF-om u vremenskom periodu od 3 minute i HPU-om u trajanju od 2,5 minute (slika 5).



**Slika 5.** Rezultati Ward klaster analize prosječnih i standardiziranih uzorka (PEF + HPU)

U tablici 4 su prikazane međusobne korelacije ispitivanih polifenolnih spojeva. Dulji vremenski period skladištenja pokazuje statistički negativnu korelaciju s udjelom hidroksicimetnih kiselina, dok je suprotan trend zabilježen za udio kondenziranih tanina. Dulja izloženost PEF tretmanu u negativnoj je korelaciji s udjelom kondenziranih tanina, odnosno dužim PEF tretmanom dolazi do smanjenja njihove stabilnosti. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Bebek Markovinović i sur. (2022a) koji su u svom istraživanju zabilježili statistički značajno smanjenje udjela kondenziranih tanina u soku od jagode tijekom izlaganja HIPEF u trajanju od 3 do 6 minuta. Nadalje, udio ukupnih fenola pozitivno korelira s udjelom kondenziranih tanina. Udjeli hidroksicimetnih kiselina pozitivno koreliraju s udjelima flavonola, a negativno s udjelima kondenziranih tanina. Negativna korelacija između udjela hidroksicimetnih kiselina i kondenziranih tanina može se pripisati mogućnosti kondenzacije hidroksicimetnih kiselina u tanine (Bebek Markovinović i sur., 2023).



**Tablica 4.** Korelacije između polifenolnih spojeva i tretmana u tehnologiji preprekama (PEF + HPU)

Parametar	Skladištenje	PEF tretman	HPU tretman	TPC	HCA	FL	CT
Skladištenje	1	0	0	- 0,07	- 0,85*	- 0,3	0,37*
PEF tretman		1	0	- 0,07	0,13	- 0,24	- 0,38*
HPU tretman			1	- 0,17	- 0,05	- 0,08	- 0,19
TPC				1	0,08	0,14	0,69*
HCA					1	0,38*	- 0,40*
FL						1	- 0,05
CT							1

Korelacija je značajna pri  $p \leq 0,05$ . TPC – ukupni fenolni spojevi (engl. *total phenolic compounds*) ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); HCA – hidroksicimetne kiseline (engl. *hydroxycinnamic acids*) ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); FL – flavonoli (engl. *flavonols*) ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); CT – kondenzirani tanini (engl. *condensed tannins*) ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); PEF (pulsirajuće električno polje) ( $30 \text{ kV cm}^{-1}$ , 100 Hz); HPU (ultrazvuk visoke snage) (amplituda = 25 %, puls = 50 %)

Rezultati utjecaja skladištenja te kombinacije PEF-a i HPU-a kao koncepta tehnologije preprekama na udjele polifenolnih spojeva u sokovima od jagode prikazani su u tablici 5. Prosječan udio ukupnih fenola u sokovima od jagode iznosi  $117,93 \pm 0,70 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , te je ta vrijednost unutar vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva ( $99,02 - 158,37 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ ) za 10 različitih kultivara koje su u svojem istraživanju zabilježili Urün i sur. (2021). Prosječan udio hidroksicimentih kiselina i flavonola iznosi  $28,03 \pm 0,28 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  i  $13,38 \pm 0,19 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ .

Skladištenjem sokova od jagode tijekom 7 dana na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo je do smanjenja udjela hidroksicimetnih kiselina za 29,91 % i flavonola za 12,34 %, dok se udio kondenziranih tanina povećao za 6,3 %, što se može objasniti kondezacijom hidroksicimetnih kiselina i flavonola u veće molekule kondenziranih tanina (Bebek Markovinović i sur., 2023). Prema rezultatima istraživanja, Teleszko i sur. (2016) su utvrdili da je tijekom skladištenja sokova od jagode različitih kultivara u trajanju od 6 mjeseci pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo do značajnog smanjenja udjela flavonola. Vrijeme skladištenja nije utjecalo na udio ukupnih fenola (tablica 5), što je u skladu s rezultatima istraživanja za sokove od nara tijekom skladištenja od 12 tjedana/ $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Guo i sur., 2014).

PEF tretman značajno ne utječe na udio ukupnih fenolnih spojeva (tablica 5), što su u svojim rezultatima utjecaja PEF-a ( $35 \text{ i } 38 \text{ kV cm}^{-1}$ , vrijeme: 281  $\mu\text{s}$ ) na fenolne spojeve u soku od nara zabilježili Guo i sur. (2014). Također, Dziadek i sur. (2019) su proveli istraživanje utjecaja PEF-a ( $30 \text{ kV cm}^{-1}$ , puls: 50 %, vrijeme 30 s) na trajnost i nutritivnu vrijednost sokova od jabuke te su utvrdili da tretman PEF-om nema značajan utjecaj na sadržaj bioaktivnih spojeva u soku od jabuke, pri čemu je evidentirana

dobra stabilnosti vitamina C i ukupnih fenola tijekom skladištenja tretiranih sokova kroz 72 sata/4 °C. No, Bebek Markovinović i sur. (2022b) su zabilježili drugačije rezultate u istraživanju kojeg su proveli na sokovima od jagode tretiranim HIPEF-om pri čemu je došlo do povećanja udjela bioaktivnih spojeva za 8,41 % u odnosu na netretirani sok. Nadalje, u istraživanju Yildiz i sur. (2021) je također zabilježeno povećanje koncentracije ukupnih fenola u sokovima od jagode tretiranim PEF-om. PEF, kao i druge netoplinske tehnologije, nema značajan utjecaj na promjenu pH vrijednosti, ukupnih topljivih tvari i kiselosti soka od jagode (Yildiz i sur., 2020). PEF tretman, osim što djeluje na inaktivaciju mikroorganizama i enzima te tako osigurava produžetak roka trajanja, zbog elektroporacije stanične membrane može pospješiti i ekstrakciju bioaktivnih spojeva te tako rezultirati nutritivno i biološki vrijedim proizvodima (Koubaa i sur., 2018). Vrijeme trajanja PEF tretmana utječe na udio hidroskicimetnih kiselina u sokovima od jagode te se prema dobivenim rezultatima (tablica 5) može vidjeti da uzorci tretirani 3 i 4,5 minute imaju više udjele ( $28,86 \pm 0,49$  i  $28,46 \pm 0,49$  mg 100 g<sup>-1</sup>) od onih tretiranih 1,5 min ( $26,79 \pm 0,49$  mg 100 g<sup>-1</sup>). Prema rezultatima istraživanja Agcam i sur. (2014) uzorci soka od naranče tretirani PEF-om imaju viši udio hidroskicimetnih kiselina od netretiranih uzoraka te nije došlo do značajnijih promjena u njihovim udjelima tijekom skladištenja 180 dana/4 °C. Za razliku od hidroskicimetnih kiselina, duže vrijeme tretiranja (4,5 minute) utječe na smanjenje udjela flavonola i kondenziranih tanina (tablica 5). U istraživanju utjecaja kombinacije PEF-a (18 kV cm<sup>-1</sup>, vrijeme: 500 μs, frekvencija pulsa: 1 kHz) i ultrazvuka (frekvencija: 40 kHz, snaga: 200 W, temperatura: 35 °C, vrijeme: 20 min) na izolaciju bioaktivnih spojeva iz badema koje su proveli Manzoor i sur. (2019), zabilježen je porast udjela kondenziranih tanina u uzorcima tretiranim PEF-om ( $1,18 \pm 0,007$  mg CE (ekvivalent katehina, engl. *catechin equivalent*) g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta) u odnosu na netretirane uzorke ( $0,853 \pm 0,006$  mg CE g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta). Suptorno tome, Odriozola-Serrano i sur. (2008) nisu zabilježili statistički značajnu promjenu u udjelu flavonola između netretiranih te uzoraka sokova od jagode tretiranih PEF-om (35 kV cm<sup>-1</sup>, vrijeme: 1,700 μs, puls: 100 Hz).

Vrijeme tretiranja HPU-om ima statistički značajan utjecaj na udio kondenziranih tanina, pri čemu uzorci koji su vremenski najduže tretirani imaju najniži udio kondenziranih tanina u vrijednosti od  $103,57 \pm 0,40$  mg 100 g<sup>-1</sup>, a najveći udio u vrijednosti od  $111,46 \pm 0,40$  mg 100 g<sup>-1</sup> uzorci tretirani 5 minuta. Također, udio ukupnih fenola se povećava s duljinom tretiranja, s vrijednošću od  $118,51 \pm 1,22$  mg 100 g<sup>-1</sup> (2,5 min) na  $120,24 \pm 1,22$  mg 100 g<sup>-1</sup> (5 min), a zatim nakon 7,5 minuta slijedi smanjenje udjela na  $115,04 \pm 1,22$  mg 100 g<sup>-1</sup>, što je moguća posljedica njihove degradacije tijekom dužeg vremenskog tretmana HPU (Bebek Markovinović i sur., 2023). Dobivene vrijednosti udjela ukupnih fenola nakon tretmana HPU-om od 7,5 minuta slične su vrijednostima uzoraka tretiranih tretmanom HPU u trajanju od 2,5 min. Wang i sur. (2019) zabilježili su sličan trend za udjele ukupnih fenolnih spojeva u sokovima

od jagoda tretiranih ultrazvukom (frekvencija: 20 kHz, snaga: 400 W, vrijeme: 0, 4, 8, 12, 16 min), gdje je došlo je do značajnog povećanja koncentracije ukupnih fenola, a to povećanje je bilo veće što je duže vrijeme tretiranja uzorka. Koncentracija ukupnih fenola u kontrolnom uzorku iznosila je 57,60 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup>, a nakon tretmana ultrazvukom u vremenu od 12 minuta koncentracija ukupnih fenola iznosila je 95,76 mg GAE 100 mL<sup>-1</sup> (Wang i sur., 2019). Djelovanjem ultrazvuka u trajanju od 16 minuta došlo je pak do smanjenja koncentracije, ali koncentracija ukupnih fenola je i dalje bila veća, nego u kontrolnom uzorku (Wang i sur., 2019). Viši udio ukupnih fenolnih spojeva u sokovima od jagode nakon tretmana ultrazvukom (frekvencija: 40 kHz, snaga: 180 W, vrijeme: 10 i 30 min, temperatura: 20 ± 1 °C) zabilježili su i Tomadoni i sur. (2017). Mogući razlozi povećanja koncentracije mogu biti adicija ultrazvukom proizvedenih hidroksilnih radikala (OH<sup>•</sup>) u aromatske prstene fenolnih spojeva te ekstrakcija više fenolnih komponenata zbog oštećenja stanične stijenke stanica jagode što ima za posljedicu povećanje prijenosa mase i brže difuzije. Također, zapaženo je i povećanje koncentracije flavonoida, askorbinske kiseline te antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima tretiranim ultrazvukom (Wang i sur., 2019). Wang i sur. (2019) također navode kako nije došlo do značajnih promjena u svojstvima proteina, vrijednosti pH, parametrima boje te ukupnoj topljivoj tvari tretiranih uzorka u odnosu na netretirane. Sličan trend prati i udio flavonola, koji je najviši pri tretmanu HPU od 5 min, a duljom vremenskom obradom udio se smanjuje (tablica 5). U svom istraživanju utjecaja ultrazvuka (vrijeme: 30, 60 i 90 min, frekvencija: 28 kHz, snaga: 600 W, temperatura: 20 °C) na kvalitetu sokova od grejpa, Aadil i sur. (2013) su zapazili viši udio flavonola (za 8 %) u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane uzorke. Tretman HPU-a, bez obzira na vrijeme trajanja tretmana, nemaju značajan utjecaj na stabilnost hidroksicimetnih kiselina (tablica 5).

