

Utjecaj koncentriranja membranskim procesima na tvari boje i arome soka od aronije

Popović, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:070669>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Kristina Popović

**UTJECAJ KONCENTRIRANJA MEMBRANSKIM
PROCESIMA NA TVARI BOJE I AROME SOKA OD ARONIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, siječanj, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni(doktorski) studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za prehrambene tehnologije

Katedra za prehrambeno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.081.6 : 664.1.039 (043.2)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana: inženjerstvo

Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 30. svibnja 2017.

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Anita Pichler

UTJECAJ KONCENTRIRANJA MEMBRANSKIM PROCESIMA NA TVARI BOJE I AROME

SOKA OD ARONIJE

Kristina Popović, 21/D

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene membranske filtracije, reverzne osmoze i nanofiltracije, u svrhu koncentriranja soka od aronije (*Aronia melanocarpa*). Istraživanje je obuhvatilo ispitivanje utjecaja procesnih parametara (tlaka i temperature) na protok permeata, te tvari boje i arome dobivenih koncentrata soka od aronije. U procesima nanofiltracije bilo je moguće koncentrirati sok od aronije do većeg udjela topljive suhe tvari za razliku od procesa reverzne osmoze. S obzirom na veću poroznost membrane permeati dobiveni nanofiltracijom su sadržavali manju količinu tvari koje su prošle kroz membranu tijekom procesa koncentriranja. Dobiveni rezultati pokazuju kako se primjenom većeg procesnog tlaka povećao protok permeata i smanjilo vrijeme trajanja kod oba ispitivana procesa. U procesima s hlađenjem zabilježen je manji protok permeata. Procesni parametri su također imali značajan utjecaj na zadržavanje (retenciju) polifenolnih spojeva (antocijani, flavonoli i fenolne kiseline), antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje tvari arome. Boljim, u smislu veće retencije, se pokazao proces reverzne osmoze. Primijena većeg tlaka uz hlađenje doprinosi većem zadržavanju tvari boje i arome.

Ključne riječi: aronija, reverzna osmoza, nanofiltracija, koncentriranje, tvari boje i tvari arome

Rad sadrži: 162 stranica
67 slika
28 tablica
1 prilog
293 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. dr. sc. Mirela Kopjar, red. prof. | predsjednik |
| 2. dr. sc. Lidija Jakobek Barron, izv. prof. | član |
| 3. dr. sc. Branka Levaj, red. prof. | član |
| 4. dr. sc. Tihomir Moslavac, red. prof. | zamjena člana |

Datum obrane: 11. siječnja 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Engineering
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 66.081.6 : 664.1.039 (043.2)

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII. held on May 30, 2017.

Mentor: Anita Pichler, PhD, associate prof.

INFLUENCE OF CONCENTRATION BY MEMBRANE PROCESSES ON COLOUR AND AROMA COMPOUNDS OF ARONIA JUICE

Kristina Popović, 21/D

Summary: The aim of this study was to investigate the possibility of using membrane filtration process, reverse osmosis and nanofiltration, for concentration of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice. The research included determination of the influence of processing parameters (pressure and temperature) on permeate flow and quality of chokeberry concentrates (colour and aroma compounds). In nanofiltration processes was possible to concentrate chokeberry juice till higher total soluble solids content then in reverse osmosis processes. Because of higher membrane porosity, permeates gain in naofiltration contained some small amounts of compounds that pass trough membrane. The obtained results show that the higher applied processing pressure leads to higher permeate flow and decrease duration of proceses. Lower permeate flow was obtained in processes with cooling. Processing parameters had significant impact on retention of polyphenols (anthocyanins, flavonols and phenolic acids), antioxidant activity and retention of aroma compounds. Better, in means of higher retention, was reverse osmosis. Retention of colour and aroma compounds was higher when higher pressure with cooling was applied.

Key words: chokeberry, reverse osmosis, nanofiltration, concentration, colour and aroma compounds

Thesis contains: 162 pages
67 figures
28 tables
1 supplement
293 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Mirela Kopjar, PhD, prof. | chair person |
| 2. Lidija Jakobek Barron, PhD, associate prof. | member |
| 3. Branka Levaj, PhD, prof. | member |
| 4. Tihomir Moslavac, PhD, prof. | stand-in |

Defense date: January 11, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler na podršci i pomoći tijekom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Hvala izv. prof. dr. sc. Andriji Pozderoviću na podršci i savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala članovima Povjerenstva na svim sugestijama i primjedbama koje su doprinijele kvaliteti ovoga rada.

Neizmjereno hvala cijeloj mojoj obitelji na ljubavi, razumijevanju, strpljenju i potpori tijekom cijelog ovog putovanja.

Možda se cilj čino daleko, ali je ipak dostižan!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. ARONIJA	6
2.1.1. Podrijetlo aronije	7
2.1.2. Kemijski sastav	8
2.1.3. Ljekovitost aronije	10
2.2. VOĆNI SOKOVI I KONCENTRATI	11
2.3. MEMBRANSKI PROCESI	12
2.3.1. Podjela membranskih procesa	14
2.3.1.1 Reverzna osmoza	16
2.3.1.2 Nanofiltracija	17
2.3.2. Vrste membrana i materijali za membrane	18
2.3.2.1 Materijali za membrane	20
2.3.3. Vrste modula	21
2.3.3.1 Pločasti moduli	22
2.3.3.2 Cijevni moduli	23
2.3.3.3 Spiralni moduli	24
2.3.3.4 Kapilarni moduli	25
2.3.3.5 Moduli sa šupljim vlaknima („hollow fiber“)	25
2.3.4. Koncentriranje voćnih sokova primjenom membranskih procesa	26
2.4. POLIFENOLI	30
2.4.1. Flavonoidi	31
2.4.1.1 Flavonoli	32
2.4.1.2 Flavanoli i proantocijanidini	33
2.4.1.3 Antocijani	34
2.4.2. Neflavonoidi	35
2.4.3. Polifenolni spojevi aronije	36
2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	38
2.5.1. Antioksidacijska aktivnost aronije	40
2.6. AROMA	41
2.6.1. Tvari arome voća	42
2.6.2. Aroma aronije	43
2.7. KROMATOGRAFSKE TEHNIKE	46
2.7.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	46
2.7.1.1 Određivanje polifenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	47
2.7.2. Plinska kromatografija (GC)	48
2.7.3. Masena spektrometrija	49
2.7.3.1 Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)	49

3. EKSPERIMENTALNI DIO	51
3.1. ZADATAK.....	52
3.2. MATERIJALI	53
3.2.1. Sirovina	53
3.2.2. Kemikalije	53
3.3. METODE.....	54
3.3.1. Koncentriranje membranskim procesima	54
3.3.1.1 Reverzna osmoza	56
3.3.1.2 Nanofiltracija	57
3.3.1.3 Obrada podataka dobivenih membranskim koncentriranjem	57
3.3.2. Mjerenje topljive suhe tvari refraktometrom	59
3.3.3. Određivanje suhe tvari sušenjem u vakuumu	59
3.3.4. Određivanje pH vrijednosti	60
3.3.5. Određivanje kiselina (titrimetrijski).....	60
3.3.6. Određivanje šećera po Luff-Schoorl-u.....	61
3.3.7. Određivanje ukupnih polifenola	62
3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	62
3.3.9. Određivanje sadržaja antocijana	63
3.3.10. Određivanje polimerne boje.....	64
3.3.11. Određivanje udjela flavonoida	65
3.3.12. Određivanje polifenola HPLC metodom	65
3.3.12.1 HPLC analitički sustav	65
3.3.12.2 HPLC metoda za analizu antocijana, flavonola i fenolnih kiselina.....	66
3.3.13. Analiza spojeva arome	67
3.3.13.1 Priprema uzorka za analizu	67
3.3.13.2 Uvjeti rada plinskog kromatografa	69
3.3.14. Statistička obrada podataka	70
4. REZULTATI	71
4.1. UZORAK PRIJE KONCENTRIRANJA.....	72
4.2. REVERZNA OSMOZA.....	76
4.2.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata	76
4.2.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva.....	84
4.2.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje arome.....	87
4.3. NANOFILTRACIJA	93
4.3.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata	93
4.3.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva.....	104
4.3.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje arome.....	108
4.4. USPOREDBA PROVEDENIH PROCESA MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	114

5. RASPRAVA	117
5.1. UZORAK PRIJE KONCENTRIRANJA	118
5.2. REVERZNA OSMOZA	119
5.2.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata	119
5.2.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva	122
5.2.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari arome	125
5.3. NANOFILTRACIJA	128
5.3.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata	128
5.3.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva	131
5.3.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari arome	133
5.4. USPOREDBA PROVEDENIH PROCESA MEMBRANSKE FILTRACIJE	135
6. ZAKLJUČCI	137
7. LITERATURA	141
8. PRILOZI	161

Popis oznaka, kratica i simbola

ANOVA	analiza varijance (engl. analysis of variance)
CA	celulozni acetat
CE	ekvivalenti katehina (engl. catechine equivalents)
CGE	ekvivalenti cijanidin-3-glukozida (engl. cyanidine-3-glucoside equivalents)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DVB	divinilbenzen
GAE	ekvivalenti galne kiseline (engl. gallic acid equivalents)
GC-MS	plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High-Performance Liquid Chromatography)
MF	mikrofiltracija
NF	nanofiltracija
NN	Narodne novine (službeno glasilo RH)
PA	poliamid
PDA	PDA detektor (engl. Photo Dioda Array Detector)
PDMS	polidimetilsiloksan
PTFE	politetrafluoretilen
RO	reverzna osmoza
SD	standardna devijacija
SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. Solid Phase Microextraction)
TE	ekvivalenti trolox kiseline (engl. trolox equivalents)
TSSC	ukupni sadržaj topljive suhe tvari (engl. Total Soluble Solid Content)
UF	ultrafiltracija
UV-Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (engl. Ultra Violet-Visible Spectroscopy)

1. UVOD

Aronija je bobičasto voće bogato fitonutrijentima i raznim esencijalnim mikronutrijentima (Kulling i Rawel, 2008.). Dobar je izvor prirodnih antioksidanasa, mineralnih tvari, vitamina, flavonoida, antocijana i fenolnih kiselina te je zaslužna za veliki broj potencijalnih medicinskih i terapijskih učinaka (Kokotkiewicz i sur., 2010.; Oszmianski i Lachowicz, 2016.).

Aronija se može konzumirati u svježem obliku, ali zbog specifičnog okusa i gorko-bademastog mirisa najčešće se procesira u različite proizvode i poluproizvode kao što su sokovi, koncentрати, sirupi, vino i želei (Balcerek, 2010.; Bermudez-Soto i Tomas-Barberan, 2004.; Kulling i Rawel, 2008.), te kombinira s drugim voćem kako bi se dobili proizvodi s većim udjelom antioksidanasa (Gonzalez-Molina i sur., 2008.).

Za kvalitetu proizvoda odgovorne su hlapljive i nehlapljive komponente koje su prisutne u proizvodima, te međusobne interakcije svih sastojaka proizvoda. Boja i aroma su vrlo važne senzorske karakteristike proizvoda na bazi voća kao što su voćni sokovi i koncentрати, te utječu na percepciju kvalitete proizvoda od strane potrošača. Najčešće potrošači prvo uočavaju boju proizvoda te je stoga neophodno očuvati prirodno prisutne pigmente odgovorne za boju. Kemijske, biokemijske, mikrobiološke i fizikalne promjene koje se odvijaju tijekom rasta, sazrijevanja, skladištenja i procesiranja voća utječu na stabilnost boje (Pathare i sur., 2013.). Sadržaj bioaktivnih sastojaka voća i proizvoda na bazi voća ovisi o uvjetima tijekom procesiranja. Tijekom termičke obrade dolazi do degradacije i polimerizacije tvari boje (Sui, 2017.).

Za mnoge prehrambene proizvode, posebno od voća, prisutnost hlapljivih spojeva arome je jedno od glavnih obilježja kvalitete. Plodovi aronije posjeduju tipičnu i vrlo specifičnu aromu koja se opisuje kao bademasta, voćna i kisela zbog visokog udjela aldehida, alkohola i terpenoida (Butorova i sur., 2016.; Kraujalyte i sur., 2013.). Tijekom procesa konzerviranja, mnogi aromatični spojevi prisutni u svježem voću mogu se djelomično izgubiti ili njihov omjer promijeniti. Također, može doći do formiranja sekundarnih spojeva arome zbog različitih reakcija u kojima primarni spojevi arome voća degradiraju (Miller i Silva, 2012.) tvoreći tako proizvod znatno drugačijeg aromatskog profila.

Voćni sokovi su vrlo značajni zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti jer su prirodno bogati mikronutrijentima i fitonutrijentima. Svježi voćni sok izoliran iz nekog prirodnog izvora uglavnom ima mali udio suhe tvari i vrlo visok udio vode. Voda, koja najvećim dijelom ulazi u sastav tekućih namirnica, doprinosi razvoju mikroorganizama (Smith, 2011.). Stoga je poželjno provesti postupak koncentriranja tekućih namirnica kako bi se uklanjanjem vode povećala trajnost i stabilnost proizvoda.

Koncentrat soka od voća je proizvod dobiven koncentriranjem voćnog soka jedne ili više vrsta voća, koji na taj način zadržava određena svojstva karakteristična za voće, ali ima znatno veću

suhu tvar. U proizvodnji voćnih sokova provodi se postupak koncentriranja uparavanjem soka kako bi se smanjio volumen i stabilizirao konačni proizvod. Međutim, kod većine voćnih koncentrata dobivenih uparavanjem primijećen je veliki gubitak aromatičnih spojeva koji su izgubljeni ili promijenjeni zbog enzimske aktivnosti, termičkog utjecaja i isparavanja (Varming i sur., 2004.).

Membranski procesi, reverzna osmoza (Ganorkar i sur., 2012.; Santana i sur., 2014.) i nanofiltracija (Salehi, 2014.; Warczok i sur., 2004.) mogu se također upotrijebiti za koncentriranje voćnih sokova. Reverzna osmoza je membranski proces pri čemu se uklanjaju ioni (94 - 99 %) te tvari organskog porijekla (100 %). Veličina pora membrana za reverznu osmozu je manja od 1 nm. Proces reverzne osmoze se događa prilikom prolaska vode kroz polupropusnu (semipermeabilnu) membranu pri čemu osmotski tlak uzrokuje zadržavanje soli na jednoj a prolaz permeata na drugu stranu. Nanofiltracija je membranski proces gdje se primjenjuje jednaki princip separacije kao kod reverzne osmoze. Nanofiltracijske membrane imaju veće pore i veću propusnost od membrana za reverznu osmozu pa je potrebno primijeniti manji procesni tlak. To znači da manji jednovalentni ioni prolaze lakše kroz membranu, dok je zadržavanje dvovalentnih iona slično kao kod membrana za reverznu osmozu. Veličina pora membrana za nanofiltraciju je od 1 nm do 10 nm. Najznačajnija prednost ovih postupaka u odnosu na koncentriranje uparavanjem je minimalna degradacija osjetljivih komponenata kao što su polifenolne tvari i tvari arome, te smanjenje količine energije potrebne za uklanjanje vode (Echavarria i sur., 2011.). S obzirom na potrošnju energije, reverzna osmoza je najučinkovitiji postupak među procesima uklanjanja vode iz namirnica. Zbog niskog osmotskog tlaka najbolja je njegova primjena za otopine s malom koncentracijom otopljenih tvari. Budući da učinak reverzne osmoze opada s povećanjem koncentracije otopljenih tvari, ona se može koristiti kao predkoncentracijski korak prije procesa uparavanja voćnih sokova čime se postiže značajna ušteda energije i bolje očuvanje značajnih osjetljivih nutrijenata (Chui i Muralidhara, 2010.).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnosti primjene membranskih procesa (reverzne osmoze i nanofiltracije) u koncentriranju voćnog soka od aronije i ispitati zadržavanje tvari boje i arome u dobivenim koncentratima s obzirom na početni nekoncentrirani sok. Koristila se sorta aronije Nero uzgojena na području Virovitičko-podravске županije. Nakon berbe sok se proizveo u tvornici za preradu voća i povrća i pasteurizirao kako bi se koristio u daljnjem istraživanju. Na membranskom uređaju LabUnit M20 (De Danske Sukkerfabrikker, Nakskov, Danska) provelo se koncentriranje membranskim procesima reverzne osmoze i nanofiltracije pri različitim procesnim parametrima (tlak, temperatura), te ispitao njihov utjecaj na protok permeata.

Uzorcima koncentrata od aronije odredio se kemijski sastav, antioksidacijska aktivnost, te ispitalo zadržavanje tvari boje i arome karakteristične za aroniju.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ARONIJA

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*) je višegodišnja listopadna voćna vrsta podrijetlom iz Sjeverne Amerike, a pripada porodici ruža (*Rosaceae*). Postoji nekoliko istoznačnica za crnoplodnu aroniju koje su u upotrebi, kao što su npr. *Aronia nigra*, *Aronia arbutifolia* var. *nigra*, *Sorbus melanocarpa*, *Pyrus melanocarpa*, *Photinia melanocarpa* i *Mespilus arbutifolia* var. *melanocarpa* (The PLANTS Database, database version 5.1.1., 2000.).

Tijekom godina aronija se svrstava u različite rodove, uključujući *Mespilus*, *Pyrus*, *Adenorachis*, *Sorbus* i *Photinia* prema različitim taksonomskim podjelama (Robertson i sur. 1991.). Rehder (1949.) i Hardin (1973.) svrstavaju je u rod *Aronia*. 1991. Robertson i sur. svrstavaju je u rod *Photinia*, navodeći da ne postoji razlika u morfologiji cvijeta i voća između biljaka u rodovima *Aronia* i *Photinia*. Tako, prema Robertson i sur. (1991.), crvenoplodna aronija postaje *Photinia pyrifolia*, crnoplodna *Photinia melanocarpa* i ljubičastoplodna *Photinia floribunda*. Botaničar Cornelius Kalkman (2004.) izražava sumnju da je morfologija između navedenih rodova ista, a novija molekularna istraživanja to i potvrđuju (Potter i sur., 2007.; Cambell i sur., 2007.). Prema njima svrstava je u rod *Aronia*. U **Tablici 1** dana je znanstvena klasifikacija crnoplodne aronije (The PLANTS Database, 2000.).

Tablica 1 Znanstvena klasifikacija crnoplodne aronije (The PLANTS Database, 2000).

Carstvo	Plantae (biljke)
Divizija	Tracheophyta (vaskularne biljke)
Razred	Magnoliopsida
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae (ruže)
Podporodica	Amygdaloideae
Rod	<i>Aronia</i> Medik.(aronija)
Vrsta	<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott (crnoplodna aronija)

Smatra se da postoje četiri vrste unutar roda *Aronia*:

- crvenoplodna aronija (*Aronia arbutifolia*),
- crnoplodna (*Aronia melanocarpa*),
- ljubičastoplodna (*Aronia prunifolia*) koja je hibrid dvije prethodno navedene i
- *Aronia mitschurinii* koja je nastala uzgojem (također je poznata i kao *Sorbaronia mitschurinii*).

Divlja aronija se razlikuje od kultiviranih sorti koje se danas uzgajaju u komercijalne svrhe. Komercijalno značajni kultivari koji se uzgajaju u Europi i SAD-u su Nero, Rubina, Viking, Hugin, Galicjanka, Hakkija, Ahonnen, Kurkumacki, Serina, Morton i McKenzie (Jeppsson,

2000.). Novija istraživanja ukazuju da su kultivari Nero, Viking i McKenzie, razvijeni u istočnoj Europi, hibridi crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa*) i jarebike (*Sorbus acuparia*). Također, vrlo je mala genetička različitost između pojedinih kultivara; Nero, Viking i Galicjanka su gotovo identični kada se uspoređuju preko genetičkih markera (Smolik i sur., 2011.).

2.1.1. Podrijetlo aronije

Aronija (**Slika 1**) je dospjela u Europu iz istočnog dijela Sjeverne Amerike. Aroniju kao hranu i lijek su prvi počeli upotrebljavati sjevernoamerički Indijanci. Kako plodovi aronije dugo vremena ostaju na grmu i ne kvare se, Indijanci su se hranili njime, plodove su sušili i mljeli, te miješali sa životinjskom mašću i osušenim mesom. Osim zrelih plodova, sjevernoamerički Indijanci su kao lijek upotrebljavali i listove i koru aronije. Ljeti su sušili listove i koru, pripremali su čaj, koji su koristili kao sredstvo za zaustavljanje krvarenja iz rana. U Europi je aronija privukla pažnju zbog svoje ljepote, jer su njeni bijeli cvjetovi jedni od najljepših cvjetova grmolikih biljaka. Prvi put se u Europi spominje oko 1816. u Ukrajini, te je sve do početka dvadesetog stoljeća uzgajana isključivo kao ukrasni grm (Hardin, 1973.).



Slika 1 Plodovi crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa*)(<https://healthyposts.wordpress.com/2013/03/09/aronia-berry-benefits/>)

Prva uzgojna sorta stvorena je od strane ruskog biologa i pomologa Ivana Vladimiroviča Mičurina početkom prošlog stoljeća, a uzgoj počeo širiti tek nakon njegove smrti 1935. Mičurin je uzgojio više hibrida aronije i jarebike. Prve uzgojne površine bile su posađene 1946. u Altajskoj oblasti današnje Rusije. Uzgoj u SAD, zemlji porijekla aronije, započeo je oko 1997. Uzgoj u Zapadnoj Europi započinje nekih 15, 20 godina prije nego u SAD, prije svega u Danskoj, Finskoj i Švedskoj (Hardin, 1973.; Seidemann, 1993.).

Danas se na europskom kontinentu najviše uzgaja u Rusiji, Poljskoj, Češkoj i Slovačkoj. Prema podacima Savjetodavne službe iz 2013. godine u Hrvatskoj se trenutno nalazi 20 ha površina pod nasadima aronije uzgojene za komercijalne svrhe. Zbog svojih je izuzetnih ljekovitih svojstava trenutno vrlo cijenjena i tražena (Lasić Jašarović i sur., 2013.).

U Hrvatskoj, moguće je uzgajati aroniju u svim zonama – od kontinentalnih područja do mediteranskih. No budući da je njezino prirodno stanište Sjeverna Amerika, i to onaj dio kontinenta na koji utječe atlantska klima, idealni uvjeti za uzgoj aronije podrazumijevaju nešto veću vlažnost tla odnosno zraka. Najbolje je kada tlo na kojem raste aronija prima 500 mm oborina godišnje. Budući da voli vlagu, važno je izbjegavati suha pješčana tla. Poznato je da se aronija često naziva sibirskom aronijom. U hladnom Sibiru ona opstaje zahvaljujući svojoj otpornosti na niske temperature. Proljetni mraz za nju ne predstavlja gotovo nikakvu opasnost, pa hladno proljeće neće upropastiti njezine bijele cvjetove. Aroniji bi mogle jedino naškoditi temperature ispod -30 °C (Lasić Jašarović i sur., 2013.).

U prirodi aronija je listopadni grm, visine 2 - 3 metra i 2,5 metra širine. Jedna od glavnih prepoznatljivosti aronije su prelijepi bijeli cvjetovi. U klimatskim uvjetima kontinentalne Hrvatske cvate krajem travnja. Listovi su ovalni, nazubljenog ruba, u vegetaciji su tamnozelene boje, a u jesen dobivaju dekorativnu žarko-crvenu boju. Tek nakon razvoja listova, krajem travnja, pokazuju se prvi cvjetovi. Pojedinačni cvjetovi bijele su boje, široki 12 mm i skupljeni u grozdove. Grozdovi se najčešće sastoje od 10 do 15, a na vrhovima mladica i od 30 cvjetova. Cvatnja traje oko 10 dana, pri čemu svaki cvijet pojedinačno cvjeta samo 5 dana. Aronija je samooplodna biljka. Okrugli, ljubičastocrveni plodovi redovito se pojavljuju u velikom broju. Promjer jednoga ploda iznosi 6 – 13,5 mm, a težina 1,0 – 1,5 g. Plodovi dozrijevaju u kolovozu. Meso ploda ima intenzivnu crvenu boju i slatku do kiselkastu, trpku aromu koja podsjeća na borovnice. Aronija ima vrlo male zahtjeve u pogledu mjesta uzgoja i klime, tako da može uspijevati u vrlo različitim klimatskim područjima. Budući da svi plodovi najčešće dozrijevaju u isto vrijeme, potrebna je samo jedna berba (Scott i Skirvin, 2007.; Milić, 2012.; Brand 2010.; Andrzejewska i sur., 2015.).

2.1.2. Kemijski sastav

Plod aronije ima niski udio masti, ali je bogat vitaminima, šećerima, mineralima, antioksidansima i prehrambenim vlaknima. Kemijski sastav uvelike ovisi o cijelom nizu čimbenika kao što su kultivar, način gnojidbe, zrelost bobica, datum berbe, lokacija nasada i dr. (Jeppsson i Johansson, 2000.; Skupien i sur., 2007.). Visok sadržaj sorbitola i polifenola razlikuju plodove i sok od aronije od drugog bobičastog voća (Ara, 2002.). Kemijski sastav bobica i soka prikazan je u **Tablici 2.**

Tablica 2 Kemijski sastav bobica aronije i svježe isprešanog i pasteriziranog soka (Kulling i Rawel, 2008.).

	SOK (g/L)		Bobice (različiti kultivari)
	Svježe isprešan ^{a*}	Pasteriziran ^b	
Relativna gustoća	1,081	1,064	-
Suha tvar, %	19,5 °Brix	15,5	15,6 ^c - 28,8 ^d
pH	3,6	3,3	3,3 - 3,7 ^e
Glukoza	41	40	NA
Fruktoza	38	37	NA
Sorbitol	80	55,6	NA
Vlakna	U tragovima ^e	ND	56 g/kg FW ^c
Masti	NA	NA	0,14 % FW ^c
Proteini	NA	NA	0,7 % FW ^c
Organske kiseline			
Jabučna	9,0	11,1	13,1 g/kg FW ^c
Limunska	500 mg/L	247 mg/L	2,1 g/kg FW ^c
Izolimunska	65 mg/L	NA	NA
Šikiminska	80 mg/L	NA	NA
Sukcininska	1,5	0,16	ND
Vitamini			
Vitamin C	200 mg/L	ND	137 mg/kg FW ^c ; 13 - 270 mg/kg FW ^d
Folna kiselina	NA	35 µg/L	200 µg/kg FW ^f
Vitamin B1	500 µg/L	NA	180 µg/kg FW ^c
Vitamin B2	600 µg/L	NA	200 µg/kg FW ^c
Vitamin B6	550 µg/L	NA	280 µg/kg FW ^c
Niacin	3400 µg/L	NA	3000 µg/kg FW ^c
Pantotenska kiselina	2200 µg/L	NA	2790 µg/kg FW ^c
Tokoferoli	NA	NA	17,1 mg/kg FW ^c
Vitamin K	NA	NA	242 µg/kg FW ^c
Minerali			
Pepeo	4,6 – 6,4 ^d	3,6 - 4,1 ^d	4400 ^c - 5800 ^d mg/kg FW
Na	5 mg/L	5,7 mg/L	26 mg/kg FW ^c
K	2850 mg/L	1969 mg/L	2180 mg/kg FW ^c
Ca	150 mg/L	185 mg/L	322 mg/kg FW ^c
Mg	140 mg/L	160 mg/L	162 mg/kg FW ^c
Fe	4 mg/L	0,4 mg/L	9,3 mg/kg FW ^c
Zn	1,3 mg/L	0,6 mg/L	1,47 mg/kg FW ^c
Fitokemikalije			
Karotenoidi	NA	70 µg/L	48,6 mg/kg FW ^g
β-karoten	NA	32 µg/L	7,7 ^c - 16,7 ^g mg/kg FW
Ukupni polifenoli	NA	6,3 - 6,95	2010 ^h –6902 ⁱ mg/100 g FW
Amigdalinal	57,5 mg/kg ^d	NA	201 mg/kg FW ^j

*NA-nije analizirano; ND-nije detektirano; FW-količina izražena na masu svježeg voća; a- Ara,2002.; b- Wiese i sur., 2008.; c-Tanaka i Tanaka,2001.; d-Lehman, 1990.; e- Strigl i sur., 1995a.; f- Stralsjo i sur., 2003.; g-Razungles i sur., 1989.; h- Wu i sur., 2004.; i- Benvenuti i sur.,2004.; j- Seidemann, 1993.

Cijeđenjem svježeg ploda aronije može se dobiti oko 75 – 80 % soka, što se može i povećati za 6 %, ako se plodovi prije cijeđenja smrznu neko vrijeme na – 5 °C (Milić, 2012.). Također se pokazalo dobrim, u smislu povećanja prinosa i očuvanja polifenolnih sastojaka, provođenje

maceracije uz toplinsku obradu (50 °C; 90 min) i dodatak enzimskih preparata (različite pektinaze) prije prešanja (Borowska i sur., 2009.).

Sok od aronije je tamno crvene boje, opora okusa i iznimno je cijenjen u prehrambenoj, farmaceutskoj i prerađivačkoj industriji. Prerađivačka industrija izuzetno cijeni sok od aronije kao prirodno sredstvo za bojenje, budući da je tamnocrvena i crna boja vidljiva i nakon stotrukog razrjeđenja. S druge strane, sokom od aronije može se popraviti ukus i boja drugih voćnih sokova. Osim čistoga soka, proizvodi aronije u tekućem stanju su još i miješani sok, nektar, koncentrat, sirup i osvježavajuća pića. Također se koristi za dobivanje džema, želea, vina, likera, te je prisutan u mnogim prerađevinama (Milić, 2012.).

Udio reducirajućih šećera u svježim bobicama je oko 16-18 %. U svježe isprešanom soku najviše ima sorbitola, glukoze i fruktoze. Sorbitola, koji se često koristi kao zamjena za šećer u dijetetskim proizvodima, je pronađeno oko 80 g/L. Od organskih kiselina najzastupljenije su jabučna i limunska kiselina. Manja količina masti, 0,14 g/100 g FW, i proteina, 0,7 g/100 g FW, je pronađena u bobicama. Najznačajnija aminokiselina u soku aronije je asparagin. Udio mineralnih tvari u bobicama se kreće oko 440 - 580 mg/100 g, a u soku 300 - 640 mg/100 mL. U soku su pronađene relativno visoke količine kalija i cinka. Od vitamina najviše ima B1, B2, B6, C, pantotenske kiseline i niacina (Kulling i Rawel, 2008.). Amigdalín, cijanogeni glukozid, izoliran iz bobica aronije odgovoran je za gorko-bademast miris svježih bobica. U bobicama ga ima oko 20,1 mg/100 g FW, a u soku oko 5,7 mg/100 g (Lehmann, 1990.).

2.1.3. Ljekovitost aronije

Aronija pripada u skupinu u voća s najbogatijim sadržajem biljnih fenola (Jakobek i sur., 2007.), a taj visok udio, kao i sastav pojedinih fenolnih sastojaka, zaslužan je za široki raspon potencijalnih medicinskih i terapijskih učinaka (Jurikova i sur., 2017.; Čujić i sur., 2018.). Antocijani i proantocijani iz aronije se ubrajaju u najjače antioksidanse protiv djelovanja slobodnih radikala koji dovode do oštećenja i pojave brojnih degenerativnih promjena u tijelu koje rezultiraju bolestima (Denev i sur., 2012.; Bermudez-Soto i sur., 2007.). Aronija se koristi za regulaciju krvnog tlaka i sprječavanje kardiovaskularnih bolesti (Kulling i Rawel, 2008.; Skoczynska i sur., 2007.), održavanje elastičnosti krvnih žila, ima zaštitni učinak na jetru (Valcheva-Kuzmanova i sur. 2004.), te protuupalno, gastroprotektivno i hepatoprotektivno djelovanje (Jurikova i sur., 2017.). Poboljšanjem imunološkog sustava osnažuje tijelo u borbi protiv bakterija i virusa (Appel i sur., 2015.; Liepina i sur., 2013.; Park i sur., 2013.), održava zdravlje mokraćnog sustava (Handeland i sur., 2014.). Aronija regulira pravilan rad i izlučivanje hormona štitne žlijezde, regulira rad pankreasa pa može biti korisna u liječenju dijabetesa (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2007.; Simeonov i sur., 2002.). Visoki udio polifenolnih sastojaka

u plodovima aronije također može povoljno utjecati na normalizaciju zgrušavanja krvi (Bijak i sur., 2011.).

2.2. VOĆNI SOKOVI I KONCENTRATI

Voćni sokovi su polidisperzni sustavi koji se međusobno razlikuju po veličini čestica voćnog tkiva i njihovoj topljivosti u vodi. Većinom sadrže oko 11 % topljive suhe tvari određene refraktometrijski (Lovrić i Piližota, 1994.).

Oni kao proizvodi podliježu određenoj zakonskoj regulativi i to "Pravilniku o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju" (NN 2013/48). Prema Pravilniku voćni sok je proizvod koji nije fermentirao, ali može fermentirati, a proizvodi se od jedne ili više vrsta tehnološki zrelog, svježeg ili ohlađenog voća. Boja, aroma i okus voćnog soka moraju biti karakteristični za voće od kojeg je sok proizveden. Aroma, pulpa i čestice voćnog tkiva koji su bili izdvojeni tijekom prerade mogu biti vraćeni tom soku (Pravilnik, NN 2013/48).

Prema veličini i topljivosti čestica voćni sokovi se dijele na bistre, mutne i kašaste. Ovisno o vrsti soka primjenjuje se i odgovarajuća tehnologija proizvodnje. Postupak izdvajanja soka iz čestica voćnog tkiva, također, se razlikuje ovisno koji se sok proizvodi. U proizvodnji bistrog soka, sok se iz voćnog tkiva izdvaja prešanjem. Prešanjem se pod velikim pritiskom kroz porozni materijal (sintetski polimerni materijal ili gruba tkanina) finog poroziteta istiskuje sok iz tkiva. Time u sok ne prelaze veće čestice i krupne netopljive čestice. To je važno kako bi se olakšao daljnji proces bistrjenja u tijeku kojeg se iz soka uklone u potpunosti sve netopljive čestice. Zato se bistri sok ne proizvodi iz voća koje sadrži pigmente netopljive u vodi npr. iz breskve ili nekog drugog voća koje sadrži karotenoidne pigmente netopljive u vodi, dok se mutni i kašast sok mogu proizvoditi iz svih vrsta voća (Lovrić i Piližota 1994.; Levaj, 2013.).

Koncentrirani voćni sok je proizvod dobiven koncentriranjem voćnog soka jedne ili više vrsta voća, koji na taj način zadržava određena svojstva karakteristična za voće, ali ima znatno veću suhu tvar. Koncentriranje voćnih sokova ubraja se u red najosjetljivijih procesa prerade voća zbog poteškoća pri očuvanju arome i poteškoća pri koncentriranju sokova koji sadrže koloide i netopljive tvari (čestice mutnoće) (Lovrić i Piližota, 1994.). U proizvodnji voćnih sokova postupak koncentriranja se najčešće provodi uparavanjem soka u višestepenom isparnom procesu koji se sastoji od 4-6 isparnih stanica kako bi se smanjio volumen i stabilizirao konačni proizvod (Figuera i Ibarz, 2014.). Međutim, kod većine voćnih koncentrata dobivenih uparavanjem primijećen je veliki gubitak aromatičnih spojeva koji su izgubljeni ili promijenjeni zbog enzimske aktivnosti, termičkog utjecaja i isparavanja (Varming i sur., 2004.). Gubitak arome može se jednim dijelom nadoknaditi dodatkom svježeg soka u koncentrat. Značajnije očuvanje može se postići rekuperacijom arome iz vodene pare, rektifikacijom i apsorpcijom te

vraćanjem u koncentrat (Lovrić, 2003.). Kako bi se uklonili nedostaci procesa uparavanja primjenjuju se i druge metode koncentriranja, poput koncentriranja membranskim procesima reverzne osmoze i nanofiltracije (Couto i sur., 2011.; Ganorkar i sur., 2012.; Gurak i sur., 2010.), te koncentriranja zamrzavanjem (Sanchez i sur., 2009.).

Voćni sok od koncentriranog voćnog soka proizvodi se tako da se koncentriranom voćnom soku ponovno dodaje ona količina vode koja je izdvojena tijekom koncentriranja i obnavlja aroma te, ako je to primjenjivo, pulpa i čestice voćnog tkiva izdvojene tijekom koncentriranja tog ili voćnog soka iste vrste. Dodana voda mora imati odgovarajuće karakteristike, posebice kemijska, mikrobiološka i senzorska svojstva kako bi se osigurala izvorna kakvoća soka (Pravilnik, NN 2013/48).

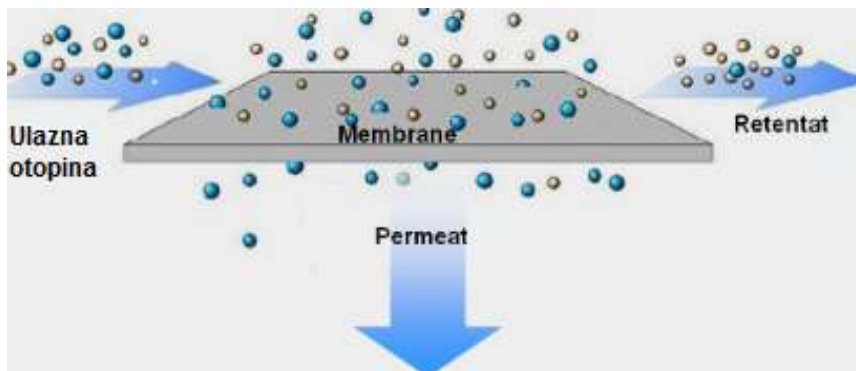
Zbog visokog udjela polifenola i znanstveno dokazane ljekovitosti (Kulling i Rawel, 2008.) plodovi aronije se nakon berbe obično prešaju i dobiveni sok samo ide na pasterizaciju. Time se dobije matični voćni sok koji mali proizvođači prodaju na tržištu. Matični voćni sok je prema definiciji (Lovrić i Piližota 1994.) poluproizvod koji se nakon tiještenja (prešanja) konzervira pasterizacijom tj. toplinskom obradom u cijevnim ili pločastim izmjenjivačima topline na temperaturama oko 90 °C. Pasterizirani se sok nakon toplinske obrade mora ohladiti, te skladištiti u aseptičnim uvjetima u odgovarajuću ambalažu ili posebno pripremljenim cisternama. Ambalaža i cisterne moraju biti sterilne kako ne bi došlo do degradativnih promjena u matičnom soku.

2.3. MEMBRANSKI PROCESI

Membranski procesi su među različitim dostupnim separacijskim procesima jedna od tehnologija koja se brzo razvija i ima sve veću primjenu, posebno na područjima kemijskog inženjerstva, biotehnologije i prehrambenog inženjerstva. Pripravom i razvojem reverzno osmotskih membrana asimetrične strukture na bazi celuloznog acetata Loeb i Sourirajan 60-ih godina 20. stoljeća postavljaju temelje tehničke primjene membranskih separacijskih postupaka (Loeb i Sourirajan, 1962.; Sun, 2005.). Daljnja intenzivna ulaganja u razvoj i sintezu novih membranskih proizvoda rezultirala su boljim, prije svega permeabilnim i selektivnim karakteristikama membrana, njihovom nižom i dostupnijom cijenom i primjenom u najširem mogućem smislu (Dolar, 2009.).

Membranski procesi se temelje na primjeni polupropusnih (semipermeabilnih) membrana, određene fizičke i kemijske strukture, koje imaju selektivnu sposobnost propuštanja, odnosno zadržavanja pojedinih molekula i iona (**Slika 2**). Membranskim procesima zajedničko je postojanje membrane kao tankog sloja koji razdvaja dvije tekuće faze (fluida) i omogućava selektivni transport tvari kroz membranu djelovanjem pogonske sile (najčešće tlaka).

Međusobno se razlikuju po mehanizmima i principima same separacije, a karakterizirani su pojavom da se ulazna otopina djelovanjem tlaka potiskuje kroz membranu i razdvaja u dvije struje: permeat i retentat (koncentrat). Permeat zapravo čini skup svih prodifundiranih komponenata odnosno frakcija (sastavljena od svih komponenata faze koje su prošle kroz membranu). Prolaskom kroz membranu u permeatu se smanjuje koncentracija otopljenih tvari. Retentat je skup svih komponenata neke frakcije koje nisu prošle kroz membranu, tj. dio ulazne otopine koji zaostaje na membrani i kojemu se povećava koncentracija tvari tijekom filtracije (Lovrić, 2003.; Mulder, 1996.; Herceg, 2009.).



Slika 2 Osnovni princip membranske filtracije (Schmeling i sur., 2010.).

Prednosti membranskih tehnologija su:

- kontinuirano zadržavanje,
- manje energetske potrebe ili troškovi,
- mogućnost kombiniranja s drugim separacijskim postupcima,
- zadržavanje pod blagim uvjetima,
- lakoća prenošenja u veće mjerilo,
- varijabilnost membranskih proizvoda,
- podesivost sustava i
- minimalna potreba za aditivima (Dolar, 2009.).

Membranski postupci, kao i svi procesi, imaju i svoje mane. Kao nedostaci izdvajaju se:

- koncentracijska polarizacija,
- membransko blokiranje,
- relativno kratki životni vijek membrana (ispod 10 godina),
- niska selektivnost ili nizak protok i
- faktor prenošenja u veće mjerilo je više–manje linearan (Dolar, 2009.).

2.3.1. Podjela membranskih procesa

S obzirom na to koji je cilj separacije, membranski procesi se mogu podijeliti na procese koji služe za:

- čišćenje: uklanjanje nepoželjnih nečistoća (npr. uklanjanje soli ili organskih tvari iz vode),
- koncentriranje: npr. koncentriranje arome voćnih sokova,
- razdjeljivanje: smjesa treba biti razdvojena u dva ili više željenih dijelova (npr. razdvajanje komponenti sirutke u tehnologiji mlijeka) i
- posredovanje pri reakciji: provođenje kemijske ili biokemijske reakcije s kontinuiranim odvođenjem produkta kroz membranu, da bi se povećala brzina reakcije (npr. membranski bioreaktor za obradu otpadnih voda) (Mulder, 1996.).

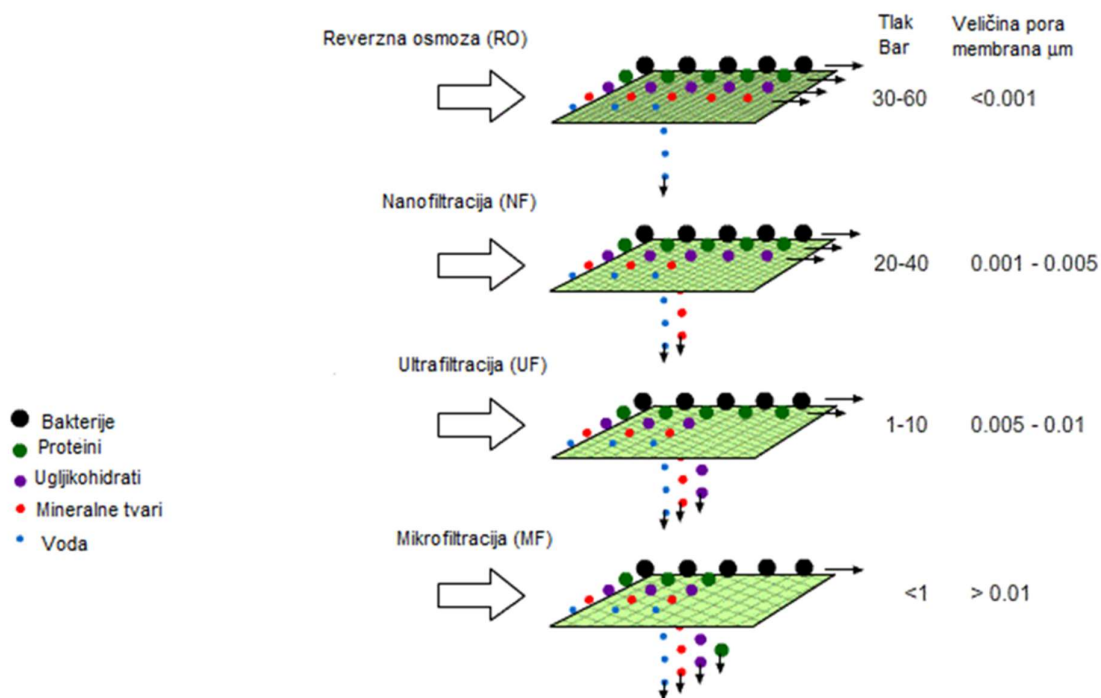
Osnovna klasifikacija membranskih postupaka (**Tablica 3**) može se postaviti prema sljedećim karakteristikama:

- pokretačkoj sili,
- mehanizmu zadržavanja,
- membranskoj strukturi i
- fazama u kontaktu.

Tablica 3 Osnovna klasifikacija membranskih postupaka (Dolar, 2009.).

Membranski postupak	Pokretačka sila	Mehanizam zadržavanja	Struktura membrana
Mikrofiltracija	Tlak (Δp)	Zadržavanje čestica po veličini	Makroporozna
Ultrafiltracija	Tlak (Δp)	Zadržavanje čestica po veličini	Mezoporozna
Nanofiltracija	Tlak (Δp)	Zadržavanje čestica po veličini + interakcije membrana – otopina (otopljena tvar) + elekt.odbijanje	Mikroporozna
Reverzna osmoza	Tlak (Δp)	Zadržavanje čestica po veličini + interakcije	Guste
Pervaporacija	Aktivitet (tlak)	Otapanje/difuzija	Guste
Membranska destilacija	Aktivitet (temperatura)	Ispravanje	Makropore
Dijaliza	Aktivitet (koncentracija)	Difuzija	Mezopore
Elektrodijaliza	Električni potencijal	Ionska izmjena	Izmjena iona

Od membranskih separacijskih postupaka najveću praktičnu primjenu imaju tlačni membranski postupci: mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), nanofiltracija (NF) i reverzna osmoza (RO). Osnovna razlika između ovih postupaka je vrsta upotrijebljenih membrana (odnosno njihova veličina pora) i tlak koji je potrebno primijeniti da bi došlo do uspješnog razdvajanja komponenti u nekom sustavu. Za navedene membranske separacijske postupke veličina pora pada od mikrofiltracije do reverzne osmoze, a time raste radni tlak budući da je hidrodinamički otpor sve veći (**Slika 3**).



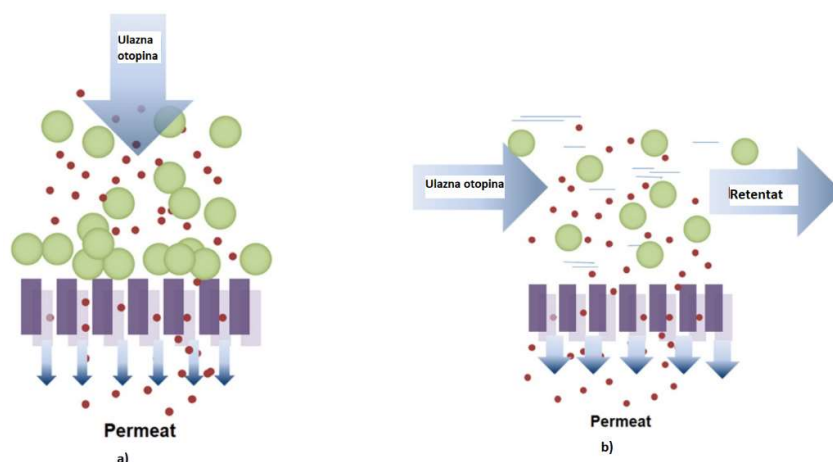
Slika 3 Tlačni membranski procesi
(<http://www.smartmembranesolutions.co.nz/membrane-classifications/>).

Kod membranskih procesa razlikuju se dva osnovna postupka membranske filtracije (**Slika 4**) ovisno o toku tečenja fluida u odnosu na membranu:

- **„dead-end“ ili statička filtracija** – u ovom postupku filtracije membrana „pregrađuje“ tok, a dobavna tekućina struji okomito na površinu membrane te prolazi cjelokupnim volumenom kroz nju. Čestice mutnoće veće od otvora pora zaostaju na membrani i tijekom filtracije te izdvojene čestice stvaraju kontinuirani sloj odnosno filterski kolač ili talog na površini membrane što dovodi do začepljenja membrane i do povećanja otpora protoka permeata kroz membranu. Ukoliko se nastavi filtracija doći će do povećanja debljine sloja na površini membrane što će u konačnici rezultirati potpunom blokadom membrane te prestankom filtracije (Moslavac, 2003.). Polarizacija koncentracije kod

ovog postupka je velika. Kapacitet zadržavanja čestica kod ove filtracije je mali. Protok permeata povećanjem polarizacije koncentracije i stvaranjem taloga na membrani se značajno smanjuje (Van der Horst i Hanemaaijer, 1990.; Grenier i sur., 2008.) i

- **„cross-flow“ ili dinamička filtracija** – u ovom postupku filtracije dobavna tekućina struji uzdužno po površini membrane odnosno tangencijalno, a permeat struji poprečno. To znači da fluid velikom brzinom struji uzdužno s površinom membrane, a u unakrsnom toku (engl. cross-flow) kroz membranu izlazi permeat. Čestice mutnoće zaostaju u retentatu u tangencijalnom toku (Moslavac, 2003.). Brzina strujanja fluida na membrani mora biti takva da se osiguraju turbulentni uvjeti strujanja (Re veći od 3000) kako bi se čestice veće od otvora pora održavale u otopini, a one čestice koje bi se ipak izdvojile na površini membrane mogle uklanjati i vraćati u retentat. Da bi se to postiglo brzina strujanja mora biti 4 – 8 m/s. Uzdužnim strujanjem dobavne tekućine ispire se površina membrane i na taj način se smanjuje polarizacija koncentracije i sprječava taloženje čestica na membrani (Haarstrick i sur., 1991.; Pabby i sur., 2009.).



Slika 4 Prikaz dva osnovna postupka membranske filtracije ovisno o toku tečenja fluida u odnosu na membranu a) „dead-end“ i b) „cross-flow“ (Tsibranska i Tylkowski, 2013.).

2.3.1.1 Reverzna osmoza

Reverzna osmoza (RO) koristi se za uklanjanje mikromolekularnih otopljenih tvari čije su molekule istog reda veličine kao i molekule vode. Takve tvari su anorganski ioni i male organske molekule koje zadržane na membrani tijekom filtracije razvijaju značajan osmotski tlak. Zbog toga se koriste visoki radni tlakovi 30 - 120 bara što omogućava da se nadvlada osmotski tlak nastao zbog zadržanih čestica, te proces separacije uspješno provede. Veličina pora membrana za reverznu osmozu je 0,1 – 1 nm (10^{-4} – 10^{-3} μm) (Lovrić, 2003.).

Protok kroz membranu gotovo je obrnuto proporcionalan debljini membrane, te stoga membrane za RO moraju imati asimetričnu strukturu s tankim gustim gornjim slojem (debljine

$\leq 1 \mu\text{m}$) na potpornom poroznom sloju (debljine $\approx 50 - 150 \mu\text{m}$). U upotrebi su najčešće asimetrične i kompozitne membrane. Kod asimetričnih membrana gornji i potporni sloj su izgrađeni od istog materijala, a kod kompozitnih od različitog. Pore na membrani su veličine manje od 2 nm, te omogućavaju da ioni koji imaju naboj imaju i veću mogućnost odbijanja od membrane nego oni ioni koji nemaju naboj (npr. organske molekule). Razdvajaju se komponente veličine do 1 nm (Moslavac, 2003.).

Reverzna osmoza se u prehrambenoj industriji primjenjuje za koncentriranje sirutke i mlijeka prije uparavanja, demineralizaciju sirutke (Cheryan, 2000.), u proizvodnji jogurta, za koncentriranje voćnih sokova (jabuka (Aguiar i sur., 2012.), naranča (Jesus i sur., 2007.), grožđe (Gurak i sur., 2010.; Ferrarini i sur., 2001.), rajčica (Pepper i sur., 1985.), ananas (Couto i sur., 2011.), pigmenta (antocijani, betaini), arome (Pozderović i Moslavac, 1999.) proizvodnji piva sa smanjenim udjelom alkohola (Catarino i sur., 2007.), kave, čaja (Zhang i sur., 1991.), koncentriranje mošta od grožđa (Mietton-Peuchot i sur., 2002.), vina (Aguera i sur., 2010.), koncentriranje rijetkog soka u šećeranstvu i umjetnih sladila (Madaeni i sur., 2004.), preradu kukuruza i soje, soka špinata i luka, desalinizaciju morske i bočate vode, obrada otpadne vode, pročišćavanje biotehnoloških proizvoda fermentacije, odvajanje alkohola iz vodenih otopina, koncentriranje ekstrakta gljiva, ekstrakta i komponenti mirisa i okusa morske hrane, glutaminske kiseline dobivene fermentacijom juhe od mesa kao i cijeli niz drugih mogućnosti uporabe (Cheryan, 2000.).

