Utjecaj visokoga hidrostatskoga tlaka na kakvoću funkcionalnih napitaka i primjena kemometrije u procjeni njihove kakvoće

Škegro, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:159:053386

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marko Škegro

UTJECAJ VISOKOGA HIDROSTATSKOGA TLAKA NA KAKVOĆU FUNKCIONALNIH NAPITAKA I PRIMJENA KEMOMETRIJE U PROCJENI NJIHOVE KAKVOĆE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marko Škegro

UTJECAJ VISOKOGA HIDROSTATSKOGA TLAKA NA KAKVOĆU FUNKCIONALNIH NAPITAKA I PRIMJENA KEMOMETRIJE U PROCJENI NJIHOVE KAKVOĆE

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Damir Ježek

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Marko Škegro

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE QUALITY OF FUNCTIONAL SMOOTHIES AND APPLICATION OF CHEMOMETRY IN ASSESSING THEIR QUALITY

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Damir Ježek, Full Professor

Zagreb, 2022.

Informacije o mentoru: prof. dr. sc. Damir Ježek

ŽIVOTOPIS

Prof. dr. sc. Damir Ježek, rođen je u Požegi, te je preselivši se u Zagreb, upisao Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 1990. godine i iste godine zaposlio se u Požeškoj gimnaziji kao profesor biologije i kemije, a 1992. se zapošljava u Laboratoriju za tehnološke operacije, Zavoda za procesno inženjerstvo, PBF-a kao znanstveni novak. Akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje prehrambena tehnologija, stekao je 1995., a akademski stupanj doktora prehrambene tehnologije, znanstveno polje prehrambena tehnologija, 1999. godine obranivši doktorski rad na PBF-u. 1992. godine je završio dopunsko pedagoško – psihološko obrazovanje na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na odjelu pedagogijskih znanosti, a habilitirao je na PBF – u 2001. Zvanje izvanrednog profesora stječe 2005. godine, a redovitog profesora 2009. godine te redovitog profesora u trajnom zvanju 2014. godine, u kojem je i dan danas. Dužnost dekana na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obnašao je od 2006/07 do 2009/10, te od 2015/16 do 2018/19, a dužnost prodekana za financije i poslovanje od 2010/11 do 2013/14. Kao nastavnik sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima. Nositelj je kolegija *Jedinične operacije, Priprema uzoraka za kemijske i biokemijske analize, Energija u biotehnologiji i proizvodnji hrane*; a suradnik je na kolegijima *Fenomeni prijelaza, Nova dostignuća u mehaničkom inženjerstvu, Energija u biotehnologiji, Vođenje procesa u prehrambenoj industriji i Ultrazvuk u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji*. Član je Znanstvenog vijeća za poljoprivredu i šumarstvo HAZU, Tehničke akademije RH, Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista i European Federation of Biotechnology te je obnašao dužnosti dopredsjednika Upravnog vijeća „Ruđer Bošković“, člana Upravnog vijeća Agencije za znanost i visokog obrazovanja, predsjedavajućeg člana Nacionalnog vijeća za znanost i visoko obrazovanje RH, predsjednika Područnog vijeća za biotehničke znanosti RH. Dobitnik je niz nagrada u znanosti, kao što su Rektorova nagrada, Državna nagrada za znanost 2012. godine, Nagrada Akademije tehničkih znanosti Hrvatske „Rikard Podhorsky“ za 2015, odlikovan je Spomenicom domovinskog rata. Ima 30 radova indeksiranih prema SCI/CC, preko 30 radova indeksiranih u sekundarnim publikacijama, preko 40 radova u domaćim i međunarodnim zbornicima te preko 55 sudjelovanja na znanstvenim skupovima u zemlji i inozemstvu. Usavršavao se u Španjolskoj, Njemačkoj, Velikoj Britaniji i Sloveniji te se aktivno služi engleskim i španjolskim jezikom, a pasivno njemačkim.

Zahvaljujem se mom mentoru, prof. dr. sc. Damiru Ježeku. Hvala na konstruktivnim savjetima, rješavanju problema, na ljubaznim riječima, toplini, brizi, podršci, mentoriranju i uloženom trudu tijekom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem se kolegama izv. prof. dr. sc. Svenu Karloviću i kolegici izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na izuzetnoj pomoći, motivaciji i savjetima koji su pratili svaku fazu izrade ovog rada. Isto tako, zahvaljujem se kolegama Darjanu Pipiću i ing. Goranu Bosancu na pomoći tijekom provedbe ovog rada kao i ostalim kolegama iz Laboratorija za tehnološke operacije i Laboratorija za tehničku termodinamiku.

I na kraju, hvala onima koji su najzaslužniji da ova disertacija uopće postoji, mojim roditeljima i bratu koji su kroz cijeli moj obrazovni vijek bezuvjetno stajali uz mene. Isto tako, da nije bilo ljubavi, podrške i razumijevanja moje supruge ova disertacija nikad ne bi bila napisana.

Hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Doktorski rad
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 57.085:582.282.12:582.282.23(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ VISOKOGA HIDROSTATSKOGA TLAKA NA KAKVOĆU FUNKCIONALNIH NAPITAKA I PRIMJENA KEMOMETRIJE U PROCJENI NJIHOVE KAKVOĆE

Marko Škegro, mag. ing. techn. aliment.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Damir Ježek

Kratki sažetak
Smoothie napitci su funkcionalna hrana s velikim potencijalom koji doprinose željenim pozitivnim zdravstvenim učincima, no kratkog su roka valjanosti. Toplinska obrada nepovoljno utječe na izvornu kakvoću, pa se u prehrambenoj industriji sve više koriste netermalne tehnologije obrade poput visokog hidrostatskog tlaka (VHT), s brojnim prednostima u vidu očuvanja kakvoće i zdravstvene ispravnosti tijekom skladištenja. Stoga je cilj ovog rada istražiti učinak VHT na kakvoću *smoothie* napitka pripremljenih od jabuke, mrkve, aronije, indijanske banane i bademovog napitka tijekom skladištenja (7,14,21 dan/4 °C). Radi usporedbe s toplinskom obradom, uzorci su podvrgnuti pasterizaciji (85 ℃/7 min). U svim ispitivanim uzorcima utvrđeni su slijedeći parametri kakvoće: (i) fizikalno kemijsksa svojstva, (ii) mikrobiološka stabilnost, (iii) stabilnost biološki aktivnih spojeva i (iv) senzorska obilježja. Pored usporedbe učinkovitosti primijenjenih tehnologija obrade u svrhu očuvanja kakvoće funkcionalnih napitaka tijekom skladištenja, uspješno su primjenjene kemometrijske metode za ispitivanje povezanosti analiziranih parametara kakvoće i tehnologija obrade funkcionalnih napitaka (VHT *vs*. pasterizacija) tijekom skladištenja s ciljem unaprjeđenja kontrole procesa te moguću industrijsku primjenu.
Broj stranica: 155
Broj slika: 50
Broj tablica: 34
Broj literaturnih navoda: 268
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak, pasterizacija, funkcionalna hrana, *smoothie* napitak, parametri kakvoće, kemometrija
Datum obrane: 23.03.2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
3. prof. dr. sc. Sandra Voća
4. prof. dr. sc. Mladen Brnčić (zamjenski član)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **PhD thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
UDK: 57.085:582.282.12:582.282.23(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE QUALITY OF FUNCTIONAL SMOOTHIES AND APPLICATION OF CHEMOMETRY IN ASSESSING THEIR QUALITY

Marko Škegro, MSc Food Engineering

Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb
Supervisor: PhD Damir Ježek, Full Professor

Short Abstract
Smoothies are functional foods with a great potential to contribute to desired positive health effects, but have a short shelf life. Heat treatment adversely affects the original quality, teherefore non-thermal processing technologies such as high hydrostatic pressure (VHT) are increasingly used in the food industry, offering numerous advantages in terms of maintaining quality during storage. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of VHT on the quality of smoothies prepared from apple, carrot, chokeberry, paw-paw and almond drink during storage (7,14,21 days / 4°C). For comparison with heat treatment, the samples were subjected to pasteurization (85 °C / 7 min). The following quality parameters were determined for all tested samples: (i) physicochemical properties, (ii) microbiological stability, (iii) stability of biologically active compounds, and (iv) sensory properties. Besides comparing the efficiency of the applied processing technologies to maintain the quality of functional beverages during storage, chemometric methods were successfully applied to test the relationship between the analyzed quality parameters and the processing technologies for functional beverages (VHT *vs.* pasteurization) during storage to improve process control and possible industrial application.

Number of pages: 155
Number of figures: 50
Number of tables: 34
Number of references: 268
Original in: Croatian
Key words: high hydrostatic pressure, pasteurization, functional food, smoothie, quality parameters, chemometrics

Date of the thesis defense:

Reviewers:
1. PhD Sven Karlović, Associate Professor
2. PhD Danijela Bursać Kovačević, Associate Professor
3. PhD Sandra Voća, Full Professor
4. PhD Mladen Brnčić, Full professor (substitute)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb, University of Zagreb, Trg maršala Tita, Zagreb.

Tema disertacije prihvaćena je na 4. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta akademske godine 2020./2021. u Zagrebu održanoj 27. siječnja 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 18. svibnja 2021. godine na 10. redovitoj elektroničkoj sjednici u 352. akademskoj godini (2020./2021.).

SAŽETAK

Svježi sokovi od voća i povrća, te u posljednje vrijeme i *smoothie* napitci, mogu se smatrati funkcionalnim proizvodima s visokim udjelima bioaktivnih spojeva kojima se pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje, a karakteriziraju ih poželjna nutritivna i senzorska svojstva. Kako bi se očuvali bioaktivni spojevi, senzorska svojstva te mikrobiološka stabilnost proizvoda tijekom skladištenja, konzerviranje ovih proizvoda industrijski se provodi primjenom toplinske obrade, tj. pasterizacije, no u novije vrijeme ispituje se mogućnost primjene inovativnih netermalnih tehnologija među kojima visoki hidrostatski tlak zauzima značajno mjesto. Stoga je cilj ovog rada ispitati utjecaj tehnologije obrade visokim hidrostatskim tlakom pri različitim uvjetima obrade, kao i utvrditi utjecaj konvencionalne toplinske obrade (šaržne pasterizacije) na parametre kakvoće (fizikalno – kemijska svojstva, mikrobiološku stabilnost, biološki aktivne spojeve i senzorske karakteristike) funkcionalnih napitaka na bazi voća, povrća i bademovog napitka tijekom skladištenja kroz 7, 14 i 21 dan pri 4 °C. Ovim istraživanjem je uspoređena učinkovitost tehnologije obrade visokim hidrostatskim tlakom i konvencionalne toplinske obrade tj. pasterizacije u potencijalu proizvodnje stabilnog, zdravstveno ispravnog, nutritivno vrijednog te senzorski prihvatljivog funkcionalnog napitka. Svi dobiveni rezultati obrađeni su primjenom kemometrijskih metoda s ciljem ispitivanja povezanosti analiziranih parametara kakvoće i tehnologije obrade funkcionalnih napitaka tijekom skladištenja. *Smoothie* napici su poizvedeni miješanjem hladno prešanih sokova jabuke, mrkve i aronije, kaše indijanske banane i bademovog napitka, te su povrgnuti pasterizaciji (85 ^{o}C/7 min) i obradi visokim hidrostatskim tlakom (350 MPa i 450 MPa), pri sobnoj temperaturi, tijekom 5 i 15 minuta. Za svaku vrstu tretmana su optimizirani procesni uvjeti obrade pri kojima se ostvaruju najbolji parametri kakvoće funkcionalih napitaka poput zadržavanja nutrijenata i biološki aktivnih spojeva, zadržavanja izvornih senzorskih obilježja te ostvarenje mikrobiološke stabilnosti tijekom skladištenja. Provedena istraživanja predstavljaju dobru bazu za razvoj i dizajn novih funkcionalnih proizvoda na bazi voća i povrća u kojima bi bili očuvani visokovrijedni bioaktivni spojevi različitih kemijskih struktura, čijim bi se kombiniranim i sinergijskim djelovanjima osigurala značajna biološka te poželjna senzorska svojstva.

Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak, pasterizacija, *smoothie* napitak, parametri kakvoće, kemometrija

SUMMARY

Fresh fruit and vegetable juices, and more recently smoothies, can be considered as functional products with a high content of bioactive compounds, which are considered to have many beneficial effects on health, and are characterisized by desirable nutritional and sensory properties. In order to preserve the bioactive compounds, sensory properties and microbiological stability of the products during storage, these products are industrially preserved by heat treatment, i.e. pasteurization. Recently, the possibility of using innovative non-thermal technologies has been investigated. Therefore, the aim of this work is to study the influence of the technology of processing with high hydrostatic pressure under different processing conditions, as well as to determine the influence of conventional heat treatment (batch pasteurization) on the quality parameters (physicochemical properties, microbiological stability, biologically active compounds and sensory characteristics) of functional beverages based on fruits, vegetables and almond drink during storage for 7, 14 and 21 days at 4 °C. This research compares the efficiency of high hydrostatic pressure treatment technology and conventional heat treatment, i.e. pasteurization, in terms of the potential to produce a stable, healthy, nutritionally valuable and sensory acceptable functional beverage. All the obtained results were processed by chemometric methods to study the relationship between the analyzed quality parameters and the technology of processing functional beverages during storage. Smoothie drinks were prepared from cold-pressed apple, carrot, and chokeberry juices, Indian banana puree, and almond drink and pasteurized (85 ℃ /7 min) and treated with high hydrostatic pressure (350 MPa and 450 MPa) at room temperature for 5 and 15 min. For each type of treatment, the processing conditions were optimized, achieving the best quality parameters of the functional drinks, such as retaining nutrients and biologically active compounds, maintaining the original sensory characteristics and achieving microbiological stability during storage. The conducted research provides a good basis for the development and design of new functional products based on fruits and vegetables, in which high quality bioactive compounds of different chemical structures are retained, whose combined and synergistic effects would provide significant biological and desirable sensory properties.

Key words: high hydrostatic pressure, pasteurization, smoothie, quality parameters, chemometrics

SADRŽAJ:

1. UVOD ... **1**
2. TEORIJSKI DIO ... **3**
2.1. Perspektiva i razvoj funkcionalnih proizvoda ... **4**
2.2. *Smoothie* kao funkcionalni napitak ... **7**
2.3. Bioaktivni potencijal *smoothie* napitaka ... **11**
2.4. Nutritivni potencijal *smoothie* napitaka ... **16**
2.4.1. Jabuka (*Malus domestica* L.) ... **16**
2.4.2. Mrkva (*Daucus carota L.*) ... **17**
2.4.3. Aronija (*Aronia melanocarpa L.*) ... **18**
2.4.4. Indijanska banana (*Asimina triloba* L.) ... **19**
2.4.5. Bademov napitak ... **20**
2.5. Senzorska obilježja *smoothie* napitaka ... **21**
2.6. Reološka svojstva *smoothie* napitaka ... **22**
2.6.1. Utjecaj na reološka svojstva ... **23**
2.6.2. Viskoznost ... **24**
2.7. Netoplinske tehnologije u obradi proizvoda od voća i povrća ... **26**
2.8. Toplinske metode obrade proizvoda od voća i povrća ... **30**
2.8.1. Pasterizacija ... **30**
2.9. Tehnologija visokog hidrostatskog tlaka (VHT) ... **32**
2.10. Primjena visokoga hidrostatskog tlaka u obradi plodova voća i povrća te njihovih proizvoda ... **40**
2.11. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u obradi *smoothie* napitaka ... **44**
3. MATERIJALI I METODE ... **46**
3.1. MATERIJALI ... **47**
Sirovine za pripremu *smoothie* napitaka za provođenje ovog istraživanja su: ... **47**
3.2. METODE RADA ... **48**
3.2.1. Priprema *smoothie* napitaka ... **48**
3.2.2. Obrada *smoothie* napitaka visokim hidrostatskim tlakom ... **49**
3.2.3. Obrada *smoothie* napitaka pasterizacijom ... **51**
3.3. Ispitivanje parametara kakvoće *smoothie* napitaka ... **52**
3.3.1. Fizikalno kemijske analize ... **53**
3.3.2. Mikrobiološka stabilnost ... **55**
3.3.3. Stabilnost biološki aktivnih spojeva (BAS) ... **57**
3.3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola ... **58**
3.3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida ... **60**
3.3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina ... **62**

3.3.3.4. Određivanje ukupnih karotenoida 64
3.3.3.5. Određivanje vitamina C 65
3.3.4. Senzorska analiza 66
3.3.5. Statistička analiza 66
4. REZULTATI 68
4.1. Eksperimentalni dizajn 69
4.2. Senzorska analiza *smoothie* napitaka 69
4.3. Hijerarhijska klasterska analiza Wardovom metodom klasteriranja 72
4.4. Određivanje nutritivnog indeksa (NI) 76
4.5. Klasterska analiza bioaktivnih spojeva 78
4.6. Analiza kolorimetrijskih rezultata 80
4.7. Mikrobiološka analiza 83
4.8. Analiza senzorskih svojstava ispitivanih *smoothie* napitaka 84
4.9. Utjecaj TP i VHT obrade, te vremena skladištenja na reološka svojstva i pH *smoothie* napitaka 89
4.10. Utjecaj vremena skladištenja na sadržaj bioaktivnih spojeva 92
4.11. Analiza utjecaja vremena skladištenja na bioaktivne spojeve 95
4.12. Analiza utjecaja procesnih parametara VHT na bioaktivne spojeve 98
4.13. Analiza raspodjele veličine čestica 102
5. RASPRAVA 108
5.1. Odabir *smoothie* napitaka 109
5.2 Klasterska analiza – boja i bioaktivni spojevi 110
5.3. Nutritivni indeks 113
5.4. Utjecaj obrade i skladištenja na bioaktivne spojeve 114
5.5. Utjecaj skladištenja na nutritivne vrijednosti *smoothie* napitaka 116
5.6. Utjecaj skladištenja na boju *smoothie* napitaka 117
5.7. Mikrobiološka stabilnost *smoothie* napitaka tijekom skladištenja za TP i VHT uzorke 119
5.8. Senzorska analiza *smoothie* napitaka 120
5.9. Analiza utjecaja na fizikalna svojstva *smoothie* napitaka 121
5.10. Raspodjela veličine čestica 123
6. ZAKLJUČCI 126
7. POPIS LITERATURE 128

1. UVOD

Za prehrambene proizvode se danas postavljaju sve veći zahtjeva da istovremeno osiguravaju visok udio biološki aktivnih spojeva, te zadržavanje visoke razine senzorskih svojstava poput mirisa, okusa i teksture (Tomašević i sur., 2021). Funkcionalna hrana, pa tako i funkcionalni napici, definirani su kao hrana koja uz svoju osnovnu nutritivnu i kalorijsku vrijednost pokazuje pozitivan utjecaj na barem jednu, ali obično i više funkcija u organizmu (Granato i sur., 2020). Kao posljedica današnjeg ubrzanog načina života potrošači danas sve više potražuju proizvode visoke kvalitete kojim bi na brz i jednostavan način nadomjestili dnevni unos voća i povrća. Stoga su *smoothie* napitci sve više popularni među potrošačima te se mogu smatrati tipičnim primjerom funkcionalnog napitka, obzirom se najčešće sastojke od baze voća i povrća uz dodatak neke mliječne komponente (McCartney i sur., 2018). Zbog sve češće netolerancije na laktozu, alergije ili sklonosti vegetarijanskoj prehrani, mliječne komponente se zamjenjuju nemliječnim sastojcima (Uzodinma i sur., 2020). Iz svega navedenoga konzumacija *smoothie* napitaka povezuje se sa pozitivnim učincima u prevenciji nekih kroničnih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, pretilosti i drugo (Muller i sur. 2020; Bestwick i sur., 2020; Leppanen i sur., 2017; Medina, 2011). Obično se pripremaju od svježih namirnica bez dodatnog konzerviranja i obrade te kao takvi imaju kratak rok trajnosti. U novije se vrijeme nastoji novim tehnologijama konzerviranja hrane zamijeniti i/ili unaprijediti dosad već postojeće sa ciljem proizvodnje visoko kvalitetnih i zdravstveno ispravnih proizvoda sa što većim zadržavanjem biološki aktivnih spojeva.

Općenito, sokovi od voća i povrća najčešće se konzerviraju konvencionalnim postupkom toplinske pasterizacije čime se inaktiviraju termolabilni mikroorganizmi odgovorni za kvarenje hrane, kao što su kvasci, plijesni i/ili vegetativne bakterije (Holdsworth, 2001; Petruzzi i sur., 2017). Po provedenoj pasterizaciji dolazi i do inaktivacije enzima čije bi zaostale aktivnosti mogle izazvati oksidacijske promjene tijekom daljnje obrade i skladištenja. Stoga su toplinski obrađeni sokovi zdravstveno ispravni tijekom dužeg roka trajanja (Agcam i sur., 2018). Primjena toplinske obrade u *smoothie* napicima može vrlo lako dovesti do nepoželjnih promjena u funkcionalnim i drugim svojstvima njegovih termolabilnih bioaktivnih spojeva, te ujedno i narušavanja senzorskih svojstava, poput boje, okusa ili mirisa (Petruzzi i sur., 2017; Ribeiro i sur., 2020). Primjena inovativnih netoplinskih tehnologija, kao što je obrada visokim hidrostatskim tlakom, prema rezultatima dosadašnjih spoznaja, mogla bi biti zamjena toplinskoj obradi u preradi sokova od voća i povrća (Bevilacqua i sur., 2018).

Tehnologija visokog hidrostatskog tlaka učinkovito inhibira rast mikroorganizama i denaturira enzime uz minimalne promjene u nutritivnoj i senzorskoj kakvoći (Podolak i sur., 2020). Na učinkovitost ove tehnologije znatno utječu procesni tehnološki parametri, poput

vrijednosti tlaka, temperature i vremena obrade, a od posebnog se značaja ističe i aktivitet vode u namirnici, kao i mikroorganizmi specifični za pojedinu namirnicu (Roobab i sur., 2021; Petrus i sur., 2019; Yuan i sur., 2018). *Smoothie* napici su višekomponentni sustavi koji osim osnovnih makronutrijenata, obiluju i raznim bioaktivnim spojevima koji mogu dodatno utjecati na rast mikroorganizama tijekom skladištenja, stoga je obrada primjenom tehnologije visokog hidrostatskog tlaka veliki izazov za prehrambenu industriju.

Za razliku od toplinske obrade, obrada visokim hidrostatskim tlakom povoljno utječe na zadržavanje senzorskih svojstava u *smoothie* napicima (Andres i sur., 2016a). Toplinska pasterizacija može negativno utjecati na stabilnost bioaktivnih spojeva u *smoothie* napicima (de Oliveira Ribeiro i sur., 2018), dok obrada visokim hidrostatskim tlakom može čak i povećati početnu razinu nutritivne kvalitete (Fernandez i sur., 2019b). Štoviše, utvrđeno je da je obrada visokim hidrostatskim tlakom manje destruktivan tretman u smislu stabilnosti vitamina C i polifenolnih spojeva u usporedbi s toplinskom obradom (Keenan i sur., 2012). U istom istraživanju je utvrđeno da također i procesni parametri obrade također značajno doprinose stabilnosti bioaktivnih spojeva, stoga ih je nužno pažljivo razmotriti i ispitati kako bi se iznašli optimalni uvjeti obrade s ciljem dobivanja proizvoda visoke kvalitete uz produljeni rok trajnosti.

Slijedom svega navedenoga, ciljevi ovog istraživanja su: (i) ispitati utjecaje konvencionalne toplinske obrade (pasterizacije) i tehnologije obrade visokim hidrostatskim tlakom na parametre kakvoće funkcionalnih napitaka tipa *smoothie*, (ii) usporediti učinkovitost primijenjenih tehnologija obrade u svrhu očuvanja njihove kakvoće tijekom skladištenja te (iii) primijeniti kemometrijske metode za ispitivanje povezanosti analiziranih parametara kakvoće (fizikalno–kemijske analize, mikrobiološka stabilnost, stabilnost biološki aktivnih spojeva i senzorska analiza) i tehnologija obrade funkcionalnih napitaka tijekom skladištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Razvoj funkcionalnih proizvoda i perspektiva

Trendovi u prehrambenoj tehnologiji prate potrebe potrošaća koji su sve osviješteniji o utjecaju hrane na zdravlje, te je u porastu potražnja za prehrambenim proizvodima visoke kakvoće koji su po svojim nutritivnim i senzorskim obilježjima slični sirovoj neprerađenoj hrani. To je posebno slučaj za voće i povrće, gdje je glavni zahtjev uz organoleptička svojstva da hranom povoljno djeluju na zdravlje. Tako se potražnja za funkcionalnom hranom također povećala. Japanska vlada je 1980. godine prva uvela pojam „funkcionalna hrana“ i definirala je kao „hranu koja osim tradicionalnih hranjivih nutrijenata (ugljikohidrata, proteina, lipida, minerala i vitamina), također osigurava hranjive i fiziološke koristi za potrošača“ (Chonan, 2011). Funkcionalna hrana je hrana koja može biti ili svježa neprerađena ili industrijski prerađena. Primarno svojstvo funkcionalne hrane he da sadrži određene aktivne tvari, koje ako se konzumiraju u odgovarajućim količinama, pozitivno djeluju na na opće zdravlje i pri tome također mogu doprinijeti smanjenju rizika od bolesti krvožilnog sustava, karcinoma i dr. (Granato i sur., 2017). To je ujedno i jedan od razloga zašto je funkcionalna hrana danas sve traženija od strane potrošača te je očigledan trend u prehrambenoj industriji vezan uz intenzivno ulaganje u razvoj ovog segmenta proizvodnje, a sve sa ciljem osiguranja proizvodnje hrane koja neće imati negativan ili neutralan utjecaj na zdravlje potrošaća, već će osigurati pozitivan utjecaj na dugoročno zdravlje potrošača.

Kako bi se utvrdili pozitivni učinci funkcionalne hrane na zdravlje, provode se klinička ispitivanja vezana uz pojedine potencijalno funkcionalne sastojke namirnice, ili čitave namirnice (randomizirana, dvostruko slijepa placebom kontrolirana klinička studija i dr.) (Assmann i sur., 2014). Nadalje, kako bi se hrana mogla proglasiti funkcionalnom, potrebno je da bude potvrđena znanstvenim ispitivanjima te da je u skladu sa svim propisima i zakonima države u kojoj se pušta na tržište (Cassidy i sur., 2018). Primjerice, neki od zakonskih propisa kojima se regulira status funkcionalne hrane moraju biti usuglašena s Europskom agencijom za sigurnost hrane u Europskoj uniji, Hrvatskom Agencijom za Hranu, Upravom za hranu i lijekove (FDA) u SAD-u i drugim agencijama koje su zadužene za pojedinu zemlju u kojoj se proizvodi ili uvozi proizvod (Brown i sur., 2018; Mak i sur., 2018).

Povrh svega navedenoga, valja istaknuti da funkcionalna hrana također mora udovoljiti zahtjevima da bude zdravstveno sigurna te da bude dostupna potrošačima bez liječničkog recepta (Lenssen i sur., 2018). Prema Rao i sur., 2019. obzirom na veliki broj unutrašnjih (npr. genetika) ili vanjskih (npr. zagađenost okoliša) faktora koji mogu utjecati na pojavu bolesti,

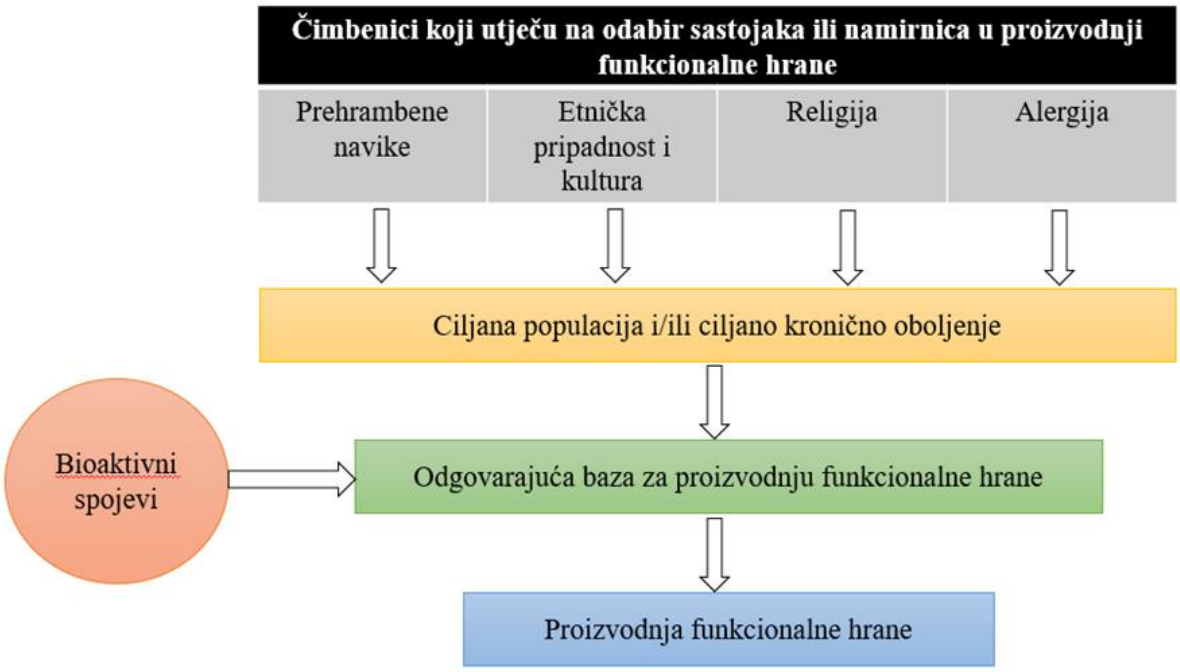
funkcionalna hrana nije lijek, ali je izvrsna preventiva za neke bolesti i pomoć u lijećenju (Chibisov i sur., 2019).

Danas u vremenu klimatskih promjena i sve većih izazova poput pandemije bolesti covid-19 (Lange, 2021; Murphy i sur., 2021; Agrimonti i sur., 2021) potrošaći su ti koji značajno doprinose kreiranju novih trendova u prehrambenoj industriji, pogotovo ako se uzme u obzir sve veća edukacija i osviještenost. Time dolazi do sve veće sklonosti za konzumacijom sigurne, svježe i prirodne hrane koja sadrži poželjne učinke na zdravlje. Iz tog razloga nužno je potrebna prilagodba prehrambene industrije, te ulaganja u razvoj proizvodnje funkcionalne hrane.

U budućnosti se očekuje značajan porast proizvodnje funkcionalne hrane širom svijeta, dok su danas od funkcionalne hrane na svjetskim tržištima najviše prisutni fermentirani mliječni proizvodi (povoljno utječu na probavni sustav), žitarice i proizvodi od žitarica (povoljno utječu na kardiovaskularna oboljenja), mliječni proizvodi poput maslaca koji prema istraživanjima imaju blagotvoran utjecaj na metabolizam kolesterola (Bogue i sur., 2016). Od bioaktivnih sastojaka za osiguranje funkcionalnosti hrane dodaju se, ili su prisutni probiotici i prebiotici, različiti antioksidansi, izolirani bioaktivni spojevi, polinezasićene masne kiseline, fitosteroli, biljni ekstrakti, ekstrakti agro-prehrambene industrije i drugo (Gómez i sur., 2019; Radivojac i sur., 2021). U svrhu integracije funkcionalnih dodataka u funkcionalnu hranu razvijaju se tehnolonije nanoinkapsulacije (Zhu i sur., 2020; Pateiro i sur., 2021, Pateiro i sur., 2020) i mikroinkapsulacije (Gómez i sur., 2018).

Na slici 1. prikazana je shema svih relevantnih čimbenika koje je potrebno razmotriti u proizvodnji funkcionalne hrane (Otunola i Martiryosan, 2021).

Slika 1. Shematski prikaz svih relevantnih čimbenika važnih u proizvodnji funkcionalne hrane (Otunola i Martiryosan, 2021)



Svježi plodovi voća i povrća imaju relativno nisku energetsku te visoku biološku vrijednost, stoga se mogu uvrstiti u dijetetske proizvode i funkcionalnu hranu. Danas se i neki voćni sokovi, primjerice proizvedeni od tzv. „supervoća“, mogu smatrati funkcionalnom hranom zbog svog izvornog kemijskog sastava. Pojam "supervoća" u posljednje je vrijeme dobio sve veću upotrebu i pozornost s marketinškom strategijom za promicanje zdravstvenih prednosti odabranih voćnih vrsta, koje možda ne uživaju status svjetske popularnosti u vidu konzumacije i/ili prerade (Chang i sur., 2018). To je dovelo do provedbe mnogih znanstvenih studija ovih vrijednih sirovina s ciljem identifikacije i kvantifikacije različitih skupina fitokemikalija. Liu i sur. (2021) ističu da voćne vrste koje se mogu ubrojiti u kategoriju "supervoća", u svom kemijskom sastavu uglavnom imaju povećanu količinu biološki aktivnih spojeva. Njima se pripisuje velik broj pozitivnih učinaka na zdravlje, stoga se pomnim odabirom polaznih sirovina, mogu ciljano formulirati novi funkcionalni proizvodi.

Prema važećem Pravilniku (NN 46/07, 84/08, 55/11, 48/2013) voćni sok se definira kao proizvod koji se proizvodi od jedne ili više vrsta tehnološki zrelog, svježeg ili ohlađenog voća pri čemu boja, aroma i okus moraju biti karakteristični za sirovinu od kojeg je sok proizveden. U novije vrijeme, s nedostatkom vremena i ubrzanim stilom života, potrošači sve više preferiraju svježe pripremljene, hladno prešane sokove od voća i povrća, kašaste teksture tj.

„ready–to drink“ proizvode ili *smoothie* napitke, koji zahvaljujući svom nutritivnom sastavu zamjenjuju obrok/e svježeg voća i povrća (Bebek Markovinović i sur., 2022). Ruxton i sur. (2006) u svom radu navode da svakodnevna konzumacija ovakvih proizvoda značajno doprinosi unosu vrijednih nutrijenata i biološki aktivnih komponenata, stoga ovi proizvodi imaju svoj doprinos u očuvanju vitalnosti i zdravlja. Osim sokova na bazi voća i povrća, sve više se konzumiraju i *smoothie* napitci, koji se mogu pripremati od cijelih plodova voća i povrća, baze voćnog soka (npr. soka od jabuke), jogurta, mlijeka, meda i drugih sastojaka.

2.2. *Smoothie* kao funkcionalni napitak

Pojam „funkcionalni napitak“ se može definirati kao napitak koji uz svoju nutritivnu i kalorijsku vrijednost ima i znanstveno dokazan pozitivan utjecaj na najmanje jednu (ali često i više) ciljanih funkcija u organizmu. Time se smanjuju rizici razvoja pojedinih bolesti. Najbitnije značajke funkcionalnih napitaka su da ima pozitivan utjecaj na fiziološke funkcije, da se može konzumirati kao dio uobičajene prehrane, te da se konzumacijom bioaktivnih tvari koje napitak sadrži može dokazano popraviti zdravstveno stanje organizma ili barem umanjiti potencijalni rizik za neke kronične ili akutne bolesti. Bitna stavka je da je sadržaj potpuno prirodan, te da su sve pojedine komponente sastava one koje se i inače prirodno mogu naći u tom napitku. Sve stavke moraju imati znastveno potvrđene i utemeljene tvrdnje (Roberfroid, 2000).

Voće i povrće su nužni dio uravnotežene zdrave prehrane s obzirom da su visokovrijedan izvor nutrijenata poput ugljikohidrata, minerala, te bioaktivnih tvari. Prema preporukama i smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) dnevno je potrebno konzumirati minimalno 400 g voća i povrća, što podrazumijeva 5 porcija ovih namirnica u danu (EC, 2020). Ipak, u svjetskoj populaciji zabilježen je deficit dnevnog unosa voća i povrća, što se povezuje s incidencijama rizika za različita oboljenja poput bolesti krvožilnog sustava i moždanog udara (Bursać Kovačević i sur., 2020, Borges i sur., 2010). Voće i povrće se najčešće konzumira u svježem obliku, no u ubrzanom životnom tempu, potrošači sve više posežu za proizvodima od voća i povrća koji bi osim nutritivnih i bioloških funkcija zadovoljili i relativno brzu i praktičnu konzumaciju, stoga je u ovoj kategoriji posebno popularan tzv. *smoothie* napitak. *Smoothie* napitak se najčešće priređuje postupcima brzog mehaničkog usitnjavanja i homogenizacije od kombinacije svježih plodova voća i povrća. U smootjie se dodatno dodaju tekući sastojci kao što su voda, sok i mlijeko. Podrijetlo mlijeka može biti životinjsko, ali danas je najčešće biljno (orašasti plodovi, riža i dr.), a karakterizirani su polutekućom konzistencijom i homogenošću teksture (Teleszko i sur., 2014). Zbog sve učestalije netolerancije na laktozu,

pojavu alergija ili novih trendova u vegetarijanskoj prehrani, sve više se istražuje upotreba nemliječnih nadomjestaka u *smoothie* napicima (Uzodinma i Ochulor., 2020).

Smatra se da zbog tehnologije proizvodnje, koja svu sirovinu prerađuje bez generiranja nusproizvoda, *smoothie* napici imaju veću nutritivnu, biološku i energetsku vrijednost u usporedbi sa klasičnim sokovima od voća i povrća (Bhardwaj i Pandey, 2011). Nadalje, utvrđeno je da *smoothie* napici imaju pozitivnu ulogu u prehrani zbog potencijalnog zdravstvenog benefita te da redovnom konzumacijom mogu osigurati povećani unos voća i povrća, posebice u mlađim dobnim skupinama (Sun-Waterhouse, 2011). Ciljanim kombiniranjem željenih vrsta voća i povrća definira se željena receptura *smoothie* napitka. Time se primjerice, neki možda manje poželjni okusi i/ili mirisi mogu prikriti te tako kreirati proizvod prihvatljive senzorske kakvoće (Ribeiro i sur., 2018). U

Tablica 1. su prikazane neke formulacije *smoothie* napitaka korištenih u različitim znanstvenim ispitivanjima.

Interes za *smoothie* napitke pojavio se neposredno po izumu električnih blendera koji su zbog izvedbe i cijene ubrzo postali pristupačni širem krugu potrošača. Prvi takav uređaj izumio je i patentirao u SAD-u 1922. godine S. Poplawski, s time da su se *smoothie* napici na tržištu u Americi pojavili četiri godine kasnije, pri čemu su sadržavali blendane cijele plodove naranče i drugih tajnih sastojaka koji su umanjili kiselost samog napitka. Šezdesetih godina prošlog stoljeća u SAD-u su se *smoothie* napitci mogli konzumirati i kupiti u *Juice-barovima* i trgovinama „zdravom hranom“, a od 1990. godine njihova proizvodnja i potrošnja širi se na cijeli svijet. Posebnu popularnost od 2004. godine uživaju tzv. „zeleni“ *smoothie* napitci čiju vrijednost su na tržištu ponajprije prepoznali vegetarijanci i vegani.

Iako *smoothie* napitci još nisu postali dio službene važeće legislative koja se u Europskoj Uniji odnosi na sokove i/ili proizvode od voća, danas je *smoothie* napitak postao standard zdravih prehrambenih navika širokih skupina potrošača, koji odabirom odgovarajućih receptura ciljano odabiru napitak za svoje individualne potrebe (Annonymus 1). Iz tog razloga je i proizvodnja *smoothie* napitaka u svijetu u stalnom porastu. Unazad nekoliko godina to je segment industrije koji pokazuje najveću stopu rasta na globalnoj razini (Morales-de la Peña i sur., 2016).

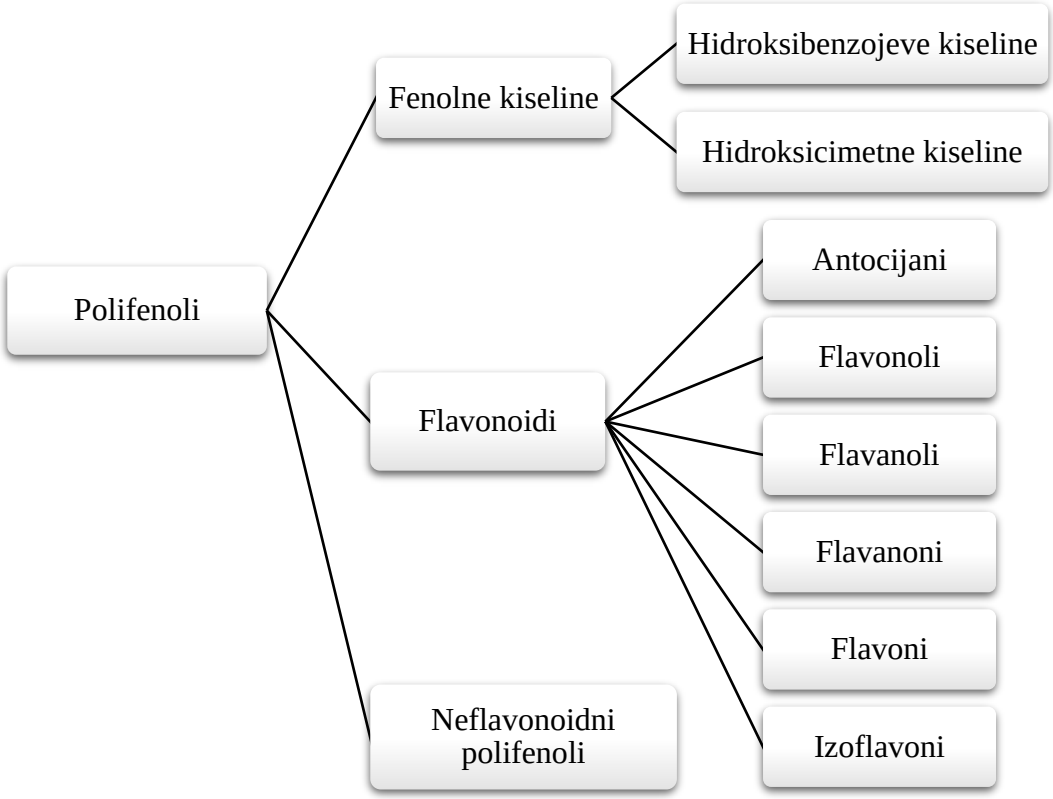
Tablica 1. Pregled formulacija *smoothie* napitaka na bazi voća i povrća u znanstvenim istraživanjima

Voće i povrće	% sadržaja	Mliječna komponenta i ostali sastojci	Referenca
Sok od naranče Jabuka Mrkva List repe Stabljika repe	59 15 15 6 5	-	Nieva i sur. (2022)
Banana Jagoda Palma *Euterpe edulis*	40 40 20	-	Ribeiro i sur., 2020
Naranča Jabuka Mrkva Repa	59 15 15 11	-	Fernandez i sur., 2019a
Jabuka Mrkva Tikvica Bundeva Poriluk	20 20 20 15 5	Citrusni pektin - 20 % Sol - 0,1 %	Hurtado i sur., 2019
Naranča i jagoda Jabuka Zlatni delišes Banana, crno grožđe i kupina Ribiz, crveni Grožđe, bijelo Limun	40 16 10 7 5 2	-	Hurtado i sur., 2016
Naranča Papaja Dinja Mrkva	50 13,5 13,5 13	Obrano mlijeko - 10 %	Andres i sur., 2016b
Naranča Papaja Dinja Mrkva	50 13,5 13,5 13	Sojino mlijeko 10 %	Andrés i sur., 2016a
Limun Rajčica Zelena paprika Celer Krastavac Luk Mrkva	1,7 33 17 8,5 4 4 4	Morska sol - 1,7 % Maslinovo ulje - 0,8 % Voda – ostatak do 100 %	Barba i sur., 2010
Šljiva Trešnja Bijelo grožđe Kupina Rajčica	31 26 20 5 8	Aloe vera 10 %	Di Cagno i sur., 2011
Kivi Bijelo grožđe Papaja Špinat Komorač	40 20 15 8 7	Aloe vera 10 %	Di Cagno i sur., 2011

Sukladno trendovima tržišta, između ostalih cilj prehrambene industrije je staviti na tržište proizvode koje će potrošači asocirati s minimalno obrađenim ili neobrađenim, tj. svježim oblicima voća ili povrća. Tako dobiveni proizvodi su daleko bolja alternativa u usporedbi sa dosad najčešće konzumiranim na tržištu dostupnim konvencionalno obrađenim proizvodima na bazi povrća ili voća poput sokova i želiranih proizvoda koji su konzervirani toplinskim postupkom pasterizacije ili sterilizacije. Posljedice visokih temperatura (>70 °C) tijekom obrade najčešće su negativan utjecaj na senzorska obilježja te nutritivnu kvalitetu dobivenih sokova ili smoothieja (Bursać Kovačević i sur., 2015; Bursać, 2007). Iz tog razloga najveći industrijski problem u proizvodnji *smoothie* napitaka odnosi se na zadržavanje originalne kvalitete nakon same obrade, te kvalitete i stabilnosti tijekom skladištenja, iz razloga jer su ovi proizvodi zbog svog kemijskog sastava vrlo lako podložni zagađenju i širenju mikroorganizama, te potencijalnoj enzimskoj aktivaciji koja može uzrokovati oksidaciju i kvarenje (Hurtado i sur., 2019).

2.3. Bioaktivni potencijal *smoothie* napitaka

Smoothie napici su izvor širokog spektra bioaktivnih spojeva, bilo da su prirodno prisutni u sirovinama od kojih su pripremljeni ili da su dodani kao funkcionalne zamjene. Bioaktivni spojevi predstavljaju produkt sekundarnog biljnog metabolizma te imaju jasan terapeutski potencijal. Polifenolni spojevi i karotenoidi su glavne fitokemikalije prisutne u voću i povrću, koje se odnose na ljudsko zdravlje (Singh i sur., 2015). Polifenoli su glavni sudionici biokemijskih promjena do kojih dolazi za vrijeme zrenja ili dozrijevanja voća (Lorenzo i sur., 2020). Biljke polifenole sintetiziraju za vrijeme svojeg prirodnog razvoja kao primarni odgovor na negativne ili nepovoljne uvjete poput infekcija, različitih oštećenja i ultraljubičastog zračenja. Također su ključni u mehanizmima stvaranja boje, arome te okusa koji su svojstveni za pojedinu biljnu vrstu. Zbog svojih karakteristika polifenolni spojevi posljedično su uključeni u sve prirodne procese (bilo poželjne ili nepoželjne) koji se odvijaju tijekom obrade svježeg povrća i voća. Polifenolni spojevi široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu sa više od 8000 različitih kemijskih struktura (slika 2.), a mogu se nalaziti u obliku jednostavnih molekula poput fenolnih kiselina, sve do različitih kompleksnih polimeriziranih spojeva. Najveću skupinu polifenola čine flavonoidi koji su ujedno i najzastupljeniji u prehrani ljudi.

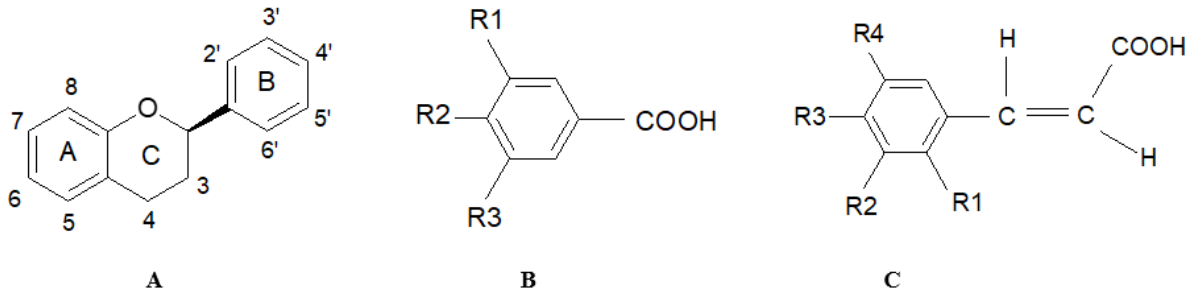


Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (prerađeno prema De la Rosa i sur., 2019)

Fenolni spojevi su prema svojoj osnovoj strukturi sastavljeni od aromatskog prstena na kojeg su najčešće direktno vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Panche i sur, 2016). S obzirom na njihovu relativno kompleksnu kemijsku građu, dijele se na flavonoide i fenolne kiseline (neflavonoide). Od neflavonoida su najzastupljenije hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiseline te njihovi derivati (slika 3.).

Flavonoidi su polifenolni spojevi s najvećim udjelom u voću i povrću. sastoje se od dva, oznaka A i B benzenskih prstenov koji su spojeni putem C prstena (centralni piranski prsten) koji u sebi sadrži kisik. Fenolne kiseline sastoje se od fenilne skupine koja je zamijenjena karboksilnom skupinom, te barem jednom ili više hidroksilnih grupa. Razlike do kojih dolazi kod pojedinih flavonoidnih podgrupa nastaju zbog razlike u rasporedu i broju hidroksilnih (OH)

grupa. Prema De la Rosi i sur., 2019. važne razlike su i stupanj nezasićenosti, te stupanj oksidacije centralnog prstena, kao i priroda te stupanj alkilacije ili glikozidacije.



Slika 3. Struktura (A) flavonoida, (B) hidroksibenzojevih i (C) hidroksicimetnih kiselina (prema De la Rosa i sur., 2019).