Tehnologija preprekama u kombinaciji PEF + HPU, neovisno o duljini trajanja tretmana, nije značajno utjecala na varijacije u udjelima hidroksicimetnih kiselina, kao ni ukupnih fenola, čime se potvrđuje dobra sinergijska učinkovitost odabranih tehnologija na stabilnost bioaktivnih spojeva u sokovima od jagoda (Bebek Markovinović i sur., 2023). Ipak, do značajnije promjene je došlo pri tretmanima PEF - 4,5 min u kombinaciji s HPU - 2,5 i 7,5 min, gdje je zabilježen pad udjela ukupnih fenola od 10,36 - 15,57 %, u odnosu na isti tretman PEF - 4,5 min u kombinaciji s HPU - 5 min. Pretraživanjem literature nije pronađen velik broj istraživanja utjecaja kombinacije PEF i HPU tretmana na stabilnost bioaktivnih spojeva u voćnim sokovima. Aadil i sur. (2017) su istraživali utjecaj PEF i ultrazvučnog tretmana na bioaktivne spojeve i mikrobnu kvalitetu sokova od grejpa. Sokovi od grejpa su najprije podvrgnuti PEF-u (protok: 80 mL min<sup>-1</sup>, frekvencija pulsa: 1 kHz, jakost električnog polja: 20 kV cm<sup>-1</sup>, temperatura: 40 °C, vrijeme: 600 μs), a zatim ultrazvučnom tretmanu u ultrazvučnoj kupelji (snaga: 600 W, frekvencija 28 kHz, temperatura: 20 °C, vrijeme: 30 min). Uočen je značajan porast koncentracije ukupnih fenola

(za 13,37 %), ukupnih flavonoida (za 12,33 %) i ukupnih flavonola (za 33,63 %), ukupnih karotenoida (za 33 %) te antioksidacijski kapacitet (za 32,34 %) u usporedbi s kontrolnim netretiranim sokovima. Također, Medina-Meza i sur. (2016) su zabilježili poboljšanje ekstrakcije ukupnih fenola iz pirea od maline (*Rubus strigosus*) za 24 % u uzorcima tretiranih kombinacijom PEF-a i ultrazvuka, dok u pireu od borovnice (*Vaccinium corymbosum*) nisu opažene značajnije statističke razlike u usporedbi s netretiranim uzorkom.

Udio flavonola je najviši pri kombinaciji PEF - 1,5 min i HPU - 5 min (16,36 mg 100 g<sup>-1</sup>) te su kod vremenski istog tretmana PEF-a s različitim trajanjem HPU - 2,5 i 7,5 min zabilježene niže vrijednosti (tablica 5). Sličan trend je vidljiv i kod tretmana PEF - 4,5 min u kombinaciji s HPU. Kod tretmana PEF - 3 min u kombinaciji s HPU došlo je utjecaja na stabilnost, pri čemu je najveći udio flavonola zabilježen pri trajanju HPU od 2,5 minute (15,19 ± 0,41 mg 100 g<sup>-1</sup>), a najniži pri trajanju od 5 minuta (11,95 ± 0,41 mg 100 g<sup>-1</sup>). Najviši udio kondenziranih tanina određen je pri tretmanu PEF - 1,5 min u kombinaciji s HPU - 2,5 min (113,62 ± 0,52 mg 100 g<sup>-1</sup>), dok je dužim HPU tretiranjem došlo do smanjenja udjela za više od 4 %. Nadalje, uzorci tretirani kombinacijom PEF - 3 min i HPU-a postigli su najviše udjele kondenziranih tanina pri nižim vremenima HPU tretmana (< 5 min). Prosječna vrijednost udjela kondenziranih tanina u 36 uzoraka je 107,66 ± 0,23 mg 100 g<sup>-1</sup>. Najniži udjeli i značajnije statističke razlike u udjelu kondenziranih tanina zabilježene su pri kombinaciji PEF + HPU pri PEF tretmanu u trajanju od 4,5 minute. Manzoor i sur. (2019) su zabilježili porast udjela kondenziranih tanina od 42 % u uzorcima suhog ekstrakta badema tretiranih kombinacijom PEF-a (18 kV cm<sup>-1</sup>, vrijeme: 500 μs, frekvencija pulsa: 1 kHz) i ultrazvuka (frekvencija: 40 kHz, snaga: 200 W, temperatura: 35 °C, vrijeme: 20 min) u odnosu na netretirane uzorke. Mogući razlog povećanja udjela kondenziranih tanina tijekom tretmana PEF + HPU su sinergijski učinci tehnologija PEF-a i HPU-a, koje zahvaljujući različitim mehanizmima djelovanja mogu utjecati na promjene u kemijskim strukturama makromolekula (Manzoor i sur., 2019).

**Tablica 5.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama (PEF + HPU) na stabilnost polifenolnih spojeva

Parametar	n	TPC	HCA	FL	CT
<b>Skladištenje</b>		<b>p = 0,39 ‡</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
0 dana	18	118,54 ± 0,99 <sup>a</sup>	32,58 ± 0,40 <sup>a</sup>	14,26 ± 0,27 <sup>a</sup>	104,15 ± 0,33 <sup>b</sup>
7 dana	18	117,31 ± 0,99 <sup>a</sup>	23,49 ± 0,40 <sup>b</sup>	12,50 ± 0,27 <sup>b</sup>	111,18 ± 0,33 <sup>a</sup>
<b>PEF</b>		<b>p = 0,48 ‡</b>	<b>p = 0,02 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
1,5 min	12	118,19 ± 1,22 <sup>a</sup>	26,79 ± 0,49 <sup>b</sup>	14,15 ± 0,33 <sup>a</sup>	110,96 ± 0,40 <sup>a</sup>
3 min	12	118,85 ± 1,22 <sup>a</sup>	28,86 ± 0,49 <sup>a</sup>	13,57 ± 0,33 <sup>a</sup>	109,94 ± 0,40 <sup>a</sup>
4,5 min	12	116,75 ± 1,22 <sup>a</sup>	28,46 ± 0,49 <sup>a</sup>	12,44 ± 0,33 <sup>b</sup>	102,09 ± 0,40 <sup>b</sup>
<b>HPU</b>		<b>p = 0,02 †</b>	<b>p = 0,63 ‡</b>	<b>p = 0,02 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
2,5 min	12	118,51 ± 1,22 <sup>a,b</sup>	28,42 ± 0,49 <sup>a</sup>	13,31 ± 0,33 <sup>a,b</sup>	107,96 ± 0,40 <sup>b</sup>
5 min	12	120,24 ± 1,22 <sup>a</sup>	27,84 ± 0,49 <sup>a</sup>	14,14 ± 0,33 <sup>a</sup>	111,46 ± 0,40 <sup>a</sup>
7,5 min	12	115,04 ± 1,22 <sup>b</sup>	27,84 ± 0,49 <sup>a</sup>	12,70 ± 0,33 <sup>b</sup>	103,57 ± 0,40 <sup>c</sup>
<b>PEF + HPU (hurdle)</b>		<b>p = 0,07 ‡</b>	<b>p = 0,59 ‡</b>	<b>p = 0,03 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
1,5 min + 2,5 min	12	122,79 ± 1,90 <sup>a</sup>	26,14 ± 0,84 <sup>a</sup>	12,80 ± 0,76 <sup>b</sup>	113,62 ± 0,52 <sup>a</sup>
1,5 min + 5 min	12	115,91 ± 1,90 <sup>a</sup>	26,81 ± 0,84 <sup>a</sup>	16,36 ± 0,76 <sup>a</sup>	110,47 ± 0,52 <sup>b</sup>
1,5 min + 7,5 min	12	115,86 ± 1,90 <sup>a</sup>	27,41 ± 0,84 <sup>a</sup>	13,29 ± 0,76 <sup>b</sup>	108,78 ± 0,52 <sup>b</sup>
<b>PEF + HPU (hurdle)</b>		<b>p = 0,39 ‡</b>	<b>p = 0,25 ‡</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
3 min + 2,5 min	12	118,18 ± 2,15 <sup>a</sup>	29,23 ± 0,82 <sup>a</sup>	15,19 ± 0,41 <sup>a</sup>	110,25 ± 0,90 <sup>a</sup>
3 min + 5 min	12	116,99 ± 2,15 <sup>a</sup>	27,63 ± 0,82 <sup>a</sup>	11,95 ± 0,41 <sup>c</sup>	113,32 ± 0,90 <sup>a</sup>
3 min + 7,5 min	12	121,37 ± 2,15 <sup>a</sup>	29,72 ± 0,82 <sup>a</sup>	13,55 ± 0,41 <sup>b</sup>	106,25 ± 0,90 <sup>b</sup>
<b>PEF + HPU (hurdle)</b>		<b>p = 0,02 †</b>	<b>p = 0,08 ‡</b>	<b>p = 0,02 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
4,5 min + 2,5 min	12	114,56 ± 2,26 <sup>b</sup>	29,89 ± 0,90 <sup>a</sup>	11,93 ± 0,51 <sup>b</sup>	99,99 ± 0,62 <sup>b</sup>
4,5 min + 5 min	12	127,80 ± 2,26 <sup>a</sup>	29,07 ± 0,90 <sup>a</sup>	14,11 ± 0,51 <sup>a</sup>	110,6 ± 0,62 <sup>a</sup>
4,5 min + 7,5 min	12	107,90 ± 2,26 <sup>b</sup>	26,40 ± 0,90 <sup>a</sup>	11,27 ± 0,51 <sup>b</sup>	95,69 ± 0,62 <sup>c</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	117,93 ± 0,70	28,03 ± 0,28	13,38 ± 0,19	107,66 ± 0,23