2.3.1.2 Nanofiltracija

Nanofiltracija (NF) je membranski proces u kojem se na membrani zadržavaju, pored većih molekula, i manje molekule kao što su neke anorganske soli i manje organske molekule kao što su šećeri (monosaharidi i disaharidi). Po svojim svojstvima NF je proces između ultrafiltracije i reverzne osmoze. Prednost NF u odnosu na RO je manja potrošnja energije u procesu za 21 % (Warczok i sur., 2004.). Princip separacije kod NF i RO je isti a razlikuju se u veličini pora membrana i veličini molekula koje se zadržavaju na membrani. Veličina pora membrana za NF kreće se oko 1 nm ($10^{-3} - 10^{-2} \mu\text{m}$). NF membrane imaju veće pore i veću propusnost od membrana za RO, pa je potrebno primijeniti manji procesni tlak. Potrebni tlak kod NF je od 10 do 40 bara, a princip separacije je otapanje i difuzija. NF membrane za razliku od RO propuštaju manje anorganske i organske molekule (soli, organske kiseline i dr.), pa permeat nije čista voda kao kod RO. Monovalentni ioni prolaze u permeat, a divalentni zaostaju u retentatu (koncentratu), pri tome soli s divalentnim ionima kao što su sulfati imaju retenciju (zadržavanje na membrani) između 90 i 99 %, dok monovalentni kao što je NaCl imaju retenciju između 20 i 80 % (Wang i Zhou, 2013.).

Membrane su uglavnom kompozitne, sastoje se od dva sloja. Gornji i potporni sloj su izgrađeni od različitog polimernog materijala, a propuštaju veći postotak monovalentnih iona nego dvo- i trovalentnih iona. Gornji sloj je debljine 1 μm (veličina pora 1 nm), a donji sloj 150 μm (Moslavac, 2003.).

NF se najviše primjenjuje u obradi površinskih voda i bunarskih voda s visokim udjelom otopljenih minerala (CaCO_3 , Mg^{2+} , Na^+ , K^+), pročišćavanje i djelomičnu demineralizaciju vode (Schaep i sur., 1998.) i za koncentriranje otopina kiselina i šećera (voćni sokovi, otopine šećera i drugo). Kod pročišćavanja vode smanjuje se tvrdoća vode, uklanjaju se kloridi, uklanja se obojenost vode organskim tvarima, smanjuje se sadržaj organskog ugljika i organskih tvari. Pored toga kroz membranu ne prolaze niti bakterije niti virusi pa se nanofiltracijom dobije sterilni permeat. Nanofiltracija se koristi za dobivanje pitke vode bez mikroorganizama, smanjene tvrdoće i bez organskih zagađenja.

NF je proces koji ima potencijala za primjenu u prehrambenoj industriji. Neke od primjena NF su: koncentriranje mošta (Versari i sur., 2003.), koncentriranje i demineralizacija mlijeka (Pouliot, 2008.), rekuperacija arome u proizvodnji voćnih sokova, obrada otpadne vode u proizvodnji pića (Warczok, 2004.). Kod koncentriranja otopina kiselina i šećera koristi se u kombinaciji s RO čime se postiže veća koncentracija suhe tvari u retentatu (Basile i Charcosset, 2016.). NF ima značajnu primjenu i u konditorskoj industriji. Predkoncentriranjem otopine šećera iz repe ili trske na NF membranama povećava se kapacitet isparivača i smanjuje gubitak šećera u melasi za 10 %. Retentat iz prvog NF stupnja ide na isparivače, a NF permeat se može upotrijebiti kao dio difuzijske vode za ekstrakciju šećera u difuzeru. U drugom NF stupnju se koncentrira višak permeata do 20 °Brix, koji se dalje može koristiti za razrjeđenje melase (Heldman, 2007.).

2.3.2. Vrste membrana i materijali za membrane

U tehnološkom smislu membrane predstavljaju selektivnu barijeru koja zbog svojih svojstava omogućuje razdvajanje pojedinih sastojaka bez ikakvih kemijskih promjena na njima. Općenito, membrane se mogu podijeliti na biološke (stanične membrane) i sintetičke membrane. Sintetičke membrane se mogu podijeliti u nekoliko skupina s obzirom na mehanizam separacije, kemijski sastav, fizičku strukturu i geometrijski oblik (Mulder, 1996.; Osada i Nakagawa, 1992.).

S obzirom na strukturu membrane mogu biti:

- *homogene* (izgrađene od jedne vrste materijala) i
- *heterogene* (od više vrsta materijala).

Prema fizičkoj strukturi membrane se dijele na:

- *simetrične (homogene)* – debljine oko 10 – 200 μm (smanjenjem debljine povećava se permeabilnost membrane), koje se prema strukturi dalje dijele na:
 - Porozne membrane – imaju dovoljno velike pore u odnosu na molekule polimera pa se transport kroz membranu odvija kroz pore membrane bez obzira na pogonsku silu i
 - Neporozne membrane – ne sadrže pore mikroskopskih dimenzija pa se transport odvija između lanaca makromolekula tvari membrane,
- *asimetrične* – po poprečnom presjeku nemaju jednaku strukturu i istu permeabilnost. Sastoje od tankog gustog sloja na površini membrane debljine od 0,1 do 0,5 μm koji se nalazi na znatno poroznijem nosaču. Porozni sloj (nosač) debljine je 50 do 150 μm . Tanki gusti sloj i porozni sloj (nosač) su izrađeni od istog materijala (polimera) i
- *kompozitne* – asimetrične membrane, sastoje se od tankog gustog sloja na površini membrane i poroznog sloja kao nosača. Debljina slojeva je ista kao kod asimetričnih membrana, ali su tanki gusti sloj i porozni sloj izrađeni od različitih materijala (polimera).

Prema mehanizmu separacije membrane se dijele na:

- *porozne* – separacija se temelji na principu razlike u veličini pora i molekula odnosno čestica (efekt sita). Primjenjuju se kod MF, UF i NF. Prema veličini pora dijele se na:
 - Makroporozne – veličina pora veća od 50 nm,
 - Porozne – veličina pora od 2 do 50 nm i
 - Mikroporozne – veličina pora manja od 2 nm,
- *neporozne* – mehanizam separacije se temelji na različitoj topljivosti i različitoj brzini difuzije kroz membranu. Membrane za RO su ovoga tipa membrana (Mulder, 1996.) i
- *membrane s ionskom izmjenom* – specifični tip neporoznih membrana, imaju fiksirane pozitivne ili negativne grupe. Postoje kationske i anionske membrane. Kationske membrane imaju fiksirane negativne grupe. Anionske membrane imaju fiksirane pozitivne grupe. Obično se koriste za elektrodijalizu pri desalinizaciji morske vode, obradi otpadnih voda iz industrije itd. (Davis, 1990.).

S obzirom na kemijski sastav membrane mogu biti:

- *organske membrane* – napravljene od organskih polimera i
- *anorganske membrane* – izrađene od keramike, metala i stakla.

Prema geometrijskom obliku membrane se mogu podijeliti na:

- *ravne (planarne) membrane* – u obliku ravnih, tankih folija s potpornim poroznim nosačem, mogu biti izvedene kao pločaste i spiralno namotane,

- *cijevne membrane* – u obliku cijevi promjera većeg od 3 mm, izrađuju se kao višekanalne cijevi od polimernih materijala, keramike, metala i stakla,
- *kapilarne membrane* – u obliku kapilarnih cjevčica, promjera od nekoliko mm do nekoliko μm i
- *membrane u obliku šupljih vlakana* – u obliku poroznih niti, promjera kao i kapilarne membrane (Mulder, 1996.; Pabby i sur., 2009.).

2.3.2.1 Materijali za membrane

Većina MF, UF, NF i RO membrana su sintetički organski polimeri. Različita kemijska svojstva membrana uzrokovana su različitim vrstama materijala od kojega su iste načinjene (**Tablica 4**). U praksi se često koriste membrane načinjene od organskih materijala i to od različitih polimera, celuloze i njezinih derivata te aromatskih poliamida, a takve membrane karakteriziraju hidrofilni karakter, izvrsna permselektivna svojstva, bolja termička i kemijska svojstva i bolja hidrolitička stabilnost od celuloznih estera, jaka osjetljivost na klor i oksidativnu degradaciju (Mulder, 1996.).

Tablica 4 Tip, struktura i primjena nekih sintetičkih organskih i anorganskih membrana (Scott i Hughes, 1996.).

Tip membrane	Struktura	Primjena
Asimetrične CA, PA, PS, PAN	Homogena ili mikroporozna, tanak sloj na mikroporoznom nosaču	UF, MF, RO, PV, GP
Kompozitne CA, PA, PS, PI	Homogeni sloj polimera na mikroporoznom nosaču	RO, GP, PV
Homogene S	Homogeni sloj polimera	GP
Membrane s ionskom izmjenom DVB, PTFE	Homogeni ili mikroporozni sloj kopolimera s pozitivno ili negativno nabijenim ionskim grupama	ED
Staklo	10 - 0 μm promjer pora	Filtracija (smjesa molekula)
Mikroporozne, sinterirani polimer PTFE, PE, PP	0,1 - 20 μm promjer pora	Filtracija (suspencije, filtracija zraka)

PTFE-politetrafluoretilen, CA-celulozni acetat, PA-poliamid, PE-polietilen, PS-polisulfon, PP-polipropilen, S-silikonska guma, PAN-poliakrilnitril, PI-poliimid, DVB-divinilbenzen, GP- plinska permeacija, ED-elektrodijaliza, PV-pervaporacija.

Celulozni acetat (CA) je materijal prve generacije membrana za RO. Uvođenjem CA Loeb i Sourirajan (1960.) su značajno proširili područje primijene membranskih procesa. Također, značajan polimerni materijal za izradu RO membrana je aromatski poliamid. U aromatskim poliamidnim polimerima, aromatski prstenovi su povezani amidnom vezom (-CONH-). Aromatski prsten vezan na -NH- skupinu je metasubstituiran, dok je prsten vezan na -CO- smjesa meta i parasubstituenata, što daje veću fleksibilnost polimernom materijalu (Kulbe i sur., 2008.).

Membrane sastavljene od poliakrilonitrila (PAN) uglavnom se koriste za ultrafiltraciju i hemodijalizu. Membrane sastavljene od polisulfon (PS) i polietersulfon (PES) polimera su hidrofbne, sklone adsorpciji, karakterizirane dobrim kemijskim, mehaničkim i termičkim svojstvima.

Također se pri izradi membrana često koriste sljedeći polimeri: politetraflouretilen (PTFE), polivinilidenfluorid (PVDF), polietilen (PE), izotaktički polipropilen (PP), polikarbonat (PC) itd. Postoje i tzv. anorganske membrane, koje su najčešće načinjene od keramike. Ove membrane karakterizira visoka termička i kemijska otpornost te se stoga često primjenjuju za separaciju organskih otapala koje nije moguće separirati polimernim membranama, budući da bi došlo do otapanja polimernog materijala od kojeg je membrana napravljena (Mulder, 1996.).

2.3.3.Vrste modula

Dizajniranje membranskih sustava može se značajno razlikovati zbog velikog broja aplikacija i konfiguracija modula. Modul predstavlja najmanju jedinicu koja sadrži jednu membranu ili više membrana i prijeko potrebnu prateću potpunu strukturu. Broj modula povezanih zajedno bilo serijski bilo paralelno čini stupanj nekog membranskog postrojenja, a također daje mogućnost jednostavne promjene kapaciteta uređaja izmjenom načina povezivanja modula ili mijenjanjem njihovog broja. Time se omogućava izrada od laboratorijskih modula manjih kapaciteta sve do industrijskih postrojenja znatno većeg kapaciteta.

Općenito, moduli se sastoje od membrane i kućišta u koje je ugrađena membrana. Kućište ima dovod dobavne otopine, te odvod retentata i permeata (Moslavac, 2003.; Lovrić, 2003). Konstrukcijom modula nastoji se:

- postići velika otpornost na radni tlak i koroziju,
- što bolje iskoristiti aktivna membranska površina,
- postići da ta površina bude što veća u relativno malom volumenu (visoka gustoća slaganja membrana),
- istovremeno postići što veću turbulenciju, dobre hidrauličke uvjete potrebne za smanjenje koncentracijske polarizacije (koncentriranje otopljenih tvari na tlačnoj strani membrane) i smanjenje stvaranja taloga,

- omogućiti lako čišćenje membrana, mogućnost kontrole ispravnosti i pravilnog rada svake membrane te jednostavna i brza zamjena oštećene membrane i
- postići da pad tlaka u modulu ne bude previsok (Krause i Thiemig, 2013.).

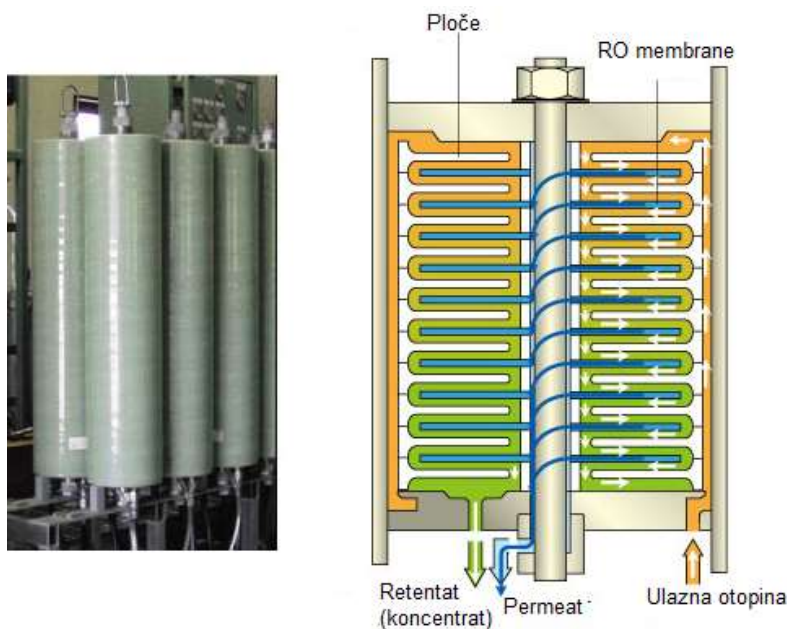
Oblik membrane određuje konstrukciju modula za filtraciju u kojeg se ugrađuju membrane.

Ovisno od konstrukcijskih rješenja razlikuje se nekoliko tipova modula:

- pločasti moduli,
- cijevni moduli,
- spiralni moduli,
- kapilarni moduli i
- moduli sa šupljim vlaknima.

2.3.3.1 Pločasti moduli

Pločasti moduli (**Slika 5**) su prvi dizajnirani moduli za membranske procese i imaju najdužu primjenu u prehrambenoj industriji (Mulder, 1996.; Baker, 2004.). Njihova osnovna karakteristika je da se membrane u vidu tankih listova nalaze između sustava paralelnih ploča manjih ili većih dimenzija različitog geometrijskog oblika (krug ili kvadrat).



Slika 5 Pločasti modul (http://www.kobelco-eco.co.jp/english/product/dt_module/genri.html).

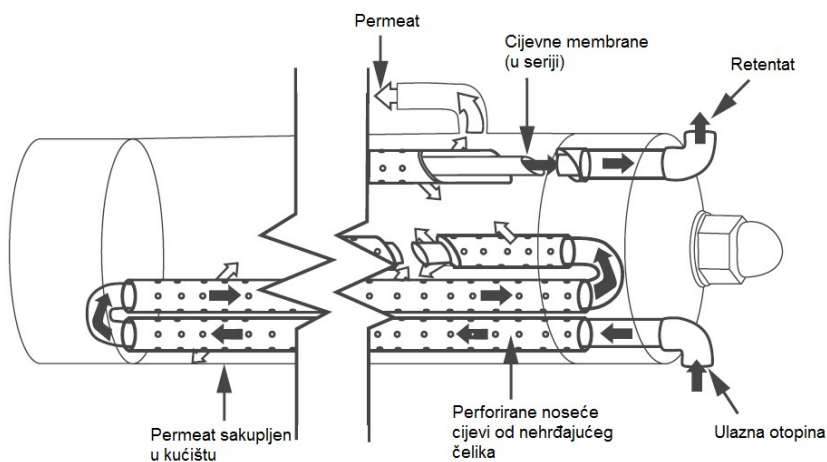
Modul se sastoji od naizmjenično postavljenih razdjelnih ploča, nosećih ploča i membrana smještenih na jednu vertikalnu ili horizontalnu centralnu osovinu. Membrane se nalaze s obje strane noseće ploče čija je površina isprepletena žljebovima koji stvaraju kanale kroz koje

permeat protječe u unutrašnjost ploče. Promjer kanala je manji od 1 mm, te je osigurano laminarno tečenje tijekom filtracije. Razdjelna ploča se nalazi između dvije noseće ploče, na njenoj površini su rebrasti izvodi i na periferiji otvori za tečenje retentata (Moslavac, 2003.; Mulder, 1996.).

Ovi moduli ne mogu podnositi jako visoke tlakove i njihova ukupna aktivna površina ($400 - 800 \text{ m}^2/\text{m}^3$) je znatno manja od kapilarnih ili spiralnih modula (Berk, 2013.). Mogu se koristiti u procesima mikrofiltracije, ultrafiltracije, reverzne osmoze, dijalize i elektrodijalize (Johnson, 2013.).

2.3.3.2 Cijevni moduli

Cijevni modul (**Slika 6**) sastoji se od cijevnih membrana koje su ugrađene u porozni nehrđajući materijal kao potporu. Najčešće se izrađuju od keramike i plastičnih polimernih materijala. Promjer cijevi unutar modula je $0,64 - 2,54 \text{ cm}$ (Kucera, 2013.), a membrane su smještene na vanjskoj ili unutarnjoj strani porozne noseće cijevi. Jedna ili više takvih cijevi mogu biti smještene u zajedničko kućište, a međusobna povezanost cijevi (serijski ili paralelno) utječe na povećanje tečenja fluida, ostvarenje potrebne membranske površine za učinkovitiju filtraciju, bolje iskorištenje prostora, te umanjuje cijenu proizvodnje (Moslavac, 2003.).



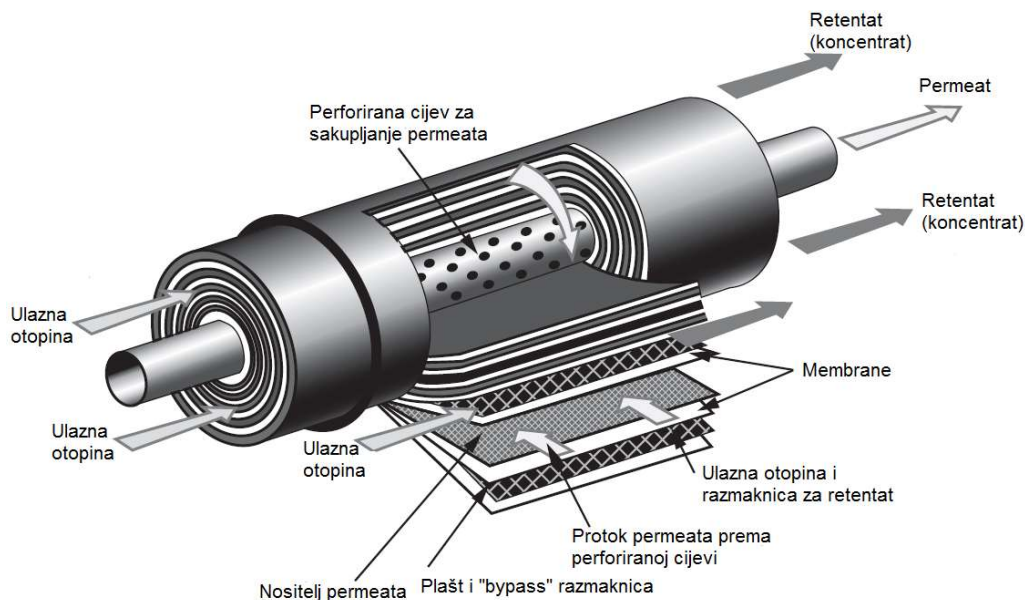
Slika 6 Shematski prikaz cijevnog membranskog modula (Kucera, 2013.).

Keramičke cijevne membrane najčešće imaju heksagonalni oblik i asimetričnu strukturu. Keramičke membrane su posebne konstrukcije, sastoje se od 19 cijevi (kanala) koje su ugrađene u porozni keramički blok od $\alpha - \text{Al}_2\text{O}_3$. Membrane predstavljaju tanki sloj kojim je obložena unutarnja površina cijevi odnosno kanala, sloj je izrađen od aluminija ($\gamma - \text{Al}_2\text{O}_3$), titana, silicija ili cirkonija (ZrO_2). Moduli se mogu spajati paralelno i serijski, broj modula u uređaju ovisi o kapacitetu. Prednost keramičke membrane i modula je što su otporne na visoku temperaturu, mogu se sterilizirati parom, te su kemijski i mehanički otporne. Kapacitet modula

ovisi o površini membrane, gustoća pakiranja je mala (Sondhi i sur.,2003.). Imaju široku primjenu u raznim industrijama, od biotehnologije i farmacije, industrije mlijeka i mliječnih proizvoda, industrije pića i sokova, pa sve do kemijske i petrokemijske industrije. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste za bistrenje voćnih sokova (jabuka, naranča, grožđe itd.) i u šećeranstvu u različitim fazama proizvodnje šećera (Cassano i sur., 2003.; Sondhi i sur.,2003.).

2.3.3.3 Spiralni moduli

Razvijen je kasnih 1960-tih kao alternativa pločastom i cijevnom modulu (Westmoreland, 1968.; Bray, 1968.). Spiralni modul sastoji se od ravnih membrana koje su spiralno smotane i međusobno razdvojene poroznim nosačem za prikupljanje permeata tako da zajedno stvaraju tzv. „sendvič“ strukturu (**Slika 7**). Na površini membrane je zalijepljen mrežasti materijal koji uzrokuje turbulentno tečenje fluida (Kucera, 2013.). Cijeli taj „sendvič“ je spiralno namotan na centralnu perforiranu cijev za odvod permeata. Krajevi membrana i poroznog nosača su spojeni s tri strane, dok je četvrta spojena s perforiranom cijevi u srednjem dijelu modula.



Slika 7 Shematski prikaz spiralnog membranskog modula (Kucera, 2010.).

Na jednom kraju spiralnog namotaja dovodi se otopina za filtraciju, ona ulazi u kanale (debljine 1 mm) i ostvaruje se laminarno tečenje, te prolazi paralelno s uzdužnom osi „sendviča“. Permeat prolazi kroz membrane, teče spiralnim tokom i ulazi u centralnu perforiranu cijev za odvođenje permeata, dok se retentat sakuplja na izlaznom kraju modula. Spiralnim namotajem ravnih membrana postignuta je velika površina membrana u odnosu na mali volumen modula, te je ostvaren dvostruki tok (spiralni i uzdužni). Neki od nedostataka su nemogućnost

mehaničkog čišćenja, češće treba provoditi kemijsko čišćenje, a u slučaju začepljenja membrana mora se zamijeniti cijeli modul (Moslavac, 2003; Kucera, 2013.). Upotrebljavaju se u svim tlačnim membranskim procesima (od mikrofiltracije do reverzne osmoze). Od 1980-tih polovica postrojenja s reverznom osmozom za desalinizaciju vode koristi spiralne membranske module, što čini kapacitet od oko 1,5 milijuna m³/dan¹ (Kucera, 2013.).

2.3.3.4 Kapilarni moduli

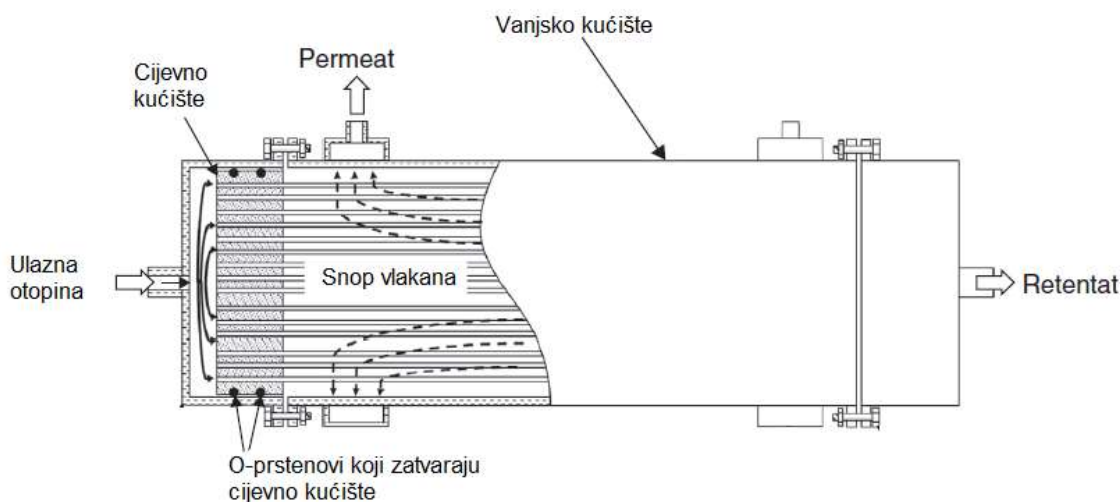
Modul se sastoji od većeg broja kapilara koje se nalaze u prozirnom polisulfonskom cilindričnom kućištu. Kapilare su na krajevima povezane epoksi smolama ili silikonskom gumom s kućištem (Mulder, 1996.). Membrane predstavljaju snop tankih cjevčica, kapilara promjera 0,2 - 1,7 mm. Aktivna površina kod takvih membrana nalazi se s unutarnje ili vanjske strane. Kod kapilarnih modula permeat se može sakupljati izvan ili unutar kapilare. Kada se dobavna tekućina provodi kroz kapilare, prolazi uzdužno preko površina membrana i na kraju cijevnog kućišta izlazi retentat. Permeat prolazi poprečno kroz kapilarnu membranu i sakuplja se u prostoru između kapilara odakle se izvodi van iz modula. Jedan modul može imati 45 do 3000 kapilarnih membrana, time se ostvaruje velika kontaktna površina membrana u odnosu na mali volumen modula, a brzina fluida je 0,5 - 2,5 m/s s laminarnim protokom. Gustoća pakiranja kapilarnih modula je 600 - 1200 m²/m³ (Mulder, 1996.). Pranje uređaja provodi se stvaranjem kontra tlaka (s vanjske strane) što uspješno otklanja nataložene čestice na membrani.

2.3.3.5 Moduli sa šupljim vlaknima („hollow fiber“)

Moduli sadrže membrane u obliku tankih šupljih vlakana (eng. hollow fiber) upakiranih u snopove čiji su krajevi povezani epoksi smolama, te usađeni u ploče koje razdvajaju prostore pod visokim i niskim tlakom, a sve se nalazi u cilindričnom kućištu modula (**Slika 8**). Snopovi obično sadrže 50 - 3000 vlakana. Gustoća pakiranja kod ovih modula je vrlo visoka i može biti do 30 000 m²/m³, a ovisi o promjeru membranskih vlakana i razmaku između njih (Mulder, 1996.). Ovi moduli se koriste za sve vrste membranskih procesa, od mikrofiltracije do reverzne osmoze (Scott, 1995.; Mat i sur., 2014.).

Promjer šupljih vlakana od 50 - 100 µm koristi se kod modula za pročišćavanje morske vode s reverznom osmozom, dok se membrane promjera 0,5 - 2 mm koriste za ultrafiltracijske procese. Šuplja vlakna izrađuju se od celuloznog acetata, aromatskih poliamida i drugih polimernih materijala (Scott, 1995.). Medij koji se želi filtrirati uvodi se u perforiranu cijev, smještenu u sredini snopa membrana, tako da može teći s vanjske ili unutarnje strane vlakana. Najčešće se dovodi u prostor oko vlakana tako da permeat prolazi kroz stijenke vlakana i odlazi u unutrašnjost, te izlazi kroz krajeve vlakana membrane, a retentat se sakuplja u omotaču i

izlazi van na drugoj strani modula (Matsuura, 1994.). Prednost ovih modula je velika površina membrana pri malom volumenu modula, zbog nižih fluksova mali je utjecaj polarizacije koncentracije. Moduli se mogu čistiti samo ispiranjem (Scott, 1995.). Zbog laminarnog toka fluida kroz vlakna dolazi lako do začepljenja modula pa se cijeli mora zamijeniti, teško je spriječiti bakterijsku infekciju prostora ispred membrana. Koloidne tvari također jako skraćuju trajnost membrana (Matsuura, 1994.).



Slika 8 Shematski prikaz membranskog modula sa šupljim vlaknima (Mat i sur., 2014.).

2.3.4. Koncentriranje voćnih sokova primjenom membranskih procesa

Tekuće namirnice, kao što su voćni sokovi, su vrlo značajni zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti jer su prirodno obogaćeni vitaminima i mineralima koji su važni za zdravlje čovjeka. Sirovi voćni sok izoliran iz nekog prirodnog izvora ima mali udio suhe tvari i vrlo visok udio vode. Voda, koja najvećim dijelom ulazi u sastav tekućih namirnica, doprinosi razvoju mikroorganizama. Uklanjanjem vode smanjuje se mikrobiološka aktivnost (njihov rast i razvoj) i povećava trajnost. Stoga je poželjno provesti postupak koncentriranja tekućih namirnica kako bi se povećala trajnost i stabilnost, te reducirali troškovi skladištenja i transporta. Konzervirajući učinak kod koncentriranja najčešće se zasniva na osmoanabiozi (Herceg, 2009.). Tekuće namirnice su u većini slučajeva osjetljive na povišene temperature, pa koncentriranje klasičnim postupkom kao što je uparavanje dovodi do njihove degradacije. Alternativni postupci, koncentriranje zamrzavanjem i membranski procesi ograničeni su maksimalno mogućom postignutom koncentracijom. Kod koncentriranja zamrzavanjem od 45 – 55 °Brix (Sanchez i sur., 2009.), a kod membranskih procesa do 28 - 35 °Brix (Ganorkar i sur., 2012.; Jiao i sur.,

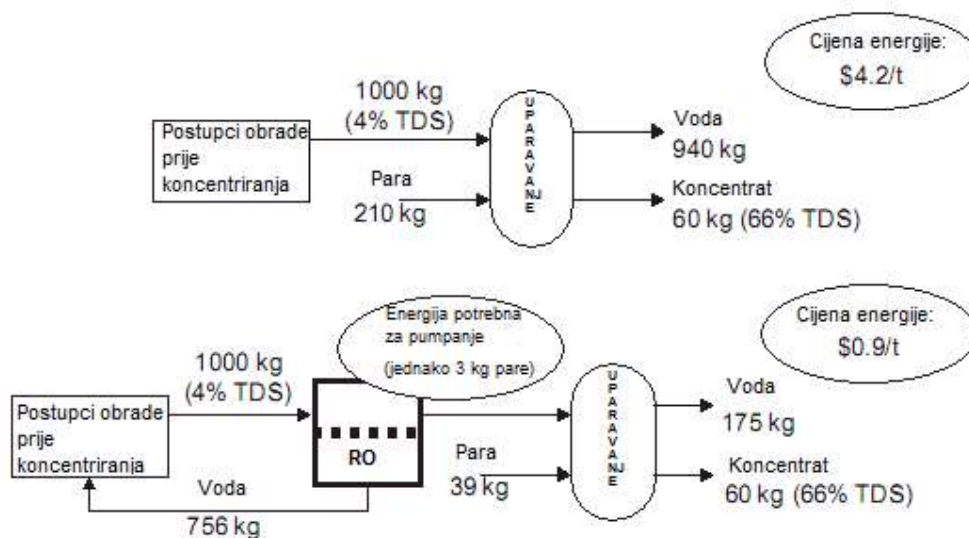
2004.). Primjena membranskih procesa je također limitirana zbog pojave polarizacije koncentracije, onečišćenja membrana, te smičnog oštećenja proteina (Phillip, 1984.; Petrotos i Lazarides, 2001.).

Tri glavna područja primjene membranskih procesa u proizvodnji voćnih sokova su:

- bistrenje (npr. proizvodnja voćnih pjenušavih pića – mikrofiltracija i ultrafiltracija),
- koncentriranje (npr. koncentriranje postupkom RO u proizvodnji voćnih koncentrata do 42 °Brix i više) i
- deacidifikacija (npr. smanjenje kiselosti sokova citrus voća – nanofiltracija i elektrodijaliza).

Najveća prednost membranskih procesa za koncentriranje voćnih sokova i proizvoda od povrća je manja potrošnja energije u usporedbi s klasičnim postupcima. Ekonomska prednost ovisi o energetske troškovima, troškovima zamjene membrana i samom trajanju kampanje prerade. S obzirom na to da su citrus sokovi neNewtonske tekućine, dolazi do određenih problema s protokom i začepljenjem membrana što povećava investicijske i radne troškove. Sok dobiven membranskim postupkom sadrži manje mikročestica pa je bistriji (transparentniji), a ako potrošači preferiraju mutniji sok vlakna se mogu naknadno dodati (Wang i sur.; 2011.). Glavni nedostatak RO procesa je nemogućnost postizanja standardnih koncentracija finalnog proizvoda koje se dobiju uparavanjem zbog limitiranosti procesa visokim osmotskim tlakom (Cheryan i Alvarez, 1995.).

Koncentriranje voćnih sokova postupkom RO je jedno od područja najveće primjene membranskih procesa. Najznačajnija prednost postupka RO u odnosu na koncentriranje uparavanjem je minimiziranje termičkog oštećenja komponenti arome, te smanjenje količine energije potrebne za uklanjanje vode (Cheryan i Alvarez, 1995.). S obzirom na potrošnju energije, RO je najučinkovitiji postupak među procesima uklanjanja vode iz namirnica. Zbog niskog osmotskog tlaka najbolja je njegova primjena za otopine s malom koncentracijom otopljenih tvari. Učinak sustava RO opada s povećanjem koncentracije otopljenih tvari, pa se stoga RO najčešće koristi kao predkoncentracijski korak (**Slika 9**) prije procesa uparavanja čime se postiže značajna ušteda energije (Chui i Muralidhara, 2010.).



Slika 9 Shematski prikaz uštede primjenom reverzne osmoze kao predkoncentracijskog koraka prije koncentriranja uparavanjem (Chui i Muralidhara, 2010.).

Radovi Mersona i Morgana (1968.) sa sokom jabuke su pokazali da celulozno acetatne membrane pokazuju dobro zadržavanje šećera, ali je aroma, odnosno komponente arome su djelomično prošle kroz membranu dajući koncentrat manje kvalitete (Demeczky i sur., 1981.). Provedena su brojna istraživanja na različitim voćnim sokovima jabuke, kruške, grejpa, ananasa, kivija i dr., radovi se temelje na ispitivanju utjecaja različitih tipova membrana i radnih uvjeta na protok permeata i zadržavanje pojedinih komponenti soka. Ustanovljeno je da poliamidne membrane pokazuju veće zadržavanje arome i ostalih komponenti, te veći protok od celulozno acetatnih membrana (Jiao i sur., 2004.).

Pektini pridonose začepeljivanju membrana i povećavaju viskoznost što utječe na rad postrojenja. Stoga se obično prije RO provodi depektinizacija enzimima i bistrenje (najčešće postupkom UF). Najčešće se upotrebljavaju spiralni i rjeđe cijevni moduli (Cheryan i Alvarez, 1995.).

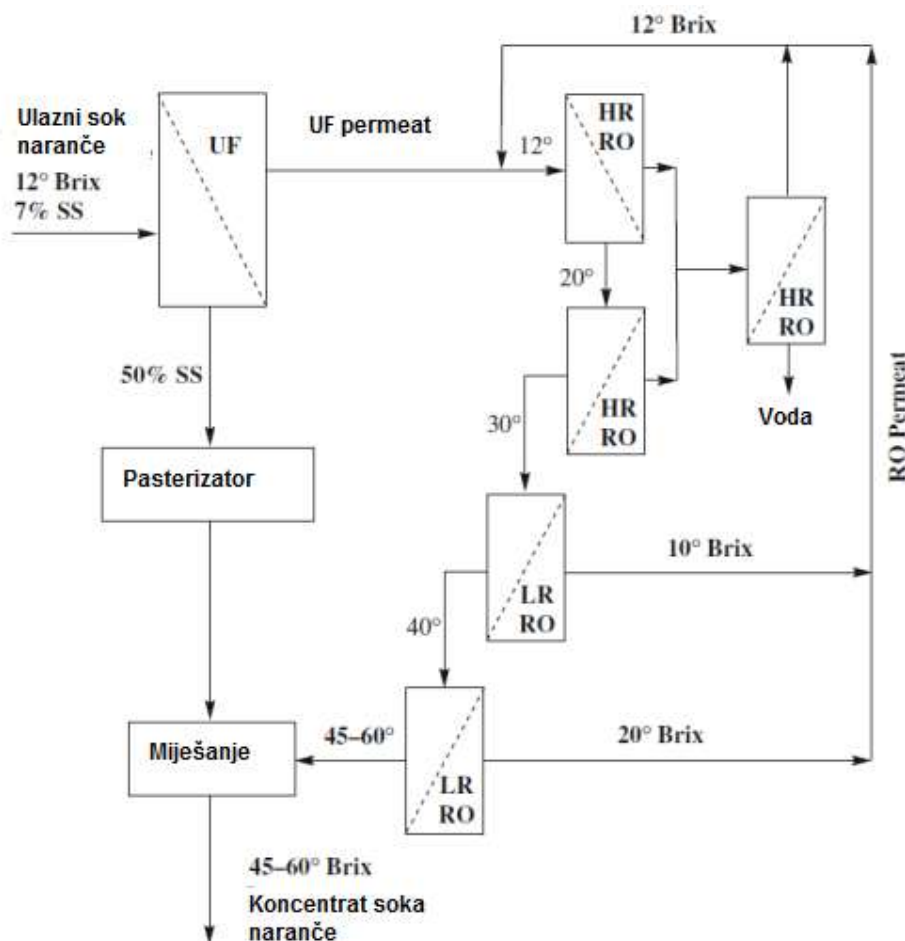
Kod soka od naranče i ostalih citrus sokova, mnogi sastojci arome ostaju u uljnoj fazi koja je prisutna u soku u obliku emulzije. Kako su ti sastojci djelomično topivi u vodi zadržavanje arome membranskim procesima bi trebalo biti bolje nego kod soka od jabuke. Na celuloznim RO membranama može se koncentrirati centrifugirani sok do 25 °Brix pri 5 – 7 °C i 30 – 70 bara. Iako je zadržavanje šećera, kiselina, fenolnih spojeva i spojeva s dušikom visoko, zadržavanje komponenti arome je slabije (Peri, 1974.). Reverznom osmozom na poliamidnim kompozitnim membranama može se koncentrirati sok od naranče bez značajnijih gubitaka arome, šećera ili kiselina (Medina i Garcia, 1988.). U permeatu je ustanovljena količina glukoze

i fruktoze od 0,02 – 0,4 %, nije bilo gubitaka saharoze. Klasični postupak RO ograničen je osmotskim tlakom i viskozitetom do 30 °Brix, stoga se primjenjuje kao predkoncentracijski postupak, uz završno koncentriranje uparavanjem do 42 °Brix (Cheryan i Alvarez, 1995.).

Prva komercijalna RO postrojenja upotrebljavala su PCI AFC–99 membrane uz brzinu protoka od 4200 – 9200 L/h i uklanjanje vode do 2000 L/h. Ulazna otopina je bio pasterizirani sok od naranče s udjelom suhe tvari 10 – 12 °Brix, pH 3,2 – 3,7 i udjelom pulpe 2 – 7,5 %. Svakih 4 – 6 sati se provodilo ispiranje membrana s lužinom kako bi se uklonio hesperidin koji uzrokuje začepljenje (Pepper, 1990.).

Za proizvodnju visoko koncentriranog (42 – 60 ° Brix) voćnog soka SeparaSystems koriste kombinaciju visoko (HR) i nisko (LR) retencijskih RO membrana (Cross, 1988.; Walker, 1990.). To je tzv. FreshNote proces (**Slika 10**).

Osmotski tlak soka od naranče s udjelom suhe tvari 10 – 12 % (10 –12 °Brix) je oko 250 – 300 psi, a pri koncentraciji 42 °Brix povećava se na 1500 psi, te na 60 °Brix 3000 psi. Povećanje osmotskog tlaka i viskoznosti rezultira većom potrošnjom energije i zahtjeva primjenu mnogo većih tlakova, što nadilazi mogućnosti modula koji se danas primjenjuju. Procesom FreshNote uklonjena su ta ograničenja. Proces se sastoji od dva stupnja. Ultrafiltracija je prvi korak u kojem se pulpa (talog na dnu) odvaja od seruma koji sadrži šećere i komponente arome. Talog sadrži nešto topivih tvari, netopive čvrste tvari, pektine, enzime, ulje naranče i mikroorganizme koji mogu narušiti stabilnost koncentrata. Stoga UF retentat (1/10 do 1/20 početnog volumena ulaznog soka) ide na pasterizaciju kako bi se uništili mikroorganizmi koji mogu uzrokovati kvarenje i poboljšala stabilnost finalnog proizvoda koji se dobije miješanjem pasteriziranog UF retentata i koncentriranog UF permeata postupkom RO. Serum, odnosno UF permeat (oko 90 – 95 % ulaznog soka) se dalje koncentrira reverznom osmozom na modulima sa šupljim vlaknima od aromatskih poliamida. Tlak je oko 1000 – 2000 psi. Koristi se višefazni sustav s visoko retencijskim membranama na početku i nisko retencijskim membranama na kraju. Kada koncentracija seruma postane toliko velika da utječe na smanjenje pogonske sile, koncentrat se odvodi na nisko retencijske membrane. Na tim membranama prolazi određeni dio šećera što rezultira smanjenjem osmotskog tlaka na membrani, pa se mogu upotrebljavati niži radni tlakovi. Voda koja se ukloni reverznom osmozom može se vratiti natrag na visoko retencijske RO module kako bi se izdvojili moguće zaostali tragovi šećera i komponenti arome. Dobiveni koncentrirani serum se na kraju miješa s pasteriziranom pulpom izdvojenom na početku procesa. Time se dobije koncentrirani sok od naranče 45 – 60 °Brix (Walker, 1990.; Cheryan i Alvarez, 1995.).



Slika 10 Postupak Fresh Note (kombinacija visoko (HR) i nisko (LR) retencijskih RO membrana) (Cheryan i Alvarez, 1995.).

Watanabe i sur. (1990.) koristili su sličnu kombinaciju visoko i nisko retencijskih membrana (NTR-7199 i NTR-7450 Nitto – Denko spiralni modul) za koncentriranje soka od jabuke 11 °Brix do 45 ° Brix uz tlakove 7,5 – 9,5 MPa. Sličan koncept koriste i Koseglu i sur. (1990.) za proizvodnju koncentrata i/ili steriliziranog soka od jabuke na UF modulu sa šupljim vlaknima i cijevnom RO modulu.

2.4. POLIFENOLI

Polifenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju spojeve različite kemijske strukture, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline (hidroksicimetne kiseline), pa sve do visoko polimeriziranih tvari kao što su proantocijanidini (tanini). Polifenoli čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva (Harbone i sur., 2000.). Oni su produkti sekundarnog metabolizma u biljkama i nisu

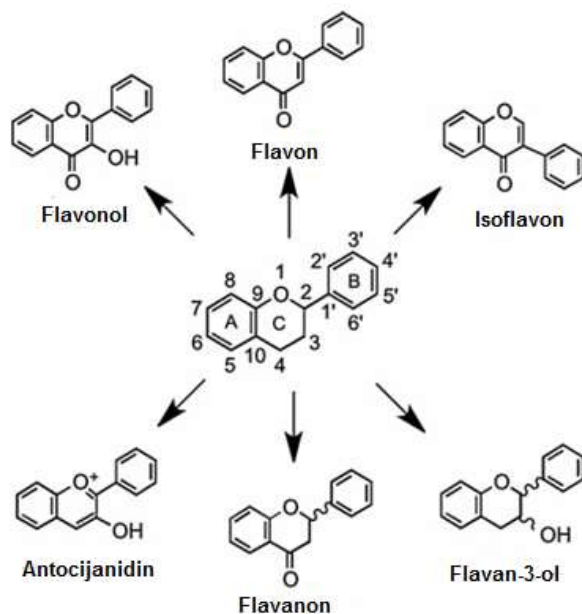
esencijalni za ljudski organizam. Najveća i najvažnija skupina polifenola su flavonoidi koji se pojavljuju u gotovo svim dijelovima biljaka, ali su po udjelu različito rasprostranjeni u različitim dijelovima biljnih organa. Tu raznovrsnost uglavnom kontroliraju geni biljke, ali na nju imaju utjecaj i drugi čimbenici kao što su stadij zrelosti biljke, klima i način uzgoja. Polifenolni spojevi sudjeluju u biokemijskim promjenama koje se odvijaju tijekom zrenja i dozrijevanja voća i uključeni su u mehanizme formiranja boje, okusa i arome svojstvene svakoj pojedinoj vrsti voća, no također su uključeni i u različite nepoželjne procese koji nastaju tijekom prerade svježeg voća (Dubrović, 2012.).

Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova i mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide (Del Rio i sur., 2013.). Također jedno od njihovih karakterističnih svojstava je i povezanost s drugim molekulama, najčešće sa šećerima i proteinima. Slobodni oblici polifenolnih spojeva su uglavnom toksični, pa se oni u biljnim tkivima najčešće javljaju u vezanom obliku (Reis Giada, 2013.).

2.4.1. Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi koji imaju osnovnu flavansku strukturu, koja se sastoji od difenilpropanskog kostura C15 (C6-C3-C6), građen od dva benzenska prstena A i B povezana piranskim prstenom C koji sadrži kisik. Do danas je identificirano preko 5000 različitih flavonoida (Ververidis i sur., 2007.), a mogu se podijeliti na: flavanole, flavanone, antocijane, flavone, izoflavone, flavan-3-ole, proantocijanidine i dihidrohalkone (Del Rio i sur., 2013.). Na **Slici 11** prikazana je osnovna kemijska struktura glavnih podgrupa flavonoida (Del Rio i sur., 2013.).

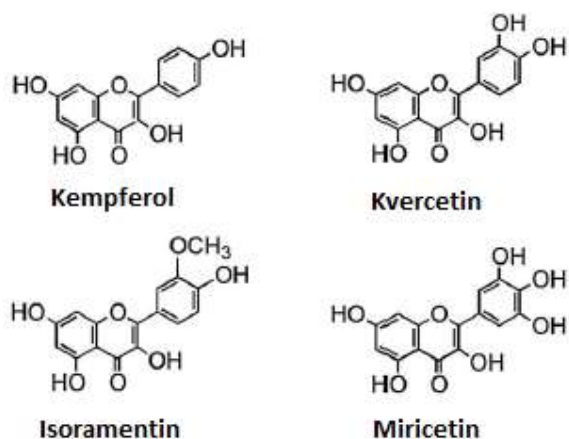
Razlike između pojedinih flavonoidnih podskupina proizlaze iz razlike u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije središnjeg C-prstena, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozilacije. U prirodi su najčešće zastupljeni kao glikozidi. Šećeri se na flavonoide vezuju β -glikozidnom vezom, pa je tako oblik 3-O-glikozida najzastupljeniji oblik flavonoida u prirodi (Hammerstone i sur., 2000.). D-glukoza je najčešći šećer koji se veže u položaju C3 ili C7 na osnovnu strukturu flavonoida, a potom slijede D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza i D-glukuronska kiselina (Heim i sur., 2002.).



Slika 11 Osnovna kemijska struktura glavnih podgrupa flavonoida (Del Rio i sur., 2013.).

2.4.1.1 Flavonoli

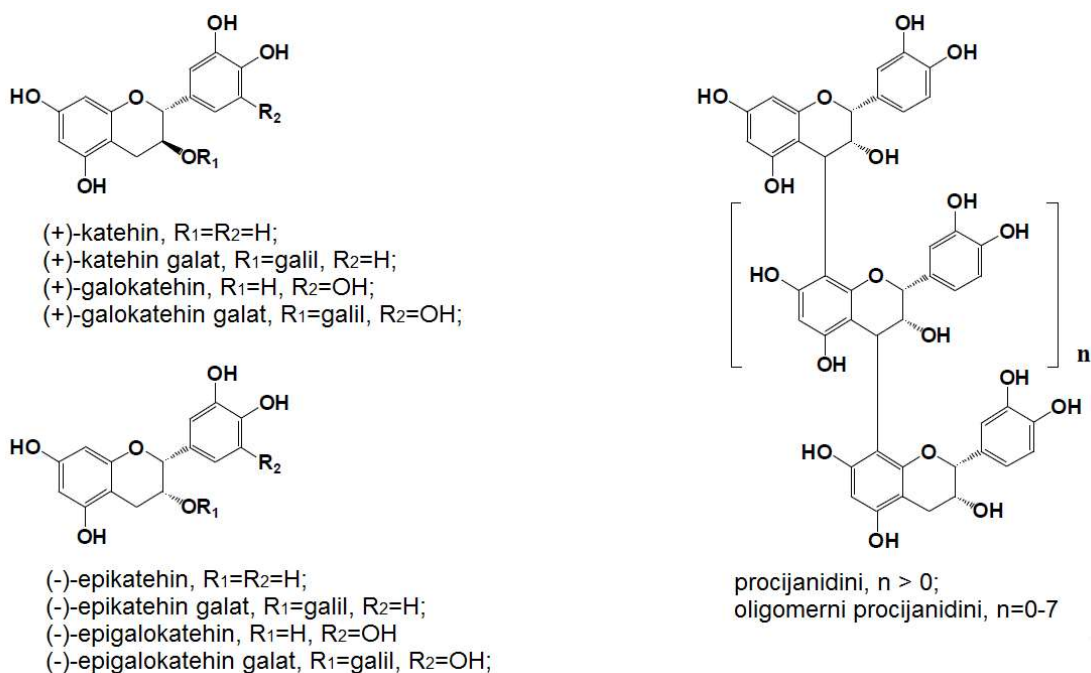
Najčešći flavonoli: kempferol, kvercetin, izoramnetin i miricetin (**Slika 12**) se obično pojavljuju u glikozidnom obliku. Mjesta glikoziliranja su uglavnom na 5, 7, 3', 4' i 5'. Iako je mogući broj aglikona ograničen, pronađeno je više od 200 konjugata kempferola (Strack i Wray, 1992.).



Slika 12 Kemijska struktura flavonolnih aglikona (kempferol, kvercetin, izoramnetin i miricetin) i tri najčešća kvercetin-O-glikozida (Del Rio i sur., 2013.).

2.4.1.2 Flavanoli i proantocijanidini

Flavanoli (flavan-3-oli) često se nazivaju i katehinima. Razlikuju se od ostalih flavonoida jer nemaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma. Na mjestu C4 na heterocikličnom prstenu C ne nalazi se atom kisika, te im je ta strukturna osobina zajednička s antocijanidinima. Te osobine, i hidroksilacija na C3 omogućuju im da imaju dva kiralna centra (na C2 i C3), te četiri moguća diastereoizomera. Katehin je izomer s *trans* konfiguracijom, a epikatehin s *cis* konfiguracijom. Svaka od te dvije konfiguracije ima dva stereoizomera, (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin. (+)-katehin i (-)-epikatehin su izomeri koji se najčešće pronalaze u hrani. Flavanole se može naći u mnogim vrstama voća, posebno u kožici grožđa, jabukama i borovnicama (Tsao i sur., 2003.; Tsao, 2010.). Monomerni flavanoli (katehin i epikatehin) i njihovi derivati (galokatehini) su glavni flavonoidi u lišću čaja i zrnu kakaovca (Si i sur., 2006.; Prior i sur., 2001.). **Slika 13** prikazuje najčešće oblike flavanola (Tsao, 2010.).

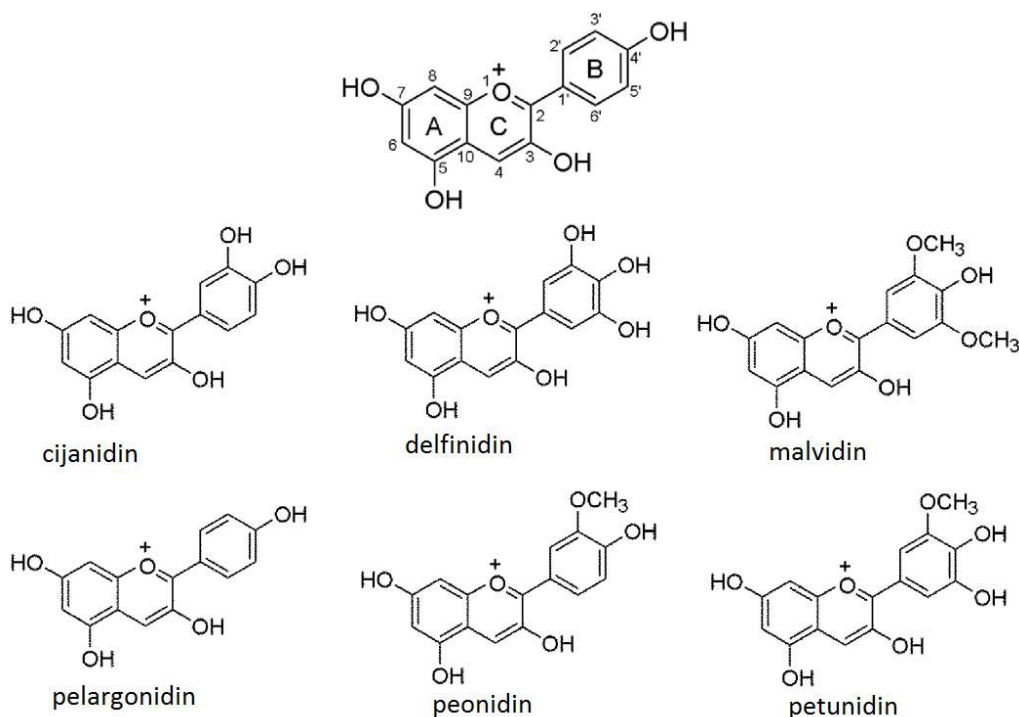


Slika 13 Kemijska struktura flavanola i proantocijanidina (Tsao, 2010.).