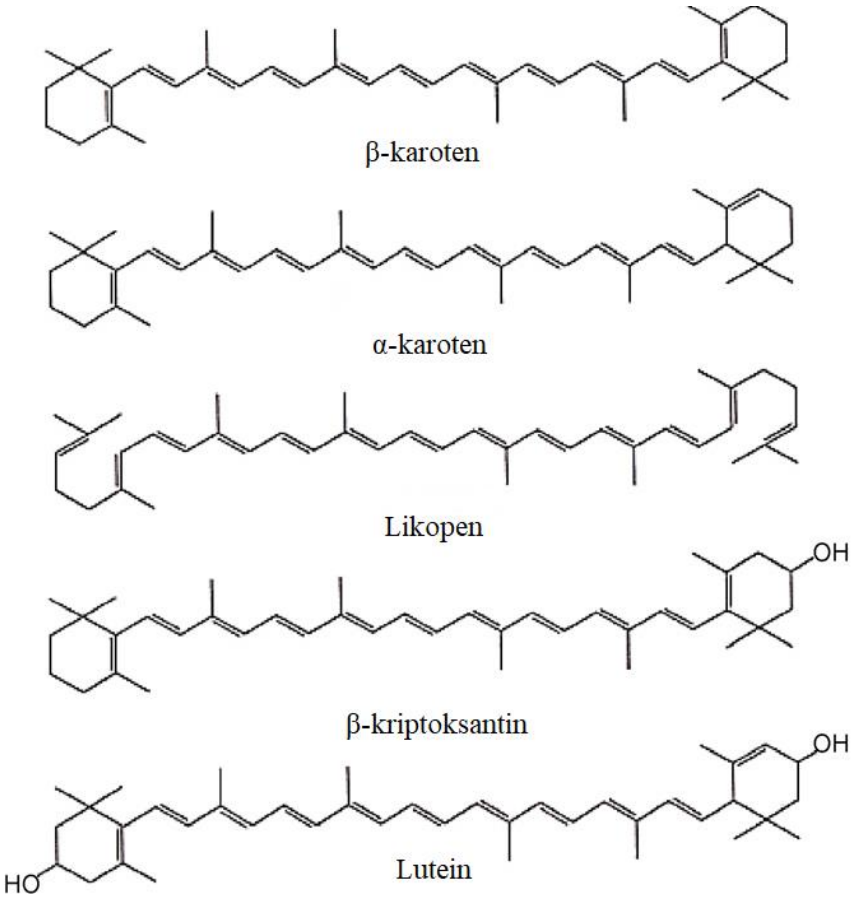
Polifenolni spojevi su najvažniji antioksidansi u ljudskoj prehrani pri čemu se dnevno kroz konumaciju hrame konzumira približno 1 gram raznih polifenola. To predstavlja znatno veći unos u usporedbi s drugim antioksidansima prisutnim u svakodnevnoj prehrani (Scalbert i sur., 2005). Pored antioksidacijskog, do danas su dokazana i brojna druga pozitivna djelovanja polifenola poput antiinflamatornog, antimikrobnog, antifungalnog, diuretičkog, antihipertenzivnog, antiaritmičnog, spazmolitičkog, antikoagulirajućeg, kardiotoničnog, antialergijskog, analgetskog, antihepatotoksičnog, antimalaričnog i hipoglikemijskog (Cori i sur., 2018; Grosso, 2018; Stevenson i Hurst, 2007). Antioksidacijsko djelovanje polifenola direktno je povezano i posljedica je njihove aromatske strukture. Zahvaljujući takvoj strukturi zbog delokalizacije elektrona istovremeno je prisutan veći broj oblika koji su u rezonanciji, dok OH (hidroksilne) skupine mogu lako donirati vodikove atome ili elektrone. Tim mehanizmom posljedično dolazi do inaktivacije štetnih tvari u organizmu poput slobodnih radikala (Gebicki i Nauser, 2021).

Karotenoidi su druga najbrojnija skupina bioaktivnih spojeva u voću i povrću te su nosioci žutih, narančastih i crvenih obojenja. Ubrajaju se u tetraterpene, derivate izoprena koji su sastavljeni od osam simetrično smještenih izoprenskih jedinica u odnosu na središte molekule te svi karotenoidi sadrže 40 ugljikovih atoma. Postoji preko 1100 poznatih karotenoida koji se mogu dalje kategorizirati u dvije klase:

(1) ksantofili (koji sadrže kisik), kao što su astaksantin, lutein, zeaksantin

(2) karoteni (koji su isključivo ugljikovodici i ne sadrže kisik), poput likopena, α-karotena i β-karotena (Slika 4.).

Svojstva karotenoidnih pigmenata *in vitro* mogu se razlikovati od onih *in vivo* zbog interakcije s okolnim supstituentima koji okružuju pigmente (npr. lipidima i proteinima) (Perera i Yen, 2007).



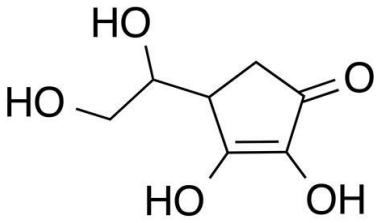
Slika 4. Prikaz struktura karotena i ksantofila.

Pokazano je da kuhanje i mehanička homogenizacija mogu povećati bioraspoloživost karotenoida, a mehanizam kojim se to odvija najvjerojatnije je posljedica oslobađanja karotenoida iz matrice hrane i iz proteinskih kompleksa (Hof i sur., 1999; Rock i sur., 1998).

Karotenoidi su poput polifenola antioksidansi, no za razliku od polifenola, oni su hvatači singletnog kisika te najčešće djeluju sinergijski sa drugim prisutnim antioksidansima, što je i pokazano da značajno doprinosi njihovoj učinkovitosti (Stahl i Sies, 2003). Rezultati brojnih epidemioloških istraživanja su potvrdila povezanost prehrane bogate karotenoidima sa

umanjenjem rizika od raznih degenerativnih poremećaja, uključujući bolesti krvožilnog sustava, oftalmoloških problema poput očne mrene i degradacije makule, te također i nekih kancerogenih stanja (Perera i Yen, 2007; Zare i sur., 2021).

Askorbinska kiselina, kao vitamin C u reduciranom obliku vrlo lako predaje dva atoma vodika s elektronima, pri ćemu prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu (oksidirani oblik) koja nema antioksidacijsko svojstvo vitamina, stoga se pod pojmom vitamina C podrazumijevaju i askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina. Prema Martiju i sur., 2001 zbog antioksidacijskih svojstava često se dodaje u prehrambene proizvode kao konzervans E300, jer sprječava enzimske promjene poput promjene boje u smeđu, a dodatno još doprinosi preporučenom dnevnom unosu vitamina C u namirnici.



Slika 5. Struktura askorbinske kiseline.

S obzirom da ljudsko tijelo nije sposobno samostalno sintetizirati vitamin C, kako bi se održala optimalna razina u organizmu potreban je gotovo svakodnevni unos. Preporučen dnevni unos je oko 80 do 110 mg, ovisno o dobi, spolu i drugim varijablama. S obzirom da se najveći udio vitamina C može naći u voću i povrću, *smoothie* napici mogu biti značajan izvor ovog vitamina, no njegova stabilnost značajno ovisi o načinu obrade (Mieszczakovska – Frac i sur., 2021). Uredbom omisije Europske Unije utvrđen je popis svih trenutno dokazanih zdravstvenih tvrdnji koje se smiju navesti uz hranu, pri čemu je za vitamin C dopušteno koristiti 15 znanstveno potvrđenih zdravstvenih tvrdnji. To je više nego za bilo koji drugi vitamin, te primjerice obuhvaća tvrdnje da doprinosi održavanju normalne funkcije imunološkog sustava, doprinosi stvaranju kolagena za normalnu funkciju hrskavice, kože, desni, kostiju, krvnih žila, te zubiju. Vitamin C također doprinosi normalnom metabolizmu, funkcioniranju živčanog sustava, psihološkoj funkciji i imunološkom sustavu. Također doprinosi zaštiti stanica od oksidativnog stresa, smanjenju umora, te poboljšava apsorpciju željeza i regeneraciju vitamina E (Anonymus, EU 432/2012). Prosječno najveća količina vitamina C u voću može se naći u crnom ribizlu (oko 180 mg /100 g), zatim kiviju i dr. Jabuke kao sastojak *smoothie* napitaka

nisu izrazito značajan izvor vitamina C s prosjekom od 4,5 mg/100 g, dok indijanske banane (paw-paw) sadrže oko 18 mg/100 g, te aronija oko 21 mg/100 g. Povrće je također bogato L-askorbinskom kiselinom, pri čemu prednjače zelene čili paprike s 242 mg/100 g, a mrkva kao sastojak ispitivanih *smoothie* napitaka prosječno oko 5,9 mg/100 g. Istraživanja vezana uz biodostupnost vitamina C pokazala su da se korištenjem netoplinskih tehnologija koje se intenzivno razvijaju zadnjih godina, u usporedbi s konvencionalnom toplinskom pasterizacijom, dobivaju značajno kvalitetniji proizvodi na bazi voća i povrća, poput sokova i *smoothie* napitaka, u vidu bolje očuvanosti vitamina C u usporedbi s konvecionalnim toplinskim potupcima. Tehnologije poput obrade visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka visokog intenziteta, te pulsirajućeg električnog polja pokazale su dobre rezultate u očuvanju bioaktivnih tvari, pa tako i vitamina C, u različitim proizvodima od voća i povrća, pri čemu je osigurana zdravstvena, tj. mikrobiološka ispravnost gotovih proizvoda uz produžen rok trajanja (Milić i sur., 2022; Pavlić i sur., 2021).

2.4. Nutritivni potencijal *smoothie* napitaka

U industrijskoj proizvodnji *smoothieja* koristi se kombinacija različitih vrste voća i povrća. Na temelju nutritivnog sastava i biološkog potencijala pojedinog voća ili povrća, vrlo lako se mogu dizajnirati funkcionalni napici koji će biti odličan izvor više vrsta vitamina, minerala, te raznih bioaktivnih i ostalih kemijskih spojeva koji posjeduju potencijalno efektivan učinak na zdravstveno stanje ljudskog organizma. U istraživanju su za pripremu *smoothie* napitaka na temelju preliminarnih istraživanja i anketa senzorske analize odabrane jabuka, aronija i indijanska banana od voća i mrkva od povrća, te bademov napitak. Stoga je u ovom radu razmatran njihov nutritivni potencijal kao sastojaka *smoothie* napitaka.

2.4.1. Jabuka (*Malus domestica* L.) u prehrani

Jabuka je prema tržišnom udjelu najpopularnija voćna vrsta u Europi, a zbog svoje otpornosti i prilagodljivosti na uvjete, uzgaja se u čitavom svijetu. Prosječna konzumacija jabuka po glavi stanovnika u Europi, od 2003. do 2005. godine, je iznosila 61 g dnevno, što predstavlja četvrtinu ukupne potrošnje voća u Europi. Kemijski sastav ploda jabuke promjenjiv je i najviše ovisi o faktorima kao što su na primjer vrsta sorte, klimatske prilike, podneblje u kojem se uzgaja, te uvjeti skladištenja, pri čemu je izravno povezan s prehrambenom vrijednošću jabuke. Za jabuke je su kvantitativne i kvalitativne analize utvrdile da imaju

značajno viši udio slobodnih fenolnih spojeva (272,1 mg na 100 g, oko 92 %) u odnosu na vezane fenolne spojeve (24,3 mg na 100 g, oko 8 %) što značajno doprinosi njihovoj biološkoj vrijednosti (Sun i sur., 2002). Plodovi jabuke sadrže velike količine derivata hidroksicimetnih kiselina (Nicolas i sur., 1994). Među njima se nalazi i klorogenska kiselina koja se ističe kao komponenta s najvećim udjelom prema kvantitativnim analizama (Lancaster i Dougall, 1992), dok su u kori pretežno zastupljene različite flavonoidne skupine od kojih su najzastupljeniji flavan-3-oli (katehini, epikatehini i procijanidini), flavonoli (kvercetin-3-glikozidi), dihidrohalkoni (floridzin) te u kori crvenih jabuka antocijani (cijanidin 3-glikozid) (Guyot i sur., 1998).

Rezultati brojnih istraživanja su utvrdili da redovna konzumacija jabuka pozitivno djeluje u prevenciji kroničnih bolesti (Boyer i Liu, 2004). Fenolni spojevi se smatraju glavnim odrednicama pozitivnog utjecaja jabuka na zdravlje, poput prevencije astme i drugih plućnih bolesti, kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa tipa 2, prekomjerne tjelesne težine i karcinoma (Graziani i sur., 2005). Služe i kao prevencija neuroloških degenerativnih poremećaja (Spencer, 2010). Istraživanja *in vitro* na životinjama utvrdila su kako određeni sastojci jabuka mogu inhibirati proliferaciju stanica karcinoma te da imaju visoku antioksidacijsku aktivnost (Sun i sur., 2002; López-Pedrouso i sur., 2020), mogu sniziti razinu kolesterola u organizmu (Leontowicz i sur., 2002) i pokazalo se je da smanjuju oksidaciju lipida (Mayer i sur., 2001) i imaju potencijal i ulogu u snižavanju razine rizika od bolesti.

2.4.2. Svojstva mrkve (*Daucus carota L.*)

Kao jedna od važnijih kultura koja se uzgaja praktički u čitavom svijetu, mrkva sadrži relativno visoku koncentraciju karotenoida, posebno β-karotena. S obzirom na unos β-karotena u organizam, prema Kleinu i Rodriguez - Concepcionu, 2015. mrkva predstavlja osnovni izvor (pro)vitamina A u ljudskoj prehrani. Utvrđeno je da su pravilna prehrana i zadovoljavajući udio karotenoida izravno povezani sa manjim rizikom od više vrsta poremećaja, što uključuje i pojedine grupe karcinoma, oftalmološka oboljenja i probleme s krvožilnim sustavom (Stahl i Sies, 2003). U mrkvi je sa 60 % do 80 % najzastupljeniji karotenoid β-karoten. Slijedi α-karoten sa udjelom od 10 % do 40 % te na kraju lutein sa udjelom do 5 % (Chen i sur., 1995). U mrkvi su od polifenola pronađeni derivati hidroksicimetnih kiselina poput kafeinske te izoklorogenske i klorogenske kiseline, kao i glikozidi cijanidina. Također prema Sharma i sur., 2012 izvrstan izvor vitamina poput tiamina, riboflavina, folne kiseline, vitamina C te minerala kalija, kalcija,

željeza, fosfora i joda (Leja i sur., 1997). Promotri li se kemijski sastav mrkve, može se zaključiti da je najzastupljeniji sastojak voda (86–89 %), zatim ugljikohidrati (6.0–10.6 %), proteini (0.7–1.1 %), lipidi (0.2–0.5 %), i vlakna (1.2–2.8 %) (Nguyen i Nguyen, 2015).

Sok na bazi mrkve smatra se izvrsnim izvorom karotenoida, većinom α-karotena i β-karotena, a u manjim koncentracijama ζ-karoten, fitofluena, fitoena i luteina (Stinco i sur., 2019). Prema Sharma i sur., 2012. sadrži i polifenole poput kafeinske, izoklorogenske i klorogenske kiseline, te glikozide cijanidina. Mrkva u svom kemijskom sastavu također sadrži riboflavine, folnu kiselinu, vitamin C i tiamin.

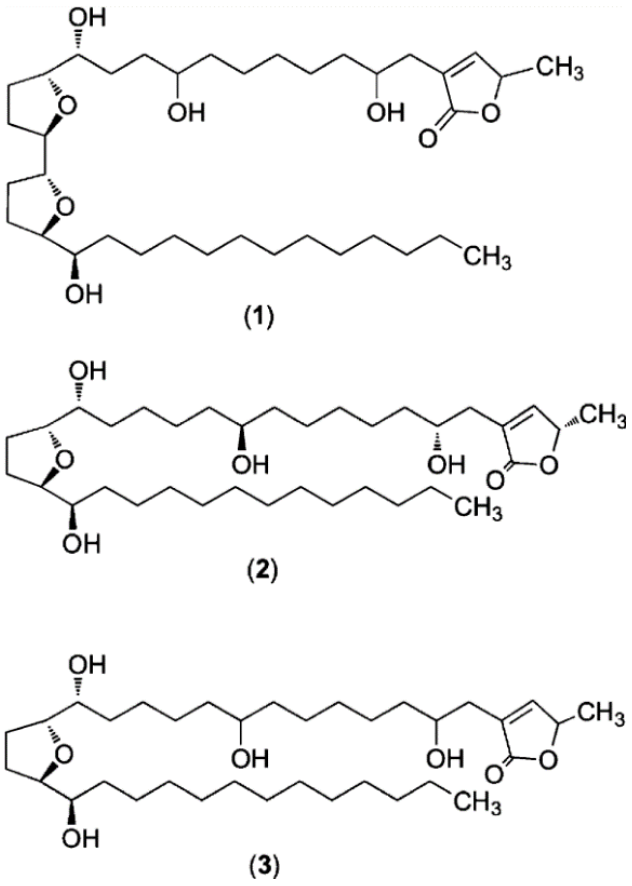
2.4.3. Svojstva aronije (*Aronia melanocarpa L.*)

Biljka podrijetlom iz Sjeverne Amerike, aronija se kao takva tek zadnjih stotinjak godina uzgaja i na tlu Europe. Aronija ima male bobice tamno plave boje. Zbog svog suhog, zemljanog i trpkog okusa koji su posljedica tanina i drugih tvari, rijetko se konzumiraju u neprerađenom obliku. Iz plodova aronije se iz tog razloga najčešće proizvode sokovi, voćni čajevi, sirupi, namazi, likeri, te dodaci prehrani (Chrubasik i sur., 2010).

U posljednje vrijeme aronija je privukla veliku pozornost potrošača i znanstvenih krugova kao namirnica sa iznimno visokim udjelom različitih fitokemikalija, čime ju mnogi svrstavaju u funkcionalnu hranu. Aroniji je bogat izvor fenolnih spojeva koji uključuju antocijane, fenolne kiseline, procijanidine i flavonolne glikozide (Lee i sur., 2014; Bursać Kovačević i sur., 2016.) te kao takva pokazuje antimutagena svojstva i može djelovati kao zaštitni faktor za jetru, s obzirom da prema istraživanjima smanjuju akumulaciju nekih teških metala poput kadmija (prema nekim istraživanjima i olova) u jetri i bubrezima. Aronija kao i ekstrakt aronihe također su se pokazali kao izvrsna preventiva karcinoma debelog crijeva u *in vitro* istraživanjima. Istovremeno smanjuju rizik od bolesti krvožilnog sustava (Kulling i Rawel, 2008). Istraživanja Valcheve – Kuzmanove i sur., 2013. i 2014. pokazala su da konzumiranje 10 mL po kg tjelesne mase soka od aronije tijekom 30 dana statistički značajno poboljšava sposobnost pamćenja i učenja kod štakora. Novija istraživanja poput Deneva i sur., 2019. su krenula u smjeru ispitivanja protuupalnih i antioksidacijskih učinaka polifenola koji se nalaze u aroniji. Istovremeno je dokazano da sok na bazi aronije dovodi do poboljšanja kognitivnih i lokomotornih funkcija u organizmu s obzirom na njegove neuroprotektivne karakteristike (Daskalova i sur., 2019). Konzumacija soka pozitivno korelira sa smanjenjem prekomjerne tjelesne težine (Kim i sur., 2018. i 2019.).

2.4.4. Svojstva indijanske banane (*Asimina triloba* L.)

Indijanska banana spada u tropsko voće izduženog, cilindričnog oblika. Maksimalne je dužine do 15 cm, te širine od 3 do 10 cm. Plod indijanske banane težak je između 200 do 400 g. Plodovi su u pravilu aromatičnog okusa, koji se najčešće doživljava kao tropska kombinacija okusa banane, manga i ananasa (Nam i sur., 2018a). Voće je bilo karakteristično za jugoistočni dio SAD–a. Boja pulpe koja predstavlja jestivi dio voća varira od bijele preko svijetlo žute sve do tamno narančaste. Kora, koja je nejestiva, u nezrelom obliku je zelene boje, dok prolaskom kroz sve faze dozrijevanja prelazi do smeđu ili čak crnu boje. Indijanska banana prema kemijskom sastavu sastoji se i od značajnih razina raznih fitokemikalija i spojeva karakterističnih za to voće. Pojedini sastojci kao i njihova kombinacija povezani su s pozitivnim zdravstvenim učincima. Istraživanja su potvrdila da je uz to bogata i polifenolima, vitaminom C, mineralnim tvarima poput kalija, kalcija i magnezija, zatim fosforom, bakrom i nizom drugih tvari poput željeza, cinka, mangana. Sadrži i riboflavin, niacin, esencijalne aminokiseline i druge tvari (Donno i sur., 2018). Razina antioksidanasa izuzetno je velika, pri čemu je usporediva s klasičnim tropskim voćem kao što su ananas ili banana (Kobayashi i sur., 2008). Istraživanja koja su proveli Nam i suradnici (2018a) otkrila su kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola, pri čemu se najviše ističu epikatehin, epigalokatehin, te *p*-kumarinska kiselina. Pokazalo se da ti spojevi mogu djelovati protuupalno i antikancerogeno, te da imaju antioksidacijska svojstva. Istovremeno u banani se nalaze i acetogenini, koji su derivati dugolančanih masnih kiselina. Pozitivna posljedica toga je istraživana i dokazana *in vitro* antimutagena i antikancerogena svojstva, i to u istraživanjima koja su obuhvaćala karcinome prostate, jetre, dojke, želuca i dr. (Nam i sur., 2018b) (Slika 6.). Istraživani su alternativni prehrambeni lijekovi i dijetetski proizvodi na bazi ekstrakta indijanske banane, te je utvrđeno da imaju antikancerogenu djelotvornost dokazanu na životinjskim modelima i u za sada malom broju kliničkih studija (Coothankandaswamy i sur., 2010).



Slika 6. Kemijske stukture 10-hidroksiglaukanetina (1), anonacina (2) i anonacina A (3) u indijanskoj banani (Coothankandaswamy i sur., 2010)

2.4.5. Bademov napitak u prehrani

Bademov napitak je emulzija tipa ulje u vodi. Na tržištu se pojavljuje kao alternativni napitak za potrošače koji su preosjetljivi na sastojke kravljeg mlijeka, netolerantni na laktozu ili jednostavno zbog stila prehrane konzumiraju isključivo napitke na biljnoj osnovi **(**Dhakal i sur., 2014). Zbog svojih jedinstvenih prehrambenih svojstava, poput uravnoteženog sastava u sadržaju proteina i masti, visokog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina i drugih korisnih biljnih spojeva poput vlakana, vitamina, antioksidansa i minerala, bademov napitak se promovira kao funkcionalna hrana. Biljni napitci općenito imaju pozitivne učinke na zdravlje zbog antioksidacijskog djelovanja i sastava masnih kiselina koje preventivno djeluju na smanjuje rizika od kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i dijabetesa (što je pokazalo istraživanje od Zujko i Witkowska, 2014.) te je također utvrđeno da umanjuju rizik od neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti (Jalali-Khanabadi i sur., 2010; Pistollato i sur., 2018).

2.5. Senzorska svojstva *smoothie* napitaka

Zbog brzog odgovora prehrambene industrije na sve veće zahtjeve tržišta, kontinuirano se dizajniraju i pojavljuju novi prehrambeni proizvodi, ili se uvode već poznati proizvodi sa nekim novim dodacima i/ili izmijenjenim svojstvima. Iz tog razloga potrebne su precizne i fleksibilne metode procjene, koje se mogu primijeniti ne samo u kontroli kvalitete proizvoda, već i u svrhu nekih drugih ispitivanja kao što su npr. razvoj novih proizvoda, utvrđivanje razlika između šarži te provedba analize tržišta kako bi se dobio odgovor kako će tržište odgovoriti na novi proizvod. Potreba objektivnih preciznih metoda za analizu hrane i potreba da se ispita i utvrdi kako će potrošači prihvatiti neki novi proizvod utjecale su na razvoj senzorskih testova i senzorike kao discipline općenito (Dijksterhuis i Piggott. 2001).

Senzorska procjena je prvi puta definirana 1975. godine, kada je u Institutu za prehrambenu tehnologiju objavljena kao znanstvena disciplina koja prema definiciji od Filajdića, 1988. potiče, mjeri, analizira i interpretira reakcije onih karakteristika hrane i tvari koje se zapažaju osjetilima vida, mirisa, okusa, dodira i sluha. Takva vrsta analize je iz tog razloga relativno novija znanstvena disciplina koja ima za cilj procijeniti one karakteristike nekon proizvoda koji dolazi u doticaj s ljudskim osjetilima. Uz to je za svaku ispitivanu karakteristiku bilo potrebno utvrditi izraze koji ju mogu identificirati i kvantificirati. U senzorska svojstva se ubrajaju izgled, miris, konzistencija, tekstura, okus i zvuk, a ispitati se tada mogli jedino ljudskim senzorskim organima. Danas je sva navedena svojstva moguće objektivno ispitati korištenjem instrumentalnih metoda poput analizatora teksture, zvuka, umjetnog nosa i dr. S obzirom da je kao i kod svake analize i u senzorskoj analizi nužno otkloniti svaku subjektivnost, minimalni uvjeti definiraju se preko ISO standarda. Uvjeti moraju osigurati ozbiljan, precizan i pouzdan rad prema ICS 67.240, u sklopu komiteta ISO/TC - 34 za poljoprivredno - prehrambene proizvode), te dodatno znanstvenog podkomiteta (Science committee SC12) za senzorsku analizu (Annonymus 2).

Postoji više različitih senzorskih testova za senzorsku procjenu proizvoda koji se u osnovi dijele na tri skupine prema vrsti informacija koje se mjere:

(1) Testovi razlika - u praksi svaki test dobiva karakterističan naziv (opći testovi razlika, testovi razlika u obilježjima), ali mogu se postaviti na različite načine

(2) Deskriptivni testovi - uključuju obučene paneliste (6-30 ljudi) koji procjenjuju proizvode po ocjeni intenziteta različitih karakteristika na ljestvici;

(3) Testovi sklonosti - testovi preferenci, i testovi prihvaćanja. Neovisno o vrsti testa koji se koristi za ispitivanje, pitanja koja se postavljaju ocjenjivačima moraju biti nedvosmislena, jasna i precizna. Potrebne su i dodatne informacije kako bi se omogućilo potpuno popunjavanje testa (Štefoković, 2000).

U senzorskoj procjeni funkcionalne hrane najčešće se primjenjuje metoda kvantitativne deskriptivne analize (eng. *Quantitative Descriptive Analysis*, *QDA*) (Pilli i Lopriore, 2018; Baiano i sur., 2012). Takva deskriptivna analiza nužno uključuje detektiranje i potpun opis svih kvalitativnih i kvantitativnih aspekata proizvoda. Analiza se provodi od strane panelista koji su utrenirani za specifičnu grupu prehrambenog proizvoda. Panelisti moraju biti uvježbani i educirani kako bi prepoznali i opisali ocjenjivano svojstvo nekog proizvoda, pri čemu također moraju naučiti razlikovati i ocijeniti intenzitet svakog pojedinog ispitivanog kvantitativnog svojstva. Kvalitativna gledišta su predstavljena vanjskim izgledom proizvoda, specifičnim svojstvima arome i okusa, teksturom koja se osjeća u ustima (*mouthfeel*) i specifična svojstva koja se osjete dodirom. Kvantitativna gledišta predstavljena su preko intenziteta svih prethodno navedenih parametara. Intenzitet nekog svojstva mjeri se raznim vrstama ljestvica. Neke od najčešće korištenih su hedonistička ljestvica, linijska ljestvica i ljestvica procjene jačine proizvoda (Lawless i Heyman, 1999). Pri završetku analize rezultati se prikupljaju od članova panela i statistički obrađuju, nakon čega se najčešće prikazuju u obliku radar dijagrama, često nazvanog i "paukovom mrežom" (eng. *spider web*). Panelisti ne smiju diskutirati o rezultatima, terminologiji ili samim uzorcima nakon završene analize (Rewell, 2008).

2.6. Reološka svojstva *smoothie* napitaka

Prema definiciji reologija je grana fizike koja se bavi proučavanjem deformacija i tečenja krutih i tekućih materijala podvrgnutih djelovanju sile. Reološka svojstva materijala koji se ispituju određuju se na temelju svojstva tećenja, tj. nastalih deformacija. (Lelas, 2006). Reologija u svim granama industrije, a posebno u prehrambenoj ima veliki značaj jer se pomoću nje definiraju i opisuju mehanička, tj. teksturna svojstva prehrambenih i drugih materijala. Ta svojstva izravno utječu na kakvoću sirovina, poluproizvoda i gotovih proizvoda u proizvodnji i kao takva podrazumijevaju složenu analizu većeg broja svojstava. Iz tog razloga ispituju se mehanička svojstva poput tvrdoće, čvrstoće, elastičnosti, rada, naprezanja, stabilnosti, dinamičke i kinematičke viskoznosti, te brojna druga (Stijepić i sur., 2011). Reološka svojstva proizvoda značajan su aspekt koji ukazuje na kvalitetu samog proizvoda i mogu se koristiti za

utvrđivanje stabilnosti. U vođenju procesa u prehrambenoj industriji vrlo važna je i mogućnost praćenja reoloških svojstava od samog ulaza, tj. sirovina, preko poluproizvoda do gotovih proizvoda. Takvim praćenjem je vrlo lako moguće prilagoditi pojedine tehnološke parametre i time utjecati na dobivanje proizvoda optimalne kvalitete uz minimalnu utrošenu energiju i minimalnu količinu otpada (Ergović, 2007). Reološka svojstva materijala koja se smatraju idealnim su plastičnost i elastičnost za krute i viskoznost za tekuće tvari. Plastičnost predstavlja svojstvo materijala da uslijed djelovanja neke vanjske sile mijenja oblik (dolazi do deformacije) i zadržava ga nakon prestanka djelovanja sile. Iz tog razloga nakon prestanka elastične i početka plastične deformacije dolazi do trajne deformacije materijala. Elastičnost je svojstvo čvrstih materijala da pod utjecajem neke vanjske sile mijenjaju oblik bez promjena u strukturi, sve do granice elastičnosti. Nakon prestanka djelovanja sile materijali koji su prošli samo elastičnu deformaciju vraćaju se u svoj početni oblik. Viskoznost pak predstavlja unutrašnje trenje u fluidnom materijalu (tekućine, plinovi i npr. neki amorfni materijali) koje je posljedica otpora tečenja fluida. Međutim, vrlo često namirnice ne pokazuju samo jedno od navedenih svojstava i ne ponašaju se idealno u skladu s matematičkom interpretacijom tih svojstava. Razlog tome je njihova kompleksna struktura i sastav te činjenica da na reološka svojstva utječu i brojni vanjski čimbenici kao što su pH, temperatura, brzina smicanja, tlak, primijenjena tehnološka metoda i dr. (McPherson i Gaonkar, 2005).

2.6.1. Utjecaj na reološka svojstva

Najvažniji faktori koji imaju utjecaj na reološka svojstva nekog materijala su osnovni kemijski sastav materijala, tehnološka operacija ili proces kojim je materijal dobiven, te temperatura na kojoj se materijal nalazi. Najznačajniji fizikalni faktor s najvećim utjecajem na reološka svojstva proizvoda jest temperatura. Naime, povišenje temperature kod većine plinova uzrokuje povećanje, dok kod tekućina uzrokuje smanjenje viskoznosti. Osim utjecaja na viskoznost, promjena temperature može dovesti do promjene reološkog karaktera. Primjeri su koncentrirani sok od limuna koji pri temperaturi od 7°C pokazuje plastična svojstva, a u rasponu od 22 °C do 50 °C pseudoplastična svojstva. Drugi primjer je 60 % - tna otopina šećera i želatine, koja pri sobnoj temperaturi od 20 °C pokazuje dilatantna svojstva. Spuštanjem temperature prema na 0 °C otopina počinje iskazivati pseudoplastična svojstva. Daljnjim spuštanjem temperatura do – 10 °C otopina pokazuje tiksotropna svojstva (Lelas, 2006). Brojne operacije u prehrambenoj tehnologiji uključuju postupke termičke obrade kao što su primjerice sterilizacija i pasterizacija. Iako je već naglašeno kako promjena temperature ima utjecaj na

konačan proizvod i njegova svojstva, valja napomenuti kako termička sterilizacija pojedinih početnih sirovina utječe na konačan proizvod. Tako primjerice pri sterilizaciji mlijeka, ukoliko su primijenjene više temperature njegova se viskoznost povećava kao posljedica denaturacije proteina, dok s druge strane, viskoznost jogurta kao konačnog proizvoda takvog mlijeka se smanjuje (Dutta i sur., 2006).

Reološka svojstva prehrambenih materijala izrazito ovise među ostalim i o tehnološkim operacijama koje se provode kod pripreme, načinu na kojem je provedeno konzerviranje i na kraju ovisi o uvjetima čuvanja poput temperature, tlaka i dr. Svojstva se mijenjaju također uslijed jediničnih operacija poput miješanja i homogenizacije, konvencionalne toplinske obrade (pasterizacija, sterilizacija), koncentriranja ili ugušćivanja, ekstrudiranja, zamrzavanja i dr. Prilikom miješanja, parametri poput brzine, trajanja ili temperature utječu na promjenu veza među molekulama te mogu utjecati na promjenu viskoznosti. Homogenizacija predstavlja tehnološku operaciju čiji je cilj povećanje stabilnosti različitih emulzija, tj. spriječiti izdvajanje masti iz različitih proizvoda na način da se usitne i ujednače globule mliječne masti. Prilikom proizvodnje majoneze ili mlijeka, homogenizacija uzrokuje povećanje viskoznosti, dok kod visokokoncentriranih sokova na bazi citrusa smanjuje viskoznost (Crandall i sur., 1988). Istraživanjima je utvrđeno da reološka svojstva ovise istovremeno o udjelu suhe tvari te o samom sastavu. Viskoznost fluida raste porastom količine krute tvari u istom proizvodu, npr. koncentriranjem ili ugušćivanjem. Međutim, pokazalo se da daleko najveći utjecaj na viskoznost prehrambenih materijala ima njihov kemijski sastav. Unutarnje trenje koje je posljedica djelovanja međumolekulskih sila poput vodikovih veza, van der Waalsovih sila i dr. izravno ovisi o jakosti privlačnih sila, te posljedično o obliku molekula i njihovoj veličini. S obzirom da su ulja građena od dugačkih nepolarnih lanaca ugljikovodika, ulje je iz tog razlog nužno viskoznije od npr. vode čije molekule su vrlo male i relativno kuglastog oblika. Iz istog razloga su razne otopine šećera sa manjom molarnom masom imaju proporcionalno manju viskoznost u usporedbi s šećerima koji imaju veću molarnu masu (Herceg, 2009).

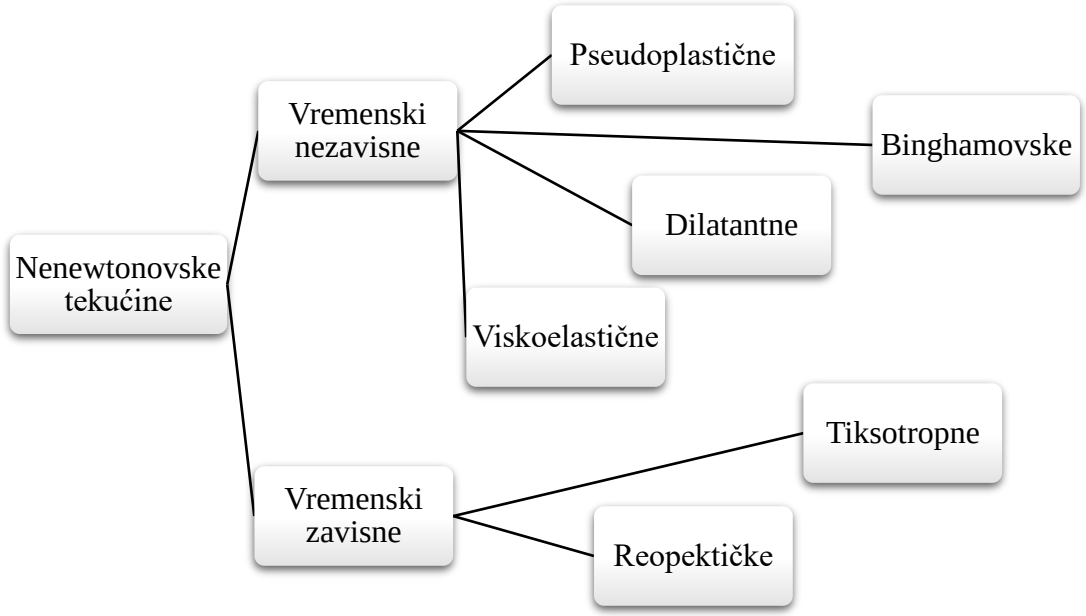
2.6.2. Viskoznost

Viskoznost ili unutarnje trenje u fluidu je osobina karakteristična za tekućine i plinove da pružaju otpor kretanju između njihovih pojedinih slojeva. Prema njutnovom zakonu tekućine kod kojih je odnos između smičnog naprezanja i smične brzine konstantan nazivaju su njutnovske tekućine, pri čemu se viskoznost takvih idealnih tekućina određuje izrazom:

$$\tau = \mu \cdot D \qquad (1)$$

Pri čemu je je τ smično naprezanje (Pa), μ koeficijent viskoznosti (Pa·s) a D brzina smicanja (s^{-1}).

Kod konstantnih uvjeta tlaka i temperature viskoznost je također konstantna veličina. Pri tome viskoznost nije ovisna o brzini smicanja niti o vremenu smicanja. Viskoznost njutnovskih tekućina ovisna je i mijenja se isključivo s promjenom temperature. Najčešći primjeri takvih fluida su voda, mlijeko i sl. Tekućine kod kojih se viskoznost mijenja sa promjenom brzine smicanja nazivaju se nenjutnovske tekućine. Viskoznost nenjutnovskih tekućina naziva se još i prividna viskoznost zbog toga što je kod svake smične brzine različita. Svojstva nenjutnovskih tekućina izražavaju se drugim pojmovima iz reologije koji preciznije i relativno jednostavnije određuju njihova reološka svojstva. To su koeficijent konzistencije i indeks tečenja. Primjeri takvih fluida su kečap, maslac, majoneza, jogurt i dr. (Hardi i sur., 2001).



Slika 7. Podjela nenewtonovskih tekućina

Utjecaj termičke obrade na viskoznost *smoothie* napitaka na bazi jabuka uočena je u istraživanju pasteriziranih *smoothie* napitaka u mikrovalnoj pećnici. Uzorci su bili okarakterizirani znatno većom viskoznošću od onih obrađenih klasičnom šaržnom pasterizacijom. To može biti pokazatelj ozbiljne termičke promjene tijekom primjene

mikrovalova (Osorio, Martinez-Navarette, Moraga i Carbonell, 2008.), što bi moglo biti potvrđeno najvećom razgradnjom askorbinske kiseline (Markowski i sur., 2016).

Obrada visokim hidrostatskim tlakom pokazala je određene učinke na viskoznost voćnih sokova. Više vrijednosti prividne viskoznosti određene su za sokove od naranče obrađene visokim tlakom u usporedbi s termički obrađenim, neposredno nakon obrade. Suspenzija narančine pulpe se značajno smanjila nakon primjene temperature i bila je izraženija nakon VHT obrade. Poznato je da VHT tretman smanjuje veličinu čestica, pretvarajući dio sedimentirajuće pulpe u koloidnu pulpu (Polydera i sur., 2003.). Međutim, drugi su autori otkrili da viskoznost mutnih i bistrih sokova nije pokazala značajnu promjenu u rasponu brzine smicanja između 4 i 63 s^{-1}, što sugerira da sokovi imaju karakteristike newtonovskih tekućina, odnosno da im se viskoznost mijenja samo promjenom temperature. Viskoznost mutnih sokova smanjena je za 32 – 67 %, u vremenu skladištenja od 1 do 6 mjeseci, na 4 °C. Rezultat je bio u skladu s prethodnim istraživanjima koje su proveli Hsu i sur. (2008.) u kojima je utvrđeno da da se viskoznost soka od rajčice tretiranog HHP tehnologijom pri 400 MPa tijekom 15 ili 30 min na 20 °C postupno smanjivala produljenjem vremena skladištenja na 4 °C. Smanjenje viskoznosti u zamućenim sokovima vjerojatno se pripisuje taloženju pulpe i razgradnji pektina. Istraženo je da se pektin može razgraditi enzimskom i neenzimskom razgradnjom (Sila i sur., 2009.). Isto tako, od strane Tomlin i sur., 2014. istraživan je učinak umjerene temperature između 42 °C – 62 °C pri tlakovima od 200 do 300 MPa na brzinu smanjenja viskoznosti otopine pektina. Utvrđeno je da se povećava s temperaturom maksimalno 0,096 $Pa^{-1}s^{-2}$ na 62 °C i maksimalno primijenjenih 300 MPa što predstavlja je oko 2,5 puta povećanje brzine smanjenja viskoznosti u odnosu na blaže uvjete obrade pri 45 °C i 0,1 MPa.

2.7. Netoplinske tehnologije u obradi proizvoda od voća i povrća

Zbog velike kompetitivnosti na tržištu i sve većih zahtjeva potrošaća, ukazala se potreba za kontinuiranim razvojem i ispitivanjem novih tehnologija obrade hrane. Takve tehnologije bi kao i konvencionalne morale osigurati sigurnost proizvoda i visoku nutritivnu vrijednost, te je poželjno da produže trajnost. Razvoj tehnologije i znanosti (pogotovo fizike) doveo je do ispitivanja potencijala primjene novih održivih netoplinskih tehnologija obrade (Putnik i Bursać Kovačević, 2021; Oms-Oliu i sur., 2012). U prehrambenoj industriji danas se najviše koriste klasične metode konzerviranja hrane od kojih su najzastupljenije metode toplinske pasterizacije i sterilizacije, metode konzerviranja hlađenjem, smrzavanjem, koncentriranjem i sušenjem.

Poznate su i metode konzerviranja biološkim putem (fermentacijom), kao i konzerviranje ionizirajućim zračenjem i mikrovalovima. S obzirom na sve veću potrebu za ekonomskim uštedama, ekološki prihvatljivijim procesima i visoku kvalitetu gotovih proizvoda, u novije vrijeme sve su više prisutne nove tehnologije obrade namirnica u prehrambenoj industriji. Popularno su nazvane netoplinske metode obrade jer se tijekom obrade primjenjuju relativno niske temperature koje ne utječu na promjenu fizikalno–kemijskih svojstava tako obrađenih proizvoda (Putnik i sur., 2019). Od spomenutih netoplinskih tehnologija kao prema Bursać Kovačević i sur., 2016 najperspektivnije su se pokazale i sve su zastupljenije tehnologija visokog hidrostatskog tlaka (eng. *High Pressure Processing, HPP*) koji je danas uz ultrazvuk visoke snage (*High Power Ultrasound, HPU*) najzastupljenija od novih tehnologija koje se koriste u prehrambenoj industriji. Među ostale netoplinske tehnologije koje se rijeđe koriste u industriji ili su još u fazi laboratorijskog ispitivanja spadaju pulsirajuće električno polje (eng. *Pulsed Electric Field, PEF*), hladna plazma (eng. *Cold Plasma, CP*), te visokonaponsko električno pražnjenj (eng. *High Voltage Electrical Discharge, HVED*), i dr. (Ježek i sur., 2017; Barba i sur., 2017; Kostelac i sur., 2020).

Primjena PEF tehnologije kao alternative pasterizaciji u obradi sokova na bazi voća i povrća pokazala se kao vrlo dobrom, te su prema Koubaa i sur., 2018 dobiveni iznimni rezultati u zadržavanju nutritivnih svojstava i organoleptičkih svojstava u povrtnim i voćnim sokovima tretiranim pulsnim električnim poljima (Gabrić i sur., 2018). Osnova tehnologije pulsnih električnih polja je korištenje brzih električnih pulseva (μs do ms) uz primjenu visokog napona (naponi od 20 do 50 $kVcm^{-1}$) na prehrambeni materijal koji se nalazi između elektroda. Kod PEF procesa osnovni parametri obrade su jakost električnog polja E koja se obično izražava u $kV\ m^{-1}$, zatim specifični unos energije ($kJ\ kg^{-1}$), frekvencija (Hz) i konačno oblik pulseva (pravokutni, kvadratni, sinusoidalni i dr.). Vrijeme tretiranja se računa kao broj primijenjenih pulseva na prehrambeni materijal umnožen s širinom odnosno trajanjem pojedinog pulsa). Primarna namjena PEF obrade je inaktivacija mikroogranizama do koje dolazi kao zbog razlike električnog potencijala unutar i izvan stanice, odnosno razlike u električnom potencijalu kroz membranu stanice. Svaki mikroorganizam ima određenu toleranciju prema razlici električnog potencijala, no kad se prijeđe određena kritična vrijednost dolazi do elektroporacije, tj. ireverzibilne promjene u strukturi stanične membrane čime se mikrobna stanica inaktivira (Barbosa-Canovas, 1998). Ipak, za slučaj da intenzitet PEF obrade ne uspije narušiti integritet većeg broja staničnih membrana prisutnih mikroorganizama, doći će do reverzibilne elektroporacije. Istraživanja su pokazala rekuperacijski potencijal mikroorganizma koji se u

praksi mogu oporaviti od takve polovične inaktivacije i da sama tehnologija pulsnih električnih polja često sama za sebe nije dovoljna za osiguravanje mikrobiološke ispravnosti prehrambenog materijala. Iz tog razloga se PEF tehnologija najčešće kombinira s drugim netoplinskim tehnologijama u tzv. „tehnologiji preprekama“ (eng. *Hurdle Concept*), čime se sinergijom dvaju ili više različitih faktora djelovanja osigura zdravstvena ispravnost i produljuje rok trajanja prehrambenog materijala (Putnik i sur., 2020).

Ultrazvuk visoke snage može se koristiti kao alternativa pasterizaciji ali ima veliki potencijal kao zamjena i za druge jedinične operacije u prehrambenoj industriji, pogotovo u obradi tekućih i polutekućih prehrambenih materijala poput voćnih i povrtnih sokova te smoothieja. Akustična energija koju stvara ultrazvučni uređaj velikom brzinom propagira kroz medij, te se gotovo istovremeno širi kroz cijeli volumen soka. Time se istovremeno obrađuje cijeli volumen materijala, a istovremeno se i značajno skraćuje potrebno vrijeme obrade. Pored toga, u usporedbi s konvencionalnim metodama poput toplinske pasterizacije, daleko niža potrošnja energije i isključivanje potrebe za zagrijavanjem materijala čini ovu metodu pogodnom za primjenu u prehrambenoj industriji, pogotovo u svijetlu održivosti i drugih postulata Industrije 4.0 (Tiwari, 2015). Pri obradi sokova ultrazvuk visoke snage proizvodi ultrazvučne valove visokog intenziteta (u okvirima 10 do 1000 Wcm^{-2}) pri relativno frekvencijama za ultrazvuk (20 do 100 kHz), što je optimalno područje za stvaranje kavitacije. Velika snaga ultrazvučnih valova utječe na fizikalno-kemijske promjene u soku te ujedno dovodi do inaktivacije mikroorganizama i enzima (Swamy i sur., 2018). Prolaskom ultrazvučnih valova kroz tekući ili polutekući medij dolazi do naglog opadanja i porasta tlaka u korelaciji s frekvencijom ultrazvuka, te do formiranja ekspanzijskih vrtloga u kojima dolazi do nastanka i rasta mikroskopski sitnih mjehurića. Nakon postizanja kritičnih vrijednosti dolazi do implozije mjehurića, što je poznato kao fenomen ili pojava kavitacije (Mason, 2003). Tijekom raspada tako nastalog velikog broja kavitacijskih mjehurića lokalno se oslobađaju visoki tlakovi i temperature, te ako se taj raspad dogodi unutar ili oko stanice mikroba stvoriti će se gradijent tlaka koji će mehanički oštetiti stanicu. Tijekom HPU obrade dolazi i do stvaranja velike količine slobodnih radikala koji također utječu na dezintegraciju mikrobne stanične stijenke (Swamy i sur., 2018). Ipak, ultrazvučni valovi često ne mogu inaktivirati bakterijske spore, stoga se i ova tehnologija obično kombinira s drugim toplinskim ili češće netoplinskom tehnologijama kako bi se ostvario sinergijski učinak inaktivacije mikroorganizama (Condon-Abanto i sur., 2016). Proces se često odvija tako da korištenjem blage topline (40-ak ^{o}C) dolazi do razvoja spora u bakterijski oblik u kojem ih je daleko lakše

inaktivirati ultrazvukom. Glavni nedostaci zamijećeni po provedenoj HPU obradi voćnih sokova odnose se na degradaciju kvalitete proizvoda bilo u nutritivnom ili biološkom smislu. Neka istraživanja poput Ordonez-Santosa i sur., 2017. sugeriraju da se primjenom ove tehnologije mogu proizvesti mikrobiološki stabilni voćni sokovi sa zadržanim bioaktivnim spojevima i poboljšanom bioraspoloživošću (Margean i sur., 2020). Najvažniji procesni parametri koji se u industrijskim ili laboratorijskim istraživanjima optimiraju kod obrade voćnih sokova ultrazvukom su snaga (*P*, W) ultrazvuka (ili intenzitet, *I*, Wm^{-2}), frekvencija (*f*, Hz), promjer ultrazvučne sonde (*d*, mm), amplituda (*A*, 0 – 100 %), vrijeme obrade (*t*, s) i temperatura (*T*, ^{o}C) (Swamy i sur., 2018).

Plazma se uz čvrsto, tekuće i plinovito smatra četvrtim stanjem tvari. Poput plina, nema strogo definiran oblik i posljedično volumen, osim u slučaju ograničavanja volumena korištenjem neke vrste zatvorene posude (Chu i Lu, 2014). Kao stanje tvari prema istraživanjima Schlütera 2013. sastavljeno je od nabijenih čestica poput slobodnih elektrona i pozitivnih iona, te nenabijenih neutralnih čestica. Iz tog razloga opisuje se prema više faktora poput temperature, stupnja ionizacije, termodinamičke ravnoteže i drugim faktorima (Chu i Lu, 2014). Ako gledamo faktor temperature, plazma se može podijeliti na hladnu i vruću. Vruća plazma se nalazi u stanju termodinamičke ravnoteže, pri čemu je temperatura svih čestica koje se nalaze u njoj (iona, elektrona i neutralnih čestica) jednaka. Za razliku od vruće, hladna plama nije u ravnoteži, te je za nju karakteristično da je temperatura elektrona daleko viša od temperatura iona i neutralnih čestica (iz tog razloga je prozvana hladnom).

U prehrambenoj industriji tehnologija je u završnim fazama ispitivanja, a o njenim mogućnostima korištenja u prehrambenoj industriji, posebice u primjeni u obradi voćnih sokova provode se mnoga istraživanja. Do sada je u istraživanjima dokazana njezina visoka i brza učinkovitost u inhibiciji ili poptunoj inaktivaciji raznih sojeva mikroorganizama, naročito kao postupak suhe dezinfekcije površine hrane poput svježeg voća ili za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala, gdje toplinske metode nisu neprimjenjive (Schlüter, 2013). Rezultati nekih istraživanja poput Bursać Kovačević i sur., 2016a, navode da je u voćnim i povrtnim proizvodima došlo do porasta koncentracije nekih bioaktivnih spojeva nakon obrade hladnom plazmom u usporedbi s kontrolnim netretiranim uzorcima, što su autori pojasnili utjecajem hladne plazme na dezintegraciju staničnih stijenki voćnog tkiva i pospješenom ekstrakcijom bioaktivnih spojeva (Bursać Kovačević i sur., 2016b).

Obrada visokim hidrostatskim tlakom trenutno je najefikasnija netoplinska tehnologija koja se uz ustale procese u prehrambenoj industriji koristi i za pasterizaciju odnosno konzerviranje hrane. S obzirom da prehrambeni materijali koji se obrađuju korištenjem VHT tehnologije mogu imati različite konzistencije (npr. polučvrsti, čvrsti, tekući i dr.) sve dok sadrže određen minimalni udio vode (obično iznad 10 %) mogu se uspješno obrađivati. Materijali koji obrađuju prije tretmana se pakiraju, vakuumiraju i potom postavljaju u uređaj te obrađuju visokim hidrostatskim tlakovima od obično 300 do 600 MPa u industriji, ali je provedba trenutno moguća do tlakova od 1200 MPa. Učinkovitost ove tehnologije ovisi o vrijednostima tlaka, temperature, vremena i pH vrijednosti materijala koji se obrađuje (Roobab i sur., 2018). Uz značajni godišnji rast HPP tehnologije i sve veći udio na globalnom tržištu, voćni sokovi i napitci imaju najbrži rast ako se gleda HPP proizvodnja. Trenutno najveća prepreka širenju tehnologije su neka tehnološka ograničenja obrade visokim tlakom i relativno veliki investicijski troškovi za opremu (Putnik i sur., 2020).