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima su međusobno statistički različite za  $p \leq 0,05$ ; † značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi. TPC – ukupni fenolni spojevi ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); HCA – hidroksicimetne kiseline ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); FL - flavonoli ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); CT – kondenzirani tanini ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); PEF – pulsirajuće električno polje ( $30 \text{ kV cm}^{-1}$ , 100 Hz); HPU – ultrazvuk visoke snage (amplituda = 25 %, puls = 50 %)

Kako bi se u uzorcima sokova od jagode osigurala najviša stabilnost polifenolnih spojeva uslijed tretmana tehnologijom preprekama, provedena je optimizacija procesnih parametara primijenjenih tehnologija (tablica 6). Prema dobivenim rezultatima može se uočiti da su najviše koncentracije svih ispitivanih polifenolnih spojeva ostvarene u nultom danu skladištenja. Ovi rezultati razlikuju se od rezultata Yildiz i sur. (2021) koji su zabilježili porast udjela ukupnih fenola u uzorcima tretiranim PEF-om uslijed skladištenja 7 dana/4 °C, u odnosu na uzorke tretirane ultrazvukom, u kojima nije došlo do promjena, ali je nakon provedenog skladištenja zapaženo smanjenje udjela ukupnih fenola u svim uzorcima. Mogući razlog porasta fenolnih spojeva tijekom skladištenja se krije u reakciji između oksidiranih polifenola i formiranju novih spojeva koji imaju antioksidacijska svojstva (Yildiz i sur., 2021). Kako bi se ostvario udio ukupnih fenolnih spojeva od 125,81 mg 100 g<sup>-1</sup> u soku od jagode potrebno je odabrati tehnologiju preprekama u kombinaciji PEF - 1,5 min i HPU - 2,5 min (tablica 6). Optimalni uvjeti za postizanje najvećeg udjela hidroksicimetnih kiselina (35,56 mg 100 g<sup>-1</sup>) su pri kraćem vremenskom tretmanu PEF-om (1,5 min) te dužem vremenskom tretiranjem HPU-om (7,5 min). Udio flavonola u vrijednosti od 17,36 mg 100 g<sup>-1</sup> moguće je postići pri sljedećim uvjetima tretiranja: PEF u trajanju od 4,5 minute i HPU u trajanju od 5,8 minuta, dok je za najveći udio kondenziranih tanina (116,72 mg 100 g<sup>-1</sup>) potrebno uzorke tretirati s kombinacijom PEF - 1,5 min i HPU - 3,2 min.

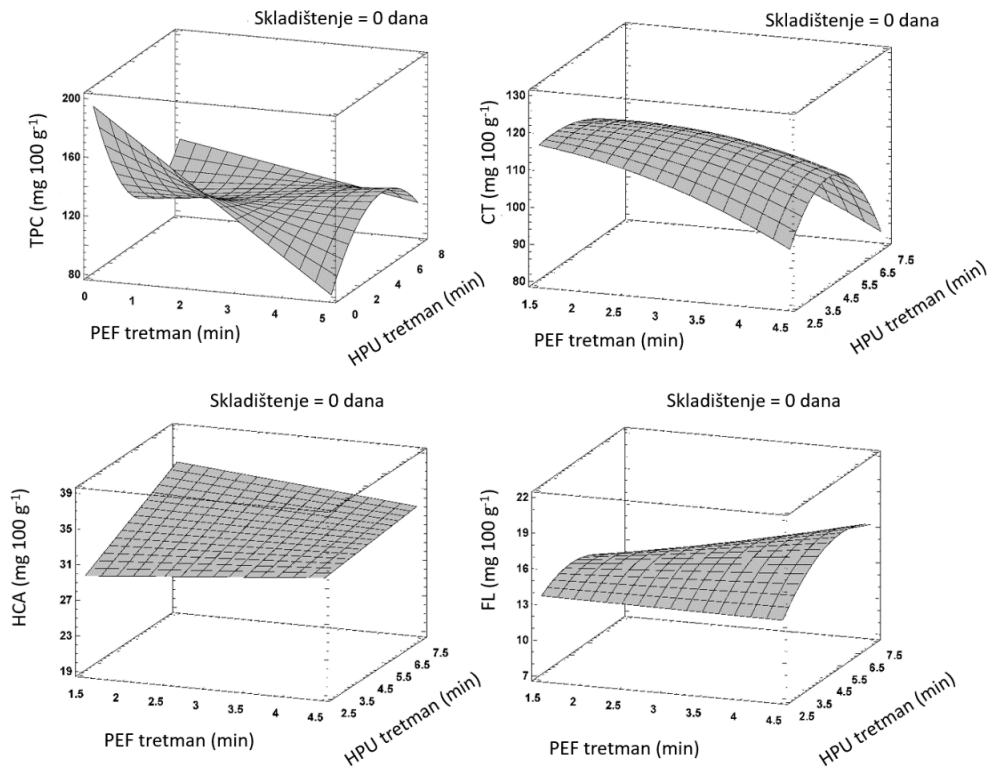
**Tablica 6.** Optimalni procesni uvjeti za maksimalni udio polifenolnih spojeva u uzorcima (PEF + HPU)

Parametar	TPC	HCA	FL	CT
Skladištenje (dani)	0	0	0	0
PEF tretman (min)	1,5	1,5	4,5	1,5
HPU tretman (min)	2,5	7,5	5,8	3,2
Optimalne vrijednosti (mg 100 g <sup>-1</sup> )	125,81	35,56	17,36	116,72

TPC – ukupni fenolni spojevi (mg 100 g<sup>-1</sup>); HCA – hidroksicimetne kiseline (mg 100 g<sup>-1</sup>); FL - flavonoli (mg 100 g<sup>-1</sup>); CT – kondenzirani tanini (mg 100 g<sup>-1</sup>); PEF – pulsirajuće električno polje (30 kV cm<sup>-1</sup>, 100 Hz); HPU – ultrazvuk visoke snage (amplituda = 25 %, puls = 50 %)

Odnos između parametara skladištenja, udjela polifenolnih spojeva te vremena tretiranja tehnologijom preprekama prikazani su na slici 6. Primijećeno je da se najviše vrijednosti udjela ukupnih fenola, kondenziranih tanina i hidroksicimetnih kiselina u sokovima od jagode primjenom koncepta preprekama tj. kombinacijom tretmana PEF i HPU postižu odmah po provedenim tretmanima na samom početku skladištenja (nulti dan) i pri kraćem vremenskom trajanju PEF tretmana, dok se vremena tretiranja s HPU

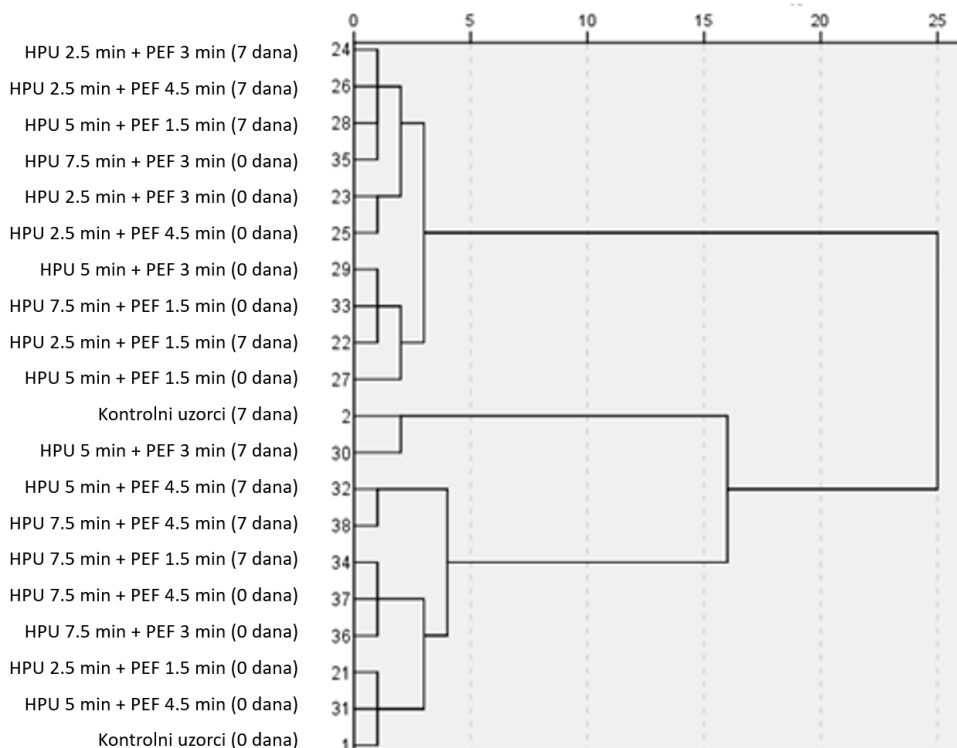
razlikuju. Isto tako je primjećeno kako većem udjelu flavonola pogoduje duži vremenski period tretiranja odabranih tehnologija PEF + HPU.