Katehin i epikatehin mogu stvarati polimere, koji se nazivaju proantocijanidini (kondenzirani tanini). Proantocijanidini obično sadrže dvije do šezdeset jedinica monomera flavanola (Tsao i McCallum, 2010.). Flavanoli i njihovi oligomeri (2-7 monomernih jedinica) su poznati kao snažni antioksidansi. Ovisno o mjestu povezanosti, oligomerni proantocijanidini mogu biti tipa A (struktura u kojoj su monomeri povezani preko C2-O-C7 ili C2-O-C5 veze) ili tipa B (C4-C6 ili C4-C8). Procijanidin C1 je trimer. Fermentacijom čaja prisutni flavanoli mogu stvarati jedinstvene dimere kao što je teaflavin.

2.4.1.3 Antocijani

Antocijani su spojevi topljivi u vodi i staničnom soku biljaka. Glavni su nositelji prirodne boje plodova voća i povrća koje ima crvenu, plavu i ljubičastu boju. Antocijani na svom središnjem prstenu imaju pozitivan naboj, a to im daje svojstvo iona (flavilijum kation) koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svjetla pri valnim duljinama oko 500 nm (Wrolstad i sur., 2005.). Osnovu antocijana čini aglikon antocijanidin koji se veže s nekim od šećera stvarajući stabilniju glikozidnu strukturu u kojoj se pojavljuju u prirodi (Wicklund i sur., 2005.). Poznato je više od 500 različitih antocijana i 23 antocijanidina (Andrsen i Jordheim, 2006.). Najzastupljeniji antocijanidini u prirodi su: cijanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin, a zastupljeni su u udjelima 50 %, 12 %, 12 %, 12 %, 7 % i 7 % (Zhang i sur., 2005.; Wrolstad, 2000.). Kemijska struktura flavilium kationa i šest najzastupljenijih antocijanidina prikazana je na **Slici 14** (Yuan i sur., 2012.).



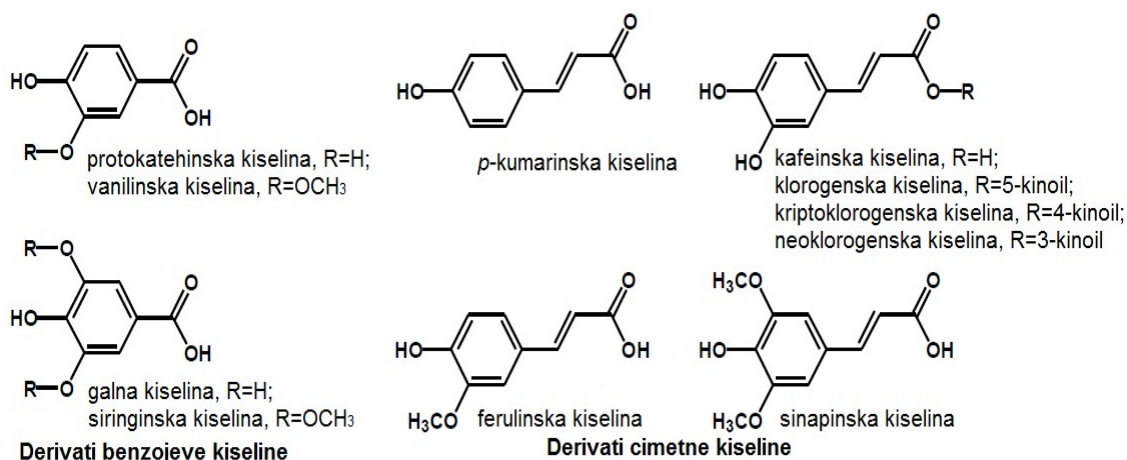
Slika 14 Kemijska struktura flavilium kationa i najzastupljenih antocijanidina (Yuan i sur., 2012.).

Hidroksilne skupine antocijana mogu biti slobodne, metilirane ili glikozilirane. Od šećera najčešće su prisutni oligosaharidi u pirano formi, koji sadržavaju dvije ili tri jedinice monosaharida, stvarajući pri tome 1,2; 1,4 ili 1,6 veze (rutinoza, soforoza, sambubioza i glukorutinoza). Od monosaharida heksoze (glukoza, galaktoza), metil pentoze (ramnoza) i pentoze (ksiloza, arabinoza) (Kahkonen i sur., 2003.). Šećeri se mogu vezati na položajima 3,

5, 7, 3' i 5', a najčešće se vežu na položajima 3 i 5 u piranskoj jezgri. Glikozilacija na C3 atomu smanjuje maksimum apsorpcije, ali povećava stabilnost i topljivost (Macheix i sur., 1990.).

2.4.2. Neflavonoidi

U skupini neflavonoida najznačajnije su fenolne kiseline. One su najčešće derivati benzojeve (C6-C1) i cimetne (C6-C3) kiseline. Rijetko se javljaju u slobodnom obliku, uglavnom su esterificirane s vinskom ili kina kiselinom (Robards i sur., 1999.). U voću i povrću se mogu naći i u slobodnom obliku, no u žitaricama i sjemenkama su uglavnom u vezanom obliku i to kao glikozidi, esteri i eteri (Kim i sur., 2006., Adom i Liu, 2002.). Vezane fenolne kiseline mogu se osloboditi jedino kiselinskom ili alkalnom hidrolizom ili uz pomoć enzima (Tsao, 2010.). Na **Slici 15** prikazani su najčešći derivati benzojeve i cimetne kiseline koji je pojavljuju u hrani (Tsao, 2010.).



Slika 15 Najčešće fenolne kiseline u hrani (Tsao, 2010.).

Hidroksibenzojeve kiseline se rjeđe nalaze u prirodi od hidroksicimetnih kiseline, izuzetak su neke vrste crveno obojenog voća, crna rotkva i luk (Manach i sur., 2004.). Također hidroksibenzojeve kiseline su sastavni dio složenih struktura kao što su hidrolizirani tanini (galotanini u mangu i elagitanini u crveno obojenom voću kao što su jagode, maline i kupine) (Clifford i Scalbert, 2000.). Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su galna, siringinska, vanilinska i protokatehinska kiselina (**Slika 15**).

Hidroksicimetne kiseline se češće nalaze u prirodi od hidroksibenzojevih i uglavnom se sastoje od *p*-kumarinske, kafeinske i sinapinske kiseline. One se rijetko nalaze u slobodnom obliku, osim u procesiranoj hrani nakon procesa smrzavanja, sterilizacije ili fermentacije (Manach i sur., 2004.). Vezani oblici su najčešće glikozilirani derivati ili esteri kina, šikiminske ili vinske kiseline. Kombinacijom kafeinske i kina kiseline nastaje klorogenska kiselina koju se može naći

u različitim vrstama voća (kupine, kivi, šljive, višnje, jabuke), a posebno u visokim koncentracijama u kavi (Clifford, 1999.; Macheix i sur., 1990.). Kafeinska kiselina, slobodni i esterificirani oblik, je najčešća fenolna kiselina i predstavlja 75 % i 100 % od ukupne količine hidroksicimetnih kiselina u većini voća. Iako se hidroksicimetne kiseline mogu naći u svim dijelovima voća, najveće koncentracije su pronađene u vanjskim dijelovima zrelog voća. Njihova koncentracija u većini slučajeva opada tijekom sazrijevanja, no ukupna količina se povećava kako se povećava i veličina ploda voća (Manach i sur., 2004.).

2.4.3. Polifenolni spojevi aronije

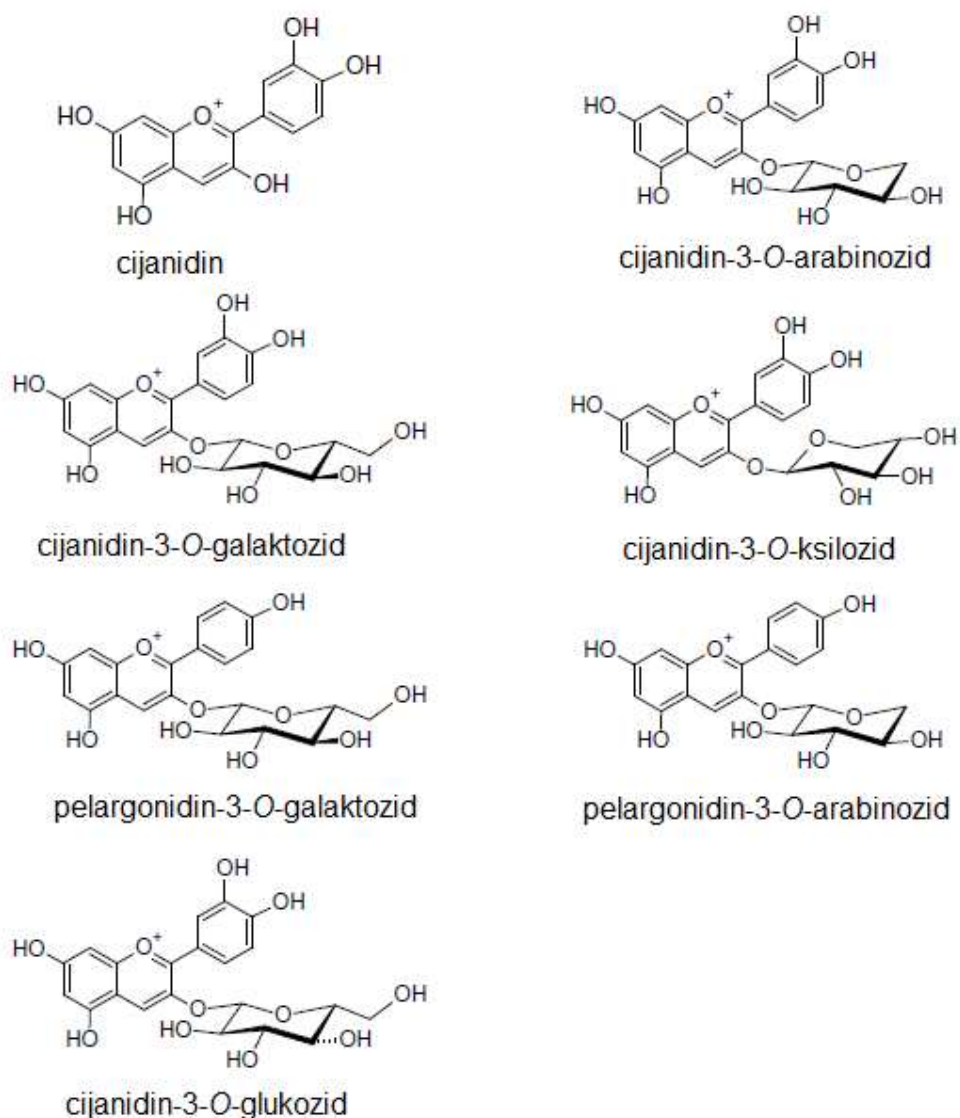
Aronija je, po svom kemijskom sastavu, bogat izvor raznih esencijalnih mikronutrijenata kao što su vitamini i minerali. U zadnje vrijeme ističe se važnost voća kao bogatog izvora spojeva koji nisu esencijalni za ljudsko zdravlje, ali pokazuju biološko djelovanje u ljudskom organizmu. U takve spojeve pripadaju polifenolni spojevi koji su zbog svoje složene kemijske građe podijeljeni u brojne skupine od kojih su najvažnije flavonoidi i fenolne kiseline (Kaur i Kapoor, 2001.; Del Rio i sur., 2010.).

Najvažnije skupine polifenola prisutne u aroniji su fenolne kiseline, flavonoli, flavan-3-oli, antocijani te proantocijanidini (Jakobek i sur., 2011.; Kokotkiewicz i sur., 2010.; Kulling i Rawel, 2008.; Oszmianski i Wojdylo, 2005.). Udio ukupnih i pojedinih polifenolnih spojeva u aroniji ovisi o sorti, načinu kultiviranja, staništu, vremenu berbe, stupnju zrelosti bobica itd. (Ochmian i sur., 2012.). Sadržaj ukupnih polifenola u aroniji određen u različitim istraživanjima se kreće od 3440 mg/100 g DW (Kolesnikov i Gins, 2001.), 3760 mg/100 g DW (kultivar Nero), (Hudec i sur., 2006.), 4010 mg/100 g DW (Kähkönen i sur., 1999.), 4210 mg/100 g DW (kultivar Viking), (Kähkönen i sur., 2001.), do 7465 mg/100 g DW (Mayer-Miebach i sur., 2008.) i 7849 mg/100 g DW (Oszmianski i Wojdylo, 2005.).

Procijanidini su jedna od značajnih polifenolnih skupina prisutni u aroniji (Oszmianski i Wojdylo, 2005.). oni su uglavnom oligomeri (2-10 monomernih jedinica) i polimeri (više od 10 monomernih jedinica) (epi)katehina. Aronija sadrži jedino tip B procijanidina s (-)-epikatehinom kao glavnom monomernom jedinicom. Udio katehinskih jedinica je oko 1,5 % (Oszmianski i Wojdylo, 2005.). Wu i sur. (2004.) odredili su sastav procijanidina u aroniji: 0,78 % monomera, 1,88 % dimera, 1,55 % trimera, 6,07 % 4-6-mera, 7,96 % 7-10-mera i 81,72 % više od 10-mera.

Antocijani su odgovorni za tamno crvenu, plavu i ljubičastu boju bobica aronije. *Aronia melanocarpa* je vrsta s do sada najvećom pronađenom koncentracijom antocijana. Sadrži veću količinu od ostalih biljnih vrsta iz porodice Ruža (*Rosaceae*) kao što su jagode, maline, višnje, kupine i dr. (Jakobek, 2007.). Prisutni antocijani su uglavnom u obliku cijanidin glikozida (Oszmianski i Wojdylo, 2005.; Jakobek i sur., 2007.; Benvenuti i sur., 2004.; Strigl i sur.,

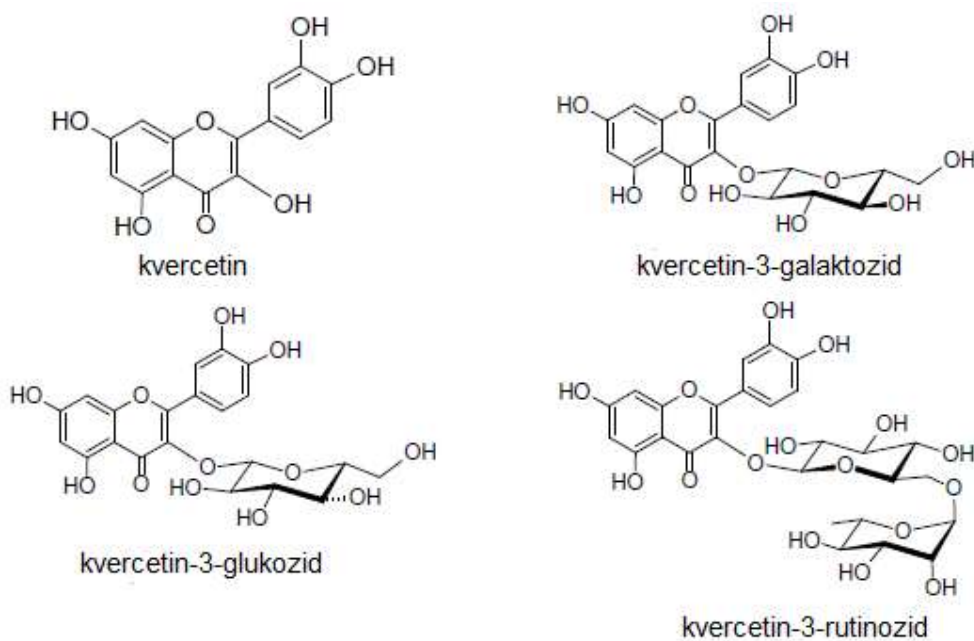
1995a.) i čine oko 25 % od ukupnih polifenola (Oszmianski i Wojdylo, 2005.). U usporedbi s ostalim bobičastim voćem koje je izrazito bogato antocijanima, aronija ima jednostavan antocijanski sastav (Seidemann, 1993.; Wu i sur., 2004.; Strigl i sur., 1995b.). Uglavnom se sastoji od četiri cijanidin glikozida: cijanidin-3-O-galaktozid (68,9 %), cijanidin-3-O-arabinozid (27,5 %), cijanidin-3-O-ksilozid (2,3 %) i cijanidin-3-O-glukozid (1,3 %) (Jeppsson, 2000.; Strigl i sur., 1995b.). Pronađeno je da je takav obrazac distribucije i količine jednak u bobicama, soku i zaostaloj prešavini (Oszmianski i Wojdylo, 2005.). Također su pronađeni u tragovima pelargonidin-3-O-galaktozid i pelargonidin arabinozid (Wu i sur., 2004.). **Slika 16** daje prikaz kemijske strukture najznačajnijih antocijana pronađenih u aroniji (Taheri, 2013.).



Slika 16 Kemijska struktura najznačajnijih antocijana pronađenih u aroniji (Taheri, 2013.).

Od *fenolnih kiselina* u aroniji su prisutne klorogenska i neoklorogenska kiselina, esteri hidroksibenzojevih kiselina s kina kiselinom (Jakobek i sur., 2012.a; Kokotkiewicz i sur., 2010.; Kulling i Rawel, 2008.; Oszmiański i Wojdyło, 2005.). One predstavljaju oko 7,5 % ukupnih polifenola (Oszmiański i Wojdyło, 2005.).

Udio *flavonola* u aroniji, u usporedbi s gore navedenim polifenolnim skupinama i spojevima, je malen. Flavonoli čine oko 1,5 % ukupnih polifenola (Oszmiański i Wojdyło, 2005.). Identificirano je 5 derivata kvercetina: 3-O-(6'-O- β -arabinozil- β -glukozid), 3-O-(6'- α -ramnozil- β -galaktozid), 3-O-(6'- α -ramnozil- β -glukozid), 3-O- β -galaktozid i 3-O- β -glukozid (Slimestad i sur., 2005.). Na **Slici 17** prikazana je kemijska struktura tri najčešća glikozida kvercetina pronađenih u bobicama, soku i prešavini aronije (Oszmiański i Wojdyło, 2005.; Taheri, 2013.).



Slika 17 Tri glikozida kvercetina najčešće prisutna u aroniji (Taheri, 2013.).

2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi su spojevi koji sprječavaju ili usporavaju procese oksidacije u organizmu, neutraliziraju slobodne radikale i na taj način kontroliraju procese starenja i razvoj kroničnih bolesti (Shahidi i Zhong, 2007.). Postoje dva izvora antioksidansa: ljudski organizam, koji je sposoban sam ih proizvesti uz pomoć vitamina i minerala, dok je drugi, vanjski izvor, hrana koju svakodnevno unosimo (Antolovich i sur., 2002.).

U zadnjim desetljećima sve više se razvija interes za prirodne antioksidanse kako bi se izbjegla upotreba umjetnih aditiva. Jedno od nepoželjnih svojstava prirodnih antioksidanasa je

osjetljivost na kisik, posebno prilikom izlaganja svjetlu, visokoj temperaturi i sušenju. Promjene se također nastavljaju i tijekom skladištenja prehrambenih proizvoda. Aktivnost prirodnih antioksidansa uvelike ovisi o kompleksnosti hrane (Pichler, 2011.).

Antioksidacijska aktivnost je sposobnost određenih tvari da kroz različite mehanizme stabiliziraju tvari koje dovode do oksidativnih promjena. Antioksidacijska aktivnost ne ovisi samo o strukturnim svojstvima antioksidanasa već i o mnogim drugim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, tip supstrata, fizikalno stanje sustava, kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001.).

Antioksidansi u hrani se mogu definirati kao bilo koji sastojak koji može odgoditi, zaustaviti ili spriječiti kvarenje hrane ili stvaranje nepoželjne arome (miris i/ili okus) kao posljedicu oksidacije. Dodatak antioksidansa nakon što je do kvarenja već došlo smatra se neučinkovitim (Kopjar, 2007.).

Vitamini (vitamin A, C i E) i polifenoli su poznati kao sastojci u voću i povrću koji posjeduju antioksidacijsku aktivnost (Skupien i Oszmainski, 2004.). Važna karakteristika polifenola je njihovo snažno antioksidacijsko djelovanje koje se iskazuje hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona, prekursora pri stvaranju slobodnih radikala (Rice-Evans i sur. 1997.). Antioksidativno djelovanje polifenola povezano je s njihovom mogućnošću pozitivnog fiziološkog djelovanja u ljudskom organizmu. Naime, polifenoli pokazuju antikancerogeno, antiupalno i antialergijsko djelovanje i zbog takvog pozitivnog djelovanja su, u zadnjih nekoliko desetljeća, postali predmet brojnih istraživanja (Del Rio i sur., 2013.; Jakobek i sur., 2008.).

Količinom polifenola se, između različitih vrsta voća, posebno ističe tamno obojeno bobičasto i jagodasto voće iz porodica Ericaceae (borovnice), Rosaceae (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda, aronija) te Caprifoliaceae (bobice bazge) (Maatta-Riihinen i sur., 2004.; Wu i sur., 2004.). Najvažnije skupine polifenola prisutne u ovom voću su flavonoli, flavan-3-oli, antocijani te proantocijanidini. Redovitom konzumacijom tog voća i njihovih proizvoda pozitivno se utječe na smanjenje rizika od nastanka različitih bolesti krvožilnog sustava i malignih bolesti (Bermúdez-Soto i sur., 2007.; Garcia-Alonso i sur., 2006.), što se pripisuje upravo visokom sadržaju polifenolnih spojeva u voću.

Općenito se vjeruje da se antioksidacijsko svojstvo polifenolnih spojeva (flavonoida) temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodikova atoma i na taj način hvatanja slobodnih radikala generiranih u reakciji peroksidacije lipida. Antioksidacijska aktivnost se danas najčešće mjeri TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja je definirana kao mmoldm⁻³ koncentracija otopine, u vodi topljivog analoga vitamina E, Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1

mmoldm-3 otopina ispitivanog flavonoida (Kazazić, 2004.). Antiradikalna aktivnost flavonoida određuje se njihovom sposobnošću reagiranja s određenim radikalima, npr. mjerenjem obezbojenja stabilnog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilnog radikala (DPPH) (Antolovich i sur., 2002.; Sanchez-Moreno, 2002.).

2.5.1. Antioksidacijska aktivnost aronije

Prema mnogim istraživanjima aronija zbog svojeg kemijskog sastava, a posebno visokog sadržaja polifenolnih spojeva, ima potencijalno pozitivno djelovanje na ljudski organizam. Određivanje antioksidacijske aktivnosti je jedan od načina definiranja mogućnosti zaštite od slobodnih radikala. Antioksidansi prisutni u aroniji su uglavnom vitamin C i polifenoli, antocijani, fenolne kiseline, flavonoli, flavanoli i tanini (Jurikova i sur., 2017).

Zaštitna uloga polifenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Ferrali i sur., 1997.; Elliott i sur., 1992.; Cos i sur., 1998.). Antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih antioksidansa ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina (Burda i Oleszek, 2001.; Cao i sur., 1997.). Na sposobnost hvatanja reaktivnih vrsta kisika i dušika flavonoida najviše utječu hidroksilne skupine prstena B. Hvatanje peroksidnih i hidroksilnih radikala kod strukturno homolognih flavona i flavanona povećava se linearno za flavone, odnosno teži zasićenju za flavanone ovisno o ukupnom broju hidroksilnih skupina (Cao i sur., 1997.). Povećanju inhibicije peroksidacije lipida pridonosi postojanje hidroksilnih grupa u položajima 3'- i 4'- (kateholna struktura) u prstenu B (Mora i sur., 1990.; Dugas i sur., 2000.). Takav je raspored je osobina najjačih hvatača radikala. Pretpostavka da su flavanoli jači hvatači slobodnih radikala nego flavoni može se pripisati većem broju hidroksilnih skupina i hidroksilnoj skupini u položaju 3- (Van Acker i sur., 1996.; Rice-Evans i sur., 1996.). Premda se u obzir moraju uzeti i drugi strukturni elementi, sposobnost hvatanja slobodnih radikala flavonoidima je povećana kada su prisutna oba elementa (Kazazić, 2004.).

Među polifenolima prisutnim u aroniji, kvercetin posjeduje mnoge gore navedene strukturne karakteristike koje ga čine jakim antioksidansom, a slijede ga cijanidin glikozidi i klorogenska kiselina (Denev i sur., 2012.). Zheng i Wang (2003.) su procijenili da antocijani, flavonoli i hidroksicimetne kiseline doprinose oko 59,4 % od ukupne antioksidacijske aktivnosti aronije, bez uzimanja u obzir moguće sinergije/antagonizma između pojedinih antioksidanasa. To znači da se gotovo 40 % antioksidacijske aktivnosti aronije može pripisati proantocijanima (Denev i sur., 2012.).

Antioksidacijska aktivnost aronije može se odrediti različitim *in vitro* metodama kao što su DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i TEAC (Trolox-ekvivalent antioksidacijski kapacitet) metoda,

te ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) i FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) (Sochor i sur., 2010.). *In vitro* istraživanja pokazuju povećanje antioksidacijske zaštite i smanjenje aktivnosti reaktivnih oksidanasa nakon inkubacije s bioaktivnim komponentama iz aronije (Rop i sur., 2010.; Malinowska i sur., 2012.). U nekoliko istraživanja pronađena je dobra korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidacijske aktivnosti uzoraka aronije određene ORAC, TEAC i TRAP metodama (Wu i sur., 2004.; Jakobek i sur., 2007.; Denev i sur., 2010.). U svim slučajevima ta se korelacija pokazala boljom od korelacije sadržaja antocijana i antioksidacijske aktivnosti. Time je dokazano da na antioksidacijsku aktivnost aronije utječu svi prisutni polifenolni spojevi, a ne samo dominantni antocijani.

Oszmianski i Wojdylo (2005.) su odredili antioksidacijsku aktivnost *Aronia melanocarpa* bobica i njihovih proizvoda kao što su sok i prešavina ostla nakon cijedenja soka. Rezultati su pokazali da prešavina ima veću antioksidacijsku aktivnost od soka i bobica. Dominantni polifenoli u prešavini su bili polimerni proantocijani i epikatehin. Udio fenolnih kiselina (klorogenske i neoklorogenske) je bio veći u soku.

Visoka antioksidacijska aktivnost sušenih bobica aronije, s flavonoidima kao dominantnim polifenolima, zabilježena je u istraživanju Tolić i sur. (2015.), slijedi ih čajna mješavina (osušeni i samljeveni ostatak od proizvodnje soka) i prah. Za sokove su utvrđene nešto niže vrijednosti vjerojatno kao posljedica utjecaja pasterizacije i temperature skladištenja (Tolić i sur., 2015.).

Antioksidacijska aktivnost, slično kao i sadržaj polifenola, također ovisi o sorti. Pronađeno je da hibrid *Aronia prunifolia* ima najveću antioksidacijsku aktivnost i bogatija je polifenolima (procijanidinima i antocijanima) u usporedbi s *Aronia melanocarpa* kultivarima Viking i Aron (Rugina i sur., 2012.).

In vivo istraživanja utjecaja bioaktivnih spojeva iz aronije su ograničena. Na modelu s životinjama uočeno je smanjenje lipidne peroksidacije djelovanjem antocijana iz aronije (Kowalczyk i sur., 2004.). Mehanizam *in vivo* antioksidacijske aktivnosti polifenola vjerojatno uključuje suzbijanje nastanka reaktivnih spojeva s kisikom i dušikom, inhibiciju prooksidanasa i obnovu antioksidacijskih enzima (Jurikova i sur., 2017.).

2.6. AROMA

Aroma je karakteristično svojstvo hrane. Ukupna aroma hrane je rezultat interakcije svih spojeva od kojih je određena hrana sastavljena. Aromatični spojevi su spojevi različitog kemijskog sastava: alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, kiseline, laktani, eterična ulja, terpeni i različiti heterociklični spojevi (El Hadi i sur., 2013.).

2.6.1. Tvari arome voća

Aroma je također jedno od značajnih karakteristika voća, a aromatični hlapivi spojevi imaju glavnu ulogu u određivanju percepcije i prihvatljivosti voća od strane potrošača. Upravo stoga je i identifikacija najznačajnijih hlapivih aromatičnih spojeva koji su nosioci karakteristične arome pojedinog voća vrlo značajna i daje uvid u tzv. „senzorski identitet voća“ (Cheong i sur., 2010.).

Svako voće ima karakterističnu aromu koja je rezultat jedinstvene kombinacije velikog broja spojeva kao što su alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni, esteri i dr., koji se nalaze u različitim koncentracijama i različitim međusobnim odnosima, ukazujući na kompleksnost sastava arome. Kemijski gledano, aroma voća rezultat je prisutnosti hlapljivih spojeva odgovornih za miris i nehlapljivih spojeva koji više utječu na okusni doživljaj voća pa se stoga pod samim pojmom arome voća podrazumijeva objedinjeni doživljaj mirisnih i okusnih sastojaka voća (Pozderović, 1984.). Biosinteza arome voća je vrlo kompleksan proces zbog velikog broja različitih spojeva arome. Nekoliko je biokemijskih puteva kojima nastaju hlapivi aromatični spojevi u voću: biosinteza lipida, aminokiselina, terpenoida i karotenoida. Kada su jednom stvoreni osnovni kosturi preko nekog od tih puteva, oni se daje modificiraju u različitim reakcijama kao što su aciliranje, metiliranje, oksidacija/redukcija i ciklizacija (El Hadi i sur., 2013.). Također, mnogi čimbenici utječu na sam sastav spojeva arome kao što su genski sastav, stupanj zrelosti, okolišni uvjeti, postupanje s voćem tijekom i nakon branja i skladištenja (Sanz i sur., 1997.; Ochmian i sur., 2012.). Tvorba aromatičnih spojeva je dinamičan proces koji započinje s fazom dozrijevanja, da bi se karakteristična aroma razvila tek po završetku faze zrenja. Tijekom tvorbe aromatičnih spojeva odvijaju se metaboličke promjene katabolizma te aromatični spojevi nastaju iz određenih biljnih sastojaka i prekursora preko različitih biokemijskih putova pri čemu pojedini enzimi ili skupine enzima također imaju važnu ulogu (Perez i sur., 1992.). Mnogi od tih aromatičnih spojeva su prisutni u voću samo u tragovima, te se nalaze ispod praga kvantifikacije većine analitičkih uređaja, ali su zato značajni u ljudskoj olfaktornoj percepciji (Goff i Klee, 2006.). Postoji razlika u sastavu arome prilikom analize cjelovitog voćnog tkiva i tkiva koje je dezintegrirano (Bruckner, 2008.). Neki aromatični spojevi se oslobađaju tek nakon razaranja stanične strukture voća (Buttery, 1993.). Također, neki se nalaze vezani na različite šećere u obliku glikozida. Najčešće se radi o *O*- β -*D*-glukozidima i *O*-diglikozidima (Sarry i Gunata, 2004.). Ti aromatični aglikoni se mogu osloboditi tijekom dozrijevanja, procesiranja i skladištenja, ili pod utjecajem enzima, kiselina i topline (Reineccius, 2006.).

2.6.2. Aroma aronije

Plodovi aronije posjeduju tipičnu, no ne i vrlo ugodnu aromu. Unatoč visokom sadržaju antioksidanasa zbog gorko-bademastog mirisa i oporog okusa plodovi aronije se rijetko koriste u svježem obliku i obično se procesiraju u različite proizvode kao što su sokovi, džemovi, vino i gazirana pića (Kulling i Rawel, 2008.; Balcerek, 2010.). Amigdalín, cijanogeni glikozid izoliran iz bobica aronije je odgovoran za gorko-bademast miris svježih bobica. Njegovom hidrolizom, uz pomoć topline ili endogenih enzima prisutnih u bobicama, može se osloboditi cijanovodik koji je vrlo otrovan (Kulling i Rawel, 2008.). Aronija sadrži manje količine amigdalina, pronađeno je 20,1 mg/100 g FW u bobicama i 5,7 mg/100 g u soku (Ara, 2002.).

Do sada je objavljeno vrlo malo radova koji pokrivaju područje arome aronije (Hirvi i Honkanen, 1985.; Dolezal i sur., 2003.; Kraujalyte i sur., 2013.; Balcerek, 2010.; Butorova i sur., 2016.).

Hirvi i Honkanen (1985.) su pronašli 48 različitih aromatičnih spojeva u soku od aronije dobivenom prešanjem. Hlapive aromatične spojeve identificirali su pomoću plinske kromatografije s masenim detektorom (GC-MS). Glavni izolirani spojevi su benzaldehid, cijanohidrin, cijanovodična kiselina i benzaldehid, te serija različitih derivata benzena kao što su benzil alkohol, 2-feniletanol, fenilacetaldehid, salicilaldehid, acetofenon, 2-hidroksiacetofenon, 4-metoksiacetofenon, fenol, 2-metoksifenol i metilbenzoat. Pronađeni benzaldehidni derivati su najvjerojatnije produkti hidrolize cijanogenih prekursora (amigdalín) (Hirvi i Honkanen, 1985.).

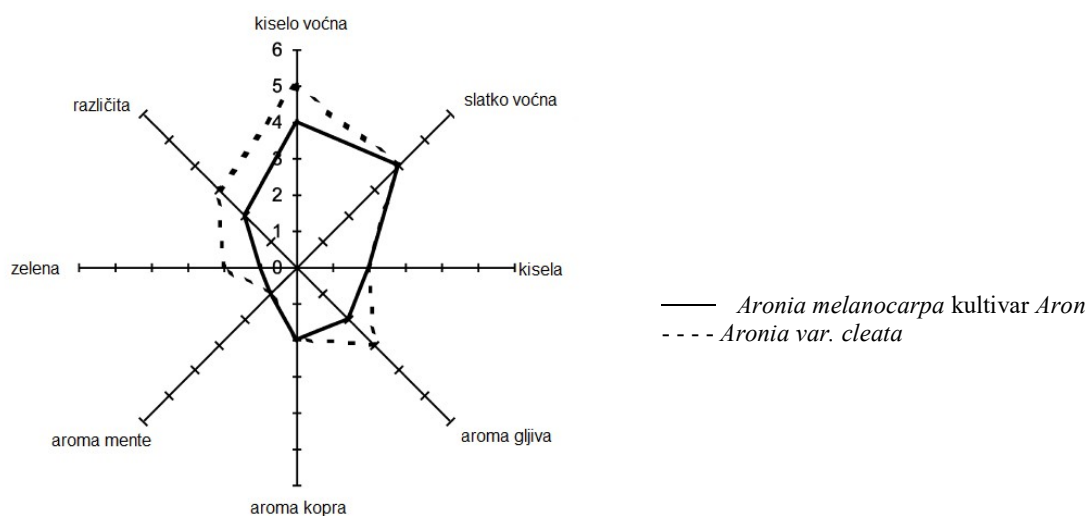
Dolezal i suradnici (2003.) su identificirali 17 sastojaka arome aronije. Najdominantniji su bili razgradni produkti cijanogenih prekursora i aromatskih aminokiselina (benzalaldehid, benzil alkohol i benzil esteri).

Kraujalyte i suradnici (2013.) su identificirali 74 različitih aromatičnih spojeva u aroniji koristeći se dvjema različitim tehnikama izolacije (simultana destilacija-ekstrakcija (SDE) i mikroekstrakcija na čvrstoj podlozi (SPME)). Od toga 49 hlapivih spojeva pripadalo je skupini alkohola, aldehida, ketona, estera, terpenoida i kiselina. Većina tih izoliranih spojeva su produkti enzimske degradacije masnih kiselina (ravnolančani alkoholi: 1-butanol, 1-penten-3-ol, 2-pentanol, 1-pentanol, 3-heksanol, 2-heksanol, 1-heksanol, 2-heptanol i 1-okten-3-ol; aldehidi: heksanal, heptanal, oktanal, nonanal; ketoni: butan-2,3-dion, 2-butanon, 2-pentanon, acetoin, 3-penten-2-on i 2-heptanon; te esteri: etil acetat, etil propanoat, metil heksanoat, etil heksanoat, heksil acetat i etil dekanat). Pretpostavlja se da su većina ostalih izoliranih aromatičnih spojeva produkti razgradnje aminokiselina (benzalaldehid, metil benzoat i etil benzoat, te esteri razgranatih masnih kiselina etil-2-metil butanoat i etil-3-metil butanoat i esteri razgranatih aldehida 2-metil-1-butanal, 3-metil-1-butanal i razgranatih alkohola 3-metil-1-butanol). Identificirani terpenoidi su oksidirani monoterpeni (1,8-cineol, mentol, terpinen-4-ol),

ciklički monoterpeni (α -felandren, β -felandren, α -terpinen i 3,9-epoksi-p-ment-1-en). Biljni terpenoidi se sintetiziraju iz dvije početne jedinice izoprenoida preko dva puta uz prisutnost terpen sintetaze. Metileritrol-fosfatni put odgovoran je za nastanak monoterpena, diterpena i karotenoida. Nepravilni terpeni (6-metil-5-hepten-2-ol i β -damascenon) pronađeni u soku od aronije su najvjerojatnije nastali kao derivati karotenoida pod utjecajem enzima (Kraujalyte i sur., 2013.).

U svojoj studiji Kraujalyte i suradnici (2013.) su također odredili aromatične spojeve u soku od aronije koji najviše pridonose senzorskom doživljaju pomoću plinske kromatografije s plameno ionizirajućim detektorom i plinskom kromatografijom-olfaktometrijom. Analiza učestalosti detekcije (DFA) je otkrila 22 spoja, od kojih je njih 15 identificirano pomoću retencijskog indeksa, plinske kromatografije s masenim detektorom i autentičnih referentnih spojeva. Sedam od njih su esteri, četiri terpena, dva alkohola i dva aldehida (**Slika 18, Tablica 5**).

Aromatični spojevi su najčešće opisivani kao voćni, najviše je identificirano estera (Kraujalyte i sur., 2013.) koji su tipični nositelji voćne arome i arome bobica (Forney i sur., 2000.). Na tipičnu aromu aronije, opisanu kao bademasta, voćna, kisela i/ili zelena, najviše utječu prisutni aldehidi, alkoholi i terpenoidi (Kraujalyte i sur., 2013.).



Slika 18 Relativna distribucija arome prema GC-O (plinska kromatografija-olfaktometrija) opisu sudionika (Kraujalyte i sur., 2013.).

Tablica 5 Spojevi arome soka od aronije identificirani plinskom kromatografijom s plameno ionizirajućim detektorom i plinskom kromatografijom-olfaktometrijom pomoću analize učestalosti detekcije (Kraujalyte i sur., 2013.).

Opis mirisa	Spoj
Opor	1-penten-3-ol
Voćni, bobice	Etil propanoat
Voćni, bobice	Neidentificiran
Voćni	Neidentificiran
Kiseo voćni, jabuka	Etil butanoat
Voćni	Etil-2-metil butanoat
Voćni, bobice	Etil-3-metil butanoat
Užegao	Heptanal
Morski plodovi	Neidentificiran
Gljive	1-okten-3-ol
Gljive	6-metil-5-hepten-2-on
Voćni, bobice	Etil heksanoat
Menta	1,8-cineol
Gljive, plijesan, zaudarajući	Neidentificiran
Zeleni, pelargonijum	Nonanal
Zaudarajući, jako sladak	Neidentificiran
Voćni, bonbon	Etil benzoat
Zeleni	Neidentificiran
Kopar	3,9-epoksi-p-ment-1-en
Voćni	Neidentificiran
Kim, kopar	Karvon
Voćni, bobice, sladak	Etil dekanat

Butorova i suradnici (2016.) su identificirali 39 hlapivih sastojaka arome aronije kod dva različita kultivara *Aronia melanocarpa* (Nero i Viking). To su 8 aldehida (benzaldehyd, etanal, heksanal, nonanal, oktanal, pentanal, propanal i trans-2-heksenal), 19 alkohola (2-metilbutanol, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol, butanol, 2-butanol, cis-3-heksenol, etanol, 2-heptanol, heksanol, metanol, 2-nonanol, oktanol, 2-oktanol, pentanol, 2-pentanol, fenilmetanol, propanol, 2-propanol i trans-3-heksenol), 6 estera (etil butanoat, etil dekanat, etil etanoat, etil heksanoat, etil pentanoat i metil etanoat), 3 ketona (heptan-2-on, pentan-2-on i propan-2-on), 2 kiseline (oktena i heksanska kiselina) i 1 terpen (limonen). Razlika u

aromatskom profilu između pojedinih istraživanja može se pripisati razlikama koje proizlaze od različitih kultivara, klimatskim i geografskim razlikama kod samog uzgoja, kao i postupaka s plodovima nakon berbe i tijekom skladištenja (Butorova i sur., 2016.). Veći udio alkohola pronađen u istraživanju Butorova i sur. (2016.) može biti rezultat početne faze fermentacijskog procesa u plodovima aronije (Zhao, 2007.).

2.7. KROMATOGRFSKE TEHNIKE

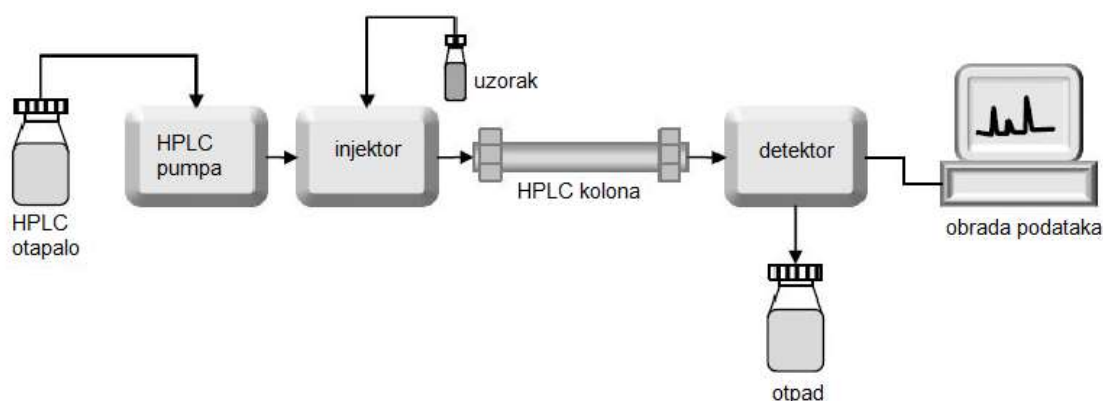
Kromatografija je skupni naziv za grupu fizikalnih laboratorijskih tehnika za razdvajanje smjese. Ona je jedna od vodećih analitičkih metoda i omogućava razdvajanje i kvantitativno određivanje tvari veoma slične strukture i kemijskih osobina. Svim kromatografskim postupcima zajedničko je postojanje stacionarne (nepokretne) faze koja može biti čvrsta tvar ili tekućina i mobilne (pokretne) faze koja može biti plin ili tekućina. Kromatografija se temelji na pojavama adsorpcije, razdjeljenja, ionske izmjene ili isključenja koje omogućuju odjeljivanje sastojaka iz smjese. Uzorak otopljen u pokretnoj fazi koja je tekućina, plin ili superkritični fluid kreće se preko nepokretne faze koja može biti u koloni ili na plohi. Kromatografske metode koriste se za odjeljivanja u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, ali i u preparativne svrhe. (Skoog, 1999.; Luterotti, 2014.).

2.7.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Mobilna faza kod tekućinske kromatografije je tekućina i ona nosi sastojke uzorka kroz stacionarnu fazu koja se nalazi u koloni. Odjeljivanje sastojaka uzorka u koloni temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu. Postoji nekoliko vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, kromatografija ionske izmjene, kromatografija na gelu itd. Razdjelna kromatografija, koja se od svih postupaka tekućinske kromatografije najviše primjenjuje, uobičajeno se dijeli na kromatografiju u sustavu tekućina-tekućina i na kromatografiju u sustavu vezane faze. Te dvije vrste kromatografija razlikuju se po načinu na koji je stacionarna faza vezana na punilu. Kod razdjelne kromatografije, stacionarna faza u koloni je najčešće silikagel na koji su vezane različite organske grupe. Ovisno o relativnoj polarnosti stacionarne i mobilne faze razlikuju se dvije vrste razdjelne kromatografije: normalna kromatografija i reverzna kromatografija. Kod normalne kromatografije stacionarna faza je vrlo polarna (trietilenglikol ili voda), a mobilna nepolarna (heksan ili propil eter). Kod reverzne kromatografije stacionarna faza je nepolarna (uglikovodici), a mobilna faza je polarno otapalo poput vode, metanola, acetonitrila. Polarna mobilna faza nosi sastojke uzorka preko nepolarne stacionarne faze koja se nalazi u koloni te, onaj sastojak uzorka koji je najpolarniji, izlazi prvi jer najmanje reagira s nepolarnom stacionarnom fazom (Jakobek, 2007.; Skoog i sur., 1999.).

Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (**Slika 19**) sastoji se od jednog ili više spremnika u kojima se nalazi tekuća mobilna faza, ventila za doziranje uzorka, crpke koja pumpa mobilnu fazu kroz sustav, detektora, kolone u kojoj se nalazi stacionarna faza i kompjuterskog sustava koji prikuplja podatke i prikazuje razdvojene komponente iz uzorka u obliku kromatograma (Jakobek, 2007.).

U tekućinskoj kromatografiji najčešće se upotrebljavaju detektori koji se temelje na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja (UV/Vis detektori), detektori koji snimaju cijeli spektar apsorpcije neke komponente (PDA detektori), detektori masene spektrometrije (MS), detektori koji mjere indeks loma komponente (RI detektori) i elektrokemijski detektori (EC) (Skoog i sur., 1999.).



Slika 19 Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) (Giri, 2015.).

2.7.1.1 Određivanje polifenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Od svih kromatografskih tehnika tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi polifenola. Za analizu više skupina polifenolnih spojeva istodobno najčešće se upotrebljava reverzno-fazna tekućinska kromatografija (RP-HPLC). Izbor kolone koja će se upotrijebiti za analizu flavonoida i fenolnih kiselina ovisi o grupi flavonoida koji se žele razdvojiti i o karakteristikama stacionarne faze koja je sposobna omogućiti zadovoljavajuću retenciju, selektivnost i oblik pika (Jakobek, 2007.). Osim odabira kolone, vrlo je važan i odabir pokretnih faza i načina eluiranja. Način eluiranja najčešće je gradijentan uz uporabu dvaju sustava otapala, jednog polarnog kao što je vodena otopina octene, perklorne, fosforne ili mravlje kiseline te drugog manje polarnog otapala, najčešće zakiseljenog metanola ili acetonitrila. U primjeni su također i sustavi s tri i četiri otapala koji ponekad mogu sadržavati soli (Rastija i Medić-Šarić, 2009.). Identifikacija razdvojenih flavonoida se najčešće provodi uspoređujući retencijska vremena s retencijskim vremenima standarda, te analiziranjem karakteristika

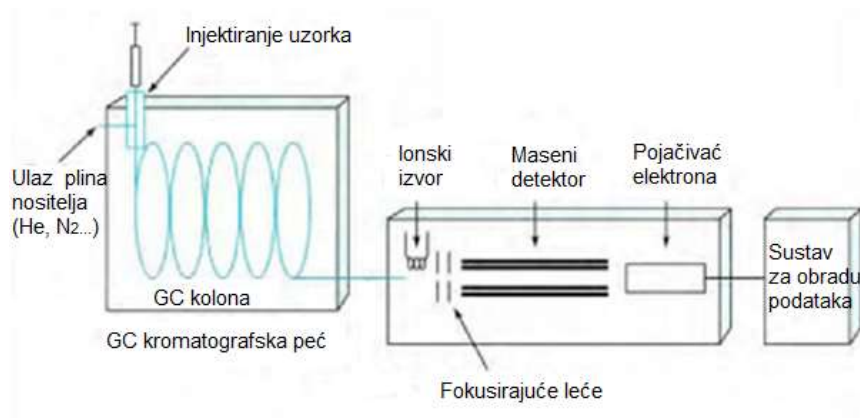
razdvojenih flavonoida koje je skupio detektor. Detektori koji se najčešće upotrebljavaju u analizi polifenola su UV/Vis ili PDA detektor (Jakobek, 2007.; Rice-Evans i Packer, 2003.).

2.7.2. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija koristi se za odvajanje, kvantitativnu analizu i izolaciju komponenata smjese, za utvrđivanje čistoće tvari te pomoć pri identifikaciji. U plinskoj kromatografiji inertni plin nositelj (mobilna faza) eluira sastojke smjese iz kolone ispunjene stacionarnom fazom. Pri ulasku smjese komponenti u kolonu, ona se trenutno razdjeljuje između stacionarne i mobilne faze. Razdvajanje smjese hlapljivih sastojaka odvija se naizmjenično adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapljivih sastojaka pod djelovanjem plina nositelja koji odnosi komponente kroz kolonu (Skoog i sur., 1999.).

S obzirom na nepokretnu fazu plinsku kromatografiju dijelimo na plinsku adsorpcijsku (engl. Gas-Solid Chromatography, GSC) i plinsko-razdjelnu kromatografiju (engl. Gas-Liquid Chromatography, GLC). Kod plinsko-adsorpcijske kromatografije stacionarna faza je adsorbens (silikagel, aluminijev oksid, dijatomejske zemlje), koje na sebe specifično veže komponente smjese. Nepokretna faza kod plinsko-razdjelne kromatografije je tekućina nanosena na kruti nosač (silikonska ulja, tekući ugljikovodici velike molekulske mase, esteri i alkoholi visokog vrelišta). Zbog razlike u topljivosti komponente smjese u stacionarnoj fazi, dolazi do njihova odvajanja. Plinskom kromatografijom može se postići kvalitativna i kvantitativna analiza smjese uz bolje razlučivanje i u kraćem vremenu nego većinom danas uvedenih analitičkih postupaka (Skoog i sur., 1999.; Luterotti, 2014.).

Plinsko kromatografski sustavi razlikuju se po tipu plina nosača, sustavu injektiranja, kolonama i detektorima. Na **Slici 20** dan je shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim detektorom (GCMS).



Slika 20 Shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim detektorom (Yusof i sur., 2015.).

2.7.3. Masena spektrometrija

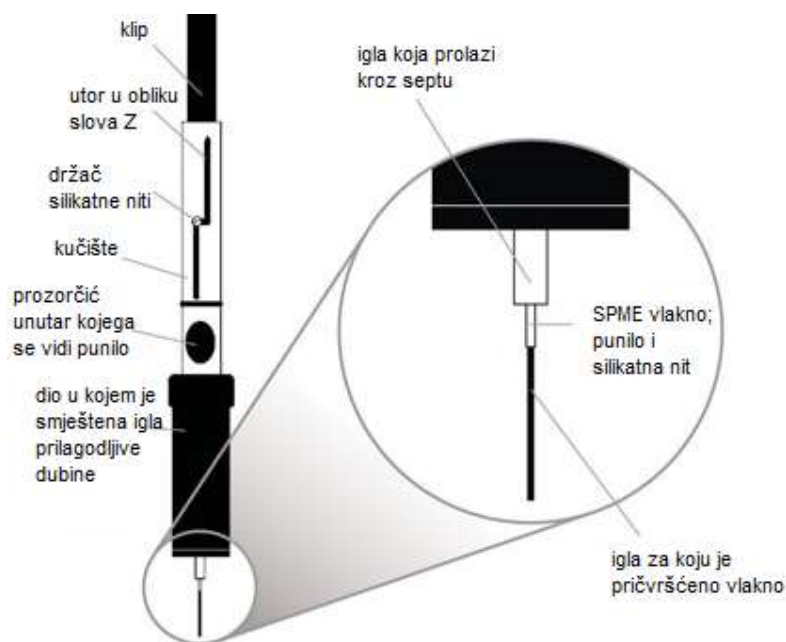
Spektrometrija masa ili masena spektrometrija (engl. mass spectrometry – MS) je analitička metoda kojom se analiziraju molekule na osnovi razlike u omjeru njihove mase i naboja (m/z). Molekule uzorka se najprije ioniziraju u ionizatoru, potom se ubrzavaju u električnom polju i uvode u odabirač brzine koji se sastoji od električnog i magnetnog polja. Analiza iona na osnovi masene razlike pruža informacije o tipu i rasporedu iona analiziranog uzorka, a za pretragu je dovoljna vrlo mala količina uzorka, svega 10^{-12} g. Stoga se ova metoda koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama. Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionizator, analizator masa i ionski detector (Dass, 2007.).

U spektrometru masa analizirani uzorak se uvodi u izvor iona u tekućem ili plinskom stanju, gdje se fragmentira i ionizira. Nastali ioni potom prvo putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema njihovim omjerima m/z , a potom odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa (Dass, 2007.; Higson, 2004.). Spektar masa predstavlja dijagram koji prikazuje relativne intenzitete signala za različite vrijednosti odnosa m/z i karakterističan je za određeni spoj. S obzirom na to da svaki kemijski spoj daje karakterističan maseni spektar koji služi za njegovu identifikaciju, kod analize smjese s više komponenti svaka od njih će dati svoj spektar, a ukupni spektar smjese bit će rezultat linearnog zbrajanja komponenata (Young i sur., 1996.).

2.7.3.1 Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

Metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. solid phase microextraction, SPME) je jedna od novijih metoda izolacije i ekstrakcije koja je razvijena kako bi se uklonili nedostaci ekstrakcije tekućina-tekućina i ekstrakcije na čvrstoj fazi (Pawliszyn, 2009.).