2.8. Toplinske metode obrade proizvoda od voća i povrća

2.8.1. Pasterizacija

Najčešća operacija koja koristi toplinsku obradu za inaktivaciju mikroorganizama osjetljivih na toplinu i odgovornih za kvarenje i/ili trovanje hranom, poput kvasaca, plijesni i vegetativnih bakterija je konvencionalna toplinska pasterizacija (Petruzzi i sur., 2017). Uz korištenje za inaktivaciju mikroorganizama, pasterizacija se trenutno uspješno primjenjuje i za inaktivaciju enzima poput polifenol oksidaze i peroksidaze. Istraživanja i trenutna primjena pasterizacije primjenjuje se i na enzime poput pektinmetil esteraze te lipooksigenaze. Enzimi prisutni u voću i povrću obično nisu poželjni nakon obrade, s obzirom da njihove aktivnosti mogu izazvati oksidacijske promjene tijekom same obrade i skladištenja (Marszalek i sur., 2017). Stoga se inaktivacijom enzima toplinskom obradom sokovima može produžiti rok trajanja do nekoliko mjeseci, pri adekvatnim temperaturama skladištenja. Komercijalno se danas primjenjuju četiri različita tipa konvencionalne pasterizacije, koje se prema intenzitetu primijenjene toplinske obrade (Ağçam i sur., 2018) dijele na tretmane:

(i) HTLT; visoka temperatura - duže vrijeme (*High Temperature – Long Time)*,

(ii) HTST; visoka temperature - kratko vrijeme (*High Temperature – Short Time*),

(iii) MTLT; blaga temperatura - duže vrijeme (*Mild Temperature – Long Time*) i

(iv) MTST; blaga temperatura - kratko vrijeme (*Mild Temperature – Short Time*).

Najčešće korištena toplinska obrada sokova i napitaka na bazi voća i povrća je HTLT tretman ($T \geq 80$ °C pri $t > 30$ s) (Petruzzi i sur., 2017). Sokovi se tijekom ovog postupka griju na željenu temperaturu koja je u rasponu između 60 °C i 75 °C, uz vrijeme obrade od minimalno 30 min. Nakon završetka postupka bez promjena u temperaturi se ambalažiraju i zatvaraju čepom. U slijedećem koraku pasteriziraju se pri temperaturama u području od 84 °C do 88 °C u vremenu između 15 do maksimalno 45 minuta, da bi se u završnom koraku hladili na sobnu temperaturu. Primjenom HTST pasterizacije se u industriji pasterizira sok od jabuke, korištenjem relativno visokih temperatura u temperaturnom području između 95 °C do 98 °C kroz svega 15 do maksimalno 30 s (Renard i Maingonnat, 2012). Toplinska pasterizacija je danas prihvaćena kao tehnologija s najvišim stupnjem pouzdanosti kako bi se dobili zdravstveno ispravni proizvodi s znatno produljenim rokom trajanja (Bursać Kovačević i sur., 2019). Bez obzira na sve veći upliv novih netoplinskih tehnologija obrade, koje daju obećavajuće rezultate u obradi voćnih sokova i napitaka na bazi voća i povrća, kao što su ultraljubičasto zračenje, pulsno električno polje, ultrazvuk visokog intenziteta i visoki hidrostatski tlak toplinska obrada i dalje ima vodeće mjesto na tržištu, usprkos njezinim nedostacima po pitanju održivosti u potrošnji energije, stvaranju otpada i potrošnji vode, te posebno utjecaju na neke bioaktivne tvari (Putnik i sur., 2019; Gabrić i sur., 2017).

Pozitivan utjecaj pasterizacije na bioaktivne spojeve se može primijetiti kod poboljšanja ukupnog fenolnog sastava, ukupnih monomernih antocijana i flavonoida, sadržaja antocijana i fenolnih kiselina u soku od aronije (Bursać Kovačević i sur., 2016), kao i kod ukupne količine fenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina u ispitivanom soku na bazi mrkve (Dereli i sur., 2015). Ispitan je dokazan pozitivan utjecaj pasterizacije i na porast TOA (Total Antioxidant Capacity, Ukupni antioksidacijski kapacitet) soka od murve (Tomas i sur., 2015) Ovaj trend se tumači poboljšanom ekstrakcijom bioaktivnih spojeva iz voćnog tkiva koje je dezintegrirano uslijed toplinskog postupka (Bursać Kovačević i sur., 2016).

Rezultati brojnih istraživanja poput Vásquez-Caicedo i sur., 2007. o direktnom utjecaju termičke obrade na karotenoide pokazali su ponekad i suprotstavljene rezultate, no općenito se ističe da ovi spojevi ostaju stabilni tijekom toplinskog tretmana (Lee i Coates, 1999). U istraživcanju Dhuique – Mayer i sur. (2007) je utvrđeno da karoteni, sa gubitcima do 18 % nakon 15 minuta tretmana pri 55 °C, imaju veću toplinsku stabilnost od ksantofila koji pri istoj temperaturi, već nakon 15 min, osjetno brže degradiraju, s također značajnim gubitcima u rasponu između 30 % do ćak 60 %. Također, pasterizacija korištenjem visokih temperatura do

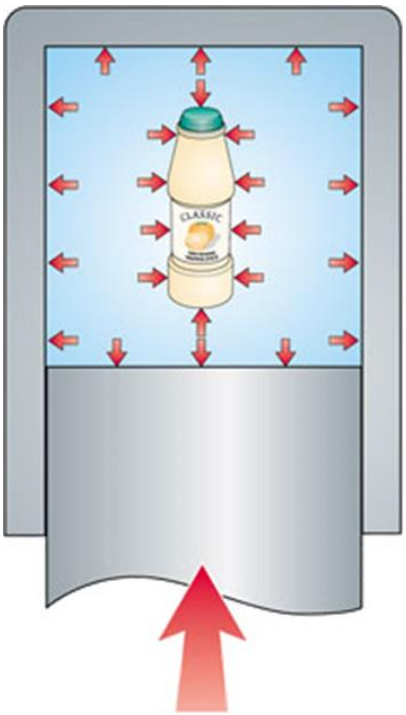
105 °C u vrlo kratkom trajanju od 10 s smanjuje sadržaj luteina za do 20 % i violaksantina za do 38 % zbog prisutnosti kisika u kemijskoj strukturi ksantofila, čime lakše oksidiraju pri višim temperaturama (Gama i de Sylos, 2007). Međutim, pasterizacija može imati i negativni utjecaj. Primjenom pasterizacije, odnosno toplinske obrade *smoothie* napitaka može doći do značajnih promjena u funkcionalnim svojstvima nekih termolabilnih bioaktivnih spojeva, a istovremeno i do promjena u organoleptičkim svojstvima, kao što su okus, miris i boja (Ribeiro i sur., 2020). Stoga se primjena inovativnih netoplinskih tehnologija, poput visokog hidrostatskog tlaka (VHT), sve više istražuje kao zamjena za toplinsku obradu u preradi sokova (Bevilacqua i sur., 2018).

Kao i za voćne sokove, obrada *smoothie* napitaka korištenjem povišene temperature, tj. toplinska obrade koristi se među ostalim i za inaktivaciju mikroorganizama, najčešće patogenih. Koristi se za istovremenu inaktivaciju enzima ili barem smanjenje njihove aktivnosti, čime se dobivaju zdravstveno ispravni proizvodi produljenog roka trajanja. Primjena toplinske obrade u *smoothie* napicima može, osim utjecaja na nutritivnu i biološku kvalitetu te narušavanja funkcionalnih svojstava proizvoda, također rezultirati i promjenama u senzorskim svojstvima poput boje i okusa. Keenan i sur. (2010), te druga istraživanja utvrdili su da su fenolni i drugi spojevi u *smoothie* napicima na bazi povrća i voća najosjetljiviji na obradu pri temperaturama od 70 °C, tijekom tretmana do 10 minuta pri čemu su prosječne koncentracije ukupnih fenola za tretirane uzorke bile niže (361 mg GAE (ekvivalenti galne kiseline) na 100 g) u usporedbi sa netretiranim tj. kontrolnim uzorcima (401 mg GAE na 100 g).

2.9. Tehnologija visokog hidrostatskog tlaka (VHT)

VHT primjenjuje tlakove između 100 MPa i 1000 MPa tijekom nekoliko sekundi ili minuta, najčešće pri sobnoj temperaturi, pri čemu učinkovito inaktivira mikrobnu aktivnost te osigurava denaturaciju enzima uz minimalne promjene u nutritivnoj i senzorskoj kakvoći (Elamin i sur., 2015). Obrada VHT-om se općenito gledano zasniva na više osnovnih fizikalnih principa, među kojima su izostatsko djelovanje (istovremena pojava iste razine tlaka u čitavom volumenu sustava), Le Chatelierovo načelo (promjena tlaka dovesti će do promjene u volumenu i/ili temperaturi sustava) i princip mikroskopskog uređenja. Osnovni princip izostatskog tlačenja se zasniva na svojstvu da primijenjeni tlak na neki sustav djeluje jednakom veličinom, istovremeno u svim elementarnim točkama, tj. u cijelom volumenu sustava koji se tlači. To je osnovni razlog zašto ne dolazi do drobljenja, lomljenja ili drugaćijeg oštećenja materijala koji ne sadrži zrak tijekom tretmana. Djelovanje iz tog razloga ne ovisi o veličini i obliku, te time

ni o volumenu materijala koji se obrađuje, što je velika prednost prema konvencionalnoj toplinskoj obradi u procesu pasterizacije, gdje se toplina ne širi kroz čitav prehrambeni materijal istovremeno, već su u namirnici najviše izloženi površinski slojevi (Dattaa i Deeth, 2018).



Slika 8. Izostatsko i kvazitrenutno djelovanje VHT-a na tretirani volumen

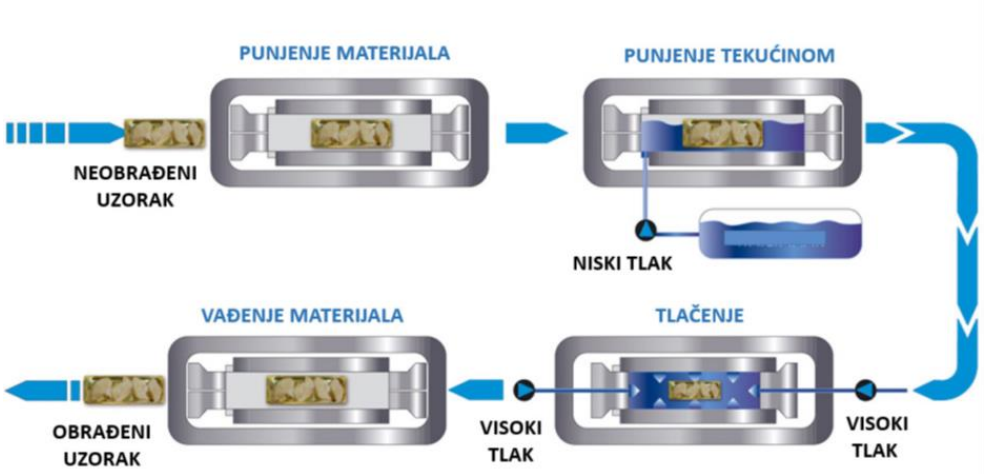
Djelovanje visokog tlaka na tlačnu tekućinu a time posredno i na uronjenu namirnicu koja se obrađuje uzrokuje promjenu volumena tekućine i same namirnice, što je posljedica Le Chatelierovog načela ili zakona. Zako govori da ako na sustav u termodinamičkoj ravnoteži djelujemo promjenom jedne od intenzivnih veličina, sustav će težiti prema minimiziranju te promjene. Iz tog razloga povećanjem tlaka u nekom sustavu, pospješuje se brzina isključivo određenih kemijskih reakcija i doprinosi se odvijanju fizikalnih promjena poput promjena faze koje nužno dovode do smanjenja volumena u sustavu. Te promjene se mogu odnositi na promjenu konformacije molekula, prelazak u drugu fazu (npr. plinovito u tekuće) ili kemijsku reakciju. Izuzev navedenih reakcija koje teže uravnoteženju sustava, sve ostale reakcije posljedično su inhibirane. Za razliku od obrade pri povišenoj temperaturi, visoki tlakovi koji se koriste u prehrambenoj industriji utječu samo na vodikove, ionske i hidrofobne veze, odnosno na nekovalentne veze. Iz tog razloga visoki tlak ima neznatni utjecaj na sastojke hrane koji su povezani sa poželjnim senzorskim i nutritivnim karakteristikama. Prema istraživanjima okus,

aroma, boja i nutritivni sadržaj ovisno o procesnim parametrima uglavnom se ne mijenjaju, pa su stoga obrađeni proizvodi vrlo slični ili čak identični svježim ili svježe pripremljenim namirnicama ili čak neobrađenim proizvodima (Triska, 2017). Povišenjem tlaka ima najveći utjecaj na na određene biomolekule u hrani, moeđu kojima su proteini i nukleinske kiseline, te polisaharidi. Kako bi održali vlastitu strukturu i funkciju, navedeni spojevi ovise o vodikovoj vezi i drugim nekovalentnim vezama. Za razliku od njih, relativno manje molekule, poput organiskih molekula odgovornih za osjet okusa, pigmenata odgovornih za boju, te hranjivih tvari u kojima su dominantne kovalentne veze, nisu pod utjecajem tlaka tijekom obrade VHT – om. Niža temperatura obrade također osigurava da dođe do minimalnih ili da obrada omogući potpuno očuvanje ovih komponenti (Dattaa i Deeth, 2018).

Povećanjem tlaka uz primjenu konstantne temperature dolazi do povećavanja stupnja uređenja tvari na molekularnoj razini. Posljedično dolazi do restrikcije svih vrsta gibanja, uključujući time rotacijsko, vibracijsko i translacijsko, koje čine temeljni princip mikroskopskog uređenja (Balasubramaniam i sur., 2015). Jedno od nezanemarivih svojstava obrade hrane povišenim tlakom jest svojstvo izotermne stlačivosti. To je fizikalna pojava koja koja je definirana kao relativna promjena volumena pod utjecajem promjene u tlaku. Prema Karlović i sur., 2014. volumen sustava se smanjuje ili povećava u ovisnosti o tlaku, u iznosu koji je ovisan o svojstvimasamog volumena, tj. sastavu materijala koji se podvrgava visokom tlaku i to od minimalnih 0,1 % pri 10 MPa (praktički bez promjena u volumenu) pa sve do 20 % za tekućine pri 600 MPa. Dolazi i do privremene samoionizacije vode, dok se također isključivo tijekom primjene tlakova mijenja pH do maksimalno utvrđenih 0,5 jedinica za svakih 100 MPa povećanja tlaka (Bosiljkov i sur., 2010).

Osnovne komponente uređaja za tretman materijala korištenjem visokog hidrostatskog tlaka koji se koristi u prehrambenoj industriji su obično kontrolna jedinica koja korištenjem SCADA ili drugog programa za vođenje procesa preko PLC i drugih regulatora vodi čitav proces, zatim jedinice sa spremnikom za tretiranje, te pomoćnih mehaničkih i električnih sustava poput sustava za regulaciju tlaka te regulaciju temperature. U sustavu za obradu nalazi se spremnik za tretiranje koji je u osnovi čelični cilindar sa žičanim namotajima sa jednim ili dva seta brtvi i čepova, te ujedno sadrži setove mjernih sondi za mjerenje tlaka, temperature unutar cilindra, van cilindra, te u plaštu za grijanje ili hlađenje, razine tekućine i ostalih procesnih parametara potrebnih za vođenje procesa. Sustav za generiranje i regulaciju tlaka sastoji se od jedne ili više visokotlačnih pumpi, ventila, hidrauličkog i pneumatskog sustavi za otvaranje cilindra, pražnjenje i druge operacije. Također se sastoji od intenzifikatora,

mehaničkih uređaja koji vrše konverziju hidrauličke snage (tlaka vode kojeg proizvodi pumpa) pri niskom tlaku u smanjeni volumen vode uz povećanje tlaka u nekom omjeru. Cilindar u kojem se odvija obrada priključen je na protočni uređaj, tj. plašt koji služi kao izmjenjivać topline za grijanje ili hlađenje, ovisno o procesnim parametrima odnosno potrebama tehnološkog procesa koji se provodi (npr. kod ekstrakcije je potrebno dodatno zagrijavati cilindar kako bi se ubrzao proces i povećao prinos). Time se omogućuje djelovanje tlaka pri željenoj temperaturi, obično od -40 ^{o}C za operaciju zamrzavanja do +130 ^{o}C za ekstrakciju, steriliaciju ili kombinirane tehnike toplinske i netoplinske obrade (npr. za inaktivaciju spora) (Caner i sur., 2004). Laboratorijski uređaji za obradu visokim tlakom su najčešće diskontinuirani (šaržni), volumena do 50 L. Industrijski uređaji mogu uz diskontinuirane koji su zbog cijene i jednostavnosti korištenja najčešći biti i polukontinuirani, te potpuno kontinuirani sustavi. U osnovi polukontinuirani sustavi prikladni su samo za obradu tekućina ili polutekućih namirnica koje se mogu pumpati. To su primjerice voćni sokovi, smoothieji, pirei i slični prehrambeni materijali (Martinez-Monteagudo i sur., 2016). Zatvaranjem tlačnih cilindara, te daljnjim postupnim pumpanjem tekućine u cilindar s obzirom na konstantan volumen sustava dolazi do komprimiranja fluida i materijala koji se obrađuje do sve do željenog tlaka. Plutajući cilindar u tom trenutku odvaja vodu, odnosno tlačni fluid od namirnice koja se obrađuje te se namirnica nakon dekompresije prebacuje u drugi spremnik. Slično tome, u sustavima za kontinuiranu obradu se pomoću pumpe održava konstantna razlika u tlaka između ulaza i izlaza, te se namirnica u stalnom protoku podvrgava visokom tlaku kroz cjevovod dužine do 100 metara (van den Berg, 2001). Na 9. je prikazan klasični diskontinuirani proces obrade namirnica visokim hidrostatskim tlakom.



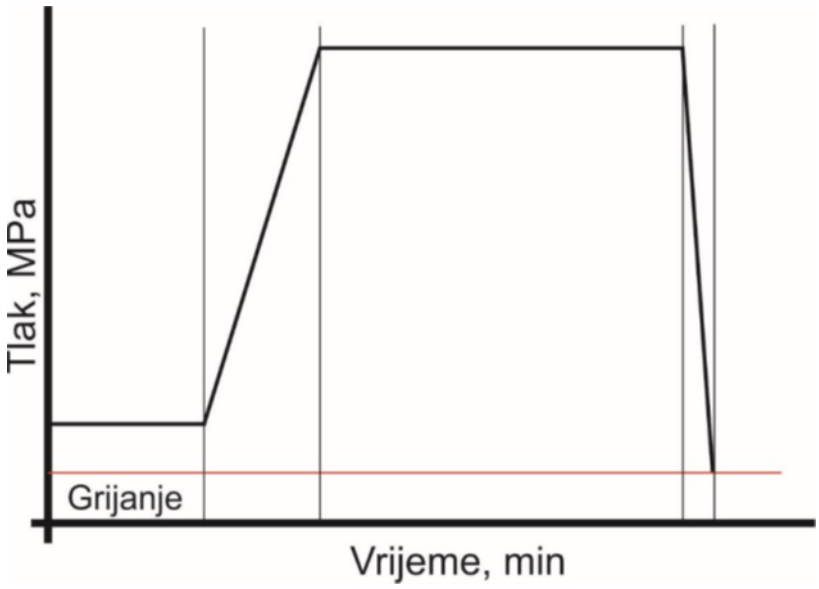
Slika 9. Obrada namirnica VHT tehnologijom (prilagođeno od Hiperbaric, Španjolska)

Pozitivna stvar kod šaržnih sustava je ta da su pogodni za sve vrste prehrambenih materijala sve dok sadrže određenu količinu vode, a uz to minimalan je rizik kontaminacije namirnice s obzirom da u sustav ulazi u ambalaži. Takvi sustavi se istovremeno lakše prazne i čiste, te pripremaju za ponovno punjenje, tj. sljedeću šaržu koja se obrađuje. Najveći nedostatak ponešto je složenija priprema same namirnice ili grupe namirnica prije obrade, te obično postoji relativno velika pauza između dvije šarže kao posljedica pripreme uređaja i ne može se izbjeći. Problem nastaje i u specifičnosti ambalaže koja se smije koristiti. S obzirom da bi došlo do deformacije ili pucanja metalne i staklene ambalaže, prvenstveno se koriste neke vrste plastike, ali i tu može doći do problema zbog potencijalne delaminacije slojeva ambalaže ili propuštanja vara. S druge strane prednost sustava koji kontinuirano obrađuju tekuće namirnice jest znatno jednostavnija priprema same namirnice. U samom procesu ne dolazi do gubitka vremena na popratne operacije poput otvaranja i zatvaranja cilindra između svake obrade. Važna ekonomska prednost je i sama ispunjenost cilindra za obradu koja je značajno veća od okvirno maksimalnih 80 % kod diskontinuiranih sustava. Nedostatak takvih sustava je što se mogu obrađivati samo namirnice koje se mogu pumpati kroz cjevovod, te nije prikladna za mesne, pekarske i mnoge druge poizvode koji se danas u industriji sve više obrađuju korištenjem visokih hidrostatskih tlakova. Ambalaža za prihvat namirnice mora biti aseptična s obzirom da se sama ambalaža ne ulazi u sustav za obradu, te se punjenje odvija nakon završetka obrade, pri čemu je nužno spriječiti naknadni prodor mikroorganizama u gotov proizvod. To prema Rao i sur., 2014. dovodi do nove kritične kontrolne točke u kojoj može doći do kontaminacije već netoplinski obrađene namirnice. Svi dijelovi tako koncipiranog uređaja moraju zadovoljiti standarde sa posebnim naglaskom na CIP („Cleaning in place“, čišćenje u mjestu) mogućnosti (Martinez-Monteagudo i sur., 2016).

Na učinkovitost ove tehnologije uvelike utječu uvjeti rada, kao što su vrijednosti tlaka, vremena tretiranja i temperature pa se za svaki proizvod, parametri obrade VHT – om trebaju optimirati s ciljem dobivanja proizvoda željene kakvoće i trajnosti (Petrus i sur., 2019; Yuan i sur., 2018). Vrijednosti iznosa tlaka ovise o fizikalnim svojstvima prehrambenog ili drugog materijala koji se obrađuje. Iz tog razloga tlakovi koji se primijenjuju tijekom obrade visokim hidrostatskim tlakom za prehrambene materijale odvijaju se pri tlakovima od 50 MPa sve do 1200 MPa. Mogući su i viši tlakovi, ali porastom tlaka dolazi do izrazitog opterećenja na sve dijelove sustava i znatnog skraćenja životnog vijeka brtvi, cilindara i svih ostalih komponenata u sustavu. Iz tog razloga je u industriji za pasterizaciju standard postao tlak od 600 MPa. Devijacije u iznosu tlaka tijekom faze postizanja tlaka i tijekom samog tlačenja su očekivane,

pogotovo ako u proizvodu koji se tretira ima zraka, te je maksimalno dopušteno odstupanje tlaka do oko 5 MPa. Kako bi se spriječila potreba za ponavljanjem procesa potrebno je provjeriti sva spojna mjesta i druge potencijalne izvore curenja. S obzirom da u slučaju pada tlaka tijekom obrade nema mogućnosti potvrde da je došlo do željene razine inaktivacije mikroorganizama, postupak se ponavlja (Chung-Yi i sur., 2016).

Ukupno vrijeme obrade visokim tlakom uključuje proces punjenja uređaja, zatim zatvaranja brtvi i cilindra, vrijeme u kojem se vrši kompresija i vrijeme održavanja tlaka u sustavu, te na kraju dekompresijsko vrijeme i vrijeme potrebno za mehaničku operaciju vađenja obrađenog proizvoda iz uređaja. Osnovno vrijeme potrebno za kompresiju je vrijeme koje je potrebno da bi tlak porastao od okolišnih 1 atm do podešene željene vrijednosti. Suprotno tome je vrijeme dekompresije, tj. vrijeme potrebno za otpuštanje zadanog tlaka natrag na atmosferski tlak. Kompresija se u industrijskim sustavima obično odvija brzinom do 10 MPa po sekundi, dok se brzina, tj. vrijeme dekompresije može prilagoditi korištenjem ventila i kapilara od gotovo trenutne npr. za zamrzavanje namirnica do neke veće vrijednosti kako bi se manje opteretio sustav. Vrijeme obrade ili vrijeme održavanja tlaka, prikazano na slici 10., te se računa od postizanja zadanog procesnog tlaka do kraja procesa tlačenja i početka otpuštanja tlaka na atmosferski. Ovisno koji se prehrambeni materijal obrađuje te o samoj operaciji koja se provodi (pasterizacija, sterilizacija, zamrzavanje, ekstrakcija, i dr.) može biti u trajanju od svega par sekundi. Ali obično se vrijeme zadržavanja izražava u minutama. Neke specijalne vrste obrade tlakom imaju vrijeme obrade u trajanju čak i do par dana (Rao i sur., 2014; Rastogi, 2013).

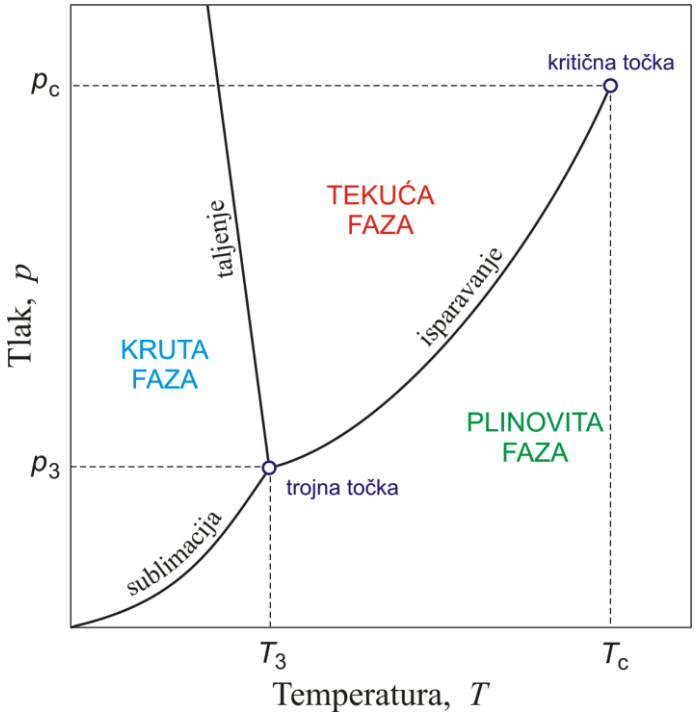


Slika 10. Ovisnost procesa obrade visokim hidrostatskim tlakom o vremenu, temperaturi i tlaku

S obzirom na utjecaj temperature na bioaktivne sastojke u hrani, temperatura je izuzetno bitan parametar koji se kontrolira tijekom obrade visokim tlakom. Mjeri se početna temperatura samog proizvoda koja u biti ukazuje na temperaturu namirnice prije obrade i prema potrebi temperiranja na željenu povišenu temperaturu (npr. za proces ekstrakcije). Zatim se mjeri završna temperatura namirnice, tj. temperatura nakon procesa obrade i vraćanja tlaka na atmosferski, te na kraju prati se procesna temperatura. Procesna temperatura je temperatura vode, odnosno tlačne tekućine u tlačnom cilindru, te se kreće u rasponu od -40 °C za zamrzavanje proizvoda do iznad 130 °C za sterilizaciju ili inaktivaciju mikroorganizama, u kojem slučaju se proces više ne smatra netoplinskim, već kombiniranim. Temperature iznad 40 ^{o}C nemaju praktičnu primjenu u prehrambenoj industriji, s obzirom da se na njih još dodaje temperatura porasla zbog adijabatskog zagrijavanja, te bi takva kombinacija imala prevelike negativne posljedice po sadržaj bioaktivnih tvari.

Voda, zrak, ulje i svi ostali fluidi uz svojstvo stlačivosti pri konstantnoj temperaturi imaju i spomenuto svojstvo zagrijavanja zbog adijabatskih promjena tijekom procesa povišenja tlaka, odnosno hlađenja tijekom procesa dekompresije sustava. To je neizbježna posljedica koja se bazira na 2. zakonu termodinamike, prema kojemu se učinak temperature ne može odvojiti od učinka tlaka tijekom kompresije, kao što je prikazano na Slici 11. Iz tog razloga dolazi do pojave adijabatske topline koja je u principu trenutna i privremena volumetrijska promjena u temperaturi materijala tijekom kompresije ili dekompresije (Bosiljkov i sur., 2010). Adijabatsko zagrijavanje javlja se kao posljedica naglog povećanja i ekvivalentno adiajabatsko hlađenje kao posljedica smanjenja unutrašnje energije sustava. Povišenje temperature kao posljedica adijabatskog zagrijavanja ovisi o samoj početnoj temperaturi prehrambenog materijala i tlačne tekućine, te o također o kemijskom sastavu materijala koja se obrađuje (Karlović i sur., 2014.). Prema istraživanjima koja su proveli Ting i sur. (2002); Knoerzer i sur., (2010); te Knoerzer i Chapman (2011) vezanim uz hidrostatsko tlačenje različitih sustava hrane i posljedice adijabatskog zagrijavanja, zaključak je da je porast količine topline u namirnicama, sa velikim udjelom vode gotovo ekvivalentan porastu temperature same vode. Porast temperature za destiliranu vodu iznosi oko 3 °C za svakih 100 MPa. Drugi prehrambeni materijali poput masti i ulja, doživljavaju porast temperature između 4 °C i 5 °C zbog njihove fizikalne strukture i kemijskog sastava. Goveđa mast imala je porast temperature od oko 6 °C dok je najveći ispitani porast pokazalo sojino ulje, sa maksimalnih 12 °C za svakih 100 MPa. S obzirom da takav porast temperature može kratkotrajno ali značajno povisiti temperaturu

namirnica (recimo za 20 °C na 600 MPa), vrlo važno je pratiti i predvidjeti utjecaj temperature. Porast obično nije toliko značajan da bi utjecao na tvari u namirnici poput toplinske pasterizacije, ali prema potrebi materijal koji se obrađuje kao i tlačna tekućina mogu biti ohlađeni na dovoljno nisku temperaturu kako bi se osigurala netoplinska obrada.



Slika 11. Fazni dijagram vode – odnos tlaka i temperature

VHT je jedina netermalna tehnologija s industrijskom primjenom u obradi proizvoda od voća koja je trenutno odobrena od strane američke Food and Drug Administration (FDA, Agencije za hranu i lijekove) i Američkog Ministarstva poljoprivrede (United States Department of Agriculture, USDA) za obradu namirnica niske pH vrijednosti. Ovim je tehnologija VHT – om prihvaćena kao alternativa toplinskoj pasterizaciji koja može osigurati mikrobiološku sigurnost i znatno produžiti trajnost obrađene hrane (Wang i sur., 2016).

2.10. Primjena visokoga hidrostatskog tlaka u obradi plodova voća i povrća te njihovih proizvoda

Obrada VHT–om rezultira dobrom očuvanosti teksture voća i povrća. Fizikalna i kemijska svojstva uzoraka mogu umanjiti djelovanje visokog tlaka, iz kojeg se razloga prije same obrade mora obratiti pažnja na propusnost membrane, elastičnost i plastičnost voća i povrća pri kompresiji, te promjene u polimerima koji se nalaze u stijenkama same stanice. Tijekom obrade namirnica visokim tlakom nužno dolazi do kompresije zraka unutar namirnice, pri ćemu zrak prelazi iz plinovitog u tekuće stanje. Takve značajne promjene u volumenu nužno rezultiraju u stvaranju podtlaka, te dolazi do urušavanja strukture. Time dolazi do izgnječenog izgleda materijala, te promjena u mehaničkim svojstvima, tj. teksturi. Istovremeno dolazi do promjena u i permeabilnosti stanica, što dodatno povećava difuzivnost, odnosno kretanje vode i drugih tvari poput enzima i metabolita iz stanice u okolnu staničnu strukturu. Stupanj loma stanice direktno ovisi o primijenjenoj vrijednosti tlaka, vremenu obrade i vrsti stanice (Matser i sur., 2000). S obzirom da obrada visokim hidrostatskim tlakom ima minimalni utjecaj na boju i okus voćnih i povrtnih proizvoda, može se pretpostaviti da će tako obrađena namirnica zadržati svoju originalnu svježinu uz istovremeno povećanje zdrastvene ispravnosti i produljenje roka trajanja. Do promjene u teksturnim svojstvima samog voća i povrća uglavnom dolazi zbog transformacija polimera unutar stijenki stanice kao posljedice enzimskih i neenzimskih reakcija (Bolumar i sur., 2016; Sila i sur., 2008).

Danas uobičajen proizvod na tržištu koji je ujedno i primjer pozitivne primjene visokog hidrostatskog tlaka na proizvode na bazi voća i povrća jest primjer guakamolija i avokado pirea. Svježe pripremljeni pire avokada jest svijetlo zelene boje i svježeg okusa, ali zbog prisutnosti enzima polifenol–oksidaze, boja mu se već nakon par sati mijenja u tamno zelenu. Obrada VHT–om inaktivira većinu enzima i sve mikroorganizme tijekom obrade na temperaturama između 20 ^{o}C do 22 ^{o}C, te osigurava da ne dolazi do promjene boje. Istovremeno se zadržava svježi okus, a rok trajanja proizvoda povećava se na do 6 tjedana pri hladnom skladištenju. Za razliku od VHT obrade, toplinska obrada rezultira stvaranjem oporog osjeta i gorkog zaostalog okusa u ustima (Matser i Timmermans, 2016).

Analizirajući sadržaj vitamina u voću i povrću može se zaključiti da obrada VHT–om pri sobnoj temperaturi nema značajan utjecaj na njihovu stabilnost. Askorbinska kiselina pri višim temperaturama značajno degradira, dok je pri sobnoj temperaturi u formi relativno stabilnog vitamina. Na stabilnost ovog vitamina utječe i sadržaj O_2 u samom proizvodu, pa se njegovom

eliminacijom tijekom obrade može značajno smanjiti stupanj degradacije. Uz to vitamini topivi u vodi, kao što su vitamin C ili B kompleks vitamina, značajno su stabilniji prilikom visokotlačnog tretmana, nego nakon obrade konvencionalnom toplinskom pasterizacijom (Oey i sur., 2008). S obzirom na relativno sličnu veličinu i strukturu, vitamini topivi u mastima isto tako bolje podnose netoplinsku obradu visokim tlakom nego konvencionalnu pasterizaciju (van der Plancken i sur., 2012). Pozitivna posljedica (i obično glavni razlog) obrade VHT–om je inaktivacija mikroorganizama. Glavni cilj je inaktivacija patogenih organizama koji mogu uzorkovati zdravstvene probleme nakon konzumacije zaražene hrane. To uključuje i bakterije raznih sojeva iz roda *E. coli, Salmonella* i *L. Monocytogenes* koje su često prisutne kod neobrađenih sirovina i proizvoda na bazi voća i povrća. Pri kontroliranoj temperaturi i pH vrijednosti, prilikom obrade i skladištenja, ne dolazi do značajnije promjene boje i smanjenja svježine takvih proizvoda. Ispitivanja u pokazala da obrada visokim tlakom između 400 i 600 MPa uz vrijeme obrade između 1 min do 10 min smanjuje koncentraciju neželjenih mikroorganizama i patogena kao što su *E. coli, Salmonella, Listeria i Cryptosporidium* do najmanje 5 log redukcije. Ta razina redukcije broja mikroorganizama nužna je kako bi se zadovoljili propisani uvjeti za zdravstvenu ispravnost hrane od strane američke Agencije za lijekove (Koutchma, 2014). Hao i sur. (2016) su us svojim istraživanjima utvrdili značajno smanjenje koncentracije kemijskog spoja patulina u VHT obrađenim sokovima na bazi povrća i voća. Istraživanje su provodili u više uzoraka komercijalnih sokova na bazi jabuke pri čemu se koncentracija patulina u soku smanjila za 62 ppb odmah nakon završetka obrade visokim tlakom pri 600 MPa tijekom 5 min sekundi pri sniženoj temperaturi od 11 °C. Zaključili su da na stupanj razgradnje patulina utječu vrsta i sastav soka, te od procesnih parametara tlak i vrijeme obrade.

Nedavno istraživanje od Juarez-Enriquez i sur., 2015. ispitivalo je rok trajanja soka od jabuke obrađenog VHT–om na 430 MPa pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 min. Tijekom skladištenja su praćeni različiti parametri kvalitete soka poput parametara boje, pH, antioksidacijskog kapaciteta, sadržaja askorbinske kiseline i ukupnih fenola, aktivnosti polifenol oksidaze i pektinmetil esteraze te senzorske analize. Sok je nakon obrade skladišten do maksimalnih 34 dana na temperaturi okoline i paralelno u hladnjaku na standardnih 4 °C. Kod oba tipa skladištenja nije došlo do statistički značajnih većih promjena u nutritivnim i senzorskim vrijednostima kao ni u fizikalno-kemijskim značajkama soka. Došlo je do porasta aktivnosti polifenol oksidaze tijekom ispitivanog vremena skladištenja, ali bez značajnog utjecaja na ispitanu razliku u boji između skladištenog i kontrolnog uzorka. Pektinmetil esteraza

se je potpunosti inaktivirala visokotlačnom obradom, isto kao i prirodne mikrobiote koje su utvrđene u sirovom, tj. neprepraćenom soku. Zadržana su u potpunosti sva fizikalna i kemijska svojstva soka od jabuke, kao i njegova organoleptička svojstva. Istovremeno je u potpunosti zadržan sadržaj ispitivanih antioksidansa i polifenola.

Buckow i sur. (2009) su dokazali da pri tlakovima većem od 300 MPa dolazi do inaktivacije polifenol oksidaze u gustom soku od jabuke. S druge strane, Perera i sur. (2010) tretirali su visokim tlakom kockice jabuka sorte 'Granny Smith' i 'Pink Lady' uronjene u sok od ananasa, pri čemu su ih za potrebe ispitivanja roka trajanja skladištili u hladnjaku tijekom 30 dana. Nakon obrade, aktivnost polifenol oksidaze se značajno smanjila, dok do promjene aktivnosti pektinmetil esteraze nije došlo, kao ni do vizualne promjene boje. Nadalje, obrada visokim tlakom u području oko 400 MPa do 600 MPa poboljšava dostupnost antioksidansa i minerala u soku od jabuke (Briones-Labarca i sur., 2011). Kim i sur. (2012) su pri VHT obradi istim tlakom od 500 MPa, tijekom 3 minute pri 25 °C pokazali da ne dolazi do promjena u sastavu vitamina C kod ispitivanog jabučnog soka. Sadržaj polifenola povećao se nakon obrade istim parametrima. Skladišteni proizvod je kroz čitavo ispitivano vrijeme skladištenja bio potpuno mikrobiološki ispravan i bez značajnih fizikalnih ili kemijskih promjena. Landl i sur. (2010) ispitivali su utjecaj VHT obrade na jabučni pire, te su ustanovili da pri obradi maksimalnim ispitivanim tlakom od 400 MPa nije došlo do promjena u koncentraciji vitamina C i ukupnih fenola. Ispitivanje su proveli kroz 21 dan skladištenja na temperaturi od 4 ^{o}C, te su utvrdili da je došlo do smanjenja koncentracije fenolnih tvari prilikom obrade na maksimalno ispitivanim tlakovima. Isti proces se je pokazao i kod toplinske pasterizacije na 75 °C u vremenu od 10 min). Među ostalim dokazali su da je broj ispitivanih mikroorganizama pao ispod razine detekcije te je ostao ispod razine tijekom čitavog vremena skladištenja. Vercammen i sur. (2012) su ispitivali utjecaj VHT obrade na kockice jabuka u zakiseljenoj glukoznoj otopini, što je rezultiralo 6 log redukcijom mikroorganizama *Candida lipolytica* i *E. coli* pri tlakovima već od 400 MPa. Posljedično je rok trajanja bio produžen sa uobičajenih dva tjedna na 3 mjeseca kod materijala skladištenih u hladnjaku. Istraživanje provedeno od Porebska i sur. (2017) utvrdilo je da se VHT obrada korištenjem parametara tlaka u iznosu od 300 MPa pri povišenoj temperaturi od 50 °C tijekom 15 min dovoljna za pasterizaciju soka od jabuke inokuliranog s *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Nakon obrade došlo je do skoro 4 log redukcije u broju mikroorganizama, te je time dodatno potvrđeno da je tretman visokim tlakom u kombinaciji s blago povišenom temperaturom, dakle korišten kao tehnologija s preprekama, uspješna tehnologija za inaktivaciju *A. Acidoterrestris* spora.

Terefe i sur. (2010) su istraživanjem utvrdili da jagode obrađene povišenim hidrostatskim tlakom od 600 MPa tijekom 600 s nisu pokazivale značajniju redukciju u koncentraciji polifenol oksidaze. Također nije bilo promjena u ukupnim koncentracijama polifenola i ispitivanih antocijana. Ipak je utvrđeno da je došlo do inaktivacije enzima peroksidaza. Nije došlo do promjena u koncentraciji vitamina C, kemijskog sastava antocijana te TOA u proizvodima od jagoda obrađenim do maksimalnih 600 MPa pri sniženim i sobnim temperaturama tijekom 15 min (Patras i sur., 2009a). Istraživanje utjecaja obrade na mutni i bistri sok od jagode tlakom od 600 MPa pokazalo je da se je nakon proteka vremena skladištenja u trajanju od 6 mjeseci, koncentracija vitamina C i antocijana smanjila za maksimalno 30 % (Cao i sur., 2012).

Istraživanja provedena od Velazquez-Estrada i sur., 2012. pokazala su da je obradom visokim tlakom moguće produljiti rok trajanja soka od naranče, te da dolazi do značajno duljeg zadržavanja aromatkih komponenti, što uključuje i prirodni voćni okus, te svježinu soka. Mikrobiološka ispravnost i ispitivana aktivnost pektinmetilesteraze vrlo su slični uspoređujući termalnu i obradu relativno niskim iznosom visokog tlaka od 200 MPa (Velazquez-Estrada i sur., 2012). Teo i sur. (2001) su dokazali da obrada soka od naranče visokim tlakom (600 MPa, 2 min) smanjuje mikrobiološku koncentraciju *E. coli* za 5,4 log CFU/mL dok koncentraciju *S. Enteritidis* nisu niti detektirali nakon obrade. Bull i sur. (2004) su dokazali da se obradom visokim hidrostatskim tlakom reducira broj mikroorganizama na minimalnu dopuštenu razinu odmah nakon procesiranja sokova od naranče sorte 'Navel' i 'Valencia'. Skladištenje sokova od naranče na 4 °C (pH 3,55) zadržalo je mikrobiološku redukciju ispod 2 log CFU po mililitru do 12 tjedana nakon obrade. Ukupna populacija aerobnih mikroorganizama obrađenog soka od naranče (600 MPa, 60 sekundi) se nije mijenjala kroz 30 dana skladištenja. Istraživanje je pokazalo da je obrada visokim hidrostatskim tlakom dobra tehnologija očuvanja mikrobiološkog vijeka trajanja soka od naranče, od 9 dana pa sve do dva mjeseca, pri 4 °C, održavajući pri tom senzorska obilježja svježeg okusa i arome (Timmermans i sur., 2011). Sanchez–Moreno i sur. (2005) su obrađivali pire od rajčice visokim hidrostatskim tlakom (400 MPa, 15 min, 25 °C) i zaključili da dolazi do smanjenja koncentracije askorbinske kiseline, dok su Patras i sur. (2009b) dokazali da se obradom pirea od rajčice pri 600 MPa, 15 min kod 25 °C zadržava 93 % askorbinske kiseline u uzorku, kao i kod toplinske obrade od 2 minute pri 70 °C. Također, obrada visokim tlakom (100 – 400 MPa, 120 – 540 s) rezultirala je boljim zadržavanjem askorbinske kiseline kod povrtnih napitaka od rajčice, zelenih paprika, celera, luka, mrkve i maslinovog ulja, nego kod toplinskih obrada (90 – 98 °C, 15 i 21 s) (Barba i sur., 2010). Obradom zelene i crvene paprike babure (100 i 200 MPa, 10 i 20 min) detektirano je

15–20 % povećanje koncentracije askorbinske kiseline u povrću (Castro i sur., 2008), dok su istraživanja na pireu od mrkve (400/500/600 MPa, 20 °C, 15 min) i kupusu (600 MPa, 20/40 °C) dokazala da su proizvodi zadržali bolje nutritivne značajke u odnosu na toplinsku obradu (Patras i sur., 2009b; Alvarez – Jubete i sur., 2014). Teo i sur. (2001) su dokazali da obrada soka od mrkve visokim tlakom (600 MPa, 2 min) smanjuje mikrobiološku koncentraciju *S. Enteritidis* sa 8,4 log CFU/mL na 0,81 log CFU/mL, dok koncentraciju *E. coli* nisu detektirali nakon obrade.

2.11. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u obradi *smoothie* napitaka

Smoothie napici su iznimno popularan način konzumiranja često cjelovitog voća i povrća i kao takvi mogu zanačajno doprinijeti unosu bioaktivnih tvari tijekom konzumacije. Dodatak biljnih mliječnih napitka osigurava solidan izvor proteina čime se dodatno povećava v nutritivni značaj i funkcionalnost napitka. S obzirom da se obrada namirnice povišenim tlakom najčešće provodi pri sobnoj temperaturi, većina poželjnih nutritivnih i drugih svojstava ostaje i nakon obrade i skladištenja. Iz tog razloga se takvi proizvode obično čuvaju u hladnjaku, kako bi se izbjegao ili usporio rast mikroorganizama tijekom skladištenja.

Trajnost prehrambenih proizvoda ograničena je i zbog potencijala za rast i razvoj bakterijskih spora, te moguće preostale aktivnosti enzima. Također se za vrijeme skladištenja može doći do promjena u fizikalno-kemijskim svojstvima. Rok trajanja iz tih razloga jako varira, obično u području između 3 do 8 tjedana ako se proizvod čuva u haldnjaku na temperaturi od maksimalno 4 °C (Matser i Vollebregt, 2017). Obrada *smoothie* napitaka visokim hidrostatkim tlakom isto tako može imati povoljniji utjecaj na stabilnost bioaktivnih spojeva u usporedbi s konvencionalnom pasterizacijom. Za HHP tehnologiju dokazano je istraživanjima da pozitivno korelira s povećanjem koncentracije bioaktivnih spojeva ako se uspoređuje s netretiranim kontrolnim uzorkom. To se uglavnom pojašnjava poboljšanom masenom difuzijom i ekstrakcijom tih spojeva (Fernández i sur., 2019). Neka istraživanja utvrdial su da boja ispitivanih prehrambenih materijala degradira protekom roka trajanja, tj. vremena skladištenja. Ta promjena je primjetna kod neobrađenog proizvoda, ali i uzoraka obrađenih visokim hidrostatskim tlakom i toplinskom pasterizacijom. Pri tome se udio karotenoida nije značajno smanjio nakon toplinske pasterizacije usporedbi sa kontrolnim *smoothie* napitkom, dok je kod *smoothie* napitaka obrađenim korištenjem povišenih tlakova od 550 MPa došlo do porasta koncentracije karotenoida. Koncentracija polifenola nije se mijenjalu neovisno o vrsti obrade. Dobiveni rezultati istraživanja dovode do zaključka da su *smoothie*

napici obrađeni visokim hidrostatskim tlakom osigurali veću funkcionalnost proizvoda, te su zadržali bioaktivna svojstva u usporedbi sa neobrađenim i toplinski pasteriziranim *smoothie* napicima (Andrés i sur., 2016).

Pregledom istraživanja od Barba i sur., 2010 i drugih može se doći do zaključka da tehnologija obrade visokim tlakom povoljno djeluje na stabilnost ukupnih fenola. Na žalost pokazalo se u nekim slučajevima da istovremeno negativno djeluje na stabilnost karotenoida u ispitivanim prehrambenim materijalima, najčešće povrću (Carbonell-Capella i sur., 2013). Istraživanje koje su proveli De Ancos i sur. (2020) pokazalo je da su koncentracije ukupnih fenola i karotenoida u ispitivanim uzorcima obrađenim visokim hidrostatskim tlakom manje od nego kod kontrolnih uzoraka. Pretpostavlja se da je smanjenje koncentracije nekih spojeva nakon visokotlačne obrade voća i povrća izravno povezano s aktivnošću preostalih aktivnih enzima polifenol oksidaze. Istovremeno dolazi i do povećane aktivnosti peroksidaze i β-glukozidaze zbog utjecaja povišenih tlakova i temperatura. (Mahadevan i Karwe, 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Sirovine za pripremu *smoothie* napitaka za provođenje ovog istraživanja su:

- jabuka sorte „Zlatni Delišes“ (*Malus domestica* L. cv. Golden Delicious) (Fragaria d.o.o, Hrvatska);
- mrkva (*Daucus carota* L.) (iz trgovačke mreže);
- pasterizirani sok od aronije (*Aronia melanocarpa* L.) OPG–a Obitelj Maletić (Hrvatska);
- kaša indijanske banane (*Asimina triloba* L.);
- napitak od badema (Alpro, Danone, Belgija) (sastojci: voda, šećer, bademi (2 %), trikalcijev fosfat, morska sol, stabilizatori (karuba guma, gellan guma), emulgator (suncokretov lecitin), vitamini (riboflavin (B2), B12, E, D2) (Tablica 2.)