**Slika 6.** Optimalni tretmani tehnologije preprekama (PEF + HPU) za postizanje najviših udjela polifenolnih spojeva

## 4.2. UTJECAJ TRETMANA HPU + PEF NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U SOKOVIMA OD JAGODE

Kad se uzmu svi ispitani uzorci sokova s obzirom na standardizirane sličnosti (ukupni fenolni spojevi (mg 100 g<sup>-1</sup>), hidroksicimetne kiseline (mg 100 g<sup>-1</sup>), flavonoli (mg 100 g<sup>-1</sup>) i kondenzirani tanini (mg 100 g<sup>-1</sup>)), Ward klaster analizom dobiveni su rezultati koju pokazuju da su uzorci tretirani kombinacijom HPU - 2,5 min i PEF - 1,5 min te uzorci tretirani s HPU - 5 min i PEF - 4,5 min najbliži netretiranom tj. svježem soku od jagode. Ovi rezultati su slični rezultatima utjecaja PEF + HPU gdje su na nulti dan skladištenja uzorci tretirani kombinacijom PEF - 1,5 min i HPU - 2,5 min bili najbliži kontrolnom uzorku. Najbliži kontrolnom uzorku nakon tjedan dana skladištenja bili su uzorci tretirani s kombinacijom HPU - 5 min i PEF - 3 min (slika 7). No, usporedbom s tretmanima kombinacije PEF + HPU, uzorci najbliži netretiranom uzorku nakon tjedan skladištenja razlikuju se po vremenskom trajanju PEF tretmana (PEF + HPU - 1,5 min i HPU + PEF - 3 min).



**Slika 7.** Rezultati Ward klaster analize prosječnih i standardiziranih uzoraka (HPU + PEF)

Vrijeme skladištenja sokova od jagode po provedenom tretmanu HPU + PEF značajno negativno korelira sa svim ispitivanim polifenolnim spojevima tj. dužim skladištenjem dolazi do smanjenje udjela polifenolnih spojeva, pri čemu je najveći utjecaj vidljiv na udio hidroksicimetnih kiselina (tablica 7). Ovi rezultati se razlikuju od rezultata dobivenih tretmanima obrnutog slijeda (PEF + HPU) (tablica 4), gdje skladištenje nema značajnog utjecaja na ukupne fenolne spojeve i flavonole te ima pozitivan značaj tj. utječe na povećanje udjela kondenziranih tanina. Ipak, ovi rezultati se slažu s rezultatima Nadeem i sur. (2018) koji su zabilježili kako ultrazvukom (frekvencija: 20 kHz, amplituda: 70 %, vrijeme: 2, 4 i 6 min) tretirani miješani sokovi od mrkve i grožđa ostvaruju postupan pad udjela fenola i flavonoida s dužim vremenskim periodom skladištenja, pri čemu je to smanjenje manje, nego kod netretiranog soka. Isto tako, prema rezultatima navedenim u tablici 7 tretman HPU utječe na smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva, flavonola i kondenziranih tanina. I u ovom slučaju, rezultati se razlikuju od rezultata prikazanih u tablici 4 gdje tretman HPU nema utjecaj na udio bioaktivnih spojeva. No, tijekom tretmana PEF + HPU duža izloženost PEF tretmanu dovodi do smanjenja udjela kondenziranih tanina (tablica 4) što nije slučaj kod tretmana HPU + PEF (tablica 7). Kao što je i očekivano, ukupni fenoli pozitivno koleriraju sa svim podgrupama ispitivanih polifenola, što podrazumijeva porast udjela pojedinih podskupina fenola, uz porast sadržaja ukupnih fenola. Hidroksicimetne kiseline imaju veću pozitivnu korelaciju s flavonolima



u odnosu na kondenzirane tanine. Također, flavonoli pozitivno koreliraju s kondenziranim taninima, što je i očekivano, obzirom da su flavonoli sastavne jedinice kondenziranih tanina. I ovi rezultati (HPU + PEF) se razlikuju od ranije navedenih rezultata tretmana PEF + HPU, gdje ukupni fenolni spojevi imaju samo pozitivnu koleraciju na kondenzirane tanine, a koleracija između hidroksicimetnih kiselina i kondenziranih tanina je negativna. Dobiveni rezultati upućuju na različite stabilnosti ispitivanih fenolnih spojeva u ovisnosti i slijedu primijenjenih PEF i HPU tehnologija.

**Tablica 7.** Korelacije između polifenolnih spojeva i tretmana u tehnologiji preprekama (HPU + PEF)

Parametar	Skladištenje	HPU tretman	PEF tretman	TPC	HCA	FL	CT
Skladištenje	1	0	0	-0,53*	-0,81*	-0,55*	-0,40*
HPU tretman		1	0	-0,50*	-0,31	-0,46*	-0,49*
PEF tretman			1	-0,30	-0,20	-0,15	-0,25
TPC				1	0,51*	0,69*	0,75*
HCA					1	0,68*	0,39*
FL						1	0,60*
CT							1

Korelacija je značajna pri  $p \leq 0,05$ . TPC –ukupni fenolni spojevi ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); HCA – hidroksicimetne kiseline ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); FL –flavonoli ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); CT – kondenzirani tanini ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); PEF ( $30 \text{ kV cm}^{-1}$ ,  $100 \text{ Hz}$ ); HPU (amplituda =  $25 \%$ , puls =  $50 \%$ )

Prema dobivenim rezultatima, prikazanim u tablici 8, najviši udjeli svih polifenolnih spojeva određeni su u nultom danu skladištenja. Nakon 7 dana skladištenja došlo je do značajnog smanjenja udjela kondenziranih tanina za  $4,56 \%$ , ukupnih fenola za  $6,2 \%$ , a najveće smanjenje zabilježeno je za hidroksicimetne kiseline i to za  $36,32 \%$  te flavonole za  $33,26 \%$ . Dobiveni rezultati, osim za ukupne fenolne spojeve, razlikuju se od rezultata Bebek Markovinović i sur. (2022b), koji su u svom istraživanju na uzorcima soka od jagode tretiranih HPU zabilježili povećanje udjela hidrokiscimetnih kiselina (za  $5,84 \%$ ), flavonola (za  $43,44 \%$ ), dok se udio kondenziranih tanina nije mijenjao nakon 7 dana skladištenja pri temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Teleszko i sur. (2016) su odredili pad udjela flavonola tj. kvercetin-3-glukoronida u mutnom soku od jagode tijekom 6 mjeseci skladištenja, pri čemu je primjećen veći pad kod uzoraka skladištenih na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , nego onih skladištenih na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Također, u istom istraživanju je zabilježen pad derivata hidroksicimetne kiseliene (*p*-kumaroil-heksoza) kod nekih kultivara, dok je kod nekih kultivara jagode zabilježen porast tijekom skladištenja na višoj temperaturi. Smanjenje udjela ukupnih fenola odmah nakon tretmana HPU za  $32,94 \%$ , a tijekom sedmodnevnog skladištenja pri

temperaturi od 4 °C za 89 %, Bursać Kovačević i sur. (2019) su detektirali u mutnom sokovima od jabuke tretiranim s HPU (snaga: 100W, frekvencija: 30 kHz)

Dužim trajanjem HPU tretmana, baš kao i dužim skladištenjem, došlo je do statistički značajnog smanjenja udjela svih polifenolnih spojeva, posebice kondenziranih tanina (7 %) i flavonola (19,72 %) (tablica 8). U istraživanju Bebek Markovinović i sur. (2022b) nije zabilježen utjecaj duljeg vremena (10 min vs. 5 min) tretiranja HPU na udio ukupnih fenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina u sokovima od jagode. Nadalje, u istom istraživanju je zabilježen pad udjela flavonola i kondenziranih tanina s dužim vremenom tretiranja, što je slučaj i u ovom istraživanju. Margean i sur. (2020) su zabilježili pad udjela ukupnih fenola u sokovima od crvenog grožđa tretiranim s HPU (snaga: 750 W, amplituda: 50 % i 70 %, vrijeme: 5 i 10 min) u odnosu na kontrolni uzorak, ali vrijeme tretiranja nije imalo utjecaja na njihovu stabilnost. Također, vrijeme djelovanja ultrazvuka nije imalo značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u istraživanju utjecaja ultrazvuka (frekvencija: 20 kHz, vrijeme: 0 do 105 min) na glavne bioaktivne spojeve sokova od naranče kojeg su proveli Brenes i sur. (2022). Udio hidrokscimetnih kiselina najprije pokazuje trend porasta ( $28,35 \pm 0,82$  vs.  $29,93 \pm 0,82$  mg 100 g<sup>-1</sup>), a zatim trend pada za 33,91 % (tablica 8). Mogući razlog pada udjela bioaktivnih spojeva je njihova razgradnja tijekom dužeg izlaganja HPU.

Isto tako, duljim vremenskim tretiranjem uzoraka PEF-om dovelo je do statistički značajnog smanjenja udjela polifenolnih spojeva (3,51 - 13,29 %) (tablica 8). U istraživanju Aguilar-Rosas i sur. (2007) zabilježeno je smanjenje ukupnih fenola u sokovima od jabuke tretiranim PEF-om (4 μs bipolarni puls, snaga električnog polja: 35 kV cm<sup>-1</sup>) za 14,39 %. Također, Rybak i sur. (2020) su utvrdili pad polifenola u crvenoj paprici (*Capsicum annuum* L.) nakon PEF-obrađe (broj pulseva: 6 i 12, 1,07 kV cm<sup>-1</sup>, 1 i 3 kJ kg<sup>-1</sup>) za 6 - 7 %. Prema rezultatima prikazanim u tablici 8, nakon 3 minute izlaganja PEF-u dolazi do stabilizacije gubitka ukupnih fenolnih spojeva, flavonola i kondenziranih tanina, a gubitak hidrokscimetnih kiselina se nastavlja. Odriozola-Serrano i sur. (2008) nisu zabilježili promjene u udjelu flavonola u PEF-tretiranom soku u odnosu na netretirani sok od jagode.