Rutinski se upotrebljava zajedno s plinskom kromatografijom s masenim detektorom (GC-MS) za analizu različitih spojeva, posebno za ekstrakciju hlapivih organskih spojeva iz različitih bioloških i prehrambenih uzoraka (Vas i Vekey, 2004.). Primjenom SPME tehnike kombinira se ekstrakcija i koncentriranje te je omogućen i direktan prijelaz adsorbiranih sastojaka u injektor plinskog kromatografa, a na taj način se sprječava ulaz kisika i vlage u kolonu plinskog kromatografa. Ovom tehnikom omogućeno je i koncentriranje sastojaka prisutnih u tragovima unutar sloja punila koje ima mali volumen, ali veliki koeficijent raspodjele sastojaka između punila i uzorka za velik broj organskih spojeva. SPME aparatura (**Slika 21**) sastoji se od kućišta unutar kojeg se nalazi igla. Adsorpcija sastojaka odvija se unutar igle na polimernoj stacionarnoj fazi prevučenoj preko silikatne niti dužine 1 cm. Igla štiti punilo tijekom uporabe i čuvanja, posebice prilikom prolaza kroz septum injektora plinskog kromatografa (Pichler, 2011.).



Slika 21 Shematski prikaz aparature za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (Pawliszyn, 2009.).

Punila koja se najčešće upotrebljavaju su sa slojem polidimetilsiloksana (PDMS), sa slojem poliakrilata (PA), kao i različite kombinacije PDMS/Carboxen, PDMS/DVB, Carbowax/divinilbenzen i dr. Napolarna punila s polidimetilsiloksanom (PDMS) vrlo su djelotvorna za molekule male i srednje molekulske težine, neovisno jesu li polarne ili nepolarne te se stoga najčešće upotrebljavaju (Vas i Vekey, 2004.).

Povećanjem koncentracije soli mijenja se osjetljivost SPME tehnike. Kod većine sastojaka adsorpcija se povećava s povećanjem koncentracije soli (etil-butanoat, benzaldehid, linalool, neral), dok se kod nekih (limonen) smanjuje povećanjem koncentracije soli (Pichler, 2011.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Ciljevi istraživanja ove disertacije bili su:

- Utvrditi mogućnost primjene membranskih procesa (nanofiltracije i reverzne osmoze) u svrhu koncentriranja voćnog soka od aronije,
- Ispitati utjecaj različitih procesnih parametara (tlak, temperatura) na protok permeata tijekom koncentriranja soka od aronije do zadane ukupne topljive suhe tvari određene refraktometrijski,
- Određivanje kemijskih svojstava osnovnog soka od aronije i koncentrata dobivenih membranskim procesima, odnosno utvrđivanje promjena na sastojcima kao što su šećeri, kiseline, antocijani, flavonoidi i antioksidansi,
- Određivanje aromatskog profila osnovnog soka od aronije i dobivenih koncentrata i utvrđivanje zadržavanja pojedinih skupina aromatskih spojeva u koncentratima u odnosu na početni sok od aronije i
- Određivanje polifenolnog profila osnovnog soka od aronije i dobivenih koncentrata i utvrđivanje zadržavanja pojedinih ispitivanih polifenolnih spojeva, karakterističnih za aroniju, u koncentratima u odnosu na početni sok od aronije.

U svrhu uspješne realizacije postavljenih ciljeva provedene su sljedeće aktivnosti:

1. Priprema sirovine i provedba postupka membranskog koncentriranja

- Osnovni sok od aronije dobiven je prešanjem i pasterizacijom i kao takav upotrebljen u svim pokusima,
- Osnovnom soku od aronije je određen osnovni kemijski sastav, aromatski i polifenolni profil,
- Koncentriranje membranskim procesima (reverzna osmoza i nanofiltracija) je provedeno na laboratorijskom uređaju za membransku filtraciju LabUnit M20 (De Danske Sukkerfabrikker, Nakskov, Danska), te su upotrebljene sljedeće membrane: Alfa Laval NF (DSS, A Tetra Pak, Silkeborg, Danska) i Alfa Laval RO98pHt (DSS, A Tetra Pak, Silkeborg, Danska) i
- Dobiveni koncentрати su pohranjeni u staklene boce sa zatvaračem i skladišteni kraće vrijeme na hladnom (4 °C) i tamnom mjestu do provedbe kemijske analize i određivanja aromatskog i polifenolnog profila.

2. Određivanje kemijskih svojstava

- Određivanje ukupne topljive tvari refraktometrijski (Carl Zeis Jena, Jena, Njemačka),
- Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem u vakuumu (Kambič VS 50S, Slovenija),
- Određivanje kiselina (titrimetrijski),
- Određivanje pH vrijednosti (Mettler Toledo MP 225, UK),

- Određivanje šećera po Luff-Schoorl-u,
- Određivanje ukupnih polifenola Folin – Ciocalteuovom metodom (Ough i Amerine, 1988.),
- Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom (Shimada i sur., 1992.),
- Određivanje sadržaja antocijana primjenom pH diferencijalne metode (Gusti i Wrolstad, 2001.) i
- Određivanje ukupnih flavonoida (Zhishen i sur., 1999.),

3. Određivanje arome

- Određivanje spojeva arome tehnikom SPME na plinskom kromatografu s masenim spektrometrom (Kraujalyte i sur., 2013.) uz određene izmjene.

4. Određivanje polifenolnih spojeva

- Određivanje polifenolnih spojeva karakterističnih za aroniju pomoću HPLC (Jakobek i sur., 2012.b)
 - antocijana (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid),
 - fenolnih kiselina (klorogenska i neoklorogenska kiselina) i
 - flavonola (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin).

Dobiveni rezultati prikazani su grafički i tablično, a odgovarajuća statistička obrada podataka napravljena je uz primjenu programa Statistica 12 (StatSoft) i Microsoft Office Excel 2013.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovina

Sirovina upotrebljena u ovom istraživanju je matični voćni sok od aronije dobiven postupkom prešanja. Plodovi aronije (sorta Nero) uzgojeni su na području Virovitičko-podravske županije. Berba plodova u stanju konzumne zrelosti je provedena tijekom kolovoza 2014. godine. Odmah nakon berbe plodovi su prevezeni u tvornicu za proizvodnju sokova od voća i povrća (Eko Vrelo d.o.o., Beli Manastir) gdje je prešanjem dobiven sok od aronije. Isprešani sok je podvrgnut pasterizaciji (85 °C, 10 minuta) i napunjen u staklene boce koje su potom čuvane na hladnom (4 °C) i tamnom mjestu do provedbe pokusa. Tako dobiven osnovni sok od aronije sadržavao je 13 % TSSC, dok je pH bio 3,62.

3.2.2. Kemikalije

- Kalijev klorid, klorovodična kiselina, sumporna kiselina, natrijev tiosulfat, natrijev bisulfit, Folin-Ciocalteu, natrijev hidroksid, natrijev klorid, askorbinska kiselina, natrijev karbonat, kalcijev karbonat, bakrov sulfat penta hidrat, kalijev tiocijanat, kalijev jodid,

kalijev ferocijanid, cinkov acetat, natrijev nitrit, natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Croatia),

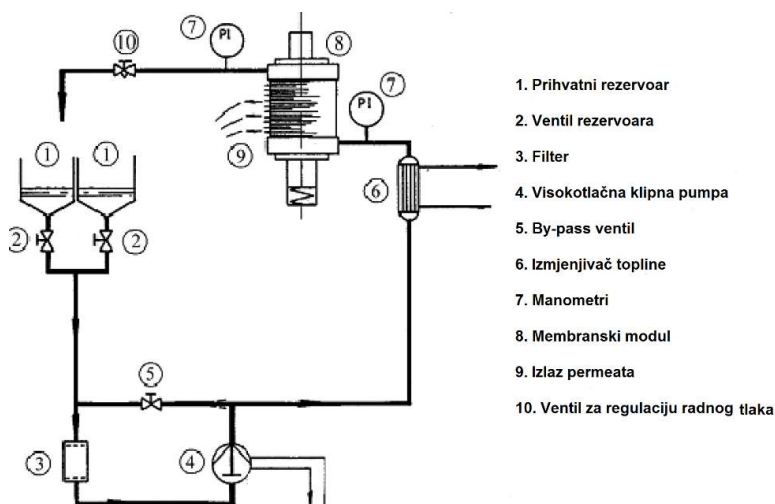
- (+) katehin, rutin hidrat (kvercetin-3-rutinozid hidrat), kvercetin dihidrat, klorogenska kiselina (3-O-kafeoil kininska kiselina), Trolox (($\pm$)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), DPPH $\cdot$ radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal), galna kiselina (monohidrat), aluminijski klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
- Cijanidin-3-O-galaktozid klorid i cijanidin-3-O-glukozid klorid (kuromanin chloride) (Extrasynthese, Genay, Francuska) i
- Metanol (HPLC čistoće) (Merck, Darmstadt, Njemačka).

3.3. METODE

3.3.1. Koncentriranje membranskim procesima

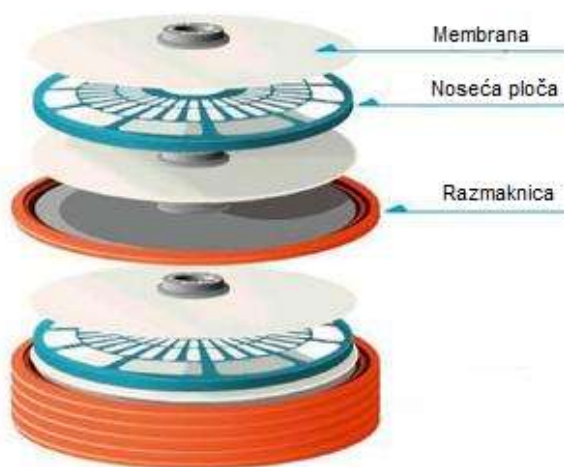
Koncentriranje soka od aronije membranskim procesima (reverzna osmoza i nanofiltracija) provedeno je pomoću laboratorijskog uređaja za membransku filtraciju LabUnit M20 (DowDanmark Separation Systemy De Danske Sukkerfabrikker, Copenhagen, Danska) s pločastim membranskim modulom.

Uređaj se sastoji od sljedećih dijelova: pločasti modul, centralni vijak, gornja i donja prirubnica, hidraulična pumpa, visokotlačna klipna pumpa (Rannie 16.50), izmjenjivač topline, by-pass ventil, dva prihvatna rezervoara s pripadajućim ventilima, ventil za regulaciju radnog tlaka, dva manometra (na ulazu u modul i na izlazu iz modula), filter na ulazu u klipnu pumpu (**Slika 22**).



Slika 22 Laboratorijski uređaj za membransku filtraciju LabUnit M20.

Pločasti modul se sastoji od razmaknica, nosećih ploča i membrana (**Slika 23**). Razmaknice omogućavaju raspodjelu protoka otopine preko cijele površine membrane, a svaki kanal razmaknice je izveden tako da se svede na minimum pojava graničnog sloja na površini membrane. Noseće ploče imaju veliki broj malih žljebova koji su specijalno izvedeni kako bi se onemogućilo njihovo začepeljivanje tijekom rada uređaja. Njihova svrha je prikupljanje permeata s dvije membrane i njegovo odvođenje pomoću silikonske cjevčice do posude za sakupljanje permeata. Kompresija i dekompresija modula prilikom montiranja modula ili zamjene oštećenih membrana se ostvaruje pomoću hidraulične pumpe. Tijekom rada membranskog uređaja kompresivni tlak bi trebao biti između 100 - 200 kN. Visokotlačna klipna pumpa Rannie 16.50 s varijatorom za promjenu kapaciteta rada (2 - 10 L/min) služi kao dobavna pumpa. Za hlađenje klipova dobavne pumpe postoji priključak za rashladnu vodu (0,5 L/min). By-pass ventil služi za regulaciju protoka na dobavnoj pumpi, on omogućava dijelu protoka povratak na usisnu stranu što u konačnici rezultira smanjenjem brzine protoka u modul.



Slika 23 Shematski prikaz pločastog modula (razmaknica, noseća ploča s membranama...).

Ulazni tok otopine koja se filtrira prolazi kroz donji kraj priрубnice i raspoređuje se oko centralnog vijka pločastog modula. Iznad priрубnice nalazi se tzv. „sendvič“ (razmaknica, noseća ploča s membranama, razmaknica...). Izlazni tok retentata se sakuplja u gornjoj priрубnici i vodi preko manometra na izlazu iz modula do ventila za regulaciju tlaka te natrag u prihvatni rezervoar ako se radi recirkulacija.

S obzirom na varijabilni broj razmaknica, nosećih ploča i membrana moguće su različite izvedbe veličine pločastog modula. Također je izmjenom membrana i primjenom odgovarajućih manometara moguće provesti bilo koji membranski postupak (reverzna

osmoza, nanofiltracija ili ultrafiltracija). Modul se može koristiti pod tlakom do 8 MPa, pH 0 – 14 i podnosi temperature do 100 °C.

3.3.1.1 Reverzna osmoza

Koncentriranje soka od aronije postupkom reverzne osmoze provedeno je na gore opisanom laboratorijskom uređaju za membransku filtraciju upotrebom kompozitnih membrana Alfa Laval RO98pHt (DSS, A Tetra Pak, Silkeborg, Danska) na polipropilenskom nosaču. U pločasti modul uređaja postavljeno je šest membrana ukupne površine 0,1736 m² (površina jedne membrane je 0,0289 m²). Karakteristike upotrebljenih membrana su dane u **Tablici 6** (Zhou i sur., 2013.).

Tablica 6 Karakteristike membrana Alfa Laval RO98pHt.

Maksimalni radni tlak	Temperatura	Permeabilnost čiste vode	MgSO ₄ zadržavanje	NaCl zadržavanje*	pH područje
55 bara	5-60 °C	3,15 L/m ² h bar	99,39 %	97 %	2-11

*mjereno pri 2000 ppm NaCl, 16 bar, 25 °C.

Početni volumen soka od aronije (TSSC 13 %) u svim pokusima bio je 4 L, a temperatura 10 °C. Proces koncentriranja je proveden pri tri različita procesna tlaka (45, 50 i 55 bara) i dva različita temperaturna režima (s hlađenjem retentata i bez hlađenja retentata) uz recirkulaciju retentata do maksimalnog udjela topljive suhe tvari koju je bilo moguće postići uz postojeće uvjete a koja je prethodno određena preliminarnim ispitivanjem. Kod reverzne osmoze maksimalna koncentracija topljive suhe tvari bila je 24,9 %. Na kraju svakog pokusa prikupljeno je 2,12 L permeata i 1,88 L retentata, što odgovara volumnom odnosu retentata od 2,12. Pokusi s hlađenjem retentata su provedeni hlađenjem retentata preko izmjenjivača topline. Kao rashladno sredstvo korišten je propilenglikol i posebna rashladna jedinica koja je priključena na izmjenjivač topline. Tijekom procesa koncentriranja mjeren je volumen prikupljenog permeata i temperatura retentata svakih 4 minute, a udio topljive suhe tvari određivan refraktometrijski svakih 12 minuta. Nakon svakog završenog procesa koncentriranja provedeno je pranje uređaja i modula.

Dobiveni permeati i retentati su čuvani u staklenim bocama na tamnom i hladnom (4 °C) mjestu do daljnje analize. Također, koncentrati (retentati) dobiveni u pojedinim pokusima su prije daljnje analize razrijeđeni do suhe tvari početnog soka (13 %) kako bi se vidjela dinamika zadržavanja pojedinih ispitivanih sastojaka s obzirom na primijenjene procesne parametre i odabrao pokus kod kojega je zadržavanje najveće, odnosno gubitci najmanji. Permeati su analizirani nerazrijeđeni.

3.3.1.2 Nanofiltracija

Koncentriranje soka od aronije postupkom nanofiltracije provedeno je na prethodno opisanom laboratorijskom uređaju za membransku filtraciju upotrebom kompozitnih membrana Alfa Laval NF (DSS, A Tetra Pak, Silkeborg, Danska) na poliesterskom nosaču. U pločasti modul uređaja postavljeno je šest membrana ukupne površine 0,1736 m² (površina jedne membrane je 0,0289 m²). Karakteristike upotrebljenih membrana su dane u **Tablici 7** (Zhou i sur., 2013.).

Tablica 7 Karakteristike membrana Alfa Laval NF.

Maksimalni radni tlak	Temperatura	Permeabilnost čiste vode	MgSO ₄ zadržavanje*	NaCl zadržavanje	pH područje
55 bara	5-60 °C	10,08 L/m ² h bar	98 %	42,65 %	3-10

*mjereno pri 2000 ppm MgSO₄, 9 bar, 25 °C.

Sam postupak provedbe pokusa je bio isti kao i kod reverzne osmoze s tim da je maksimalni udio topljive suhe tvari kojega je bilo moguće postići bio 26,9 %. Na kraju svakog pokusa prikupljeno je 2,33 L permeata i 1,67 L retentata, što odgovara volumnom odnosu retentata od 2,39.

3.3.1.3 Obrada podataka dobivenih membranskim koncentriranjem

Na osnovi podataka dobivenih mjerenjem volumena permeata i udjela topljive suhe tvari tijekom koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom i nanofiltracijom, izračunati su sljedeći parametri (1-8):

a) Protok permeata

$$J = \frac{V_p}{A \times t} \quad (1)$$

gdje je: J – protok permeata (L/m²h¹),
 V_p – volumen permeata (L),
 A – površina membrane (m²),
 T – vrijeme istjecanja permeata (h).

b) Volumni udio permeata

$$Y = \frac{V_p}{V_0} \times 100 \quad (2)$$

gdje je: Y – volumni udio permeata (%),
 V_p – volumen permeata (L),
 V₀ – početni volumen soka (L).

c) Volumen retentata

$$V_r = V_0 - V_{pu} \quad (3)$$

gdje je: V_r – volumen retentata (L),
 V_0 – početni volumen soka (L),
 V_{pu} – ukupni volumen permeata u datom vremenu (L).

d) Volumni odnos retentata

$$F = \frac{V_0}{V_r} \quad (4)$$

gdje je: F – volumni odnos retentata,
 V_r – volumen retentata (L),
 V_0 – početni volumen soka (L).

e) Indeks koncentriranja u retentatu

$$I_{rt} = \frac{A_{rt}}{A_{fc}} \times 100 \quad (5)$$

gdje je: I_{rt} – indeks koncentriranja komponente u retentatu (%),
 A_{rt} – udio topljive suhe tvari u retentatu (%),
 A_{fc} – udio topljive suhe tvari u početnom soku (13 %).

f) Indeks koncentriranja u permeatu

$$I_{pt} = \frac{A_{pt}}{A_{fc}} \times 100 \quad (6)$$

gdje je: I_{pt} – indeks koncentriranja komponente u permeatu (%),
 A_{pt} – udio topljive suhe tvari u permeatu (%),
 A_{fc} – udio topljive suhe tvari u početnom soku (13 %).

g) Permeabilnost

$$P = \frac{c_p}{c_r} \times 100 \quad (7)$$

gdje je: P – permeabilnost (%),
 c_p – koncentracija u permeatu,

c_r – koncentracija u retentatu.

h) Retencija

$$R = \frac{c_r - c_p}{c_r} \times 100 = \left(1 - \frac{c_p}{c_r}\right) \times 100 \quad (8)$$

gdje je:

R – retencija (%)

c_p – koncentracija u permeatu,

c_r – koncentracija u retentatu.

3.3.2. Mjerenje topljive suhe tvari refraktometrom

Na prizmu refraktometra (Carl Zeiss Jena, Jena, Njemačka) nanese se nekoliko kapi soka ili koncentrata, spusti se poklopac i svjetlost se usmjeri prema prizmi. Na ljestvici s vrijednostima suhe tvari se očitava vrijednost suhe tvari u %. Refraktometrom se mjeri topljiva suha tvar na osnovi loma zrake svjetlosti na granici dviju različitih tvari (zrak/tekućina), a dana je odnosom između brzine prolaza svjetlosti kroz zrak i tekućinu (sok ili koncentrat od aronije). Temperatura uzorka treba odgovarati baždarnoj temperaturi refraktometra (20 °C).

3.3.3. Određivanje suhe tvari sušenjem u vakuumu

Za proizvode čiji se sastav mijenja dugim sušenjem, kao i za proizvode u kojima sadržaj vode iznosi najmanje 10 % određivanje ukupne suhe tvari se provodi u vakuumu.

U izvaganu posudu od aluminija odvaži se 20 g kvarcnog pijeska, suši 1 sat, ohladi i izvaži. Osušena i izvagana posuda s kvarcnim pijeskom, staklenim štapićem i uzorkom (3 g) stavi se u vakuum sušionik (Kambič VS 50S, Slovenija) (**Slika 24**) na 70 °C. Suši se pri sniženom tlaku (30 mbar) u struji zraka, protoka 10 L/h, 5 sati, bez poklopca. Nakon toga se poklopac stavi na posudu, posuda se izvadi iz sušionika, ohladi u eksikatoru (30 minuta) i nakon toga važe s točnošću 0,0002 g. Dosušivanje se radi pri istim uvjetima u trajanju od 1 sata.

Ukupna suha tvar izračunata je prema formuli (9):

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100 \quad (9)$$

gdje je:

M_0 - masa posude s pijeskom, staklenim štapićem i poklopcem (g),

M_1 - masa iste posude s uzorkom prije sušenja (g).

M_2 - iste posude s uzorkom poslije sušenja (g).



Slika 24 Vakuum sušionik (Kambič VS 50S, Slovenija).

3.3.4. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost određivana je pH metrom (Mettler Toledo MP 225, UK) tako da je uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak direktno na instrumentu očitana vrijednost pH. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

3.3.5. Određivanje kiselina (titrimetrijski)

U pokazatelje kakvoće voća ubraja se i ukupan sadržaj kiselina. Kiselost voćnih plodova čine organske kiseline kao što su limunska, jabučna itd. One se nalaze u voćnom soku kao slobodne ili u obliku soli. Ako u ispitivanom materijalu ima više kvalitativno različitih kiselina, kao npr. u voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima, rezultat se izražava kao ukupna kiselina u količini samo jedne od njih, a rezultat se u tom slučaju izražava kao ekvivalent odabrane kiseline.

U staklenu čašicu od 25 mL odpipetira se 5 mL uzorka (soka) i zagrije do vrenja kako bi izašao eventualno prisutan CO_2 . Nakon hlađenja doda se 10 mL destilirane vode i provodi titracija s 0,1 M natrijevim hidroksidom (NaOH) pomoću pH metra (Mettler Toledo MP 225, UK) do pH 8,1. Ukupan sadržaj kiselina (g/100 mL) izračunava se prema sljedećoj formuli (10):

$$\textit{kiseline} = \frac{A \times 0,067 \times 100}{5} \quad (10)$$

gdje je: A - mL 0,1 M NaOH trošenih za titraciju,
0,067 – faktor kojim se množi dobiveni rezultat s obzirom da aronija najviše sadrži jabučne kiseline.

3.3.6. Određivanje šećera po Luff-Schoorl-u

Određivanje reducirajućih šećera

U odmjernu tikvicu od 20 mL odvaži se 3 g uzorka. Sadržaju u tikvici se doda 1-2 g kalcijeva karbonata (CaCO_3) da bi se postigla slabo kisela reakcija i potom promiješa. Doda se 5 mL reagensa I i 5 mL reagensa II, promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Promiješa se još jednom da se sadržaj potpuno homogenizira. Kada se gornji sloj počne izdvajati filtrira se preko suhog, nabranog filter papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat se zove F1.

U tikvicu od 300 mL pipetom se odmjeri 25 mL Luffove otopine i doda otopina šećera koja treba sadržavati nešto manje od 100 mg šećera te toliko destilirane vode da volumen iznosi 50 mL. Radi se slijepa proba sa 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Po dodatku staklenih kuglica sadržaj se zagrijava tako da prokuha za dvije minute i da se umjereno vrenje nastavi 10 minuta. Zagrijavanje se provodi preko azbestne mrežice uz povratno hladilo. Kada je završeno zagrijavanje, sadržaj se naglo hladi pod mlazom hladne vode, a poslije dvije minute dodaje se 3 mL otopine kalijeva jodida (KI). Promiješa se brzo, i pažljivo dodaje 20 mL 25 % sumporne kiseline (H_2SO_4) i 10 mL otopine kalij tijocijanata (KCNS). Tikvica se mućka do prestanka šuma. Istaloženi jod se titrira otopinom natrijeva tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) uz dodatak škroba kao indikatora dok se ne izgubi plava boja. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja. Postotak reducirajućih šećera u uzorku se izračuna preko sljedeće formule:

$$\% \text{ reducirajućih šećera} = \frac{a \times 100}{m} \quad (11)$$

gdje je: a = mg šećera izračunati iz tablice u **Prilogu 1**,

m – masa uzorka (mg).

Određivanje ukupnih šećera

Otpipetira se 50 mL filtrata F1 u odmjernu tikvicu od 100 mL i doda 5 mL kloridne kiseline (HCl) te se sve dobro promiješa. Zatim se zagrijava 10 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C (fruktoza se raspada na višim temperaturama), brzo se hladi uz stalno miješanje, neutralizira s 20 % -tnom otopinom natrijevog hidroksida (NaOH) uz metiloranž kao indikator. Ohladi se na sobnu temperaturu i dopuni destiliranom vodom do oznake. Dobiveni filtrat je F2. Postupak dalje ide kao kod određivanja reducirajućih šećera. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja a postotak ukupnih šećera izračunat preko sljedeće formule (12):

$$\% \text{ ukupnih šećera} = \frac{a \times 100}{m} \quad (12)$$

3.3.7. Određivanje ukupnih polifenola

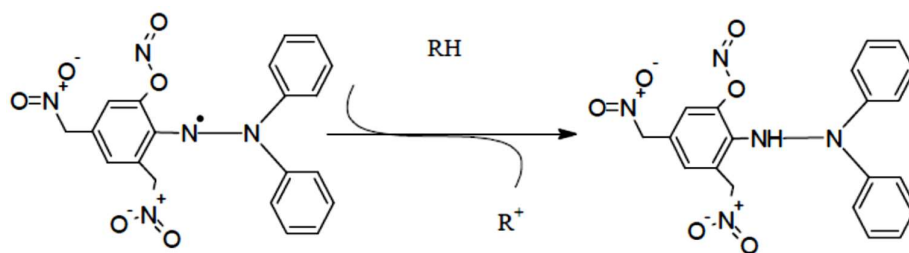
Koncentracija ukupnih fenola je određena Folin-Ciocalteu metodom (Ough i Amerine, 1988.). Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

U epruvetu se otpipetira se 200 μL uzorka (soka ili koncentrata razrijeđenog na suhu tvar početnog soka od aronije (13 %)) i 1,8 mL destilirane vode (kod permeata je pipetirano 1 mL permeata i 1 mL destilirane vode), te se doda 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa (1:10) i 8 mL otopine natrijevog karbonata (7,5 % otopina). Promućka se i ostavi stajati 2-20 sati na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija otopine se određuje spektrofotometrijski (Jenway 6300 spektrofotometar, Bibby Scientific, Stone, UK) pri 765 nm. Slijepa proba pripravi se s destiliranom vodom umjesto uzorka. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Uklanjanje ili vezanje slobodnih radikala je glavni mehanizam djelovanja antioksidanasa u hrani. Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidacijske aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće koriste 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale (Pichler, 2007.).

Metoda DPPH temelji se na redukciji slobodnih DPPH radikala antioksidansom koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona (**Slika 25**).



Slika 25 Mehanizam reakcije DPPH $\cdot$ radikala s antioksidansom (Brand-Williams i sur., 1995.).

DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra, dok u prisutnosti elektron donora - RH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani

oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 517 nm (Brand-Williams i sur., 1995.).

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom provedeno je prema metodi Shimade i suradnika (1992.). Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja. Uzme se 200 µL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje Troloxa.

3.3.9. Određivanje sadržaja antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorbancije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati.

Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001.) s malom modifikacijom. Uzeto je 200 µL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 1 mL pufera pH 1 (1,86 g KCl u 1 l destilirane vode, pH vrijednost namještena je na 1,0 s koncentriranom HCl), a u drugu 1 mL pufera pH 4,5 (54,43 g CH₃CO₂Nax3H₂O u 1 l destilirane vode, pH vrijednost podešena je na 4,5 s koncentriranom HCl). Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra (Jenway 6300, Bibby Scientific, Stone, UK) mjerena absorbanca pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm (A₅₁₂, A₇₀₀). Apsorbancija uzorka izračunata je prema sljedećoj formuli (13):

$$A = (A_{512} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{512} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad (13)$$

Količina antocijana izračunata je prema sljedećoj formuli (14):

$$ukupni\ antocijanini\ \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{A \times MW \times FR \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (14)$$

gdje je: A - apsorbancija uzorka,
MW – relativna molekularna masa cijanidin-3-glukozida (449.2 g/mol),
FR - faktor razrjeđenja,

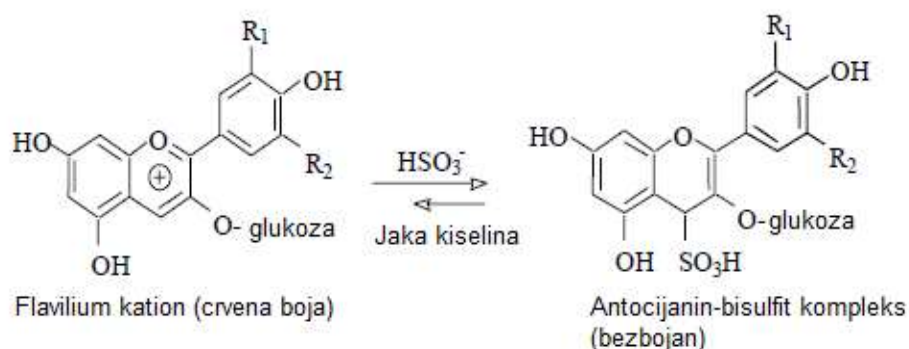
$$FR = \frac{V(ukupni)}{V(uzorka)} \quad (15)$$

ϵ – molarni ekstincijski koeficijent cijanidin-3-glukozida (26 900 L/mol cm),
 l - duljina kivete (1 cm).

Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-glukozida po litri uzorka. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

3.3.10. Određivanje polimerne boje

Degradacija antocijana može se pratiti očitanjem apsorbance u uzorcima koji su tretirani bisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 26**). Boja koja nastaje polimerizacijom antocijana odnosno nastajanjem kompleksa antocijani/tanini, je otporna na djelovanje bisulfitu. Apsorbanca uzorka tretiranog bisulfitom, na 420 nm predstavlja stupanj posmeđivanja, a gustoća boje se definira kao suma apsorbanci na 420 nm i $\lambda_{vis-max}$ (512 nm). Omjer između polimerne boje i gustoće boje se koristi kao postotak boje koja je nastala polimerizacijom.



Slika 26 Nastajanje bezbojnog kompleksa između antocijana i bisulfita (Wrolstad i sur., 2005.).

Degradacija antocijana određena je prema metodi Giusti i Wrolstad (2001.). Otpipetira se 2,8 mL uzorka u dvije kivete. U jednu se doda 0,2 mL vode, a u drugu 0,2 mL otopine bisulfit. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra (Jenway 6300, Bibby Scientific, Stone, UK) mjerena apsorbanca pri valnim duljinama od 420 nm, 512 nm i 700 nm. Degradacija antocijana, odnosno smanjenje intenziteta crvene boje (A_{512}) i povećanje posmeđivanja (A_{420}) se izračunava prema formuli **(16-18)**:

$$\% \text{ boje nastale polimerizacijom} = \frac{\text{boja nastala polimerizacijom}}{\text{gustoća boje}} \times 100 \quad (16)$$

gdje je: gustoća boje (kontrolnog uzorka tretiranog vodom),

$$\text{gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR \quad (17)$$

boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran s bisulfitom)

$$\text{boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR \quad (18)$$

Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

3.3.11. Određivanje udjela flavonoida

Udio flavonoida određen je primjenom AlCl_3 kao reagensa spektrofotometrijskom metodom prema Zhishen i suradnici (1999.).

Otopina se priprema miješanjem određenog volumena uzorka (200 μL), 4 mL destilirane vode i 0,3 mL 5 % NaNO_2 . Nakon 5 min doda se 1,5 mL 2 % AlCl_3 , nakon 5 min još 2 mL 1 mol/L NaOH i destilirane vode do 10 mL. ApSORBANCA se mjeri na 510 nm, u odnosu na destiliranu vodu kao slijepu probu. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje katehina. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

3.3.12. Određivanje polifenola HPLC metodom

3.3.12.1 HPLC analitički sustav

Analiza antocijana, flavonola i fenolnih kiselina provedena je na HPLC analitičkom sustavu (Varian, USA) (**Slika 27**) koji se sastoji od ProStar 230 pumpe, ProStar 330 PDA detektora i ProStar 310 UV-Vis detektora. Razdvajanje polifenolnih spojeva provedeno je upotrebom OmniSpher C18 kolone (unutrašnjeg promjera 250 x 4,6 mm, promjer čestica 5 μm , Agilent, USA) koja je zaštićena pretkolonom (ChromSep 1 cm x 3 mm, Agilent, USA). Dobiveni podaci su obrađeni na IBM kompjuterskom sustavu s instaliranim softverom Star Chromatography Workstation (verzija 5,52). Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

Koncentrati su razrijeđeni na udio topljive suhe tvari osnovnog soka (13 %) i profiltrirani kroz filter Chromafil Xtra (PTFE; 0,45 μm , 25 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prije HPLC analize. Permeati su analizirani nerazrijeđeni. Metode za analizu antocijana, flavonola i fenolnih kiselina su prethodno validirane (Jakobek i sur., 2012.b). Antocijani su identificirani na valnoj duljini 520 nm, flavonoli na 360 nm, te fenolne kiseline na 320 nm. Kvantifikacija antocijana provedena je na osnovi kalibracijske krivulje cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-galaktozida. Dodatni podatci za identifikaciju dobiveni su slaganjem profila antocijana aronije s profilima antocijana već objavljenima u literaturi (Jakobek i sur., 2012.b.; Wilkes i sur., 2014.; Mayer-Miebach i sur., 2012.; Oszmianski i Wojdyło, 2005.). Količine cijanidin-3-galaktozida

izražene u mg ekvivalenta cijanidin-3-galaktozida po L soka ili koncentrata, a količine ostalih antocijana u mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po L soka ili koncentrata. Ukupna količina antocijana dobivena je zbrajanjem količine svakog pojedinog antocijana. Kvantifikacija flavonola i fenolnih kiselina je provedena na osnovi kalibracijskih krivulja standardnih spojeva (rutina, kvercetina i klorogenske kiseline). Neki spojevi su određeni djelomično (neoklorogenska kiselina). Zbrajanjem količina pojedinih flavonola i fenolnih kiselina, dobivene su količine ukupnih flavonola i fenolnih kiselina, a zbrajanjem ukupnih količina antocijana, flavonola i fenolnih kiselina dobivena je količina ukupnih polifenolnih spojeva određenih pomoću HPLC.



Slika 27 HPLC analitički sustav.

3.3.12.2 HPLC metoda za analizu antocijana, flavonola i fenolnih kiselina

Antocijani su razdvojeni reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0,5 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Volumen injektiranja uzorka u svim analizama bio je 20 μ L. Na osnovi UV/Vis spektara snimanih unutar valnih duljina 190 - 600 nm određeni su karakteristični antocijani. Valna duljina očitavanja bila je 520 nm. Radni uvjeti analize prikazani su u **Tablici 8**. Između pojedinih analiza bio je period re-ekvilibracije od 10 minuta. Kromatogrami su snimani na sobnoj temperaturi.

Tablica 8 Radni uvjeti HPLC metode za analizu antocijana.

Vrijeme (min)	% A	% B	Protok (ml/min)
0	97	3	1
38	35	65	1
45	35	65	1

Flavonoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0,1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A i 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Volumen injektiranja uzorka u svim analizama bio je 20 μ L. Radni uvjeti analize prikazani su u **Tablici 9**. Između pojedinih analiza bio je period re-ekvibracije od 10 minuta. Na osnovi UV/Vis spektara snimanih unutar valnih duljina 190 - 600 nm određeni su flavonoli i fenolne kiseline karakteristični za aroniju. Kromatogrami su snimani na sobnoj temperaturi.

Tablica 9 Radni uvjeti HPLC metode za analizu flavonola i fenolnih kiselina.

Vrijeme (min)	% A	% B	Protok (ml/min)
0	95	5	0,8
30	20	80	0,8
33	20	80	0,8
35	95	5	0,8

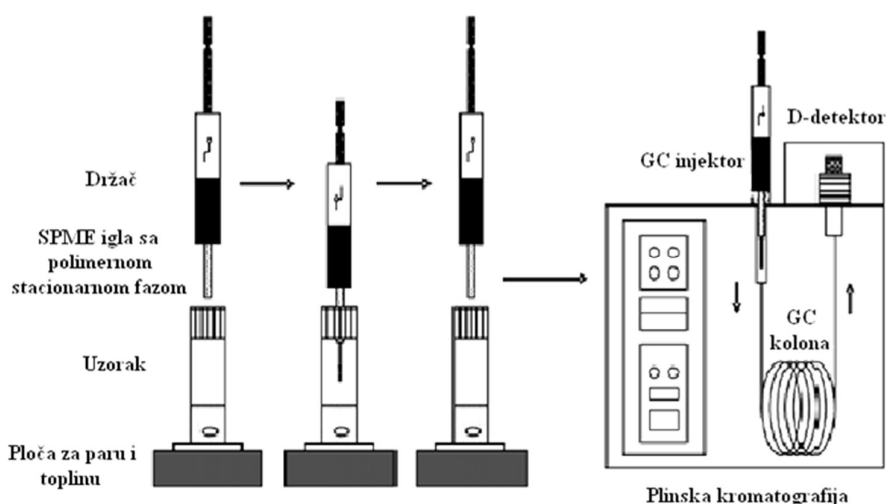
3.3.13. Analiza spojeva arome

3.3.13.1 Priprema uzorka za analizu

Prilikom pripreme uzorka upotrebljena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Osnova SPME aparature (**Slika 28**) je igla unutar koje se na polimernu stacionarnu fazu adsorbiraju aromatični sastojci. U radu je korišteno punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (PDMS/ DVB), kao polimerna stacionarna faza, debljine 65 μ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA).

U staklenu bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka (soka od aronije, razrijeđenog koncentrata ili permeata). Doda se 1 g NaCl radi bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. U bočicu se ubaci

magnet te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u posudu s vodom te se, uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu (unutar igle). Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 20 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija.



Slika 28 Korištenje SPME holdera za uzorkovanje i analizu (Pichler, 2007.).

Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977 A (Agilent, Santa Clara, California, USA) prikazan na **Slici 29**.



Slika 29 GC-MS analitički sustav.

3.3.13.2 Uvjeti rada plinskog kromatografa

Parametri ekstrakcije: temperatura ekstrakcije: 40 °C,
 vrijeme ekstrakcije: 20 min,
 tip mikroekstrakcijske igle: 65 µm PDMS/ DVB (Supelco).

GC – MS analitički uvjeti:

kolona: CP-WAX 52CB (60 m x 250 µm x 0.25 µm) (Agilent),
 početna temperatura: 40 °C (2 min),
 temperaturni gradijent: 6 °C/min,
 plin nosač: helij 5,0 (čistoće 99,9 %) (Messer Austria,
 Gumpoldskirchen, Austria) s protokom 1 mL/min pri 40 °C,
 konačna temperatura: 230 °C,
 temperatura injektora: 250 °C,
 temperatura detektora: 250 °C,
 desorpcija uzorka u injektor: 5 min.

Pojedinačni pikovi na kromatogramu su identificirani usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz *Wiley9* (Wiley,SAD) i *NIST08* (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, SAD) baze podataka. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

Određivani su odabrani sastojci arome:

- alkoholi (izoamilni alkohol, 3-heksenol, 2-heksenol, 2-etilheksanol, benzen metanol i benzen etanol),
- kiseline (heksanska, oktanska, nonanska, dekanska i dodekanoinska kiselina), esteri (n-heksil acetat, etiloktanoat),
- terpeni (limonen, 1,8-cineol, p-cimen, linalool oksid, geraniol) i
- karbonilni spojevi (2-heksenal, 6-metil-5-hepten-2-on, nonanal, benzaldehid, vitispiran, β -damascenon).

3.3.14. Statistička obrada podataka

Pri obradi rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardna devijacija izmjerenih, odnosno izračunatih parametara u uzorcima. Rezultati su statistički obrađeni pomoću ANOVA, Fisher's LSD testa ($P < 0,05$). Za obradu podataka upotrebljeni su programi Statistica 12 (StatSoft) i Microsoft Office Excel 2013.

4. REZULTATI

4.1. UZORAK PRIJE KONCENTRIRANJA

Tablica 10 Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost soka od aronije prije koncentriranja membranskim procesima (početni sok).

Parametri ^a	
Topljiva suha tvar (°Brix)	13,00 ± 0,10
Ukupna suha tvar (°Brix)	13,80 ± 0,15
Kiseline (g/100 mL jabučne kiseline)	0,93 ± 0,01
pH	3,63 ± 0,01
Polifenoli (g GAE/L) ^b	4,00 ± 0,04
Antocijani (mg CGE/L) ^c	369,47 ± 0,91
Degradacija antocijana (%)	18,71 ± 1,40
Flavonoidi (mg CE/mL) ^d	2,50 ± 0,04
Antioksidacijska aktivnost DPPH (mmol TE/100 mL) ^e	0,83 ± 0,01
Šećeri-reducirajući (g/L)	76,03 ± 0,64
Šećeri-ukupni (g/L)	82,83 ± 1,44

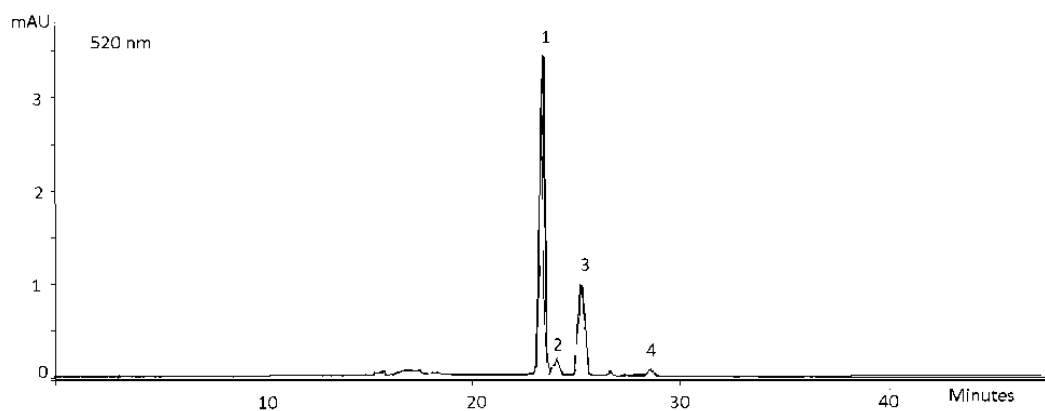
^asrednje vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija (SD)

^bGAE – ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)

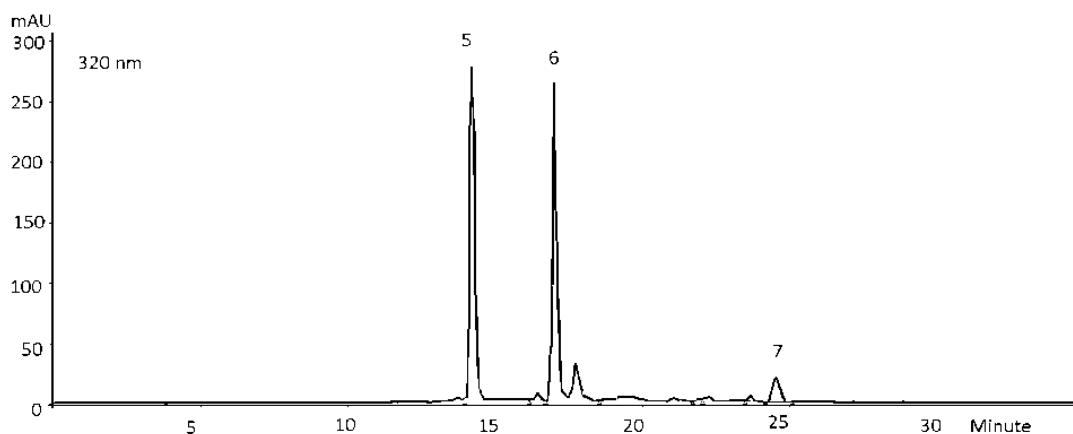
^cCGE – ekvivalent cijanidin-3-glukozida (*engl. cyanidine-3-glucoside equivalent*)

^dCE – ekvivalent katehina (*engl. catechin equivalent*)

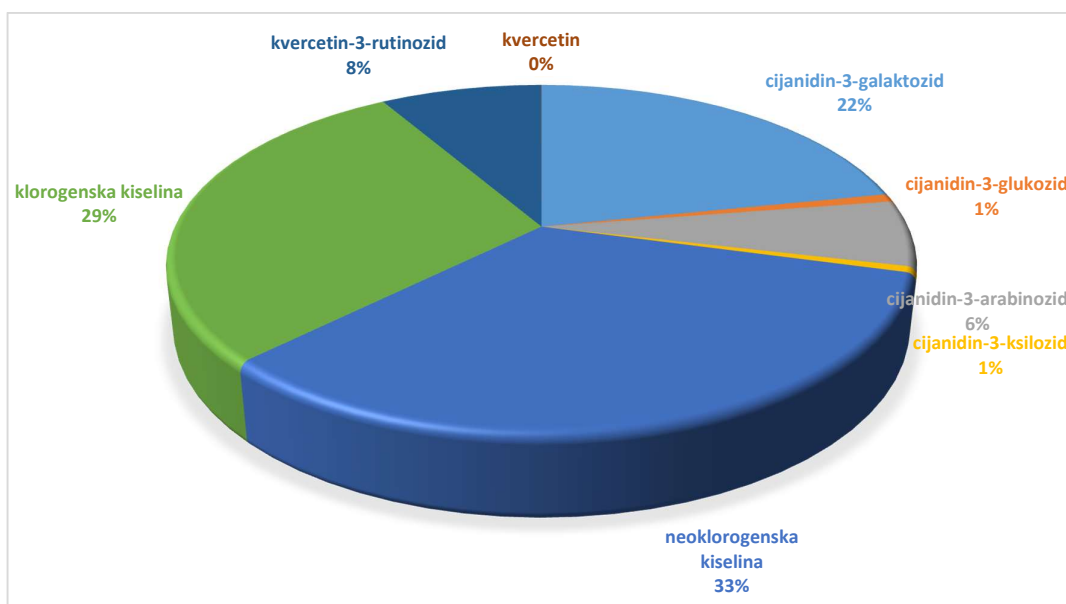
^eTE – ekvivalent trolox kiseline (*engl. trolox equivalent*)



Slika 30 Karakteristični HPLC-PDA kromatogram, soka od aronije, prikazan pri 520 nm. Objašnjenje pikova: (1) cijanidin-3-galaktozid, (2) cijanidin-3-glukozid, (3) cijanidin-3-arabinozid i (4) cijanidin-3-ksilozid.



Slika 31 Karakteristični HPLC-PDA kromatogram, soka od aronije, prikazan pri 320 nm. Objašnjenje pikova: (5) neoklorogenska kiselina, (6) klorogenska kiselina i (7) kvercetin-3-rutinozid.



Slika 32 Raspodjela (% u ukupnoj količini polifenola dobivenih HPLC metodom) pojedinih polifenolnih spojeva u soku od aronije prije koncentriranja.

Tablica 11 Aromatični sastojci identificirani u soku i koncentratima od aronije.

Sastojak	RT*
<i>Alkoholi</i>	
izoamilni alkohol (3-metil-1-butanol)	13,54
3-heksenol	17,79
2-heksenol	18,25
2-etilheksanol	20,04
benzen metanol	27,95
benzen etanol	28,58
<i>Kiseline</i>	
heksanska (kapronska) kiselina	27,34
oktanska (kaprilna) kiselina	30,94
nonanska (pelargonska) kiselina	32,62
dekanska (kaprinska) kiselina	34,23
dodekanoinska (laurinska) kiselina	37,97
<i>Esteri</i>	
n-heksil acetat	15,17
etiloktanoat	18,89
<i>Terpenoidi</i>	
<i>d</i> /limonen	13,34
1,8-cineol	13,73
<i>p</i> -cimen	15,27
linalool oksid	19,16
geraniol	27,12
<i>Karbonilni spojevi</i>	
2-heksenal	14,03
6-metil-5-hepten-2-on	16,78
nonanal	18,09
benzaldehyd	21,22
vitispiran	21,28
β -damascenon	26,94

* vrijeme zadržavanja aromatičnih sastojaka (retencijsko vrijeme) (min)

4.2. REVERZNA OSMOZA

4.2.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata

Tablica 12 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 45 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	140	12,09	3,5	1,04		19	
8	270	11,69	6,75	1,07		23	
12	410	11,81	10,25	1,11	105,39	25	13,7
16	535	11,56	13,38	1,15		28	
20	665	11,50	16,63	1,19		30	
24	790	11,38	19,75	1,25	116,15	31	15,1
28	920	11,36	23	1,29		31	
32	1030	11,13	25,75	1,35		32	
36	1135	10,89	28,38	1,39	137,69	32	17,9
40	1230	10,62	30,75	1,44		33	
44	1325	10,41	33,13	1,49		33	
48	1415	10,19	35,38	1,55	144,62	33	18,8
52	1500	9,97	37,5	1,6		34	
56	1590	9,82	39,75	1,66		34	
60	1670	9,62	41,75	1,72	154,62	35	20,1
64	1730	9,34	43,25	1,76		35	
68	1775	9,02	44,38	1,79		36	
72	1820	8,74	45,5	1,84	161,54	37	21
76	1860	8,46	46,5	1,87		37	
80	1895	8,19	47,38	1,9		37	
84	1925	7,92	48,13	1,93	173,08	37	22,5
88	1945	7,64	48,63	1,95		38	
92	1965	7,38	49,13	1,97		38	
96	1990	7,16	49,75	1,99	180,77	38	23,5
100	2010	6,95	50,25	2,01		39	
104	2025	6,73	50,63	2,03		40	
108	2040	6,53	51	2,04	183,85	40	23,9
112	2050	6,33	51,25	2,05		41	
116	2060	6,14	51,5	2,06		41	
120	2070	5,96	51,75	2,07	186,92	42	24,3
124	2080	5,79	52	2,08		41	
128	2087	5,64	52,18	2,09		41	

Nastavak **Tablice 12**

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
132	2095	5,49	52,38	2,09	190	40	24,7
136	2103	5,34	52,58	2,11		40	
140	2110	5,21	52,75	2,12	191,54	40	24,9

Tablica 13 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 45 bara, bez primjene hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	150	12,95	3,75	1,04		21	
8	300	12,96	7,5	1,08		26	
12	470	13,54	11,75	1,13	107,69	29	14
16	660	14,26	16,5	1,19		33	
20	825	14,27	20,63	1,26		36	
24	995	14,32	24,88	1,33	121,54	39	15,8
28	1145	14,15	28,63	1,40		42	
32	1280	13,83	32	1,47		44	
36	1395	13,39	34,88	1,54	143,07	46	18,6
40	1510	13,04	37,75	1,61		49	
44	1605	12,61	40,13	1,67		52	
48	1670	12,02	41,75	1,72	154,62	53	20,1
52	1730	11,49	43,25	1,76		52	
56	1795	11,08	44,88	1,81		52	
60	1840	10,59	46	1,85	161,54	52	21
64	1870	10,09	46,75	1,88		54	
68	1895	9,63	47,38	1,9		53	
72	1915	9,19	47,88	1,92	170,77	54	22,2
76	1945	8,84	48,63	1,95		56	
80	1960	8,46	49	1,96		55	
84	1980	8,15	49,5	1,98	181,54	56	23,6
88	2005	7,87	50,13	2,01		57	
92	2020	7,59	50,5	2,02		56	
96	2040	7,34	51	2,04	183,85	56	23,9
100	2055	7,10	51,38	2,06		55	
104	2075	6,89	51,88	2,08		56	
108	2085	6,67	52,13	2,09	190,77	55	24,8
112	2110	6,51	52,75	2,12	191,54	56	24,9

Tablica 14 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 50 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	170	14,68	4,25	1,04		18	
8	340	14,73	8,5	1,09		21	
12	505	14,55	12,63	1,14	110	24	14,3
16	660	14,26	16,5	1,19		26	
20	805	13,93	20,13	1,25		27	
24	945	13,61	23,63	1,31	120	29	15,6
28	1075	13,29	26,88	1,37		30	
32	1195	12,92	29,88	1,43		31	
36	1300	12,48	32,5	1,48	131,54	31	17,1
40	1400	12,09	35	1,54		31	
44	1490	11,71	37,25	1,59		32	
48	1575	11,34	39,38	1,65	146,15	31	19
52	1650	10,96	41,25	1,70		32	
56	1720	10,62	43	1,75		32	
60	1785	10,28	44,63	1,81	154,62	32	20,1
64	1850	9,99	46,25	1,86		33	
68	1900	9,66	47,5	1,91		34	
72	1940	9,31	48,5	1,94	162,31	33	21,1
76	1980	9,00	49,5	1,98		34	
80	2010	8,69	50,25	2,01		34	
84	2034	8,37	50,85	2,04	176,15	35	22,9
88	2035	7,99	50,88	2,04		35	
92	2078	7,81	51,95	2,08		35	
96	2097	7,55	52,43	2,10	186,92	35	24,3
100	2105	7,27	52,63	2,11		35	
104	2115	7,03	52,88	2,12	191,54	35	24,9

Tablica 15 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 50 bara, bez primjene hlađenja.