Tablica 2. Nutritivni sastav napitka korištenog u pripremi *smoothie* napitka u 100 mL

Energija	**102 kJ/24 kcal**
Masti	1,1 g
zasićene	0,1 g
monozasićene	0,8 g
polinezasićene	0,2 g
Ugljikohidrati	3 g
šećeri	3 g
Vlakna	0,2 g
Bjelančevine	0,5 g
Sol	0,14 g
Vitamini	
vitamin D	0,75 µg
vitamin B2	0,21 mg
vitamin B12	0,38 µg
vitamin E	18,0 mg
Minerali	
kalcij	120 mg

U prvom dijelu istraživanja je definirano i pripremljeno ukupno 20 uzoraka *smoothie* napitaka različitog sastava, te je provedeno senzorsko ispitivanje kako bi se ispitala prihvatljivost pripremljenih formulacija. Prema organoleptičkim svojstvima najbolji uzorak je bio uzorak sastava prikazanog u Tablici 3., te su prema ovoj recepturi pripremljeni uzorci za sva daljnja istraživanja. Do pripreme *smoothie* napitka, jabuke, mrkve i bademov napitak su bili skladišteni na 4 °C u hladnjaku, dok su sok od aronije i kaša indijanske banane bili zamrznuti na –18 °C i odmrzavani neposredno prije pripreme uzoraka. *Smoothie* napitci pripremljeni miješanjem sastojaka prikazanih u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav ispitivanih uzoraka *smoothie* napitaka

Sastojak	Udio % (v/v ili w/v)
Sok od jabuke	50
Mrkva	20
Aronija	5
Indijanska banana – kaša	10
Napitak od badema	15

Smoothie napitci su pripremljeni od navedenih sirovina te tretirani postupkom pasterizacije (Hurtado i sur. 2019) i visokim hidrostatskim tlakom, nakon čega su skladišteni na 4 °C tijekom 7, 14 i 21 dan, dok je kontrolni uzorak predstavljao netretirani uzorak *smoothie* napitka pripremljen nulti dan eksperimenta.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema *smoothie* napitaka

Za proizvodnju *smoothie* napitaka, od sirovina jabuke i mrkve prvotno su pripremljeni sokovi, koji su se u potom miješali prema definiranoj recepturi sa preostalim sastojcima. Za proizvodnju soka od jabuke korišten je sokovnik za hladno prešanje TEFAL Infinity Press Revolution ZC500H38 (300 W, brzina okretaja 80 min^{-1}, promjer filtera 0,3 mm). Prije samog

prešanja jabuke su oprane, izrezane u četvrtine te su im uklonjene peteljke i sjemene lože. Za proizvodnju soka od mrkve korišten je sokovnik BOSCH MES 4000 snage 1000 W i promjera filtra 0,5 mm. Mrkve su prije obrade oprane, oguljene i narezane na komade. Sok od aronije i kaša indijanske banane su neposredno prije pripreme *smoothie* napitka odmrznuti, te se svaka pojedina komponenta *smoothie* napitka dodala u staklenu čašu volumena 5 L u definiranom omjeru. Kako bi se poštivali zadani udjeli sastojaka prema recepturi, potrebni volumeni sokova od jabuke, mrkve, aronije i bademovog napitka su izmjereni menzurom, dok je kaša indijanske banane izvagana na analitičkoj vagi KERN ABS. Svi sastojci su potom homogenizirani štapnim mikserom SIEMENS MQ 33001, snage 170 W. Pripremljeni *smoothie* napitak je prebačen u adekvatne sterilne plastične (PP) boce (punjenje do vrha). Napunjene bočice s uzorcima su potom podvrgnute VHT tretmanu (jedna boca volumena 500 mL i jedna bočica volumena 50 mL za svaku šaržu VHT tretmana). *Smoothie* napitak predviđen za tretman toplinskom pasterizacijom prebačen je u sterilne staklene boce volumena 500 mL. Uzorak *smoothie* napitka koji nije podvrgnut niti jednom tretmanu (kontrolni uzorak), također je prebačen u plastičnu bocu volumena 500 mL i odmah analiziran.

3.2.2. Obrada *smoothie* napitaka visokim hidrostatskim tlakom

Za potrebe obrade tehnologijom VHT-a, *smoothie* napici su se punili u odgovarajuću polipropilensku ambalažu koja mora biti dovoljno elastična (više od 15 %). Kao dodatna zaštita od popuštanja čepa ili ambalaže, te propuštanja tlačne tekućine u uzorak, napunjene boce su se vakuumirale u plastičnim vrećicama u uređaju za vakuumiranje „STATUS SV2000“. Pripremljeni *smoothie* napitci su se tretirali VHT–om pomoću poluindustrijskog uređaja za obradu visokim hidrostatskim tlakom Stansted Fluid Power (Velika Britanija) (Slika 12.), prema punom faktorskom planu pokusa prikazanom u Tablici 4. koji uključuje varijaciju tlakova 350 MPa i 450 MPa i vrijeme tretiranja od 5 i 15 minuta pri sobnoj temperaturi (≈ 20 °C) te su skladišteni kroz 7, 14 i 21 dan, u hladnjaku pri 4 °C.



Slika 12. Uređaj za obradu visokim hidrostatskim tlakom Stansted Fluid Power (Velika Britanija)

Tablica 4. Plan pokusa tretiranja *smoothie* napitaka

Šifra uzorka	Vrsta tretmana	Skladištenje (dani) pri 4 °C	Tlak (MPa)	Vrijeme (min)
1	Kontrola	0	0	0
2	Pasterizacija	0	0	0
3	VHT1	0	350	5
4	VHT2	0	350	15
5	VHT3	0	450	5
6	VHT4	0	450	15
7	Pasterizacija	7	0	0
8	VHT1	7	350	5
9	VHT2	7	350	15
10	VHT3	7	450	5
11	VHT4	7	450	15

12	Pasterizacija	14	0	0
13	VHT1	14	350	5
14	VHT2	14	350	15
15	VHT3	14	450	5
16	VHT4	14	450	15
17	Pasterizacija	21	0	0
18	VHT1	21	350	5
19	VHT2	21	350	15
20	VHT3	21	450	5
21	VHT4	21	450	15

3.2.3. Obrada *smoothie* napitaka pasterizacijom

Smoothie napici za obradu pasterizacijom su se punili u staklene boce volumena 500 mL, a režim same pasterizacije izabran je na temelju provedenih istraživanja za *smoothie* napitke sličnog sastava i iznosio je 7 minuta pri 85 °C (Hurtado i sur., 2019). Pasterizacija je provedena na šaržnom pasterizatoru ukupne snage grijača 6 kW (2x3 kW) (PS-100, Oprema Ludbreg d.o.o. Hrvatska) (Slika 13.). Budući da je korištenjem termometar u obliku Pt-100 sonde utvrđeno da su potrebne 24 minute kako bi se u čitavom volumenu *smoothie* napitka postigla željena temperatura, te je ukupno vrijeme koje su uzorci proveli u pasterizatoru iznosilo 31 minutu. Pasterizirani *smoothie* napitci su nakon hlađenja do sobne temperature skladišteni prema planu pokusa (Tablica 4) u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.



Slika 13. Šaržni pasterizator PS-100 (Oprema Ludbreg d.o.o. Hrvatska)

3.3. Ispitivanje parametara kakvoće *smoothie* napitaka

U kontrolnom uzorku, kao i u svim uzorcima *smoothie* napitaka neposredno nakon provedenog tretmana visokim tlakom i pasterizacijom (Slika 14.), te tijekom skladištenja nakon 7. , 14. i 21. dana, određivani su parametri kakvoće podijeljeni prema planiranim analizama u četiri podskupine: (I) Fizikalno kemijske analize, (II) Mikrobiološka stabilnost, (III) Stabilnost biološki aktivnih spojeva i (IV) Senzorska analiza.



Slika 14. Uzorci *smoothie* napitaka tretirani visokim hidrostatskim tlakom (A) i pasterizacijom (B)

3.3.1. Fizikalno kemijske analize

Fizikalno kemijske analize obuhvaćaju instrumentalno mjerenje boje, pH vrijednosti, topljive suhe tvari u % Brixa, gustoće, viskoznosti i raspodjele veličine čestica.

Mjerenje boje provedeno je pomoću difuzne reflektirajuće spektrofotometrije na kolorimetru (CM – 3500d, Konica – Minolta, Japan) (Slika 15.) prema CIELab sustavu boja. Za standardno osvjetljenje je korištena pulsna ksenonska lampa dok su sve potrebne postavke mjerenja napravljene pomoću programa Spectramagic NX (Konica – Minolta, Japan). Odabrana je geometrija d/8 gdje se površina uzorka gleda pod kutom od 8 ° u odnosu na svoju normalu. Po provedenim mjerenjima dobiveni su rezultati za svjetlinu boje L* (svjetlo/tama), vrijednost parametra a* (crveno/zeleno) i b* (žuto/plavo), na temelju kojih se izračunaju vrijednosti zasićenosti boje C, tona boje H i ukupnu razliku obojenosti ΔE_{ab}, prema jednadžbama 2, 3 i 4.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \tag{2}$$

$$H^* = arctan\frac{b^*}{a^*} \tag{3}$$

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2} \tag{4}$$

L_1, a_1 i b_1 su parametri boje kontrolnih uzoraka dok su L_2, a_2 i b_2 parametri boje tretiranih uzoraka.

ΔE odnosi se na najkraću udaljenost koja spaja dvije točke boja u jednoličnom prostoru boja i mjera je odstupanja tj. ukupne razlike obojenosti između dvije mjerene točke.

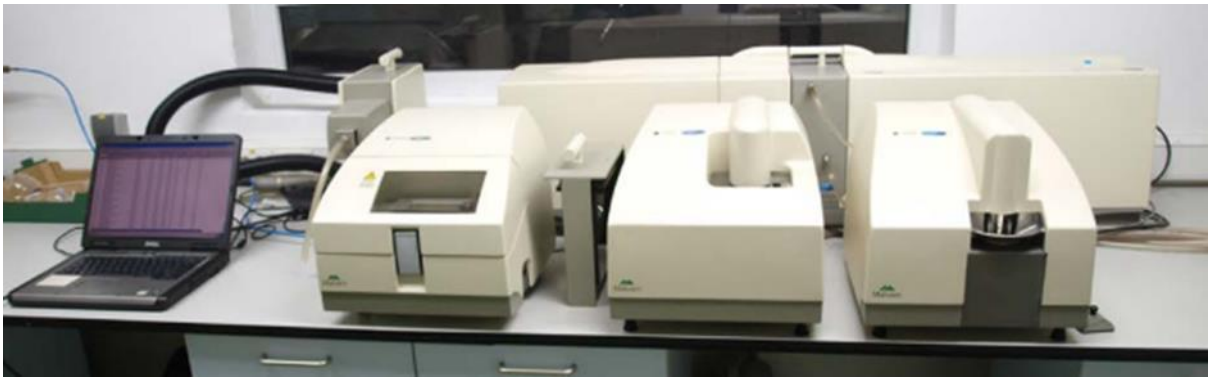


Slika 15. Spektrofotometar CM-3500d, Konica-Minolta (Japan)

Analize pH vrijednosti i topive suhe tvari (%) provedene su sukladno važećem Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka te obavljanja kemijskih i fizikalnih analiza radi kontrole kvalitete proizvoda od voća i povrća (1983) Službeni list SFRJ br. 29, (preuzeto u NN 53/91).

Gustoća uzoraka mjerena je na denzitometru (Mettler Toledo Density Meter DE40), raspona mjerenja od 0,0000 gcm^{-3} do 3,0000 gcm^{-3}, pri referentnoj temperaturi od 20 °C. Radna komora uređaja se je prije svakog mjerenja isprala destiliranom vodom, te se je pomoću pumpe izbacio sadržaj kako bi se uređaj doveo u stanje za mjerenje. Gustoća je mjerena injektiranjem cca 1 mL uzorka pomoću plastične šprice. Nakon postizanja zadane temperature očitava se vrijednost, s točnošću od 0,0001 gcm^{-3}.

Raspodjela veličine čestica mjerena je na uređaju Malvern Mastersizer 2000 (Worchestershire, Velika Britanija) (prikazan na Slici 14.) Prije same analize uzorak se dobro promiješa, te ulijeva u vanjsku jedinicu Hydro 2000S. Ulijevanje se provodi sve do zadovoljavajuće razine zasićenja koja se uživo prati na popratnom softveru. Nakon postizanja zasićenja, uređaj dodatno raspršuje potencijalne aglomerate korištenjem ugrađenog ultrazvučnog procesora sa sondom, podešenog na 100 % snage. Istovremeno sonda uronjena u uzorak služi i za otplinjavanje mjehurića zraka. Nakon završetka svakog pojedinog mjerenja uključuje se sustav ispiranja i čišćenja destiliranom vodom, te provodi softversko poravnanje.



Slika 16. Uređaj za raspodjelu veličine čestica Malvern Mastersizer 2000 (Velika Britanija)

Princip rada zasniva se na prolasku laserske zrake točno definirane valne duljine kroz otvor s uzorkom, te odbijanju ili raspršivanju zrake od pojedine čestice u ispitivanom uzorku. Pri tomu čestice raspršuju svjetlost pod kutom koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Smanjenjem veličine čestica logaritamski se povećava promatrani kut raspršenja svjetlosti dok se intenzitet raspršenja smanjuje s volumenom čestice. Veće čestice raspršuju svjetlost pod oštrim kutovima s višim intenzitetom, dok manje čestice raspršuju svjetlost pod širim kutom, ali s niskim intenzitetom (Jillavenkatesa i sur., 2001). Zbog izvora plave svjetlosti manje valne duljine, uz He – Ne laser (svjetlost crvene boje), submikronska osjetljivost je povećana, što povećava i mjerni raspon instrumenta koji iznosi 0,02 – 2000 μm. Analiza određivanja veličine čestica tekućeg uzorka je nedestruktivna metoda koja ima veliku pouzdanost analize disperziranih čestica u prikladnom otapalu (destilirana voda ili etanol).

Viskoznost uzoraka određena je na viskozimetru (Fungilab ALPHA) uz mjerno vratilo oznake L2. Uzorci su uliveni u staklene čaše od 150 mL. Nakon uranjanja mjernog vratila u uzorak do oznake na vratilu, pokreće se mjerenje. Mjerenje viskoznosti provedeno je pri različitim brzinama okretaja mjernog vratila od 100, 60, 50, 30 i 20 o min^{-1}.

3.3.2. Mikrobiološka stabilnost

Mikrobiološka stabilnost određena je klasičnim mikrobiološkim metodama pri čemu su testirani mikroorganizmi odabrani prema propisanom Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za namirnice (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu; EC, 2073/2005; EC, 853/2004; EC, 854/2004). Prije samog provođenja analize, bilo je potrebno pripremiti hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g L-1 destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K3PO4 0,3; agar 18. pH vrijednost podloge je 7.3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min

- SA (sladni agar), sastava (g L-1 destilirane vode): sladni ekstrakt 6; maltoza 1,8; glukoza 6,0; kvaščev ekstrakt 1.2. pH vrijednost podloge je 4.7; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min

- LJCŽA (ljubičasto crveno žučni agar), sastava (g L-1 destilirane vode): pepton 7; kvaščev ekstrakt 3; natrijev klorid 5; žučne soli 1.5; glukoza 10; neutralno crveno 0.03; kristal violet 0.002; agar 15. pH vrijednost podloge je 7.4; podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje

- Fraser bujon, sastava (g L-1 destilirane vode): proteoza pepton 5; tripton 5; goveđi ekstrakt 5; ekstrakt kvasca 5; natrijev klorid 20; di-natrij hidrogenfosfat anhidrid 9.5; kalijev dihidrogenfosfat 1.35; eskulin 1; litijev klorid 3; akriflavin HCl 0.025; nalidiksična kiselina 0.02. pH vrijednost podloge je 7.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min

- PALCAM agar, sastava (g L-1 destilirane vode): pepto-kompleks 10; triptoza 10; pepton 3; ekstrakt kvasca 3; kukuruzni škrob 1; natrijev klorid 5; glukoza 0.5; manitol 10; eskulin 0.8; željezo amonijev citrat 0.5; litij-klorid 15; fenolno crvenilo 0.08 g/l; agar 12; polimiksin B 0.01; ceftazidim 0.02; akriflavin HCl 0.005. pH vrijednost podloge je 7.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min

- RVS (rappaport vassiliadis soja) bujon, sastava (g L-1 destilirane vode) : sojin pepton 4.5; natrijev klorid 7.2; kalijev dihidrogenfosfat 1.26; di-kalij hidrogen fosfat 0.18; magnezijev klorid 13.4; malahitno zelenilo oksalat 0.036. pH vrijednost podloge je 5.2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 15min

- XLD agar (ksiloza-lizin-deoksiholat), sastava (g L-1 destilirane vode): ksiloza 3.75; L-lizin 5; lakotoza 7.5; saharoza 7.5; natrijev klorid 5; kvaščev ekstrakt 3; natrijev deoksikolat 1; natrijev tiosulfat 6.8; amonij željezo (III) citrat 0.8; fenol crveno 0.08; agar 14.5. pH vrijednost podloge je 4.7; Podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje

Aerobne mezofilne bakterije su određene nakon inkubacije na hranjivom agaru na 37 °C tijekom 48 sati, a enterobakterije uzgojem na LJCŽA agaru na 37 °C tijekom 48 sati. *Listeria monocytogenes* je određivana metodom dvostrukog predobogaćivanja u Fraser bujonu, nakon

čega je uslijedio uzgoj na PALCAM agaru na 37 °C tijekom 24 sata, a *Salmonella sp.* predobogaćivanjem u RVS bujonu nakon čega je uslijedio uzgoj na XLD agaru na 37 °C tijekom 72 sata. Kvasci i plijesni određeni su uzgojem na sladnom agaru na 28 °C tijekom 48 sati. Mikrobni rast određen je tradicionalnom metodom brojanjem poraslih kolonija, a rezultati su izraženi kao „colony forming units“ (CFU) po mL uzorka.

3.3.3. Stabilnost biološki aktivnih spojeva (BAS)

Analize biološki-aktivnih spojeva provedene su na svim ispitivanim uzorcima *smoothie* napitaka (kontrolni uzorak, uzorci obrađeni VHT tretmanom te uzorci obrađeni pasterizacijom) tijekom 0., 7., 14. i 21. dana skladištenja. Obzirom na sastav *smoothie* napitaka, obuhvaćena je analiza najzastupljenijih BAS u pojedinim zastupljenim sirovinama, u koje se ubrajaju fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, karotenoidi i vitamin C.

U kontrolnom uzorku, kao i neposredno nakon provedbe svakog provedenog tretmana (0. dan), odnosno prema planu pokusa nakon 7., 14. i 21. dana skladištenja, provedena je ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija BAS–a iz uzoraka *smoothie* napitaka pomoću ultrazvučne kupelji frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka) pri temperaturi 50 °C tijekom 10 minuta uz 96 % - tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo (Slika 17.). U pripremljenim ekstraktima provedena su spektrofotometrijska određivanja (VWR UV–1600PC Spektrofotometar, VWR International, USA) svih navedenih BAS–a, izuzec vitamina C, koji je određen HPLC–DAD metodom (Thermo Scientific Accela) na koloni Nucleosil C18, 5 µm (250 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Los Angeles, CA).



Slika 17. Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex (Njemačka) (lijevo) i filtracija ekstrakata *smoothie* napitaka (desno)

Postupak ekstrakcije: Na analitičkoj vagi se plastičnoj kiveti volumena 50 mL odvaže približno 5g (± 0,0001) smoothie soka te se nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (9 6%-tnog etanola). Ekstrakcija se provodi primjenom ultrazvučne kupelji frekvencije 40 kHz (Bandelin Sonorex, Njemačka) pri temperaturi 50 °C tijekom 10 min. Po završetku ekstrakcije, uzorak se uz pomoć staklenog lijevka i filter papira profiltrira u odmjernu tikvicu volumena 25 mL, a tikvica se potom do oznake nadopuni ekstrakcijskim otapalom. Pripremljeni ekstrakt se prebaci u plastičnu kivetu volumena 50 mL, te se skladišti pri 4 °C do provedbe analiza. U pripremljenim ekstraktima *smoothie* napitaka spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli, ukupni flavonoidi te ukupne hidroksicimetne kiseline.

3.3.3.1.Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja: Određivanje ukupnih fenola provodi se primjenom modificirane spektrofotometrijske metode prema literaturi (Yuan i sur., 2018), a koja se temelji na kolornoj reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta plavog obojenja pri 725 nm, koji je proporcionalan koncentraciji polifenolnih spojeva. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolbidenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Staklene kivete
- Centrifuga (Hettich, Rotofix 32)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Plastične kivete, volumena 50 mL
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100 µL i 1000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Stakleni lijevak

Otapala i reagensi

- Folin Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (5x razrijeđen)
- Destilirana voda
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Otopina natrijevog karbonata (7,5 %-tna otopina, w/v)

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

- Standard galne kiseline

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

Postupak mjerenja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 400 µL ekstrakta, koji je prethodno dvostruko razrijeđen ekstrakcijskim otapalom, 400 µL F.C. reagensa, koji je prethodno razrijeđen s destliranom vodom pet puta, 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodaje 400 µL destilirane vode. Reakcijska smjesa se ostavi da stoji 1 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega se centrifugira 10 min na 5000 rpm. Supernatant se koristi za mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 725 nm. Provedena su dva paralelna određivanja za svaki ekstrakt.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti koncentracijski niz standarda galne kiseline. Najprije se pripremi otopina standarda koncentracije 5 g L^{-1} na način da se u staklenoj čašici odvaže 500 mg galne kiseline, koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola. Otopina standarda se kvantitativno prebaci u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 10 mL tako da se otpipetira redom 20, 50, 100, 200, 300, 500 µL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose redom 10, 25, 50, 100, 150, 250 mg L^{-1}. Iz svake se tikvice potom otpipetira 400 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 400 µL F.C. reagensa, koji je prethodno razrijeđen s destliranom

vodom pet puta te 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodaje 400 µL destilirane vode. Reakcijska smjesa se ostavi da stoji 1 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega se centrifugira 10 min na 5000 rpm. Supernatant se koristi za mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 725 nm. Provedena su dva paralelna određivanja za svaku koncentracijsku otopinu standarda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija izradi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Na temelju dobivene jednadžbe pravca može se izračunati koncentracija ukupnih fenola izražena u ekvivalentima galne kiseline.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0{,}007x + 0{,}0207$$

$$R^2 = 0{,}9948$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

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

3.3.3.2.Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode: Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem intenziteta plavog obojenja nastalog kompleksa pri 415 nm, koji je proporcionalan koncentraciji prisutnih flavonoida (Chang i sur., 2002).

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete (100 i 1000 µL)

- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje

Otapala i reagensi

- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Destilirana voda
- Aluminijev klorid, 10 %-tni

Priprema*:* 1 g aluminijevog klorida se otopi u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 1M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata se otopi u 10 mL destilirane vode i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom

- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})

Priprema: 10 mg standarda kvercentina se odvaže u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu te se potom tikvica nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom

Postupak mjerenja

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 96 %-tni etanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje jednaki volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa stoji 30 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega se reakcijskoj smjesi mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Provedena su dva paralelna određivanja za svaki ekstrakt.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti koncentracijski niz standarda kvercetina. Iz alikvotne otopine standarda kvercentina (100 mg L^{-1}) pripremljena su sljedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1} na način da je iz početne alikvotne otopine redom otpipetirano 1, 2,5, 5 i 7,5 mL u odmjerne tikvice volumena 10 mL te nadopunjeno 100%-tnim

metanolom do oznake. U staklenu epruvetu se iz svake tikvice otpipetira 0,5 mL otopine standarda, zajedno s 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje jednaki volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa stoji 30 minuta nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se izradi baždarni pravac (Slika 19) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije otopine standarda kvercentina (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Provedena su dva paralelna određivanja za svaku koncentracijsku otopinu standarda. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$y = 0{,}0069x + 0{,}0002$$

$$R^2 = 0{,}9997$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 415 nm

x – koncentracija kvercentina (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije

3.3.3.3.Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Princip metode: Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se po dodatku reagensa mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD)
- Kvarcne kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf (1000 µL i 5000 µL)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 100 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L

- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Metanol, 100 %-tni
- Metanol, 80 %-tni (v/v)
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} HCl (u 96 %-tnom etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %, v/v) se otpipetira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L^{-1} HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %, v/v) se otpipetira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard klorogenske kiseline (100 mg L^{-1})

Priprema: 10 mg standarda klorogenske kiseline se odvaže u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu te se tikvica nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Reakcijskoj smjesi se potom mjeri apsorbancija na 320 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način, izuzev što se namjesto ekstrakta uzima isti volumen ekstrakcijskog otapala (96 %-tni etanol). Provedena su dva paralelna određivanja za svaki ekstrakt.

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu. Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline (100 mg L^{-1}) pripreme se slijedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg L^{-1} na način da se iz početne alikvotne otopine redom otpipetira 1, 2,5, 5 i 6,67 mL u odmjerne tikvice volumena 10 mL te potom nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. U staklene epruvete se potom otpipetira 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl.

Pripremljenim reakcijskim smjesama se zatim mjeri apsorbancija na 320 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način, izuzev što se namjesto otopine standarda uzima isti volumen 100 %-tnog metanola.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacrta baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije klorogenske kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm. Provedena su dva paralelna određivanja za svaku koncentracijsku otopinu standarda.

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$y = 0{,}0035x + 0{,}0082$$

$$R^2 = 0{,}9992$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije

3.3.3.4.Određivanje ukupnih karotenoida

Princip određivanja:

Kvantitativno određivanje karotenoida u biljnom ekstraktu temelji se na absorbanciji karotenoida na 470 nm, međutim za precizno određivanje karotenoida potrebno je uzeti u obzir i količinu klorofila b koji također znatno apsorbira na ovoj valnoj duljini, kao i ostale parametre, primjerice poput izbora otapala (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Ultrazvučna kupelj DT 514 H SONOREX DIGITEC (13,5L, 860W, 40 kHz) (Bandelin electronic, Berlin, Germany)
- Staklena čaša, stakleni lijevak, filter papir
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Celulozna vata

Otapala i reagensi:

- Aceton čistoća (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 80 %-tni aceton

Priprema uzorka: Otpipetira se 3 mL uzorka u Erlenmayerovu tikvicu od 50 mL te se nadoda 20 mL ekstrakcijskog otapala (80%-tni aceton, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri T=50 °C C i t=30 min. Po provedenoj ekstrakciji, uzorci se po potrebi centrifugiraju pri 10 000 rpm/10 min, a potom se supernatanti profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake.

Postupak određivanja: Pripremljenim ekstraktima mjeri se apsorbancija pri 440 nm, 644 nm i 662 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni aceton.

Izračunavanje

Izračun:

Klorofil *a* (mg/L) = (9.784 × A662) – (0.99 × A664)

Klorofil *b* (mg/L) = (21.426 × A664) – (4.65 × A662)

Ukupni karotenoidi (mg/L) = (4.695 × A440) – 0.369 (Klorofil *a* + Klorofil *b*)

$X\ (mg\ g^{-1}) = X\ (mg\ L^{-1}) \times V_{ekstrakta}\ (L) \times$ razrjeđenje /m (g)

$X\ (\mu g\ g^{-1}) = X\ (mg\ g^{-1})/1000$

3.3.3.5. Određivanje vitamina C

Analiza vitamina C je provedena HPLC–DAD metodom, a izolacija i kvantifikacija prema standardnoj metodi (HRN EN 14130:2005 – Određivanje vitamina C pomoću HPLC) na tekućinskom kromatografu Thermo Scientific Accela HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Korištena je kolona Nucleosil 100-5C18, 5 µm (250 mm x 4.6 mm I.D.) (Phenomenex, Los Angeles, CA, USA). Vrijednosti granica detekcije i granica kvantifikacije iznosile su 0,2 mg 100 mL^{-1} i 1,6 mg 100 mL^{-1}. Sadržaj vitamina C je izražen u mg askorbinske

kiseline odnosno kao zbroj askorbinske kiseline i njenog oksidativnog oblika, dehidroaskorbinske kiseline, na 100 mL uzorka.

3.3.4. Senzorska analiza

Senzorska analiza provedena je metodom Kvantitativne Deskriptivne Analize („*Quantitative Descriptive Analysiy*“, QDA) koja se ubraja u opisne senzorske testove putem kojih panelisti slučajnim redoslijedom identificiraju i kvantitativno određuju osjetilna zapažanja proizvoda, čime panelisti ne određuju samo kvalitativni nego i kvantitativni aspekt ocjenjivanog svojstva (Lawless i Heymann, 1999; Mandić i Perl, 2016).

Skala intenziteta pojedinog svojstva ocjenjivana je bodovima od 0 do 7 (0 – neizraženo svojstvo; 7-najjače izražen intenzitet ocjenjivanog svojstva). Ukupno je definirano 14 senzorskih deskriptora koji su uključivali svojstva izgleda (tamnoća, heterogenost), arome (intenzitet, aroma na svježe voće, aroma na kuhano voće), okusa (intenzitet, okus na svježe voće, okus na kuhano voće, kiselost, slatkoća, harmoničnost) i teksture (viskoznost, zrnatost, ukupni senzorski dojam).

Prije provedbe QDA analize, svi uzorci *smoothie* napitaka temperirani su na sobnu temperaturu. Po svakom uzorku, u male prozirne plastične čašice od 50 mL koje su prethodno označene šifrom, servirano je približno 30 mL smoothie soka. U svakom setu ocjenjivanja sudjelovalo je 14 senzorskih ocjenjivača (panelista). Svi prikupljeni rezultati senzorskog ocjenjivanja obrađeni su prvotno u programu Microsoft Excel, kako bi se izračunale prosječne vrijednosti za svako senzorsko svojstvo svakog uzorka, a zatim se prikazuju grafički u formi tzv. "paukove mreže " (*eng. spider-web*). Prosjeci ocjena za svako senzorsko svojstvo nanose se na polarne koordinate, koje predstavljaju svaki pojedini senzorski deskriptor. Intenzitet (kvantifikacija) određenog senzorskog obilježja je najniži u centru, a povećava se prema obodu polarnog dijagrama. Dobiveni dijagrami imaju 14 koorkoordinata odnose se na intenzitet promjena odnosno ocjenu (Vahčić i sur., 2000).

3.3.5. Statistička analiza

Za karakterizaciju uzorka korištena je deskriptivna statistika. MANOVA – om („*Multivariate analysis of varianc*e“) su testirane diskretne varijable i faktorski rezultati. Za

mjerenje standardiziranih sličnosti u uzorcima korištena je Wardova istraživačka hijerarhijska klaster analiza. Neparametarska analiza je korištena pomoću Kruskal Wallisovog testa. Kako bi se provjerila struktura specifičnih varijabli i procijenila ukupna promjena nutritivne vrijednosti uzoraka za različite kombinacije neovisnih varijabli, provedena je faktorska analiza („*Principal Component Analysis*“, PCA). Prikladnost faktorske analize ispitana je Kaiser – Mayer – Olkin testom (KMO) i Bartlettovim testom sferičnosti. Rezultat faktorske analize izračunat je metodom linearne regresije te je razina značajnosti za sve testove bila je $\alpha \leq 0,05$, a rezultati su analizirani pomoću SPSS (v.22) i Statistica (v12) programa.

4. REZULTATI

4.1. Eksperimentalni dizajn

Na temelju ulaznih parametara (rok trajanja, tlak, vrijeme obrade i vrsta obrade) proveden je eksperimentalni dizajn kako bi se objektivno i kontrolirano provelo istraživanje, te dobili specifični zaključci na temelju hipoteza istraživanja. Provedena je optimizacija kako bi se maksimizirala količina korisnih informacija kroz minimalan broj provedenih eksperimenata. Eksperimenti su također provedeni varijacijom samo jednog faktora (parametra) istovremeno. Na temelju Tablice 4 provedena su istraživanja, te su ispitane interakcije između faktora. Provedeni eksperimentalni dizajn također omogućuje bolje shvaćanje i evaluaciju faktora koji utječu na sustav.

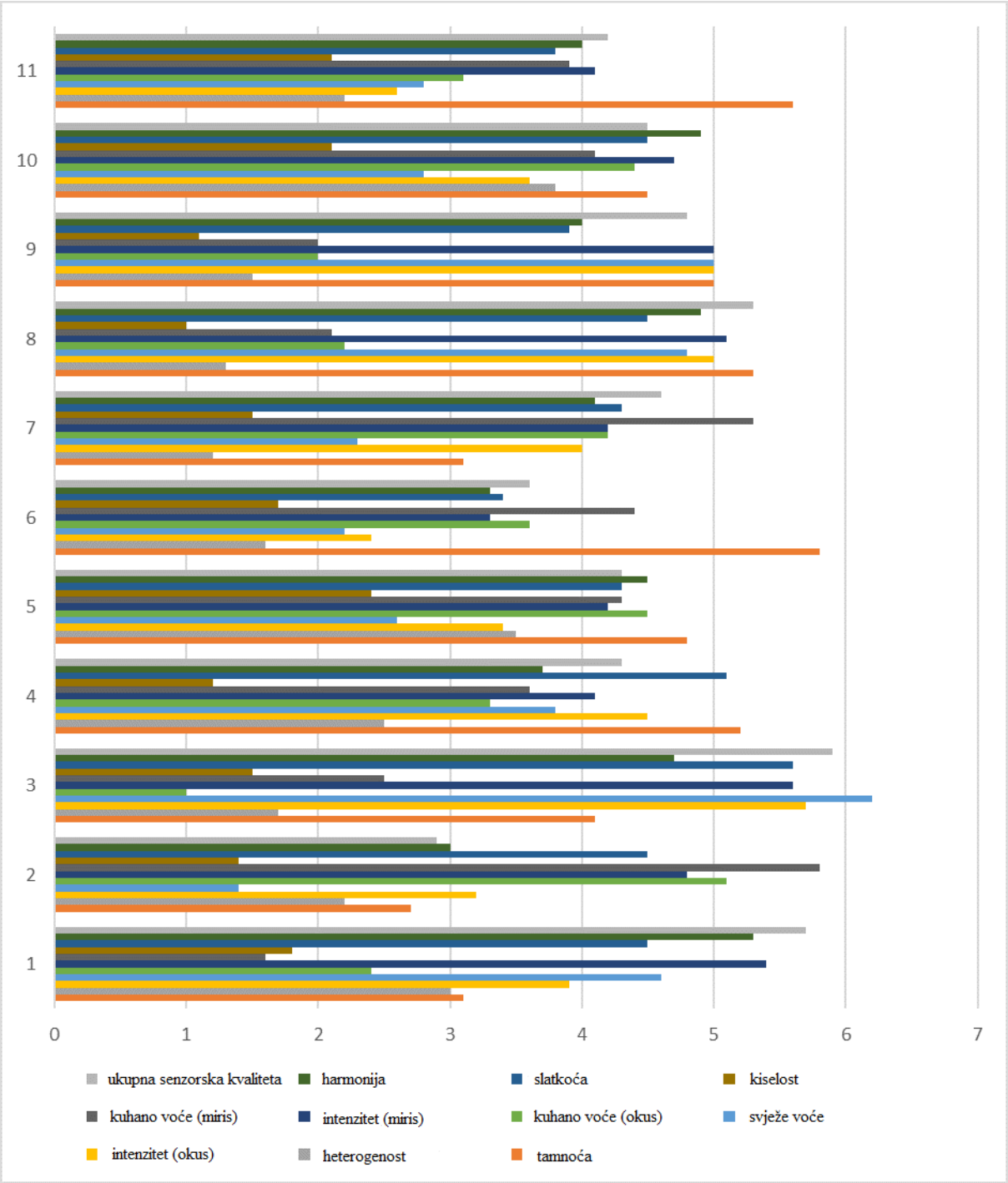
Na temelju varijabli i mogućih vrijednosti

- Vrsta obrade – Pasterizacija; VHT, kontrola (bez obrade)
- Rok trajanja – od 0 do 28 dana (prirast po 1 dan)
- Tlak – od 0 do 600 MPa (prirast po 50 MPa)
- Vrijeme obrade – od 1 do 15 min (prirast po 1 min)

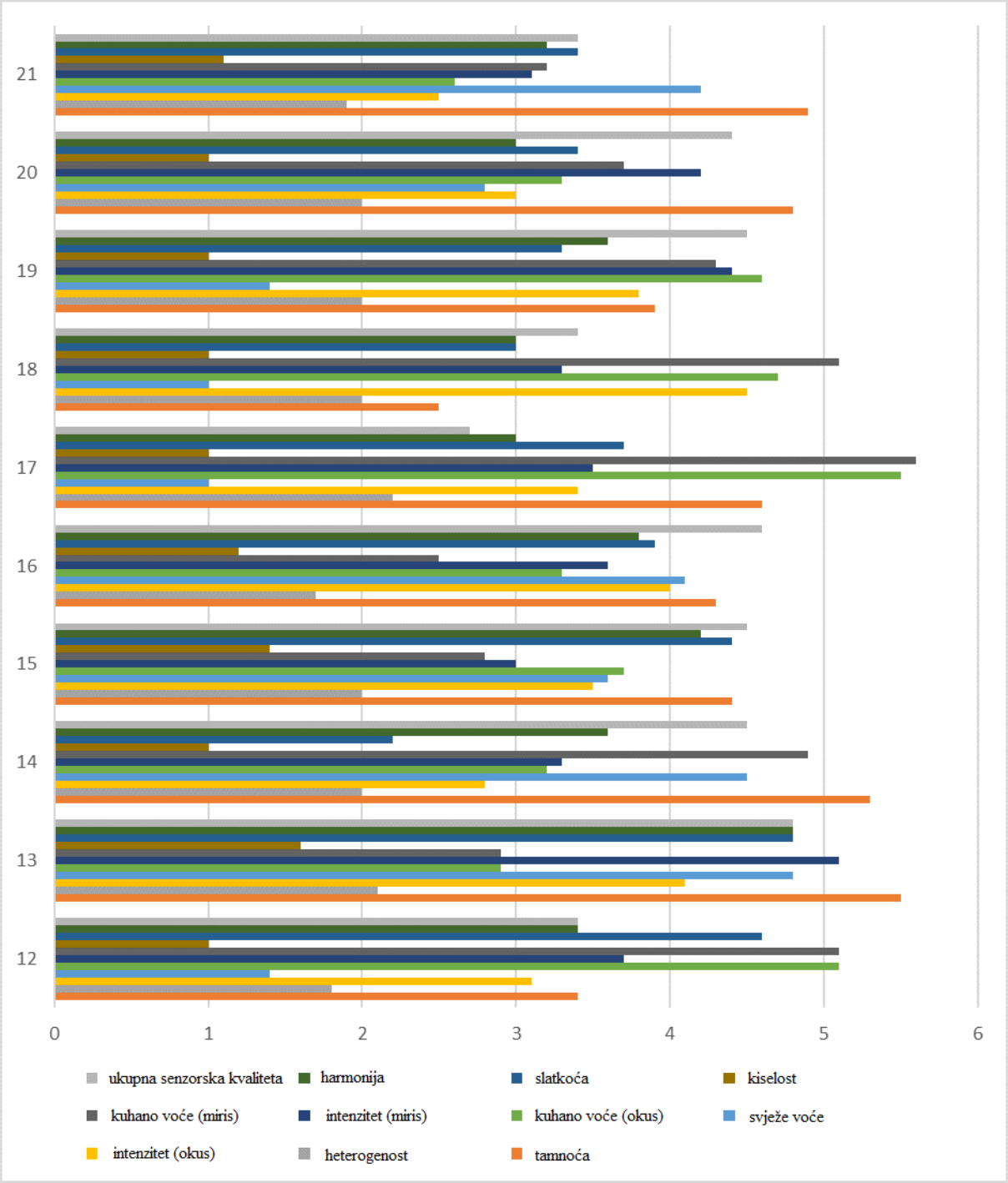
Na temelju rezultata dosadašnjih vlastitih i drugih istraživanja, optimiziran je dizajn i broj eksperimenata smanjen sa preko 6000 na 21 eksperiment koji u potpunosti zadovoljava sve kriterije za provjeru hipoteza i postizanje ciljeva istraživanja.

4.2. Senzorska analiza *smoothie* napitaka

S obzirom na široki raspon varijabli koje su ispitivane, poput intenziteta okusa i arome, svježine, teksture, boje i dr., senzorska analiza integrira više različitih znanosti kako bi se shvatila korelacija između kvalitete i senzorskih svojstava ispitanog proizvoda. Prije samog početka istraživanja ispitan je 21 *smoothie* napitak različitih sastava, te je provedena senzorska analiza kako bi se prema poželjnim organoleptičkim svojstvima izdvojili uzorci s najboljim karakteristikama. S najbolje ocijenjenim uzorcima provedena su sva daljnja istraživanja. Zbog relativno velikog početnog broja uzoraka i kategorija, ispitivanje je provedeno u dva dijela (uzorci 1 do 11 i 12 do 21). Pri izabiru najboljih *smoothie* napitaka cilj je bio pronaći poveznicu između preferencije potrošača i fizikalno – kemijskih svojstava proizvoda.



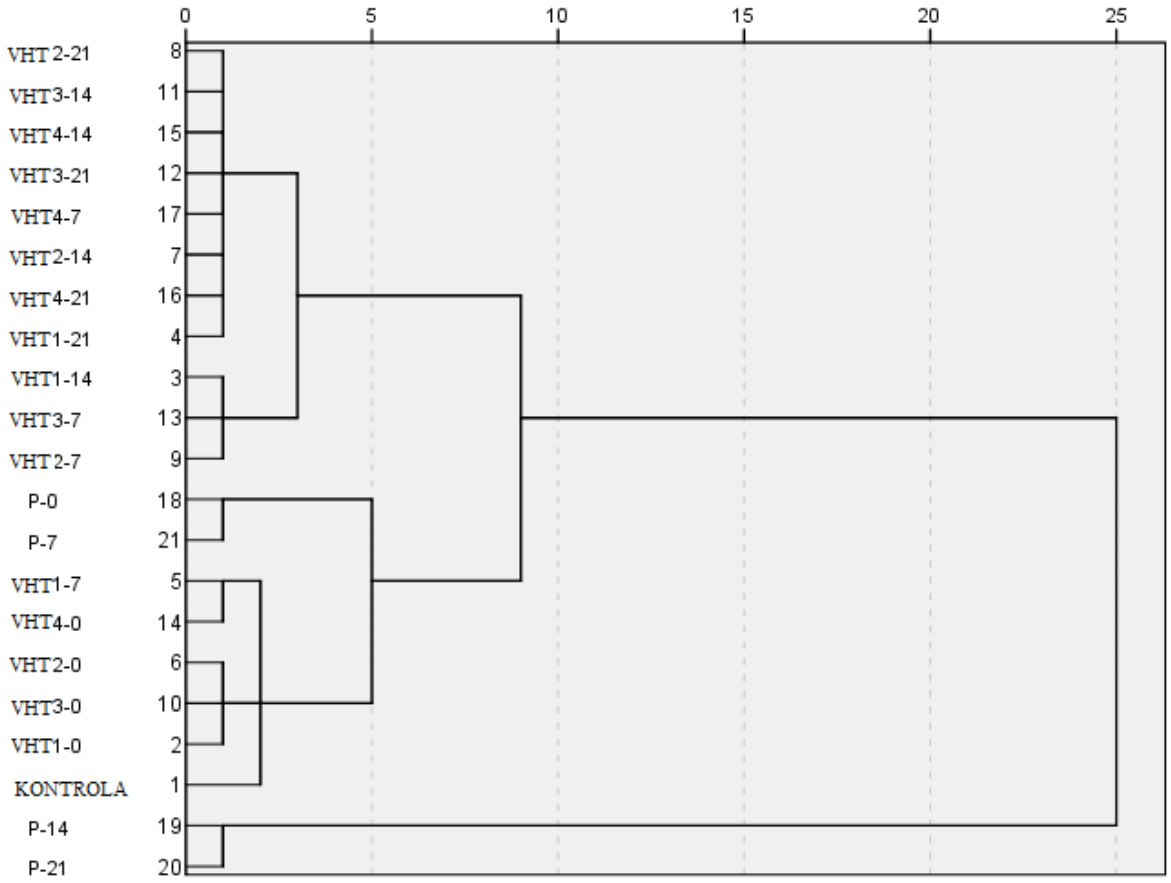
Slika19. Kriteriji za odabir sastava uzorka za provedbu ispitivanja, uzorci 1-11



Slika 20. Kriteriji za odabir sastava uzorka za provedbu ispitivanja, uzorci 12-21

4.3. Hijerarhijska klasterska analiza Wardovom metodom klasteriranja

Wardova metoda klasteriranja uz minimalnu varijancu koristi *n* klastera, svaki sa pojedinim objektom. Kombiniranjem svih *n* klastera u jedan koji sadrži sve objekte i dijeljenjem tog klastera korak po korak čime se minimizira varijanca koja se mjeri indeksom E (suma kvadrata). U prvom koraku računa se srednja vrijednost svakog klastera, te se računa udaljenost objekata unutar klastera. Razlike u udaljenosti se kvadriraju i zbrajaju. Pri tome se proces provodi za svaku moguću kombinaciju klastera (Romesburg, 2004.). Na Slici 21. prikazan je rezultat klasterske analize za ispitivane uzorke.



Slika 21. Rezultati hijerarhijske klasterske analize standardiziranih uzoraka

U Tablicama 6., 7. i 9. prikazani su rezultati analiza kolorimetrijskog ispitivanja uzoraka. Ispitani su standardni L*, a* i b* parametri boje uzoraka, te su određeni kroma i ton boje. Na temelju klasterske analize povezani su elementi grupe u klaster, te je određena sličnost boje ispitivanih uzoraka TP i VHT sa referentnim uzorkom K. Prema istom principu korištenjem neparametarske analize određena je sličnost količine analiziranih bioaktivnih tvari nakon toplinske (TP) i visokotlačne (VHT) obrade sa referentnim uzorkom (Tablice 8., 9. i 11.). Provedena je i neparametarska analiza kako bi se međusobno usporedili TP i VHT uzorci, kao što je prikazano u Tablici 12.

Tablica 5. Prosječne vrijednosti za kontrolni uzorak K

Svjetlina boje	L* (0-100)	45,06 ± 0,01
Crveno – zeleno	a* (0-100)	16,70 ± 0,02
Žuto - plavo	b* (0-100)	17,82 ± 0,01
Zasićenost boje (kroma)	C* (0-100)	24,42 ± 0,01
Ton boje	H* (0-100)	46,87 ± 0,05

Tablica 6. Prosječne vrijednosti za toplinski obrađene uzorke TP

Svjetlina boje	L* (0-100)	36,88 ± 11,02
Crveno – zeleno	a* (0-100)	17,67 ± 3,99
Žuto - plavo	b* (0-100)	24,47 ± 6,74
Zasićenost boje (kroma)	C* (0-100)	30,19 ± 7,79
Ton boje	H* (0-100)	26,78 ± 2,75

Tablica 7. Prosječne vrijednosti bioaktivnih tvari za kontrolni uzorak K

Ukupan sadržaj fenola	TPC, mg 100 mL^{-1}	782,57 ± 20,00
Ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina	HCA, mg 100 mL^{-1}	51,51 ± 2,60
Ukupan sadržaj flavonoida	TFL, mg 100 mL^{-1}	58,58 ± 0,64
Sadržaj vitamina C	Vitamin C, mg 100 mL^{-1}	27,48 ± 0,13
Ukupan sadržaj karotenoida	CAR, mg 100 mL^{-1}	14,97 ± 0,85

Tablica 8. Prosječne vrijednosti bioaktivnih spojeva za toplinski obrađene uzorke TP

Ukupan sadržaj fenola	TPC, mg 100 mL^{-1}	857,99 ± 65,34
Ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina	HCA, mg 100 mL^{-1}	36,76 ± 9,03
Ukupan sadržaj flavonoida	TFL, mg 100 mL^{-1}	58,18 ± 5,29
Sadržaj vitamina C	Vitamin C, mg 100 mL^{-1}	2,00 ± 2,45
Ukupan sadržaj karotenoida	CAR, mg 100 mL^{-1}	12,49 ± 1,94

Tablica 9. Kruskal Wallis statistika za usporedbu parametara boje VHT i K uzoraka.

	L*	a*	b*	C*	H*
hi-kvadrat	0,000	5,487	0,000	3,086	3,086
Stupnjevi slobode	1	1	1	1	1
asimptotska značajnost (p – vrijednost)	1,000	0,019	1,000	0,079	0,079

Tablica 10. Kruskal Wallis statistika za usporedbu kemijskih parametara VHT i K uzoraka.

	TPC	HCA	TFL	Vit. C	CAR
hi-kvadrat	4,200	5,486	2,594	5,486	1,206
Stupnjevi slobode	1	1	1	1	1
asimptotska značajnost (p – vrijednost)	0,040	0,019	0,107	0,019	0,272

Tablica 11. Kruskal Wallis statistika za usporedbu parametara boje TP i VHT uzoraka

	L*	a*	b*	C*	H*
hi-kvadrat	0,371	0,929	8,070	5,603	0,659
Stupnjevi slobode	1	1	1	1	1
asimptotska značajnost (p – vrijednost)	0,543	0,335	0,005	0,018	0,417

Tablica 12. Kruskal Wallis statistika za usporedbu kemijskih parametara VHT i K uzoraka

	TPC	HCA	TFL	Vit. C	CAR
hi-kvadrat	17,864	0,370	8,458	17,033	1,245
Stupnjevi slobode	1	1	1	1	1
asimptotska značajnost (p – vrijednost)	0,000	0,543	0,004	0,000	0,264

4.4.Određivanje nutritivnog indeksa (NI)

Korištenjem klasterske analize određen je faktor nutritivnog indeksa, te promjene u NI u ovisnosti o primijenjenim procesnim parametrima i vrsti obrade. Analiza NI i korelacije pojedinih ispitivanih bioaktivnih tvari s NI prikazani su u Tablicama 14. i 15. Utjecaj tlaka, vremena obrade i vremena skladištenja kod VHT uzoraka prikazan je u Tablici 16. te su utvrđene korelacije između pojedinih faktora i promjena u NI. Analiza TP uzoraka prikazana je u Tablici 17, te je također utvrđeno postojanje korelacije između obrade, vremena skladištenja i nutritivnog indeksa.

Tablica 13. Analiza provedena za NI faktor

	Komponente
	1
Vitamin C	0,75
CAR	0,81
HCA	0,70
Varijanca	75 %
Svojstvena vrijednost (Eigenvrijednost)	2,26

Tablica 14. Pearsonove korelacije s NI

	NI	HCA	Vitamin C	CAR
NI	1	0,80**	0,89**	0,95**
HCA		1	0,54**	0,65**
Vitamin C			1	0,82**
CAR				1

** Korelacija je značajna na razini 0,01 (dvosmjerno)

Tablica 15. Promjene u nutritivnom indeksu (NI) uzoraka obrađenim VHT tijekom skladištenja

Varijabla	NI
Tlak	$p \leq 0,01^{\dagger}$
350 MPa	$0,21 \pm 0,03^{a}$
450 MPa	$-0,23 \pm 0,03^{b}$
Vrijeme	$p \leq 0,01^{\dagger}$
5 min	$0,08 \pm 0,03^{a}$
15 min	$-0,09 \pm 0,03^{b}$
Skladištenje	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	$1,18 \pm 0,05^{a}$
7 dana	$0,13 \pm 0,05^{b}$
14 dana	$-0,47 \pm 0,05^{c}$
21 dan	$-0,87 \pm 0,05^{d}$
Srednja vrijednost	$-0,01 \pm 0,02$

Tablica 16. Promjene u Nutritivnom indeksu (NI) u uzorcima obrađenim toplinskom pasterizacijom tijekom skladištenja

Varijabla	NI
Skladištenje	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	$0,6 \pm 0,1^{a}$
7 dana	$0,0 \pm 0,1^{b}$
14 dana	$-1,0 \pm 0,1^{c}$
21 dan	$-1,7 \pm 0,1^{d}$
Srednja vrijednost	$-0,5 \pm 0,1$

4.5.Klasterska analiza bioaktivnih spojeva

U Tablicama 18. i 19. prikazan je sadržaj ispitanih bioaktivnih spoejva u uzorcima obrađenim visokim hidrostatskim tlakom i toplinskom pasterizacijom. Kod VHT uzoraka provedena je višefaktorska ANOVA analiza ukazala je na značajne faktore, te se utvrdio utjecaj parametara tlaka, vremena obrade i vremena skladištenja na sadržaj bioaktivnih tvari (TPC, HCA, TFL, CAR i vitamin C) u smoothie napicima.