Tretman HPU - 2,5 min u kombinaciji s PEF - 1,5 - 4,5 min nema statistički značajan utjecaj na udio proučavanih polifenolnih spojeva. Produljenjem tretmana HPU na 5 minuta u kombinaciji s PEF-om (1,5 - 4,5 min) dovodi do smanjenja udjela ukupnih fenola, hidrokscimetnih kiselina i kondenziranih tanina, dok isti tretman ne utječe na stabilnost flavonola. Također je kod svih ispitivanih polifenolnih spojeva uočeno da je pri istom tretmanu najveća stabilnost ostvarena pri krećem PEF tretmanu (1,5 min). Do promjena u udjelima dolazi oko 3. minute izlaganja PEF-u, pri čemu udio hidrokscimetnih kiselina nakon tog vremena i dalje opada, a fenolnih spojeva raste (s  $113,64 \pm 0,65$  na  $118,70 \pm 0,65$  mg 100 g<sup>-1</sup>), što je vidljivo i kod kondenziranih tanina (s  $103,26 \pm 0,91$  na  $107,90 \pm 0,91$ g<sup>-1</sup>). Produljenjem HPU tretmana na 7,5 minuta uz naknadni tretman PEF-om dolazi do smanjenja udjela polifenolnih spojeva. U

istraživanju Nadeem i sur. (2018), dužim ultrazvučnim tretiranjem miješanog soka od mrkve i grožđa došlo je do značajnog povećanja udjela ukupnih fenola i flavonoida. Kao što je vidljivo iz rezultata prikazanih u tablici 8 i u ovom tretmanu (HPU - 7,5 min), kao i u prethodnom navedenom (HPU - 5 min), najviši udjeli polifenolnih spojeva zabilježeni su pri kraćem izlaganju PEF-u (1,5 min). Isto tako, kao i u prethodnom tretmanu, ključne promjene u stabilnosti polifenolnih spojeva događaju se oko 3 minute izloženosti PEF-u, prilikom čega se koncentracije ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina smanjuju do 3 minute tretmana PEF-om, a zatim njihova vrijednost ostaje nepromijenjena, dok se udio kondenziranih tanina značajnije počinje smanjivati tek nakon 3 minute tretmana PEF-om tj. pri 4,5 minute. Udio flavonola se najprije smanjuje s  $11,52 \pm 0,37$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  (PEF 1,5 min) na  $7,27 \pm 0,37$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  (PEF 3 min) te zatim ponovno raste na  $8,63 \pm 0,37$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  (PEF 4,5 min).

Manzoor i sur. (2019) su proveli istraživanje utjecaja kombinacije HPU i PEF na bioaktivne spojeve ekstrakta badema. Prema njihovim rezultatima došlo je do povećanja udjela ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima tretiranim zasebno PEF-om i HPU-om te onih tretiranim kombinacijom HPU + PEF u odnosu na netretirane uzorke. Također, u istom istraživanju naveden je i porast kondenziranih tanina u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane uzorke. Utjecaj ultrazvuka i PEF-a na kvalitetu sokova od špinata istraživali su Faisal Manzoor i sur. (2021). Najprije je proveden tretman ultrazvukom (frekvencija: 40 kHz, snaga: 200 W, temperatura: 30 °C, vrijeme: 21 min) u ultrazvučnoj kupelji, nakon kojeg je uslijedio PEF tretman (frekvencija pulsa: 1 kHz, protok: 60 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura: 30 °C, vrijeme: 335  $\mu\text{s}$ , jakost električnog polja: 9 kV  $\text{cm}^{-1}$ ). Kao i u prethodnim istraživanjima, uočene su veće vrijednosti ukupnih fenola (12 %), flavonoida (10 %), flavonola (23 %), antioksidacijskog kapaciteta, antocijana (15 %), karotenoida (18 %), klorofila (~17 %) i vitamina C u odnosu na netretirane uzorke i uzorke tretirane pojedinačno PEF-om i ultrazvukom. Također, autori navode kako permeabilizacija membrane uzrokovana PEF tretmanom pospješuje ekstrakciju unutarstaničnog sadržaja što rezultira povećanjem učinkovitosti ekstrakcije i prinos unutarstaničnih metabolita. Nadalje, autori navode i da je povećanje udjela ukupnih fenola tijekom djelovanja ultrazvuka vjerojatno povezano s oslobađanjem vezanih fenolnih molekula zbog oštećenja stanične membrane uzrokovne kavitacijom.

Prosječne vrijednosti polifenolnih spojeva u uzorcima tretiranih HPU + PEF su:  $120,56 \pm 0,44$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  za ukupne fenole,  $27,01 \pm 0,25$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  za hidroksicimetne kiseline,  $11,55 \pm 0,16$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  za flavonole, te  $109,99 \pm 0,31$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  za kondenzirane tanine. Yildiz i sur. (2020) su nakon HPU tretmana odredili nešto viši udio ukupnih fenolnih spojeva ( $137,59 \pm 1,93$  mg GAE  $100 \text{ mL}^{-1}$ ) u sokovima od jagode, kao i nakon tretmana PEF-om ( $144,97 \pm 1,52$  mg GAE  $100 \text{ mL}^{-1}$ ). Prosječan udio ukupnih fenola i kondenziranih tanina je viši u uzorcima tretiranim najprije HPU, a zatim PEF-om. Također su zabilježene i više početne vrijednosti polifenolnih spojeva (osim flavonola) u uzorcima najprije tretiranim

HPU u odnosu na one prvo tretirane PEF-om. Rybak i sur. (2020) su u rezultatima istraživanja na crvenoj paprici zabilježili blagi pad udjela ukupnih fenola nakon tretmana PEF u kombinaciji s ultrazvukom (PEF: 30 kV, broj pulseva: 12 i 34, 1,07 kV cm<sup>-1</sup>, 1 i 3 kJ kg<sup>-1</sup>; ultrazvuk- ultrazvučna kupelj, frekvencija: 21 kHz, snaga: 300 W, vrijeme: 30 min) i tretmana ultrazvuk + PEF u odnosu na netretirane uzorke.

**Tablica 8.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama (HPU + PEF) na stabilnost polifenolnih spojeva

Parametar	n	TPC	HCA	FL	CT
<b>Skladištenje</b>		<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
0 dana	18	124,5 ± 0,63 <sup>a</sup>	33,01 ± 0,67 <sup>a</sup>	13,86 ± 0,23 <sup>a</sup>	113,58 ± 0,45 <sup>a</sup>
7 dana	18	116,78 ± 0,63 <sup>b</sup>	21,02 ± 0,67 <sup>b</sup>	9,25 ± 0,23 <sup>b</sup>	108,40 ± 0,45 <sup>b</sup>
<b>HPU</b>		<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
2,5 min	12	126,02 ± 0,77 <sup>a</sup>	28,35 ± 0,82 <sup>a</sup>	13,83 ± 0,28 <sup>a</sup>	116,30 ± 0,55 <sup>a</sup>
5,0 min	12	118,52 ± 0,77 <sup>b</sup>	29,93 ± 0,82 <sup>b</sup>	11,71 ± 0,28 <sup>b</sup>	108,06 ± 0,55 <sup>b</sup>
7,5 min	12	117,14 ± 0,77 <sup>b</sup>	22,76 ± 0,82 <sup>c</sup>	9,14 ± 0,28 <sup>c</sup>	108,61 ± 0,55 <sup>b</sup>
<b>PEF</b>		<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
1,5 min	12	124,48 ± 0,77 <sup>a</sup>	28,66 ± 0,82 <sup>a</sup>	12,64 ± 0,28 <sup>a</sup>	113,12 ± 0,55 <sup>a</sup>
3,0 min	12	118,07 ± 0,77 <sup>b</sup>	27,31 ± 0,82 <sup>b</sup>	10,96 ± 0,28 <sup>b</sup>	110,70 ± 0,55 <sup>b</sup>
4,5 min	12	119,14 ± 0,77 <sup>b</sup>	25,06 ± 0,82 <sup>c</sup>	11,07 ± 0,28 <sup>b</sup>	109,14 ± 0,55 <sup>b</sup>
<b>HPU + PEF (hurdle)</b>		<b>p = 0,10 ‡</b>	<b>p = 0,10 ‡</b>	<b>p = 0,20 ‡</b>	<b>p = 0,07 ‡</b>
2,5 min + 1,5 min	12	129,54 ± 2,04 <sup>a</sup>	28,43 ± 1,42 <sup>a</sup>	13,47 ± 1,55 <sup>a</sup>	115,87 ± 2,09 <sup>a</sup>
2,5 min + 3,0 min	12	123,06 ± 2,04 <sup>a</sup>	29,77 ± 1,42 <sup>a</sup>	14,70 ± 1,55 <sup>a</sup>	118,87 ± 2,09 <sup>a</sup>
2,5 min + 4,5 min	12	125,46 ± 2,04 <sup>a</sup>	26,85 ± 1,42 <sup>a</sup>	13,30 ± 1,55 <sup>a</sup>	114,15 ± 2,09 <sup>a</sup>
<b>HPU + PEF (hurdle)</b>		<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p = 0,08 ‡</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
5,0 min + 1,5 min	12	123,21 ± 0,65 <sup>a</sup>	32,73 ± 0,83 <sup>a</sup>	12,94 ± 1,55 <sup>a</sup>	113,01 ± 0,91 <sup>a</sup>
5,0 min + 3,0 min	12	113,64 ± 0,65 <sup>b</sup>	30,59 ± 0,83 <sup>a</sup>	10,92 ± 1,55 <sup>a</sup>	103,26 ± 0,91 <sup>b</sup>
5,0 min + 4,5 min	12	118,70 ± 0,65 <sup>c</sup>	26,46 ± 0,83 <sup>b</sup>	11,27 ± 1,55 <sup>a</sup>	107,90 ± 0,91 <sup>c</sup>

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima su međusobno statistički različite za p ≤ 0,05; † značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi. TPC – ukupni fenolni spojevi (mg 100 g<sup>-1</sup>); HCA – hidroksicimne kiseline (mg 100 g<sup>-1</sup>); FL - flavonoli (mg 100 g<sup>-1</sup>); CT – kondenzirani tanini (mg 100 g<sup>-1</sup>); PEF – pulsirajuće električno polje (30 kV cm<sup>-1</sup>, 100 Hz); HPU – ultrazvuk visoke snage (amplituda = 25 %, puls = 50 %).