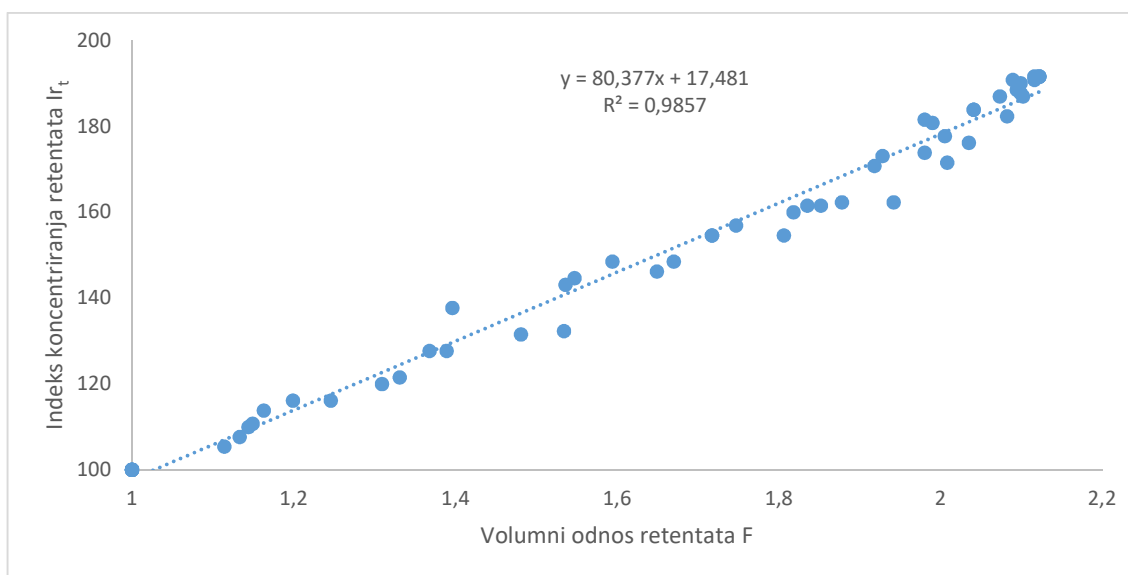
Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	165	14,25	4,12	1,04		18	
8	335	14,51	8,38	1,09		21	
12	520	14,98	13	1,15	110,77	24	14,4
16	720	15,55	18	1,22		29	
20	920	15,91	23	1,29		33	
24	1120	16,13	28	1,39	127,69	38	16,6
28	1295	16,01	32,38	1,48		41	
32	1455	15,73	36,38	1,57		43	
36	1605	15,41	40,13	1,67	148,46	44	19,3
40	1710	14,77	42,75	1,75		44	
44	1800	14,15	45	1,82		45	
48	1870	13,47	46,75	1,88	162,31	46	21,1
52	1930	12,82	48,25	1,93		49	
56	1975	12,19	49,38	1,98		49	
60	2008	11,57	50,2	2,01	171,54	51	22,3
64	2037	10,99	50,93	2,04		51	
68	2058	10,46	51,45	2,06		51	
72	2079	9,98	51,98	2,08	182,31	52	23,7
76	2095	9,53	52,38	2,09		54	
80	2110	9,12	52,75	2,12	190,77	55	24,8
84	2115	8,70	52,88	2,12	191,54	56	24,9

Tablica 16 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 55 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	185	15,98	4,63	1,05		18	
8	375	16,24	9,38	1,10		22	
12	560	16,13	14	1,16	113,85	26	14,8
16	745	16,09	18,63	1,23		29	
20	915	15,83	22,88	1,29		30	
24	1075	15,48	26,88	1,37	127,69	31	16,6
28	1225	15,12	30,63	1,44		31	
32	1365	14,75	34,13	1,52		32	
36	1490	14,31	37,25	1,59	148,46	32	19,3
40	1605	13,86	40,13	1,67		33	
44	1705	13,39	42,63	1,74		33	
48	1800	12,96	45	1,82	160	34	20,8
52	1875	12,46	46,88	1,88		35	
56	1950	12,04	48,75	1,95		35	
60	2005	11,55	50,13	2,01	177,69	35	23,1
64	2045	11,04	51,13	2,05		36	
68	2068	10,51	51,7	2,07		36	
72	2090	10,03	52,25	2,09	188,46	36	24,5
76	2105	9,57	52,63	2,11		36	
80	2115	9,14	52,88	2,12	191,54	36	24,9

Tablica 17 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlaku od 55 bara, bez primjene hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Temp. retentata (°C)	% stv retentata
0	0	0	0	1	100	10	13
4	245	21,16	6,13	1,07		22	
8	460	19,92	11,5	1,13		26	
12	665	19,15	16,63	1,19	116,15	31	15,1
16	855	18,47	21,38	1,27		34	
20	1045	18,08	26,13	1,53		37	
24	1235	17,79	30,88	1,45	132,31	40	17,2
28	1405	17,34	35,13	1,54		42	
32	1575	17,02	39,38	1,65		45	
36	1710	16,42	42,75	1,75	156,92	45	20,4
40	1825	15,76	45,63	1,84		47	
44	1930	15,17	48,25	1,93		50	
48	1980	14,26	49,5	1,98	173,85	51	22,6
52	2025	13,45	50,63	2,03		53	
56	2065	12,75	51,63	2,07		55	
60	2095	12,07	52,38	2,09	187,69	56	24,4
64	2115	11,42	52,88	2,12	191,54	56	24,9



Slika 33 Linija trenda utjecaja volumnog odnosa retentata na indeks koncentriranja u retentatu kod koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlakovima od 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem (H) i bez primjene hlađenja (BH).

4.2.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva

Tablica 18 Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost koncentrata od aronije dobivenih postupkom reverzne osmoze pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

Parametar ^a	RO45H	RO45BH	RO50H	RO50BH	RO55H	RO55BH
Topljiva suha tvar (°Brix)	24,9±0,15	24,9±0,10	24,9±0,20	24,9±0,10	24,9±0,15	24,9±0,10
Ukupna suha tvar (°Brix)	24,9±0,07	24,9±0,07	24,9±0,03	25,0±0,06	24,9±0,06	25,1±0,05
Kiseline (g/100 mL jabučne kiseline)	0,83±0,01	0,89±0,01	0,87±0,01	0,88±0,01	0,89±0,01	0,89±0,01
pH	3,58± 0,01	3,58±0,01	3,62±0,01	3,65±0,01	3,62±0,01	3,63±0,01
Šećeri-reduc. (g/L)	66,0±1,27	64,2±1,00	69,0±0,64	68,3±0,64	69,0±0,64	69,0±0,63
Šećeri-ukupni (g/L)	72,2±1,27	71,4±1,27	74,5±1,27	71,6±1,27	73,8±1,27	74,5±1,27
Polifenoli (g GAE/L) ^b	3,72±0,01	3,68±0,03	3,75±0,04	3,74±0,03	3,87±0,04	3,81±0,02
Antocijani (mg CGE/L) ^c	295,98±5,42	289,89±5,09	327,61±1,87	270,10±2,61	352,3±0,72	302,64±3,12
Degradacija antocijana (%)	35,0±0,95	36,2±2,58	27,81±1,18	37,08±2,78	22,30±1,31	34,35±1,33
Flavonoidi (mg CE/mL) ^d	1,96±0,03	1,91±0,03	2,18±0,04	1,97±0,06	2,27±0,02	2,03±0,04
Antiok. akt. DPPH (mmolTE/100 mL) ^e	0,71±0,02	0,71±0,01	0,79±0,01	0,78±0,01	0,79±0,01	0,78±0,01

^asrednje vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija (SD)

^bGAE – ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)

^cCGE – ekvivalent cijanidin-3-glukozida (*engl. cyanidine-3-glucoside equivalent*)

^dCE – ekvivalent katehina (*engl. catechin equivalent*)

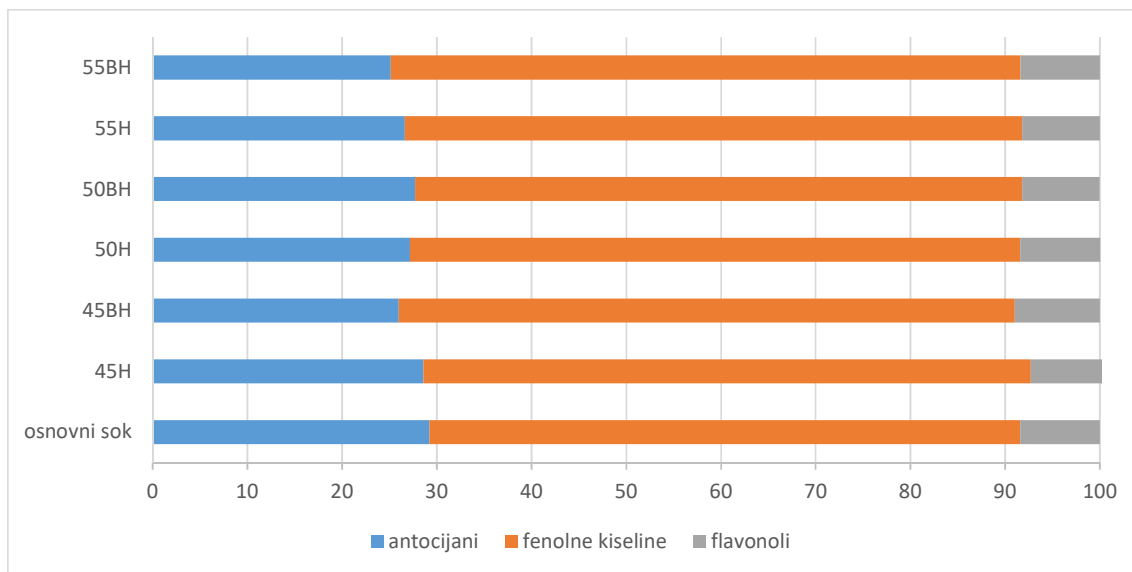
^eTE – ekvivalent trolox kiseline (*engl. trolox equivalent*)

Tablica 19 Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola u koncentratima od aronije dobivenim pri različitim procesnim uvjetima reverznom osmozom u usporedbi s početnim sokom od aronije.

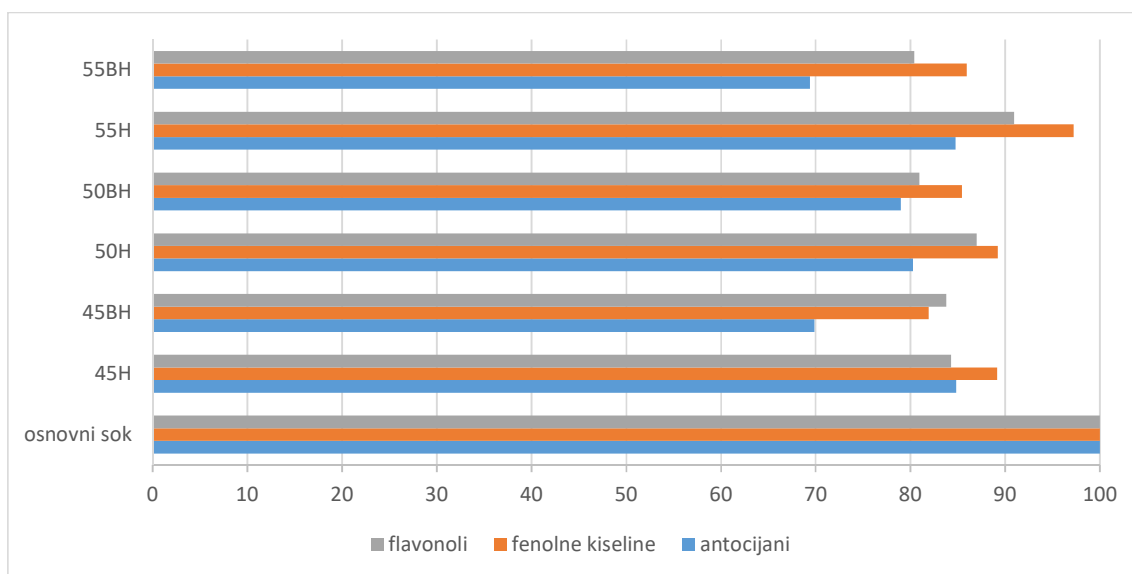
	Količina (mg/L)						
	Početni sok	45H	45BH	50H	50BH	55H	55BH
Antocijani							
Cijanidin-3-galaktozid	278,43±25,03 ^a	234,03±6,28 ^a	198,98±4,02 ^b	227,13±8,55 ^{a,b}	226,68±14,21 ^{a,b}	240,36±17,49^a	196,63±21,72 ^b
Cijanidin-3-glukozid	9,28±0,96 ^a	8,15±0,46^a	6,87±0,15 ^b	8±0,44 ^a	6,95±0,37 ^b	7,69±0,58 ^{a,b}	7,66±0,4 ^{a,b}
Cijanidin-3-arabinozid	78,47±4,27 ^a	67,77±3,55^{a,b}	50,13±0,74 ^d	58,73±0,99 ^{b,c,d}	55,56±6,63 ^{c,d}	62,2±5,54 ^{a,b,c}	49,76±5,81 ^d
Cijanidin-3-ksilozid	6,88±0,51 ^a	6,55±0,11^a	4,7±0,04 ^d	5,66±0 ^{b,c}	5,43±0,42 ^{c,d}	6,02±0,29 ^{a,b,c}	4,79±0,58 ^d
Ukupno	373,06±30,77^a	316,5±10,4^{a,b}	260,68±4,95 ^c	299,52±9,98 ^{b,c}	294,62±21,63 ^{b,c}	316,27±23,9 ^{a,b}	258,84±28,51 ^c
Fenolne kiseline							
Neoklorogenska kiselina	426,57±0,98 ^a	374,75±4,77 ^b	334,52±11,72 ^c	375,71±14,33 ^b	353,65±19,34 ^{b,c}	422,32±2,05^a	353,75±7,68 ^{b,c}
Klorogenska kiselina	370,06±3,29 ^a	335,29±2,28 ^c	318,19±7,19 ^d	335,12±3,43 ^c	326,92±2,33 ^{c,d}	352,34±6,82^b	330,97±3,93 ^c
Flavonoli							
Kvercetin-3-rutinozid	107,13±5,08 ^a	90,51±0,27 ^{c,d}	89,98±3,81 ^{c,d}	93,42±3,1 ^{b,c}	86,93±3,01 ^d	97,69±1,26^{a,b}	86,37±1,61 ^d
Kvercetin	0,27±0,23	<lod**	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
Ukupno	904,03±9,58 ^a	800,55±7,32 ^{b,c}	742,69±22,72 ^d	803,71±20,86 ^b	767,50±24,68 ^{c,d}	872,35±10,13^a	771,09±12,77 ^{b,c,d}
UKUPNO	1277,09±40,35^a	1107,05±17,72 ^b	1003,37±27,67 ^e	1103,23±30,84 ^{b,c}	1062,12±46,3 ^{c,d}	1188,62±34,03^a	1029,93±41,28 ^{d,e}

**<lod: limit detekcije, H-s hlađenjem, BH-bez hlađenja.

Vrijednosti u istom redu s različitim eksponentima (a-d) su statistički značajno različite (P < 0,05) ANOVA, Fisher's.

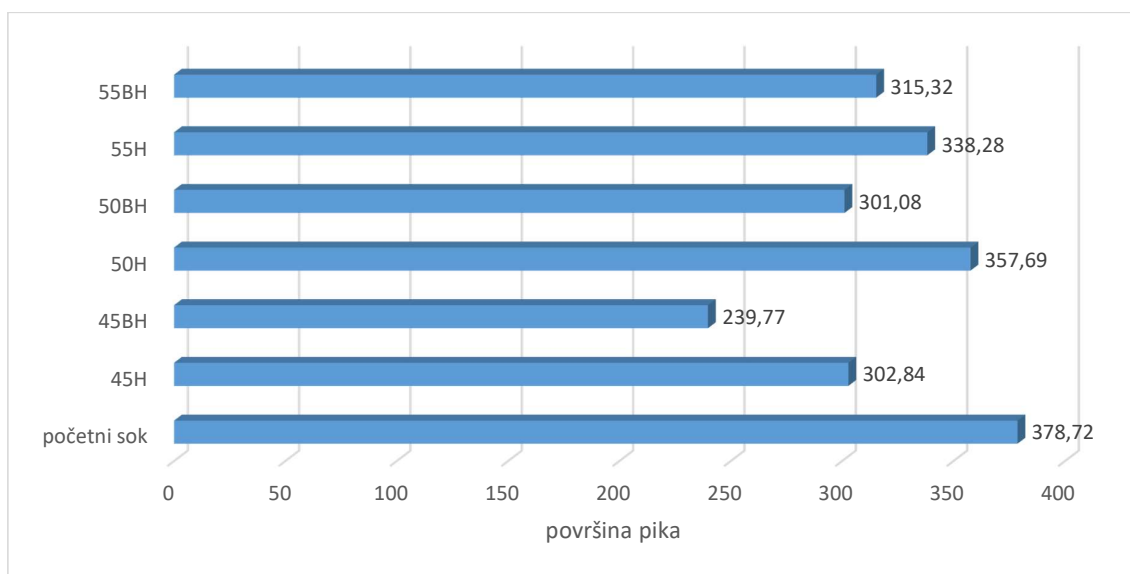


Slika 34 Raspodjela (% u ukupnoj količini polifenola dobivenih HPLC metodom) pojedinih polifenolnih skupina (antocijani, fenolne kiseline i flavonoli) u početnom soku i koncentratima soka od aronije dobivenim različitim procesnim uvjetima tlaka (45,50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

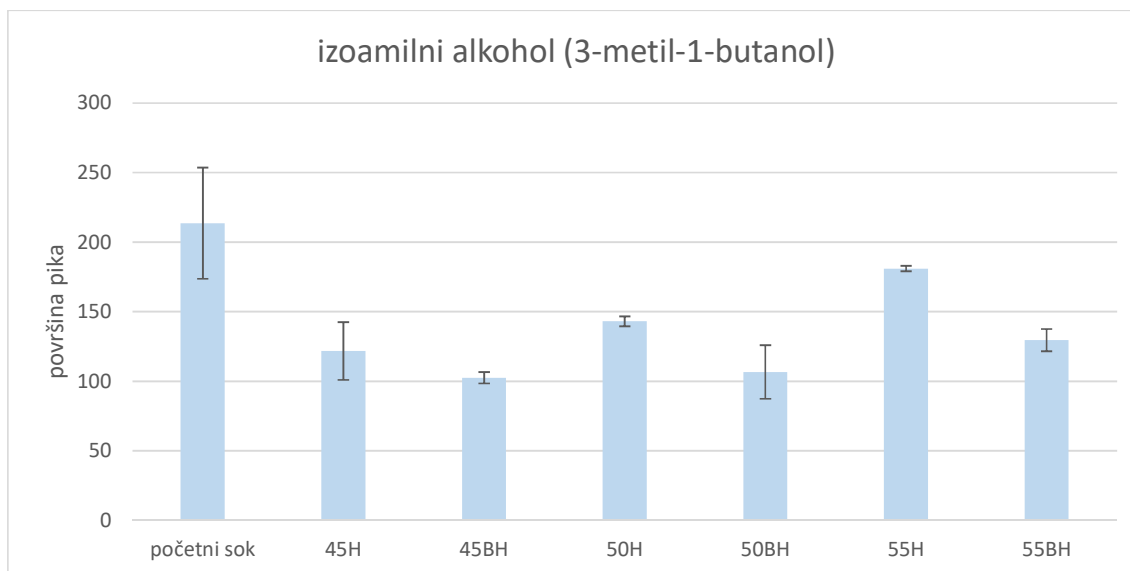


Slika 35 Sadržaj (% u odnosu na početni sok od aronije) pojedine skupine polifenolnih spojeva (antocijani, fenolne kiseline i flavonoli) u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

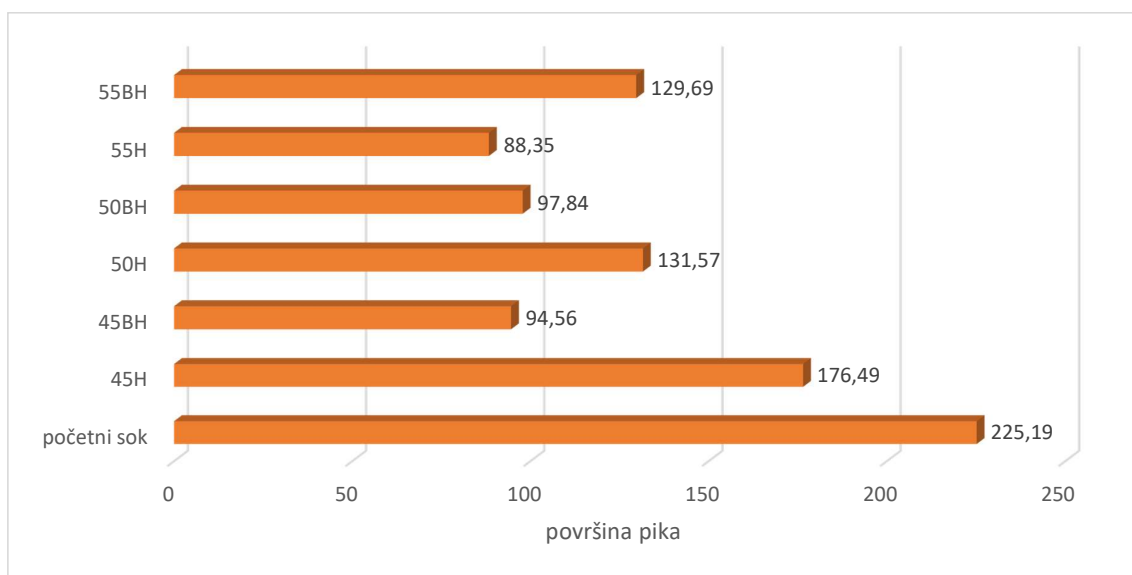
4.2.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje arome



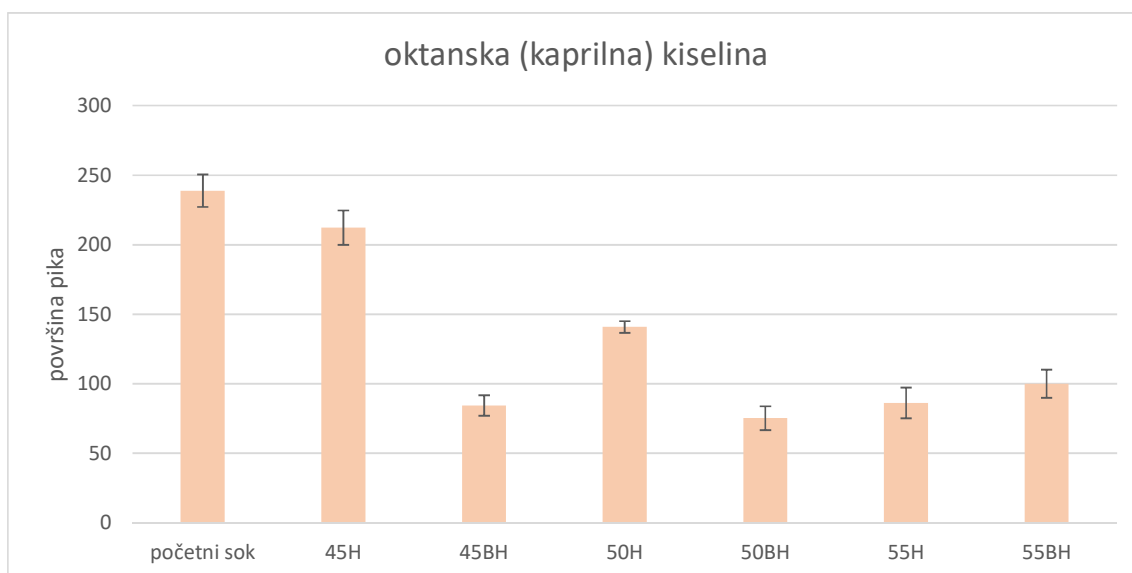
Slika 36 Zadržavanje alkohola u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



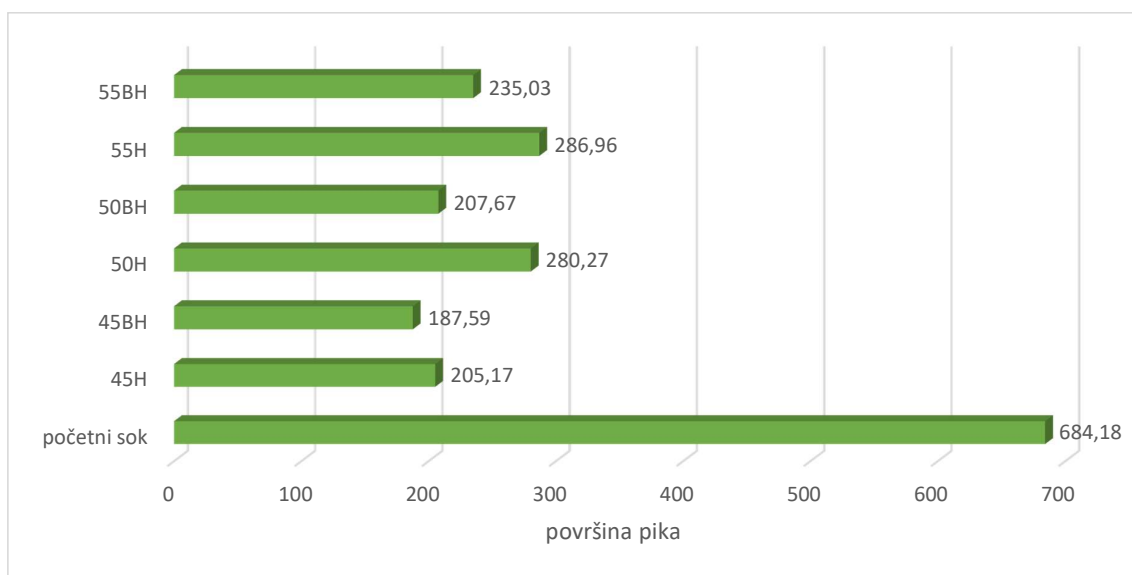
Slika 37 Zadržavanje izoamilnog alkohola u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



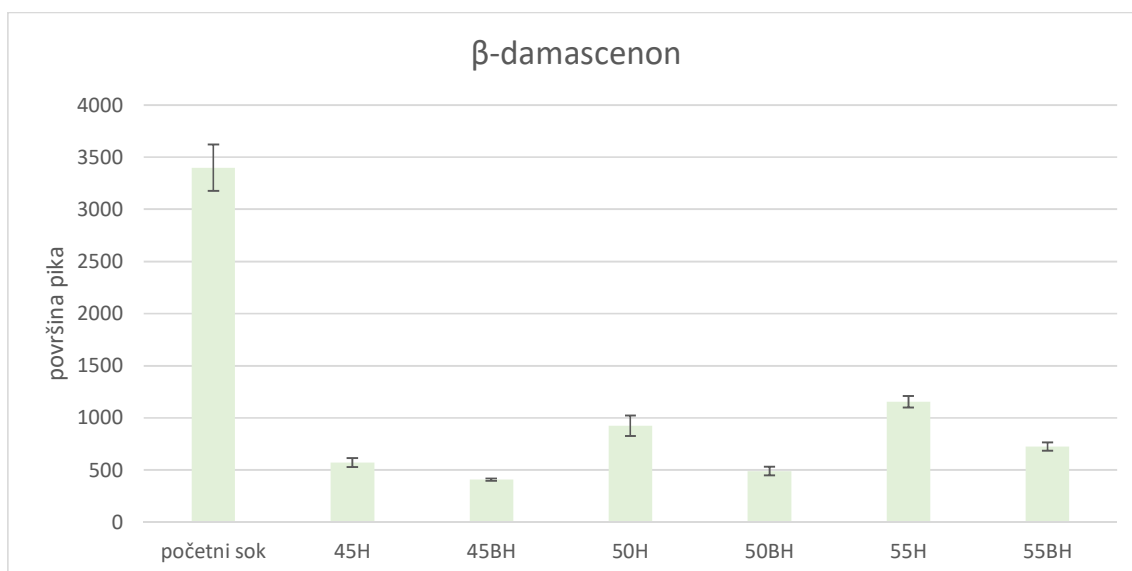
Slika 38 Zadržavanje kiselina u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



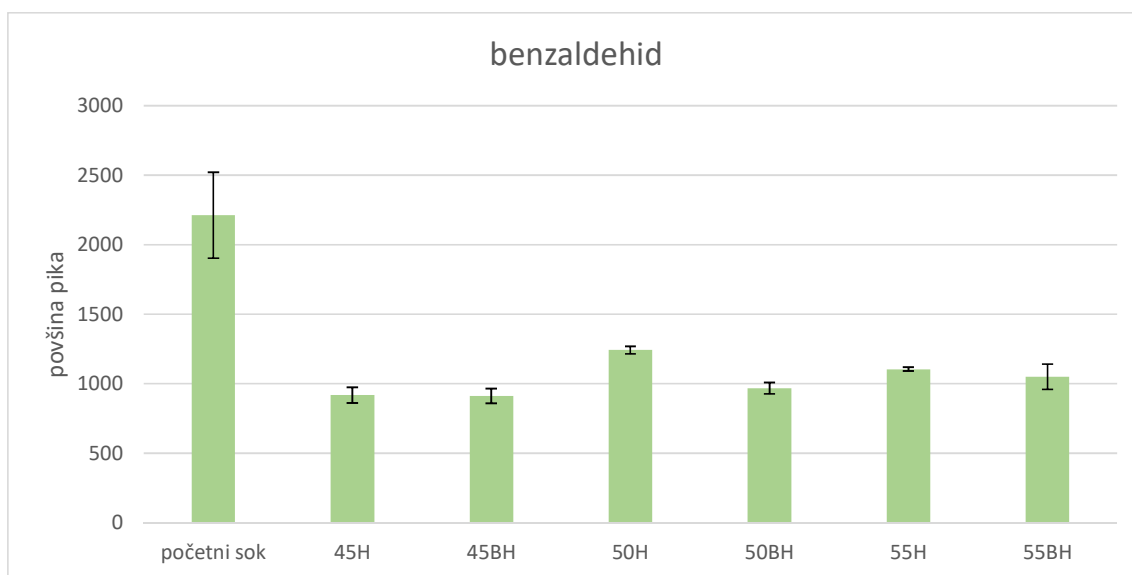
Slika 39 Zadržavanje kaprilne kiseline u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



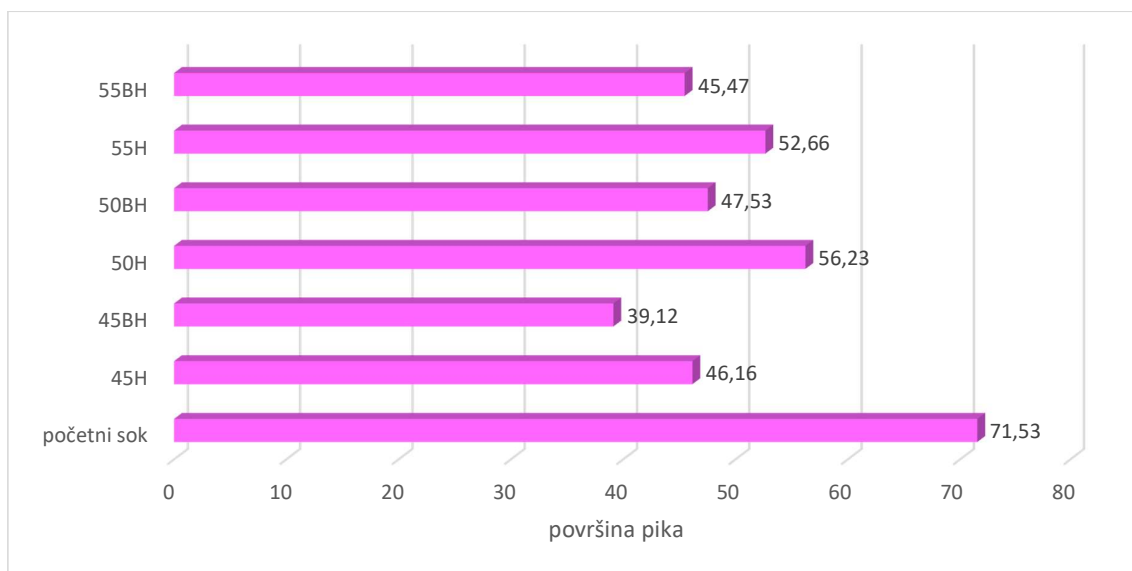
Slika 40 Zadržavanje karbonilnih spojeva u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



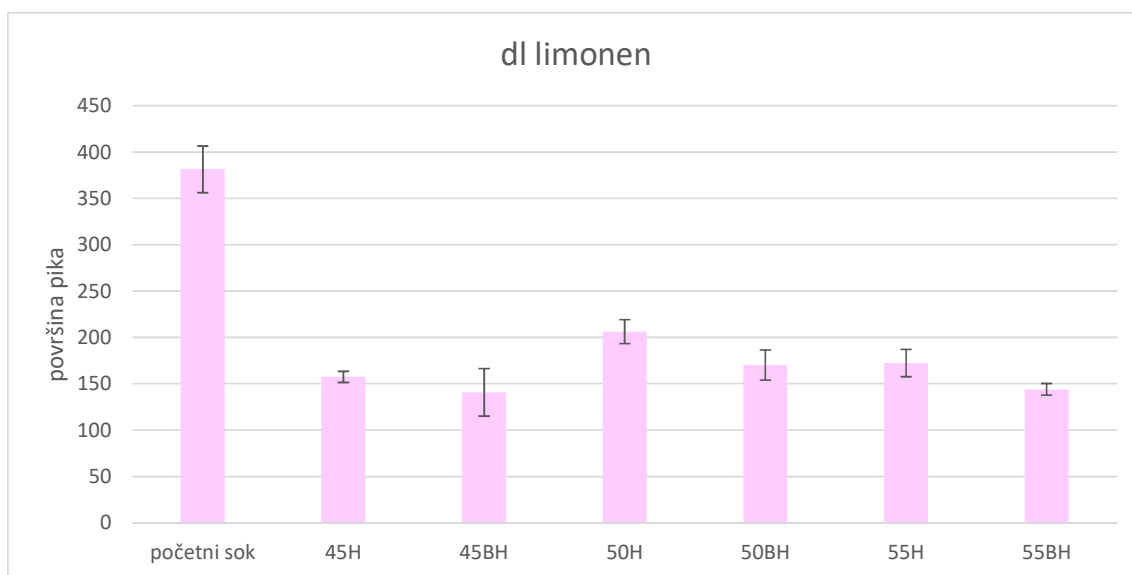
Slika 41 Zadržavanje β -damascenona u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



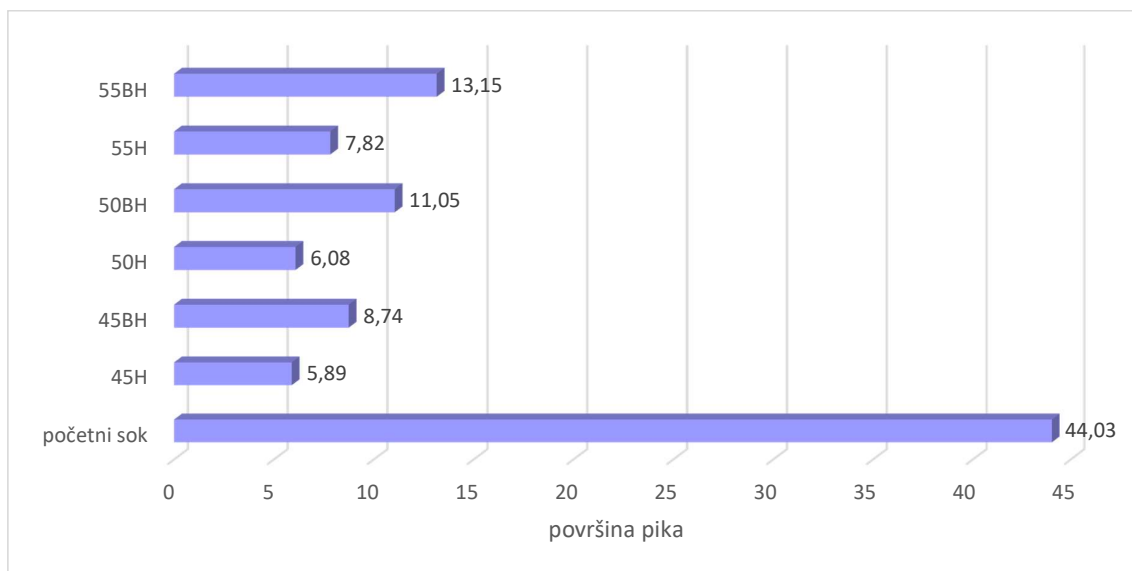
Slika 42 Zadržavanje benzaldehida u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



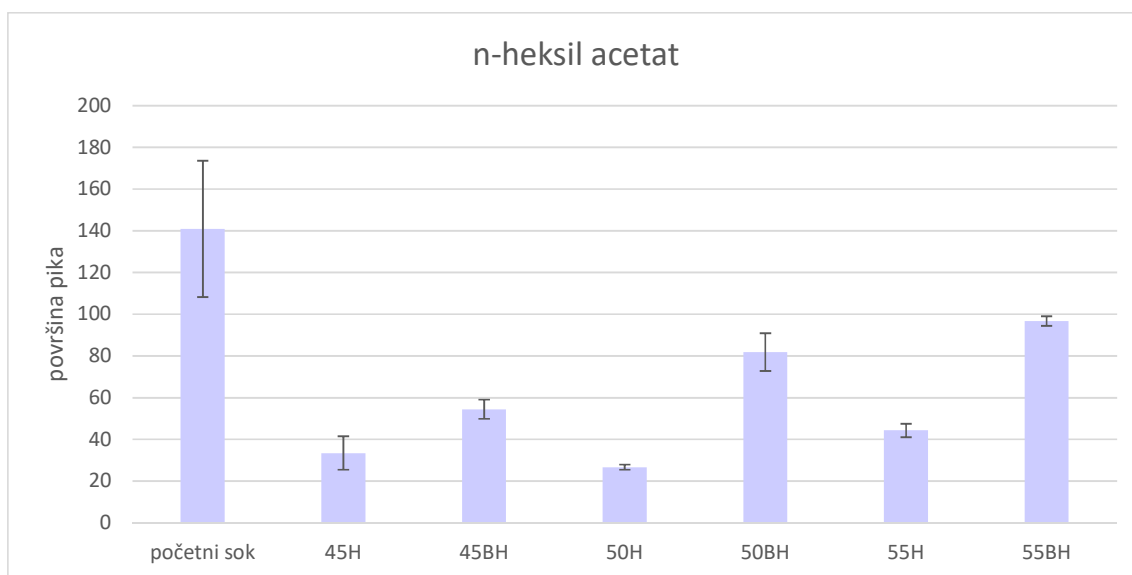
Slika 43 Zadržavanje terpenoida u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



Slika 44 Zadržavanje terpenoida u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



Slika 45 Zadržavanje estera u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



Slika 46 Zadržavanje n-heksil acetata u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).

4.3. NANOFILTRACIJA

4.3.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata

Tablica 20 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 45 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
0	0	0	0	0	1	100	0	100	10	13	0
4	135	11,67	3,38		1,04				19		
8	260	11,26	6,5		1,07				22		
12	390	11,23	9,75	3,08	1,11	107,69	2,86	97,14	24	14	0,4
16	520	11,23	13		1,15				26		
20	650	11,24	16,25		1,19				27		
24	790	11,30	19,75	3,08	1,25	115,39	2,67	97,33	28	15	0,4
28	920	11,27	23		1,29				29		
32	1040	11,24	26		1,35				30		
36	1170	11,23	29,25	4,62	1,41	130	3,55	96,45	32	16,9	0,6
40	1285	11,09	32,13		1,47				33		
44	1400	11,00	35		1,54				32		
48	1500	10,80	37,5	4,62	1,6	146,15	3,16	96,84	33	19	0,6
52	1590	10,56	39,75		1,66				33		
56	1670	10,31	41,75		1,72				33		
60	1740	10,02	43,5	4,62	1,77	160,77	2,91	97,09	33	20,9	0,6
64	1815	9,79	45,38		1,83				35		
68	1865	9,48	46,63		1,87				35		
72	1910	9,17	47,75	6,15	1,91	173,85	3,54	96,46	35	22,6	0,8

Nastavak Tablice 20

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I _{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
76	1950	8,87	48,75		1,95				35		
80	1995	8,62	49,88		1,99				36		
84	2030	8,35	50,75	7,69	2,03	183,85	4,18	95,82	37	23,9	1
88	2060	8,09	57,5		2,06				37		
92	2095	7,87	52,38		2,09				37		
96	2130	7,67	53,25	7,69	2,14	194,62	3,95	96,05	38	25,3	1
100	2155	7,45	53,88		2,17				38		
104	2190	7,28	54,75		2,21				39		
108	2215	7,09	55,38	7,69	2,24	200,77	3,83	96,17	40	26,1	1
112	2235	6,89	55,88		2,27				41		
116	2250	6,71	56,25		2,29				41		
120	2265	6,52	56,63	7,69	2,31	203,08	3,79	96,21	42	26,4	1
124	2280	6,35	57		2,33				42		
128	2295	6,19	57,38		2,35				42		
132	2305	6,04	57,63	7,69	2,36	206,15	3,73	96,27	43	26,8	1
136	2315	5,88	57,88		2,37				43		
140	2325	5,74	58,13	7,69	2,39	206,92	3,72	96,28	44	26,9	1

Tablica 21 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 45 bara, bez primjene hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
0	0	0	0	0	1	100	0	100	10	0	0
4	150	13,95	3,75		1,04				20		
8	330	14,26	8,25		1,09				24		
12	470	13,54	11,75	3,077	1,13	110,77	2,78	97,22	27	14,4	0,4
16	630	13,44	15,75		1,19				31		
20	790	13,65	19,75		1,25				33		
24	950	13,68	23,75	3,077	1,31	116,15	2,65	97,35	34	15,1	0,4
28	1100	13,57	27,5		1,38				36		
32	1200	12,97	30		1,43				40		
36	1290	12,39	32,25	3,846	1,48	130,77	2,94	97,06	52	17	0,5
40	1395	12,05	34,88		1,54				46		
44	1500	11,79	37,5		1,6				48		
48	1600	11,52	40	4,615	1,67	146,15	3,16	96,84	51	19	0,6
52	1690	11,23	42,25		1,73				52		
56	1770	10,93	44,25		1,79				53		
60	1850	10,59	46,25	5,385	1,86	162,31	3,32	96,68	54	21,1	0,7
64	1910	10,31	47,75		1,91				56		
68	1965	9,99	49,13		1,97				58		
72	2010	9,65	50,25	6,923	2,01	180,77	3,83	96,17	58	23,5	0,9
76	2050	9,32	51,25		2,05				57		
80	2085	9,01	52,13		2,09				57		
84	2120	8,72	53	7,692	2,13	193,08	3,98	96,02	57	25,1	1
88	2155	8,46	53,88		2,17				57		
92	2190	8,23	54,75		2,21				57		

Nastavak Tablice 21

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
96	2225	8,01	55,63	7,69	2,25	196,92	3,91	96,09	58	25,6	1
100	2250	7,78	56,25		2,29				58		
104	2270	7,55	56,75		2,31				57		
108	2290	7,33	57,25	7,69	2,34	204,62	3,76	96,24	57	26,6	1
112	2305	7,11	57,63		2,36				58		
116	2320	6,91	58		2,38				57		
120	2330	6,71	58,25	7,69	2,39	206,92	3,72	96,28	57	26,9	1

Tablica 22 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 50 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I _{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
0	0	0	0	0	1	100	0		10	13	0
4	170	14,68	4,25		1,04				19		
8	375	16,24	9,38		1,10				22		
12	550	15,84	13,75	3,08	1,16	113,85	2,70	97,29	25	14,8	0,4
16	750	16,20	18,75		1,23				27		
20	925	16,00	23,13		1,30				28		
24	1070	15,41	26,75	3,08	1,37	130	2,37	97,63	30	16,9	0,4
28	1220	15,08	30,5		1,44				31		
32	1370	14,81	34,25		1,52				31		
36	1500	14,40	37,5	3,08	1,6	150	2,05	97,95	32	19,5	0,4
40	1630	14,08	40,75		1,69				33		
44	1740	13,67	43,5		1,77				35		
48	1835	13,21	45,88	3,85	1,85	166,92	2,30	97,69	34	21,7	0,5
52	1915	12,72	47,88		1,92				35		
56	1995	12,32	49,88		1,99				34		
60	2060	11,87	51,5	4,62	2,06	183,85	2,51	97,49	35	23,9	0,6
64	2110	11,39	52,75		2,12				36		
68	2140	10,88	53,5		2,15				36		
72	2180	10,47	54,5	5,39	2,19	196,92	2,73	97,27	36	25,6	0,7
76	2220	10,09	55,5		2,25				36		
80	2245	9,70	56,13		2,28				38		
84	2270	9,34	56,75	6,15	2,31	203,08	3,03	96,97	38	26,4	0,8
88	2290	8,99	57,25		2,34				38		

Nastavak Tablice 22

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
92	2310	8,68	57,75		2,37				39		
96	2320	8,35	58	6,92	2,38	206,15	3,36	96,64	39	26,8	0,9
100	2330	8,05	58,25	6,92	2,39	206,92	3,35	96,65	39	26,9	0,9

Tablica 23 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 50 bara, bez primjene hlađenja.

Vrijeme t (min)		Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I _{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
0		0	0	0	0	1	100	0	100	10	13	0
4		130	11,23	3,25		1,03				20		
8		260	11,26	6,5		1,07				24		
12		415	11,95	10,38	3,08	1,12	109,23	2,82	97,18	28	14,2	0,4
16		560	12,09	14		1,16				32		
20		720	12,45	18		1,22				35		
24		880	12,67	22	3,08	1,28	123,85	2,48	97,52	38	16,1	0,4
28		1050	12,98	26,25		1,36				41		
32		1210	13,08	30,25		1,43				44		
36		1350	12,96	33,75	3,08	1,51	135,39	2,27	97,73	45	17,6	0,4
40		1475	12,74	36,88		1,58				45		
44		1600	12,57	40		1,67				48		
48		1730	12,46	43,25	3,08	1,76	160	1,92	98,08	50	20,8	0,4
52		1830	12,16	45,75		1,84				50		
56		1915	11,82	47,88		1,92				51		
60		2010	11,58	50,25	4,62	2,01	183,08	2,52	97,48	53	23,8	0,6
64		2095	11,31	52,38		2,09				53		
68		2140	10,88	53,5		2,15				53		
72		2185	10,49	54,63	4,62	2,20	200,77	2,29	97,70	54	26,1	0,6
76		2230	10,14	55,75		2,26				56		
80		2270	9,81	56,75		2,31				56		
84		2290	9,42	57,25	6,15	2,34	206,15	2,99	97,02	55	26,8	0,8
88		2315	9,09	57,88		2,37				54		

Nastavak Tablice 23

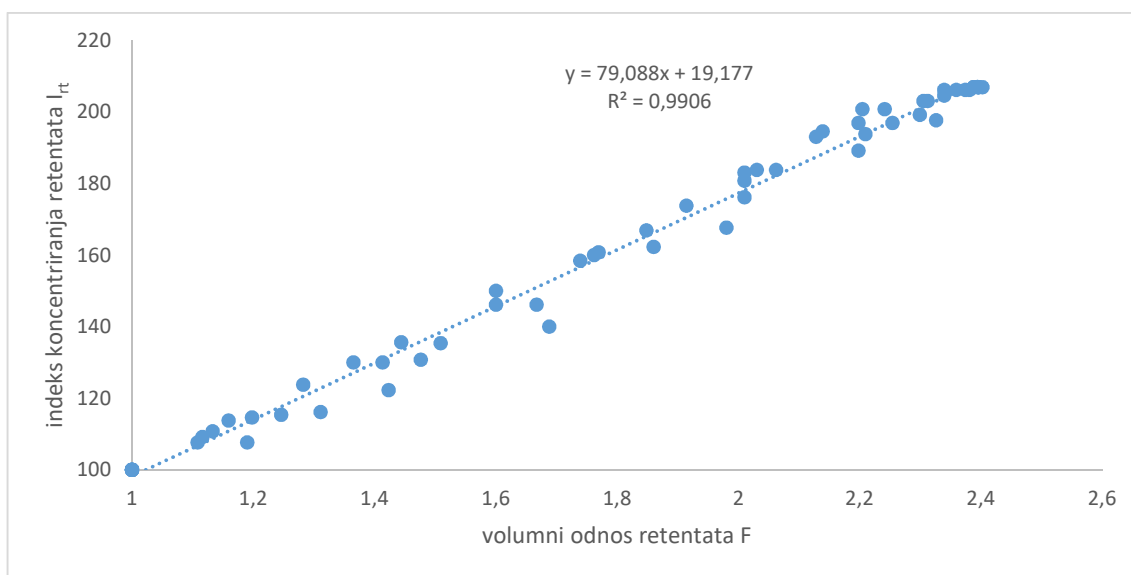
Vrijeme t (min)		Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
92		2330	8,76	58,25	6,92	2,39	206,92	3,35	96,65	54	26,9	0,9

Tablica 24 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 55 bara, s primjenom hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I _{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I _{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata	Vrijeme t (min)	Volumen permeata V _p (ml)
0	0	0	0	0	4	1	100	0	100	10	-10	13	0
4	210	18,14	5,25		3,79	1,06				18	-8		
8	420	18,15	10,5		3,58	1,12				21	-5		
12	640	18,43	16	3,08	3,36	1,19	107,69	2,86	97,14	23	-3	14	0,4
16	820	17,71	20,5		3,18	1,26				26	-2		
20	990	17,13	24,75		3,01	1,33				28	0		
24	1190	17,14	29,75	3,08	2,81	1,42	122,31	2,52	97,48	31	2	15,9	0,4
28	1350	16,67	33,75		2,65	1,51				30	4		
32	1490	16,10	37,25		2,51	1,59				32	5		
36	1630	15,65	40,75	3,08	2,37	1,69	140	2,19	97,80	32	7	18,2	0,4
40	1760	15,19	44		2,24	1,79				32	10		
44	1870	14,69	46,75		2,13	1,88				33	12		
48	1980	14,26	49,5	4,62	2,02	1,98	167,69	2,75	97,25	33	13	21,8	0,6
52	2065	13,72	51,63		1,94	2,07				34	15		
56	2140	13,21	53,5		1,86	2,15				34	17		
60	2180	12,56	54,5	4,62	1,82	2,19	189,23	2,44	97,56	34	18	24,6	0,6
64	2200	11,88	55		1,8	2,22				34	19		
68	2230	11,34	55,75		1,77	2,26				34	20		
72	2260	10,85	56,5	6,15	1,74	2,29	199,23	3,09	96,91	35	23	25,9	0,8
76	2280	10,37	57		1,72	2,33				35	26		
80	2305	9,96	57,63		1,69	2,36				35	26		
84	2315	9,53	57,88	6,92	1,69	2,37	206,15	3,36	96,64	36	27	26,8	0,9
88	2325	9,13	58,13	6,92	1,68	2,39	206,92	3,35	96,65	35	27	26,9	0,9

Tablica 25 Procesni parametri koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlaku od 55 bara, bez primjene hlađenja.

Vrijeme t (min)	Volumen permeata V_p (mL)	Protok permeata J (L/m ² h)	Volumni udio permeata Y (%)	Indeks konc. permeata I_{pt}	Volumni odnos retentata F	Indeks konc. retentata I_{rt}	Permeabi- lnost P (%)	Retencija R (%)	Temp. retentata (°C)	% stv retentata	% stv permeata
0	0	0	0	0	1	100	0	100	10	13	0
4	225	19,43	5,63		1,06				19		
8	445	19,27	11,13		1,13				23		
12	660	19,01	16,5	3,08	1,19	114,62	2,69	97,32	25	14,9	0,4
16	855	18,47	21,38		1,27				29		
20	1045	18,08	26,13		1,35				31		
24	1230	17,71	30,75	3,08	1,44	135,69	2,27	97,73	35	17,6	0,4
28	1410	17,41	35,25		1,54				38		
32	1585	17,13	39,63		1,66				40		
36	1700	16,32	42,5	3,08	1,74	158,46	1,94	98,06	41	20,6	0,4
40	1805	15,59	45,13		1,82				43		
44	1910	15,01	47,75		1,91				46		
48	2010	14,47	50,25	3,85	2,01	176,15	2,18	97,82	49	22,9	0,5
52	2090	13,89	52,25		2,09				52		
56	2155	13,31	53,88		2,17				53		
60	2190	12,62	54,75	5,39	2,21	193,85	2,78	97,22	54	25,2	0,7
64	2210	11,93	55,25		2,27				54		
68	2245	11,41	56,13		2,28				54		
72	2280	10,95	57	6,15	2,33	197,69	3,11	96,89	54	25,7	0,8
76	2305	10,48	57,63		2,36				53		
80	2325	10,05	58,13		2,39				53		
84	2335	9,61	58,38	6,92	2,40	206,92	3,35	96,65	53	26,9	0,9



Slika 47 Linija trenda utjecaja volumnog odnosa retentata na indeks koncentriranja u retentatu kod koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom pri tlakovima od 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem (H) i bez primjene hlađenja (BH).