Tablica 17. Promjene u bioaktivnim tvarima u uzorcima obrađenim VHT tijekom skladištenja

Varijabla	n	TPC	HCA	TFL	CAR	Vit C
Tlak		$p=0,48^{‡}$	$p=0,42^{‡}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$
350 MPa	16	$688,0 \pm 4,1^{a}$	$35,7 \pm 0,5^{a}$	$49,3 \pm 0,66^{a}$	$13,8 \pm 0,1^{a}$	$11,72 \pm 0,1^{a}$
450 MPa	16	$683,8 \pm 4,1^{a}$	$35,1 \pm 0,5^{a}$	$45,9 \pm 0,66^{b}$	$12,8 \pm 0,1^{b}$	$7,81 \pm 0,1^{b}$
Vrijeme		$p \leq 0,01^{†}$	$p=0,94^{‡}$	$p = 0,26^{‡}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$
5 min	16	$697,7 \pm 4,1^{a}$	$35,4 \pm 0,5^{a}$	$48,2 \pm 0,66^{a}$	$13,5 \pm 0,1^{a}$	$10,41 \pm 0,1^{a}$
15 min	16	$674,1 \pm 4,1^{b}$	$35,4 \pm 0,5^{a}$	$47,1 \pm 0,66^{a}$	$13,1 \pm 0,1^{b}$	$9,12 \pm 0,1^{b}$
Skladištenje		$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$	$p \leq 0,01^{†}$
0 dana	8	$708,8 \pm 5,8^{a}$	$39,9 \pm 0,7^{a}$	$44,3 \pm 0,93^{b}$	$16,3 \pm 0,1^{a}$	$16,37 \pm 0,1^{a}$
7 dana	8	$684,6 \pm 5,8^{b}$	$37,1 \pm 0,7^{b}$	$54,2 \pm 0,93^{a}$	$13,8 \pm 0,1^{b}$	$8,84 \pm 0,1^{b}$
14 dana	8	$674,1 \pm 5,8^{b}$	$33,6 \pm 0,7^{c}$	$44,9 \pm 0,93^{b}$	$11,8 \pm 0,1^{c}$	$8,26 \pm 0,1^{c}$
21 dan	8	$676,2 \pm 5,8^{b}$	$21,1 \pm 0,7^{d}$	$47,0 \pm 0,93^{b}$	$11,3 \pm 0,1^{d}$	$5,60 \pm 0,1^{d}$
Srednja vrijednost	32	$685,9 \pm 2,9$	$35,42 \pm 0,4$	$47,6 \pm 0,46$	$13,3 \pm 0,1$	$9,80 \pm 0,1$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška u mg 100 mL^{-1}. Vrijednosti izražene s različitim slovima u stupcu su statistički različite uz $p \leq 0,05$. † značajni faktor u višefaktorskoj analizi. ‡ neznačajni faktor u višefaktorskoj analizi.

Tablica 18. Promjene u biokativnim tvarima u uzorcima obrađenim toplinskom pasterizacijom tijekom skladištenja

Varijabla	n	TPC	HCA	TFL	Vit C	CAR
Skladištenje		$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	8	$944,2 \pm 10,3^{a}$	$44,3 \pm 2,5^{a}$	$66,7 \pm 0,7^{a}$	$5,6 \pm 0,0^{a}$	$15,0 \pm 0,5^{a}$
7 dana	8	$881,2 \pm 10,3^{b}$	$44,1 \pm 2,5^{a}$	$55,3 \pm 0,7^{b}$	$2,4 \pm 0,0^{b}$	$13,1 \pm 0,5^{b}$
14 dana	8	$819,9 \pm 10,3^{c}$	$33,9 \pm 2,5^{b}$	$55,6 \pm 0,7^{b}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$11,3 \pm 0,5^{c}$
21 dan	8	$786,6 \pm 10,3^{c}$	$24,8 \pm 2,5^{c}$	$55,2 \pm 0,7^{b}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$10,5 \pm 0,5^{c}$
Srednja vrijednost	32	858,0 ± 5,1	36,8 ± 1,2	58,2 ± 0,3	2,0 ± 0,0	12,6 ± 0,2

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška u mg 100 mL^{-1}. Vrijednosti izražene s različitim slovima u stupcu su statistički različite uz $p \leq 0,05$. † značajni faktor u višefaktorskoj analizi.

4.6.Analiza kolorimetrijskih rezultata

Kolorimetrijski podaci, tj. boja uzoraka vrlo su važan parametar prihvatljivosti napitaka od strane potrošača. Promjene u boji u usporedbi s neobrađenim, kontrolnim uzorkom pokazuju koliko sama obrada utječe na enzimsku aktivnost, antioksidante i druge tvari koje mogu dovesti do promjene ili zaštiti boju napitka tijekom skladištenja. Mjeren je standardni niz parametara (L*, a* i b*) koji definiraju boju, kao i parametri C* i H*. Rezultati analize boje za uzorke obrađene visokim tlakom prikazani su u Tablici 20. Kolorimetrijska analiza toplinski obrađenih uzoraka prikazana je u Tablici 21. Na temelju rezultata prikazanih u Tablicama 20. i 21. analizirano je odstupanje u boji u odnosu na kontrolni uzorak, te su konačni rezultati analize prikazani u Tablici 22.

Tablica 19. Promjene u kolorimetrijskim vrijednostima tijekom skladištenja za uzroke *smoothie* napitaka obrađene VHT – om

Varijabla	n	L*	a*	b*	C*	H*
Tlak		$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
350 MPa	16	$46,4 \pm 0,0^{a}$	$15,0 \pm 0,0^{a}$	$19,1 \pm 0,0^{a}$	$24,3 \pm 0,0^{a}$	$51,8 \pm 0,0^{a}$
450 MPa	16	$43,5 \pm 0,0^{b}$	$14,2 \pm 0,0^{b}$	$16,1 \pm 0,0^{b}$	$21,5 \pm 0,0^{b}$	$48,6 \pm 0,0^{b}$
Vrijeme		$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
5 min	16	$45,4 \pm 0,0^{a}$	$14,6 \pm 0,0^{a}$	$17,9 \pm 0,0^{a}$	$23,1 \pm 0,0^{a}$	$50,5 \pm 0,0^{a}$
15 min	16	$44,6 \pm 0,0^{b}$	$14,6 \pm 0,0^{b}$	$17,3 \pm 0,0^{b}$	$22,7 \pm 0,0^{b}$	$49,9 \pm 0,0^{b}$
Skladištenje		$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	8	$44,7 \pm 0,0^{d}$	$15,4 \pm 0,0^{a}$	$17,5 \pm 0,0^{b}$	$23,3 \pm 0,0^{b}$	$48,6 \pm 0,0^{d}$
7 dana	8	$45,7 \pm 0,0^{d}$	$14,9 \pm 0,0^{b}$	$18,0 \pm 0,0^{a}$	$23,4 \pm 0,0^{a}$	$50,3 \pm 0,0^{c}$
14 dana	8	$44,8 \pm 0,0^{c}$	$14,1 \pm 0,0^{c}$	$17,4 \pm 0,0^{d}$	$22,4 \pm 0,0^{c}$	$50,9 \pm 0,0^{b}$
21 dan	8	$44,9 \pm 0,0^{b}$	$14,1 \pm 0,0^{d}$	$17,4 \pm 0,0^{d}$	$22,4 \pm 0,0^{c}$	$51,0 \pm 0,0^{a}$
Srednja vrijednost	32	45,0 ± 0,0	14,6 ± 0,0	17,6 ± 0,0	22,9 ± 0,0	50,2 ± 0,0

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška u mg 100 mL^{-1}. Vrijednosti izražene s različitim slovima u stupcu su statistički različite uz $p \leq 0,05$. † značajni faktor u višefaktorskoj analizi.

Tablica 20. Promjene u kolorimetrijskim vrijednostima tijekom skladištenja za uzroke *smoothie* napitaka obrađene toplinskom pasterizacijom

Varijabla	n	L*	a*	b*	C*	H*
Skladištenje		$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	8	$47,3 \pm 0,02^{a}$	$13,95 \pm 0,0^{c}$	$19,03 \pm 0,0^{c}$	$23,59 \pm 0,0^{c}$	$53,76 \pm 0,0^{a}$
7 dana	8	$47,1 \pm 0,02^{b}$	$13,93 \pm 0,0^{c}$	$17,37 \pm 0,0^{d}$	$22,26 \pm 0,0^{d}$	$51,28 \pm 0,0^{b}$
14 dana	8	$26,7 \pm 0,02^{c}$	$21,51 \pm 0,0^{a}$	$30,83 \pm 0,0^{a}$	$37,59 \pm 0,0^{a}$	$21,05 \pm 0,0^{c}$
21 dan	8	$26,47 \pm 0,0^{d}$	$21,29 \pm 0,0^{b}$	$30,67 \pm 0,0^{b}$	$37,34 \pm 0,0^{b}$	$21,05 \pm 0,0^{c}$
Srednja vrijednost	32	36,88 ± 0,0	17,67 ± 0,0	24,47 ± 0,0	30,19 ± 0,0	36,78 ± 0,0

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška u mg 100 mL^{-1}. Vrijednosti izražene s različitim slovima u stupcu su statistički različite uz $p \leq 0,05$. † značajni faktor u višefaktorskoj analizi.

Tablica 21. Promjene u ΔE tijekom skladištenja za uzroke *smoothie* napitaka obrađene VHT i TP

Varijabla	ΔE (VHT)	ΔE (TP)
Tlak	$p \leq 0,01^{\dagger}$	-
350 MPa	$2,8 \pm 0,0^{b}$	-
450 MPa	$3,4 \pm 0,0^{a}$	-
Vrijeme	$p \leq 0,01^{\dagger}$	-
5 min	$3,6 \pm 0,0^{a}$	-
15 min	$2,7 \pm 0,0^{b}$	-
Skladištenje	$p \leq 0,01^{\dagger}$	$p \leq 0,01^{\dagger}$
0 dana	$2,7 \pm 0,0^{d}$	$3,77 \pm 0,0^{b}$
7 dana	$3,36 \pm 0,0^{a}$	$3,45 \pm 0,0^{c}$
14 dana	$3,12 \pm 0,0^{c}$	$23,04 \pm 0,0^{a}$
21 dan	$3,31 \pm 0,0^{b}$	$23,07 \pm 0,0^{a}$
Srednja vrijednost	3,12 ± 0,0	13,33 ± 0,0

4.7.Mikrobiološka analiza

Za potrebe istraživanja provedena je mikrobiološka analiza, čiji su rezultati prikazani u Tablici 23. Ispitani su najčešći mikroorganizmi koji uzrokuju kvarenje napitaka, te je analizirana kvaliteta toplinske i visokotlačne pasterizacije. Utvrđena je mikrobiološka ispravnost obrađenih sokova kroz čitavo ispitivano vrijeme skladištenja.

Tablica 22. Analiza broja mikroorganizama (CFU / mL) kod VHT, TP i neobrađenih uzoraka skladištenih na 4 °C

Mikroorganizam	Obrada	Skladištenje /dan			
		0	7	14	21
Aerobne mezofilne bakterije	Kontrola	$5{,}3 \cdot 10^{4}$ *	n.d.	n.d.	n.d.
	VHT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enterobacteriaceae	Kontrola	$1{,}6 \cdot 10^{2}$ **	n.d.	n.d.	n.d.
	VHT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L. monocytogenes	Kontrola	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VHT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	Kontrola	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VHT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvasci i plijesan	Kontrola	$4{,}0 \cdot 10^{5}$ ***	n.d.	n.d.	n.d.
	VHT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Simboli: n.d. – nije detektirano. * - nije zadovoljen uvjet mikrobiološke ispravnosti ($\leq 10^4$ CFU/mL). ** - nije zadovoljen uvjet mikrobiološke ispravnosti ($\leq 10^2$ CFU/mL). *** - nije zadovoljen uvjet mikrobiološke ispravnosti ($\leq 10^5$ CFU/mL).

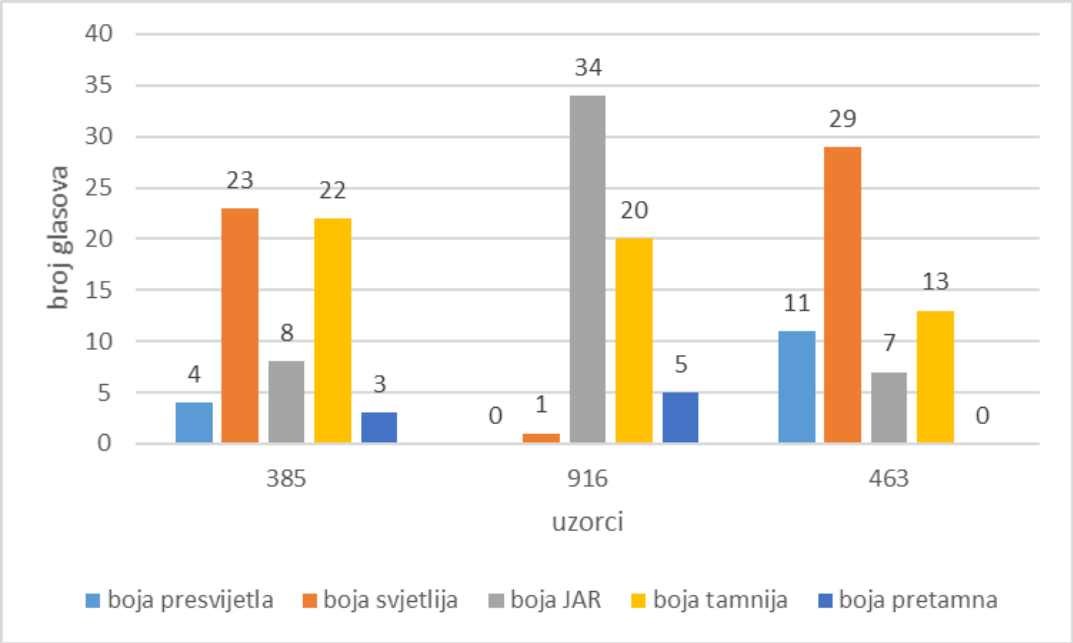
4.8.Analiza senzorskih svojstava ispitivanih *smoothie* napitaka

U svrhu ispitivanja organoleptičke kvalitete dobivenih napitaka provedena je analiza senzorskih svojstava. Dobivene vrijednosti obrađene su ANOVA metodom, te su dobiveni rezultati prikazani u Tablici 24. Od strane senzorskog panela ispitani su kontrolni uzorak (pod šifrom 385), VHT obrađeni uzorak (pod šifrom 916) i TP obrađeni uzorak (šifra 463). Rezultati ispitivanja za pojedine parametre senzorskog ispitivanja prikazani su u Slikama 22. do 26., pri čemu je sveukupno dopadanje uzorka prikazano u Slici 27. Rezultati senzorske analize pokazani su i u slikama 28. i 29., pri čemu su vrijednosti za svaku od 14 ispitanih kategorija unesene u polarni (radar) dijagram kako bi se vizualno utvrdila odstupanja pojedinih ispitivanih uzoraka od željenog standarda.

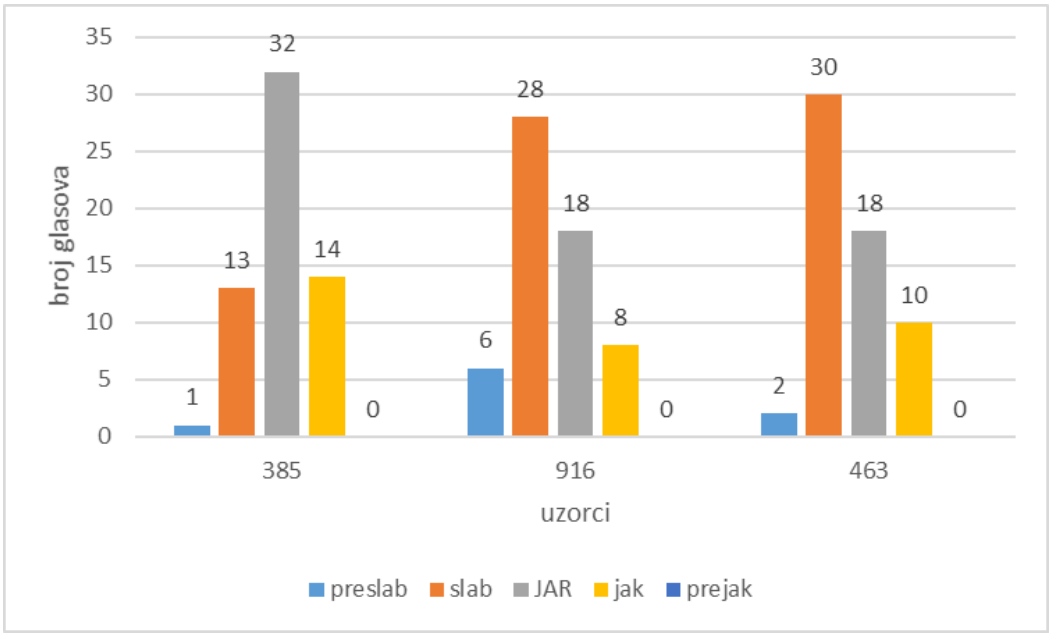
Tablica 23. ANOVA analiza organoleptičkog ispitivanja izabranih *smoothie* napitaka

SUMA NIZA	104	118	138		
	1.	2.	3.	PO PREFERENCIJI	
Anova: Jednofaktorska					
SUMMARY					
Grupe	*Broj*	*Suma*	*Srednja vrijednost*	*Varijanca*	
Kolona 1	60	104	1,733333	0,537853	
Kolona 2	60	118	1,966667	0,744633	
Kolona 3	60	138	2,3	0,586441	

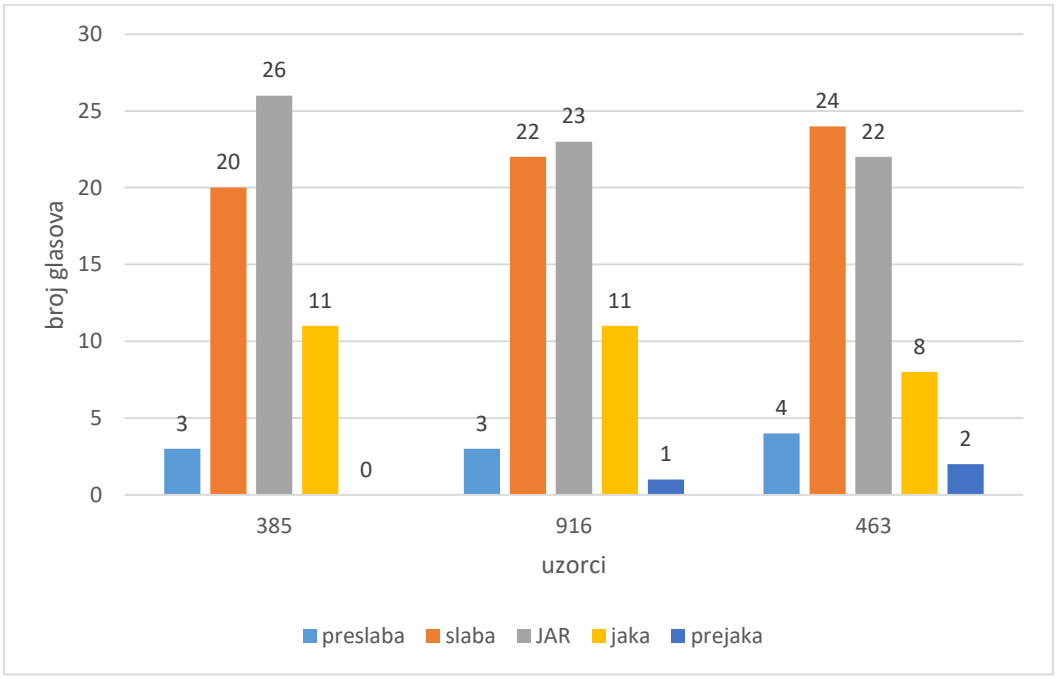
ANOVA						
Izvor varijancije	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-vrijednost*	*F krit*
Između grupa	9,733333	2	4,866667	7,811971	**0,000561**	3,047012
Unutar grupa	110,2667	177	0,622976			
Ukupno	120	179				



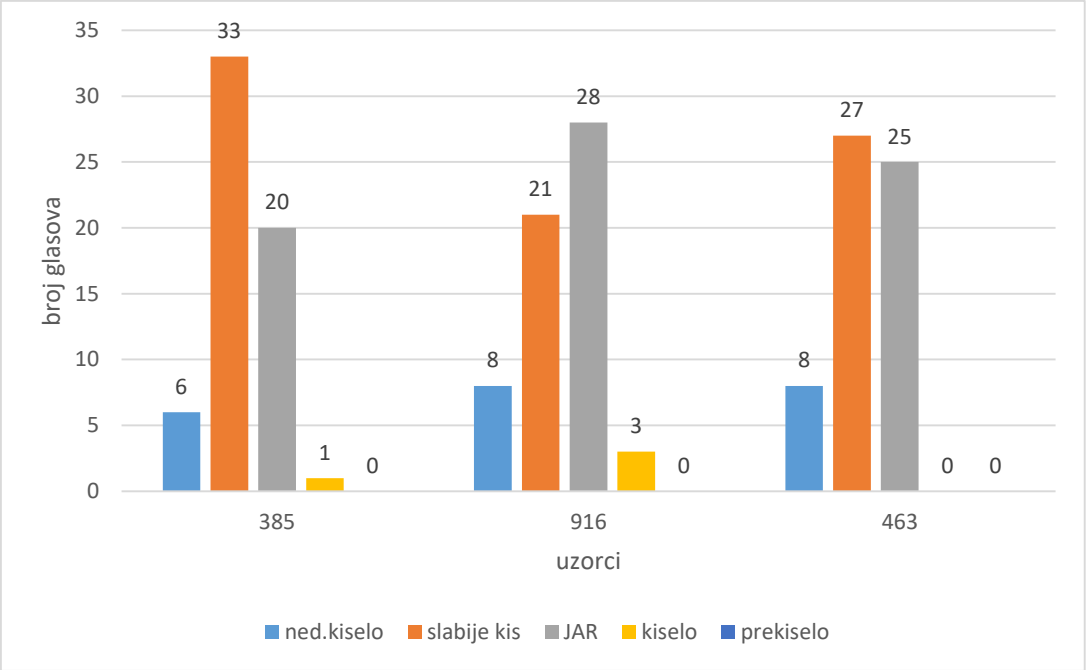
Slika 18. Potrošačka reakcija na boju ispitivanih *smoothie* napitaka



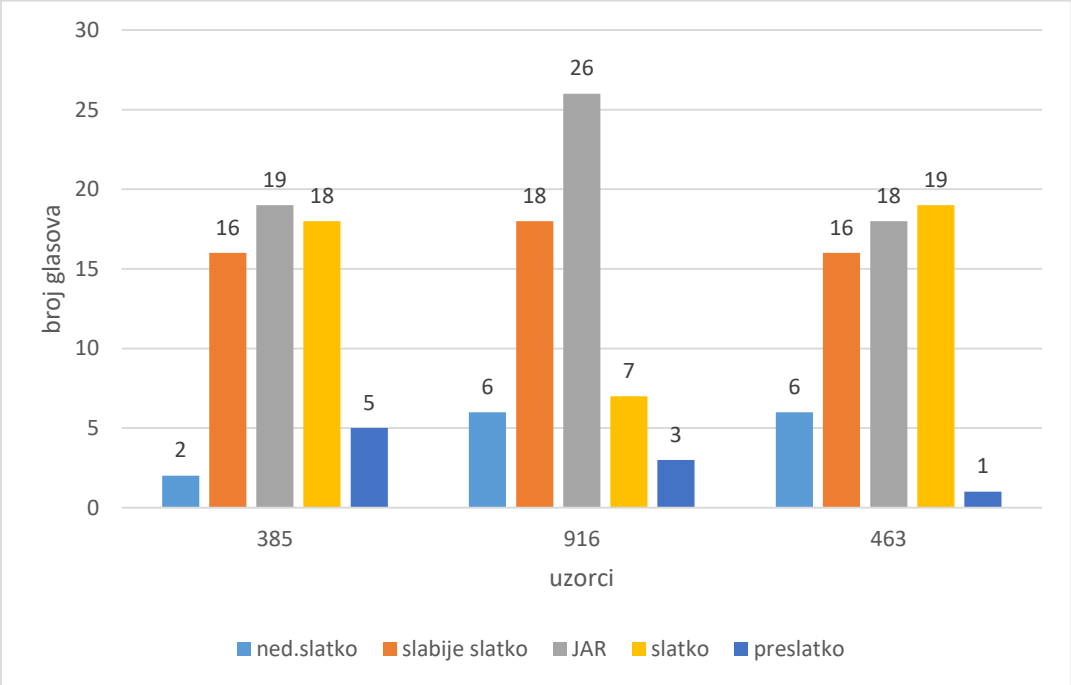
Slika 19. Potrošačka reakcija na miris istraživanih *smoothie* napitaka



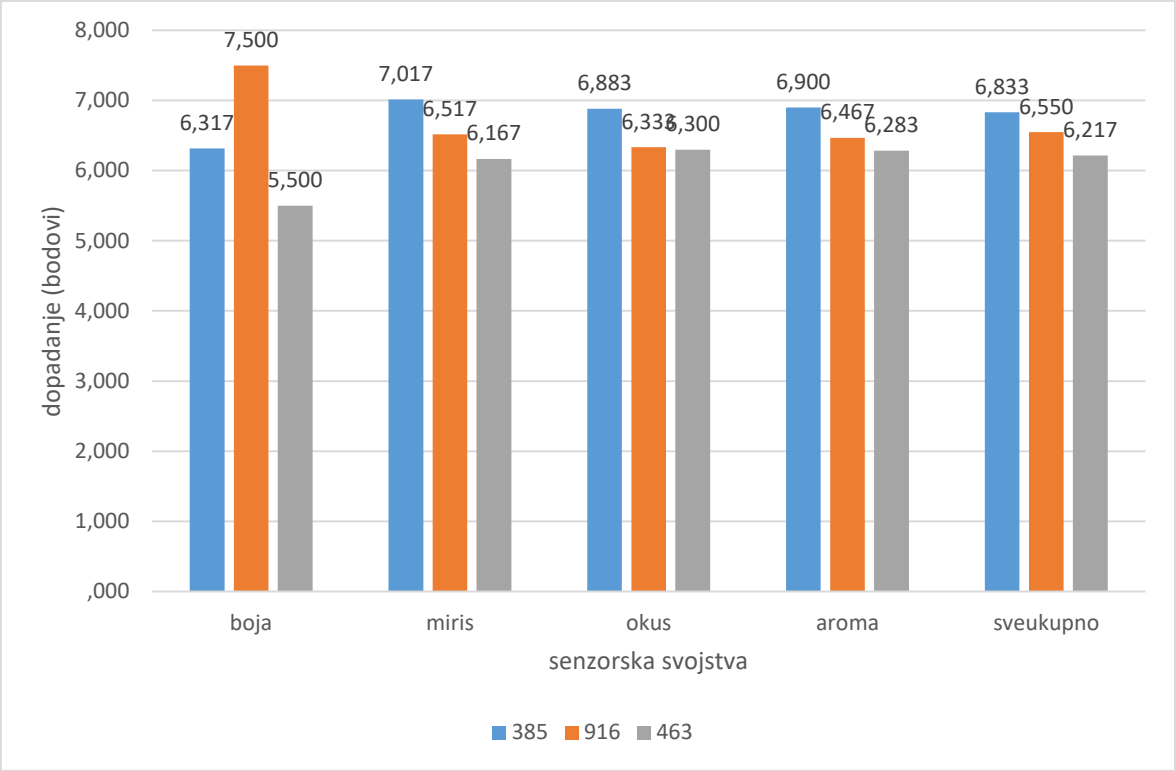
Slika 20. Potrošačka reakcija na aromu istraživanih *smoothie* napitaka



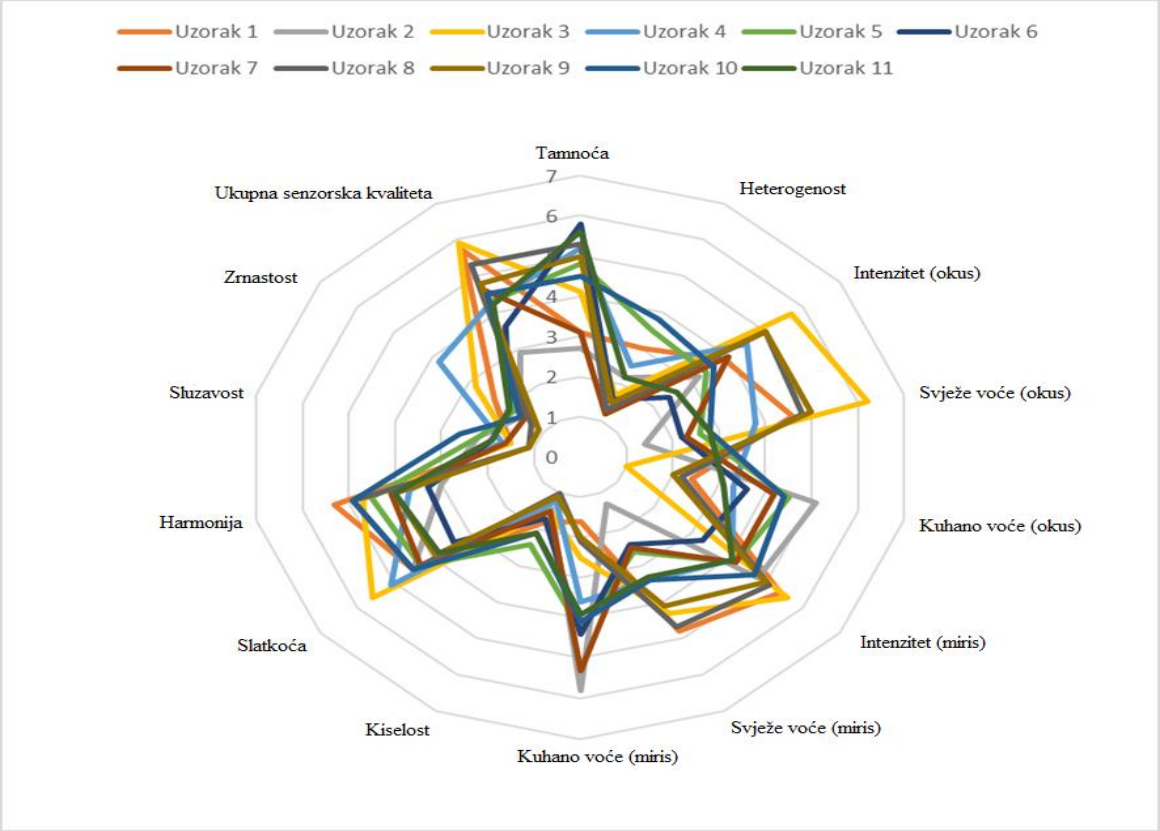
Slika 21. Potrošačka reakcija na kiselost istraživanih *smoothie* napitaka



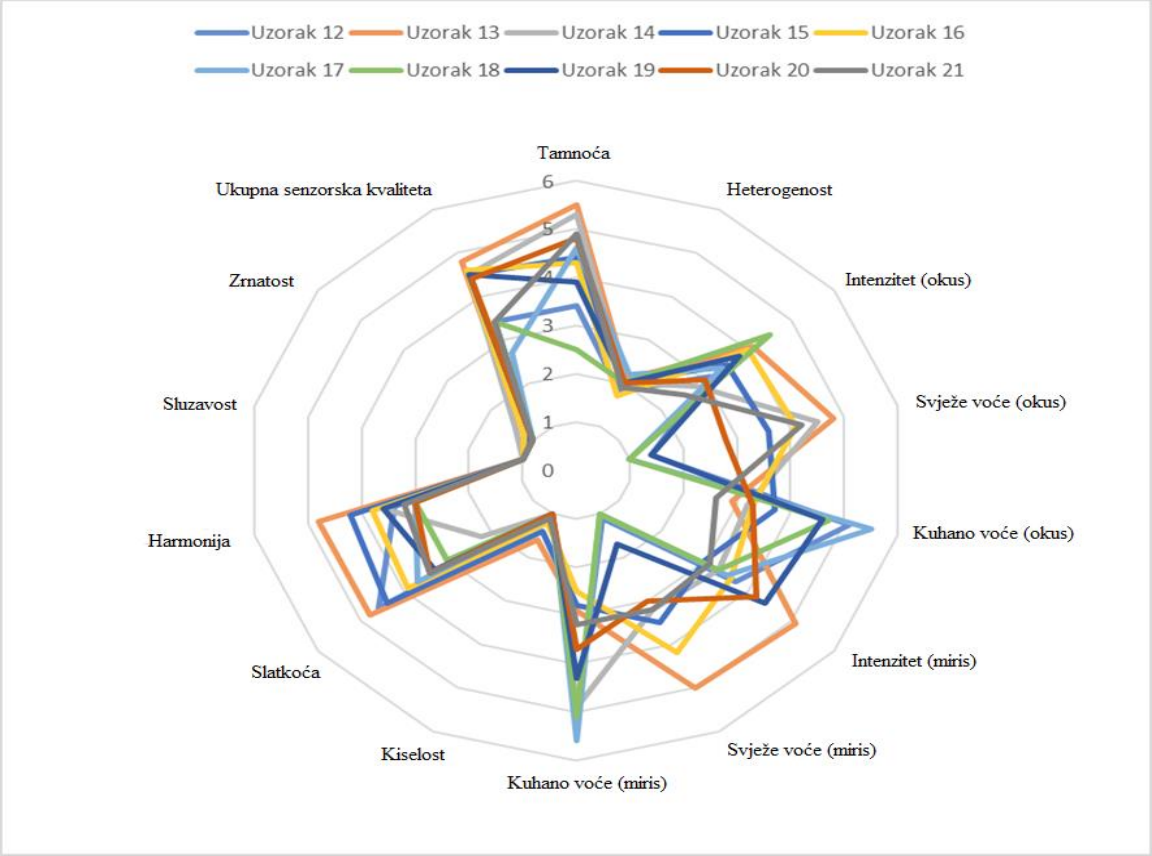
Slika 22. Potrošačka reakcija na slatkoću istraživanih *smoothie* napitaka



Slika 23. Sveukupno dopadanje i dopadanje pojedinih senzorskih svojstava istraživanih *smoothie* napitaka



Slika 24 Polarni dijagram organoleptičke analize uzoraka *smoothie* napitaka različitog sastava 1-11

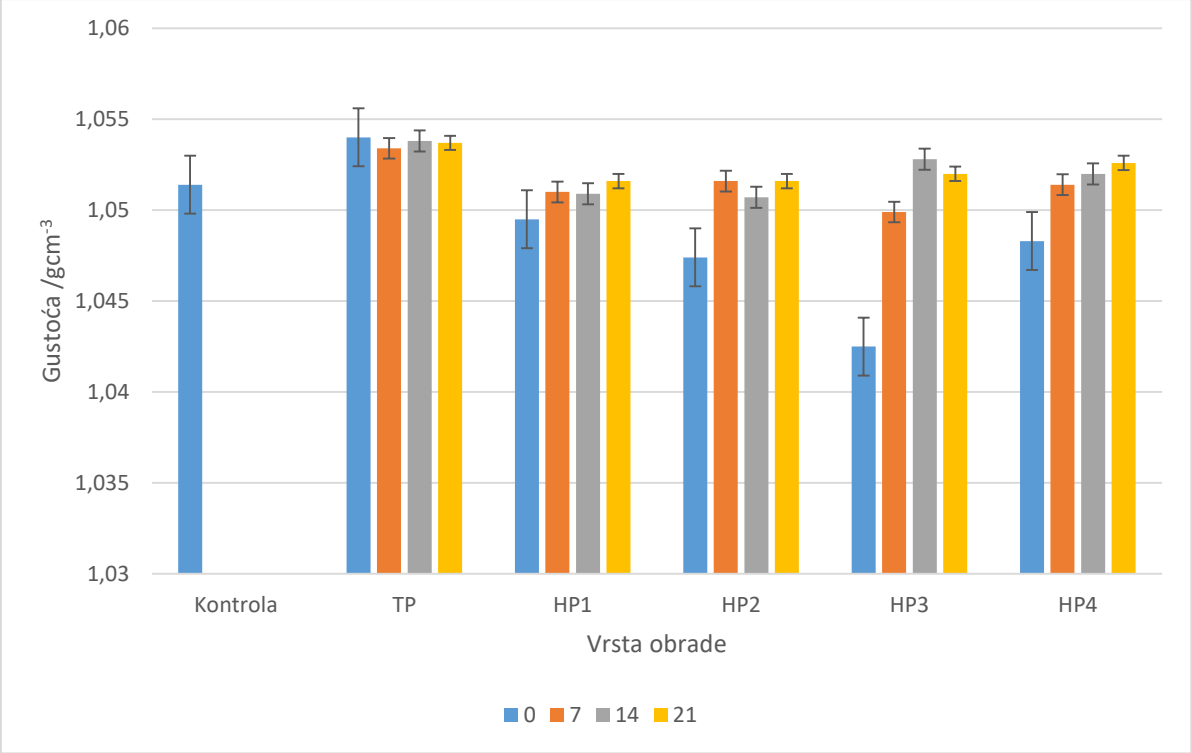


Slika 25 Polarni dijagram organoleptičke analize uzoraka *smoothie* napitaka različitog sastava 12-21

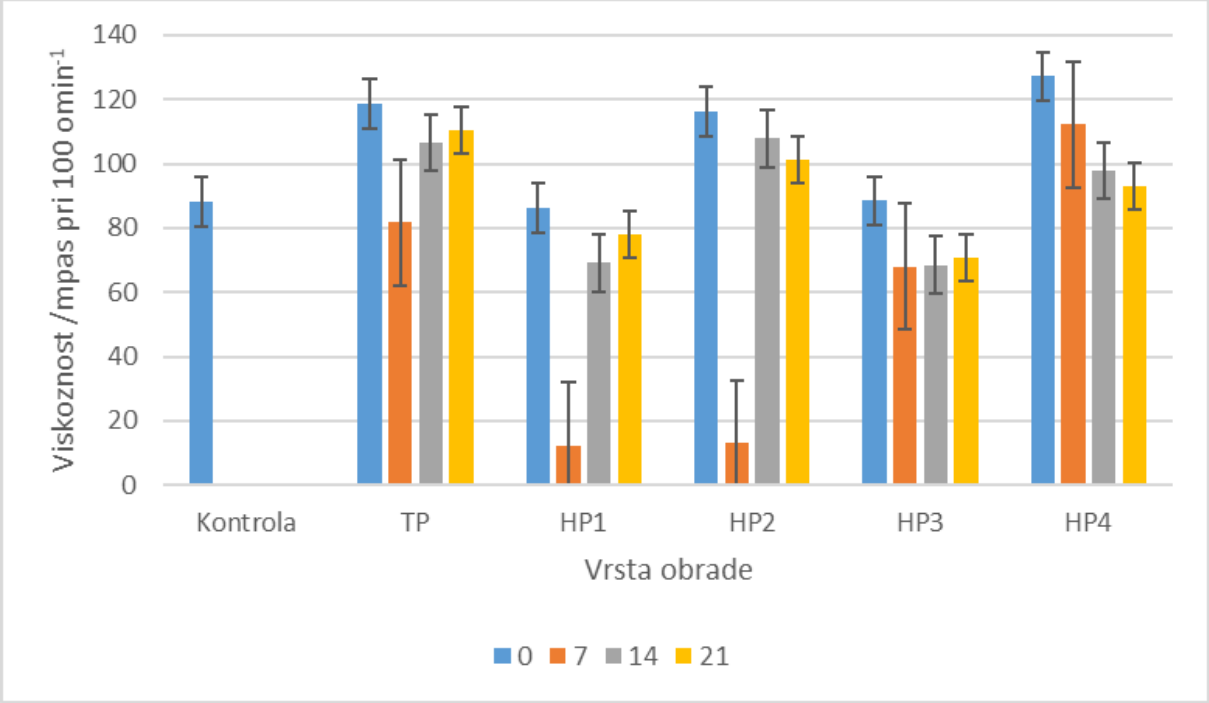
4.9.Utjecaj TP i VHT obrade, te vremena skladištenja na reološka svojstva i pH *smoothie* napitaka

Ispitan je utjecaj toplinske pasterizacije i obrade visokim hidrostatskim tlakom na gustoću, viskoznost i pH vrijednost smoothie napitaka. Utjecaj na gustoću odmah nakon TP i VHT tretmana, kao i tijekom vremena skladištenja u trajanju od 21 dan prikazan je na Slici 30. Nakon provedenih statističkih analiza (jednofaktorska ANOVA i post-hoc analiza), utvrđeno je da je odstupanje vrijednosti u usporedbi s kontrolnim uzorkom statistički bilo značajno. Provedena mjerenja prividne viskoznosti uzoraka također su pokazala statistički značajne razlike u viskoznosti TP, VHT i kontrolnih uzoraka, kao što je prikazano na Slici 31. Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je postojanje korelacije između gustoće, viskoznosti i vrste obrade. Dodatna analiza mjerenja viskoznosti na punom rasponu broja okretaja potvrdila je rezultate analize viskoznosti, te je prikazana na Slici 32.

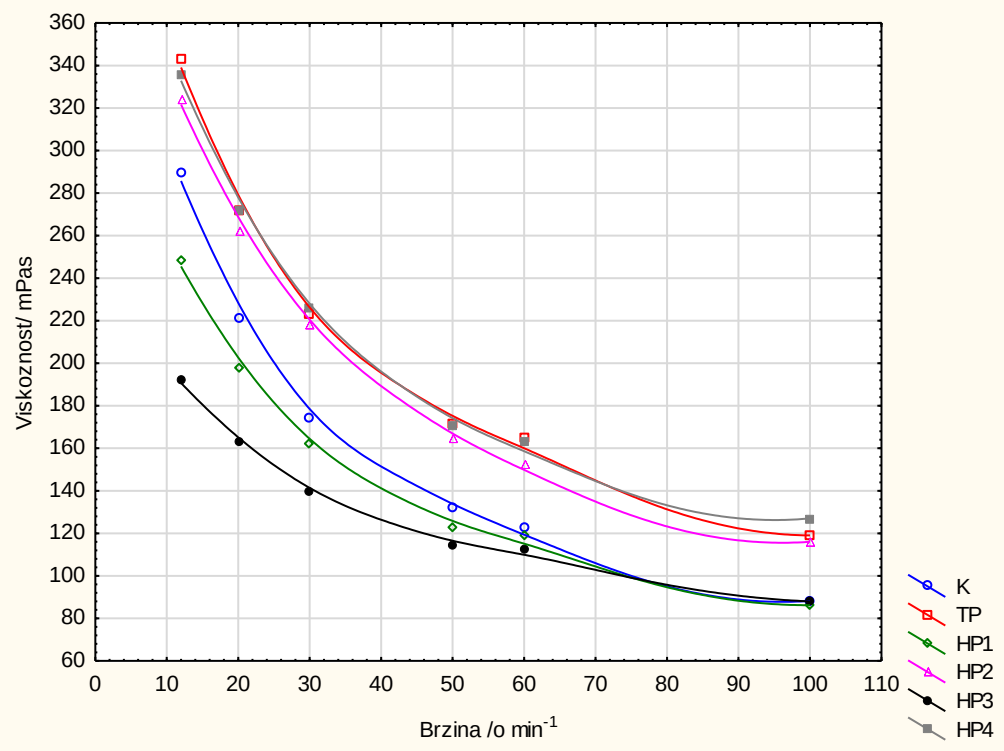
Analiza dobivenih pH vrijednosti prikazana je na slici 33. Rezultati analize pokazuju jasnu statistički značajnu korelaciju između vrste obrade i promjene u pH vrijednosti kroz 21 dan skladištenja.



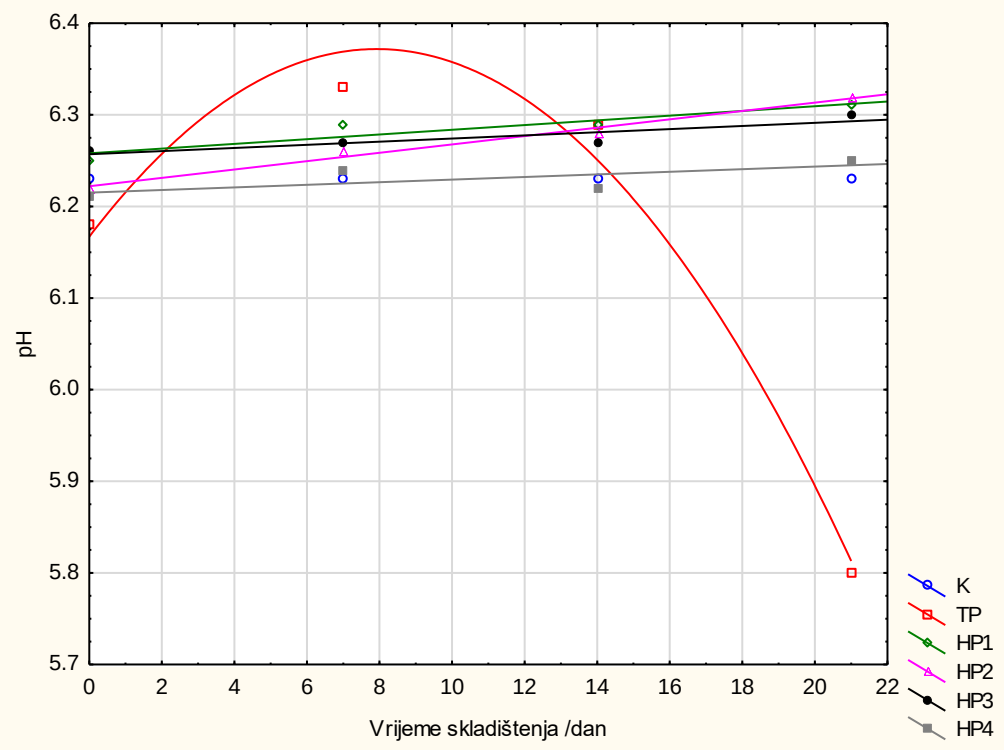
Slika 30. Utjecaj obrade i vremena skladištenja na gustoću



Slika 31. Utjecaj obrade i vremena skladištenja na viskoznost



Slika 26. Ovisnost dinamičke viskoznosti ispitivanih uzoraka o brzini okretaja



Slika 27. Utjecaj vremena skladištenja na pH vrijednost *smoothie* napitaka za sve ispitivane uzorke

4.10. Utjecaj vremena skladištenja na sadržaj bioaktivnih spojeva

Kao nastavak na poglavlje Klasterska analiza bioaktivnih tvari, dodatno je analiziran utjecaj vrste obrade i procesnih parametara na sadržaj bioaktivnih tvari, ali s posebnim naglaskom na utjecaj faktora vremena skladištenja. Rezultati analize odmah nakon obrade prikazani su u tablici 25., te konsekutivno za 7., 14. i 21. dan u Tablicama 26. do 28. Na slikama 34. do 39. grafički je prikazana ovisnost pojedine ispitane bioaktivne tvari (TPC, HCA, TFL, CAR i vitamin C) o vremenu skladištenja za TP i VHT uzorke, te je ANOVA analizom utvrđena ovisnost sadržaja bioaktivnih tvari o vremenu skladištenja. ANOVA metodom i Tukey HSD post-hoc testom analiziran je utjecaj parametara obrade i težina pojedinog parametra na sadržaj bioaktivnih tvari, te su rezultati prikazani u Tablicama 29. do 32., te grafički na Slikama 40. do 44.