**Tablica 8.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju tehnologije preprekama (HPU + PEF) na stabilnost polifenolnih spojeva - nastavak

Parametar	n	TPC	HCA	FL	CT
<b>HPU + PEF (hurdle)</b>		<b>p = 0,02 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>	<b>p ≤ 0,01 †</b>
7,5 min + 1,5 min	12	120,68 ± 1,33 <sup>a</sup>	24,83 ± 0,57 <sup>a</sup>	11,52 ± 0,37 <sup>a</sup>	110,49 ± 0,70 <sup>a</sup>
7,5 min + 3,0 min	12	117,50 ± 1,33 <sup>a,b</sup>	21,57 ± 0,57 <sup>b</sup>	7,27 ± 0,37 <sup>c</sup>	109,97 ± 0,70 <sup>a</sup>
7,5 min + 4,5 min	12	113,25 ± 1,33 <sup>b</sup>	21,86 ± 0,57 <sup>b</sup>	8,63 ± 0,37 <sup>b</sup>	105,38 ± 0,70 <sup>b</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	36	120,56 ± 0,44	27,01 ± 0,25	11,55 ± 0,16	109,99 ± 0,31

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima su međusobno statistički različite za  $p \leq 0,05$ ; † značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u višestrukoj faktorskoj analizi. TPC – ukupni fenolni spojevi ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); HCA – hidroksicimetne kiseline ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); FL - flavonoli ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); CT – kondenzirani tanini ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); PEF – pulsirajuće električno polje ( $30 \text{ kV cm}^{-1}$ ,  $100 \text{ Hz}$ ); HPU – ultrazvuk visoke snage (amplituda = 25 %, puls = 50 %).

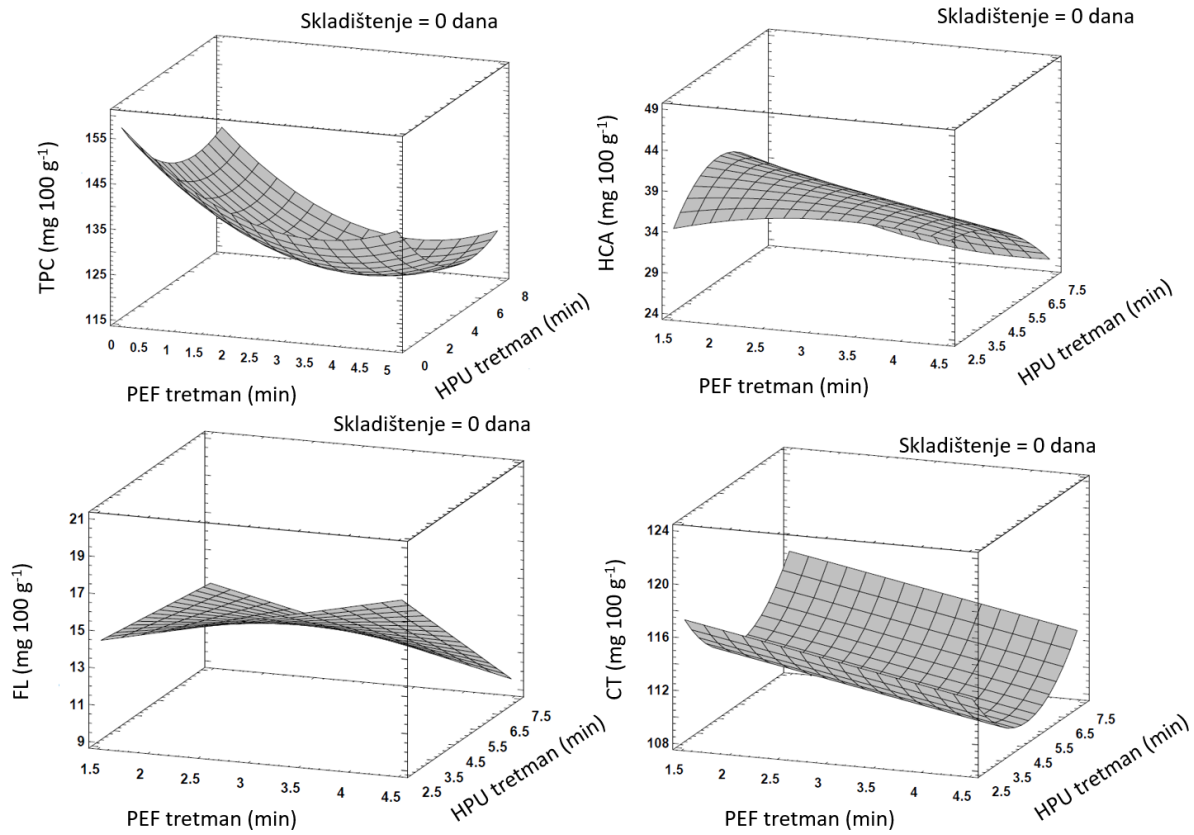
Optimizacija procesnih parametara u slijedu tehnologije preprekama HPU + PEF provedena je s ciljem iznalaženja uvjeta obrade koji će rezultirati s najvećim prinosima ispitivanih polifenolnih spojeva (tablica 9). Za sve polifenolne spojeve najveća stabilnost se postiže pri kraćem vremenskom periodu skladištenja tj. na samom početku. Isti rezultati dobiveni su i za optimalni tretman PEF + HPU (tablica 6). Ukupnim fenolima, flavonolima i kondenziranim taninima pogoduje kraće HPU tretiranje od 2,5 minute, dok je za postizanje najviše vrijednosti hidrokiscimetnih kiselina potrebno provesti HPU tretman u trajanju od 4,7 min. Promotri li se utjecaj PEF tehnologije, vidljivo je da se najviše vrijednosti polifenolnih spojeva postižu pri kraćem vremenu PEF tretiranja, izuzev za flavonole, čija stabilnost je najveća uz nešto duži tretman (4,5 min). Isti rezultati dobiveni su i za tretman PEF-om u kombinaciji PEF + HPU (tablica 6). U konačnici, uz provedbu tehnologije preprekama u kombinaciji HPU + PEF tretmana pri optimalnim uvjetima, ostvareni bi bili najveći prinosi polifenolnih spojeva kako slijedi: ukupni fenoli  $129,35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , hidroksicimetne kiseline  $39,15 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , flavonoli  $18,04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  i  $117,19 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  kondenzirani tanini.

**Tablica 9.** Optimalni procesni uvjeti za maksimalni udio polifenolnih spojeva u uzrocima (HPU + PEF)

Parametar	TPC	HCA	FL	CT
Skladištenje (dani)	0.0	0.0	0.0	0.0
HPU tretman (min)	2.5	4.7	2.5	2.5
PEF tretman (min)	1.5	1.5	4.5	1.5
Optimalne vrijednosti (mg 100 g <sup>-1</sup> )	129.35	39.15	18.04	117.19

TPC – ukupni fenolni spojevi (mg 100 g<sup>-1</sup>); HCA – hidroksicimetne kiseline (mg 100 g<sup>-1</sup>); FL - flavonoli (mg 100 g<sup>-1</sup>); CT – kondenzirani tanini (mg 100 g<sup>-1</sup>); PEF – pulsirajuće električno polje (30 kV cm<sup>-1</sup>, 100 Hz); HPU – ultrazvuk visoke snage (amplituda = 25 %, puls = 50 %)

Odnosi vremena skladištenja, udjela polifenolnih spojeva te vremena tretiranja PEF-om i HPU-om u kombinaciji tehnologije preprekama HPU + PEF prikazani su na slici 8. Općenito gledajući, dobiveni rezultati ukazuju da boljoj stabilnosti većine ispitivanih polifenolnih spojeva poguduju kombinacije PEF i HPU tretmana s odabranim kraćim vremenima tretiranja. Time se učvršćuje teza da su u kombinaciji ovih tehnologija prema konceptu preprekama potrebni tzv. „blaži“ uvjeti obrade za postizanje optimalnih rezultata (Putnik i sur., 2020).



**Slika 8.** Optimalni (HPU + PEF) tretmani tehnologije preprekama za postizanje maksimalnog sadržaja polifenolnih spojeva

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sok od jagode vrijedan je izvor polifenolnih spojeva, među kojima se u najvećoj koncentraciji ističu kondenzirani tanini, zatim hidroksicimetne kiseline i flavonoli.
2. Promotri li se slijed primjenjenih tehnologija na stabilnost polifenolnih spojeva, dobiveni rezultati ukazuju da većoj stabilnosti hidroksicimetnih kiselina i flavonola pogoduje slijed prepreka PEF + HPU, dok je veća stabilnost ukupnih fenola i i kondenziranih tanina određena za uzorke sokova obrađene slijedom prepreka HPU + PEF.
3. Stabilnost polifenolnih spojeva tijekom skladištenja (0. dan vs. 7. dan) u sokovima od jagode tretiranim s PEF + HPU slijedom prepreka, veća je u nultom danu za hidroskicimetne kiseline i flavonole, dok je nakon sedmodnevnog skladištenja na 4 °C zabilježena veća stabilnost kondenziranih tanina. U obrnutom slijedu primijenjenih tehnologija HPU + PEF, veća stabilnost svih ispitivanih polifenolnih spojeva određena je u nultom danu u odnosu na 7. dan skladištenja.
4. Tehnologije preprekama u slijedu PEF+HPU i HPU+PEF primijenjene u 3 različita vremena tretiranja pokazuju statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) i različite trendove s obzirom na stabilnost ispitivanih polifneolnih spojeva. Ipak, općenito gledajući, kraća vremena obrade (1,5 min za PEF i 2,5 min za HPU), neovisno o slijedu primjenjenih tehnologija, povoljno utječu na veću stabilnost ukupnih fenola. Također, kako bi se ostvarila veća stabilnost hidroksicimetnih kiselina, flavonola i kondenziranih tanina, u slijedu tehnologija PEF + HPU potrebna su dulja vremena obrade za HPU tretman, dok su u slijedu tehnologija HPU + PEF potrebna kraća vremena HPU obrade.
5. U zaključku, tehnologija preprekama, kao održiva tehnologija prerade funkcionalne hrane, uz primjenu odabranih tehnologija PEF i HPU pri optimalnim uvjetima obrade, predstavlja inovativan pristup u proizvodnji biološki vrijednih funkcionalnih sokova od jagode.



## 6. LITERATURA

Aadil RM, Zeng XA, Han Z, Sun DW (2013) Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem* **141**(3), 3201–3206. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.008>

Aadil RM, Zeng XA, Han Z, Sahar A, Khalil AA, Rahman UU i sur. (2017) Combined effects of pulsed electric field and ultrasound on bioactive compounds and microbial quality of grapefruit juice. *J Food Process Pres* **42**(2), e13507. <https://doi:10.1111/jfpp.13507>

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

Agcam E, Akyıldız A, Akdemir Evrendilek G (2014) Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. *Food Chem* **143**, 354–361. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.115>

Aguiló-Aguayo I, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009) Changes in quality attributes throughout storage of strawberry juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *LWT-Food Sci Technol* **42**(4), 813-818. <https://doi:10.1016/j.lwt.2008.11.008>

Alves Filho EG, Almeida FDL, Cavalcante RS, de Brito ES, Cullen PJ, Frias JM, i sur. (2016) <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of nonthermal processing of orange juice. *Food Chem* **204**, 102–107.