4.3.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva

Tablica 26 Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost koncentrata (retentata) od aronije dobivenih postupkom nanofiltracije (NF) pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

Parametar ^a	NF45H	NF45BH	NF50H	NF50BH	NF55H	NF55BH
Topljiva suha tvar (°Brix)	26,9±0,01	26,9±0,06	26,9±0,05	26,9±0,02	26,9±0,04	26,9±0,06
Ukupna suha tvar (°Brix)	26,9±0,07	27,3±0,05	26,9±0,06	27,3±0,06	27,2±0,07	26,9±0,06
Kiseline (g/100 mL jabučne kiseline)	0,70±0,01	0,59±0,01	0,69±0,02	0,71±0,01	0,68±0,01	0,71±0,01
pH	3,67±0,01	3,73±0,01	3,73±0,01	3,71±0,01	3,71±0,01	3,77±0,01
Polifenoli (g GAE/L) ^b	3,69±0,03	3,77±0,03	3,69±0,03	3,59±0,03	3,38±0,04	3,63±0,02
Antocijani (mg CGE/L) ^c	290,56±7,11	271,35±1,26	316,44±2,94	316,95±2,08	306,84±1,42	325,65±4,06
Degradacija antocijana (%)	36,1±1,2	37,01±1,4	29,5±1,4	29,75±2,2	35,12±1,3	27,67±1,9
Flavonoidi (mg CE/mL) ^d	2,04±0,02	2,27±0,02	2,35±0,04	2,00±0,03	2,04±0,01	2,27±0,05
Antiok. akt. DPPH (mmol TE/100 mL) ^e	0,71±0,01	0,71±0,02	0,69±0,01	0,70±0,01	0,70±0,01	0,69±0,02
Šećeri-reducirajući (g/L)	62,06±1,69	61,42±1,24	60,54±1,24	64,00±4,33	61,35±1,05	62,90±0,63
Šećeri-ukupni (g/L)	65,88±1,13	66,17±0,04	62,78±1,21	66,62±1,22	66,07±2,49	66,73±2,17

^asrednje vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija (SD)

^bGAE – ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)

^cCGE – ekvivalent cijanidin-3-glukozida (*engl. cyanidine-3-glucoside equivalent*)

^dCE – ekvivalent katehina (*engl. catechin equivalent*)

^eTE – ekvivalent trolox kiseline (*engl. trolox equivalent*)

Tablica 27 Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost permeata dobivenih postupkom nanofiltracije (NF) pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

Parametar ^a	NF45H	NF45BH	NF50H	NF50BH	NF55H	NF55BH
Topljiva suha tvar	0,8±0,01	1,0±0,01	0,9±0,01	0,9±0,01	0,9±0,01	0,8±0,01
Ukupna suha tvar	0,9±0,02	1,1±0,01	0,9±0,01	1,0±0,02	0,9±0,01	0,9±0,03
Kiseline (g/100 mL jabučne kiseline)	0,39±0,01	0,49±0,01	0,38±0,01	0,43±0,01	0,32±0,01	0,41±0,01
pH	2,85±0,01	2,99±0,01	2,85±0,01	2,98±0,01	2,85±0,01	2,93±0,01
Polifenoli (g GAE/L) ^b	0,09±0,01	0,09±0,01	0,05±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01	0,06±0,01
Flavonoidi (mg CE/mL) ^c	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
Antiok. akt. DPPH (mmol TE/100 mL) ^d	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01
Šećeri-reducirajući (g/L)	1,8±0,01	1,9±0,00	1,0±0,00	1,6±0,01	1,0±0,01	1,9±0,00
Šećeri-ukupni (g/L)	2,0±0,01	2,6±0,01	1,5±0,00	2,5±0,00	1,4±0,00	2,3±0,01

^asrednje vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija (SD)

^bGAE – ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)

^cCE – ekvivalent katehina (*engl. catechin equivalent*)

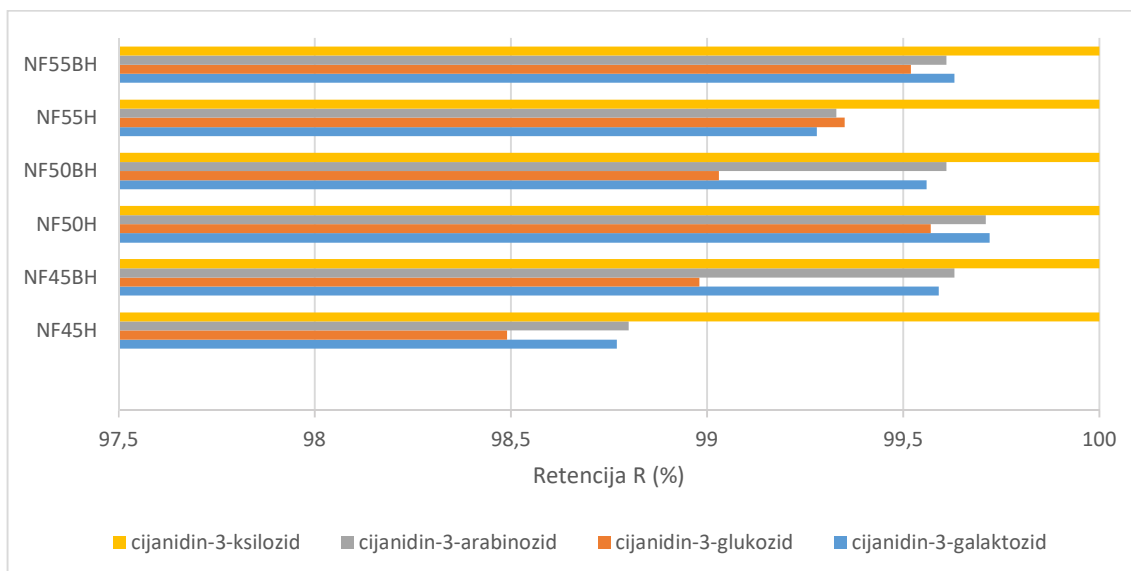
^dTE – ekvivalent trolox kiseline (*engl. trolox equivalent*)

Tablica 28 Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola u koncentratima od aronije dobivenim pri različitim procesnim uvjetima nanofiltracijom u usporedbi s početnim sokom od aronije.

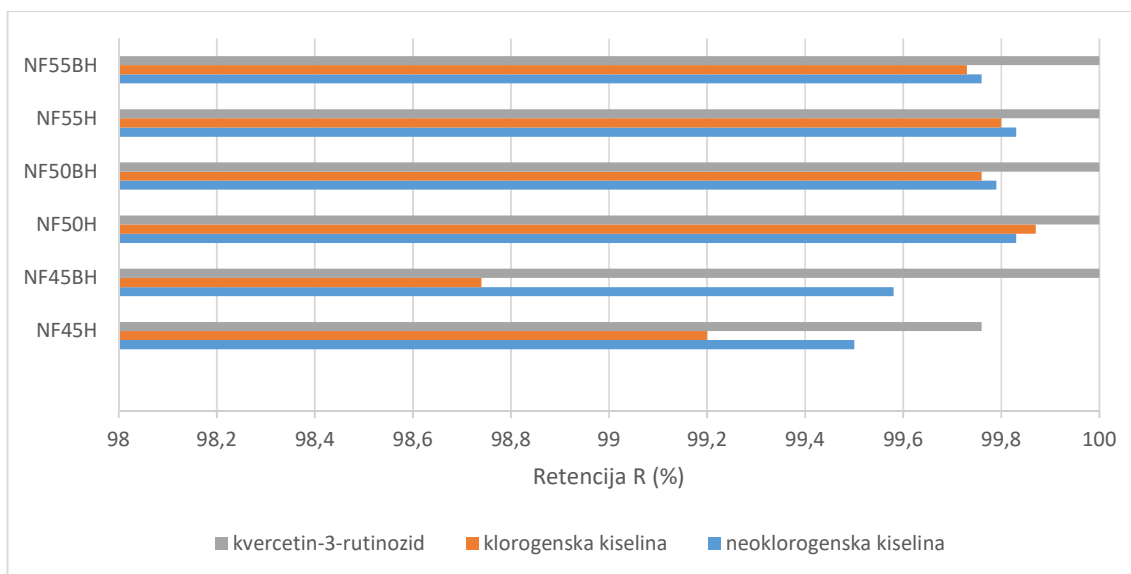
	Količina (mg/L)						
	Početni sok	45H	45BH	50H	50BH	55H	55BH
Antocijani							
Cijanidin-3-galaktozid	278,43±25,03 ^a	182,32±17,07 ^d	210,89±9,17 ^c	228,14±2,76 ^{b,c}	238,69±1,56 ^{a,b}	217,93±11,59 ^{b,c}	237,77±4,91 ^{a,b}
Cijanidin-3-glukozid	9,28±0,96 ^a	6,52±0,44 ^c	7,05±0,08 ^{b,c}	7,23±0,4 ^{b,c}	7,42±0,14 ^{b,c}	7,5±0,46 ^{a,b}	7,52±0,57 ^{a,b}
Cijanidin-3-arabinozid	78,47±4,27 ^a	45,19±4,67 ^e	52,31±3,66 ^{d,e}	56,81±1,1 ^{c,d}	64,55±0,11 ^b	57,19±3,74 ^{b,c,d}	62,67±2,33 ^{b,c}
Cijanidin-3-ksilozid	6,88±0,51 ^a	4,32±0,41 ^d	5,09±0,08 ^{c,d}	5,66±0,07 ^{b,c}	6,36±0,11 ^{a,b}	5,75±0,51 ^{a,b,c}	6,43±0,37 ^{a,b}
Ukupno	373,06±30,77 ^a	238,35±22,59 ^d	275,34±12,99 ^c	297,84±4,33 ^{b,c}	317,02±1,92 ^{a,b}	288,37±16,3 ^{b,c}	314,39±8,18 ^{a,b}
Fenolne kiseline							
Neoklorogenska kiselina	426,57±0,98 ^a	375,01±11,64 ^{b,c}	400,98±10,34 ^{a,b}	355,51±6,40 ^c	377,42±27,62 ^{b,c}	377,49±1,42 ^{b,c}	402,08±8,07 ^{a,b}
Klorogenska kiselina	370,06±3,29 ^a	343,53±18,17 ^{a,b}	354,07±6,07 ^{a,b}	310,59±3,25 ^c	323,95±12,66 ^{b,c}	348,45±17,58 ^{a,b}	351,41±9,01 ^{a,b}
Flavonoli							
Kvercetin-3-rutinozid	107,13±5,08 ^a	91,73±8,33 ^{a,b,c}	100,21±5,71 ^a	79,95±5,08 ^c	86,01±4,12 ^{b,c}	93,93±4,66 ^{a,b}	94,89±4,86 ^{a,b}
Kvercetin	0,27±0,23 ^a	<lod**	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
Ukupno	904,03±9,58 ^a	810,27±38,14 ^{b,c,d}	855,26±22,12 ^{a,b}	746,05±14,73 ^d	787,38±44,40 ^{c,d}	819,87±23,66 ^{a,b,c}	848,38±21,94 ^{a,b,c}
UKUPNO	1277,09±40,35 ^a	1048,62±60,73 ^c	1130,60±35,11 ^{b,c}	1043,89±19,06 ^c	1104,40±46,32 ^{b,c}	1108,24±39,96 ^{b,c}	1162,77±30,12 ^{a,b}

**<lod: limit detekcije, H-s hlađenjem, BH-bez hlađenja.

Vrijednosti u istom redu s različitim eksponentima (a-d) su statistički značajno različite (P < 0,05) ANOVA, Fisher's LSD.

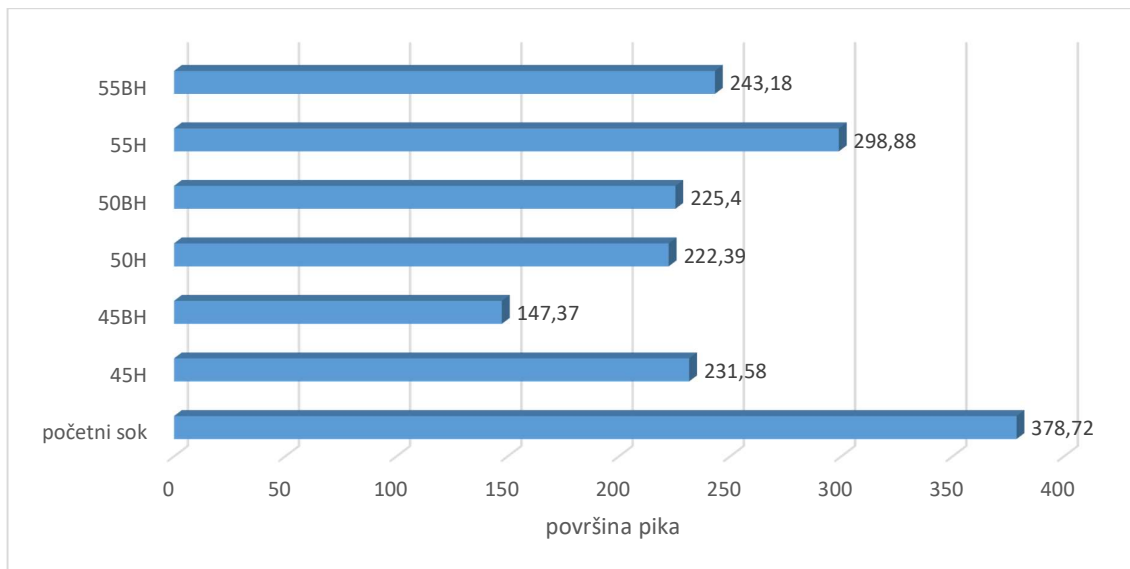


Slika 48 Retencija karakterističnih antocijana u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

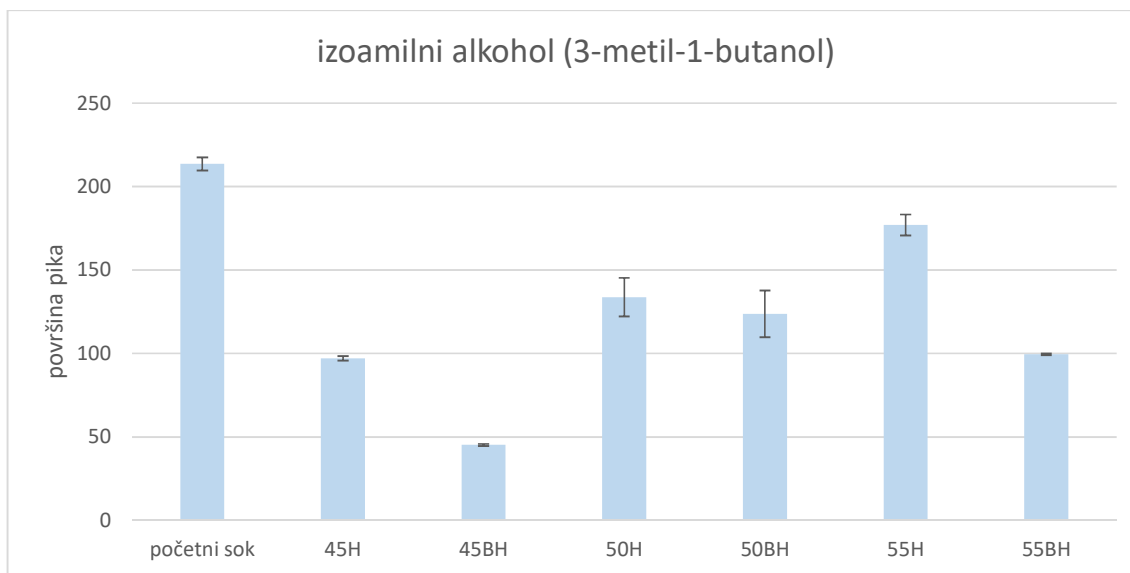


Slika 49 Retencija fenolnih kiselina i flavonola u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja (BH)).

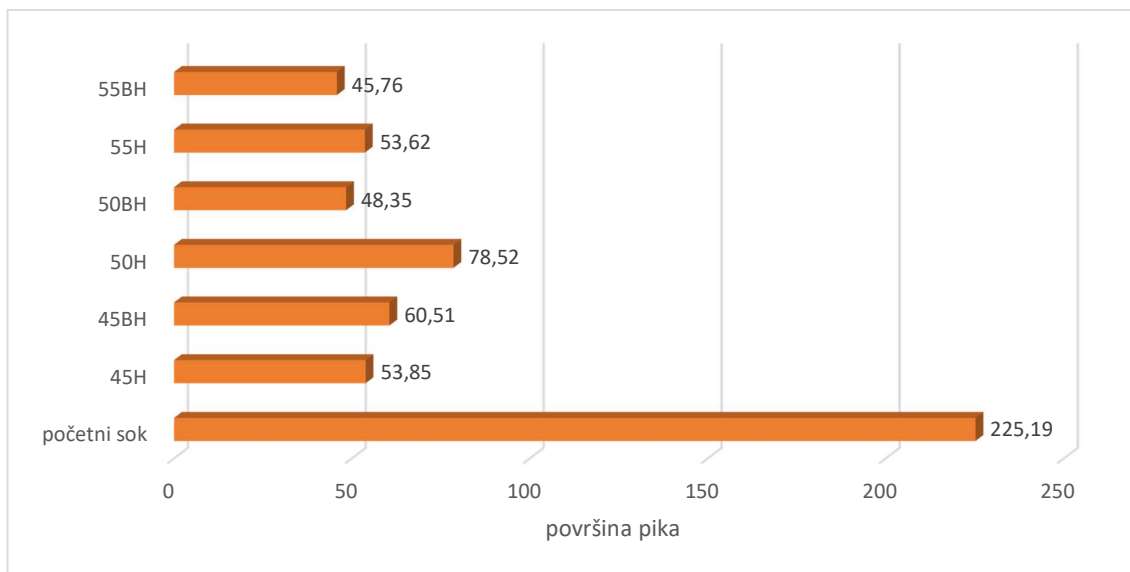
4.3.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje arome



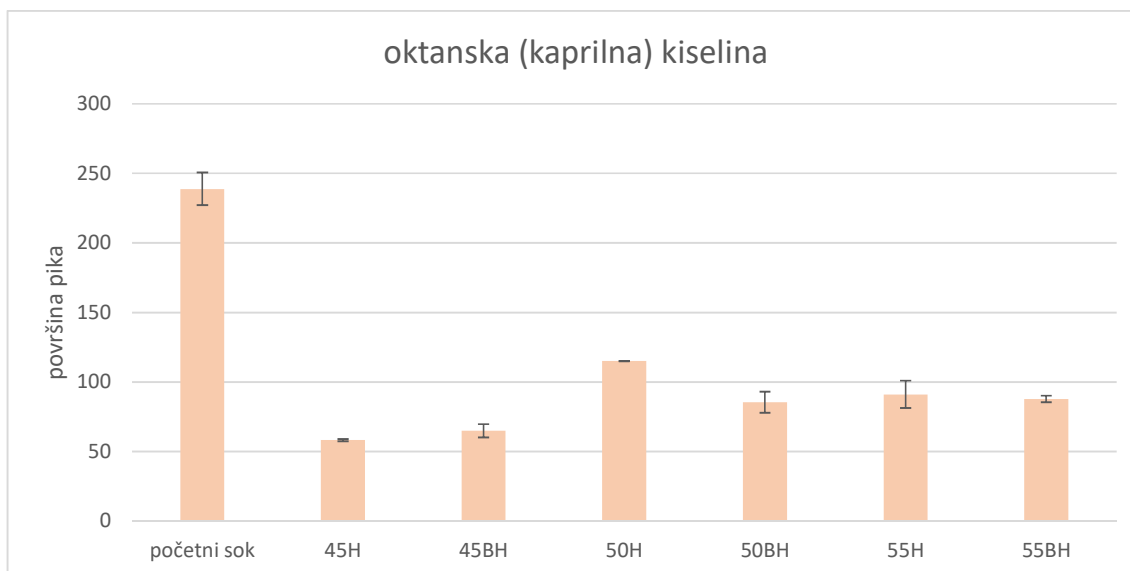
Slika 50 Zadržavanje alkohola u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



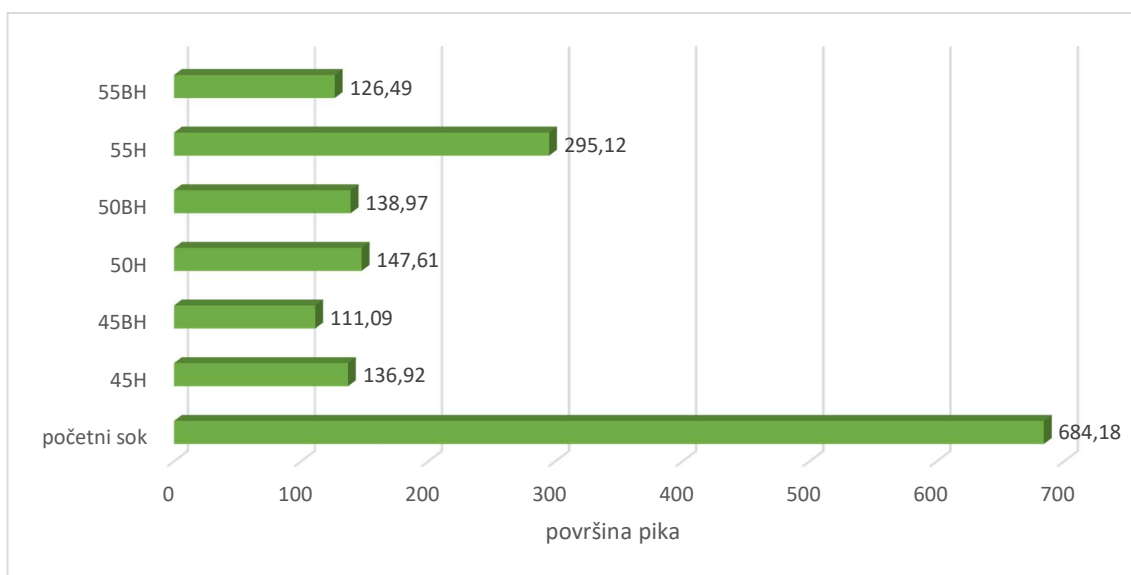
Slika 51 Zadržavanje izoamilnog alkohola u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



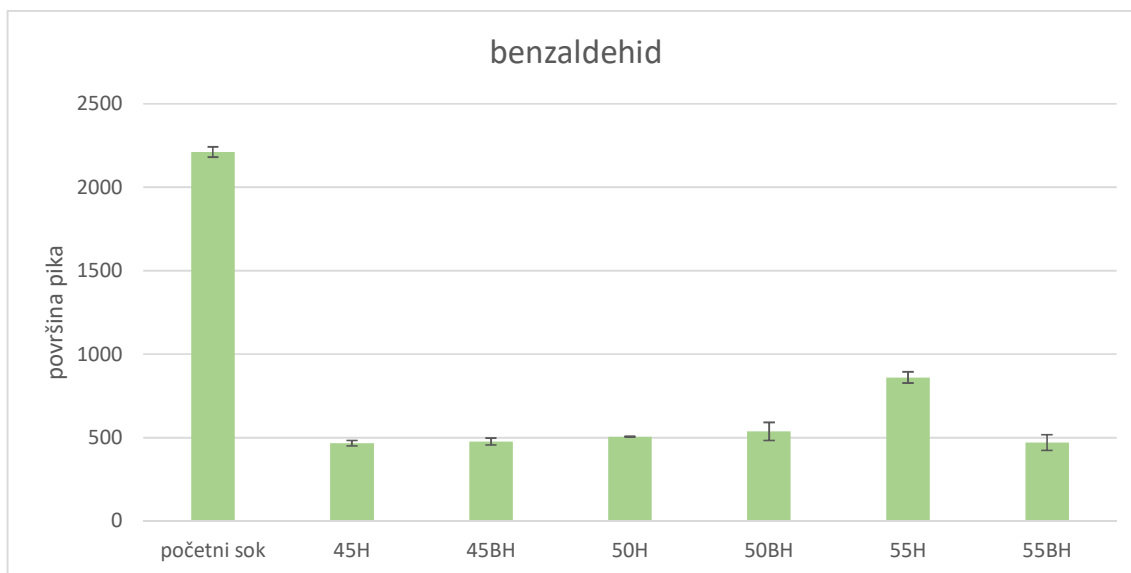
Slika 52 Zadržavanje kiselina u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



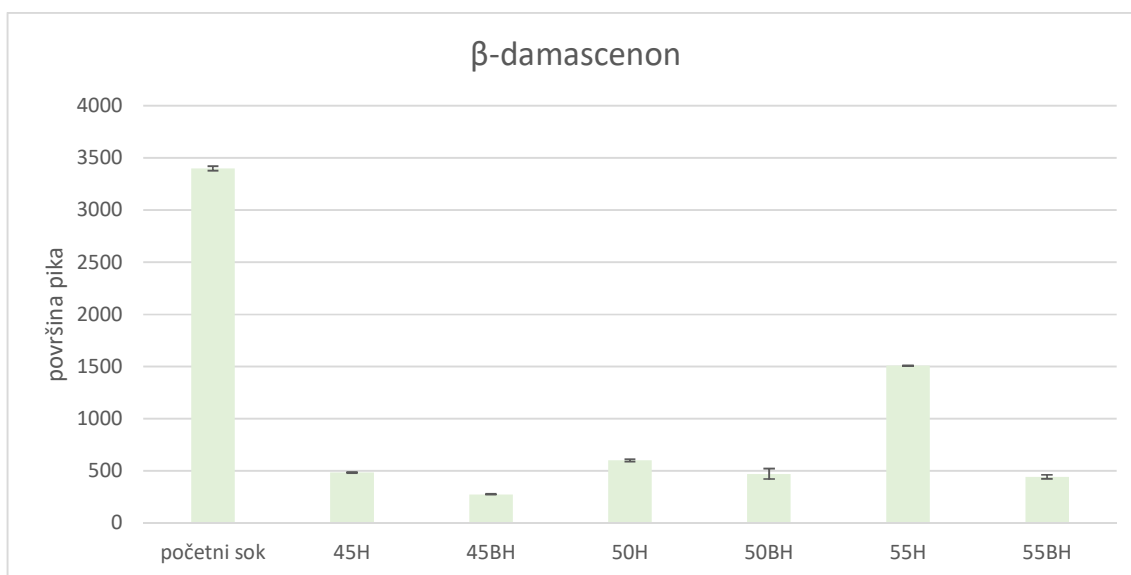
Slika 53 Zadržavanje kaprilne kiseline u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



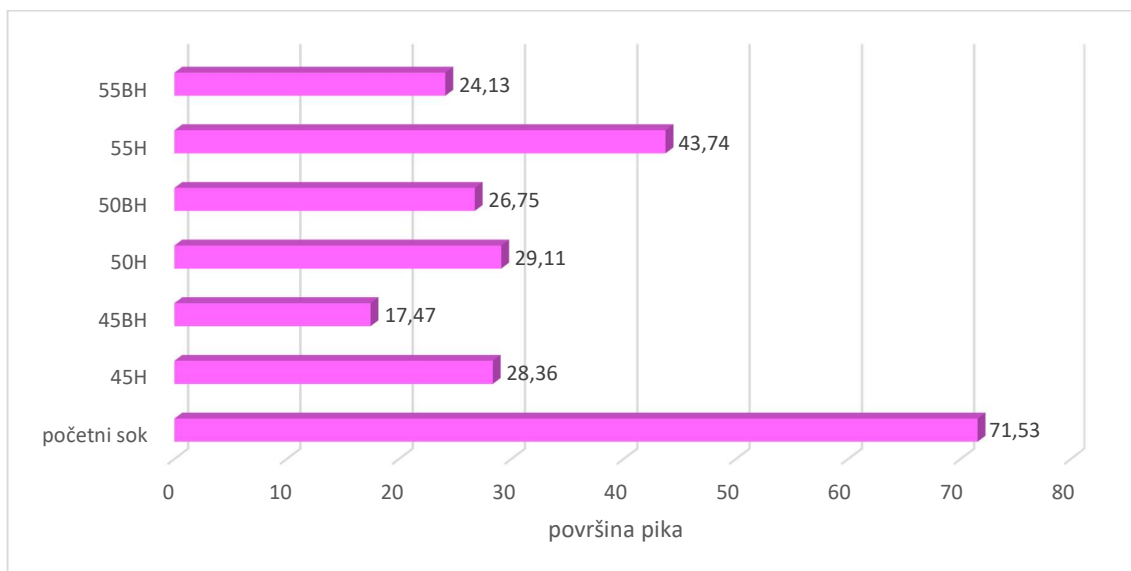
Slika 54 Zadržavanje karbonilnih spojeva u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



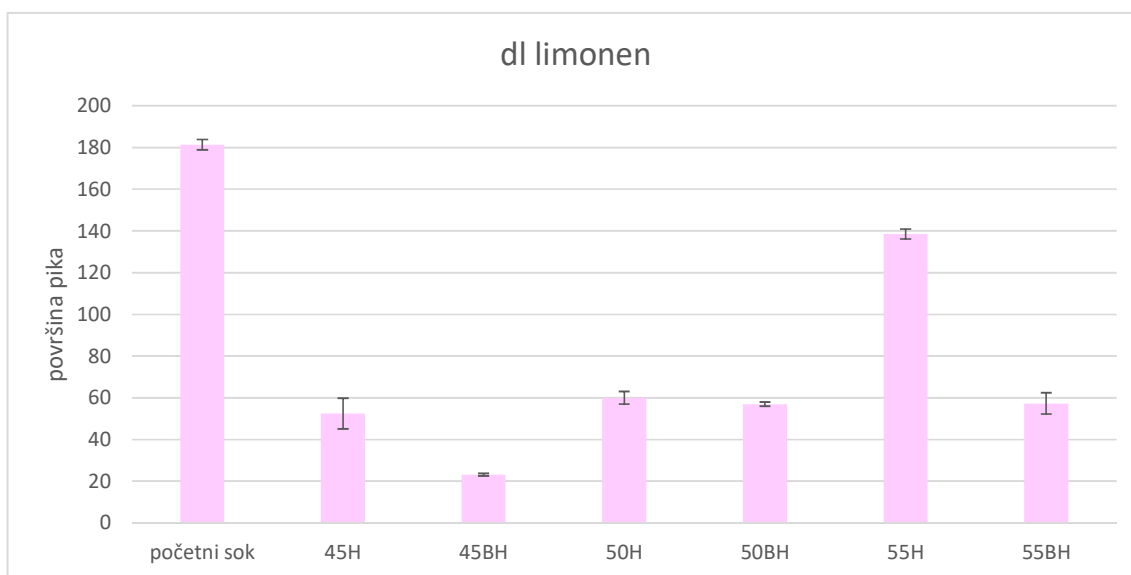
Slika 55 Zadržavanje benzaldehida u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



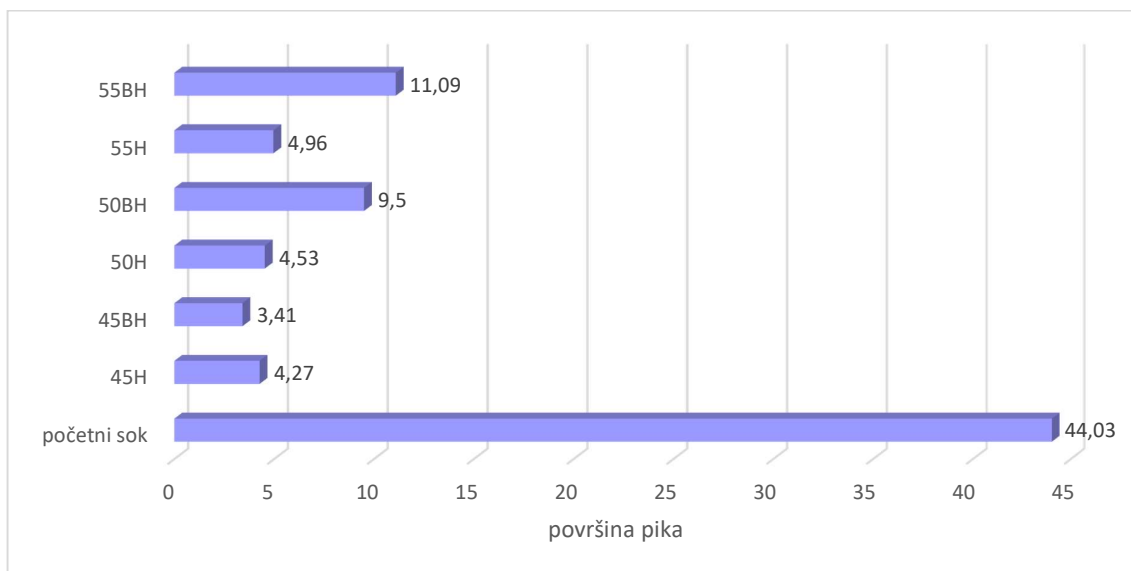
Slika 56 Zadržavanje β -damascenona u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



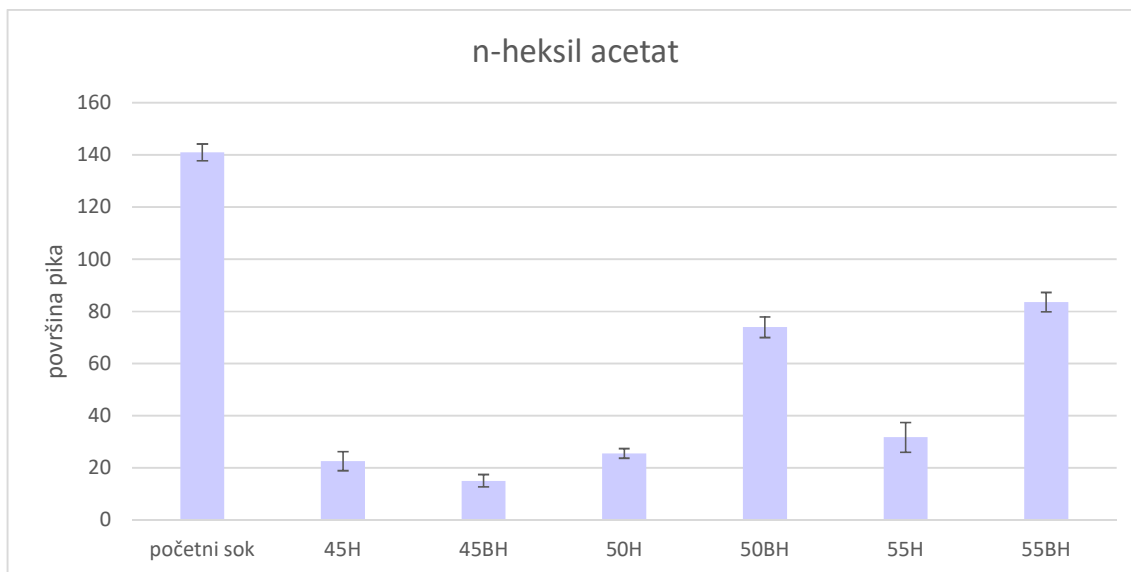
Slika 57 Zadržavanje terpenoida u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



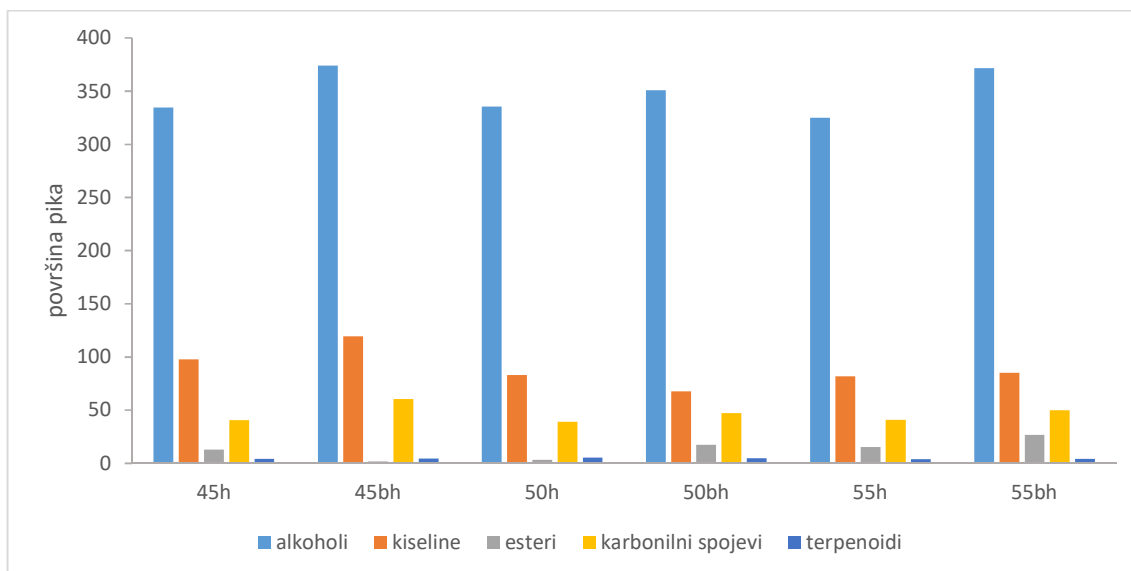
Slika 58 Zadržavanje dl limonena u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).



Slika 59 Zadržavanje estera u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).

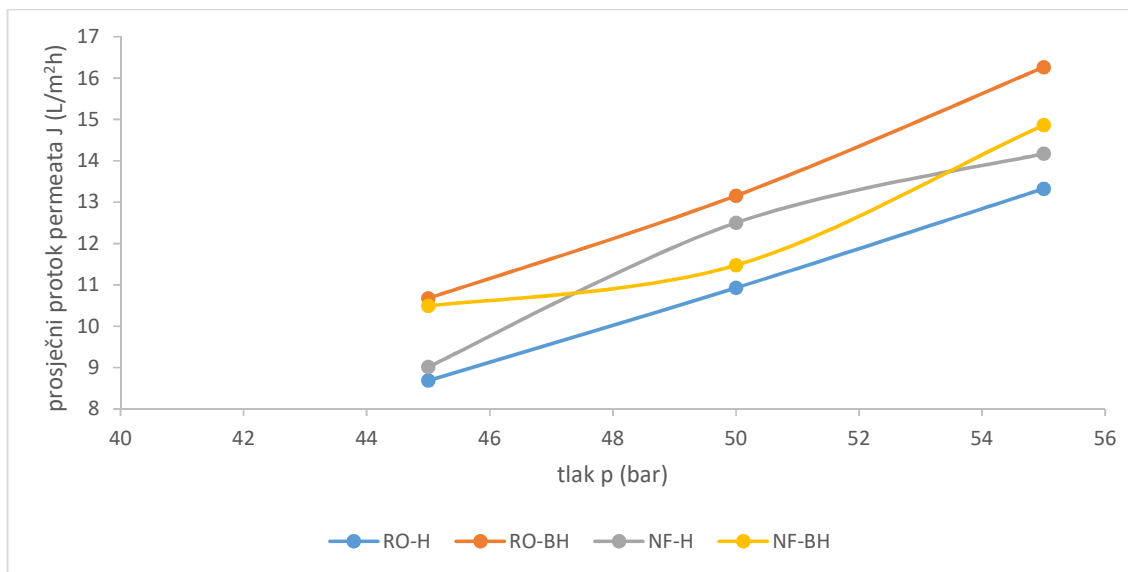


Slika 60 Zadržavanje n-heksil acetata u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).

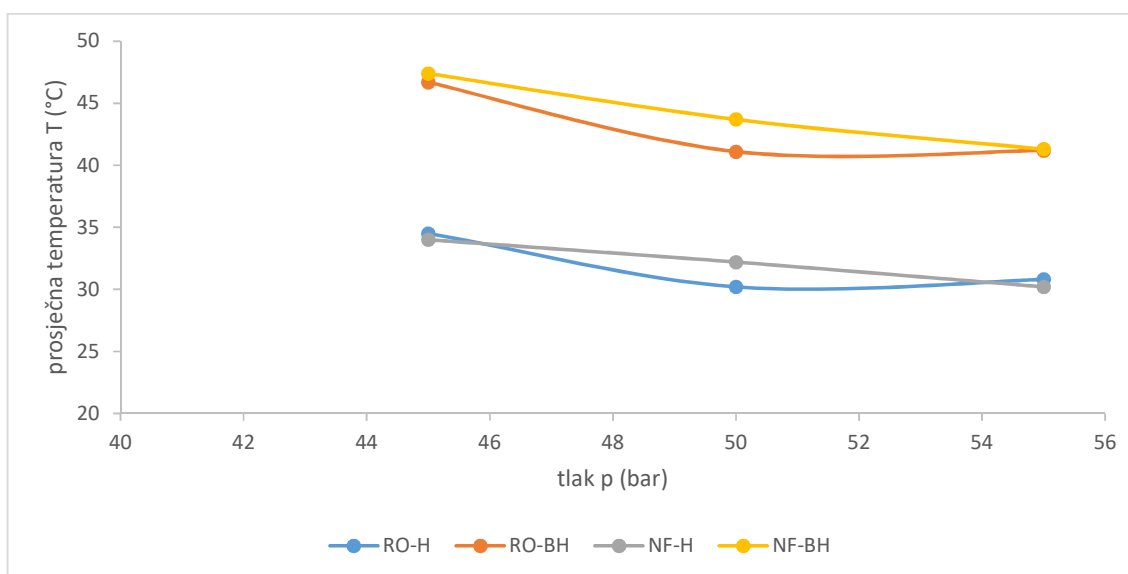


Slika 61 Sadržaj pojedine skupine aromatskih spojeva (alkoholi, kiseline, terpenoidi, esteri i karbonilni spojevi) u permeatima dobivenim koncentriranjem soka od aronije nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara) i temperature (s hlađenjem (H) i bez hlađenja(BH)).

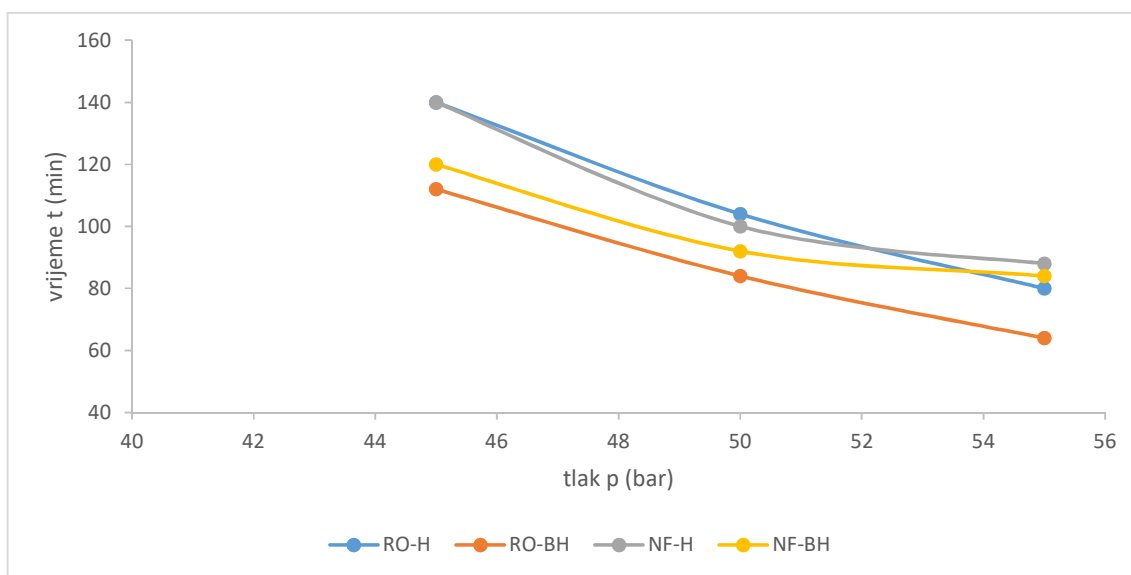
4.4. USPOREDBA PROVEDENIH PROCESA MEMBRANSKE FILTRACIJE



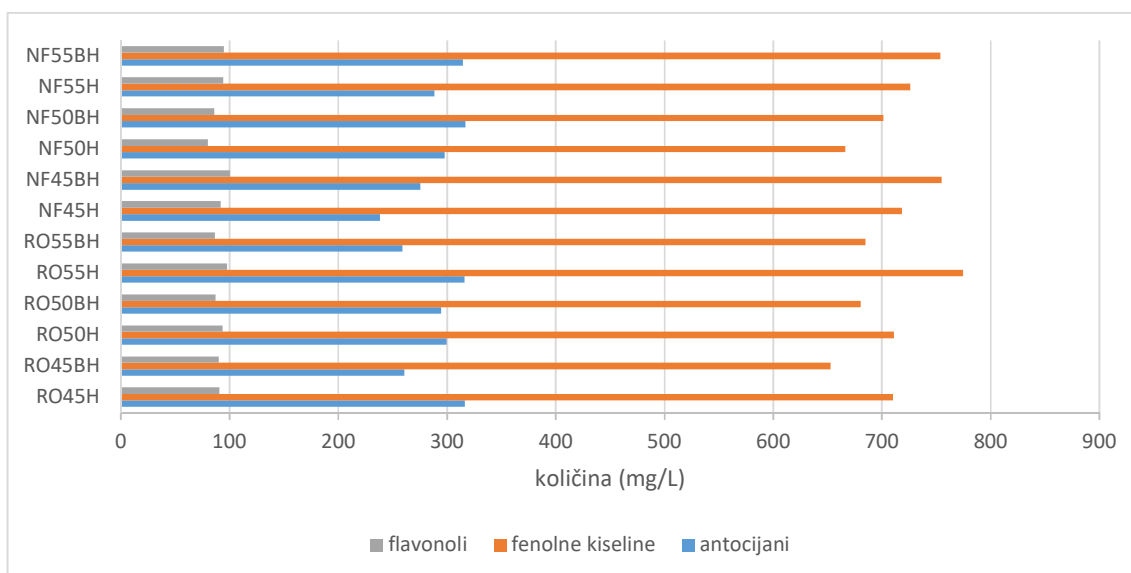
Slika 62 Prosječni protok permeata kod koncentriranja soka od aronije membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).



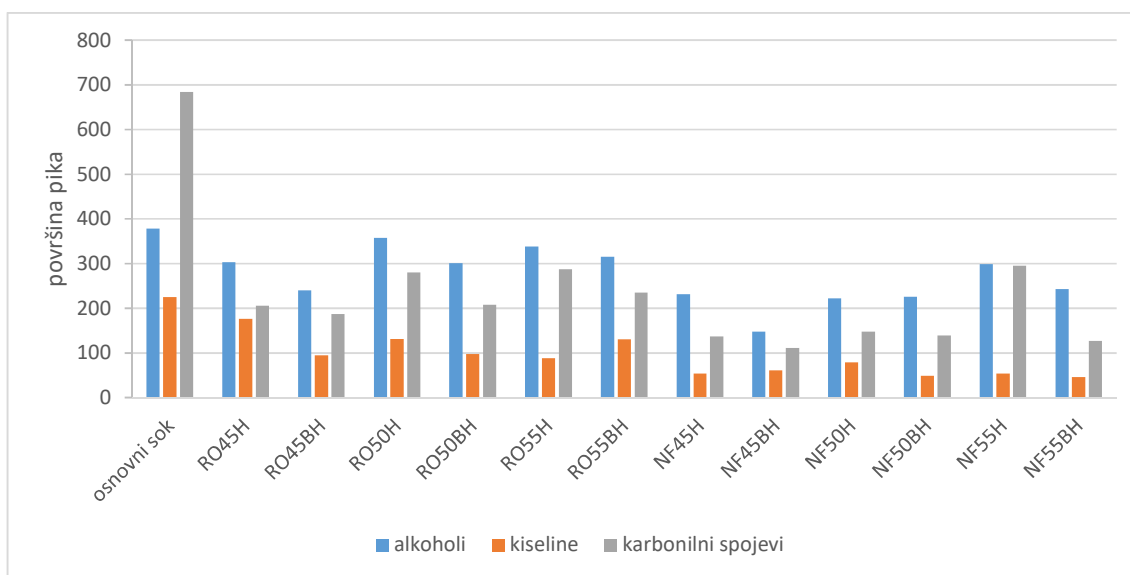
Slika 63 Temperatura retentata na kraju procesa koncentriranja soka od aronije membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).



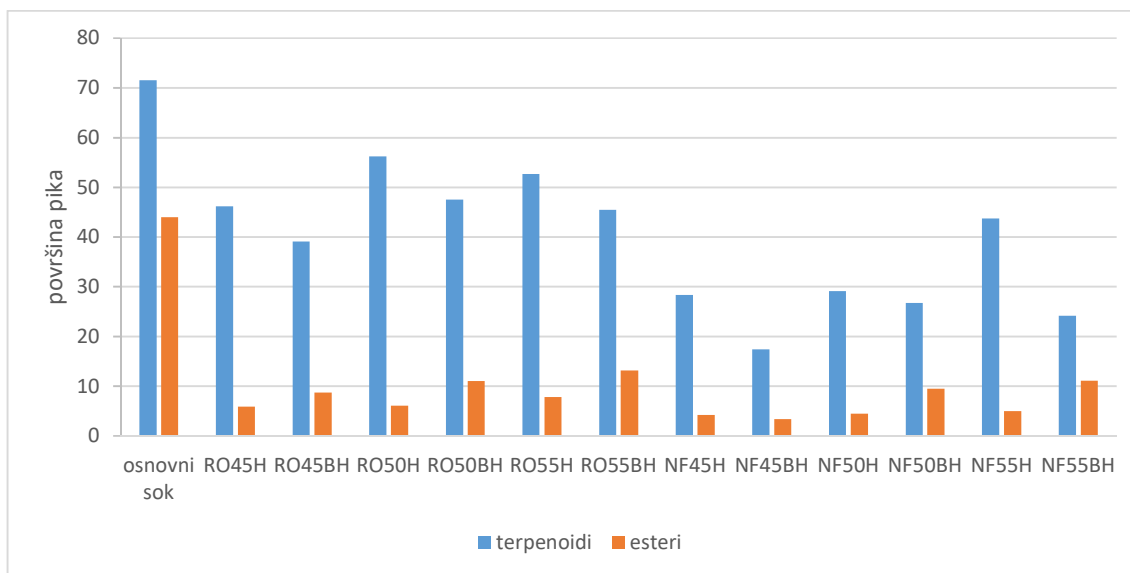
Slika 64 Usporedba vremena trajanja procesa koncentriranja soka od aronije membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).



Slika 65 Usporedba sadržaja pojedinih polifenolnih skupina u koncentratima od aronije dobivenim membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).



Slika 66 Usporedba sadržaja pojedine skupine aromatičnih spojeva (alkoholi, kiseline i karbonilni spojevi) u koncentratima od aronije dobivenim membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).



Slika 67 Usporedba sadržaja pojedine skupine aromatičnih spojeva (terpenoidi i esteri) u koncentratima od aronije dobivenim membranskim procesima, reverznom osmozom (RO) i nanofiltracijom (NF) pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem(H) i bez hlađenja retentata (BH).

5. RASPRAVA

Koncentriranje voćnih sokova uparavanjem je jedan od procesa konzerviranja u prehrambenoj industriji koji se upotrebljava već dugi niz godina. Uz mnogobrojne prednosti jedan od najvećih nedostataka ovog procesa je značajan gubitak arome i osjetljivih, a nutritivno vrlo značajnih sastojaka namirnica kao što su antocijani i vitamini. Stoga se provode mnogobrojna istraživanja kako bi se primijenili drugi postupci koncentriranja i mogući gubitci sveli na minimum. Neki od alternativnih postupaka koncentriranja su koncentriranje zamrzavanjem, perevaporacija i membranski procesi.

Predmet istraživanja ove disertacije bio je utvrditi mogućnost primjene membranskih procesa, reverzne osmoze i nanofiltracije, u svrhu koncentriranja soka od aronije do najvećeg udjela suhe tvari kojega je moguće postići navedenim postupcima uz minimalnu degradaciju visokokvalitetnih sastojaka samoga soka. Zbog jednostavnijeg praćenja opisa dobivenih rezultata ovo poglavlje podijeljeno je u potpoglavlja sukladno grafičkim i tabličnim prikazima rezultata u poglavlju **Rezultati**.

5.1. UZORAK PRIJE KONCENTRIRANJA

Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost pasteriziranog soka od aronije prije koncentriranja membranskim procesima prikazana je u **Tablici 10**. Dobivene vrijednosti su u skladu s podacima objavljenim u literaturi (Kulling i Rawel, 2008.; Ara, 2002.; Wiese i sur., 2008.). Udio suhe tvari u soku je nešto manji u odnosu na prosječne literaturne podatke (Wiese i sur., 2008.). To se može pripisati klimatskim uvjetima koji su prevladavali 2014. godine (iako je bila ekstremno topla istovremeno je prevladavalo i izrazito kišno vrijeme (DHMZ, Prikazi br.26, 2015.)).