Tablica 24. Rezultati analize bioaktivnih tvari - 0. dan

Uzorak	TPC /mg 100 mL^{-1}	HCA /mg 100 mL^{-1}	TFL /mg 100 mL^{-1}	Vitamin C /mg 100 mL^{-1}	CAR /mg 100 mL^{-1}
K	782,572 ± 14,14	51,511 ± 1,83	58,579 ± 0,46	27,480 ± 0,09	14,967 ± 0,60
TP-0	944,249 ± 6,35	44,290 ± 2,32	66,673 ± 0,37	5,587 ± 0,02	15,038 ± 0,42
VHT1-0	661,165 ± 1,52	39,858 ± 0,08	46,165 ± 3,68	23,526 ± 0,60	16,014 ± 0,05
VHT2-0	678,285 ± 5,27	36,138 ± 1,10	38,075 ± 1,83	16,353 ± 0,18	17,139 ± 0,43
VHT3-0	746,812 ± 24,12	37,797 ± 2,08	42,930 ± 1,80	14,712 ± 1,28	16,919 ± 0,31
VHT4-0	749,038 ± 15,34	45,702 ± 3,40	49,891 ± 1,92	10,897 ±0,08	15,030 ± 0,03

Tablica 25. Rezultati analize bioaktivnih tvari - 7. dan

Uzorak	TPC /mg 100 mL^{-1}	HCA /mg 100 mL^{-1}	TFL /mg 100 mL^{-1}	Vitamin C /mg 100 mL^{-1}	CAR /mg 100 mL^{-1}
TP-7	782,572 ± 14,14	51,511 ± 1,83	58,579 ± 0,46	27,480 ± 0,09	14,967 ± 0,60
VHT1-7	944,249 ± 6,35	44,290 ± 2,32	66,673 ± 0,37	5,587 ± 0,02	15,038 ± 0,42
VHT2-7	661,165 ± 1,52	39,858 ± 0,08	46,165 ± 3,68	23,526 ± 0,60	16,014 ± 0,05
VHT3-7	678,285 ± 5,27	36,138 ± 1,10	38,075 ± 1,83	16,353 ± 0,18	17,139 ± 0,43
VHT4-7	746,812 ± 24,12	37,797 ± 2,08	42,930 ± 1,80	14,712 ± 1,28	16,919 ± 0,31

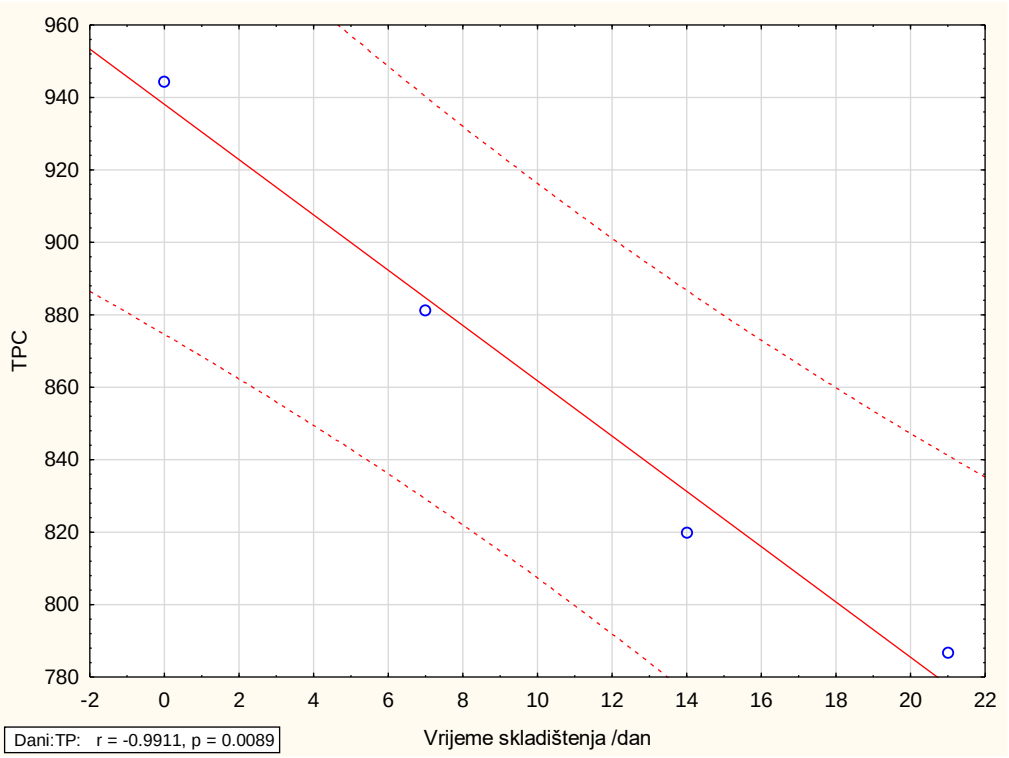
Tablica 26. Rezultati analize bioaktivnih tvari - 14. dan

Uzorak	TPC /mg 100 mL^{-1}	HCA /mg 100 mL^{-1}	TFL /mg 100 mL^{-1}	Vitamin C /mg 100 mL^{-1}	CAR /mg 100 mL^{-1}
TP-14	819,916 ± 10,89	33,883 ± 2,47	55,556 ± 1,21	0,000 ± 0,00	11,279 ± 0,05
VHT1-14	621,246 ± 14,46	37,217 ± 0,07	63,212 ± 0,36	9,401 ± 0,16	12,698 ± 0,29
VHT2-14	673,932 ± 2,12	33,918 ± 2,71	44,715 ± 0,58	9,575 ± 0,03	12,694 ± 0,01
VHT3-14	736,388 ± 11,10	30,314 ± 1,65	37,649 ± 0,72	6,634 ± 0,11	11,458 ± 0,40
VHT4-14	664,719 ± 7,40	32,922 ± 0,27	34,223 ± 0,37	7,433 ± 0,06	10,437 ± 0,20

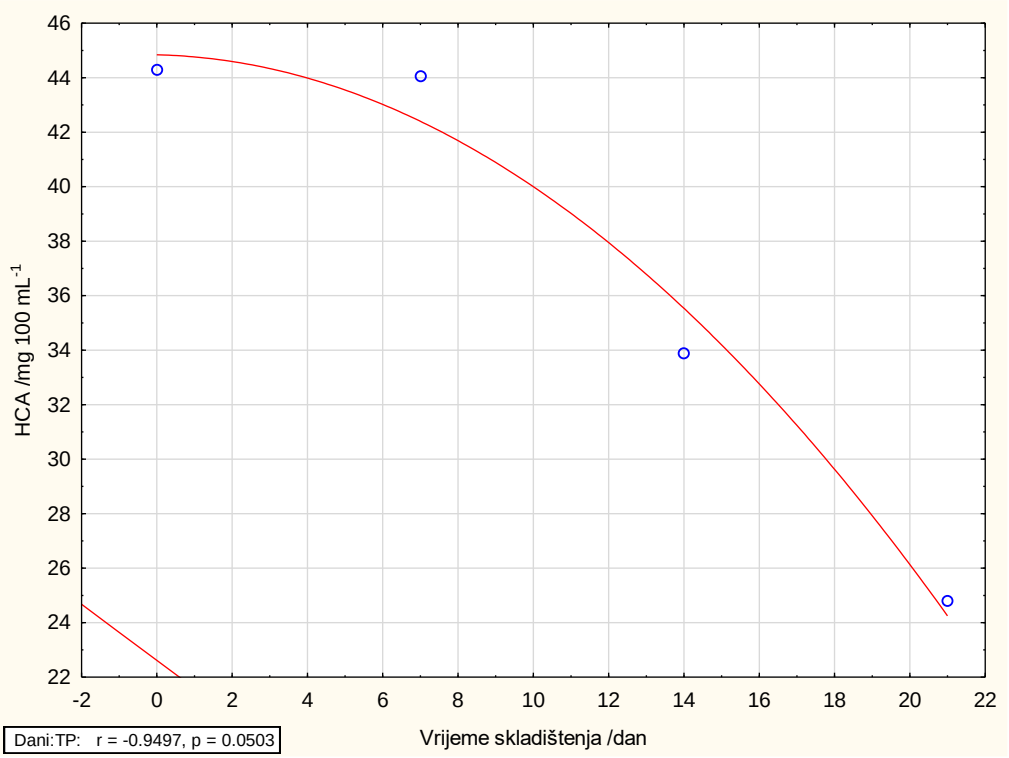
Tablica 27. Rezultati analize bioaktivnih tvari - 21. dan

Uzorak	TPC /mg 100 mL^{-1}	HCA /mg 100 mL^{-1}	TFL /mg 100 mL^{-1}	Vitamin C /mg 100 mL^{-1}	CAR /mg 100 mL^{-1}
TP-21	625 ± 12,05	24,802 ± 2,68	55,216 ± 2,96	0,000 ± 0,00	10,509 ± 0,11
VHT1-21	653,991 ± 9,53	29,853 ± 0,41	40,722 ± 1,95	6,811 ± 0,02	11,612 ± 0,14
VHT2-21	699,882 ± 4,34	30,010 ± 0,42	56,060 ± 2,23	5,693 ± 0,02	10,670 ± 0,09
VHT3-21	743,371 ± 14,20	32,335 ± 1,99	43,046 ± 1,04	5,559 ± 0,10	11,649 ± 0,09
VHT4-21	607,669 ± 13,36	32,074 ± 0,24	48,138 ± 1,15	4,345 ± 0,04	11,243 ± 0,10

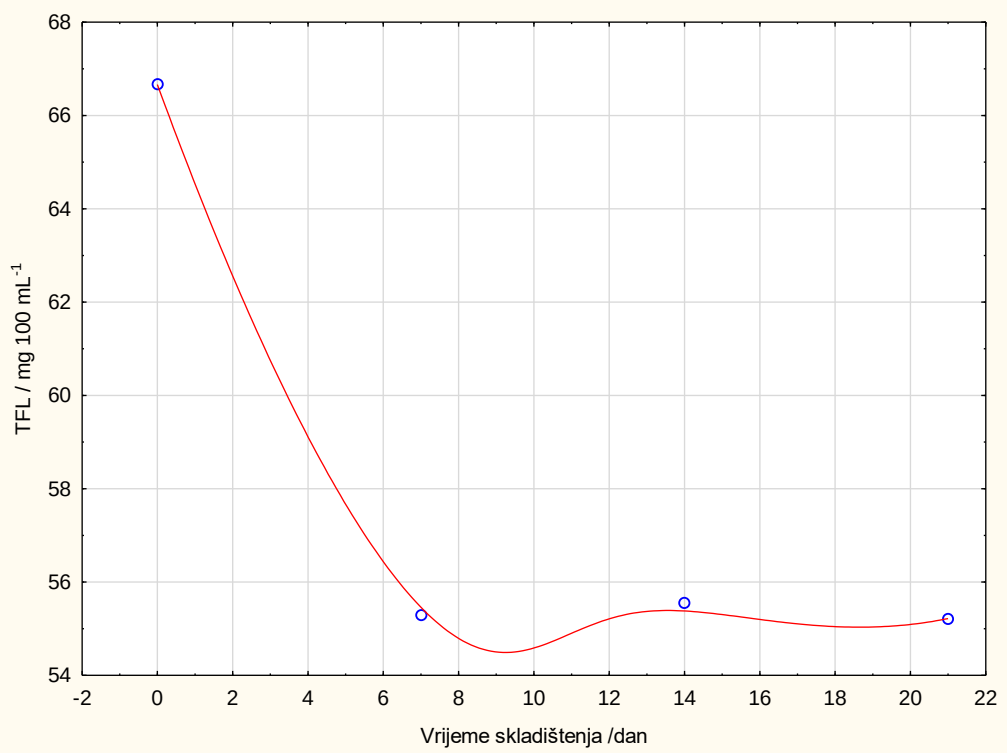
4.11. Analiza utjecaja vremena skladištenja na bioaktivne spojeve



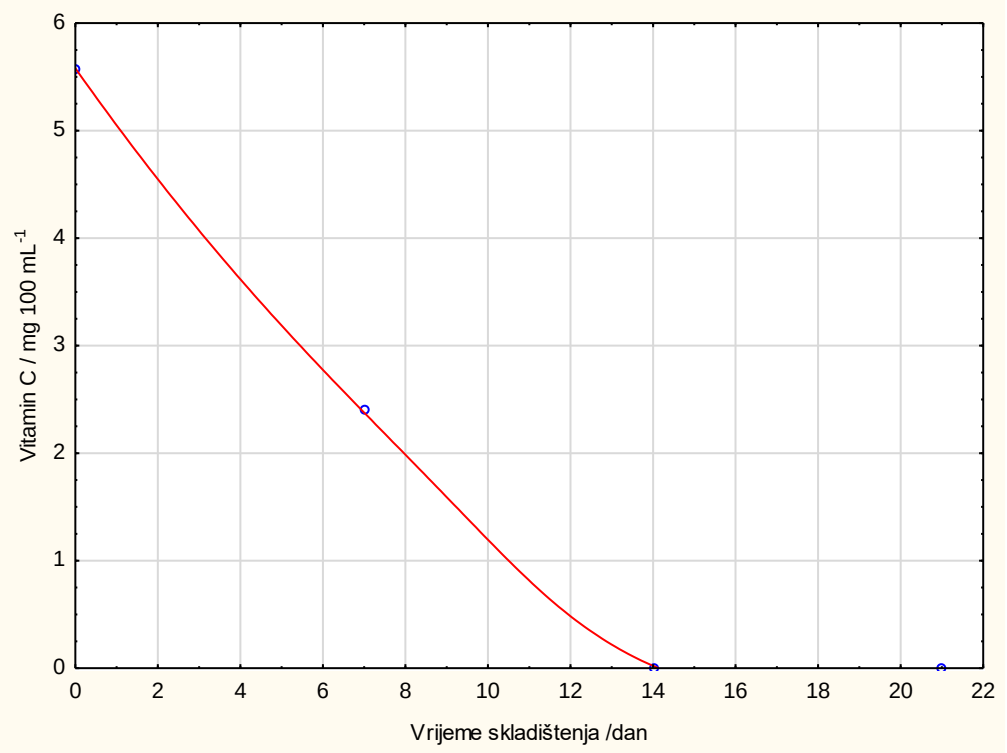
Slika 28. Utjecaj vremena skladištenja na TPC toplinski obrađenih uzoraka



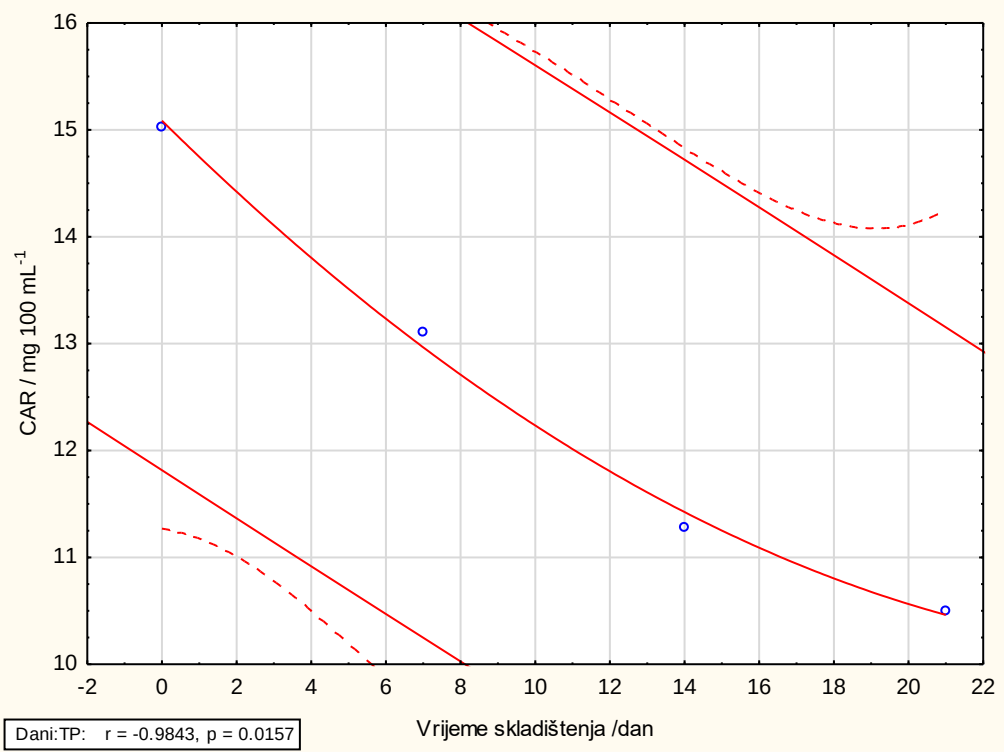
Slika 29. Utjecaj vremena skladištenja na HCA toplinski obrađenih uzoraka



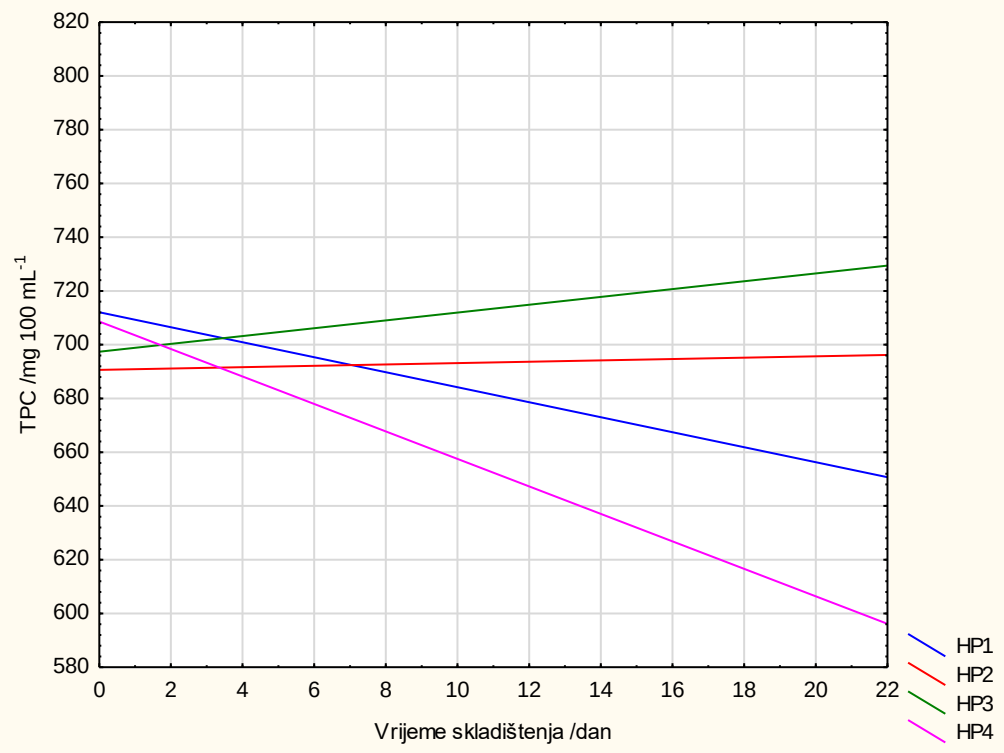
Slika 30. Utjecaj vremena skladištenja na TFL toplinski obrađenih uzoraka



Slika 31. Utjecaj vremena skladištenja na vitamin C toplinski obrađenih uzoraka

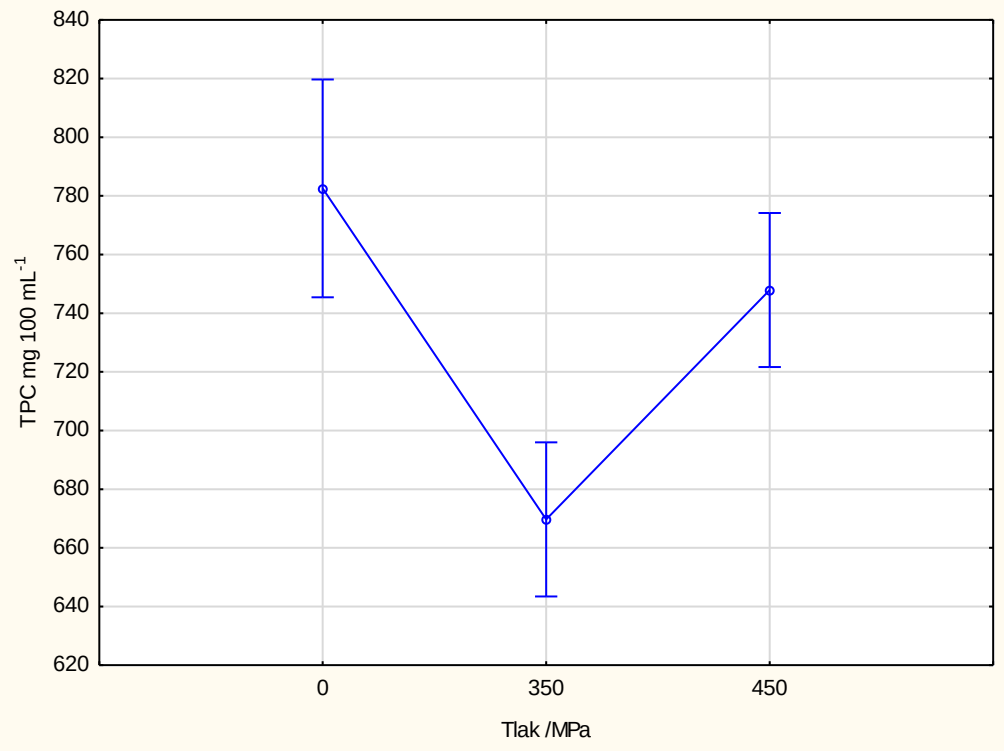


Slika 32. Utjecaj vremena skladištenja na CAR toplinski obrađenih uzoraka



Slika 33. Utjecaj vremena skladištenja na TPC uzoraka obrađenih visokim hidrostatskim tlakom

4.12. Analiza utjecaja procesnih parametara VHT na bioaktivne spojeve



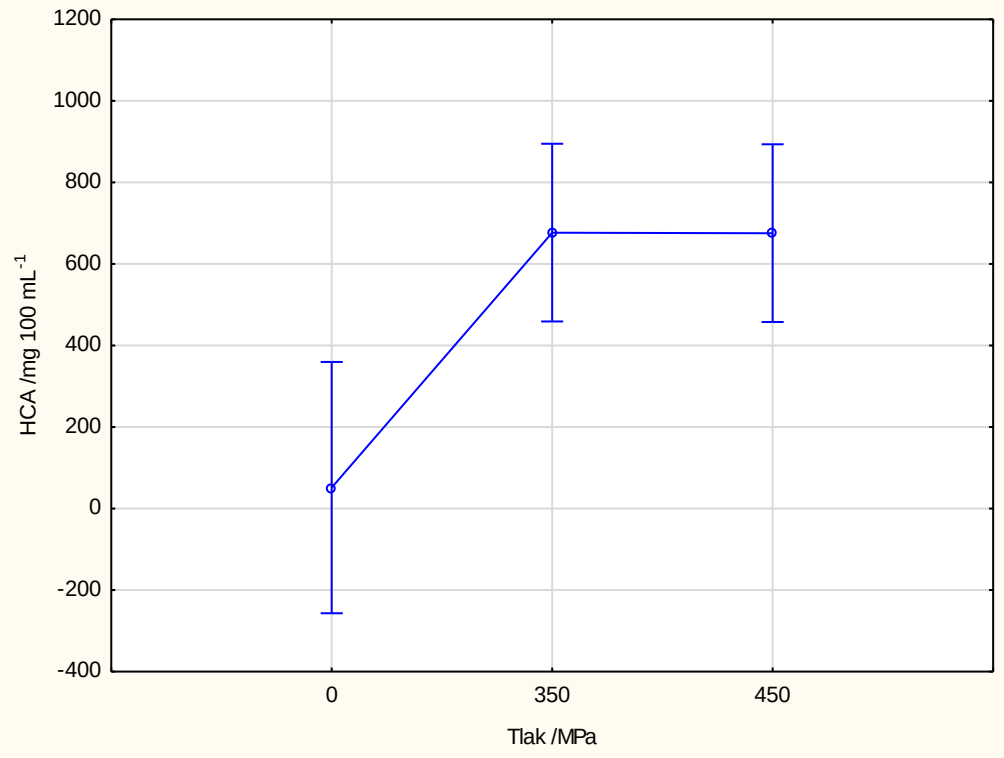
Slika 40. ANOVA - Analiza utjecaja tlaka na sadržaj TPC u *smoothie* napicima

Tablica 28. ANOVA - Ovisnost TPC o tlaku

Zavisna varijabla	Test SS čitavog modela vs. SS ostatka							
	Višestruki R	Višestruki R^2	Prilagođeni R^2	SS Model	SS Ostatak	M Ostatak	F	p
TPC	0,992956	0,985962	0,971923	10466,88	149,0292	74,51460	70,23375	**0,014038**

Tablica 29. Tukey HSD test za ovisnost TPC o tlaku

Cell No.	Tukey HSD test; variable TPC /mg 100 mL^{-1} Približne vrijednosti za pogrešku post hoc testova: Između MS = 55.455, df = 1.0000			
	Tlak /MPa	{1} 782.57	{2} 669.72	{3} 747.92
1	0		0.077088	0.243839
2	350	0.077088		0.090692
3	450	0.243839	0.090692	



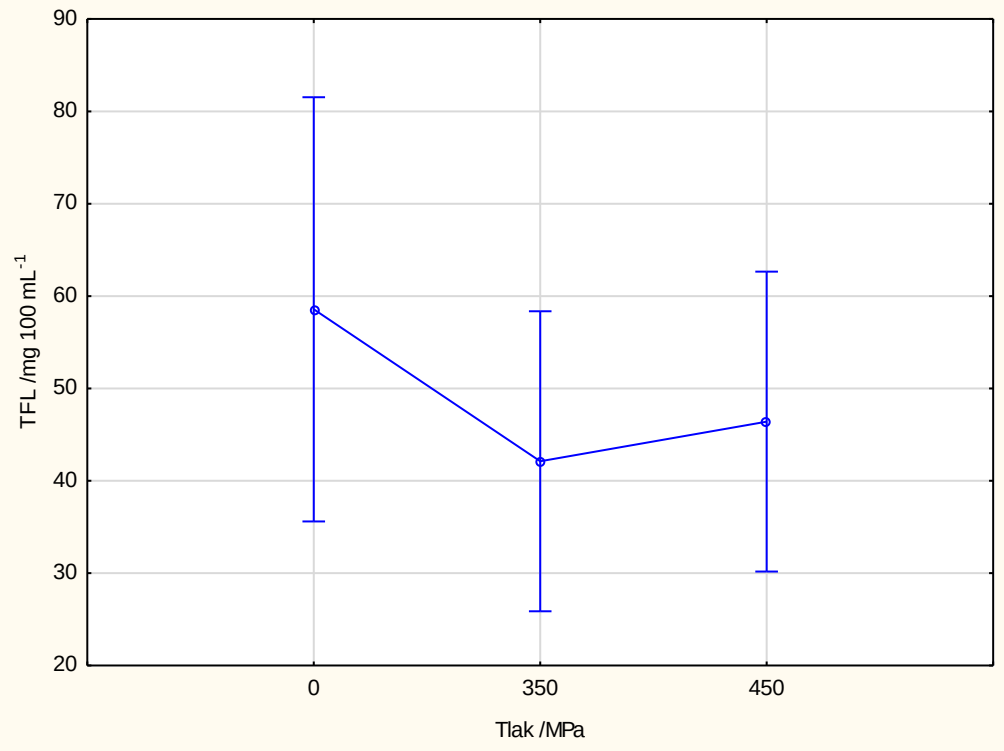
Slika 41. ANOVA - analiza utjecaja tlaka na sadržaj HCA u *smoothie* napicima

Tablica 30. ANOVA – ovisnost sadržaja HCA o tlaku

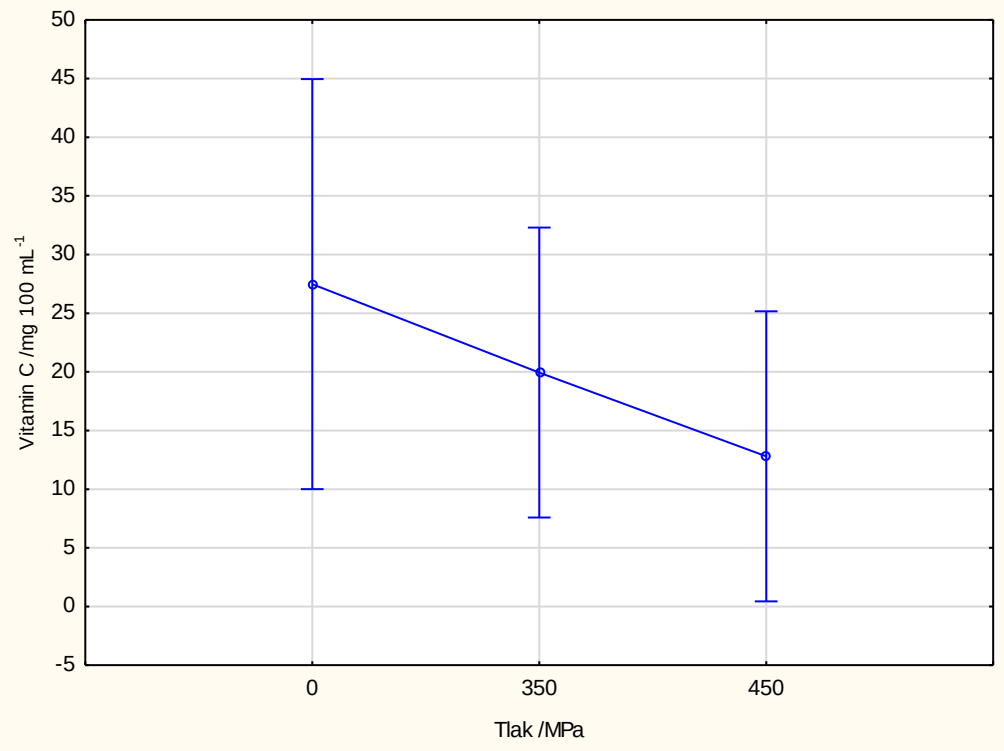
Ovisna variabla	Test SS cijelog modela vs. SS ostatka									
	Višestruk R	Višestruk R^2	Prilagođen R^2	SS Model	df Model	MS Model	SS Zaostao	MS Zaostao	F	p
HCA	0,983963	0,968183	0,936366	312220,4	2	156110,2	10260,42	5130,211	30,42959	0,031817

Tablica 31. Tukey HSD test za ovisnost TPC o tlaku

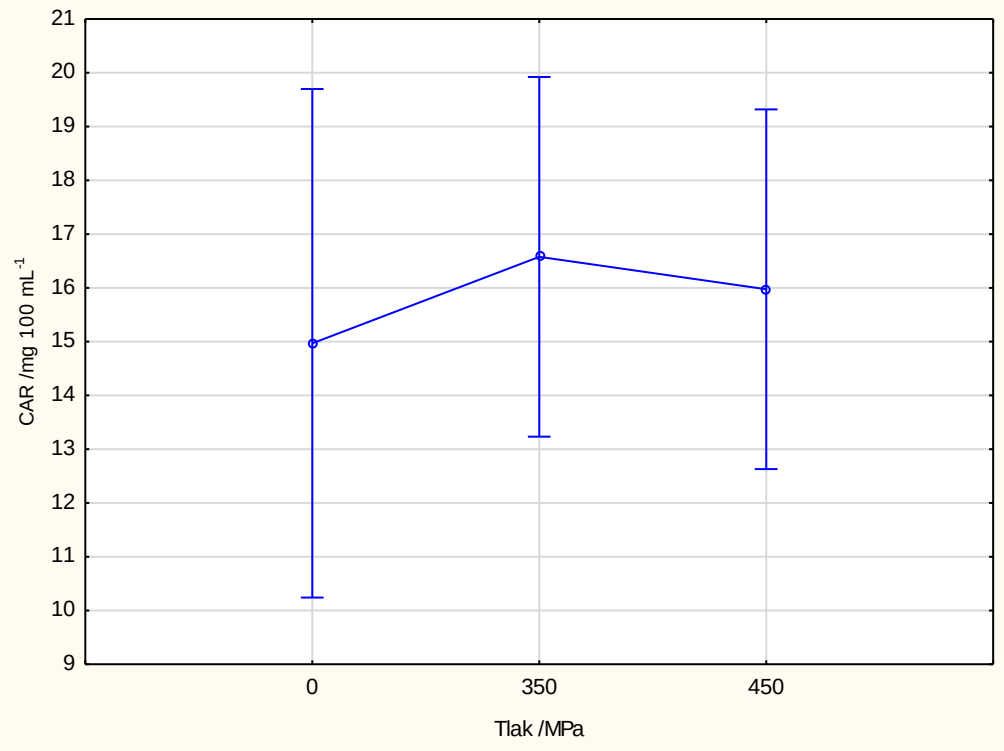
Cell No.	Tukey HSD test; variable TPC /mg 100 mL^{-1} Približne vrijednosti za pogrešku post hoc testova: Između MS = 19.080, df = 2.0000			
	Tlak /MPa	{1} 51.510	{2} 37.998	{3} 41.749
1	0		0.222492	0.353926
2	350	0.222492		0.711508
3	450	0.353926	0.711508	



Slika 34. ANOVA - analiza utjecaja tlaka na sadržaj TFL u *smoothie* napicima



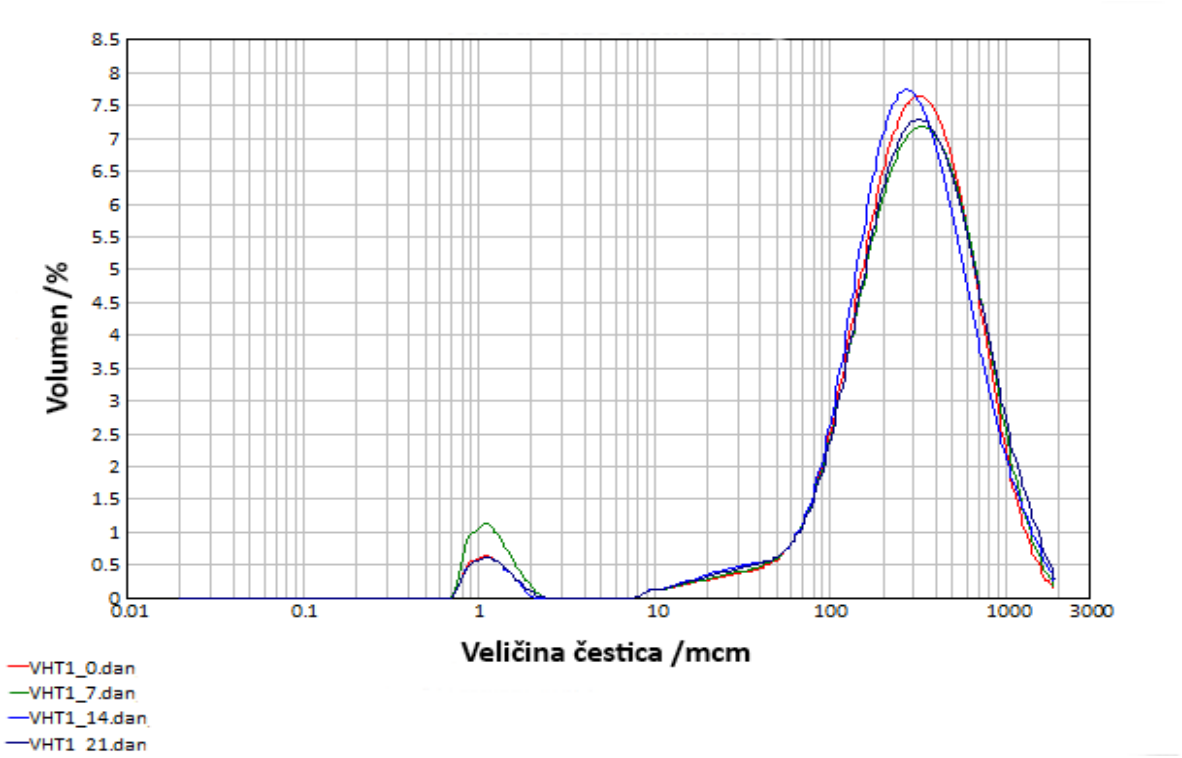
Slika 35. ANOVA - analiza utjecaja tlaka na sadržaj vitamina C u *smoothie* napicima



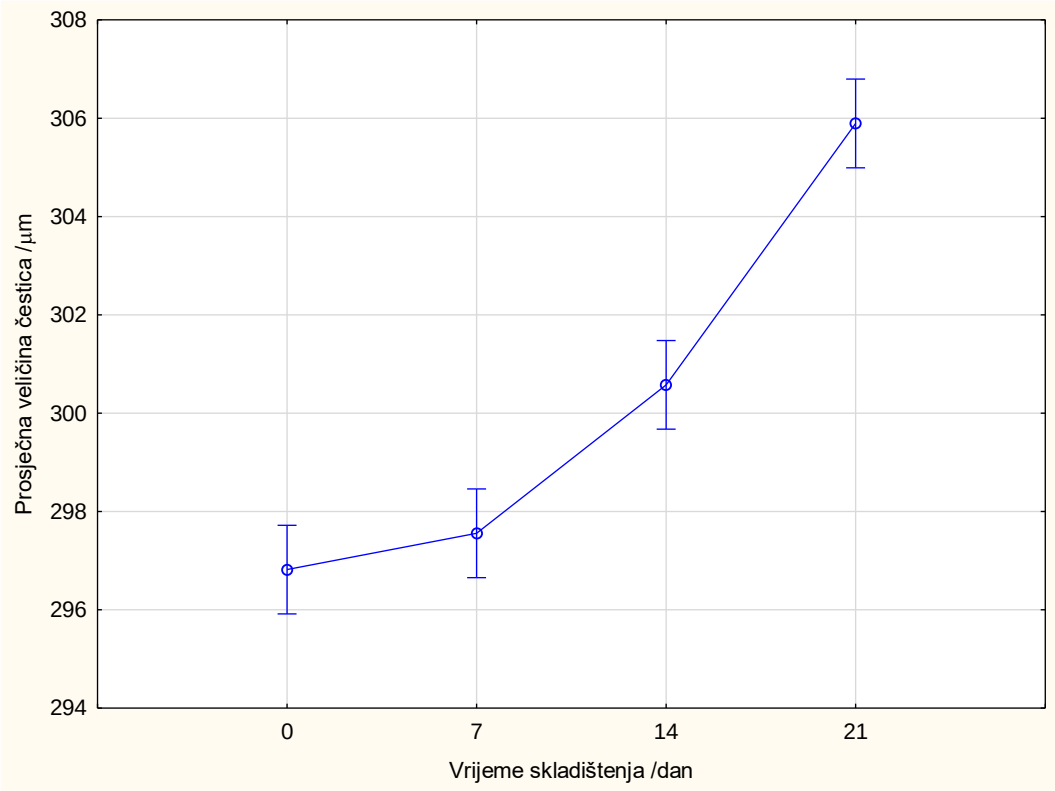
Slika 36. Analiza utjecaja tlaka na sadržaj CAR u *smoothie* napicima

4.13. Analiza raspodjele veličine čestica

Provedena raspodjela veličine čestica prikazana je frekvencijskim krivuljama. Utvrđen je odnos između relativne učestalosti, te volumena i promjera čestica za kontrolni napitak, te VHT i TP obrađene napitke. Određen je i utjecaj vremena skladištenja na raspodjelu veličine čestica. Utjecaj vremena skladištenja na veličinu čestica VHT i TP obrađenih uzoraka prikazan je na Slikama 45. i 46. Utjecaj TP i VHT obrade na raspodjelu veličine čestica utvrđen je usporedbom s kontrolnim uzorkom, te je rezultat prikazan na Slici 49. Ispitani utjecaj procesnih parametara visokog tlaka prikazan je na Slici 50.



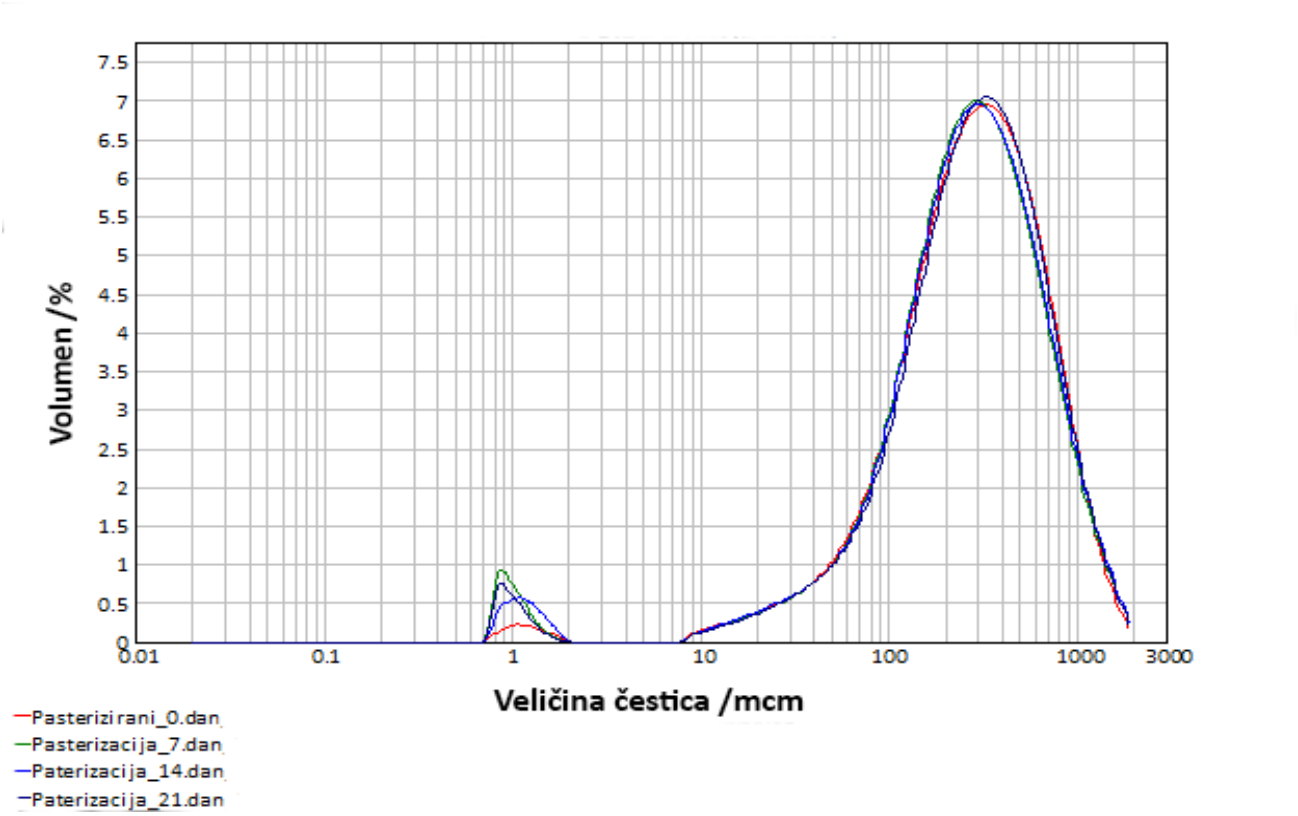
Slika 37. Ovisnost raspodjele veličine čestica VHT uzoraka o vremenu skladištenja



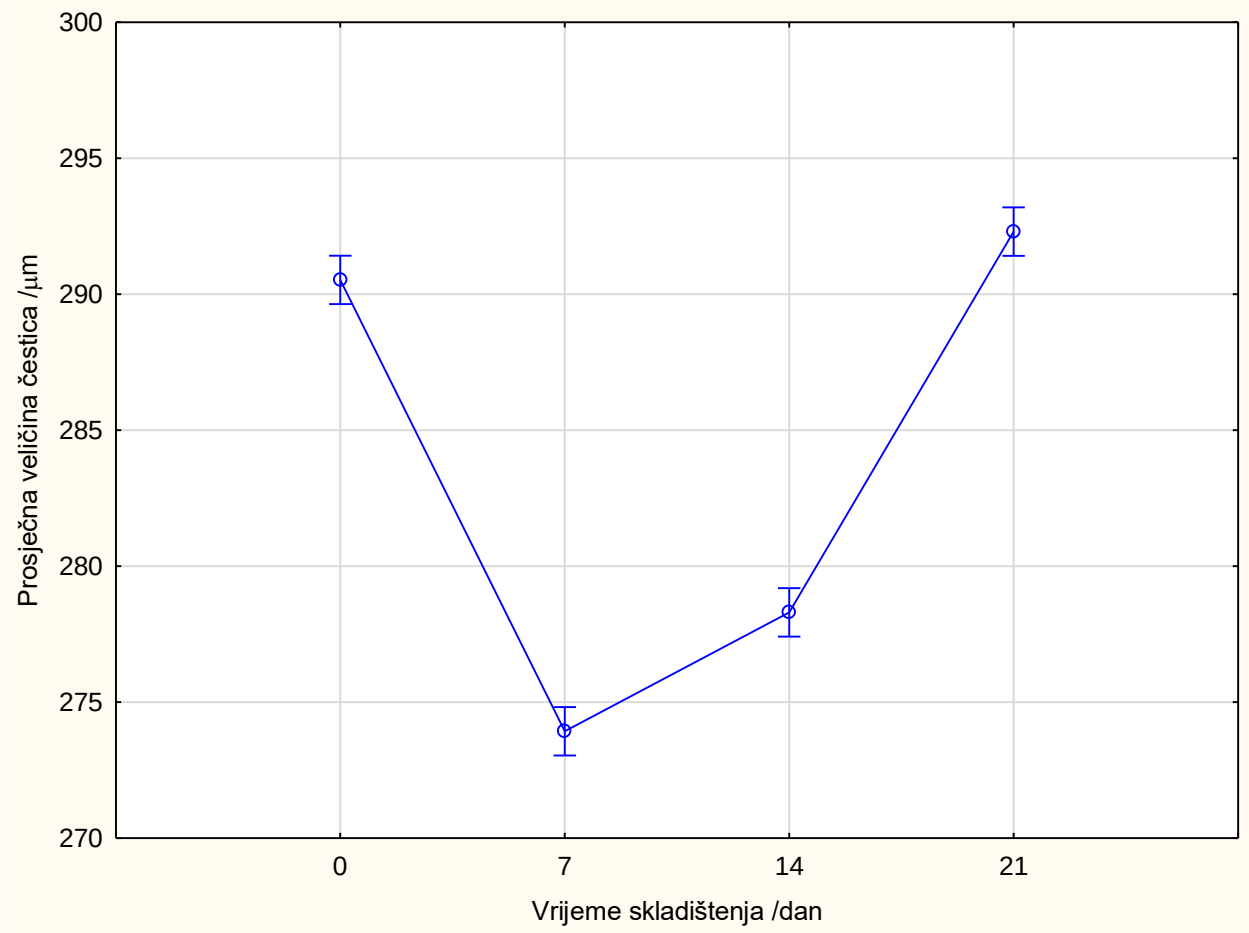
Slika 38. Analiza utjecaja vremena skladištenja na srednju vrijednost veličine čestica VHT uzoraka

Tablica 32. ANOVA analiza utjecaja vremena skladištenja na veličinu čestica VHT

Efekt	SS	Stupnjevi slobode	MS	F	p
Konstantni član	721012.0	1	721012.0	3419326	0.000000
Vrijeme skladištenja /dan	102.0	3	34.0	161	0.000126
Greška	0.8	4	0.2		



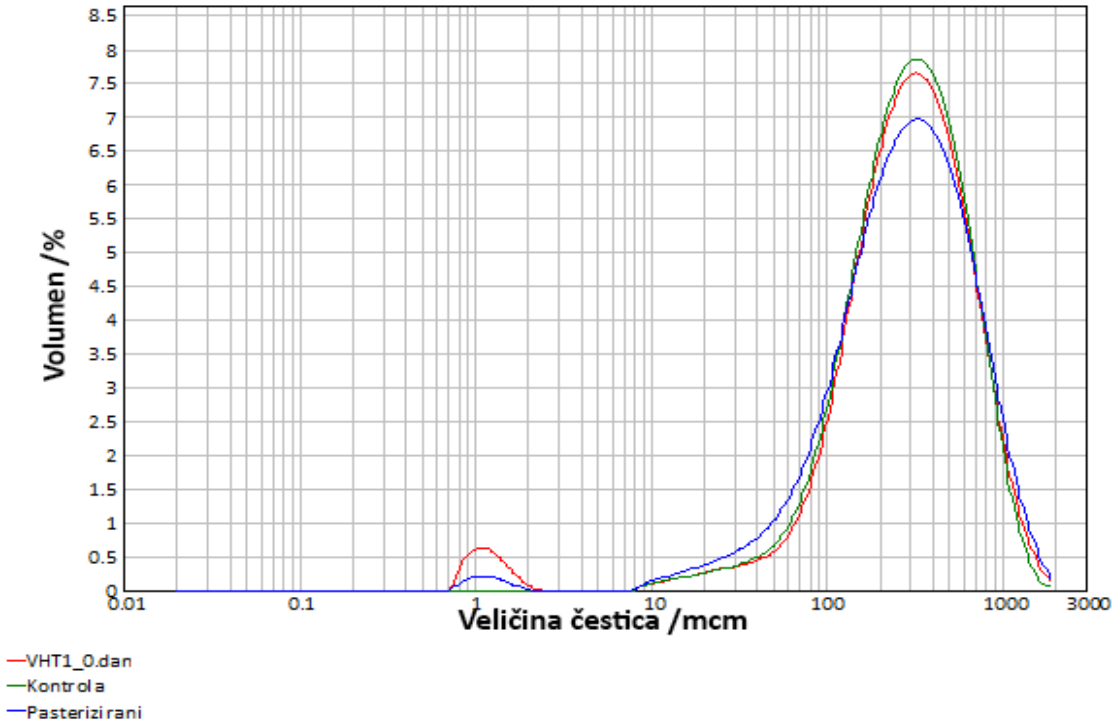
Slika 39. Ovisnost raspodjele veličine čestica TP uzoraka o vremenu skladištenja



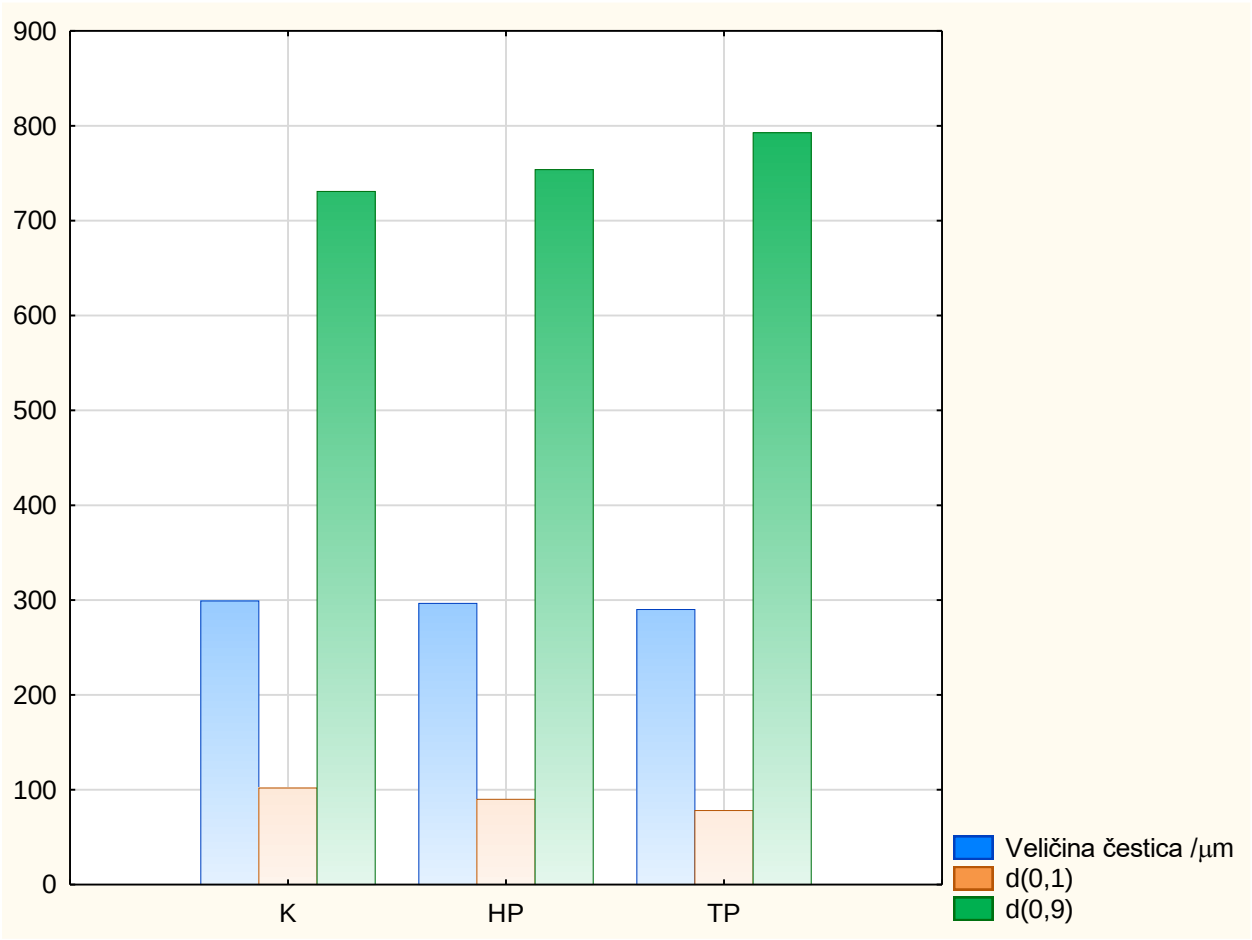
Slika 40. Analiza utjecaja vremena skladištenja na srednju vrijednost veličine čestica TP uzoraka

Tablica 33. ANOVA analiza utjecaja vremena skladištenja na veličinu čestica TP

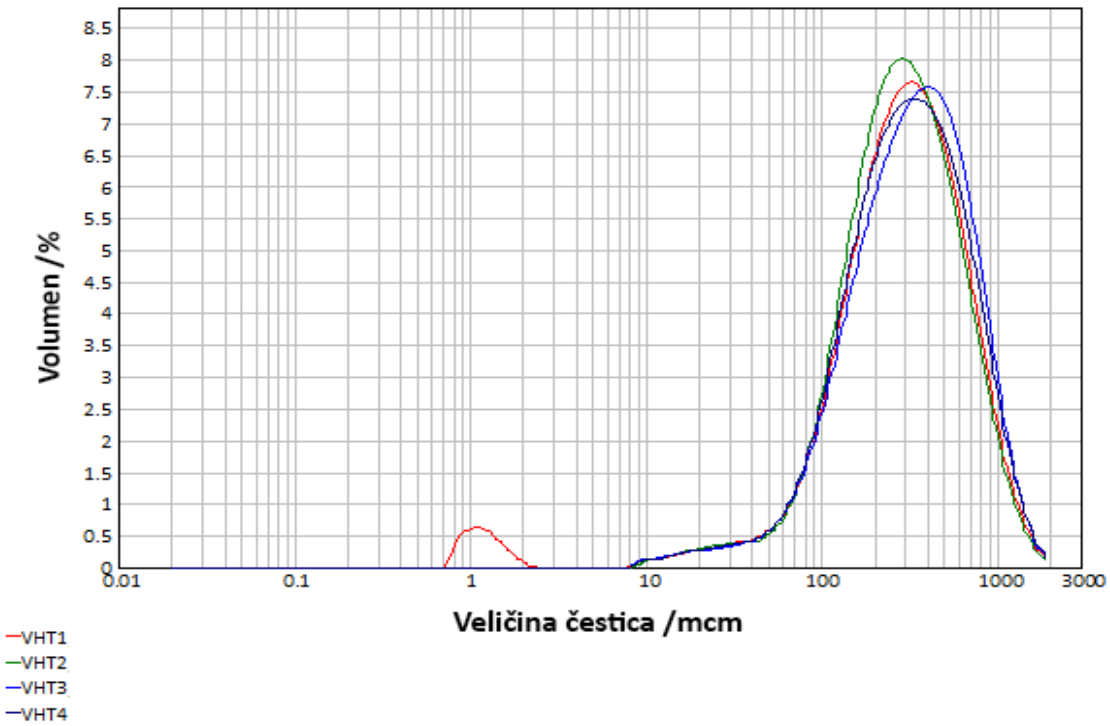
Efekt	SS	Stupnjevi slobode	MS	F	p
Konstantni član	644176.1	1	644176.1	3137253	0.000000
Vrijeme skladištenja /dan	490.4	3	163.5	796	0.000005
Greška	0.8	4	0.2		



Slika 41. Raspodjela veličine čestica kontrolnog, te TP i VHT obrađenih uzoraka



Slika 42. Usporedba parametara raspodjele veličine čestica kod HP i TP obrade s kontrolnim uzorkom



Slika 43. Utjecaj procesnih parametara visokotlačne obrade na raspodjelu veličine

5. RASPRAVA

5.1. Odabir *smoothie* napitaka

Na temelju 20 polaznih uzoraka *smoothie* napitaka različitih sastava i omjera voća, povrća i bademovog napitka provedena je senzorska analiza. Izabrano je 12 senzorskih karakteristika (slatkoća, kiselost, harmoničnost, sluzavost, zrnatost, svjetlina, homogenost, intenzitet, svježina voća, kuhanost voća i ukupna senzorska kvaliteta). Pomoću klasterske analize uzorci s nepoželjnim senzorskim karakteristikama nisu dalje razmatrani, te su uzorci sa sličnim senzorskim svojstvima grupirani. S obzirom na broj uzoraka, kako bi se pojednostavilo utvrđivanje odnosa različitih ispitivanih faktora (senzorskih karakteristika), izrađena je analiza prikazana u Slikama 19. i 20. Utvrdilo se da boja uzoraka 4, 6 i 11 ne odgovara željenim vrijednostima (svjetlina je bila premala). Analizom rezultata ukupne senzorske kvalitete eliminirani su uzorci 2, 12 i 17 (kvaliteta ispod 3). Uzorci 4, 8, 9, 14, 18, 19, 20 i 21 su imali zadovoljavajuću kiselost, ali manju od optimalne, te su i oni odbačeni za nastavak istraživanja. Daljnjom analizom kombinacija ispitanih senzorskih svojstava uklonjeni su i svi ostali uzorci kako bi preostao jedan s najboljim svojstvima. Rezultati analize prikazani na Slikama 28. i 29. upućuju na to da je uzorak s oznakom 1 imao najbolja senzorska svojstva. Sva daljnja istraživanja provedena su s tim uzorkom.