Avitabile-Leva A, Martinelli A, Leiss M, Castagnoli GF, Maestrelli A (2006) Selection of new strawberry varieties suitable for processing – Cultivar effects on the quality of strawberry sorbet. *Acta Hortic* **708**, 559-564. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.708.100>

Balthazar CF, Santillo A, Guimarães JT, Capozzi V, Russo P, Caroprese M, i sur. (2019) Novel milk–juice beverage with fermented sheep milk and strawberry (*Fragaria*×*ananassa*): Nutritional and functional characterization. *J Dairy Sci* **102**(12), 10724-10736. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16909>

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

Bebek Markovinović A, Putnik P, Bičanić P, Brdar D, Duralija B, Pavlić B, i sur. (2022b) A Chemometric Investigation on the Functional Potential in High Power Ultrasound (HPU) Processed Strawberry Juice Made from Fruits Harvested at two Stages of Ripeness. *Molecules* **28**(1), 138. <https://doi.org/10.3390/molecules28010138>

Bebek Markovinović A, Stulić V, Putnik P, Birkić A, Jambrović M, Šaško D, i sur. (2023) Pulsed Electric Field (PEF) and High-Power Ultrasound (HPU) in the Hurdle Concept for the Preservation of Antioxidant Bioactive Compounds of Strawberry Juice—A Chemometric Evaluation—Part I. *Foods* **12**(17), 3172. <https://DOI: 10.3390/foods12173172>

Brnčić M, Ljubić Herceg I, Šubarić D, Badanjak M, Rimac Brnčić S, Tripalo B, i sur. (2009) Influence of power ultrasound on textural properties of corn starch gels. U: Proceedings of the fifth International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich, 500-501.

Brenes X, Guevara M, Wong E, Cortés C, Usaga J, Rojas-Garbanzo C (2022) Effect of high intensity ultrasound on main bioactive compounds, antioxidant capacity and color in orange juice. *Food Sci Technol Int* **28**(8), 694-702. <https://doi:10.1177/10820132211050203>

Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Putnik P, Vukušić T, Herceg Z, Dragović-Uzelac V (2016a) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. *Food Chem* **212**, 323-331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.192>

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016b) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem* **190**(1), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>

Bursać Kovačević D, Maras M, Barba FJ, Granato D, Roohinejad S, Mallikarjunan K i sur. (2018) Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: a review. *Food Chem* **268**, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.091>

Bursać Kovačević D, Brdar D, Fabečić P, Barba FJ, Lorenzo JM, Putnik P (2020) Strategies to Achieve a Healthy and Balanced Diet: Fruits and Vegetables as a Natural Source of Bioactive Compounds. U: Barba FJ, Putnik P, Bursać Kovačević D (ured.) *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability*, Academic Press, Cambridge, str. 51-88. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02185-4>

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 Preserv* **43**, e14023. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14023>

Buvé C, Kebede BT, De Batselier C, Carrillo C, Pham HTT, Hendrickx M, i sur. (2017) Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. *J Food Eng* **216**, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.002>

Cassani L, Tomadoni B, Moreira MR, Agüero MV (2018) Improving quality parameters of functional strawberry juices: Optimization of prebiotic fiber enrichment and geraniol treatment. *Food Bioprocess Tech* **11**, 2110–2124. <https://doi:10.1007/s11947-018-2170-x>

Cheng LH, Soh CY, Liew SC, Teh FF (2007) Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem* **104**(4), 1396–1401. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.001

Cortez R, Luna-Vital DA, Margulis D, Gonzalez de Mejia E (2017) Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Compr Rev Food Sci F* **16**(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

Cruz RMS, Vieira MC, Silva CLM (2006) Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*), *J Food Eng* **72**, 8–15. <https://doi:10.1016/J.JFOODENG.2004.11.007>

Dubrović I (2012) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na antioksidacijsku aktivnost te mikrobiološku kakvoću soka od jagode (disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Dziadek K, Kopeć A, Drózdź T, Kielbasa P, Ostafin M, Bulski K, i sur. (2019) Effect of pulsed electric field treatment on shelf life and nutritional value of apple juice. *J Food Sci Technol* **56**, 1184–1191. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03581-4>

Emamifar A, Mohamadizadeh M (2020) Influence of sonication and antimicrobial packaging-based nano-ZnO on the quality of fresh strawberry juice during cold storage. *J Food Meas Charact* **14**, 3280–3290. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00570-6>

Espachs-Barroso A, Barbosa-Cánovas GV, Martín-Belloso O (2003) Microbial and enzymatic changes in fruit juice induced by high-intensity pulsed electric fields. *Food Rev Int* **19**(3), 253–273. <https://doi.org/10.1081/fri-120023479>

Faisal Manzoor M, Ahmed Z, Ahmad N, Karrar E, Rehman A, Muhammad Aadil R, i sur. (2021) Probing the combined impact of pulsed electric field and ultra-sonication on the quality of spinach juice. *J Food Process Pres* **45**(5), e15475. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15475>

FDA (2021) Guidance for Industry: Juice HACCP and the FDA Food Safety Modernization Act. FDA-U.S Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-haccp-and-fda-food-safety-modernization-act>

Pristupljeno 11.7.2023.

Gabrić D, Barba FJ, Roohinejad S, Gharibzahedi SMT, Radojčin M, Putnik P, i sur. (2017) Pulsed electric fields as an alternative to thermal processing for preservation of nutritive and physicochemical properties of beverages: A review. *J Food Process Eng* **41**(1), 12638-12638. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12638>

Ganhão R, Pinheiro J, Tino C, Faria H, Gil MM (2019) Characterization of Nutritional, Physicochemical, and Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Strawberry

“*Fragaria × ananassa* Duch.” Cultivars (“Primoris”, “Endurance”, and “Portola”) from Western Region of Portugal. *Foods* **8**(12), 682. <https://doi.org/10.3390/foods8120682>

García-García R, Escobedo-Avellaneda Z, Tejada-Ortigoza V, Martín-Belloso O, Valdez-Fragoso A, Welti-Chanes J (2015) Hurdle technology applied to prickly pear beverages for inhibiting *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **60**(6), 558–564. <https://doi.org/10.1111/lam.12406>

Garofulić IE, Jambrak AR, Milošević S, Dragović-Uzelac V, Zorić Z, Herceg Z (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT-Food SciTechnol* **62**(1), 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.036>

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino (2012) The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>

González-Domínguez R, Sayago A, Akhatou I, Fernández-Recamales Á (2020) Multi-Chemical Profiling of Strawberry as a Traceability Tool to Investigate the Effect of Cultivar and Cultivation Conditions. *Foods* **9**(1), 96. <https://doi.org/10.3390/foods9010096>

Granato D, Putnik P, Bursać Kovačević D, Santos JS, Calado V, Rocha RS, i sur. (2018). Trends in chemometrics: Food authentication, microbiology, and effects of processing. *Compr Rev Food Sci F* **17**(3), 663–677. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12341>

Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2019) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci T* **11**(3), 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Grönroos A, Pirkonen P, Ruppert O (2004) Ultrasonic depolymerization of aqueous carboxymethylcellulose. *Ultrason Sonochem* **11**, 9–12. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00129-9)

Guerrero SN, Ferrario M, Schenk M, Carrillo MG (2017) Hurdle Technology using ultrasound for food preservation, U: Bermudez-Aguirre (ured.) *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation*, Academic Press, Cambridge, str. 39-99.

Guo M, Jin TZ, Geveke DJ, Fan X, Sites JE, Wang L (2014) Evaluation of Microbial Stability, Bioactive Compounds, Physicochemical Properties, and Consumer Acceptance of Pomegranate Juice Processed in a Commercial Scale Pulsed Electric Field System. *Food Bioprocess Tech* **7**(7), 2112–2120. <https://doi:10.1007/s11947-013-1185-6>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr* **83**(12), 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Herceg Z, Režek Jambrak A, Rimac Brnčić S, Krešić G (2009) *Procesi konzerviranja hrane - Novi postupci, Golden marketing-Tehnička knjiga*, Zagreb

HZJZ (2021) *Europska zdravstvena anketa (EHIS) u Hrvatskoj 2019. – Osnovni pokazatelji*. HZJZ-Hrvatski zavod za javno zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/medunarodna-istrazivanja/europska-zdravstvena-anketa-ehis-u-hrvatskoj-2019-osnovni-pokazatelji/> Pristupljeno 8. svibnja 2023.