S obzirom na to da je aronija izrazito bogata polifenolima, određen je sadržaj pojedinih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s PDA detektorom. Pronađena su 4 antocijana (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid i cijanidin-3-ksilozid), 2 fenolne kiseline (klorogenska i neoklorogenska), te dva flavonoida (kvercetin i kvercetin-3-rutinozid) karakterističnih za aroniju (Braunlich i sur., 2013.; Jakobek, 2012.a; 2012.b; Oszmianski, 2005.). Na **Slikama 30 i 31** prikazani su karakteristični HPLC-PDA kromatogrami soka od aronije, prikazani pri 320 nm i 520 nm uz objašnjenje pojedinih pikova. Fenolne kiseline (klorogenska i neoklorogenska) su određene prema njihovim poznatim UV/Vis spektrima koji se kreću oko 315 nm. Flavonoli, kvercetin i kvercetin-3-rutinozid pokazuju tipičan maksimum pri 250 i 340-353 nm, a antocijani imaju dva maksimum spektra (prvi pri 278 nm, a drugi pri 505-512 nm). Dobiveni spektri su slični onima pronađenim u literaturi (Jakobek i sur., 2012.b; Slimestad i sur., 2005.) i onima od standarda. Sa **Slike 32** je vidljivo da su u ukupnoj količini polifenola u soku od aronije dobivenih HPLC metodom najzastupljeniji spojevi iz skupine fenolnih kiselina (neoklorogenska 33 % i klorogenska 29 %),

zatim spojevi iz skupine antocijana (cijanidin-3-galaktozid 22 %, cijanidin-3-arabinozid 6 %, cijanidin-3-glukozid 1 % i cijanidin-3-ksilozid 1 %), te je najmanje spojeva iz skupine flavonola (kvercetin-3-rutinozid 8 % i kvercetin 0,02 %). Dobiveni polifenolni profil odgovara podacima pronađenim u literaturi (Kulling i Rawel, 2008.; Jakobek i sur., 2012.b; Kokotkiewicz i sur., 2010.). Aronija je izvrstan prehrambeni izvor antocijana (5,000 - 10,000 mg/kg svježeg voća) u usporedbi s drugim bobičastim voćem (Neveu i sur., 2010.)

Kao što se može vidjeti u **Tablici 11** u pasteriziranom soku od aronije prije postupaka koncentriranja identificirano je dvadeset četiri aromatična sastojaka. Radi boljeg prikaza i uočavanja razlika u zadržavanju pojedinih identificiranih aromatičnih sastojaka, sastojci su podijeljeni u pet skupina. To su alkoholi, kiseline, esteri, karbonilni spojevi i terpenoidi. Vrlo je malo objavljenih literaturnih podataka o aromatskom profilu aronije (Hirvi i Honkanen, 1985.; Dolezal i sur., 2003.; Kraujalyte i sur., 2013.; Balcerk, 2010.; Butorova i sur., 2016.). Aronija nije izrazito aromatična voćna vrsta, već je mnogo značajnija zbog svog polifenolnog sadržaja i sastava.

5.2. REVERZNA OSMOZA

5.2.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata

Utjecaj procesnih parametara (tlaka i temperature) na protok permeata kod koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom prikazan je u **Tablicama 12-17** i na **Slici 33**. Koncentriranje je provedeno pri tri različita tlaka (45, 50 i 55 bara) i dva temperaturna režima (s hlađenjem retentata i bez hlađenja retentata preko izmjenjivača topline). Maksimalni udio topljive suhe tvari, određen refraktometrijski (TSSC), koji se primjenom membrane AlfaLaval RO98pHt mogao postići u svim provedenim postupcima bio je 24,9 %. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Ganorkar i sur., 2012.; Jesus i sur., 2007.; Jiao i sur., 2004.). Početni volumen soka od aronije u svim pokusima bio je 4 L. Nakon koncentriranja dobiveno je 1,89 L koncentrata (retentata) i 2,11 L permeata u svim provedenim postupcima, što odgovara volumnom odnosu retentata od 2,12.

Iz **Tablica 12-17** može se vidjeti utjecaj volumnog odnosa retentata i indeksa koncentriranja retentata na protok permeata kod koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri tlakovima 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem i bez primjene hlađenja. Iz dobivenih i izračunatih podataka može se vidjeti da se povećanjem volumnog odnosa retentata i indeksa koncentriranja retentata protok permeata proporcionalno smanjuje. To je u skladu s istraživanjem Gurak i sur. (2010.) Spomenuti autori su istraživali koncentriranje soka od grožđa pomoću istih membrana (AlfaLaval RO98pHt) koje su upotrebljene u ovoj disertaciji, te su zaključili da s povećanjem udjela suhe tvari u retentatu dolazi do smanjenja protoka permeata.

Sličan zaključak dobiven je i u drugim istraživanjima (Jesus i sur., 2007.; Pap i sur., 2009.). To je klasično ponašanje koje se može objasniti pomoću pojave polarizacije koncentracije na površini membrane, fenomena začepijivanja pora membrana i porasta osmotskog tlaka i viskoziteta soka zbog povećanja (koncentriranja) udjela suhe tvari u retentatu (Gurak i sur., 2010.). Polarizacija koncentracije predstavlja omjer između koncentracije otopljene tvari na površini membrane i u dobavnoj struji. Ako vrijednost faktora polarizacije poraste znatno iznad 1, bit će u velikoj mjeri smanjen prolaz otapala kroz membranu, a isto tako i zadržavanje otopljene tvari. Faktor polarizacije ovisi o uvjetima toka pored membrane, viskoznosti otopine, o toku kroz membranu i zadržavanju otopljene tvari, odnosno raste s porastom viskoznosti i prolaza kroz membranu, a pada sa smanjenjem zadržavanja otopljene tvari (Lovrić, 1994.). S obzirom na eksperimentalne uvjete u istraživanju nije se mogla odrediti polarizacija koncentracije, pa je smatrano da su glavni otpori permeaciji zbog same membrane. Povećanje osmotskog tlaka i viskoznosti soka tijekom procesa dovodi do smanjenja pokretačke sile i povećanja otpora prijenosu mase, što u konačnici dovodi do smanjenja volumnog protoka permeata.

Tijekom procesa koncentriranja dolazi do pada volumnog protoka permeata. Pri tlaku 45 bara s hlađenjem protok se kretao od početnih 12,07 L/m²h do 5,21 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 12,95 L/m²h do 6,51 L/m²h. Pri tlaku 50 bara s hlađenjem protok se kretao od početnih 14,68 L/m²h do 7,03 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 14,25 L/m²h do 8,70 L/m²h. Dok se pri tlaku 55 bara s hlađenjem kretao od 15,98 L/m²h do 9,14 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 21,16 L/m²h do 11,42 L/m²h. Iz navedenoga se također vidi da povećanjem radnoga tlaka s 45 bara na 55 bara dolazi do značajnog povećanja protoka permeata, osobito u početku procesa koncentriranja. Također u procesu bez hlađenja je zabilježen veći protok nego u procesima s hlađenjem. Najveći prosječni protok permeata zabilježen je u procesu pri 55 bara bez hlađenja i iznosio je 16,26 L/m²h, dok je najmanji bio pri 45 bara s hlađenjem (8,69 L/m²h).

Pozderović i sur. (2006.a; 2006.b; 2007.) proveli su istraživanje utjecaja tipa membrane, procesnih parametara, tipa i veličine molekula na protok permeata tijekom koncentriranja modelnih otopina alkohola, estera i aldehida reverznom osmozom. Istraživanje je pokazalo da tip membrane, procesni parametri (tlak i temperatura retentata), te tip i veličina molekula imaju značajan utjecaj na protok permeata tijekom procesa koncentriranja. Santana i sur. (2011.) koncentrirali su sok od grožđa pri tri različita tlaka (40, 50 i 60 bara) i različitim temperaturama (20 °C, 30 °C, 40 °C i 50 °C) i zabilježili najveći protok permeata pri najvećem ispitivanom tlaku (60 bara) i najvećoj temperaturi (50 °C).

Das Gupta i Jayarama (1996.) koncentrirali su sok od lubenice reverznom osmozom pri 50 bara primjenom poliamidnih kompozitnih membrana. Prosječni volumni protok permeata u

njihovom istraživanju je iznosio 15,2 L/m²h, a sok su koncentrirali od 6,5 % do 24 % Brix, što odgovara volumnom odnosu retentata od 3,1. Gomes i sur. (2011.) proveli su slično istraživanje ali pri većem procesnom tlaku (60 bara) i koncentrirali sok od lubenice do 30 % Brix. Couto i sur. (2011.) su proveli koncentriranje soka od ananasa reverznom osmozom do 31 °Brix i zabilježili prosječni protok od 9,3 L/m²h.

Na **Slici 33** prikazan je utjecaj volumnog odnosa retentata na indeks koncentriranja u retentatu kod koncentriranja soka od aronije pri tlakovima 45, 50 i 55 bara s hlađenjem i bez hlađenja. Na skupinu navedenih podataka dodana je linearna linija trenda i dobivena jednadžba pravca $y=80,377x+17,481$. Povećanjem volumnog odnosa retentata gotovo linearno se povećava i indeks koncentriranja u retentatu ($r^2=0,9857$). U ovom slučaju primjena hlađenja nema značajnijeg utjecaja kao kod drugih prethodno ispitivanih odnosa.

U svim provedenim procesima primijećen je sličan trend smanjenja protoka permeata tijekom vremena trajanja procesa koncentriranja soka od aronije. Povećanjem procesnog tlaka smanjuje se vrijeme trajanja procesa koncentriranja jer se povećava volumni protok permeata. Proces pri 45 bara s hlađenjem je trajao najduže (140 min), dok je proces pri 55 bara bez hlađenja bio čak 76 min kraći od njega. Kod svih ispitivanih tlakova, pri istom tlaku, procesi s hlađenjem trajali su duže od procesa bez hlađenja (28 min duže kod 45 bara do 16 min kod 55 bara).

Jesus i sur. (2007.) koncentrirali su sok od naranče reverznom osmozom (membrane HR98PP) pri tri različita tlaka (20, 40 i 60 bara) i zaključili da povećanjem radnog tlaka raste volumni protok permeata, a tijekom trajanja procesa dolazi do njegovog pada kako se povećava udio suhe tvari u retentatu. Najveći udio suhe tvari postigli su u procesu pri 60 bara (36 % Brix).

Sok od aronije koncentriran je od početnih 13 % Brix do maksimalnih 24,9 % Brix. Povećanje udjela suhe tvari (TSSC) u retentatu tijekom procesa koncentriranja, pri svim ispitivanim tlakovima i temperaturnim režimima, također utječe na smanjenje volumnog protoka permeata.

Početna temperatura soka u svim izvedenim pokusima bila je 10 °C. Tijekom procesa koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom dolazi do zagrijavanja soka. Temperature na kraju procesa bez hlađenja znatno su više (56 °C) u odnosu na procese s hlađenjem (35 - 40 °C) kod svih ispitivanih tlakova. Pri radu s vrlo visokim tlakovima razvija se veća količina topline koja se u pokusu s hlađenjem retentata odvodila hlađenjem preko izmjenjivača topline, no unatoč tome nije se uspjelo odvesti svu toplinu koja nastaje u procesu pa je stoga i konačna temperatura kod pokusa s hlađenjem bila viša u odnosu na početnu temperaturu soka. Prosječni procesni kapacitet se može povećati primjenom veće temperature ulaznog soka. Sheu i Wiley (1983.) su ustanovili da se povećanjem temperature za 1 °C procesni kapacitet

može povećati za 3 do 4 %. Međutim, pri većoj temperaturi i koeficijent permeabilnosti membrane je veći, a sukladno tome koeficijent difuzije u otopini raste a smanjuje se koeficijent viskoznosti (Alvarez i sur., 1998.). Pri visokim temperaturama može se oštetiti membrana i doći do degradacije osjetljivih sastojaka soka kao što su antocijani, pa je hlađenje neophodno. U budućim istraživanjima namjerava se poboljšati sustav hlađenja kako bi se uspjela održati početna temperatura soka konstantnom.

5.2.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva

Kemijski sastav, sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost koncentrata od aronije dobivenih postupkom reverzne osmoze pri različitim procesnim uvjetima tlaka i temperature prikazan je u **Tablici 18**. Iz rezultata je vidljivo da je između pojedinih koncentrata vrlo mala razlika u sadržaju kiselina, reducirajućih i ukupnih šećera, te pH vrijednosti. Sadržaj kiselina u koncentratima je bio nešto manji (0,83-0,89 g/100 mL jabučne kiseline) u odnosu na početni sok od aronije (0,93 g/100 mL jabučne kiseline). Nešto veća količina kiselina je pronađena u procesima bez hlađenja u odnosu na procese s hlađenjem kod istog ispitivanog tlaka. To se može objasniti činjenicom da su procesi bez hlađenja trajali znatno kraće od procesa s hlađenjem. Najveći sadržaj kiselina je pronađen u koncentratu dobivenom pri 45 bara bez hlađenja, stoga se može zaključiti da na zadržavanje kiselina najveći utjecaj imaju primijenjeni tlak i vrijeme trajanja procesa. Najveće zadržavanje reducirajućih i ukupnih šećera primijećeno je u koncentratima dobivenim u procesima pri većim tlakovima (50 bara s hlađenjem i 55 bara bez hlađenja). Svi ispitivani parametri su u koncentratima nešto niži u odnosu na početni sok od aronije što znači da je tijekom procesa koncentriranja došlo do određenih gubitaka.

Jesus i sur. (2007.) istraživali su koncentriranje soka od naranče reverznom osmozom. U dobivenim koncentratima su primijetili manje gubitke vitamina C i šećera. Vrlo male količine vitamina C i suhe tvari su pronašli i u permeatima. Razlog tome je selektivnost upotrebene membrane (95 % NaCl). Povećanjem procesnoga tlaka povećala se i retencija (zadržavanje) ispitivanih parametara.

Početni sok od aronije s kojim je provedeno istraživanje je sadržavao 4 g/L ukupnih polifenola (**Tablica 10**). Tijekom procesa koncentriranja dolazi do određenih gubitaka polifenola. U procesima s hlađenjem je primijećeno veće zadržavanje ukupnih polifenola (**Tablica 18**). Također je zamijećeno da se s povećanjem procesnog tlaka (45 bara do 55 bara), bez obzira na temperaturni režim, povećava i zadržavanje ukupnih polifenola. U istraživanju Gurak i sur. (2010.) su zaključili da je koncentrat od grožđa s najvećim udjelom polifenola i antocijana dobiven u procesu reverzne osmoze pri visokom tlaku (60 bara) i niskoj temperaturi (20 °C).

Sličan trend je primijećen i kod antocijana, flavonoida i degradacije antocijana. Tako je u procesu 55 bara bez hlađenja veće zadržavanje nego u procesima pri nižim tlakovima s hlađenjem. Najboljim postupkom se pokazao proces koncentriranja reverznom osmozom pri 55 bara s hlađenjem u kojem je najveće zadržavanje ukupnih polifenola (3,87 g/L), antocijana (352,3 mg/l) i flavonoida (2,27 mg kat/mL) te najmanja degradacija antocijana (22,30 %) u odnosu na početni sok od aronije. To znači da se zadržalo 96,75 % ukupnih polifenola, 95,35 % ukupnih antocijana i 90,8 % ukupnih flavonoida. Sadržaj monomernih antocijana određen pH diferencijalnom metodom ovisio je o primijenjenom tlaku, temperaturi tijekom procesa i vremenu trajanja procesa. Njihov sadržaj u koncentratima je varirao od 270,10 do 352,3 mg CGE/L. Glavna razlika između sadržaja monomernih antocijana i ostalih ispitivanih parametara (ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijske vrijednosti) je u činjenici da je najmanja količina antocijana pronađena u koncentratu dobivenom pri 50 bara bez hlađenja. Najmanja količina ukupnih polifenola, flavonoida i najniža antioksidacijska aktivnost je zabilježena u koncentratu dobivenom pri 45 bara bez hlađenja. Iz navedenoga proizlazi da osim visoke temperature i visoki procesni tlak utječe na degradaciju antocijana. Degradacija antocijana odnosno sadržaj polimerne boje predstavlja udio boje koju čini polimerni materijal. Termička degradacija antocijana dovodi do pojave polimernih pigmenata, posebno u prisutnosti kisika (Rimac-Brnčić i sur., 2015., Danisman i sur., 2015.; Poiana i sur., 2013.). Porast sadržaja polimerne boje u koncentratima odgovara smanjenju sadržaja antocijana u istim koncentratima, a kretao se od 22,3 (55 bara uz hlađenje) do 37,08 % (50 bara bez hlađenja). Niže koncentracije antocijana u soku od aronije mogu biti uzrokovane procesima bistrenja ili pasterizacije (Tolić i sur., 2015.). Očuvanje antocijana je bitno zbog održavanja boje proizvoda. Stabilnost antocijana ovisi o kemijskom sastavu proizvoda, pa se tako npr. povećanom metilacijom i glikozilacijom povećava njihova stabilnost (Delgado-Vargas i sur., 2000.). Pozitivan utjecaj na očuvanje boje ima i kopigmentacija tj. stvaranje kompleksa antocijana s proteinima, drugim flavonoidima i polisaharidima koji su u tom obliku manje podložni degradaciji uzrokovanoj promjenom pH vrijednosti. Povišena temperatura, prisutnost kisika mogu dovesti do razgradnje antocijana i stvaranja smeđih produkata (Francis, 1989.; Wrolstad i sur., 2000.).

Vrijeme berbe bobica aronije također utječe na sadržaj polifenola, šećera i antioksidacijsku aktivnost u soku od aronije, dok stabilnost antocijana pri pH 4,5 ostaje gotovo nepromijenjena (Bolling i sur., 2015.).

Nekoliko je autora proučavalo stabilnost polifenolnih komponenti (antocijani, proantocijani) tijekom procesiranja bobičastog voća, između ostaloga i aronije, u sok u laboratorijskim (White, 2011.; Skrede, 2000.) i tvorničkim uvjetima (Mayer-Miebach i sur., 2012.). Različiti čimbenici, uključujući temperaturu, vrijeme trajanja procesiranja i procesi predobrade voća utječu na

zadržavanje polifenolnih spojeva u soku. U prethodno navedenim istraživanjima se pokazalo da su polifenolne komponente dosta stabilne jer dolazi samo do manjih gubitaka tijekom procesa prerade bobica u sok.

Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom imala je sličan trend kretanja kao i prethodno komentirane polifenolne komponente. U svim koncentratima dobivenim reverznom osmozom je određena manja antioksidacijska aktivnost u usporedbi s početnim sokom od aronije (0,82 mmol(Trolox)/100 mL). U procesima koncentriranja s većim tlakom i s primjenom hlađenja zadržavanje antioksidacijske aktivnosti (0,79 mmol (Trolox)/100 mL pri 55 bara s hlađenjem). Istraživanja bazirana na DPPH metodi pokazala su da metanolni ekstrakti aronije imaju veću antioksidacijsku aktivnost od borovnice, maline i jagode (Espin i sur., 2000.; Jakobek i sur., 2007.). Također, antioksidacijska aktivnost ekstrakta aronije se pokazala većom od antioksidacijske aktivnosti sintetičkih antioksidanasa (butilhidroksitoluena i butilhidroksianisola), ali slabijom u odnosu na α -tokoferol (Espin i sur., 2000.).

Aronija je izniman antioksidans, te kao takva sprječava stvaranje slobodnih radikala i „napad“ na zdrave stanice u tijelu i krvnoj plazmi, usporavajući time proces starenja organizma i sprječavajući razvoj kroničnih bolesti (Lima i sur., 2014.; Sharif i sur., 2012.; Rice-Evans i sur., 1997.). Prisutnost velike količine spojeva iz skupine polifenola, aroniju čine najjačim poznatim antioksidansom današnjice. Zbog svega gore navedenoga pri procesiranju aronije vrlo je bitno očuvati njezin izvorni sastav u što većoj mjeri.

U **Tablici 19** i na **Slikama 34-35** prikazan je sadržaj pojedinih polifenolnih spojeva (antocijana, fenolnih kiselina i flavonola) u koncentratima od aronije dobivenim pri različitim procesnim uvjetima reverzne osmoze u usporedbi s početnim sokom od aronije. Iz **Slike 34** se može vidjeti da su fenolne kiseline najdominantnija polifenolna skupina u početnom soku od aronije i dobivenim koncentratima. Koncentriranjem soka od aronije reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima dolazi do određenih gubitaka unutar pojedinih polifenolnih skupina (antocijani, fenolne kiseline i flavonoli) u odnosu na početni sok (**Slika 35**). Također se vidi da je veće zadržavanje (retencija) fenolnih kiselina u odnosu na antocijane i flavonole.

Sadržaj pojedinih polifenolnih spojeva je prikazan u **Tablici 19**. Dominantne fenolne kiseline u soku i koncentratima su klorogenska i neoklorogenska kiselina. Količina klorogenske kiseline se kretala između $318,19 \pm 7,19$ – $352,34 \pm 6,82$ mg/L u koncentratima i $370,06 \pm 3,29$ mg/L u početnom soku od aronije. Neoklorogenske kiseline je pronađeno nešto više $426,57 \pm 0,98$ u početnom soku i $334,52 \pm 11,72$ – $422,32 \pm 2,05$ mg/L u koncentratima. U literaturi se navodi da je u aroniji i proizvodima od aronije uglavnom veća količina klorogenske od neoklorogenske kiseline (Oszmianski i Wojdylo, 2005.; Ochmian i sur., 2009.; Ochmian i sur., 2012.; Jakobek i sur., 2012.b). U istraživanju Taheri i sur. (2013.) su pronašli veći udio neoklorogenske od

klorogenske kiseline u crnoj sorti *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, te Slimstad i sur. (2005.) u norveškoj crnoj aroniji, i to 1,23 (neoklorogenska kiselina) i 0,61 mg/g FW (klorogenska kiselina). Hellstrom i sur. (2013.) također navode da je sok od aronije sadržavao veći udio neoklorogenske (13,8 mg/100 mL) od klorogenske (9,9 mg/100 mL).

Kvercetin-3-rutinozid je najznačajniji flavonol pronađen u soku i koncentratima od aronije (107,13±5,08 mg/L u soku i 86,37±1,61 – 97,69±1,26 mg/L u pojedinim koncentratima). Veće zadržavanje kvercetin-3-rutinozida je zapaženo u koncentratima dobivenim s hlađenjem. Kvercetin je u koncentratima dobivenim reverznom osmozom pronađen ispod praga kvantifikacije. Početni sok ga je sadržavao 0,27±0,23 mg/L.

Cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid su najznačajniji antocijani pronađeni u soku i koncentratima. Ukupno gledajući najveće zadržavanje antocijana je postignuto u procesima pri 45 bara s hlađenjem (316,5±10,4 mg/L) i 55 bara s hlađenjem (316,27±23,9 mg/L) između kojih nema statistički značajne razlike u količini ukupnih antocijana. U svim procesima s hlađenjem je zabilježena veća količina ispitivanih spojeva u odnosu na procese bez hlađenja pri istom procesnom tlaku. Male količine cijanidin-3-glukoizida i cijanidin-3-ksilozida su također identificirane u soku i koncentratima. Veće zadržavanje je također primijećeno u procesima s hlađenjem, te pri nižem procesnom tlaku (45 bara). Antocijani su izrazito nestabilni i podložni degradaciji. Na stabilnost boje antocijana utječe nekoliko čimbenika kao što su pH, njihova kemijska struktura i koncentracija, temperatura skladištenja, svjetlost, kisik, prisutnost enzima, flavonoida, proteina i metalnih iona (Rein, 2005.). Stabilnost se može povećati uklanjanjem kisika i inaktivacijom enzima. U proizvodima od bobičastog voća stabilnost je obično pojačana prisutnošću prirodnih fenolnih kopigmenata, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi (Gonzalez-Manzano i sur., 2009.; Rein, 2005.). Antocijani su stabilni u kiseloj sredini, međutim prilikom procesiranja i skladištenja mogu se pretvoriti u bezbojne spojeve, te postepeno i u netopive smeđe pigmente (Arslan, 2015.). Termičko tretiranje i temperatura skladištenja imaju značajnu ulogu u stabilnosti antocijana (Zorić i sur., 2014.).

Najveće zadržavanje ukupnih antocijana (316,27±23,9 mg/L), te fenolnih kiselina i flavonoida (670,03±13,88 mg/L) je postignuto u procesu pri 55 bara s hlađenjem u odnosu na početni sok od aronije. Najveći gubitak kako pojedinačnih tako i ukupnih polifenolnih komponenti je zamijećen pri tlaku 55 i 45 bara bez hlađenja.

5.2.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari arome

Gubitak aromatičnih spojeva tijekom procesa koncentriranja voćnih sokova procesom uparavanja na klasičnim uparivačima je gotovo 90 %. Iako se dio arome može rekuperirati pomoću rektifikacijske kolone (Karlsson i sur., 1995.) gubitci su još uvijek značajni. Današnja istraživanja usmjerena su na mogućnosti primijene različitih novih tehnika za rekuperaciju

arome poput: pevaporacije, ekstrakcije superkričnim tekućinama, adsorpcije (Saffarionpour i Ottens, 2017.), osmotske destilacije i vakuumske membranske destilacije (Hasanoglu i sur., 2012., Bagger-Jorgensen i sur., 2011.).

Koncentriranjem voćnih sokova reverznom osmozom i nanofiltracijom postignuto je znatno veće zadržavanje arome (Alvarez i sur., 1997.; Alvarez i sur., 2001.; Ferrarini i sur., 2001.; Medina i Garcia, 1998.). Veće zadržavanje aromatičnih spojeva je primijećeno pri upotrebi kompozitnih HR membrana prilikom procesa koncentriranja voćnog soka (Chou i sur., 1991.; Das Gupta i Jayarama, 1996.; Sheu i Wiley, 1983.). Konja i Clauss (1991.) su zabilježili zadržavanje arome od 88 % primjenom kompozitnim membrana HR98. Pozderović i Moslavac (1999.) su u radu prikazali mogućnost primjene reverzne osmoze u koncentriranju kondenzata arome jabuke dobivenog tijekom klasičnog procesa uparavanja na uparivačima.

Najveći dio svih aromatičnih sastojaka prisutan je u osnovnom soku od aronije, dok je u koncentratima dobivenim postupcima reverzne osmoze došlo do većih ili manjih gubitaka (**Slika 36-46**). U osnovnom soku od aronije među hlapivim komponentama je najviše bilo iz skupine karbonilnih spojeva (48,64 %), zatim alkohola (26,21 %), kiselina (16,01 %), terpena (6,51 %) i estera (2,63 %). Među karbonilnim spojevima prema površini pikova najzastupljeniji su bili β -damascenon i benzaldehid. Većina identificiranih aromatičnih spojeva u soku od aronije su najvjerojatnije produkti enzimske degradacije masnih kiselina (3-heksenol, 2-heksenol, 2-heksenal, nonanal, n-heksil acetat) i produkti razgradnje aminokiselina (benzaldehyd). Identificirani aromatični spojevi iz skupine terpena su uglavnom monoterpeni (dl limonen, geraniol, p-cimen) i oksidirani terpeni (linalool oksid, 1,8-cinol). Nepravilni terpeni, β -damascenon i 6-metil-5-hepten-2-on su najvjerojatnije derivati karotenoida nastali enzimskom reakcijom (Kraujayte i sur. 2013.). Koncentriranjem soka od aronije reverznom osmozom dolazi do njihovog značajnog smanjenja; benzaldehida za 50,02-58,72 % i β -damascenona za 65,99 - 87,98 %. Zbog toga u koncentratima ima najviše alkohola (41,12 - 45,26 %), zatim karbonilnih spojeva (27,86 - 37,07 %), kiselina (11,41 - 23,96 %), terpena (6,16 - 7,15 %) i najmanje estera (0,73 - 1,78 %). U svim koncentratima je značajno smanjena količina prisutnih aromatičnih spojeva iz skupine karbonilnih spojeva i terpena u odnosu na početni sok od aronije.

Iz skupine alkohola u radu je ispitivano djelovanje na izoamil alkohol, 3-heksenol, 2-heksenol, 2-etilheksanol, benzen metanol te benzen etanol. Navedeni sastojci zadržani su u svim koncentratima od aronije. Na **Slici 36** prikazano je zadržavanje alkohola u koncentratima dobivenim reverznom osmozom u odnosu na početni sok od aronije. Najveće zadržavanje postignuto je u procesu pri 50 bara uz hlađenje. Također je prikazano zadržavanje izoamilnog alkohola (**Slika 37**) kao pojedinog, karakterističnog spoja iz skupine alkohola. Značajan utjecaj na njegovo zadržavanje imali su primijenjeni radni tlak i proces hlađenja. U svim procesima s

hlađenjem postignuto je veće zadržavanje navedenog alkohola u odnosu na procese bez hlađenja. Sličan utjecaj imalo je i povećanje radnog tlaka, pa je najveće zadržavanje postignuto u procesu pri 55 bara uz hlađenje. Miris izoamilnog alkohola opisuje se kao gorak, miris na viski i alkohol (Carrau i sur., 2008.), te miris koji podsjeća na sir (Cheng i sur., 2015.).

U početnom soku od aronije i koncentratima identificirane su heksanska, oktanska, nonanska, dekanska kiselina i dodekanoinjska kiselina. To su zasićene monokarboksilne kiseline koje uglavnom imaju neugodan miris koji pri manjim koncentracijama podsjeća na sirni, a pri većim na užegao (Tao i Zhang, 2010.). Sadržaj kiselina u svim koncentratima značajno je manji u odnosu na početni sok od aronije (**Slika 38**). U procesima s hlađenjem (osim pri 55 bara) primijećeno je veće zadržavanje u odnosu na procese bez hlađenja. Najboljim se pokazao proces pri 45 bara s hlađenjem. Na **Slici 39** prikazano je zadržavanje oktanske (kaprilne) kiseline. Kao i kod ukupnih kiselina najboljim u smislu zadržavanja se pokazao proces pri 45 bara s hlađenjem. Tim procesom zadržano je 88,87 % kaprilne kiseline u odnosu na početni sok od aronije.

Zadržavanje karbonilnih spojeva (2-heksenal, 6-metil-5-hepten-2-on, nonanal, benzaldehid, vitispiran i β -damascenon) u koncentratima od aronije dobivenim reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima prikazano je na **Slici 40**. Koncentriranjem soka od aronije sadržaj karbonilnih spojeva u dobivenim koncentratima značajno je manji, i kretao se od 27,41 % u koncentratu dobivenom pri 45 bara bez hlađenja do 41,94 % u koncentratu dobivenom pri 55 bara s hlađenjem, u odnosu na sadržaj u početnom soku. Procesi s hlađenjem, pri istom ispitivanom tlaku, pokazali su se boljima u smislu većeg zadržavanja karbonilnih spojeva, također povećanjem radnog tlaka od 45 do 55 bara povećava se i zadržavanje. Na **Slikama 41-42** prikazano je zadržavanje benzaldehida i β -damascenona, kao karakterističnih aromatičnih spojeva iz skupine karbonilnih spojeva. Kod β -damascenona, koji je odgovoran za cvjetnu, voćnu aromu (Pineau i sur., 2007.), primjećen je značajan gubitak u koncentratima od aronije. U procesu koji se pokazao kao najbolji u smislu zadržavanja β -damascenona (55 bara uz hlađenje) zadržano ga je tek 34 %. U slučaju benzaldehida najboljim se pokazao proces pri 50 bara uz hlađenje (zadržavanje 56,15 %).

Iz skupine terpenoida ispitivano je zadržavanje sljedećih spojeva: dl limonena, 1,8-cinola, p-cimena, linalol oksida i geraniola (**Slika 43**). Procesi s hlađenjem su se pokazali boljima u smislu većeg zadržavanja, a najveće zadržavanje je postignuto pri 50 bara, gdje je zadržano 61,43 % terpenoida u odnosu na njihov sadržaj u početnom soku od aronije. Sličan trend može se vidjeti i kod dl limonena (**Slika 44**).

Na **Slici 45** prikazan je sadržaj estera u početnom soku od aronije te zadržavanje istih u koncentratima dobivenim reverznom osmozom. Iz skupine estera u radu je ispitivano

zadržavanje n-heksil acetata i etiloktanoata. Miris navedenih estera se uglavnom opisuje kao voćni, miris na krušku, ananas ili cvijeće (Jiang i Zhang, 2010.). Esteri su lako hlapivi i procesiranjem soka od aronije došlo je značajnih gubitaka u dobivenim koncentratima. Najmanji gubitak spojeva iz skupine estera je bio u koncentratu dobivenom pri 55 bara bez hlađenja. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 37,03 (najviše estera) u početnom soku od aronije pa do 5,89 (najmanje estera) u koncentratu dobivenom promjenom tlaka od 45 bara s hlađenjem (izraženo u površinama pikova). U procesima bez hlađenja, a pri istom procesnom tlaku, primijećeno je veće zadržavanje n-heksil acetata (**Slika 46**).

Na **Slikama 36-46** vidljivo je da tijekom koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima dolazi do određenog gubitka aromatičnih spojeva. Pri većem procesnom tlaku i u postupcima s hlađenjem je veće zadržavanje pojedine skupine aromatičnih spojeva (osim kod spojeva iz skupine estera) u odnosu na postupke bez hlađenja. Najveća retencija, s obzirom na ukupnu površinu pikova svih analiziranih aromatičnih spojeva, je postignuta kod postupka pri 50 bara s hlađenjem retentata.

5.3. NANOFILTRACIJA

5.3.1. Utjecaj procesnih parametara na protok permeata

Čimbenici koji utječu na selektivnost membrane za nanofiltraciju su: ulazne varijable kao što su koncentracija otopljene tvari u otopini, temperatura, pH i različiti procesi predobrade; zatim varijable same membrane kao što su tip polimernog materijala, geometrija modula i njegov razmještaj; te procesne varijable kao što su volumni protok permeata, radni tlak i vrijeme trajanja procesa (Ho i Sirkar, 1992.).

Na temeljnoj razini nanofiltracija je vrlo kompleksan proces. Razvijeno je nekoliko modela koji se mogu podijeliti na dva glavna tipa, a to su modeli ireverzibilne termodinamike i modeli transportnog mehanizma. Temeljni modeli proizašli iz ireverzibilne termodinamike su Kedem-Katchalsky model i Spiegler-Kedem model. Oni se upotrebljavaju za predviđanje transporta kroz nanofiltracijske membrane za jednostavne i binarne sustave, a u zadnje vrijeme i za višekomponentne sustave (Sabbaghi i sur., 2012.).

Utjecaj procesnih parametara (tlaka i temperature) na volumni protok permeata kod koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom prikazan je u **Tablicama 20-25** i na **Slici 47**. Koncentriranje je provedeno pri tri različita tlaka (45, 50 i 55 bara) i dva temperaturna režima (s hlađenjem retentata i bez hlađenja retentata preko izmjenjivača topline). Maksimalni udio topljive suhe tvari, određen refraktometrijski (TSSC), koji se primjenom membrane AlfaLaval NF mogao postići u svim provedenim postupcima bio je 26,9 %. Početni volumen soka od aronije u svim pokusima bio je 4 L. Nakon koncentriranja dobiveno je 1,67 L koncentrata

(retentata) i 2,33 L permeata u svim provedenim postupcima. Volumni odnos retentata, koji se definira kao odnos između volumena početnog soka i volumena koncentrata (retentata) koji se dobije na kraju procesa koncentriranja, iznosio je 2,39 što odgovara udjelu topljive suhe tvari (TSSC) od 26,9 %.

Iz **Tablica 20-25** može se vidjeti utjecaj volumnog odnosa retentata i indeksa koncentriranja retentata na protok permeata pri koncentriranju soka od aronije nanofiltracijom pri tlakovima 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem i bez primjene hlađenja. Usporedbom dobivenih i izračunatih podataka vidljivo je da se protok permeata smanjuje s povećanjem volumnog odnosa retentata i indeksa koncentriranja retentata. Sličan zaključak navode i drugi autori (Diaz-Reinoso i sur., 2009.; Aguiar Prudencio i sur., 2012.).

Na **Slici 47** prikazan je utjecaj volumnog odnosa retentata na indeks koncentriranja u retentatu kod koncentriranja soka od aronije pri tlakovima 45, 50 i 55 bara s hlađenjem i bez hlađenja. Na skupinu navedenih podataka dodana je linearna linija trenda i dobivena jednadžba pravca $y=79,088x+19,177$. Povećanjem volumnog odnosa retentata gotovo linearno se povećava i indeks koncentriranja u retentatu ($r^2=0,9906$). U ovom slučaju primjena hlađenja nema značajnijeg utjecaja kao kod drugih prethodno ispitivanih odnosa.

Tijekom procesa koncentriranja dolazi do pada volumnog protoka permeata, dok se povećanjem procesnog tlaka povećava volumni protok permeata (Hodur i sur., 2009.). Pri tlaku 45 bara s hlađenjem protok se kretao od početnih 11,67 L/m²h do 5,74 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 13,95 L/m²h do 6,71 L/m²h. Pri tlaku 50 bara s hlađenjem protok se kretao od početnih 14,68 L/m²h do 8,05 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 11,23 L/m²h do 8,76 L/m²h, dok se pri tlaku 55 bara s hlađenjem kretao od 18,14 L/m²h do 9,13 L/m²h, a pri istom tlaku ali bez hlađenja od 19,43 L/m²h do 9,61 L/m²h. Iz navedenoga se također vidi da povećanjem radnoga tlaka s 45 bara na 55 bara dolazi do značajnog povećanja protoka permeata, osobito u početku procesa koncentriranja. Također kod procesa bez hlađenja je zabilježen nešto veći protok nego u procesima s hlađenjem. Najveći prosječni protok permeata zabilježen je u procesu pri 55 bara bez hlađenja i iznosio je 14,86 L/m²h, dok je najmanji bio pri 45 bara s hlađenjem (9,02 L/m²h).

Vincze i sur. (2007.) su proveli istraživanje u kojem su koncentrirali sok od pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L) i zabilježili protok permeata od 14 L/m²h do 4,6 L/m²h, dok su Ferrarini i sur. (2001.) pri koncentriranju soka od grožđa nanofiltracijom zabilježili protok permeata od 7,41 L/m²h do 5,4 L/m²h.

Smanjenje volumnog protoka permeata do kojega dolazi tijekom procesa koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom se može objasniti nakupljanjem otopljenih tvari na površini membrane (što dovodi do začepljivanja pora membrane i pojave koncentracije polarizacije), te

povećanjem osmotskog tlaka i viskoznosti soka zbog povećanja udjela topljive suhe tvari. Pri istom ispitivanom tlaku, procesi s hlađenjem retentata su trajali nešto duže u donosu na procese bez hlađenja retentata. Povećanje radnoga tlaka od 45 bara do 55 bara dovodi do smanjenja vremena trajanja procesa. Proces pri 55 bara bez hlađenja je značajno kraći (84 minute) od procesa pri 45 bara bez hlađenja (120 minuta).

Membrane za nanofiltraciju imaju veći promjer pora (1 - 10 nm) za razliku od pora membrana za reverznu osmozu (< 1 nm), pa stoga pojedine male molekule i ioni mogu proći kroz njih i dobiveni permeat nije čista voda. U **Tablicama 20-25** također su prikazani podatci o permeabilnosti i retenciji tijekom svih ispitivanih procesa. Ovi parametri, retencija i permeabilnost, su obrnuto proporcionalni, što znači da se povećanjem permeabilnosti smanjuje retencija. Najveća permeabilnost (3,7 %) je primijećena pri 45 bara pri oba ispitivana temperaturna režima (s hlađenjem i bez hlađenja). Na kraju svih ostalih ispitivanih procesa permeabilnost je bila 3,4 % što odgovara retenciji od 96,7 %. To malo povećanje permeabilnosti pri 45 bara je vjerojatno posljedica duljeg trajanja procesa koncentriranja pri 45 bara. Duže procesiranje pri nižem tlaku je potrebno kako bi se postigao isti udio topljive suhe tvari (26,9 %) kao u procesima pri višem tlaku. Međutim, dužim procesiranjem se razvija i veća količina topline. Pri većoj temperaturi koeficijent permeabilnosti same membrane je veći (Alvarez i sur., 1998.).

Početna temperatura soka u svim ispitivanim procesima bila je 10 °C. Tijekom procesa koncentriranja soka od aronije nanofiltracijom dolazi do zagrijavanja soka. Temperature na kraju procesa bez hlađenja znatno su više (53 - 57 °C) u usporedbi s procesima s hlađenjem (35 - 44 °C) kod svih ispitivanih tlakova.

Općenito, volumni protok vode raste linearno s primijenjenim tlakom. Također se povećava s povećanjem temperature, s obzirom na to da se difuzivnost vode kroz membranu povećava, a viskoznost vode smanjuje s povećanjem temperature. Povećanje protoka vode može se opisati Arrheniusovom jednadžbom (temperaturna ovisnost konstante permeabilnosti vode) ili promjenama viskoznosti vode (Mehdizadeh i Dickson, 1991.). Protok vode je veći pri većem protoku ulazne otopine jer se smanjuje polarizacija koncentracije, a smanjuje se povećanjem koncentracije otopljene tvari u ulaznoj otopini (veća koncentracija rezultira i većim osmotskim tlakom, te manjom pokretačkom snagom kroz membranu). Takvo ponašanje predviđa većina transportnih modela. Protok vode se također postepeno smanjuje tijekom rada membrane zbog mehaničke kompresije i drugih fizikalnih i kemijskih promjena u strukturi membrane (Ho i Sirkar, 1992.).

5.3.2. Utjecaj procesnih parametara na kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i zadržavanje pojedinih polifenolnih spojeva

U **Tablici 26** prikazana je promjena kemijskog sastava, koncentracije antocijana i flavonoida, polimerne boje, koncentracije polifenola te antioksidacijske aktivnosti u koncentratima od aronije u ovisnosti o primijenjenom postupku koncentriranja nanofiltracijom (s hlađenjem ili bez hlađenja, te pri tlaku od 45, 50 i 55 bara).

Najveća količina topljive suhe tvari koja je postignuta u svim procesima koncentriranja nanofiltracijom bila je 26,9 %. Sadržaj kiselina u koncentratima je bio znatno manji u odnosu na početni sok od aronije (**Tablica 10**) i kretao se od 0,59 do 0,71 g/100 mL jabučne kiseline. Najmanja količina je pronađena u koncentratu od aronije dobivenom pri 45 bara bez hlađenja. Nešto veće količine su pronađene u koncentratima pri 55 bara i 50 bara bez hlađenja (0,71 g/100 mL jabučne kiseline). Takav rezultat je vjerojatno posljedica vremena trajanja procesa, procesi pri većem tlaku traju kraće, a posebno u procesima bez hlađenja, pa je i manji prolaz kiselina u permeat. Sličan trend je primijećen i kod kretanja sadržaja šećera (reducirajućih i ukupnih) u dobivenim koncentratima.

Rezultati pokazuju značajno smanjenje polifenola, flavonoida i antocijana u svim ispitivanim koncentratima. Povećanje procesnog tlaka od 45 bara do 55 bara dovodi do većeg zadržavanja polifenola i antocijana u koncentratima. Procesi koncentriranja bez primjene hlađenja pokazuju nešto bolje zadržavanje navedenih tvari boje.

Najbolji rezultati dobiveni su koncentriranjem pri tlaku 55 bara bez hlađenja. Koncentrat dobiven tim procesom imao je 3,77 g/L polifenola, 330,32 mg/L antocijana, te 2,27 g/L flavonoida. To znači da je 94,3 % polifenola, 89,4 % antocijana i 90,8 % flavonoida zadržano u odnosu na početni sok. Iz rezultata se može vidjeti da promjena polimerne boje slijedi trend promjene koncentracije antocijana. Veća koncentracija antocijana daje veću polimernu boju. Polimerna boja predstavlja udio boje polimeriziranog materijala koji je nastao raspadom antocijana (Poiana i sur., 2005.). S obzirom na njihovu veliku reaktivnost, antocijani se lako prevode u bezbojne i nepoželjne smeđe obojene spojeve. Temperatura, pH, svjetlo, kisik, enzimi, askorbinska kiselina i vodikov peroksid imaju značajan utjecaj na stabilnost antocijana (Moldovan i sur., 2012.).

Iz **Tablice 26** također je vidljivo da nema statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti među ispitivanim koncentratima. Antioksidacijska aktivnost nešto je niža (0,69 – 0,71 mmol TE/100 mL) u odnosu na početni sok od aronije (0,82 mmol TE/100 mL).

Najveće zadržavanje polifenola zamijećeno je pri tlaku od 45 bara bez hlađenja. Iz rezultata može se zaključiti da je pri većim tlakovima, bez obzira na primjenu hlađenja, degradacija

polifenola izraženija u odnosu na niže primijenjene tlakove. Koncentriranje bez hlađenja trajalo je znatno kraće u odnosu na proces s hlađenjem, tako da je degradacija i propusnost pojedinih komponenata bila manja.

U **Tablici 27** prikazan je kemijski sastav, sadržaj polifenola i flavonoida, te antioksidativna aktivnost u permeatima dobivenim pri koncentriranju soka od aronije nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima (s hlađenjem ili bez hlađenja, te pri tlaku od 45, 50 i 55 bara). U permeatima je određena mala količina suhe tvari (oko 1 %). Među određivanim sastojcima pronađene su male količine kiselina, šećera, polifenola i flavonoida. Veći sadržaj kiselina je pronađen u permeatima iz procesa bez hlađenja. Sadržaj kiselina u permeatima se kretao od 0,317 g/100 mL jabučne kiseline (55 bara s hlađenjem) do 0,498 g/100 mL jabučne kiseline (45 bara bez hlađenja). Mala količina polifenola (0,05 – 0,08 g GAE/L) i flavonoida (0,01–0,02 mg CE/mL) također je nađena u permeatima. Zabilježeno je i malo antioksidacijsko djelovanje u svim permeatima. Koncentraciju antocijana nije bilo moguće odrediti uz pomoć pH diferencijalne metode.

Sadržaj pojedinih polifenolnih spojeva (antocijani, flavonoli i fenolne kiseline) u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima tlaka (45, 50 i 55 bara i temperature (s hlađenjem i bez hlađenja retentata) je prikazan u **Tablici 28**, a retencija pojedinih spojeva na **Slikama 48-49**.

Početni sok od aronije i koncentrat dobiveni nanofiltracijom su sadržavali smjesu 4 različita cijanidin glikozida: 3-galaktozid, 3-arabinozid, 3-ksilozid i 3-glukozid. Takav sastav antocijana je karakterističan za aroniju i u skladu je s drugim autorima (Jakobek i sur., 2012.b; Mayer-Miebach i sur., 2012.; Oszmianski i Wojdylo, 2005.). Cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid su pronađeni u znatno većim količinama u odnosu na cijanidin-3-ksilozid i cijanidin-3-glukozid. Količine pojedinih antocijana u dobivenim koncentratima su bile manje u odnosu na početni sok od aronije. Tijekom procesiranja soka dolazi do degradacije i gubitka određene količine antocijana. Mala količina antocijana je prošla kroz membranu i pronađena je u permeatu. Bolje zadržavanje (retencija) pojedinih antocijana u koncentratima je zapaženo pri većem primijenjenom procesnom tlaku (50 i 55 bara) i u procesima bez hlađenja retentata. Najveće količine cijanidin-3-galaktozida (238,69 mg/L) i cijanidin-3-arabinozida (64,55 mg/L) su pronađene u koncentratu dobivenom pri 50 bara bez hlađenja, dok su najveće količine cijanidin-3-glukozida (7,52 mg/L) i cijanidin-3-ksilozida (6,43 mg/L) su pronađene u koncentratu dobivenom pri 55 bara bez hlađenja. Ukupno gledajući, najveća količina antocijana (317,02 mg/L) je pronađena u koncentratu pri 50 bara bez hlađenja.

Od fenolnih kiselina ispitivan je sadržaj klorogenske i neoklorogenske kiseline. Najveće zadržavanje klorogenske kiseline (354,07 mg/L) je primijećeno u koncentratu dobivenom pri

45 bara bez hlađenja, dok je najveće zadržavanje neoklorogenske kiseline (402,08 mg/L) pri 55 bara bez hlađenja. Općenito, veće zadržavanje fenolnih kiselina je u procesima bez hlađenja pri istom ispitivanom tlaku. Najboljim procesima u smislu zadržavanja fenolnih kiselina su se pokazali procesi pri 45 bara bez hlađenja i 55 bara bez hlađenja između kojih nema statistički značajne razlike.

U koncentratima i soku od aronije ispitivan je sadržaj dva flavonola: kvercetina i kvercetin-3-rutinozida. Količina kvercetina u koncentratima je bila ispod praga kvantifikacije upotrebljenom metodom. Najveće zadržavanje kvercetin-3-rutinozida (100,21 mg/L) je primijećeno u koncentratu dobivenom pri 45 bara bez hlađenja. Kao i kod fenolnih kiselina, pri istom ispitivanom tlaku veće zadržavanje je zapaženo u procesima bez hlađenja. To se može objasniti činjenicom da su ti procesi trajali nešto kraće za razliku od procesa s hlađenjem, pa je i degradacija i permeabilnost pojedinih sastojaka kroz membranu manja.

Ukupno gledajući, najveća količina polifenolnih spojeva (1162,77 mg/L) određena HPLC metodom je dobivena pri 55 bara bez hlađenja. Prema izračunatoj retenciji (količini pojedinih polifenolnih spojeva određenih u koncentratu i permeatu) taj koncentrat je sadržavao 99,63 % cijanidin-3-galaktozida, 99,52 % cijanidin-3-glukozida, 99,61 % cijanidin-3-arabinozida, 100 % cijanidin-3-ksilozida, 99,76 % neoklorogenske kiseline, 99,73 % klorogenske kiseline i 100 % kvercetin-3-rutinozida (**Slika 48-49**).

Veće zadržavanje pojedinih komponenata može se objasniti mehanizmom otapanje-difuzija, gdje povećanjem tlaka dolazi do veće adsorpcije vode, zbog jače interakcije vode i hidrofilnih membrana u odnosu na otopljene tvari povezane vodikovim vezama (Murthy i sur., 2005.).

5.3.3. Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari arome

SPME, metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, korištena je za određivanje hlapljivih komponenata u početnom soku od aronije te retentatima i permeatima dobivenim koncentriranjem nanofiltracijom. Na aromatski profil, dobiven ovom tehnikom, veliki utjecaj imalo je odabrano vlakno za ekstrakciju, matriks i brzina adsorpcije tvari arome na vlakno (Sostaric i sur., 2000.). Nakon ekstrakcije, sadržaj hlapljivih komponenata određen je pomoću GC-MS tehnike.

Dio svih aromatičnih sastojaka prisutan je u početnom soku od aronije, dok je u koncentratima dobivenim postupkom nanofiltracije pri različitim tlakovima i temperaturnom režimu došlo do većih ili manjih gubitaka aromatičnih sastojaka (**Slike 50-61**).

Analizirani koncentrati sadržavali su od 42,9 - 53,9 % alkohola, 28,2 - 32,7 % karbonilnih spojeva, 7,7 - 17,8 % kiselina, 5,1 - 6,3 % terpenoida i 0,7 - 2,5 % estera. Proces

koncentriranja s hlađenjem zadržali su više hlapivih spojeva od onih bez hlađenja pri istim tlakovima. Također, nešto bolje zadržavanje dobiveno je pri većim tlakovima.

Na **Slici 50** prikazano je zadržavanje alkohola u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 378,72 (najviše alkohola) u početnom soku od aronije pa do 147,37 (najmanje alkohola) u koncentratu dobivenom primjenom tlaka od 45 bara bez hlađenja (izraženo u površinama pikova). Koncentrat dobiven pri 55 bara s hlađenjem zadržao je 78,92 % spojeva iz skupine alkohola u odnosu na početni sok od aronije. Također, u tom procesu je zadržano 82,83 % izoamilnog alkohola (**Slika 51**).

Općenito, sadržaj kiselina u svim koncentratima značajno je manji u odnosu na početni sok od aronije (**Slika 52**). Primjena visokog tlaka, kao i temperaturnog režima, podjednako utječe na smanjenje sadržaja kiselina u odnosu na početni sok od aronije. Heksanska kiselina doprinosi nepoželjnoj aromi voća (Ulrich, 1997.). Određena je u vrlo maloj količini u početnom soku kao i u dobivenim koncentratima. Na **Slici 53** prikazano je zadržavanje kaprilne kiseline u dobivenim koncentratima. U smislu zadržavanja najboljim se pokazao process pri 50 bara s hlađenjem.

Sadržaj karbonilnih spojeva u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom prikazan je na **Slici 54**. U literaturi se često svježa, zelena mirisna voćna nota vezuje uz prisustvo karbonilnih sastojaka (Fischer i Hammerschmidt, 1992.; Malowicki i sur., 2008.a; Malowicki i sur., 2008.b). Toplinskom obradom ili smrzavanjem dolazi do smanjenja udjela tih sastojaka pa su zamjetne razlike u aromi u odnosu na svježe voće (Douillard i Guichard, 1990.; Schieberle, 1994.). Najboljim, u smislu zadržavanja, se pokazao proces pri 55 bara s hlađenjem (**Slike 54-56**). Tijekom procesa koncentriranja nanofiltracijom primijećen je veliki gubitak karbonilnih spojeva (β -damascenona), posebno u procesima bez hlađenja (**Slika 56**).

Na **Slici 57** prikazano je zadržavanje terpenoida u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima. Kao i kod prethodno komentiranih aromatičnih sastojaka, pri istom procesnom tlaku procesi s hlađenjem su bolji u smislu većeg zadržavanja terpenoida. dl limonen (racemat, smjesa lijevog i desnog enantiomera limonena (Šinko, 2005.)) najviše je zadržan u koncentratu dobivenom pri 55 bara s hlađenjem (**Slika 58**).

Sadržaj estera u koncentratima od aronije dobivenim nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima bio je značajno manji u odnosu na početni sok od aronije (**Slika 59**). Primjenom većih procesnih tlakova, i u procesima bez hlađenja, postiže se i veće zadržavanje estera. Najveće zadržavanje (25,19 % u odnosu na početni sok od aronije) je postignuto u koncentratu dobivenom pri 55 bara bez hlađenja. Sličan trend uočen je i kod zadržavanja n-heksil acetata (**Slika 60**).