5.2 Klasterska analiza – boja i bioaktivni spojevi

Za utvrđivanje odnosa unutar dobivenog skupa podataka prema **Error! Reference source not found.Error! Reference source not found.**. provedena je analiza hijerarhijskom Wardovom metodom klasteriranja, koja povezuje dva elementa iz grupe u klaster pri čemu se minimizira varijanca unutar klastera. Analizom su ispitane kolorimetrijske (na L*, a*, b*, C*, H*) i kemijske (na ukupan sadržaj fenola (TPC, mg 100 mL^{-1}), ukupan sadržaj hidroksicimetne kiseline (HCA mg 100 mL^{-1}), ukupan sadržaj flavonoida (TFL, mg 100 mL^{-1}), vitamin C (mg 100 mL^{-1}) i ukupan sadržaj karotenoida (CAR, mg 100 mL^{-1})) standardizirane sličnosti. Usporedbom svih uzoraka prema standardnim sličnostima, pokazalo se da su uzorci koji prema svojim svojstvima najviše odgovaraju kontrolnom uzorku bili VHT1-0, VHT2-0, VHT3-0, VHT4-0 i VHT1-7. To je očekivano s obzirom na dosadašnje rezultate ispitivanja utjecaja visokog hidrostatskog tlaka na voćne i povrtne sokove poput soka od nara (Ferrari i sur., 2010), soka od krastavaca (Liang i sur., 2013) i grožđa (Mert i sur., 2013) koji su pokazali minimalan utjecaj obrade na organoleptička, fizikalna i kemijska svojstva, te su ustanovili da je VHT metoda obrade vrlo učinkovita u inaktivaciji enzima poput polifenol oksidaze, peroksidaze i dr. u voćnim i povrtnim napitcima.

Na temelju dobivenog dendrograma može se iščitati da su za čitav ispitivani rok trajanja, tj. vrijeme skladištenja (21 dan) uzorci obrađeni visokim hidrostatskim tlakom bili sličniji kontrolnom uzorku u usporedbi s toplinski obrađenim uzorcima. Sličnost postaje sve očiglednija s protekom vremena skladištenja s obzirom da TP-7 i TP-21 zasnivaju zasebne klastere odvojene od K, kao što je prikazano na Slici 21. Na temelju dobivenih rezultata može se utvrditi pozitivan utjecaj netoplinske obrade visokim hidrostatskim tlakom na kvalitativne parametre *smoothie* napitaka u usporedbi s konvencionalnom toplinskom pasterizacijom. To je u skladu s istraživanjem od Chang i sur. (2016), te Garcia-Palazon i sur. (2004) koji su utvrdili korelaciju između vrijednosti parametra tlaka i inaktivacije enzima u malinama i jabukama.

Provedbom neparametarske analize utvrđeno je da su uzorci VHT sličnih svojstava kao uzorak K za ispitivane vrijednosti boje L*, b*, C* i H*, te sadržaj TFL i CAR. Pri tome je ustanovljeno da su TPC, HCA i vitamin C imali manje vrijednosti u usporedbi s kontrolom, pri čemu su prosječne vrijednosti prikazane u Tablicama 8. i 9. Slični rezultati vidljivi su i u Tablici 10. za TP uzorke.

Neparametarske analize prikazane u Tablicama 4 i 5 ukazuju da su uzorci VHT sličnih svojstava kao i toplinski pasterizirani uzorci TP za kolorimetrijske parametre L*, a*, H*. Kod kemijskih

svojstava sličnost se očituje samo za HCA i CAR vrijednosti. TPC, TFL, b* i C* imaju više vrijednosti kod TP uzoraka, dok VHT uzorci sadrže veću količinu vitamina C.

Prema rezultatima prikazanim u Tablicama 11. i 13. kontrolni uzorci imaju slične vrijednosti ispitivanih parametara vezanih uz bioaktivne tvari u usporedbi s TP uzorcima, izuzev sadržaja vitamina C i HCA koji je značajno snižen kod toplinski pasteriziranih uzoraka.

Uzorci obrađeni toplinskom pasterizacijom imali su manju količinu ukupnih fenola (TPC) (685,93 ± 2,89 mg 100 mL^{-1}) u odnosu na uzorke obrađene visokim hidrostatskim tlakom (857,99 ± 5,15 mg 100 mL^{-1}). Prema Laslu i sur. (2017) toplinska obrada uzorkuje otpuštanje fenolnih tvari iz matrice voća i povrća, što doprinosi većem sadržaju TPC u usporedbi s K i VHT uzorcima. Toplinski obrađeni uzorci također pokazuju veći sadržaj TFL (58,18 ± 0,34 mg 100 mL^{-1}) u usporedbi sa VHT uzorcima (47,62 ± 0,46 mg 100 mL^{-1}). Jedan od razloga veće stabilnosti TFL u TP uzorcima je otpuštanje monomera i dimera tijekom toplinski pokrenute hidrolize termolabilnih fenolnih tvari (Alongi i sur., 2019). Stabilnost HCA bila je niža nakon toplinske obrade u usporedbi s kontrolnim uzorcima, ali nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji HCA između VHT i TP uzoraka.

Sadržaj vitamina C smanjio se nakon pasterizacije, što je prema dosadašnjim istraživanjima uobičajena posljedica toplinske obrade voćnih sokova i *smoothie* napitaka (Petruzzi i sur., 2017). Istraživanja provedena od strane Keenana i sur. (2012) pokazala su da za razliku od toplinske pasterizacije obrada visokim hidrostatskim tlakom omogućuje značajno bolje zadržavanje vitamina C, što je u skladu s dobivenim rezultatima. Usporedbom rezultata pasterizacije na 90 °C tijekom 15 min i VHT obrade na 300 MPa i 500 MPa tijekom 15 min pokazalo se je da je sadržaj vitamina C značajno niži kod toplinske obrade (Marszalek i sur., 2015). Zadržavanje askorbinske kiseline je bilo veće kod VHT obrade na 400 MPa tijekom 5 min nego kod uzoraka obrađenih zagrijavanjem na 90 °C tijekom svega 15 s (Zulueta i sur., 2012). Gubici vitamina C u pasteriziranim uzorcima posljedica su toplinske degradacije koja bi se mogla izbjeći adekvatnim izborom pulpe (Uzodinma i sur., 2020). Do sada je dokazano da je vitamin C termolabilna tvar, te prolazi enzimsku i kemijsku oksidaciju tijekom toplinske obrade. Oksidativni enzimi i vitamin C mogu doći u kontakt zbog narušavanja matrice hrane kao posljedice utjecaja toplinske energije na staničnu strukturu. Za razliku od toplinske obrade, VHT obrada se najčešće odvija pri sobnim temperaturama, a sama primjena povišenog tlaka obično ne dovodi do trajnih posljedica po strukturu matrice hrane koja se obrađuje (Hotz i Gibson, 2007; Sanchez – Moreno i sur., 2005; Martinez – Hernandez i sur., 2013).

Kada se uzima u obzir toplinska stabilnost karotenoida, iz rezultata za CAR vidljivo je da toplinska pasterizacija nema značajnog utjecaja na njihovu stabilnost i ne dovodi do degradacije. Vidljivo je da su TP i K vrijednosti za CAR minimalno i statistički neznačajno različite, što je u skladu s istraživanjem koje je pokazalo da su blagi (90 °C, 20 s) i intenzivni (120 °C, 20 s) procesi toplinske obrade dodatno poboljšali stabilnost karotenoida. Ključni faktori koji su tome pridonijeli na ispitivanom soku od manga-papaje-mrkve su otpuštanje i micelarizacija karotenoida (Buniowska i sur., 2019). Stoga se može zaključiti da su karotenoidi stabilni pigmenti i njihova koncentracija neće se značajno mijenjati neovisno o vrsti obrade koja je provedena.

Prema rezultatima klasterske analize VHT obrada pokazala se u gotovo svim ispitivanim segmentima značajno boljom u usporedbi s toplinskom obradom. Uz produženi rok trajanja, sva svojstva su imala veliku sličnost s referentnim, neobrađenim uzorkom. Dodatno raščlanjivanje utjecaja pojedinih parametara obrade pokazuje da je niži tlak uz kraće vrijeme tretiranja dovoljan za postizanje svih zadanih uvjeta. O obzirom da je potrebno i minimizirati utrošak vremena i energije kako bi se zadovoljili standardi održivosti, na temelju klasterske analize može se zaključiti da su optimalne vrijednosti obrade 350 MPa i 5 min.

5.3. Nutritivni indeks

Nutritivni indeks (NI) kao mjera nutritivne kvalitete *smoothie* napitaka dobiven je kao jedinstveni faktor korištenjem analize glavne komponente (PCA) faktorske analize pri čemu se glavne komponente izračunavaju dekompozicijom pojedinačne vrijednosti. Za potrebe analize NI se testirao nasuprot VHT procesnim parametrima. Ukupna varijanca dobivena analizom iznosila je 75 %, što je vidljivo u Tablici 14. U NI su uključeni sadržaj hidroksicimetne kiseline, vitamin C i ukupni karotenoidi. KMO (Kaiser – Meyer – Olkin) test kao statistička mjera kojom se utvrđuje prikladnost podataka za faktorsku analizu iznosio je 0,71. Time su se dobiveni podaci pokazali dovoljno dobrim (>0,6) za provedbu faktorske analize. Za adekvatnost faktorske analize proveden je i Bartlettov test sfericiteta koji mjeri da li je matrica korelacija jednaka matrici identiteta (u kojem slučaju je test neznačajan) i preko hi^2 testa određuje njeno odstupanje koje govori o značajnosti razlike. Rezultat analize iznosio je 48,15 pri $p \leq 0,01$. Pri tome veća vrijednost NI implicira veće vrijednosti parametara HCA, CAR i vitamina C, kao što je prikazano u Tablici 15.

Usporedbom promjena NI nakon TP i VHT obrade, te tijekom skladištenja prikazanih u Tablicama 16. i 17., utvrđeno je da su najveći NI imali VHT obrađeni uzorci. Najmanji utjecaj na NI je imalo najkraće vrijeme obrade, dok sam tlak nije imao statistički značajan utjecaj. Promjene u NI kod toplinski obrađenih uzoraka izraženije su, te se toplinska obrada pokazala manje poželjnom tehnologijom u usporedbi s VHT. Sam proces skladištenja je i kod TP i VHT uzoraka imao utjecaj na smanjenje NI s protekom vremena skladištenja, pri čemu su se VHT uzorci pokazali otpornijim na pad NI.

5.4. Utjecaj obrade i skladištenja na bioaktivne spojeve

S obzirom da su *smoothie* napici izrađeni od različitog biljnog materijala poput voća, povrća i bademovog napitka, ispitan je utjecaj VHT i TP na različite bioaktivne spojeve, kako bi se utvrdila njihova stabilnost u takvim heterogenim sustavima. Ispitane su promjene u ukupnom sadržaju fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonoida, vitamina C i karotenoida koje su prikazane u Tablici 18 za VHT obradu i Tablici 19 za TP obradu. Također je određena i ukupna nutritivna kvaliteta VHT i TP obrađenih *smoothie* napitaka, te su rezultati za smoothije obrađene visokim tlakom prikazani u Tablici 16, a toplinski obrađene u Tablici 17.

U usporedbi s neobrađenim uzorcima, ukupan sadržaj fenola smanjio se za 12 %, neovisno o primijenjenom tlaku. Za razliku od obrade VHT-om, toplinska pasterizacija je povećala sadržaj fenola sa 768,428 mg 100 mL^{-1} na 950,602 mg 100 mL^{-1}. Utjecaj toplinske pasterizacije u skladu je s istraživanjem od Kim i sur. (2012) u kojemu su dobili veći sadržaj TPC nakon pasterizacije soka od jabuke. Efekt povećanja sadržaja fenola može se pripisati ubrzanju ekstrakcije iz stanica kao posljedice utjecaja toplinske energije na koloidnu staničnu strukturu unutar koje je dio zaostalih fenolnih i drugih bioaktivnih spojeva (Bursać Kovačević i dur., 2016). Pad TPC vrijednosti nakon VHT obrade može se objasniti visokom rezidualnom aktivnosti enzima poput peroksidaze i polifenol oksidaze, koji su odgovorni za kataliziranje oksidacije fenola (Queiroz i sur., 2010). Dodatni potencijalni uzrok može biti polimerizacija fenolnih tvari s proteinima (Barba i sur., 2011). S druge strane, neka istraživanja pokazala su veću razinu TPC u VHT obrađenim sokovima od kombinacije naranče i mlijeka u usporedbi s kontrolnim uzorcima, isto neovisno o ispitivanim tlakovima od 300 MPa i 400 MPa (Alongi i sur., 2019). Druga ispitivana receptura za *smoothie* napitak sastojala od 59 % soka od naranče, 15 % soka od mrkve, 15 % soka od jabuke i ostatak od cikle. Tretirana je tlakom od 630 MPa tijekom 6 min, te nisu uočene nikakve promjene u TPC vrijednostima u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Fernandez i sur., 2019). S obzirom na kompleksnost sastava i matrice *smoothie* napitaka, moguće je da je utjecaj VHT obrade drugačiji za različite ispitivane prehrambene matrice (Diez – Sanchez i sur., 2020). Stoga je u industrijskom okruženju uvijek potrebno ispitati svaku novu formulaciju prije same proizvodnje. Vrijeme obrade VHT-om također je u korelaciji sa smanjenjem razine TPC, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Barba i sur., 2011). Prema rezultatima prikazanima na Slici 12. iz provedene ANOVA vidljiv je utjecaj tlaka na sadržaj TPC u *smoothie* napicima uz $p = 0,014$. Provedbom Tukey HSD testa može se uočiti da je veći utjecaj imao niži tlak (350 MPa), neovisno o vremenu tretiranja i vremenu skladištenja. Vrijeme obrade VHT-om ne igra značajnu ulogu u promjeni sadržaja TPC, uz $p >$

0,05. S obzirom na dosadašnja istraživanja poput Baroneovog i sur. (2019) kod kojih se vidi utjecaj vremena, postoje dva moguća razloga za takav rezultat. S obzirom na kvazitrenutno širenje tlaka kroz čitav volumen i istovremeno djelovanje na sav sadržaj, uključujući i stanice, već se i nakon najkraćeg ispitanog vremena obrade postigla maksimalna moguća ekstrakcija bioaktivnih spojeva u tim uvjetima tlaka i temperature. Istovremeno s obzirom na potencijalan utjecaj tlaka na strukturu bioaktivnih spojeva moguće je da je došlo do djelomičnog raspada. Drugi vjerojatniji uzrok je nedovoljna razlika između najkraćeg i najdužeg vremena obrade da bi se vidjeli značajniji utjecaji vremena na sadržaj TPC.

Kada se uzmu u obzir i drugi fenolni spojevi, vrijeme obrade VHT-om nema značajan utjecaj na sadržaj HCA. S druge strane, u istraživanju od Baronea i sur. (2019) rezultati su pokazali značajno povećanje u HCA u soku od jabuke tretiranom s VHT od 200 MPa do 600 MPa tijekom 2 min do 9 min. To je objašnjeno otpuštanjem fenolnih tvari iz matrice uzrokovano utjecajem tlaka na strukturu stanične membrane. Usporedbom sadržaja ukupnih flavonoida u netretiranom uzorku sa toplinski obrađenim i VHT obrađenim uzorcima vidljiv je porast TFA između 15 i 16 % kod pasteriziranog uzorka. U istom istraživanju povećanje tlaka dovelo je do smanjenja TFL. Kasikci i Bagdatholglu (2017.) u svom istraživanju pokazali su da se TFL u sokovima povećava nakon obrade tlakom pri 400 MPa tijekom 5 min na 40 °C. Nasuprot tom rezultatu, novo istraživanje potvrdilo je da VHT obrada pri 600 MPa smanjuje koncentraciju flavanola u jabukama do 53 % (koji su predominantna klasa flavonoida u jabukama), te su ujedno uočili da je smanjenje veće za flavanole s većom molekularnom masom i većim brojem hidroksilnih grupa (Fernandez – Jalao i sur., 2019.).

Korištenje VHT na nižim temperaturama i tlakovima tijekom kraćeg vremena obrade može biti efektivna tehnologija za poboljšanje stabilnosti vitamina C u voćnim i povrtnim proizvodima (Tewari i sur., 2017.). Iako se mogu izmjeriti značajne količine vitamina C i ukupnih karotenoida, dobiveni rezultati pokazuju da se povećanjem tlaka i dužim trajanjem obrade smanjuju razine vitamina C i ukupnih karotenoida u ispitanim uzorcima. Slično tome, sokovi tretirani pri 550 MPa tijekom vremena dužeg od 2 min pokazuju gubitak od 3 do 15 % vitamina C (Jimenez – Aguilar i sur., 2015.). Značajniji gubitak vitamina C nakon VHT obrade moguće je zbog oksidacije za vrijeme adijabatskog zagrijavanja kao posljedice povećanja tlaka ili zbog rezidualne enzimske aktivnosti (Tewari i sur., 2017.).

5.5. Utjecaj skladištenja na nutritivne vrijednosti *smoothie* napitaka.

Istraživan je utjecaj skladištenja u trajanju od 21 dan na 4 °C, na bioaktivne tvari u *smoothie* napicima obrađenim VHT i TP procesima. TPC kod toplinski pasteriziranih i VHT obrađenih *smoothie* napitaka značajno opada protekom vremena skladištenja, što je prikazano u tablici 10 za VHT i 12 za TP obradu). Rezultati su pokazali da je pad TPC značajniji nakon toplinske pasterizacije, pri čemu se tijekom skladištenja od početnih 9,83 % smanjuje do 19,51 % nakon 21 dan, u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Kod VHT obrade gubitak TPC je bio nešto niži, te je sa početnih 3,42 % povećan na 4,59 % nakon 21 dana obrade. Ti rezultati pokazuju da su ukupni fenoli tijekom skladištenja bili znatno stabilniji nakon VHT obrade nego kod TP uzoraka. Do sličnog zaključka došli su i (Vierira i sur., 2018.) koji su istraživali ponašanje tijekom skladištenja sokova od naranče tretiranih sa VHT i TP pohranjene u hladnjak.

Za vrijeme skladištenja VHT uzoraka sadržaj ukupnih flavonoida (TFL) povećavao se do 7. dana skladištenja, nakon čega se smanjio na početne vrijednosti i ostao konstantan sve do ispitivanog 21. dana. Povećanje TFL može se objasniti prisutnošću rezidualne polifenol oksidaze i peroksidaze, koje mogu raskinuti veze fenolnih tvari velike molekularne mase poput procijanidina i time otpuštati monomerne flavanole (Hotz i Gibson, 2007.).

Poznato je da VHT obrada može utjecati na promjenu kvartarne, tercijarne i sekundarne strukture proteina i enzima, te time modificirati aktivnost samih enzima. To uključuje i aktivaciju enzima pri nižim, te inaktivaciju pri višim tlakovima (Leite Junior i sur., 2017.). TFL u toplinski pasteriziranim uzorcima ostaju stabilni tijekom čitavog vremena skladištenja, iako ih je sama obrada smanjila za 5,49 % u usporedbi s kontrolom. Slično tome, HCA je pokazala manju stabilnost nakon 21 dana skladištenja u TP uzorcima u usporedbi s VHT uzorcima (51,85 % smanjenje) i kontrolom (39,68 % smanjenje).

Prema očekivanjima, vitamin C je najosjetljivija bioaktivna tvar za vrijeme skladištenja. U TP uzorcima sadržaj vitamina C se konstantno smanjivao protekom vremena skladištenja, te je već nakon 14 dana došlo do potpunog gubitka vitamina C. Kod VHT uzoraka nakon 7 dana skladištenja došlo je do 50 % gubitka vitamina C.

Skladištenje smanjuje sadržaj CAR u VHT uzorcima za 30,65 % i TP uzorcima za 30,11 %. Povećanje temperature za vrijeme toplinske obrade može dovesti do otapanja karotenoida i naknadno njihovog ulaska u otopinu nakon toplinske degradacije stanične strukture. To je glavni razlog za značajno povećanje sadržaja CAR u TP uzorcima (Koley i sur., 2020.).

Dobiveni rezultati pokazuju da je veći sadržaj CAR uočen u VHT uzorcima (13,30 mg 100 mL^{-1}) u usporedbi sa TP uzorcima (12,59 mg 100 mL^{-1}).

Sudeći prema Nutritivnom indeksu (NI), niži tlakovi su povećali prinos i osigurali veću nutritivnu vrijednost ispitivanih uzoraka. VHT uzorci koji su prošli kraće vrijeme obrade imali su veću nutritivnu vrijednost. Konstantan gubitak nutritivne vrijednost očit je kada se promatra vrijeme skladištenja. Unatoč degradaciji uzrokovanoj VHT obradom, obrađeni uzorci *smoothie* napitaka mogu se smatrati bogatim izvorom raznih bioaktivnih tvari, čak i po isteku maksimalnog istraživanog vremena skladištenja.

5.6. Utjecaj skladištenja na boju *smoothie* napitaka

Boja kao organoleptičko svojstvo je još jedan važan parametar kvalitete toplinski ili netoplinski obrađenih i skladištenih *smoothie* napitaka. Pretraživanjem dostupne literature nije moguće jednoznačno utvrditi je li se nakon TP ili VHT obrade zadržava boja neobrađenih *smoothie* napitaka i kako se sama boja održava tijekom skladištenja. Promjene u CIE L*a*b* parametrima neobrađenih i VHT obrađenih *smoothie* napitaka prikazane su u Tablici 20. dok se utjecaj toplinske pasterizacije na vrijednosti boje tijekom skladištenja prikazan u Tablici 21. Relativna promjena boje prema referentnom, kontrolnom uzorku dana je u obliku ΔE u Tablici 22.

Kao što je vidljivo u Tablicama 20 i 21, povećanje tlaka kojim se obrađuju *smoothie* napici i produživanjem vremena obrade kod ispitivanih uzoraka dolazi do smanjenja L* vrijednosti, što znači da uzorci postaju tamniji. To je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Andres i sur., 2016.). Sličan nelinearan odnos vidljiv je i usporedbom boje tijekom skladištenja. Značajno tamnjenje je uočeno za TP uzorke tijekom 7. dana skladištenja, sve do 21. dana. Usporedbom rezultata uočava se sličan trend i kod sličnih *smoothie* napitaka baziranih na mlijeku obrađenih na 450 MPa koji također gube oko 6 % svjetline tijekom skladištenja (Andres i sur., 2016.).

Usporedbom parametra a* s neobrađenim *smoothie* napitkom, rezultati su pokazali smanjenje od 10,18 % za VHT *smoothie* napitke tretirane na 350 MPa i 14,80 % za 450 MPa. Uz povećani tlak, vrijeme obrade je također imalo utjecaj na smanjenje a* vrijednosti, kao što je vidljivo u Tablici 14. Gubitak crvene boje u VHT uzorcima može se objasniti rezidualnom enzimskoj aktivnosti koja uključuje enzimsko posmeđivanje fenolnih tvari (Huang i sur., 2013.). Vrijednosti za b* također su pokazale značajne promjene u ovisnosti o tlaku i vremenu obrade,

kao i vremenu skladištenja. Povećani tlak i dužina obrade smanjili su b* parametar, koji još dodatno opada nakon 7. dana skladištenja. Primijećena promjena, tj. požućivanje boje posljedica je enzimske aktivnosti PPO i POD povezane s enzimskim posmeđivanjem (Stinco i sur., 2019.).

Povišeni tlak i produženo vrijeme obrade dovode do smanjenje kroma vrijednosti (C*), dok skladištenje povećava C* vrijednost do 7. dana. Nakon 7. dana skladištenja C* vrijednost opada i postaje konstantna prema 21. danu skladištenja. Povećanje tlaka i produženje vremena također smanjuje u H* vrijednost, dok je skladištenje dodatno povećava. Udio TFL za vrijeme skladištenja pokazuje iste karakteristike kao i kolorimetrijske vrijednosti, te se može pretpostaviti da je udio ukupnih fenola odgovoran za promjene u boji uzoraka tijekom skladištenja.

Ukupna razlika u boji između neobrađenog, tj. referentnog uzorka i ispitivanih VHT uzoraka mjerena je u obliku parametra ΔE i prikazana je u Tablici 16.. Razlike u viđenju boje mogu se analitički klasificirati kao neprimjetne (0 – 0,5), lagano primjetne (0,5 – 1,5), primjetne (1,5 – 3,0), vrlo vidljive (3,0 – 6,0) i velike (6,0 – 12,0) (Barba i sur., 2012). U prosjeku, svi uzorci bili su u području primjetne razlike (do 3,0), što znači da razlika u boji između ispitivanih i referentnog uzorka nije zanemariva. Povećani tlak povećao je promjenu boje, dok se duže vrijeme obrade imalo manji utjecaj na boju uzoraka. Dužina skladištenja je pozitivno korelirana s promjenom boje do 7. dana, nakon čega je došlo do skoka u razlici u boji, te naknadno opet do pada u razlici kako je skladištenje odmicalo prema 21. danu.

U usporedbi s neobrađenim uzorkom, L* i b* vrijednosti *smoothie* napitaka su povećane kod TP. Ipak, za vrijeme skladištenja L* vrijednost je opadala protekom vremena, dok su a* i b* vrijednosti rasle. To indicira da su TP *smoothie* napici postali tamniji, intenzivnije crveni i žuti. Uočene promjene u boji mogu biti posljedica povećanja neenzimskog posmeđivanja kao posljedice Maillardovih reakcija i uništenja pigmenata (Leneveu – Jenvrin i sur., 2020.; Ahmed i sur. 2005.).

Analizom H* vrijednosti vidljiv je utjecaj toplinske obrade i vremena skladištenja, pri čemu su više H* vrijednosti u TP uzorcima u usporedbi s K. Uzrok tome su oksidacijske reakcije katalizirane temperaturom koje su dovele do degradacije sastojaka (de Oliveira Ribeiro i sur., 2018.). Niže H* vrijednosti su također uočene protekom vremena skladištenja TP uzoraka. Slično kao crvena i žuta boja, kroma vrijednosti, tj. intenzitet boje su također značajno više kod dužeg vremena skladištenja.

Vrijednosti za ΔE za sve TP uzorke se značajno povećavaju protekom vremena skladištenja. Vidljivo je da su VHT uzorci značajno bolje zadržali boju nakon same obrade i prolazili kroz manje promjene boje tijekom skladištenja u usporedbi sa TP uzorcima. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima na *smoothie* napicima od manga tijekom skladištenja, kod kojih su toplinski obrađeni uzorci pokazali veće razlike u boji u odnosu na svježi *smoothie* napitak (Bi i sur., 2020.).

5.7. Mikrobiološka stabilnost *smoothie* napitaka tijekom skladištenja za TP i VHT uzorke

Vrijednosti mikrobioloških parametara za VHT, TP i K uzorke skladištenje na 4 °C kroz 21 dan prikazane su u Tablici 23. Veliki broj aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija, kvasaca i plijesni zabilježen je odmah nakon pripreme kontrolnog uzorka. S obzirom da je zbog razvoja kvasaca došlo do napuhavanja boce u kojoj je bio pohranjen kontrolni uzorak i posljedične evakuacije sadržaja, mikrobiološko ispitivanje je prekinuto nakon 3. dana skladištenja. U uzorcima tretiranim sa VHT i toplinski pasteriziranim uzorcima nisu odmah nakon tretmana nije nađen niti jedan od ispitivanih mikroorganizama. Ispitivanje provedeno nakon 21 dan skladištenja također nije pronašlo tragove niti jednog ispitivanog mikroorganizma. Ti rezultati su u skladu s istraživanjima provedenim od Andresa i sur. (Andres i sur., 2016), koji su uočili pad broja mikroorganizama i produženje roka trajanja na 45 dana nakon VHT i TP obrade. Uz to, istraživanje provedeno na voćnim i povrtnim *smoothie* napicima od strane Fernandeza i sur. (2019.) pokazalo je značajnu redukciju broja mikroorganizama, te stabilnost proizvoda nakon 21 dana skladištenja. Inaktivacija mikroorganizama je dobro istražena i potvrđena prednost VHT i TP obrada, potkrijepljena mnogobrojnim istraživanjima na voćnim i povrtnim sokovima. Utjecaji tih metoda obrade nastaju zbog raspada stanične stijenke, denaturacije proteina i degradacije DNA (Woldermariam i sur., 2019.).

5.8. Senzorska analiza *smoothie* napitaka

Za potrebe utvrđivanja prihvatljivosti kombinacije sastojaka *smoothie* napitaka provedeno je ispitivanje tržišta, kao i senzorske analize za tri kombinacije sastava. Provedena je i QDA analiza. Kako bi se zadržala objektivnost, uzorci su nasumično šifrirani oznakama 385 (TP), 916 (K) i 463 (VHT). Na temelju dobivenih rezultata provedena je ANOVA prikazana u Tablici 18., te je utvrđena statistički značajna razlika u organoleptičkim svojstvima između uzoraka uz p = 0,0006. Ispitanici smatraju da boja VHT tretiranog uzorka minimalno odstupa od očekivanja, što je u skladu s prethodno obrađenim rezultatima kolorimetrije. Uzorci korišteni u istraživanju odstupali su bojom od očekivane za taj tip proizvoda. Reakcija potrošača na boju triju istraživanih uzoraka prikazana je na Slici 22. gdje je vidljivo da je VHT obrađen uzorak dobio nešto niži „Just about right" broj ocjena u usporedbi s kontrolnim uzorkom, te kao i za TP uzorak potrebno je minimalno doraditi recepturu kako bi se uzorak uklopio u očekivanja potrošača.

Istraživanje mirisa *smoothie* napitaka, prikazano na Slici 23, pokazalo je da je miris kontrolnog uzorka odličan, dok su kod TP i VHT uzoraka mirisi malo preblagi od očekivanog za taj tip proizvoda. S obzirom da toplinska obrada može utjecati na aromatske komponente, to je očekivani rezultat. To je u skladu s istraživanjem od Inada i sur. (2017) koji su utvrdili smanjenje arome za 10 %, ali zadržavanje potpune senzorske prihvatljivosti jabuticaba soka S druge strane, kod istraživanja provedenih na soku od cikle izostao je problem sa smanjenjem arome, te nisu ustanovljene značajne promjene u organoleptičkim svojstvima. Panel nije uspješno identificirao VHT obrađeni sok nasumično ubačen među neobrađene (Ubeira – Iglesias i sur., 2019). Liu i sur. (2019) potvrdili su da su razlike između VHT i neobrađenog soka od krastavaca minimalne, ali da postoje značajne razlike između toplinski obrađenih i neobrađenih. Također su ustanovili da i nakon 20 dana skladištenja VHT obrađeni sokovi imaju najbolja organoleptička svojstva. Rezultati pokazuju da je VHT obrađeni sok nije doveo do promjena u senzorskim svojstvima soka kroz čitavo vrijeme trajanja, neovisno o primijenjenom tlaku i vremenu obrade. Za razliku od VHT, toplinski obrađeni sok je već odmah nakon obrade promijenio senzorska svojstva, ali se ona nisu dalje značajnije mijenjala tijekom vremena skladištenja.

5.9. Analiza utjecaja na fizikalna svojstva *smoothie* napitaka

5.9.1. Gustoća

Analiza gustoće *smoothie* napitaka prije i nakon VHT i TP obrade prikazana je na slici 30. Utvrđeno je da se gustoća uzoraka minimalno mijenja sa protekom vremena skladištenja, neovisno o primijenjenom tretmanu. Toplinski obrađeni uzorci su odmah nakon tretmana pokazivali veću gustoću u usporedbi s neobrađenim uzorkom, te su usprkos blagom padu tijekom ispitanog vremena skladištenja zadržali povećanu razinu gustoće. Za razliku od TP uzoraka, VHT uzorci su odmah nakon obrade pokazivali značajno nižu razinu gustoće u usporedbi s neobrađenim uzorkom, što je posljedica brže aglomeracije i sedimentacije komponenata *smoothie* napitaka. Gustoća kod VHT uzoraka raste tijekom vremena skladištenja, te se stabilizira između 7. i 14. dana skladištenja. Završna gustoća nakon 21. dana skladištenja potpuno odgovara gustoći kontrolnog uzorka u 1. danu skladištenja. *Smoothie* napitak oznake VHT1 obrađen pri najblažim uvjetima pokazao se najbližim (1,054 gcm^{-3}) prema kontrolnom uzorku (1,052 gcm^{-3}). Iako su razlike u gustoći kod TP i K uzoraka, te VHT i K uzoraka vidljive analizom, s obzirom da je maksimalno odstupanje iznosilo 0,005 gcm^{-3} razliku je organoleptički nemoguće osjetiti, te svi ispitani načini obrade daju zadovoljavajući rezultat.

5.9.2. Viskoznost

Viskoznost ispitivanih uzoraka jako je ovisila o načinu i parametrima obrade. Referentni uzorak imao je viskoznost od 90 mPas pri 100 min^{-1}, pri čemu su iz Slike 31. vidljive razlike u viskoznosti TP i VHT uzoraka. Nakon TP obrade utvrđen je nagli porast viskoznosti (do skoro 120 mPas), te naknadni pad na 81 mPas koji se odvio do 7. dana skladištenja. TP obrada je dovela do značajne aglomeracije čestica u ispitivanim uzorcima, te posljedično do početnog povećanja viskoznosti. Taj rezultat korelira sa rezultatima prikazanim na Slici 30. koji ukazuju na statistički značajan porast gustoće uzoraka nakon VHT obrade. Nakon sedimentacije aglomerata i pada viskoznosti vidljiv je ponovni blagi porast sve do stabilizacije između 14. i 21. dana. Završne vrijednosti viskoznosti TP obrađenih uzoraka i dalje su između 35 % i 40 % veće od referentne vrijednosti. Ponašanje toka direktno ovisi o raspodjeli malih i velikih čestica, te je toplinska obrada vrlo vjerojatno utjecala na čestice i njihove funkcionalne grupe (Hulle i sur., 2015.). Analiza ovisnosti prividne viskoznosti o vrsti obrade prikazana na Slici 32. pokazuje isti trend kroz čitavo ispitano područje od 10 do 100 min^{-1}, pri čemu je vidljivo da TP uzorak ima najveća odstupanja od referentnog.

Isti trend porasta, naknadnog pada, te porasta i konačno stabilizacije vrijednosti za viskoznost pokazao se i kod nekih VHT obrađenih uzoraka. Uzorci VHT2 i VHT4 imali su slični skok u viskoznosti kao i TP uzorak (do maksimalnih 128 mPas). VHT1 i VHT3 nisu pokazali značajnije promjene u viskoznosti u usporedbi s referentnim. Pokazalo se je da iznos primijenjenog tlaka pri obradi nema značajan utjecaj na viskoznost uzoraka, ali da je porast viskoznosti u direktnoj korelaciji s porastom vremena obrade. Rezultati su u okvirima rezultata istraživanja od Hulle i sur. (2015.) kod kojih nije utvrđena značajna promjena u pH nakon obrade sokova od Aloe.

Prema dobivenim rezultatima, za optimalnu viskoznost najboljom se je pokazala VHT obrada s najkraćim vremenom tretiranja, pri čemu se viskoznost u usporedbi s referentnom nije značajnije promijenila. TP uzorci su se s obzirom na značajnu razliku u viskoznosti iz organoleptičke perspektive pokazali najlošijim.

5.9.3. pH vrijednost

Inaktivacija enzima koji utječu na destabilizaciju sokova i *smoothie* napitaka, te gubitak konzistencije je vrlo poželjna mogućnost obrade, pri čemu najveći utjecaj imaju temperatura kod toplinske obrade, te porast tlaka i sniženje pH vrijednosti kod VHT obrade. S obzirom da se tijekom same VHT obrade pH smanjuje od 0,3 do 0,5 jedinica za svakih 100 MPa, posljedično je da će se dužom obradom pri višim tlakovima utjecaj pektin metil esteraze (PME) ili drugih prisutnih enzima značajno smanjiti, te se time popraviti kvaliteta i produžiti rok trajanja. S obzirom da je PME vezan *in situ* za staničnu stijenku, utvrđeno je da je esteraza značajno otpornija na toplinske i tlačne utjecaje u krutom nego u tekućem (sok, *smoothie* napitak) obliku, te pri pH 6 (što je ujedno i okvirna vrijednost kontrolnog *smoothie* napitka) (Balogh i sur., 2004.). Ispitivanjem na sokovima od grejpa je također pokazalo da uz sniženi pH, blago povišena temperatura i tlakovi od 300 MPa dovode do značajne (>80 %) eliminacije PME (Guiavarc'h i sur., 2005.).

Analiza pH vrijednosti TP obrađenog *smoothie* napitka pokazala je značajan pad od 0.4 jedinice tijekom 21 dan skladištenja. Prema rezultatima prikazanim na Slici 33. pad u kiselo područje je prevelik, te se je osjetio i tijekom provedbe organoleptičke analize. Za razliku od TP uzoraka, svi VHT uzorci zadržali su se u okvirima početnog pH (21. dan između 6,25 i 6,31), što u potpunosti odgovara referentnoj pH vrijednosti dobivenoj za kontrolni uzorak. Odstupanje od željene vrijednosti je manje od 0,5 jedinica. Analizom utjecaja parametara tlaka i vremena

obrade, istraživanje je pokazalo da su niži tlakovi imali manji utjecaj na pH, neovisno o vremenu obrade. Utjecaj je uz $p<0,05$ ipak statistički značajan.

Iako postoje razlike u pH vrijednostima kod VHT obrade, te se optimalnom pokazala obrada pri najnižem tlaku i najkraćem vremenu, iz organoleptičke perspektive svi VHT uzorci u potpunosti zadovoljavaju kriterij kvalitete.

5.10. Raspodjela veličine čestica

Analiza raspodjele veličine čestica za kontrolni uzorak, prikazana na Slici 47. pokazuje da se srednja vrijednost veličine čestica 299,108 mm, te da je povećana učestalost čestica u rasponu od 101,927 do 731,076 mm. S obzirom da se stabilnost voćnih i povrtnih napitaka, pa tako i smoothieja, povećava smanjenjem prosječne veličine čestica, poželjno je da obrada napitka zadrži vrijednosti veličine čestica u tim okvirima, ako ne i smanji srednju vrijednost. Rezultati za toplinski obrađene uzorke pokazali su da je srednja vrijednost veličine čestica 288,945 mm, uz raspon od 82,672 do 759,810 mm, čime se pokazalo da pasterizacija nema značajnog utjecaja na raspodjelu veličine čestica. Isti zaključak se može donijeti i za uzorke obrađene visokim hidrostatskim tlakom, s obzirom da pri najintenzivnijem tretmanu srednja vrijednost veličine čestica iznosi 294,292 mm, što je statistički neznačajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Kubo i sur. (2012) pokazali su da VHT obrada utječe na poboljšanje stabilnosti sokova od rajčice razaranjem suspendirane pulpe. Do sličnih rezultata došli su i Liu i sur. (2019) gdje su utvrdili da je došlo do promjena u pulpi i smanjenja prosječne veličine čestica, te posljedično i povećane stabilnosti pulpe već na tlakovima iznad 60 MPa. Hurtado i sur. (2016) utvrdili su da je obrada visokim hidrostatskim tlakom minimalno povećala stabilnost smoothie napitaka na bazi jagoda. Iako visoki hidrostatski tlak u ovisnosti o primijenjenom tlaku i vremenu obrade može djelovanjem na staničnu strukturu dovesti do promjene u višekomponentnim sustavima poput smoothie napitaka, taj utjecaj nije se pokazao značajnim u ovom istraživanju. To je u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Al-Bandak i sur. (2011) gdje se pokazalo da nije nužno da VHT obrada utječe na smanjenje veličine čestica u emulzijama.

Vrijeme skladištenja je statistički značajno ali minimalno utjecalo na raspodjelu veličine čestica koja je prikazana na slici 45. Provedena ANOVA analiza prikazana na slici 46. i u Tablici 33. uz $p < 0,05$ pokazala je da srednja veličina čestica blago raste protekom vremena skladištenja, te dosiže svoj maksimum na 306 mm, što je zanemarivo više u usporedbi s početnih 297 mm.

Usporedbom s kontrolnim uzorkom, raspodjela veličine čestica nakon obrade VHT-om u potpunosti zadovoljava kriterij kvalitete kroz čitavo vrijeme skladištenja od 21 dan.

Sličan rezultat dobiven je i za TP uzorke, pri čemu je ovisnost raspodjele o vremenu skladištenja prikazana na slici 47. Analiza dobivenih vrijednosti za TP tijekom 21 dan prikazana na Slici 48. i u Tablici 34. pokazuje smanjenje veličine čestica tijekom proteka prvih 7 dana, te kasniji porast i stabilizaciju veličine čestica na početnim vrijednostima. Početno smanjenje veličine čestica može se pripisati toplinskom utjecaju na staničnu strukturu, te sporijoj sedimentaciji. Rezultati koreliraju s rezultatima dobivenim za gustoću i viskoznost, te su vjerojatno posljedica istih mehaničkih i toplinskih utjecaja na strukturu pulpe u napicima. Nakon 7. dana dolazi do pojave aglomeracije čestica kao posljedice homogenizacije uzorka prije ispitivanja.

Analiza utjecaja obrade VHT-om i TP-om prikazana na Slikama 49. i 50. pokazuje da nema značajnije promjene u prosječnoj veličini čestica neovisno o primijenjenom postupku i parametrima. Ipak, iako se sama prosječna veličina čestica ne mijenja, kod TP obrade utvrđeno je smanjenje d(0,1) i povećanje d(0,9) parametra, što upućuje na povećanje broja najvećih čestica i smanjenje broja najmanjih čestica. Prilikom obrade dolazi do raspada čestica zbog utjecaja toplinske energije na staničnu strukturu, ali istovremeno i do aglomeracije čestica zbog istog utjecaja. S obzirom da ne dolazi do povećanja prosječne veličine čestica, srednja vrijednost se značajnije ne mijenja, ali se sama struktura toplinski obrađenih napitaka značajno promijenila, kao što se vidi na slici 49.

U usporedbi s TP uzorcima, d(0,1) kod HP uzoraka značajno manje opada, dok dolazi do manjeg porasta d(0,9) vrijednosti. Odvijaju se isti procesi kao i kod toplinske pasterizacije, ali u ovom slučaju pod tlačnim a ne toplinskim utjecajem. Utjecaj je značajno manji nego kod TP uzoraka, te se je HP obrada pokazala kao kvalitetnijom za postizanje ujednačene raspodjele veličine čestica. Na raspodjelu veličine čestica kod HP uzoraka ispitan je i utjecaj procesnih parametara, te je prikazan na Slikama 50. i 51. Najveći utjecaj na raspodjelu veličine čestica ima vrijeme obrade, s time da duže vrijeme obrade stvara veći broj aglomerata i povećava vrijednost d(0,9). Vidljiva je pozitivna korelacija između vremena obrade i srednje vrijednosti veličine čestica. Sam iznos tlaka od 350 ili 450 MPa nije imao statistički značajan utjecaj na raspodjelu.

S obzirom na pokazane rezultate, visoki hidrostatski tlak je više smanjio veličinu čestica u usporedbi s toplinskom obradom, te je imao manji udio velikih čestica, što doprinosi većoj

stabilnosti napitaka kroz čitavo vrijeme skladištenja. Iz tog razloga VHT obrada preporučljivija je za postizanje optimalnog gotovog proizvoda.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, izvedeni su sljedeći zaključci:

- Povećanje tlaka nije imalo utjecaj na TPC niti na HCA dok se razina TFL, karotenoida i vitamina C smanjila. Time se obrada visokim hidrostatskim tlakom pokazala značajno boljom u usporedbi s toplinskom pasterizacijom, neovisno o primijenjenom iznosu tlaka.
- Dulje vrijeme obrade negativno je utjecalo na koncentraciju TPC, karotenoida i vitamina C. Istraživanje je pokazalo da kraće vrijeme obrade i dalje udovoljava zahtjevima za produženje roka trajanja, mikrobiološku ispravnost i stabilnost *smoothie* napitaka tijekom skladištenja.
- U uzorcima obrađenim visokim hidrostatskim tlakom, vitamin C je najnestabilniji bioaktivni spoj tijekom skladištenja, dok je TFL najstabilniji. Svi istraživani fenolni spojevi su bili u većim koncentracijama u pasteriziranim uzorcima u odnosu na uzorke obrađene VHT – om, dok su vitamin C i karotenoidi bili u manjim koncentracijama. Toplinska obrada time se pokazala boljom opcijom za zadržavanje fenolnih spojeva nakon obrade, ali smanjenje fenolnih spojeva nakon obrade VHT-om nije toliko značajno u odnosu na ostale prednosti VHT – a pred toplinskom pasterizacijom.
- Vrijeme skladištenja pasteriziranih uzoraka utjecalo je na pad koncentracije istraživanih bioaktivnih spojeva tijekom skladištenja, s obzirom na uzorke obrađene VHT – om. Temeljem toga može se zaključiti da se veća stabilnost bioaktivnih tvari tijekom skladištenja postiže u uzorcima obrađenim VHT – om. Obrada visokim hidrostatskim tlakom je dobar način očuvanja kakvoće *smoothie* napitaka tijekom skladištenja što se može zaključiti iz podataka koji pokazuju da je VHT u stanju nadmašiti ili postići iste rezultate kao i konvencionalna toplinska pasterizacija.
- Kemometrijski pristup istraživanju i analizi, koristan je za buduću primjenu u prehrambenoj industriji, za diferencijaciju uzoraka i usporedbu njihove klasifikacije prema primijenjenoj tehnologiji, kao i za sposobnost predviđanja kakvoće, kako bi se osigurala brza i točna karakterizacija uzoraka.
- Obrade visokim hidrostatskim tlakom i toplinskom pasterizacijom nisu imale značajan utjecaj na raspodjelu veličine čestica, kao ni na stabilnost napitaka tijekom čitavog vremena skladištenja

7. POPIS LITERATURE

Ağçam, E., Akyıldız, A., Dündar, B. (2018) Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices, Fruit Juices, pp. 309-339.

Agrimonti, C., Lauro, M., Visioli, G. (2021) Smart agriculture for food quality: facing climate change in the 21st century, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 61(6), 971-981.

Ahmed, J. Ramaswamy, H.S. Hiremath, N. (2005) The effect of high pressure treatment on rheological characteristics and colour of mango pulp. International Journal of Food Science & Technology, 40, 885–895.

Al - Bandak, G., Dermesonlouglou, E. K., Taoukis, P.S., Oreopoulou, V. (2011) Antioxidant effect of Majorana syriaca extract in bulk corn oil and o/w emulsion after applying high hydrostatic pressure. Food Chemistry 125(4), 1166 - 1170.

Alongi, M.; Verardo, G.; Gorassini, A.; Lemos, M.A.; Hungerford, G.; Cortella, G.; Anese, M. (2019) Phenolic content and potential bioactivity of apple juice as affected by thermal and ultrasound pasteurization. *Food Funct* **10**, 7366-7377, doi:10.1039/c9fo01762c.

Alvarez-Jubete, L., Valverde, J., Patras, A., Mullen, A.M., Marcos, B. (2014) Assessing the impact of high-pressure processing on selected physical and biochemical attributes of white cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata alba). Food Bioprocess Technology, **7**, 682–692.