Iqbal A, Murtaza A, Hu W, Ahmad I, Ahmad A, Xu X (2019) Activation and inactivation mechanisms of polyphenol oxidase during thermal and non-thermal methods of food processing. *Food Biopro Process* **117**, 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.006>

Islam MN, Zhang M, Adhikari B (2014) The Inactivation of Enzymes by Ultrasound—A Review of Potential Mechanisms. *Food Rev Int* **30**, 1–21. <https://doi:10.1080/87559129.2013.853772>

Jurica K, Brčić Karačonji I, Lasić D, Bursać Kovačević D, Putnik P (2021) Unauthorized Food Manipulation as a Criminal Offense: Food Authenticity, Legal Frameworks, Analytical Tools and Cases. *Foods* **10**, 2570. <https://doi.org/10.3390/foods10112570>

Kempkes M (2017) Industrial Pulsed Electric Field Systems. U: Miklavcic D. (ured.), Handbook of Electroporation, Springer International Publishing AG, Cham, str. 1-21. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1\\_211-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_211-1)

Khan I, Nkufi Tango C, Miskeen S, Lee BH, Oh DH (2016) Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety- A review. *Food Control* **73**, 1426-1444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>

Klopotek Y, Otto K, Böhm V (2005) Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agr Food Chem* **53**(14), 5640–5646. <https://doi:10.1021/jf047947v>

Kostelac D, Putnik P, Markov K, Frece J, Bursac Kovačević D (2020) Effects of electrotechnologies on enzymes in foods and food model systems. *Current Opinion in Food Science* **31**, 47–56. <https://doi:10.1016/j.cofs.2019.10.005>

Koubaa M, Barba FJ, Bursac Kovačević D, Putnik P, Santos MD, Queirós RP i sur. (2018) Pulsed electric field processing of fruit juices. U: Rajauria G, Tiwari BK (ured.) Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis, Academic Press, Cambridge, str. 437–449. <https://doi:10.1016/b978-0-12-802230-6.00022-9>

Koutchma T, Popović V, Ros-Polski V, Popielarz A (2016) Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comp Rev Food Sci F* **15**, 844–867. <https://doi:10.1111/1541-4337.12214>

Lafarga T, Rodríguez-Roque MJ, Bobo G, Villaró S, Aguiló-Aguayo I (2019) Effect of ultrasound processing on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of selected vegetables. *Food Sci Biotechnol* **28**(6), 1713–1721. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00618-4>

Mahmoud MZ, Fagiry MA, Davidson R, Abdelbasset WK (2022) The benefits, drawbacks and potential future challenges of the most commonly used ultrasound-based hurdle combinations technologies in food

preservation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **15**, 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.03.006>

Margean A, Lupu MI, Alexa E, Padureanu V, Canja CM, Cocan I, i sur. (2020) An Overview of Effects Induced by Pasteurization and High-Power Ultrasound Treatment on the Quality of Red Grape Juice. *Molecules* **25**(7), 1669. <https://doi.org/10.3390/molecules25071669>

Medina-Meza IG, Boioli P, Barbosa-Cánovas GV (2016) Assessment of the Effects of Ultrasonics and Pulsed Electric Fields on Nutritional and Rheological Properties of Raspberry and Blueberry Purees. *Food Bioprocess Tech* **9**(3), 520–531. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1642-5>

Mehta D, Yadav SK (2019) Impact of atmospheric non-thermal plasma and hydrothermal treatment on bioactive compounds and microbial inactivation of strawberry juice: A hurdle technology approach. *Food Sci Technol Int* **26**(1), 3-10. <https://doi.org/10.1177/1082013219865360>

Miller K, Feucht W, Schmid M (2019) Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. *Nutrients* **11**(7), 1510–1512. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>

Milosavljević DM, Mutavdžić DR, Radotić K, Milivojević JM, Maksimović VM, Dragišić Maksimović JJ (2020) Phenolic profiling of 12 strawberry cultivars using different spectroscopic methods. *J Agric Food Chem* **68**, 4346-4354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07331>

Ministarstvo poljoprivrede (2023) Nacionalna strategija za provedbu Školske sheme voća I povrća te mlijeka i mliječnih proizvoda od školske godine 2023./2024. do školske godine 2028/2029., Ministarstvo poljoprivrede - Školska shema (gov.hr) Pristupljeno 8. svibnja 2023.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>



Narendar A, Hanani N, Syafrial (2018) Factors that influence technical efficiency of organic rice farming in Sumberngepoh village, La Wan subdistrict, Makang district. *Agricultural Socio-Economics Journal* **18** (2), 79-85. <https://doi:10.21776/ub.agrise.2018.018.2.5>

Nile SH i Park SW (2014) Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* **30**, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>

Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R (2021) The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J Food Sci Technol* **58**, 397–411. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>

Odrizola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2008) Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Eur Food Res Technol* **228**(2), 239–248. <https://doi:10.1007/s00217-008-0928-5>

Odrizola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009) Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice. *LWT - Food Sci Technol* **42**(1), 93–100. <https://doi:10.1016/j.lwt.2008.05.008>

Oren-Shamir M (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci* **177**, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.015>

Patil S, Bourke P, Kelly B, Frías JM, Cullen PJ (2009) The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innov Food Sci Emerg Technol* **10**, 486–490. <https://doi:10.1016/J.IFSET.2009.06.005>

Pravilnik (2013) Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. Narodne Novine 48, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_04\\_48\\_941.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html) Pristupljeno 18. svibnja 2023.

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**(6) 699. <https://doi:10.3390/foods9060699>.

Putnik P, Bursać Kovačević D (2021) Sustainable Functional Food Processing. *Foods*, **10**(7), 1438. <https://doi.org/10.3390/foods10071438>

Rahman MS (2015) Hurdle Technology in Food Preservation. U: Siddiqui MW, Rahman MS (ured.) Minimally Processed Foods: Technologies for Safety, Quality, and Convenience, Springer, New York, str. 17-33. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9_2)

Rojas ML, Miano AC, Augusto PED (2017) Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation. U: Bermudez-Aguirre D (ured.) Ultrasound Processing of Fruit and Vegetable Juices, Academia Press, Cambridge, str. 181–199. <https://doi:10.1016/B978-0-12-804581-7.00007-5>

Roobab U, Abida A, Chacha JS, Athar A, Madni GM, Ranjha MMAN, i sur. (2022) Applications of innovative non-thermal pulsed electric field technology in developing safer and healthier fruit juices. *Molecules* **27**, 4031-4049 <https://doi.org/10.3390/molecules27134031>

Rybak K, Wiktor A, Witrowa-Rajchert D, Parniakov O, Nowacka M (2020) The Effect of Traditional and Non-Thermal Treatments on the Bioactive Compounds and Sugars Content of Red Bell Pepper. *Molecules* **25**(18), 4287. <https://doi:10.3390/molecules25184287>

Sala FJ, Burgos J, Condón S, Lopez P, Raso J (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes, U: Gould GW (ured.) New Methods of Food Preservation, Springer US, Boston, str. 176–204. [https://doi:10.1007/978-1-4615-2105-1\\_9](https://doi:10.1007/978-1-4615-2105-1_9)

Salehi F (2020a) Physico-chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by pulsed electric field: a review. *Int J Food Prop* **23**, 1036-1050. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1775250>

Salehi F (2020b) Physico-chemical properties of fruit and vegetable juices as affected by ultrasound: a review. *Int J Food Prop* **23**, 1748-1756. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1825486>

Sampedro F, McAloon A, Yee W, Fan X, Zhang HQ, Geveke DJ (2013) Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields. *Innov Food Sci Emerg* **17**, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.002>

Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J (2015) Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *Int J Mol Sci* **16**, 24673-24706. <https://doi:10.3390/ijms161024673>

Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agr Food Chem* **46**(10), 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

Šimunek M, Režek Jambrak A, Petrović M, Juretić H, Major N, Herceg Z, i sur. (2013). Aroma profile and sensory properties of ultrasound-treated apple juice and nectar. *Food Technol Biotech* **51**(1) 101-111.

Škegro M, Putnik P, Bursać Kovačević D, Kovač AP, Salkić L, Čanak I, i sur. (2021) Chemometric Comparison of High-Pressure Processing and Thermal Pasteurization: The Nutritive, Sensory, and Microbial Quality of Smoothies. *Foods* **10**(6), 1167. <https://doi.org/10.3390/foods10061167>

Teleszko M, Nowicka P, Wojdyło A (2016) Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. *J Food Compos Anal* **54**, 10–19. <https://doi:10.1016/j.jfca.2016.09.009>

Terefe NS, Gamage M, Vilku K, Simons L, Mawson R, Versteeg C (2009) The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chem* **117**, 20–27. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.067>

Teribia N, Buve C, Bonerz D, Aschoff J, Hendrickx M, Van Loey A (2021a) Impact of processing and storage conditions on color stability of strawberry puree: The role of PPO reactions revisited. *J Food Eng* **294**, e110402. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110402>

Teribia N, Buvé C, Bonerz D, Aschoff J, Hendrickx M, Van Loey A (2021b) Effect of cultivar, pasteurization and storage on the volatile and taste compounds of strawberry puree. *LWT-Food Sci Technol* **150**, e112007. <https://doi:10.1016/j.lwt.2021.112007>

Tomadoni B, Cassani L, Viacava G, Moreira MDR, Ponce A (2017) Effect of ultrasound and storage time on quality attributes of strawberry juice. *J Food Process Eng* **40**(5), e12533. <https://doi:10.1111/jfpe.12533>

Tomadoni B, Cassani L, Moreira MDR, Ponce A, Agüero MV (2019) Natural Antimicrobials Combined with Ultrasound Treatments to Enhance Quality Parameters and Safety of Unpasteurized Strawberry Juice. *International Journal of Fruit Science* **20**, 178-197. <https://doi:10.1080/15538362.2019.1709115>

Ubeda C, Callejón RM, Troncoso AM, Morales ML, Garcia-Parrilla MC (2014) Influence of the production process of strawberry industrial purees on free and glycosidically bound aroma compounds. *Innov Food Sci Emerg* **26**, 381-388. <https://doi:10.1016/j.ifset.2014.02.015>

Urün I, Attar SH, Sönmez DA, Gündeşli MA, Ercişli S, Kafkas NE, i sur. (2021) Comparison of Polyphenol, Sugar, Organic Acid, Volatile Compounds, and Antioxidant Capacity of Commercially Grown Strawberry Cultivars in Turkey. *Plants* **10**, 1654. <https://doi.org/10.3390/plants10081654>

USDA (2022) Strawberries, raw USDA- U.S. Department of Agriculture <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2346409/nutrients> Pristupljeno 26. lipnja 2023.

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

WHO (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO- World Health Organization [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf) Pristupljeno 26.lipnja 2023

Ye Q, Georges N, Selomulya C (2018) Microencapsulation of active ingredients in functional foods: from research stage to commercial food products. *Trends Food Sci Technol* **78**, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>

Yildiz S, Pokhrel PR, Unluturk S, Barbosa- Canovas GV (2020) Changes in quality characteristics of strawberry juice after equivalent high pressure, ultrasound, and pulsed electric fields processes. *Food Eng Rev* **13**(5), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09250-z>

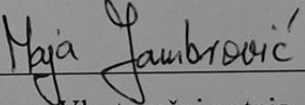
Yildiz S, Pokhrel PR, Unluturk S, Barbosa-Cánovas GV (2021) Shelf life extension of strawberry juice by equivalent ultrasound, high pressure, and pulsed electric fields processes. *Food Res Int* **140**, 110040. <https://doi:10.1016/j.foodres.2020.110040>

Yu X, Bals O, Grimi N, Vorobiev E (2015) A new way for the oil plant biomass valorization: polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields. *Ind Crops Prod* **74**, 309–318. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.045>

Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

  
Vlastoručni potpis