Najveće zadržavanje alkohola, karbonilnih spojeva i terpenoida imao je koncentrat dobiven primjenom tlaka od 55 bara uz hlađenje. Tim procesom zadržano je 78,9 % alkohola, 23,8 % kiselina, 11,3 % estera, 43,1 % karbonilnih spojeva i 61,2 % terpenoida u odnosu na početni sok od aronije. Na taj način zadržano je 49,6 % aromatskih spojeva u koncentratu od aronije u odnosu na početni sok od aronije.

Sadržaj pojedine skupine aromatskih spojeva (alkoholi, kiseline, terpenoidi, esteri i karbonilni spojevi) u permeatima dobivenim koncentriranjem soka od aronije nanofiltracijom pri različitim procesnim uvjetima prikazan je na **Slici 61**. Permeati su sadržavali veću količinu alkohola (66,71-80,54 %) i kiselina (13,85-21,29 %), te nešto manje količine estera, karbonilnih spojeva i terpenoida. U procesima bez hlađenja primijećena je veća permeabilnost aromatičnih spojeva. Najviše aromatičnih spojeva je pronađeno u permeatu dobivenom u procesu pri 45 bara bez hlađenja, što odgovara najvećem gubitku arome koji je primijećen u koncentratima od aronije dobivenim u istom procesu.

5.4. USPOREDBA PROVEDENIH PROCESA MEMBRANSKE FILTRACIJE

Zbog brojnih nedostataka, koji se prvenstveno odnose na smanjenje kvalitete soka, procesi koncentriranja na uparivačima se nastoje zamijeniti drugim alternativnim postupcima kao što su membranski procesi, iako i oni imaju svojih nedostataka. Glavni nedostaci procesa uparavanja voćnih sokova su: gubitak arome i hranjivih tvari (vitamina i antioksidansa), gubitak boje (pojava tamno obojenih pigmenata zbog Mailardovih reakcija), pojava okusa po „kuhanome“ zbog nastanka furfurala, te utrošak velike količine energije koja je potrebna za uklanjanje vode (Sotoft i sur., 2012.). Upotrebom procesa reverzne osmoze i nanofiltracije većina gore navedenih nedostataka se može lako ukloniti, no najveći nedostatak membranski procesa je nemogućnost postizanja visokog udjela suhe tvari koji je moguć uparavanjem (Jiao i sur., 2004.). Koncentriranjem voćnog soka na nanofiltracijskim membranama može se dobiti proizvod koji je senzorski vrlo sličan svježem polaznom soku (Salehi, 2014.). Nabetani (1996.) je razvio integrirani proces koji uključuje i reverznu osmozu i nanofiltraciju kako bi dobio sok što veće koncentracije. Sok je uspio koncentrirati od 10 °Brix do 45 °Brix, uz uštedu energije od 1/8 i 1/5 u usporedbi s procesima uparavanja i koncentriranja zamrzavanjem.

U ovom istraživanju upotrebom membranskih procesa reverzne osmoze i nanofiltracije uspio se koncentrirati sok od aronije do relativno visokog udjela suhe tvari. Očekivano nešto veći udio topljive suhe tvari je postignut kod procesa nanofiltracije (26,9 %) za razliku od reverzne osmoze (24,9 %). Na **Slikama 62-67** prikazana je usporedba tih procesa s obzirom na pojedine procesne parametre (radni tlak, prosječni volumni protok permeata, temperaturu i vrijeme trajanja procesa). Najveći prosječni volumni protok permeata (**Slika 62**) je zabilježen kod

reverzne osmoze pri procesima bez hlađenja retentata i pri sva tri ispitivana tlaka (45, 50 i 55 bara). Iz navedenog grafičkog prikaza vidljivo je da su procesi nanofiltracije po prosječnom volumnom protoku permeata između procesa reverzne osmoze s hlađenjem i bez hlađenja. Nešto veća temperatura retentata na kraju procesa koncentriranja soka od aronije je postignuta u procesima nanofiltracije (**Slika 63**) u odnosu na procese reverzne osmoze. Povećanje temperature u procesima nanofiltracije je posljedica većeg osmotskog tlaka i polarizacije koncentracije zbog većeg udjela suhe tvari pri kraju procesa za razliku od reverzne osmoze.

Usporedbom vremena trajanja procesa koncentriranja soka od aronije membranskim procesima, reverznom osmozom i nanofiltracijom pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem i bez hlađenja retentata (**Slika 64**) vidljivo je da su najkraći bili procesi reverzne osmoze bez hlađenja pri sva tri ispitivana tlaka.

Usporedba sadržaja pojedinih polifenolnih skupina (antocijani, fenolne kiseline i flavonoli) u koncentratima od aronije dobivenim membranskim procesima, reverznom osmozom i nanofiltracijom pri 45, 50 i 55 bara, s hlađenjem i bez hlađenja retentata je prikazana na **Slici 65**. Iz priloženog dijagrama vidljivo je da je zadržavanje fenolnih kiselina bilo najveće u koncentratu dobivenom reverznom osmozom pri 55 bara s hlađenjem, dok je sličan sadržaj antocijana zabilježen u koncentratima dobivenim reverznom osmozom pri 45 bara s hlađenjem i 55 bara s hlađenjem, te nanofiltracijom pri 50 bara bez hlađenja, između kojih nema statistički značajne razlike. Nešto veće zadržavanje kvercetin-3-rutinozida, jedinog predstavnika flavonola pronađenog u svim koncentratima, je zabilježeno u procesu nanofiltracije pri 45 bara bez hlađenja. Općenito gledajući kod reverzne osmoze veći utjecaj na zadržavanje pojedinih sastojaka ima hlađenje, za razliku od nanofiltracije kod koje su bolji procesi bez hlađenja. Kod oba procesa najboljim se pokazao veći procesni tlak (55 bara).

Bolje zadržavanje pojedinih aromatičnih skupina spojeva (**Slika 66** i **Slika 67**) je bilo u procesima reverzne osmoze. Zadržavanje većine aromatičnih spojeva (alkoholi, kiseline, terpenoidi i karboksilni spojevi) je bilo bolje u procesima s hlađenjem, pri istom ispitivanom tlaku, osim estera kod kojih je uočen suprotan trend zadržavanja (bolje u procesima bez hlađenja). Također su bolji rezultati primijećeni pri višim procesnim tlakovima.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata i provedene rasprave u ovoj disertaciji, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Koncentriranje soka od aronije membranskim procesima, reverznom osmozom i nanofiltracijom, bilo je moguće provesti do određenog udjela topljive suhe tvari, ovisno o primijenjenom postupku i membranama. Reverznom osmozom sok je koncentriran do 24,9 % što odgovara volumnom odnosu retentata od 2,12. Nanofiltracijom sok je koncentriran do 26,9 % udjela topljive suhe tvari, što odgovara volumnom odnosu retentata od 2,39.
2. U oba provedena postupka na protok permeata i kvalitetu dobivenih koncentrata od aronije značajan utjecaj su imali primijenjeni procesni parametri, tlak i temperatura.
3. Veći protok permeata kod oba provedena postupka koncentriranja zabilježen je pri većim procesnim tlakovima. U procesima bez hlađenja retentata preko izmjenjivača topline protok je bio veći u odnosu na procese s hlađenjem retentata pri istom procesnom tlaku.
4. Povećanjem volumnog odnosa retentata i indeksa koncentriranja retentata protok permeata se proporcionalno smanjuje, odnosno povećanjem udjela suhe tvari u retentatu dolazi do smanjenja protoka permeata.
5. Pri istom procesnom tlaku procesi s hlađenjem su trajali nešto duže u odnosu na procese bez hlađenja, a povećanjem radnog tlaka smanjuje se vrijeme trajanja procesa.
6. Povećanjem volumnog odnosa retentata gotovo linearno se povećava i indeks koncentriranja u retentatu. U ovom slučaju primjena hlađenja nema značajnijeg utjecaja kao kod drugih prethodno ispitivanih odnosa.
7. Tijekom koncentriranja dolazi do pada protoka permeata zbog povećanja udjela suhe tvari i viskoznosti u retentatu koja uzrokuje pojavu polarizacije koncentracije, povećanja osmotskog tlaka i povećanja otpora prijenosu mase, a kao posljedica toga dolazi do začepjenja pora membrana.
8. Pri radu s visokim tlakovima razvija se veća količina topline koju treba odvoditi kako bi se očuvali toplinski osjetljivi sastojci soka kao što su antocijani. Temperature na kraju procesa bez hlađenja znatno su više u odnosu na procese s hlađenjem kod svih ispitivanih tlakova.
9. Sadržaj šećera i kiselina je manji u rekonstituiranim koncentratima dobivenim reverznom osmozom i nanofiltracijom, u odnosu na početni sok od aronije, što znači da tijekom procesa koncentriranja dolazi do određenih manjih gubitaka. Između pojedinih koncentrata je vrlo mala razlika u sadržaju kiselina, reducirajućih i ukupnih šećera, te pH vrijednosti.
10. Tijekom procesa koncentriranja reverznom osmozom i nanofiltracijom dolazi do određenih gubitaka tvari boje (polifenola, antocijana i flavonoida). U procesima s hlađenjem je primijećeno je veće zadržavanje ukupnih polifenola. Povećanjem procesnog tlaka

- povećava se i njihovo zadržavanje. Promjena polimerne boje slijedi trend promjene koncentracije antocijana.
11. U svim koncentratima dobivenim reverznom osmozom je određena manja antioksidacijska aktivnost u usporedbi s početnim sokom aronije. U procesima koncentriranja s većim tlakom i s primjenom hlađenja zadržavanje je veće zadržavanje antioksidacijske aktivnosti.
 12. Koncentriranjem soka od aronije reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima dolazi do određenih gubitaka unutar pojedinih polifenolnih skupina (antocijani, fenolne kiseline i flavonoli) u odnosu na početni sok od aronije.
 13. Zadržavanje fenolnih kiselina (klorogenske i neoklorogenske kiseline) je veće u odnosu na zadržavanje antocijana i flavonola. Primjenom većeg procesnog tlaka uz hlađenje postignuto je bolje očuvanje fenolnih kiselina.
 14. Veće zadržavanje kvercetin-3-rutinozida, jedinog flavonoida određenog u dobivenim koncentratima, je bilo u procesima s hlađenjem pri većem procesnom tlaku. Kvercetin u koncentratima od aronije je pronađen ispod praga kvantifikacije.
 15. Cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid su najznačajniji antocijani pronađeni u soku od aronije i dobivenim koncentratima. Veće zadržavanje je primijećeno u procesima s hlađenjem, te pri nižem procesnom tlaku.
 16. Najveće zadržavanje ukupnih antocijana (84,8 %), te ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida (96,49 %) je postignuto u procesu pri 55 bara s hlađenjem retentata u odnosu na početni sok od aronije.
 17. Tijekom koncentriranja soka od aronije reverznom osmozom pri različitim procesnim uvjetima dolazi do određenog gubitka aromatičnih spojeva. Pri većem procesnom tlaku i u postupcima s hlađenjem je veće zadržavanje pojedine skupine aromatičnih spojeva (osim spojeva iz skupine estera) u odnosu na postupke bez hlađenja.
 18. U dobivenim koncentratima ima najviše aromatičnih spojeva iz skupine alkohola (41,12 - 45,26 %), zatim karbonilnih spojeva (27,86 - 37,07 %), kiselina (11,41 - 23,96 %), terpena (6,16 - 7,15 %) i najmanje estera (0,73 - 1,78 %).
 19. U svim koncentratima je značajno smanjena količina prisutnih aromatičnih spojeva iz skupine karbonilnih spojeva i terpena u odnosu na početni sok od aronije.
 20. Membrane za nanofiltraciju imaju veći promjer pora od membrana za reverznu osmozu, pa stoga pojedine male molekule i ioni mogu proći kroz njih i dobiveni permeat nije čista voda. Analizirani permeati dobiveni nanofiltracijom sadržavali su manje količine kiselina, šećera, polifenola i flavonoida. Veća permeabilnost (3,7 %) je primijećena pri nižem procesnom tlaku (45 bara), a ne ovisi o primijenjenom temperaturnom režimu.

21. Procesi pri većem tlaku trajali su kraće, a posebno procesi bez hlađenja, pa je zabilježen i manji prolaz kiselina u permeat. Sličan trend je primijećen i kod kretanja sadržaja šećera (reducirajućih i ukupnih) u dobivenim koncentratima.
22. Procesi koncentriranja nanofiltracijom bez primjene hlađenja pokazuju nešto bolje zadržavanje polifenola i antocijana. Najbolji rezultati dobiveni su koncentriranjem pri tlaku 55 bara bez hlađenja. U dobivenom koncentratu zadržano je 94,3 % polifenola, 89,4 % antocijana i 90,8 % flavonoida u odnosu na početni sok.
23. Mala količina pojedinačnih spojeva antocijana je prošla kroz membranu i pronađena je u permeatu. Bolje zadržavanje antocijana, fenolnih kiselina i flavonola u koncentratima je zapaženo pri većem primijenjenom procesnom tlaku i u procesima bez hlađenja retentata.
24. Najboljim u smislu zadržavanja pojedinih polifenolnih spojeva se pokazao proces nanofiltracije pri 55 bara bez hlađenja.
25. Procesi koncentriranja s hlađenjem zadržali su više hlapivih spojeva od onih bez hlađenja pri istim tlakovima. Također, nešto bolje zadržavanje arome dobiveno je primijenom većih tlakova. Primijećen je veliki gubitak karbonilnih spojeva (posebno β -damascenona) u procesima bez hlađenja.
26. U dobivenim permeatima je određena manja količina alkohola i kiselina. U procesima bez hlađenja i pri nižem tlaku primijećena je veća permeabilnost aromatičnih spojeva.
27. Koncentriranjem soka od aronije membranskim postupkom reverzne osmoze pri različitim procesnim uvjetima postignuto je bolje zadržavanje tvari boje i arome nego u procesima nanofiltracije.

7. LITERATURA

- Adom KK, Liu RH: Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182-6187, 2002.
- Aguera E, Bes M, Roy A, Camarasa C, Sablayrolles JM: Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1): 53-60, 2010.
- Aguiar IB, Miranda NGM, Gomes FS, Santos MCS, Freitas DGC, Tonon RV, Cabral LMC: Physicochemical and sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16: 137–142, 2012.
- Aguiar Prudencio AP, Schwinden Prudencio E, Castanho Amboni RDM, Negrao Murakami AN, Maraschin M, Cunha Petrus JC, Ogliari PJ, Leite RS: Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex para guariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 399–405, 2012.
- Alvarez V, Alvarez SA, Riera FA: Permeate flux prediction in apple juice concentration by reverse osmosis. *Journal of Membrane Science*, 127: 25–34, 1997.
- Alvarez S, Riera FA, Alvarez R, Coca J: Permeation of apple aroma compounds in reverse osmosis. *Separation and Purification Technology*, 14: 209–220, 1998.
- Alvarez S, Riera FA, Alvarez R, Coca J: Prediction of flux and aroma compounds rejection in a reverse osmosis concentration of apple juice model solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40: 4925–4934, 2001.
- Andersen OM, Jordheim M: The anthocyanins. In: Andersen O.M., Markham K.R. (eds): *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton: 471–551, 2006.
- Andrzejewska J, Sadowska K, Klóska L, Rogowski L: The effect of plant age and harvest time on the content of chosen components and antioxidative potential of black chokeberry fruit. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14: 105–114, 2015.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127: 183-198, 2002.
- Appel K, Meiser P, Millan E, Collado JA, Rose T, Gras CC, Munoz E: Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia*, 105: 73–82, 2015.
- Ara V: Schwarzfruchtige Aronia: Gesund – und bald "in aller Munde"? *Flüssiges Obst* 10: 653-658, 2002.
- Arslan D: Effects of degradation preventive agents on storage stability of anthocyanins in sour cherry concentrate. *Agronomy Research*, 13(4): 892–899, 2015.
- Bagger-Jorgensen R, Meyer AS, Pinelo M, Varming C, Jonsson G: Recovery of volatile fruit juice aroma compounds by membrane technology: Sweeping gas versus vacuum membrane distillation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3): 388-397, 2011.

- Baker RW: *Membrane technology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2004.
- Balcerek M: Carbonyl compounds in aronia spirits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(3): 243–249, 2010.
- Basile A, Charcosset C: *Integrated Membrane Systems and Processes*. Wiley, Chichester, UK, 2016.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D: Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 69(3): FCT164-FCT169, 2004.
- Berk Z: *Food Process Engineering and Technology*. Academic Press, London, UK, 2013.
- Bermudez-Soto MJ, Larrosa M, Garcia-Cantalejo JM, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT: Up-regulation of tumor suppressors carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 259-271, 2007.
- Bermudez-Soto MJ; Tomas-Barberan FA: Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology*, 219: 133-141, 2004.
- Bijak M, Bobrowski M, Borowiecka M, Podsedek A, Golanski J, Nowak P: Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, 82(6): 811-817, 2011.
- Bolling BW, Taheri R, Pei R, Kranz S, Yu M, Durocher SN, Brand MH: Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food Chemistry*, 187:189-196, 2015.
- Borowska EJ, Szajdek A, Czaplicki S: Effect of heat and enzyme treatment on yield, phenolic content and antioxidant capacity of juices from chokeberry mash. *Italian Journal of Food Science*, 21(2): 1-14, 2009.
- Brand M: Aronia: Native Shrubs with untapped potential. *Arnoldia* 67(3): 14-25, 2010.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30, 1995.
- Braunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malteru KE, Barsett H: Extracts, anthocyanins and procyanidins from aronia melanocarpa as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*, 5: 663–678, 2013.
- Bray DT: *Reverse osmosis purification apparatus*. Assigned to Gulf General Atomic Inc., US patent 3417870 A, 1968.
- Bruckner B: *Fruit and Vegetable Flavour: Recent Advances and Future Prospects*. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Cambridge, UK, 2008.
- Burda S, Oleszek W: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2774-2779, 2001.

- Butorova L, Vítova E, Polovka M: Comparison of volatiles identified in *Aronia melanocarpa* and *Amelanchier alnifolia* using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55(1): 57–68, 2016.
- Buttery RG: Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetable and fruits. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. TE Acree, R Teranishi (Eds.), ACS, Washington DC, USA, 259-286, 1993.
- Campbell CS, Evans RS, Morgan DR, Dickinson TA, Arsenault MP: Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution*, 266:119–145, 2007.
- Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22: 749-760, 1997.
- Cassano A, Drioli E, Galaverna G, Marchelli R, Di Silvestro G, Cagnasso P: Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *Journal of Food Engineering*, 57(2):153–163, 2003.
- Catarino M, Mendes A, Madeira LM, Ferreira A: Alcohol removal from beer by reverse osmosis. *Separation Science and Technology*, 42(13): 3011-3027, 2007.
- Cheong KW, Tan CP, Mirhosseini H, Hamid NSA, Osman A, Basri M: Equilibrium headspace analysis of volatile flavour compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid phase microextraction. *Food Research International*, 43: 1267–1276, 2010.
- Cheryan M, Alvarez JR: Food and beverage industry application. In *Membrane separation technology. Principles and applications*. Noble RD, Stern SA (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1995.
- Cheryan M: Food technology. Membrane separations. In *Encyclopedia of Separation Science*. Wilson ID, Adlard ER, Cooke M, Poole CF (Eds.) Academic Press, New York, 2849-2855, 2000.
- Chou F, Wiley RC, Schlimme DV: Reverse osmosis and flavor retention in apple juice concentration. *Journal of Food Science*, 56: 484–487, 1991.
- Chui ZF, Muralidhara HS: *Membrane technology. A practical guide to membrane technology and applications in food and bioprocessing*. Elsevier, Burlington, USA, 2010.
- Clifford MN: Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 362–372, 1999.
- Clifford MN, Scalbert A: Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1118–1125, 2000.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu Jp, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vander-Berghe V: Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61: 71-76, 1998.
- Couto DS, Cabral LCM, Matta VM, Deliza R, Castro Freitas DG: Concentration of pineapple juice by reverse osmosis: physicochemical characteristics and consumer acceptance. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31: 905-910, 2011.

- Cross S: *Achieving 60 Brix with membrane technology*. Presented at the 49th Annual Meeting, Institute of Food Technologists, New Orleans, June 19-22, 1988.
- Ćujić N, Kardum N, Šavikin K, Zdunić G, Janković t, Menković N: Potential of chokeberry (*Aronia Melanocarpa* L.) as a therapeutic food. In *Handbook of Food Bioengineering: Therapeutic Foods*. Academic Press, London, 209-239, 2018.
- Danisman G, Arslan E, Toklucu AK: Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in grape juice during heating. *Czech Journal of Food Science*, 33(2): 103–108, 2015.
- Das Gupta DK, Jayarama KS: Studies on the membrane concentration of watermelon juice. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55: 966–970, 1996.
- Dass C: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2007.
- Davis TS: Electrodialysis. In *Handbook of Industrial Membrane Technology*. Porter MC (Eds.), Noyes Publication, New Jersey, USA, 40–102, 1990.
- Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O: Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173–289, 2000.
- Del Rio D, Borges G, Crozier A: Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(53): S67-S90, 2010.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A: Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18: 1818–1892, 2013.
- Demeczky M, Khell-Wicklein M, Godek-Krek E: The preparation of fruit juice semi-concentrates by reverse osmosis. In: *Developments in food preservation — 1*. Stuart Thorne Applied Science Publ, London, 93-119, 1981.
- Denev PN, Ciz M, Ambrozova G, Lojek A, Yanakieva I, Kratchanova M: Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123:1055–1061, 2010.
- Denev PN, Kratchanov CG, Ciz M, Lojek A, Kratchanova MG: Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: in vitro and in vivo evidences and possible mechanisms of action: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5):471-489, 2012.
- Diaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC: Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *Journal of Food Engineering*, 91: 587–593, 2009.
- Dolar D: Utjecaj poroznosti i ostalih karakteristika NF/RO membrana na njihovu separacijsku djelotvornost pri obradi voda. *Doktorski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Dolezal M, Velisek J, Famfulikova PJ: Aroma of less-known wild fruits. In: *Flavour Research at the Dawn of the Twenty first Century*. Proceedings of the 10th Weurman Flavour

- Research Symposium. Beaune, France, 25–28 June, 2002. Beaune: Centre de Recherche de Dijon, 576–579, 2003.
- Douillard C, Guichard E: The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): characterisation of some cultivars and influence of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50: 517-531, 1990.
- Državni hidrometerološki zavod: Prikazi br. 26: praćenje i ocjena klime u 2014. godini. Zagreb, 2015. http://klima.hr/razno/publikacije/prikazi/prikazi_26_14.pdf [12.03.2016.]
- Dubrović I: Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na antioksidacijsku aktivnost te mikrobiološku kakvoću soka od jagode. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2012.
- Dugas AJ Jr, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW: Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure activity relationships. *Journal of Natural Products*, 63: 327-31, 2000.
- Echavarria AP, Torras C, Pagan J, Ibarz A: Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Engineering Reviews*, 3: 136-158, 2011.
- Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS: Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 44: 1603-8, 1992.
- El Hadi MAM, Zhang F-J, Wu F-F, Zhou C-H, Tao J: Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18: 8200-8229, 2013.
- Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, Garcia-Viguera C: Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1588-1592, 2000.
- Falguera V, Ibarz A: *Juice processing: quality, safety and value-added opportunities*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2014.
- Ferrarini R, Versari A, Galassi S: A preliminary comparison between nanofiltration and reverse osmosis membranes for grape juice treatment. *Journal of Food Engineering*, 50: 113–116, 2001.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M: Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416(2): 123-129, 1997.
- Fischer N, Hammerschmidt FJ: A contribution to the analysis of fresh strawberry flavour. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 14: 141-148, 1992.
- Forney CF, Kalt W, Jordan MA: The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *Horticultural Science*, 35: 1022–1026, 2000.
- Francis J: Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28: 273-314, 1989.
- Ganorkar P, Nandane A, Tapre A: Reverse osmosis for fruit juice concentration – a review. *Research & Reviews: Journal of Food Science and Technology*, 1(1): 23–36, 2012.
- Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara ML, Periago MJ: Acute intake of phenolic-rich juice improves, antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research*, 26: 330-339, 2006.

- Giusti MM, Wrolstad RE: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York, F1.2.3-F.1.2.13., 2001.
- Giri D: *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications*. 2015. <http://laboratoryinfo.com/hplc/> [23.08.2016.]
- Goff SA, Klee HJ: Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value. *Science*, 311: 815–819, 2006.
- Gomes FS, Costa PA, Campos MBD, Couri S, Cabral LMC: Concentration of watermelon juice by reverse osmosis process. *Desalination and Water Treatment*, 27: 120–122, 2011.
- Gonzalez-Manzano S, Duenas M, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT, Santos-Buelga C: Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114: 649–656, 2009.
- Gonzalez-Molina E, Moreno DA, Garcia-Viguera C: Aronia enriched lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11327-11333, 2008.
- Grenier A, Meireles M, Aimar P, Carvin P: Analysing flux decline in dead-end filtration. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(11): 1281–1293, 2008.
- Gurak PD, Cabral LMC, Rocha-Leao MHM, Matta VM, Freitas SP: Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 96: 421–426, 2010.
- Haarstrick A, Rau U, Wagner F: Cross-flow filtration as a method of separating fungal cells and purifying the polysaccharide produced. *Bioprocess Engineering*, 6(4): 179-186, 1991.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH: Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods, *Journal of Nutrition*, 130: 2086S–2092S, 2000.
- Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R: Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term-a pilot study. *Nutrition Research*, 34: 518–525, 2014.
- Harborne JB, Williams C: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504, 2000.
- Hardin JW: The enigmatic chokeberries (*Aronia*, Rosaceae). *Torreya*, 100:178–184, 1973.
- Hasanoglu A, Rebolledo F, Plaza A, Torres A, Romero J: Effect of the operating variables on the extraction and recovery of aroma compounds in an osmotic distillation process coupled to a vacuum membrane distillation system. *Journal of Food Engineering*, 111(4): 632-641, 2012.
- Healthy Posts: *Aronia berry benefits*. WordPress, 2013. <https://healthyposts.wordpress.com/2013/03/09/aronia-berry-benefits/> [15.01.2016.]
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572–84, 2002.
- Heldman, DR Lund DB: *Handbook of food engineering*. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, 2007.

- Hellstrom J, Mattila P, Karjalainen R: Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1): 12–19, 2013.
- Herceg Z: *Procesi konzerviranja hrane: novi postupci*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
- Higson S: *Analytical Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2004.
- Hirvi T, Honkanen E: Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Ell). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 808–10, 1985.
- Ho W, Sirkar K: *Membrane handbook*. Van Nostrand Reinhold, New York, 263–390, 1992.
- Hudec J, Bakos D, Mravec D, Kobida L, Burdova M, Turianica I, Hlusek J: Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3625 – 3628, 2006.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Jakobek L, Šeruga M, Medvidović-Kosanović M, Novak I: Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103: 58-64, 2007.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M, Lukačević I: Antioxidant activity of polyphenols from blueberry and strawberry. *Pomologia Croatica*, 14 (1): 13-26, 2008.
- Jakobek L, Šeruga M, Krivak P: The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(4): 345-352, 2011.
- Jakobek L, Šeruga M: Influence of anthocyanins, flavonols and phenolic acids on the antiradical activity of berries and small fruits. *International Journal of Food Properties*, 15(1): 122-133, 2012.a.
- Jakobek L, Drenjačević M, Jukić V, Šeruga M: Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galinka” and wild chokeberries. *Scientia Horticulturae*, 147: 56-63, 2012.b.
- Jeppsson N: The effect of cultivar and cracking on the fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and the hybrids between chokeberry and rowan (*Soubzis*). *Gartenbauwissenschaft*, 65: 93-98, 2000.
- Jeppsson N, Johansson R: Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 340-345, 2000.
- Jesus DF, Leite MF, Silva LMF, Modesta RD, Matta VM, Cabral LMC: Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 81(2): 287–291, 2007.
- Jiang B, Zhang Z: Volatile compounds of young wines from cabernet sauvignon, cabernet gernischet and chardonnay varieties grown in the loess plateau region of China. *Molecules*, 15: 9184-9196, 2010.

- Jiao B, Cassano A, Drioli E: Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: A review. *Journal of Food Engineering*, 63: 303–324, 2004.
- Johnson JE: Design and construction of commercial spiral wound modules. In *Encyclopedia of Membrane Science and Technology*. Hoek EM, Tarabara V (Eds.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2013.
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J: Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*, 22(6): 1-23, 2017.
- Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M: Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4076 – 4082, 2001.
- Kahkonen MP, Heinamaki J, Ollilainen V, Heinonen M: Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1403-1411, 2003.
- Kalkman C: Rosaceae. In *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki K (ed.) Springer, Berlin, 343–386, 2004.
- Karlsson HOE, Loureiro S, Tragardh G: Aroma compound recovery with pervaporation—temperature effects during pervaporation of a Muscat wine. *Journal of Food Engineering*, 26(2): 177-191, 1995.
- Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725, 2001.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene Rada Toksikologije*, 55: 279-290, 2004.
- Kim KH, Tsao R, Yang R, Cui SW: Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95: 466-473, 2006.
- Kobelco Eco-Solutions: *Reverse osmosis leachate treatment system-DT module system*. 2007. http://www.kobelco-eco.co.jp/english/product/dt_module/genri.html [25.02.2016.]
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M: *Aronia Plants - A review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine*. *Journal of Medicinal Food*, 13: 255-269, 2010.
- Kolesnikov MP, Gins VK: Phenolic substances in medicinal plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37: 392 – 399, 2001. Translated from Kolesnikov MP, Gins VK. Phenolic compounds in medicinal plants *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 37: 457 – 465, 2001.
- Konja G, Clauss E: Study of color and aroma retention of black currant juice during concentration by hyperfiltration. *Prehrambeno-tehnološka biotehnološka revija*, 29: 121–125, 1991.
- Kopjar M: Utjecaj dodataka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

- Koseoglu SS, Lawhon JT, Lusas EW: Use of membranes in citrus juice processing. *Food technology*, 44(12): 90-97, 1990.
- Kowalczyk E, Charyk K, Fijałkowski P, Niedworok J, Błaszczak J, Kowalski J: Protective influence of natural anthocyanins of *Aronia melanocarpa* on selected parameters of antioxidative status in experimental intoxication with sulphide-2-chloroethyl-3-chloropropyl. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13: 339–341, 2004.
- Kraujalyte V, Leitner E, Venskutonis PR: Characterization of *Aronia melanocarpa* volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20): 4728-4736, 2013.
- Krause S, Thiemig C: Membrane bioreactors, applications to wastewater treatment and reuse. In *Encyclopedia of Membrane Science and Technology*. Hoek EM, Tarabara V (Eds.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2013.
- Kucera J: Membrane materials and module development, historical perspective. In *Encyclopedia of Membrane Science and Technology*. Hoek EM, Tarabara V (Eds.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2013.
- Kucera J: *Reverse Osmosis*. Scrivener Publishing, Salem, MA, USA, 2010.
- Kulbe KC, Feng CY, Matsuura T: Synthetic membranes for membrane processes. In *Synthetic polymeric membranes*. Springer, Leipzig, Germany, 5-18, 2008.
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74: 1625–1634, 2008.
- Lasić Jašarović T, Grubišić Popović G, Grgić V, Šimunović V: *Uzgoj aronije - Savjetodavna služba*. www.savjetodavna.hr/adminmax/publikacije/aronija_2312_ispravak_opt.pdf [01.08. 2014.]
- Lehmann H. Die Aroniabeere und ihre verarbeitung. *Flüssiges Obst*, 57: 746-52, 1990.
- Levaj B: Tehnologija voća i povrća, II dio. *Skripta*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2013.
- Liepina I, Nikolajeva V, Jakobsone I: Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environmental and Experimental Biology*, 11: 195–199, 2013.
- Lima GPP, Vianello F, Corrêa CR, Campos RAS, Borguini MG: Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 1065-1082, 2014.
- Loeb S, Sourirajan S: Sea water demineralization by means of an osmotic membrane. *Advances in Chemistry*, 38: 117–132, 1962.
- Lovrić T, Piližota V: *Konzerviranje i prerada voća i povrća*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1994.
- Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.

- Luterotti S: *Uvod u kemijsku analizu*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2014.
- Maatta-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, Gonzalez-Paramas AM, Torronen AR: Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4477-4486, 2004.
- Macheix J-J , Fleuriet A, Billot J: *Fruit Phenolics*. CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 1990.
- Madaeni SS, Tahmasebi K, Kerendi SH: Sugar syrup concentration using reverse osmosis membranes. *Engineering in Life Sciences*, 4(2): 187–190, 2004.
- Malinowska J, Babicz K, Olas B, Stochmal A, Oleszek W: Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition*, 28: 793–798, 2012.
- Malowicki SMM, Martin R, Qian MC: Comparison of sugar, acids, and volatile composition in raspberry bushy dwarf virus-resistant transgenic raspberries and the wild type 'Meeker' (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6648–6655, 2008a.
- Malowicki SMM, Martin R, Qian MC: Volatile composition in raspberry cultivars grown in the Pacific Northwest determined by stir bar sorptive extraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4128–4133, 2008b.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727–747, 2004.
- Mat NC, Lou Y, Lipscomb GG: Hollow fiber membrane modules. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 4:18–24, 2014.
- Matsuura T: *Synthetic Membranes and Membrane Separation Processes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994.
- Mayer-Miebach E, Adamiuk M, Behnsnlian D: Research project dietary procyanidins – from a better understanding of human health effects to functionalised foods. Process engineering to improve procyanidin stability and extractability. *Internal Report*. 2008.
- Mayer-Miebach E, Adamiuk M, Behnsnlian D: Stability of chokeberry bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product. *Agriculture*, 2: 244-258, 2012.
- Medina BG, Garcia A: Concentration of orange juice by reverse osmosis. *Journal of Food Process Engineering*, 10: 217-230, 1988.
- Mehdizadeh H, Dickson J: Modelling of temperature effects on the performance of reverse osmosis membranes. *Chemical Engineering Communications*, 103: 99–117, 1991.
- Merson RL, Morgan AI: Juice concentration by reverse osmosis. *Food technology*, 22 (5): 97-100, 1968.
- Mietton-Peuchot M, Milisic V, Noilet P: Grape must concentration by using reverse osmosis. Comparison with chaptalization. *Desalination*, 148(1–3): 125–129, 2002.
- Miller FA, Silva CLM: Thermal treatment effects in fruit juice. In *Advances in fruit processing technologies* (eds. Rodrigues S, Fernandes FAN). CRC Press, Boca Raton, 2012.

- Milić M: *Priručnik za uzgoj aronije*. Donji Miholjac, 2012, https://www.agroklub.com/upload/dokumenti/prirucnik_za_uzgoj_aronije.pdf [15.07.2014.]
- Moldovan B, David L, Chisbora C, Cimpoiu C: Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules*, 17: 11655–11666, 2012.
- Mora A, Payá M, Ríos JL, Alcaraz MJ: Structure-activity relationships of polymethoxy flavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 40: 793-797, 1990.
- Moslavac T: Koncentriranje model otopina alkohola, estera i aldehida reverznom osmozom. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2003.
- Mulder M: *Basic principles of membrane technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, 1996.
- Murthy G, Sridhar S, Shyam Sunder M, Shankaraiah B, Ramakrishna M: Concentration of xylose reaction liquor by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. *Separation and Purification Technology*, 44: 221–228, 2005.
- Nabetani H: Development of a membrane system for highly concentrated fruit juice. *Journal of Membrane (Japanese)*, 21(2): 102–108, 1996.
- Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L: Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford), bap024, 2010.
- Ochmian I, Grajkowski J, Smolik M: Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1): 253-260, 2012.
- Osada Y, Nakagawa T: *Membrane Science and Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
- Oszmianski J, Wojdylo A: *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221: 809-813, 2005.
- Oszmianski J, Lachowicz S: Effect of production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, 21: 1-14, 2016.
- Ough CS, Amerine MA: Phenolic compounds. In *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley & Sons, New York, 196–221, 1988.
- Pabby AK, Rizvi SSH, Sastre AM: *Handbook of membrane separations. Chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2009.
- Pap N, Kertesz S, Pongracz E, Myllykoski L, Keiski RL, Vatai G, Hodur C: Concentration of blackcurrant juice by reverse osmosis. *Desalination*, 241: 256–264, 2009.
- Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang M-W, Bae J-Y, Heo J, Kim D, Han S-Z, Park M-S: *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440: 14–19, 2013.

- Pathare PB, Opara UL, Al-Said FA-J: Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food Bioprocess Technology*, 6: 36-60, 2013.
- Pawliszyn J: *Handbook of SPME*. Chemical Industry Press, Beijing, 2009.
- Pepper D, Orchard ACJ, Merry AJ: Concentration of tomato juice and other fruit juices by reverse osmosis. *Desalination*, 53(1-3): 157-166, 1985.
- Pepper D: RO for improved products in the food and chemical industries and water treatment. *Desalination*, 77: 55-71, 1990.
- Perez AG, Rios JJ, Sanz C, Olias JM: Aroma components and free amino acids in strawberry variety chandler during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2232-2237, 1992.
- Peri C: Concentration of orange juice by reverse osmosis. *Scienze e Technologie degli Alimentari*, 4: 43-47, 1974.
- Petrots KB, Lazarides HN: Application of membrane technology to food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 277-282, 2001.
- Phillip T: Purification and concentration of natural colourants by membranes. *Food Technology*, 38 (12): 107-108, 1984.
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Pineau B, Barbe J-C, Van Leeuwen C, Dubourdieu D: Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4103-4108, 2007.
- Poiana MA, Munteanu MF, Bordean DM, Gligor R, Alexa E: Assessing the effects of different pectins addition on color quality and antioxidant properties of blackberry jam. *Chemistry Central Journal*, 121: 1-13, 2013.
- Poiana M-A, Moigradean D, Dogaru D, Mateescu C, Raba D, Gergen I: Processing and storage impact on the antioxidant properties and color quality of some low sugar fruit jams. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5): 6504-6512, 2011.
- Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS: Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266: 5-43, 2007.
- Pozderović A: Proučavanje fenomena zadržavanja odnosno gubitka tvari arome voća tijekom liofilizacije na model sistemima. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 1984.
- Pozderović A, Moslavac T: Apple juice aroma concentration from evaporator condensate by reverse osmosis – I. Influence of process parameters on retention and final aroma concentration. *Acta Alimentaria*, 28(1): 71-83, 1999.
- Pozderović A, Moslavac T, Pichler A: Concentration of aqua solutions of organic components by reverse osmosis. I: Influence of trans-membrane pressure and membrane type on concentration of different ester and aldehyde solutions by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 76(3): 387-395, 2006.

- Pozderović A, Moslavac T, Pichler A: Concentration of aqueous solutions of organic components by reverse osmosis: II. Influence of transmembrane pressure and membrane type on concentration of different alcohol solutions by reverse osmosis *Journal of Food Engineering*, 77(4): 810-817, 2006.
- Pozderović A, Moslavac T, Pichler A: Influence of processing parameters and membrane type on permeate flux during solution concentration of different alcohols, esters, and aldehydes by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 1092-1102, 2007.
- Pravilnik o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. NN 2013/48.
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF: Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1270-1276, 2001.
- Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji*, 58 (3): 121-128, 2009.
- Razungles A, Oszmianski J, Sapis JC: Determination of carotenoids in fruits of *Rosa* sp. (*Rosa canina* and *Rosa rugosa*) and of chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Journal of Food Science*, 54: 774-775, 1989.
- Rehder A: *Bibliography of cultivated trees and shrubs*. Arnold Arboretum, Harvard University, USA, 261–262, 1949.
- Rein M: *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki University, Finland, 2005. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/rein/copigmen.pdf> [15.07.2014.]
- Reineccius G: *Flavor chemistry and technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2006.
- Reis Giada ML: Food Phenolic Compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants*. Morales-González JA (ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 87-112, 2013.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-56, 1996.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2: 152-159, 1997.
- Rice-Evans CA, Packer L: *Flavonoids in Health and Disease*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2003.
- Rimac-Brnčić S; Badanjak Sabolović M, Šic Žlabur J, Jelovečki M: Colour stability and antioxidant activity of some berry extracts. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11(3-4): 115-119, 2015.
- Robards K, Prenzel PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436, 1999.
- Robertson KR, Phipps JB, Rohrer JR, Smith PG: A synopsis of genera in Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, 16: 376–394, 1991.

- Rop O, Mlcek J, Jurikova T, Valsikova M, Sochor J, Reznicek V, Kramarova D: Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (michx.) elliot) cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research*, 22: 2432–2437, 2010.
- Rugina D, Sconta Z, Leopold L, Pinteá A, Bunea A, Socaciu C: Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on hela human cervical tumor cells. *Journal of Medicinal Food*, 15:700–706, 2012.
- Sabbaghi S, Maleki R, Shariaty-Niassar M, Zerafat MM: Modeling chloride ion removal from gas condensates by nanofiltration membrane separation. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 3: 30–33, 2012.
- Saffarionpour S, Ottens M: Recent advances in techniques for flavour recovery in liquid food processing. *Food Engineering Reviews*, 10: 81-94, 2018.
- Salehi F: Current and future applications for nanofiltration technology in the food processing. *Food and bioproducts processing*, 92: 161–177, 2014.
- Sanchez J, Ruiz Y, Auleda JM, Hernandez E, Raventos M: Review. Freeze concentration in the fruit juices industry. *Food Science and Technology International*, 15(4): 303-315, 2009.
- Sanchez-Moreno C: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8:121-37, 2002.
- Santana I, Gurak PD, da Matta VM, Pereira Freitas S, Cabral LMC: Concentration of grape juice (*Vitis labrusca*) by reverse osmosis process. *Desalination and Water Treatment*, 27: 103–107, 2011.
- Santana I, Cabral LMC, Matta V, Godoy RLO: Influence of the temperature of reverse osmosis process on the anthocyanin composition of grape juice (*Vitis labrusca* L.). *Acta Horticulturae*, 1040: 281-288, 2014.
- Sanz C, Olias JM, Perez AG: Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Oxford University Press Inc., New York, USA, 125–155, 1997.
- Sarry JE, Gunata Z: Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, 87: 509–521, 2004.
- Schaep J, Bruggen BV, Uytterhoeven S, Croux R, Vandecasteele C, Wilms D, Houtte EV, Vanlerberghe F: Removal of hardness from groundwater by nanofiltration. *Desalination*, 119: 295-302, 1998.
- Schieberle P: Heat-induced changes in the most odour-active volatiles of strawberries. In *Trends in flavour research*. Maarse H, Van der Heij DG (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, 345-351, 1994.
- Schmeling N, Konietzny R, Sieffert D, Rölling P, Staudt C: Functionalized copolyimide membranes for the separation of gaseous and liquid mixtures. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 6: 789–800, 2010.
- Scott K: *Handbook of industrial membranes*. Elsevier Advanced Technology, Oxford, UK, 1995.

- Scott K, Hughes R: *Industrial membrane separation technology*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, UK, 1996.
- Scott RW, Skirvin RM: Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Michx.): A semi-edible fruit with no pests. *Journal Of The American Pomological Society*, 61: 135-137, 2007.
- Seidemann J: Chokeberries a fruit little-known till now. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 89(1): 149–51, 1993.
- Shahidi F, Zhong, Y: Measurment of antioxidant activity in food and biological systems. In *Antioxidant measurment and applications*. Shahidi F, Ho CH (eds.), American Chemical Society, Washington, 2007.
- Sharif T, Alhosin M, Auger C, Minker C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Schini-Kerth VB: *Aronia melanocarpa* juice induces a redox-sensitive p73-related caspase 3-dependent apoptosis in human leukemia cells. *PLoS ONE*, 7(e32526), 2012.
- Sheu MJ, Wiley RC: Preconcentration of apple juice by reverse osmosis. *Journal of Food Science*, 48: 422–428, 1983.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T: Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945–948, 1992.
- Si W, Gong J, Tsao R, Kalab M, Yang R, Yin Y: Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125(2): 204-210, 2006.
- Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM: Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Medica (Plovdiv)*, 44: 20-23, 2002.
- Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Ryszard A: Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacological Report*, 59: 177-182, 2007.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije*. 1st edition. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Skrede G, Wrolstad RE, Durst RW: Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65: 357–364, 2000.
- Skupien K, Oszmainski J: Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, 219: 66-70, 2004.
- Skupien K, Oszmianski J: The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science*, 16: 46-55, 2007.
- Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH: Flavonols from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 61–68, 2005.

- Smart Membrane Solutions: *Membrane classifications*.
<http://www.smartmembranesolutions.co.nz/membrane-classifications/> [22.02.2016.]
- Smith PG: *Introduction to food process engineering*. Springer Science+Business Media, New York, 2011.
- Smolik M, Ochmian I, Smolik B: RAPD and ISSR methods used for fingerprinting selected, closely related cultivars of *Aronia melanocarpa*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2): 276-284, 2011.
- Sochor J, Ryvolova M, Krystofova O, Salas P, Hubalek J, Adam V, Trnkova L, Havel L, Beklova M, Zehnalek J, Provaznik I, Kizek R: Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*, 15: 8618–8640, 2010.
- Sondhi R, Bhawe R, Jung G: Applications and benefits of ceramic membranes. *Membrane Technology*, 11: 5-8, 2003.
- Sostaric T, Boyce M C, Spickett E E: Analysis of the volatile compounds in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5802–5807, 2000.
- Sotoft LF, Christensen KV, Andresen R, Norddahl B: Full scale plant with membrane based concentration of blackcurrant juice on the basis of laboratory and pilot scale tests. *Chemical Engineering and Processing*, 54: 12–21, 2012.
- Stefanova M, Stafilov T, Kulevanova S: HPLC analysis of flavonoids. In *Encyclopedia of Chromatography*. Cazes J (ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 113-119, 2005.
- Strack D, Wray V: Anthocyanins. In *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Harborne JB (ed.), Chapman & Hall, London, UK, 1–22, 1992.
- Stralsjo L, Ahlin H, Witthoft C M, Jastrebova J: Folate determination in Swedish berries by radioprotein-binding assay (RPBA) and high performance liquid chromatography (HPLC). *European Food Research and Technology*, 216: 264-269, 2003.
- Strigl AW, Leitner E, Pfannhauser W. Die schwarze Apfelbeere (*Aronia melanocarpa*) als natürliche farbstoffquelle. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 91: 177-180, 1995.
- Strigl AW, Leitner E, Pfannhauser W: Qualitative und quantitative Analyse der Anthocyane in Schwarzen Apfelbeeren (*Aronia melanocarpa* Michx EII) mittels TLC, HPLC and UV/VIS-Spectrometrie. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 201: 266–268, 1995.
- Sui X: *Impact of food processing on anthocyanins*. Springer Science+Business Media, Singapore, 2017.
- Sun D-W: *Emerging technologies for food processing*. Elsevier Academic Press, London, UK, 2005.
- Šinko G: Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih bioloških aktivnih enantiomera. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 56:351-361, 2005.

- Taheri R: Polyphenol composition of underutilized aronia berries and changes in aronia berry polyphenol content through ripening. *Master's Theses*, University of Connecticut Graduate School, 2013. Paper 436. http://digitalcommons.uconn.edu/gs_theses/436 [23.08.2016.]
- Tanaka T, Tanaka A: Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology*, 48: 606-610, 2001.
- Tao Y, Zhang L: Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China). *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1550-1556, 2010.
- The PLANTS Database, database (version 5.1.1). National Plant Data Center, NRCS, USDA, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA, 2000. <http://plants.usda.gov> [16.01.2016.]
- Tolić M-T, Jurčević IL, Krbavčić IP, Marković K, Vahčić N: Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technology and Biotechnology*, 53:171–179, 2015.
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H: Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6347-6353, 2003.
- Tsao R, McCallum J: Chemistry of Flavonoids. In *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, New Delhi, 131-153, 2010.
- Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2: 1231-1246, 2010.
- Tsibranska IH, Tylkowski B: Concentration of ethanolic extracts from *Sideritis* ssp. L. by nanofiltration: Comparison of dead-end and cross-flow modes. *Food and Bioprocess Processing*, 91 (2): 169-174, 2013.
- Ulrich D, Hoberg E, Rapp A, Kecke S: Analysis of strawberry flavour-discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, A205: 218-223, 1997.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A: Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 29: 101-105, 2007.
- Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A: Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56: 195-201, 2004.
- Van Acker SABE, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, Bast A: Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20:331-42, 1996.
- Van Der Horst HC, Hanemaaijer JH: Cross-flow microfiltration in the food industry: state of the art. *Desalination*, 77: 235-258, 1990.
- Varming C, Andersen ML, Poll L: Influence of thermal treatment on black currant (*Ribes nigrum* L.) juice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25): 7628-7636, 2004.

- Vas G, Vékey K: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3): 233-54, 2004.
- Versari A, Ferrarini R, Parpinello GP, Galassi S: Concentration of grape must by nanofiltration membranes. *Food and Bioprocesses Processing*, 81(3): 275–278, 2003.
- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N: Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal*, 2(10): 1214–1234, 2007.
- Vincze I, Bányai-Stefanovits E, Vatai G: Concentration of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice with membrane separation. *Separation and Purification Technology*, 57: 455–460, 2007.
- Walker JB: Membrane process for the production of superior quality fruit juice concentrates. *Proceedings of International Congress on Membranes and Membrane Processes*, Vol. 1. North American Membrane Society, Chicago, USA, 283-285, 1990.
- Wang LK, Shammas NK, Cheryan M, Zeng Y-M, Zou S-W: Treatment of food industry foods and wastes by membrane filtration. In *Handbook of environmental engineering, Volume 13: Membrane and desalination technologies*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA, 237-267, 2011.
- Wang H, Zhou H: Understand the basics of membrane filtration. *Chemical Engineering Progress*, 109: 33-40, 2013.
- Warczok J, Ferrando M, Lopez F, Guell C: Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering*, 63: 63–70, 2004.
- Watanabe A, Nabetani H, Nakajima M, Ohmori T, Yamada Y, Isiguro Y: Development of multi-stage RO combined system (MRC) for high concentration of apple juice. *Proceedings of International Congress on Membranes and Membrane Processes*, Vol. 1, North American Membrane Society, Chicago, USA, 282-282, 1990.
- Westmoreland JC: *Spirally wrapped reverse osmosis membrane cell*. Assigned to Gulf General Atomic Inc., US patent 3367504, 1968.
- White BL, Howard LR, Prior RL: Impact of different stages of juice processing on the anthocyanin, flavonol and procyanidin contents of cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 4692–4698, 2011.
- Wicklund T, Rosenfeld H J, Martinsen BK, Sundfor MW, Lea P, Bruun T, Blomhoff R, Haffner K: Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 38: 387–391, 2005.
- Wiese S, Kruse HP, Kulling SE: Research project Dietary procyanidins – From a better understanding of human health effects to functionalised foods. Bioavailability and biological activity of procyanidins. Internal Report 2008.
- Wilkes K, Howard LR, Brownmiller C, Prior RL: Changes in chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 4018–4025, 2014.

- Wu XL, Gu LW, Prior RL, McKay S: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7846-7856, 2004.
- Wrolstad RE: Anthocyanins. In *Natural Food Colorants*. Francis FJ, Lauro GJ (Eds.), Marcel Dekker, New York, 237–252, 2000.
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J: Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 423-428, 2005.
- Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In *Antioxidants in food*. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (Eds.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 210-263, 2001.
- Young H, Gilbert JM, Murray SH, Ball, RD: Causal effects of aroma compounds on royal gala apple flavours. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 71: 329-336, 1996.
- Yuan B, Imai M, Kikuchi H, Fukushima S, Hazama S, Akaike T, Yoshino Y, Ohyama K, Hu X, Pei X, Toyoda H: Cytocidal effects of polyphenolic compounds, alone or in combination with anticancer drugs against cancer cells: Potential future application of the combinatory therapy. In *Apoptosis and medicine*. Ntuli TM (Ed.) , InTech, Rijeka, Croatia, 2012. <https://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/cytocidal-effects-of-polyphenolic-compounds-alone-or-in-combination-with-anticancer-drugs-against-ca> [23.08.2016.]
- Yusof UKM, Soh AC, Radzi NFM, Ishak AJ, Hassan MK, Ahmad SA, Khamis S: Selection of feature analysis electronic nose signals based on the correlation between gas sensor and herbal phytochemical. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(5): 360-367, 2015.
- Zhang SQ, Fouda AE, Matsuura T, Chan K: Some experimental results and design calculations for reverse osmosis concentration of green tea juice. *Desalination*, 80(2–3): 211–234, 1991.
- Zhang Y, Vareed SK, Nair MG: Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Science*, 76: 1465-1472, 2005.
- Zhao Y: Berry fruit: value-added products for health promotion. CRC Press, Boca Raton, USA, 2007.
- Zheng W, Wang SY: Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:502–509, 2003.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming J: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555–559, 1999.
- Zhou F, Wang C, Wei J: Separation of acetic acid from monosaccharides by NF and RO membranes: Performance comparison. *Journal of Membrane Science*, 429: 243–251, 2013.
- Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Kurtanek Ž, Garofulić IE: Heat-induced degradation of antioxidants in Marasca paste. *Food Technology and Biotechnology*, 52: 101–108, 2014.

8. PRILOZI

Prilog 1 Tablica za računanje količine šećera.

mL Na-tiosulfata	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer	
	razlika	mg
1	2,4	2,4
2	4,8	2,4
3	7,2	2,5
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,6
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6
11	27,6	2,7
12	30,3	2,7
13	33,0	2,7
14	35,7	2,8
15	38,5	2,8
16	41,3	2,9
17	44,2	2,9
18	47,1	2,9
19	50,0	3,0
20	53,0	3,0
21	56,0	3,1
22	59,1	3,1
23	62,2	3,1