Andrés, V., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Villanueva, M.J., Tenorio, M.D. (2016a) High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. LWT - Food Science and Technology **69**, 123-130.

Andrés, V.; Villanueva, M.-J.; Tenorio, M.-D. (2016c) Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. *Lwt-Food Sci Technol*, **65**, 98-105, doi:10.1016/j.lwt.2015.07.066.

Andrés, V., Villanueva, M. J., Tenorio, M. D. (2016b) The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. *Food Chem.* **192**, 328–335.

Archbold, D. D., Koslanund, R., Pomper, K. W. (2003) Ripening and postharvest storage of pawpaw. *Horttechnology*. **13**, 439–441.

Assmann G., Buono P., Daniele A., Della Valle E., Farinaro E. (2014) Functional foods and cardiometabolic diseases International task force for prevention of cardiometabolic diseases. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases 24(12): 1272–1300.

Baiano A, Mastromatteo M, Del Nobile MA. (2012) Effects of Cultivar and Process Variables on Dynamic-Mechanical and Sensorial Behavior of Value-Added Grape-Based Smoothies. Molecules. 17(10):11421-11434. https://doi.org/10.3390/molecules171011421.

Balasubramaniam V.M., Martínez-Monteagudo S.I., Gupta R. (2015) Principles and application of high pressure–based technologies in the food industry. Annual Review of Food Science and Technology, 6 435-462.

Balogh, T., Smout, C., Nguyen, B.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2004) Thermal and high-pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase: From model system to real foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2004(5), 429–436.

Barba, F.J.; Cortés, C.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2011) Study of antioxidant capacity and quality parameters in an orange juice–milk beverage after high-pressure processing treatment. *Food Bioprocess Tech*, **5**, 2222-2232, doi:10.1007/s11947-011-0570-2.

Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A. (2010) Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **58**, 10070–10075.

Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A. (2012) High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review. *Compr Rev Food Sci F*, **11**, 307-322, doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00185.x.

Barba F.J., Parniakov O., Pereira S.A., Wiktor A., Grimi N., Boussetta N., Saraiva J.A., Raso J., Martin-Belloso O., Witrowa-Rajchert D., Lebovka N., Vorobiev E. (2015) Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. Food Research International 77: 773 – 798.

Barba F.J., Putnik P., Bursać Kovačević D., Poojary M.M., Roohinejad S., Lorenzo J.M., Koubaa M. (2017) Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (Opuntia spp.) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of by-products. Trends in Food Science & Technology 67: 260 - 270.

Barba, F.J., Terefe, N.S., Buckow, R., Knorr, D., Orlien, V. (2015) New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. Food Research International 77, 725-742.

Baron, A., Dénes, J.-M., Durier, C. (2006) High-pressure treatment of cloudy apple juice. *Lwt-Food Sci Technol*, **39**, 1005-1013, doi:10.1016/j.lwt.2006.02.016.

Bebek Markovinović, A., Putnik, P., Duralija, B., Krivohlavek, A., Ivešić, M., Mandić Andačić, I., Palac Bešlić, I., Pavlić, B., Manuel Lorenzo, J., Bursać Kovačević, D. (2022) Chemometric Valorization of Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) cv. 'Albion' for the Production of Functional Juice: the Impact of Physicochemical, Toxicological, Sensory, and Bioactive Value. *Foods*, 11(5), 640. doi: 10.3390/foods11050640

Bestwick, C., Scobbie, L., Milne, L., Duncan, G., Cantlay, L., Russell, W. (2020) Fruit-Based Beverages Contain a Wide Range of Phytochemicals and Intervention Targets Should Account for the Individual Compounds Present and Their Availability. Foods, 9, 891. https://doi.org/10.3390/foods9070891.

Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Perricone, M., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. (2018) Nonthermal Technologies for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: Overview and Advances. Compr Rev Food Sci Food Saf 17, 2-62.

Bhardwaj, R.L. i Pandey, S. (2011) Juice Blends – A way of utilization of under-utilized fruits, vegetables and spices: A Review. *Cr. Rev. Food Sci*. **51**, 563-570.

Bi, X.; Zhou, Z.; Qin, T.; Wang, X.; Ma, Y.; Xing, Y.; Che, Z. (2020) Effects of high pressure processing (HPP) on microorganisms and the quality of mango smoothies during storage. *RSC Advances*, **10**, 31333-31341, doi:10.1039/d0ra05181k.

Bogue J., Collins O., Troy A.J. (2016) Market analysis and concept development of functional foods. U: Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. Bagchi, D., Nair, S., ur., Academic Press, str. 29–45.

Bolumar, T., Middendorf, D., Toepfl, S., Heinz, V. (2016) Structural Changes in Foods Caused by High-Pressure Processing. U: Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Lelieveld, H.L.M. (ed): High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications, str. 509-537. Springer, NY, USA. DOI:10.1007/978-1-4939-3234-4_23.

Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., Crozier, A. (2010) Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3901-3909.

Bosiljkov T., Tripalo B., Ježek D., Brnčić M., Karlović S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji, Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske, 59 11 539 – 544.

Boyer, J., Liu, R. H. (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* **3**. 5.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., Maureira, H. (2011) Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. Food Chem 128, 520-529.

Brown L., Caligiuri S.P.B., Brown D., Pierce G.N. (2018) Clinical trials using functional foods provide unique challenges. Journal of Functional Foods 45: 233–238.

Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D. (2009) Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure temperature domains. Innov Food Sci Emerg Technol 10:441–448.

Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellahewa, J., Szabo, E.A., Johnson, R.L., Steward, C.M. (2004) The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. Innovative food science and emerging technologies 5, 135-149.

Buniowska, M.; Arrigoni, E.; Znamirowska, A.; Blesa, J.; Frígola, A.; Esteve, M.J. (2019) Liberation and micellarization of carotenoids from different smoothies after thermal and ultrasound treatments. *Foods*, **8**, doi:10.3390/foods8100492.

Bursać Kovačević, D., Bilobrk, J., Buntić, B., Bosiljkov, T., Karlović, S., Rocchetti, G., Lucini, L., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Putnik, P. (2019) High-power ultrasound altered the polyphenolic content and antioxidant capacity in cloudy apple juice during storage. Journal of Food Processing and Preservation 43. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.192

Bursać Kovačević, D., Brdar, D., Fabečić, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2020) Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. U: *Agri-food industry strategies for healthy diets and sustainability* (Barba, F. J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., ured.), Academic Press, London, str. 51-88.

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

Bursać, D., Vahčić, N., Levaj, B., Dragović-Uzelac, V., Biško, A. (2007) The influence of cultivar on sensory profiles of fresh and processed strawberry fruits grown in Croatia. Flavour Fragr. J. 22, 512-520. doi: 10.1002/ffj.1833

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

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

Caner, C., Hernandez, R.J., Harte, B.R. (2004) High-pressure processing effects on the mechanical, barrier and mass transfer properties of food packaging flexible structures: a critical review. Packaging Technology and Science 17, 23-29.

Cao, X., Bi, X., Huang, W., Wu, J., Hu, X., Liao, X. (2012) Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. Innov Food Sci Emerg Technol 16:181–190.

Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A. (2013) High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **18**, 48–56.

Cassidy Y.M., McSorley E.M., Allsopp P.J. (2018) Effect of soluble dietary fibre on postprandial blood glucose response and its potential as a functional food ingredient. Journal of Functional Foods 46: 423–439.

Castro, S.M., Saraiva, J.A., Lopes-Da-Silva, J.A., Delgadillo, I., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M. (2008) Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (Capsicum annuum L.). Food Chemistry, 107, 1436–1449.

Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Bozzi Nising, A., Hurrell, R. F. (2012) Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J. Food Compost. Anal.* **26**, 128-135.

Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal 10*, 178-182, doi:N/A.

Chang, S.K., Alasalvar, C., Shahidi, F. (2019) Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects – A comprehensive review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59:10, 1580-1604, DOI: 10.1080/10408398.2017.1422111

Chen, B.H., Peng, H.Y., Chen, H.E. (1995) Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. J. Agric. Food Chem. 43, 1912-1918.

Chibisov S., Singh M., Singh R.B., Halabi G., Horiuchi R., Takahashi T. (2019) Functional food security for pre-vention of obesity and metabolic syndrome. U: The role of functional food security in global health, Singh, R.B., Watson, R.R., Takahashi, T., ur., Academic Press, str. 145–156.

Chonan, O. (2011) FOSHU Japanese regulations for probiotic foods. In: Takeda, Y. (Ed.), Probiotic Foods in Health and Disease. CRC Press, Science Publishers, Enfield, CT, pp. 33-40.

Chrubasik, C., Li, G., Chrubasik, S. (2010) The clinical effectiveness of chokeberry: A systematic review. *Phytother. Res.* **24**, 1107–1114.

Chu, P. K., Lu, X. (2014) Low temperature plasma technology: Methods and applications, CRC Press – Taylor & Francis Group, London.

Chung-Yi, W., Hsiao-Wen, H., Chiao-Ping, H., Binghuei, B.Y. (2016) Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56:4, 527-540, DOI: 10.1080/10408398.2012.745479.

Condón-Abanto S., Arroyo C., Álvarez I., Condón S., Lyng J.G. (2016) Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (Cancer pagurus). International Journal of Food Microbiology 223: 9 – 16.

Coothankandaswamy, V., Liu, Y., Mao, S. C., Morgan, J. B., Mahdi, F., Jekabsons, M. B., Nagle, D. G., Zhou, Y. D. (2010) The alternative medicine pawpaw and its acetogenin constituents suppress tumor angiogenesis via the HIF-1/VEGF Pathway. *J. Nat. Prod.* **73**, 956–961.

Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018)The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. Frontiers in Nutrition,5, DOI: 10.3389/fnut.2018.00087.

Daskalova, E., Delchev, S., Topolov, M., Dimitrova, S., Uzunova, Y., Valcheva-Kuzmanova, S., Kratchanova, M., Vladimirova-Kitova, L., Denev, P. (2019) *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot fruit juice reveals neuroprotective effect and improves cognitive and locomotor functions of aged rats. *Food Chem. Toxicol.* **132**, 110674.

Dattaa, N., Deeth, H. C. (2018) Non-thermal technologies: High pressure processing. U: *Reference module in food science* (Smithers, G. W., Day, L., Ferranti, P., Fischer, A., Glibetic, M., Knoerzer, K., Lee, A., McSweeney, P., Robertson, G., Schasteen, C., Smith, N., Tanner, D., Varelis, P., ured.), Elsevier Academic, London, str. 1-8.

De Ancos, B., Rodrigo, M. J., Sánchez-Moreno, C., Pilar Cano, M., Zacarías, L. (2020) Effect of high-pressure processing applied as pretreatment on carotenoids, flavonoids and vitamin c in juice of the sweet oranges "Navel" and the red-fleshed "Cara Cara". *Food Res. Int.* **132**, 109105.

De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. (2019) Phenolic compounds. U: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (Yahia, E. M., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 253–271.

de Oliveira Ribeiro, L., Almeida, A.C.S., de Carvalho, C.W.P., Borguini, R.G., Ferreira, J.C.S., Freitas, S.P., da Matta, V.M., (2018) Effect of Processing on Bioactive Compounds, Physicochemical and Rheological Characteristics of Jucara, Banana and Strawberry Smoothie. Plant Foods Hum Nutr 73, 222-227.

De Pilli, T., Lopriore, G. (2018) Ripeness stage effects on quality characteristics of smoothies made up of sweet cherries (*P. Avium L., cv. 'Lapins'*). Emir. J. Food Agric, 30 (11), 959-967.

Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., Blazheva, D. (2019) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophilmodulating activities. *Food Chem.* **284**, 108–117.

Dereli, U., Türkyilmaz, M., Yemiş, O., Özkan, M. (2015) Effects of clarification and pasteurization on the phenolics, antioxidant capacity, color density and polymeric color of black carrot (*Daucus Carota* L.) juice. *J. Food Biochem.* **39**, 528–537.

Dhakal, S., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K. H., Sathe, S. K., Balasubramaniam, V. M. (2014) Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk, *Food Res. Int.* **62**, 215–222.

Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M. J. (2007) Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4209–4216.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011) Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* **28**, 1062–1071.

Diez-Sánchez, E.; Martínez, A.; Rodrigo, D.; Quiles, A.; Hernando, I. (2020) Optimizing high pressure processing parameters to produce milkshakes using chokeberry pomace. *Foods*, **9**, doi:10.3390/foods9040405.

Dijksterhuis, G.B., Piggott, J.R. (2000) Dynamic methods of sensory analysis. Trends in Food Science & Technology, 11(8), 284-290.

Donno, D., Mellano, M.G., Cerutti, A.K., Beccaro, G.L. (2018) Nutraceuticals in alternative and underutilized fruits and functional food ingredients: Ancient species for new health needs. U: Alternative and Replacement Foods, Volume 17 (Holban, A.M. i Grumezescu, A.M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 261-282.

EC (2020) Fruit and Vegetables. EC – European Commision, Bruxelles, <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/fruit-vegetables#_efsadatabase> Pristupljeno 16. travnja 2021.

Elamin, W.M., Endan, J.B., Yosuf, Y.A., Shamsudin, R., Ahmedov, A. (2015) High Pressure Processing Technology and Equipment Evolution : A Review. Journal of Engineering Science and Technology Review 8, 75-83.

Uredba komisije (EU) 432/2012 od 16.05.2012. o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=celex%3A32012R0432.

Fernández, M.V., Denoya, G.I., Agüero, M.V., Vaudagna, S.R., Jagus, R.J. (2019b) Quality preservation and safety ensurement of a vegetable smoothie by high-pressure processing. Journal of Food Processing and Preservation 44.

Fernandez, M. V., Denoya, G. I., Jagus, R. J., Vaudagna, S. R., Agüero, M. V. (2019a) Microbiological, antioxidant and physicochemical stability of a fruit and vegetable smoothie treated by high pressure processing and stored at room temperature, *LWT - Food Sci. Technol.* **105**, 206-210.

Fernández-Jalao, I.; Sánchez-Moreno, C.; De Ancos, B. (2019) Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **51**, 20-31, doi:10.1016/j.ifset.2018.06.002.

Ferrari G.; Maresca P.; Ciccarone R. (2010) The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. Journal of Food Engineering, 100, 245-253.

Filajdić, M. i sur. (1988) Metode za organoleptičku procjenu namirnica, Interna skripta PBF-a, Zagreb.

Gabrić, D., Barba, F. J., Roohinejad, S., Gharibzahedi, S. M. T., Radojčin, M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (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**, 1-14. doi: 10.1111/jfpe.12638

Gama, J. J. T., de Sylos, C. M. (2007) Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem.* **100**, 1686–1690.

Gebicki JM, Nauser T. (2021) Fast Antioxidant Reaction of Polyphenols and Their Metabolites. Antioxidants.10(8):1297. https://doi.org/10.3390/antiox10081297.

Gómez, B., Munekata, P.E.S., Zhu, Z., Barba, F.J., Toldrá, F., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J.M. (2019) Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects. U: Advances in Food and Nutrition Research, (Toldra, F., ured.), volume 89, Academic Press, str. 259-295. doi: 10.1016/bs.afnr.2019.03.003

Gómez, B., Barba, F.J., Domínguez, R., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Pateiro, M., Toldrá, F., Lorenzo, J.M. (2018) Microencapsulation of antioxidant compounds through innovative technologies and its specific application in meat processing. *Trends Food Sci Technol.*, 82(2018), 135-147. doi: 10.1016/j.tifs.2018.10.006

Granato, D., Barba, F.J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P. (2020) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol*. **11**(3), 1-26. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051708.

Granato, D., D.S. Nunes, and F.J. Barba, An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. Trends in Food Science & Technology, 2017. 62, 13-22.

Graziani, G., D'Argenio, G., Tuccillo, C., Loguercio, C., Ritieni, A., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, C., Fogliano, V., Romano, V. (2005) Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa *in vivo*. *Gut* **54**, 193–200.

Grosso G. Effects of Polyphenol-Rich Foods on Human Health. Nutrients. 2018; 10(8):1089. https://doi.org/10.3390/nu10081089.

Guiavarc'h, Y., Segovia, O., Hendrickx, M., Van Loey, A. (2005) Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*). Innovative Food Science & Emerging Technologies 6, 363–371.

Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J. F. (1998) Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1698–1705.

Hao, H., Zhou, T., Koutchma, T., Wu, F., Warriner, K. (2016) High hydrostatic pressure assisted degradation of patulin in fruit and vegetable juice blends. Food Control 62, 237-242.

Hasan, N. A. (2012) Almond milk production and study of quality characteristics. *Journal of Academia*, **2**, 1-8.

van het Hof, K.H.; Tijburg, L. B.; Pietrzik, K.; Weststrate, J.A. Influence of Feeding Different Vegetables on Plasma Levels of Carotenoids, Folate and Vitamin C. Effect of Disruption of the Vegetable Matrix. Br. J. Nutr. 1999, 82, 203–212.

Holdsworth, D. (2001) Continuous thermal processing of foods - Pasteurization and UHT sterilization. *Int J Food Sci Tech, 36*, 699-700, doi:10.1046/j.1365-2621.2001.0512a.x.

Hotz, C.; Gibson, R.S. (2007) Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. *The Journal of Nutrition*, **137**, 1097-1100, doi:10.1093/jn/137.4.1097.

Howard, L.R.; Clark, J.R.; Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr*, *83*, 1238-1247, doi:10.1002/jsfa.1532.

Huang, W.; Bi, X.; Zhang, X.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J. (2013) Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **18**, 74-82, doi:10.1016/j.ifset.2013.01.001.

Hulle, N.R.S., Srinivasa Rao, N.K. (2015) Effect of High Pressure Processing on Rheological Properties, Pectinmethylesterase Activity and Microbiological Characteristics of Aloe Vera (Aloe barbadensis Miller) Juice, International Journal of Food Properties, 18(7), 1597-1612, DOI: 10.1080/10942912.2014.923907.

Hurtado, A., Dolors Guàrdia, M., Picouet, P., Jofré, A., Bañón, S., Ros, J.M. (2019) Shelf-life extension of multi-vegetables smoothies by high-pressure processing compared with thermal treatment. Part I: Microbial and enzyme inhibition, antioxidant status, and physical stability. Journal of Food Processing and Preservation 43.

Hurtado, A., Guàrdia, M. D., Picouet, P., Jofré, A., Ros, J. M., Bañón, S. (2016) Stabilization of red fruit-based smoothies by high-pressure processing. Part A. Effects on microbial growth, enzyme activity, antioxidant capacity and physical stability, *J. Sci. Food Agric.* **97**, 770-776.

Hurtado, A., Picouet, P., Jofré, A., Guàrdia, M.D., Ros, J.M., Bañón, S. (2015) Application of High Pressure Processing for Obtaining "Fresh-Like" Fruit Smoothies. Food and Bioprocess Technology 8, 2470-2482.

Hurtado, A., Dolors Guardia, M., Picouet, P., Jofre, A., Maria Rios, J., Banon, S. (2016) Stabilization of red fruit -based smoothies by high pressure processing. Part II: effects on sensory quality and selected nutrients. J Sci Food Agric., DOI 10.1002/jsfa.7795.

Husband, F.A., Aldick, T., der Plancken, I., Grauwet, T., Hendrickx, M., Skypala, I., Mackie, A.R. (2011) High-pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. Molecular Nutrition and Food Research, 55(7), 1087–1095.

Inada K.O.P., Torres A.G., Perrone D., Monteiro M. (2017) High hydrostatic pressure processing affects the phenolic profile, preserves sensory attributes and ensures microbial quality of jaboticaba (Myrciaria jaboticaba) juice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98 (1), 231 – 239.

Jalali-Khanabadi, B. A., Mozaffari-Khosravi, H., Parsaeyan, N. (2010) Effects of almond dietary supplementation on coronary heart disease lipid risk factors and serum lipid oxidation parameters in men with mild hyperlipidemia, *J. Altern. Complement. Med.* **16**, 1279–1283.

Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R. F., Octavianti, F. (2011) Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J. Med. Plants Res.* **5**, 7119–7131.

Ježek, D., Karlović, S., Bosiljkov, T., Marelja, M., Škegro, M., Dujmić, F. (2017) Antioxidant activity of high-pressure processed tangerine juice. Journal of Biotechnology 2017, S74. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.1053.

Jillavenkatesa, A., Dapkunas, S. J., Lin-Sien Lum (2001) Particle Size Characterization, National Institute of Standards and Technology, Special Publication 960-1, Washington.

Jiménez-Aguilar, D.M.; Escobedo-Avellaneda, Z.; Martín-Belloso, O.; Gutiérrez-Uribe, J.; Valdez-Fragoso, A.; García-García, R.; Torres, J.A.; Welti-Chanes, J. (2015) Effect of high hydrostatic pressure on the content of phytochemical compounds and antioxidant activity of prickly pears (Opuntia ficus-indica) beverages. *Food Eng Rev* **7**, 198-208, doi:10.1007/s12393-015-9111-5.

Juarez-Enriquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N., Ramaswamy, H.S., Ortega-Rivas, E., 2015. Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. LWT - Food Science and Technology 62, 915-919.

Karlović S., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M., Tripalo B., Dujmić F. (2014) Textural Properties of High Hydrostatic Pressure Processed Vegetable Based Products. U: International Food Congress Novel Approaches in Food Industry, Abstract Book. Kusadasi, Turska.

Kasicki M.B., Bağdatlioğlu, N. (2017) Impact of nonthermal treatments on quantity and bioaccessibility of phenolic compounds in food matrix. *EC Nutrition 12.1*, 29-36.

Keenan, D.F., Rößle, C., Gormley, R., Butler, F., Brunton, N.P. (2012) Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. LWT - Food Science and Technology 45, 50-57.

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T., Rupasinghe, H. P. V. (2008) Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 396–401.

Kim, H.K., Leem, K.-H., Lee, S., Kim, B.-Y., Hahm, Y.T., Cho, H.-Y., Lee, J.Y. (2012) Effect of high hydrostatic pressure on immunomodulatory activity of cloudy apple juice. Food Science and Biotechnology 21, 175-181.

Kim, N. H., Jegal, J., Kim, Y. N., Chung, D. M., Heo, J. D., Rho, J. R., Yang, M. H., Jeong, E. J. (2018) Antiobesity effect of fermented chokeberry extract in high-fat diet-induced obese mice. *J. Med. Food.* **21**, 1113–1119.

Lange, K.W. (2021) Food science and COVID-19, Food Science and Human Wellness,10 (1), 1-5.

Klein, C. S., Rodriguez - Concepcion, M. (2015) Carotenoids in Carrot. U: *Pigments in Fruits and Vegetables* (Chen, C., ured.), Springer, New York, str. 217–228.

Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. (2010) Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing—a study of some insulating polymer materials. J. Food Eng. 98:110–19.

Knoerzer, K., Chapman, B. (2011) Effect of material properties and processing conditions on the prediction accuracy of a CFD model for simulating high pressure thermal (HPT) processing. J. Food Eng. 104:404–13.

Kobayashi, H., Wang, C.Z., Pomper, K.W. (2008) Phenolic content and antioxidant capacity of pawpaw fruit (*Asimina triloba* L.) at different ripening stages. *HortScience* **43**, 268–270.

Koley, T.K.; Nishad, J.; Kaur, C.; Su, Y.; Sethi, S.; Saha, S.; Sen, S.; Bhatt, B.P. (2020) Effect of high-pressure microfluidization on nutritional quality of carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Journal of Food Science and Technology* **57**, 2159-2168, doi:10.1007/s13197-020-04251-6.

Kostelac D., Putnik P., Markov K., Frece J., Bursać Kovačević D. (2019). Effects of electrotechnologies on enzymes in foods and food model systems. Current Opinion in Food Science 31: 47 - 56. doi: 10.1016/j.cofs.2019.10.005

Koubaa, M., Barba, F. J., Bursać-Kovačević, D., Putnik, P., Santos, M. D., Queirós, R. P., Moreira, S. A., Inácio, R. S., Fidalgo, L. G., Saraiva, J. A. (2018) Pulsed electric field processing of fruit juices. U: *Fruit Juices* (Rajauria, G., Tiwari, B., ured.), Academic Press, London, str. 437-449.

Koutchma, T. (2014) Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations, Elsevier, London, UK.

Kubo, M.T.K., Augusto, P.E.D, Cristianini, M. (2013) Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical stability of tomato juice. Food Research International, 51(1), 170-179.

Kulling, S.E., i Rawel, H.M. (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*. **74**, 1625-1634.

Lancaster, J. E., Dougall, D. K. (1992) Regulation of skin color in apples. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 487–502.

Landl, A., Abadias, M., Sarraga, C., Vinas, I., Picouet, P.A. (2010) Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple puree product. Innov Food Sci Emerg Technol. 11:557–564.

Laslo, V.; Teusdea, A.C.; Socaci, S.A.; Mierlita, D.; Vicas, S.I. (2017) Influence of pasteurization on total phenols content and antioxidant capacity of *Prunus persica* L. juices. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 45*, 553-560, doi:10.15835/nbha45210699.

Lawless, H.T., Heymann, H. (1999) Sensory evaluation of food principles and practices, 2. izd., Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, str. 341 – 378.

Lee, H., Coates, G. (1999), Thermal Pasteurization Effects on Color of Red Grapefruit Juices. Journal of Food Science, 64, 663-666. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15106.x.

Lee, J. E., Kim, G.-S., Park, S., Kim, Y.-H., Kim, M.-B., Lee, W. S., Shin, S. C. (2014) Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chem.* **146**, 1–5

Leite Júnior, B.R.d.C.; Tribst, A.A.L.; Cristianini, M. (2017) Effect of high-pressure technologies on enzymes applied in food processing. In *Enzyme Inhibitors and Activators* 10.5772/66629.

Leja, M., Marczek, A., Wojciechowska, R., Rożek, S. (1997) Phenolic metabolism in root slices of selected carrot eultivars. Acta Physiol. Plant. 3, 319-325.

Leneveu-Jenvrin, C.; Quentin, B.; Assemat, S.; Remize, F. (2020) Maintaining physicochemical, microbiological, and sensory quality of pineapple juice (*Ananas comosus*, Var. ‘Queen Victoria’) through mild heat treatment. *Processes, 8*, doi:10.3390/pr8091186.

Lenssen K.G.M., Bast A., De Boer A. (2018) Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. Journal of Functional Foods 47: 386–396

Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Číž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y. S., Jung, S. T., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O. (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 603–610.

Leppanen J., Cardi V., Ng K.W., Paloyelis Y., Stein D., Tchanturia K., Treasure J.(2017) The effects of intranasal oxytocin on smoothie intake, cortisol and attentional bias in anorexia nervosa. Psychoneuroendocrinology, 79, 167-174.

Liang Z., Siyuan W., Fengxia L., Peng D., Wenshu H., Xiong L., Xiaojun L. (2013) Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 17, 27-36.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterisation by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1 – F4.3.8.

Lim, S. M., Lee, H. S., Jung, J. I., Kim, S. M., Kim, N. Y., Seo, T. S., Bae, J. S., Kim, E. J. (2019) Cyanidin-3-O-galactoside-enriched *Aronia melanocarpa* extract attenuates weight gain and adipogenic pathways in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrients* **11**, 1190.

Liu F., Zhang X., Zhao L., Wang Y., Liao X. (2015) Potential of high-pressure processing and high-temperature/short time thermal processing on microbial, physicochemical and sensory assurance of clear cucumber juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 34, 51 – 58.

Liu J., Xu, D., Chen, S., Yuan, F., Mao, L., Gao, Y. (2021) Superfruits in China: Bioactive phytochemicals and their potential health benefits – A Review. Food Sci Nutr, 9(12), 6892-6902.

Liu, J., Wang, R., Wang, X., Yang, L., Shan, Y., Zhang, Q., Ding, S. (2019) Effects of High-Pressure Homogenization on the Structural, Physical, and Rheological Properties of Lily Pulp. Foods, 8(10):472. https://doi.org/10.3390/foods8100472.

López-Pedrouso, M., Bursać Kovačević, D., Oliveira, Putnik, P., Moure, A., Lorenzo, J.M., Domínguez, H., Franco, D. (2020) *In vitro* and *in vivo* Antioxidant Activity of Anthocyanins. U: Anthocyanins - antioxidant properties, sources and health benefits. (Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Munekata, P. ured.), Nova Science Publishers Inc., New York, USA, str. 169-204.

Lorenzo, J.M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Petrović, M., Munekata, P.E., Gómez, B., Marszałek, K., Roohinejad, S., Barba, F.J. (2020) Silymarin Compounds: Chemistry, Innovative Extraction Techniques and Synthesis. U: Studies in Natural Products Chemistry (Atta-ur-Rahman, ured.), Volume 64, poglavlje 4, Elsevier, str. 112-128. doi: 10.1016/B978-0-12-817903-1.00004-8

Mahadevan, S., Karwe, M. V. (2016) Effect of high-pressure processing on bioactive compounds. U: *High pressure processing of food* (Balasubramaniam, V. M., ured.), Springer, New York, 479–507.

Mahboobeh, Z., Zahra, N.R., Elham, A. Seid Mahdi J. (2021) Improving the cancer prevention/treatment role of carotenoids through various nano-delivery systems, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 61(3), 522-534, DOI: 10.1080/10408398.2020.1738999.

Mak K.K., Tan J.J., Marappan P., Balijepalli M.K., Choudhury H., Ramamurthy S., Pichika M.R. (2018) Galangin's potential as a functional food ingredient. Journal of Functional Foods 46: 490–503.

Mandić, M.L., Perl, A. (2016) Osnove senzorske procjene hrane, Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek.

Margean A., Lupu M.I., Alexa E., Padureanu V., Canja C.M., Cocan I., Negrea M., Calefariu G., Poiana M.A. (2020) An overview of effects induced by pasteurization and high-power ultrasound treatment on the quality of red grape juice. Molecules 25(7): 1669.

Marszałek, K., Krzyzanowska, J., Wozniak, L., Skapska, S. (2017) Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment, LWT - Food Science and Technology http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.018

Marszałek, K.; Mitek, M.; Skąpska, S. (2015) The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and

enzyme activity in strawberry purée. *Innov. Food Sci. Emerg.* **27**, 48-56, doi:10.1016/j.ifset.2014.10.009.

Marti N., Perez-Vicente A., Garcia-Viguera C. (2001) Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 217-221.

Martínez-Hernández, G.B.; Artés-Hernández, F.; Gómez, P.A.; Artés, F. (2013) Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J Funct Foods*, **5**, 133-143, doi:10.1016/j.jff.2012.09.004.

Martinez-Monteagudo, S.I., Balasubramianiam, V.M. (2016) Fundamentals and Applications of High-pressure Processing Technology. In: High Pressure Processing of Food-Principles, Technology and Application, Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Canovas, G.V., Lelieveld, H (ed.), New York, USA: Springer LLC, pp. 3-17.

Mason T.J. (2003) Sonochemistry and sonoprocessing: The link, the trends and (probably) the future. Ultrasonics Sonochemistry 10: 175 – 179.

Matser, A.M., Knott, E.R., Teunissen, P.G.M., Bartels, P.V. (2000) Effects of high isostatic pressure on mushrooms. J Food Eng 45:11–16.

Matser, A.M., Timmermans, R. (2016) High-Pressure Effects on Fruits and Vegetables. U: Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Lelieveld, H.L.M. (ed): High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications, str. 541-551. Springer, NY, USA.

Matser, A., Vollebregt, M. (2017) High-pressure processing combined with heat for fruit and vegetable preservation. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 135-145.

Mayer, B., Schumacher, M., Brandstätter, H., Wagner, F. S., Hermetter, A. (2001) High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal. Biochem.* **297**, 144–153.

Mayne, S.T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* **10**, 690–701

McCartney, D.M., Rattray, M., Desbrow, B., Khalesi, S., Irwin, C. (2018) Smoothies: Exploring the Attitudes, Beliefs and Behaviours of Consumers and Non-Consumers. Current Research in Nutrition and Food Science Journal 6, 425-436. DOI 10.12944/CRNFSJ.6.2.17

Medina, M.B. (2011) Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J Funct Foods, 3*, 79-87, doi:10.1016/j.jff.2011.02.007.

Mert M., Buzrul S., Alpas H. (2013) Effects of high hydrostatic pressure on microflora and some quality attributes of grape juice. High Pressure Research: An International Journal 33(1), 55-63.

Mieszczakowska-Frąc, M., Celejewska, K., Płocharski, W. (2021) Impact of Innovative Technologies on the Content of Vitamin C and Its Bioavailability from Processed Fruit and Vegetable Products. Antioxidants, 10(1), 54. https://doi.org/10.3390/antiox10010054.

Milić, A., Daničić, T., Tepić Horecki, A., Šumić, Z., Teslić, N., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Pavlić, B. (2022) Sustainable Extractions for Maximizing Content of Antioxidant Phytochemicals from Black and Red Currants. Foods, 11, 325. doi: 10.3390/foods11030325

Morales-de la Peña, M., Welti-Chanes, J., Martín-Belloso, O. (2016) Application of novel processing methods for greater retention of functional compounds in fruit-based beverages. Beverages. 2, 14-26.

Murphy, B., Benson, T., McCloat, A., Mooney, E., Elliott, C., Dean, M., Lavelle, F. (2021) Changes in Consumers' Food Practices during the COVID-19 Lockdown, Implications for Diet Quality and the Food System: A Cross-Continental Comparison. Nutrients, 13(1), 20.

Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., Böhm V. (2010) Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology, 43 (6) 992-999. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.02.004.

Nam, J.S., Park, S.Y., Lee, H.J., Lee, S.O., Jang, H.L., Rhee, Y.H. (2018b) Correlation between acetogenin content and antiproliferative activity of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp grown in Korea. *J. Food Sci.* **83**, 1430-1435.

Nam, J.S., Park, S.Y., Oh, H.J., Jang, H.L., Rhee, Y.H. (2018a) Phenolic profiles, antioxidant and antimicrobial activities of pawpaw pulp (*Asimina triloba* [L.] Dunal) at different ripening stages. *J. Food Sci.* **84**, 174-182.

Namitha, K. K., Negi, P. S. (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**, 1040–8398.

Nguyen, H. H. V., & Nguyen, L. T. (2015). Carrot processing. In Y. H. Hui, & E. €O. Evranuz (Eds.), Handbook of vegetable preservation and processing (pp. 449–466). Florida: CRC Press.

Nieva, S.G. , Jagus, R.J., Agüero, M.V., Fernandez, M.V. (2022) Fruit and vegetable smoothies preservation with natural antimicrobials for the assurance of safety and quality, LWT,154, https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112663.

Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M., Aubert, S. Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 109–157.

Odluka o proglašenju zakona o izmjenama i dopunama zakona o vinu, NN 55/2001, 18.05.2011., https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_05_55_1201.html.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2008) Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. Trends in Food Science & Technology 19, 320-328.

Oliver, J., Palou, A. (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr. A.* **881**, 543-555.

Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., & Martín-Belloso, O. (2012). The effects of nonthermal technologies on phytochemicals. In V. Rao (Ed.), Phytochemicals- A global perspective of their role in nutrition and health. 978-953-51-0296-0, 107–126.

Ordóñez-Santos L.E., Martínez-Girón J., Arias-Jaramillo M.E. (2017) Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. Food Chemistry 233: 96 – 100.

Otunola, G.A., Martirosyan D. (2021) Choosing Suitable Food Vehicles for Functional Food Products. Functional Foods in Health and Diseaase, 11(2), 44.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science, 5, e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41.

Pateiro, M., Domínguez, R., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Barba, F.J., Munekata, P.S.E., Fierro, E.M., Lorenzo, J.M. (2020) Herbal Product Development and Characteristics. U: Herbal

product development - Formulation and Applications (Sharma, A.K., Keservani, R.K., Gautam, S.P., ured.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, str. 205-240.

Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P.E.S., Barba, F.J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J.M. (2021) Nanoencapsulation of Promising Bioactive Compounds to Improve Their Absorption, Stability, Functionality and the Appearance of the Final Food Products. *Molecules*, 2021(26), 1547.

Patras, A., Brunton, N.P., Pieve, S.D., Butler, F. (2009a) Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and color of strawberry and blackberry purees. Innov Food Sci Emerg Technol 10:308–313.

Patras, A., Brunton, N.P., Pieve, S.D., Butler, F., Downey, G. (2009b) Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10(1), 16–22.

Pavlić, B., Šojić, B., Teslić, N., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (2021) Extraction of bioactive compounds and essential oils from herbs using green technologies. U: Aromatic herbs in food (Galanakis, C., ured.), cademic Press, Elsevier, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 237-266.

Perera C.O., Yen G.M. (2007) Functional Properties of Carotenoids in Human Health, International Journal of Food Properties, 10(2), 201-230, DOI: 10.1080/10942910601045271.

Perera, N., Gamage, T.V., Wakeling, L., Gamlath, G.G.S., Versteeg, C. (2010) Colour and texture of apples high pressure processed in pineapple juice. Innov Food Sci Emerg Technol 11:39–46.

Petrus, R., Churey, J., Worobo, R. (2019) Searching for high pressure processing parameters for Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes reduction in Concord grape juice. British Food Journal 122, 170-180.

Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2017) Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. Compr Rev Food Sci Food Saf 16, 668-691.

Pistollato, F., Iglesias, R. C., Ruiz, R., Aparicio, S., Crespo, J., Lopez, L. D., Manna, P. P., Giampieri, F., Battino, M. (2018) Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: a focus on human studies. *Pharmacol. Res.* **131**, 32–43

Podolak R., Whitman D., Black D.G. (2020) Factors Affecting Microbial Inactivation during High Pressure Processing in Juices and Beverages: A Review. *J Food Prot*.,**83(9)**: 1561-1575.

Porębska, I., Sokołowska, B., Skąpska, S., Rzoska, S. J. (2017) Treatment with high hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide to control Alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice. Food Control 73 (Part A), 24-30. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.005.

Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. NN 48/2013, 24.03.2013., https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html.

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

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Herceg, K., Pavkov, I., Levaj, B. (2017) Effects of modified atmosphere, anti-browning treatments and ultrasound on the polyphenolic stability, antioxidant capacity and microbial growth in fresh-cut apples. *J. Food Process Eng.* **40**, e12539.

Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Režek Jambrak, A., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Roohinejad, S., Granato, D., Žuntar, I., Bursać Kovačević, D. (2019) Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. *Food Chem.* **279**, 150–161.

Putnik, P., Pavlić, B., Šojić, B., Zavadlav, S., Žuntar, I., Kao, L., Kitonić, D., Bursać Kovačević, D. (2020) Innovative hurdle technologies for the preservation of functional fruit juices. Foods, 9(6), 699. DOI:10.3390/foods9060699.

Radivojac, A., Bera, O., Zeković, Z., Teslić, N., Mrkonjić, Ž., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Pavlić, B. (2021) Extraction of Peppermint Essential Oils and Lipophilic Compounds: Assessment of Process Kinetics and Environmental Impacts with Multiple Techniques. Molecules, 26(10), 2879

Queiroz, C.; Moreira, C.F.F.; Lavinas, F.C.; Lopes, M.L.M.; Fialho, E.; Valente-Mesquita, V.L. (2010) Effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. *High Pressure Research*, **30**, 507-513, doi:10.1080/08957959.2010.530598.

Rao, P.S., Chakraborty, S., Kaushik, N., Kaur, B.P., Swami-Hulle, N.R. (2014) High Hydrostatic Pressure Processing of Food Materials. In: Introduction to Advanced Food Process Engineering, J. K. Sahu (ed.), London: CRC Press, UK, pp. 151-186.

Rao S.S., Singh R.B., Takahashi T., Juneja L.R., Fedacko J., Shewale A.R. (2019) Economic burden of noncommu- nicable diseases and economic cost of functional foods for prevention. U: The role of functional food security in global health, Singh, R.B., Watson, R.R., Takahashi, T., ur., Academic Press, str.57–68.

Rastogi, N.K. (2013) Recent Developments in High Pressure Processing of Foods, Springer, Briefs in Food, Health, and Nutrition, DOI 10.1007/978-1-4614-7055-7_1.

Renard, C., Maingonnat, J. F. (2012) Thermal Processing of Fruits and Fruit Juices. U: *Thermal food processing: new technologies and quality issues*, 2.izd. (Sun, D.-W., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 413–438.

Rewell, J., (2008) Sensory Profile & Consumer Acceptability of Sweet Cherries. MR Thesis, School of Bioscience, University of Nottingham, Liecestershire, UK.

Ribaya-Mercado, J. D., Blumberg, J. B. (2004) Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 567S–587S.

Ribeiro, L.d.O., Barbosa, I.d.C., SÁ, D.d.G.C.F.d., Silva, J.P.L.d., Matta, V.M.d., Freitas, S.P. (2020) Stability evaluation of juçara, banana and strawberry pasteurized smoothie during storage. Food Science and Technology 40, 387-393.

Roberfroid, M.B. (2000) Defining functional foods. In: Gibson G. R., & Williams C. M (eds.) Functional foods Concept to product. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 9-25.

Rock, C.L.; Lovalvo, J.L.; Emenhiser, C.; Ruffin, M.T.; Flatt, SW.; Schwartz, S.J. Bioavailability of β-Carotene Is Lower in Raw than in Processed Carrots and Spinach in Women. The Journal of Nutrition. 1998, 128 (5), 913–916.

Rodriguez-Amaya, D. B. (1999) *A guide to carotenoid analysis in foods*, International life Sciences Institute Press, Washington DC, str. 12.

Romesburg, C. (2004) Cluster Analysis for Researchers. Lulu.com, SAD.

Roobab U., Aadil R.M., Madni G.M., Bekhit A.E.D. (2018) The impact of nonthermal technologies on the microbiological quality of juices: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 17: 437 – 457.

Roobab, U., Abida, A., Afzal, A., Madni, G.M., Zeng, X.-A., Rahaman A., Aadil R.M. (2021) Impact of high-pressure treatments on enzyme activity of fruit-based beverages: an overview. International Journal of Food Science and Technology, 57, 801 – 815.

Ruxton, C.H.S., Gardner, J., Walker, D. (2006) `Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence', Int J Food Sci Nutr, 57, 249-272.

Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martinez, P., De Ancos, B., Martin-Belloso, O., Cano, M.P. (2005) Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(11), 4403–4409.

Scalbert, A., Johnson, I., Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. Am J Clin Nutr. 81, 2155-2175.

Scheibenzuber, M. (2003) Molekulare und klinische Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung allergener Lebensmittel. PhD thesis. TU Muenchen.

Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K., Holzhauser, T. Knorr, D., Eisenbrand, G. (2013.) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. Mol. Nutr. Food Res. 57, 920 – 927.

Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S., Attri, S. (2012) Chemical composition, functional properties and processing of carrot - a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 22-32.

Sila, D.N., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlenta, I., Smout, C., Moates, G.H., Hills, B.P., Waldron, K.K.,Hendrickx, M., Van Loey, A. (2008) Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. Trends Food Sci Technol 19:309–319.

Singh, J. P., Kaur, A., Shevkani, K., Singh, N. (2015) Influence of jambolan (Syzygium cumini) and xanthan gum incorporation on the physicochemical, antioxidant and sensory properties of gluten-free eggless rice muffins. Int. J. Food Sci. Tech., 50, 1190-1197.

Spencer, J. P. E. (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* **104**, S40–S47.

Stahl, W. i Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. Mol. Aspects Med. 24, 345-351.

Stevenson, D.E., Hurst, R.D. (2007) Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?. Cell. Mol. Life Sci. 64, 2900–2916. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1.

Stinco, C.M., Szczepanska, J., Marszalek, K., Pinto, C.A., Inacio, R.S., Mapelli-Brahm, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Saraiva, J.A., Melendez-Martinez, A.J. (2019) Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. Food Chem 299, 125112.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.

Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., Liu, R. H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7449–7454.

Sun-Waterhouse, D. (2011) The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. International Journal of Food Science & Technology 46, 899-920.

Swamy G.J., Muthukumarappan K., Asokapandian S. (2018) Ultrasound for fruit juice preservation U: Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis, 1.izd., Rajauria G., Tiwari B., Academic Press: Cambridge, str. 451 – 461.

Štefoković, I. (2000) Metoda kvantitativne deskriptivne analize u senzorskoj procjeni jogurta. Diplomski rad Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Zagreb.

Teleszko, M. i Wojdyło, A. (2014) Bioactive compounds vs. organoleptic assessment of „smoothies“-type products prepared from selected fruit species. Int. J. Food Sci. Technol. 49, 98-106.

Teo, A.Y., Ravishankar, S., Sizer, C.E. (2001) Effect of low temperature, high pressure treatment on the survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in unpasteurized fruit juices. Journal of food protection vol 64-No 8, 112-1127.

Terefe, N.S., Ya, H.Y., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. (2010) High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. Innov Food Sci Emerg Technol 11:52–60.

Tewari, S.; Sehrawat, R.; Nema, P.K.; Kaur, B.P. (2017) Preservation effect of high pressure processing on ascorbic acid of fruits and vegetables: A review. *J Food Biochem* **41**, doi:10.1111/jfbc.12319.

Tiwari B.K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. Trends in Analytical Chemistry 71: 100 – 109.

Timmermans, R.A.H., Mastwijk, H.C., Knol, J.J., Quataert, M.C.J., Vervoort, L., Van der Plancken, I., Hendrickx, M.E., Matser, A.M. (2011) Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12 (3),235-243.

Ting, E., Balausubramaniam, V.M., Raghubeer, E. (2002) Determining thermal effects in high pressure processing, J. Food Technol. 56, 31–35

Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R., Beekwilder, J., Capanoglu, E. (2015) The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. *Food Chem.* **186**, 277–284.

Tomašević, I., Putnik, P., Valjak, F., Pavlić, B., Šojić, B., Bebek Markovinović, A., Bursać Kovačević, D. (2021) 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Curr. Opin. Food Sci*, **41**, 138–145.

Tremarin A., Brandão T.R.S., Silva C.L.M. (2017) Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for Alicyclobacillus acidoterrestris spores inactivation in apple juice. LWT-Food Science and Technology 78: 138 – 142.

Tříska, J. (2017) Health active components in fruit/ vegetable juices treated by high pressure. U: *High pressure processing of fruit and vegetable products* (Houška, M., Silva, F. V. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 105-119.

Ubeira – Iglesias M., Wilches -Perez, D., Mar Cavia M., Alonso – Torre S., Carrillo, C. (2019) High hydrostatic pressure processing of beetroot juice: effects on nutritional, sensory and microbiological quality. High Pressure Research – An International Journal. i-16

Union, T.E.P.a.t.c.o.t.E. Regulation (EC) No 2073/2005 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 on microbiological criteria for foodstuffs. OJEU, 338/1.

Uzodinma, E.O., Mbaeyi-Nwaoha, I.E, Onwurafor, E.U., Ochulor, C.E. (2020) Influence of Pasteurization on the Quality of Pineapple, Watermelon and Banana Pulps-based Smoothie

Flavoured with Coconut Milk. American Journal of Food Science and Technology, 8(3), 99-105. doi: 10.12691/ajfst-8-3-3.

Vahčić, N., Hruškar, M., Marković, K. (2000) Metoda kvantitativne deskriptivne analize u senzorskoj procjeni jogurta. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka. 50(4), 279-296.

Valcheva-Kuzmanova, S., Eftimov, M., Belcheva, I., Tashev, R., Belcheva, S. (2013) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on learning and memory in the two-way active avoidance task in rats. *J. Biomed. Clin. Res*, **6**, 18–23.

Valcheva-Kuzmanova, S., Eftimov, M., Tashev, R., Belcheva, I., Belcheva, S. (2014) Memory effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in a passive avoidance test in rats. *Folia Med.* **56**, 199–203.

Van den Berg, R.W., Hoogland, H., Lelieveld, H.L.M., Van Schepdael, L. (2001) High Pressure Equipment Designs for Food Processing Applications. In: Hendrickx M.E.G., Knorr D., Ludikhuyze L., Van Loey A., Heinz V. (eds) Ultra High Pressure Treatments of Foods. Food Engineering Series. Springer, Boston, MA.

Van der Plancken, I., Verbeyst, L., De Vleeschouwer, K., Grauwet, T., Heinio, R., Husband, F.A., Lille, M., Mackie, A.R., Van Loey, A., Viljanen, K., Hendrickx, M. (2012) (Bio)chemical reactions during high pressure/high temperature processing affect safety and quality of plant-based foods. Trends Food Sci Techn 23:28–38.

Vásquez-Caicedo, A.S., Reinhold S. Neidhart, S. (2007). Effects of thermal processing and fruit matrix on β-carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into puree and nectar. Food Chemistry, 102, 1172-1186. 10.1016/j.foodchem.2006.07.005.

Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Guamis-López, B., Roig-Sagués, A.X. (2012) Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization. Innovative Food Sci. Emerg. Technol. 13: 100–106

Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Lemmens, L., Lurquin, I., Hendrickx, M.E.G., Michiels, C.W. (2012) High pressure pasteurization of apple pieces in syrup: Microbiological shelf-life and quality evolution during refrigerated storage, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 16, 259-266.

Verma, D., Mamta, S., Prem, Ki, Vahid S.H. (2020). Effects of Drying Technology on Physiochemical and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. 10.1201/9780429297335-3.

Vieira, F.; Lourenço, S.; Fidalgo, L.; Santos, S.; Silvestre, A.; Jerónimo, E.; Saraiva, J. (2018) Long-term effect on bioactive components and antioxidant activity of thermal and high-pressure pasteurization of orange juice. *Molecules*, *23*, doi:10.3390/molecules23102706.

Wang, C.Y., Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B., 2016. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. Crit Rev Food Sci Nutr 56, 527-540.

Woldemariam, H.W.; Emire, S.A.; Yildiz, F. (2019) High pressure processing of foods for microbial and mycotoxins control: Current trends and future prospects. *Cogent Food & Agriculture*, *5*, doi:10.1080/23311932.2019.1622184.

https://www.smoothiekingfranchise.com/articles/resources/downloadable-resources/the-evolution-of-the-smoothie-industry/ pristupljeno 15.12.2021.

https://www.iso.org/ics/67.240/x/, pristupljeno: 15.12.2021.

Yuan, B., Danao, M.-G.C., Stratton, J.E., Weier, S.A., Weller, C.L., Lu, M. (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. Innovative Food Science & Emerging Technologies 47, 249-255.

Zujko, M. E., Witkowska, A. M. (2014) Antioxidant potential and polyphenol content of beverages, chocolates, nuts, and seeds. *Int. J. Food Prop.* **17**, 86–92.

Zulueta, A.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2012) Changes in quality and nutritional parameters during refrigerated storage of an orange juice–milk beverage treated by equivalent thermal and non-thermal processes for mild pasteurization. *Food Bioprocess Tech*, **6**, 2018-2030, doi:10.1007/s11947-012-0858-x

Zakon o hrani, NN 46/07, 07.05.2007. narodne - novine.nn.hr /clanci/ sluzbeni/ 2007_05_46_1554.html.

Zhu, Z., Gavahian, M., Barba, F.J., Roselló-Soto, E., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Denoy, G.I. (2020) Valorization of waste and by-products from the food industry through the use of innovative technologies. U: Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability. (Barba, F.J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., ured.), Academic Press, str. 247-267. doi: 10.1016/B978-0-12-817226-1.00011-4