

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Danijela Šeremet
916/PI

**ODREĐIVANJE HIDROKSILNIH
RADIKALA I
ANTIOKSIDACIJSKOG
KAPACITETA ELEKTRONSKOM
SPINSKOM REZONANCIJOM
NAKON VISOKONAPONSKOG
PRAŽNENJA**

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „*Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja*“ (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak uz pomoć doc. dr. sc. Tomislave Vukušić te u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković uz pomoć više znanstvene suradnice dr. sc. Nadice Maltar Strmečki.

ZAHVALA

Jedno veliko HVALA roditeljima koji su ovo omogućili.

I jedno veliko HVALA najboljoj sestri na podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE HIDROKSILNIH RADIKALA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ELEKTRONSKOM SPINSKOM REZONANCIJOM NAKON VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA

Danijela Šeremet, 916/PI

Sažetak: Visokonaponsko pražnjenje pripada u tehnike netermalnog procesiranja hrane. U ovome radu korišten je hibridni reaktor s argonom kao radnim plinom. Tretman se provodio na destiliranoj vodi i soku od jabuke kod različitih frekvencija (60, 90 i 120 Hz) kroz različito vrijeme (3, 5 i 10 min). Elektronska spinska rezonancija korištena je u svrhu određivanja hidroksilnih radikala i antioksidacijskog kapaciteta. Tretman kod 120 Hz kroz 10 min rezultirao je nastankom najvećeg broja hidroksilnih radikala u uzorcima destilirane vode, dok kod uzoraka soka oni nisu zabilježeni. Primjenom blisko-infracrvene spektroskopije uočene su strukturne promjene i kod uzoraka vode i soka. Najveći porast antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke zabilježen je nakon tretmana na frekvenciji od 60 Hz kroz 10 min. Za uzorke soka provedena je analiza parametara boje po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu boja te su najveće promjene boje određene nakon tretmana na frekvenciji od 120 Hz kroz 10 min.

Ključne riječi: visokonaponsko pražnjenje, elektronska spinska rezonancija, bliska-infracrvena spektroskopija, antioksidacijski kapacitet, hidroksilni radikali

Rad sadrži: 66 stranica, 23 slika, 15 tablica, 75 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić*

viši znanstveni suradnik, dr. sc. *Nadica Maltar Strmečki*

prof. dr. sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. izv. prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*
3. dr. sc. *Nadica Maltar Strmečki*, viši znanstveni suradnik
4. doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić* (zamjena)

Datum obrane: 17. srpanj 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF HYDROXYL RADICALS AND ANTIOXIDANT CAPACITY USING ELECTRON SPIN RESONANCE AFTER HIGHVOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE

Danijela Šeremet, 916/PI

Abstract: Highvoltage electrical discharge is non-thermal food processing technique. In this research, experiments were conducted in hybrid reactor with argon as working gas. Treated materials were distilled water and apple juice. Plasma processing parameters were frequency (60, 90 and 120 Hz) and treatment time (3, 5 and 10 min). Electron spin resonance was used to determine hydroxyl radicals and antioxidant capacity. 10 min treatment at 120 Hz resulted in the biggest number of formed hydroxyl radicals in distilled water samples, while they were not determined in apple juice samples. Changes in structural composition were determined both in water and juice samples using near-infrared spectroscopy. The highest increase in antioxidant capacity of apple juice was observed after 10 min treatment at 60 Hz. Analysis of color parameters for apple juice was performed using CIE $L^*a^*b^*$ color system. The biggest change in values of color parameters were observed after 10 min treatment at 120 Hz.

Keywords: highvoltage electrical discharge, electron spin resonance, near-infrared spectroscopy, antioxidative capacity, hydroxyl radicals

Thesis contains: 66 pages, 23 figures, 15 tables, 75 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph. D. *Anet Režek Jambrak*, Associate professor

Technical support and assistance: Ph. D. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor

Ph. D. *Nadica Maltar Strmečki*, Senior Research Associate

Ph. D. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full Professor

Reviewers:

1. Ph. D. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. Ph. D. *Anet Režek Jambrak*, Associate professor
3. Ph. D. *Nadica Maltar Strmečki*, Senior Research Associate
4. Ph. D. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 17 July 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NETOPLINSKE TEHNIKE PROCESIRANJA HRANE I MINIMALNO PROCESIRANA HRANA.....	2
2.2. HLADNA PLAZMA.....	2
2.2.1. Kemija hladne plazme	3
2.2.2. Načini generacije hladne plazme	5
2.2.3. Plazma u tekućinama.....	6
2.3. VODA KAO OSNOVNI SASTOJAK HRANE	8
2.4. OKSIDATIVNI I DUŠIČNI STRES.....	9
2.5. JABUKA I SOK OD JABUKE.....	10
2.6. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL SOKA OD JABUKE.....	12
2.7. ELEKTRONSKA SPINSKA REZONANCIJA.....	14
2.7.1. Hiperfino cijepanje rezonantnih linija	15
2.7.2. Pomoćne tehnike ESR spektroskopije.....	16
2.7.2.1. Metoda spinskih zamki.....	16
2.8. BLISKA - INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
3.2. MATERIJALI	19
3.2.1. Materijali za tretman visokonaponskim pražnjenjem.....	19
3.2.2. Označavanje uzoraka.....	20
3.2.3. Kemikalije	21
3.2.3.1. Za određivanje OH• radikala ESR metodom.....	21
3.2.3.2. Za određivanje antioksidacijskih svojstava soka ESR metodom	22
3.2.4. Oprema	22
3.3. METODE RADA	23
3.3.1. Određivanje suhe topljive tvari (°Bx).....	23
3.3.2. Tretman visokonaponskim pražnjenjem.....	23
3.3.3. Mjerenje temperature uzoraka prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem	25
3.3.4. Mjerenje pH vrijednosti i električne vodljivosti prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem	25
3.3.5. Elektronska spinska rezonancija.....	25
3.3.5.1. ESR spektrometar.....	25
3.3.5.2. Određivanje hidroksilnih radikala ESR metodom.....	27

3.3.5.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke ESR metodom.....	28
3.3.6. NIR spektroskopija.....	28
3.3.7. Određivanje parametara boje sokova po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu boja.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA NA FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA VODE I SOKA OD JABUKE.....	30
4.2. ODREĐIVANJE HIDROKSILNIH RADIKALA POMOĆU ELEKTRONSKE SPINSKE REZONANCIJE.....	32
4.3. ODREĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA PRIMJENOM BLISKO-INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE.....	37
4.4. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET SOKA OD JABUKE.....	44
4.5. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA NA BOJU SOKA OD JABUKE.....	51
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	59

1. UVOD

U posljednjih godina istraživanja u prehrambenoj industriji usmjerena su na razvoj i istraživanje netermalnih tehnika procesiranja hrane u namjeri da zadovolje zahtjeve potrošača koji traže minimalno procesiranu hranu. Minimalno procesirana hrana podrazumijeva hranu koja je po nutritivnim, organoleptičkim i senzorskim karakteristikama što sličnija neprerađenoj sirovini. Visoki potencijal kao netermalna tehnika procesiranja hrane pokazuje hladna plazma. Hladna plazma definira se kao djelomično ili potpuno ionizirani plin sastavljen od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona UV zračenja. Veliki dio istraživanja usmjeren je na interakcije plazma-tekućine, odnosno na električno pražnjenje u tekućinama koje rezultira nastankom brojnim reaktivnih kemijskih vrsta, kako u prostoru iznad tekućine, tako i u samim tekućinama.

U ovome radu kao materijali za tretman visokonaponskim pražnjenjem korišteni su destilirana voda, pošto je voda osnovni sastojak svake namirnice, te sok od jabuke koji je jedan od najčešće konzumiranih voćnih sokova. Tretman se provodio u hibridnom reaktoru u kojem dolazi do visokonaponskog pražnjenja u prostor iznad tekućine i u samu tekućinu. Procesni parametri bili su frekvencija (60, 90 i 120 Hz) i vrijeme tretmana (3, 5 i 10 min). Cilj istraživanja bio je odrediti hidroksilne radikale koji nastaju tijekom visokonaponskog pražnjenja u tekućine pomoću elektronske spinske rezonancije (ESR) koristeći DMPO kao spinsku zamku. Bliska-infracrvena spektroskopija korištena je kao bi se utvrdile promjene u strukturnim karakteristikama ispitivanih tekućina. Također, elektronska spinska rezonancija korištena je u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke uz DPPH kao izvor slobodnih radikala. Provedena je i analiza boje soka koristeći CIE $L^*a^*b^*$ sistem boja. Konačan cilj jest utvrditi nedestruktivan učinak visokonaponskog pražnjenja na fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih tekućina, čime bi se zadovoljili zahtjevi potrošača za visokokvalitetnim i minimalno procesiranim namirnicama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NETOPLINSKE TEHNIKE PROCESIRANJA HRANE I MINIMALNO PROCESIRANA HRANA

U posljednjih dva desetljeća najveće promjene u prehrambenoj industriji odnose se razvoj netoplinskih tehnika procesiranja hrane te minimalno procesirane hrane što je posljedica zahtjeva potrošača za proizvodima koji su po svojim značajkama što sličniji neprerađenoj hrani („*fresh-like*“ proizvodi) te koji zahtijevaju minimalno vrijeme za pripremu. Netoplinske tehnike mogu se definirati kao tehnike konzerviranja hrane koje su učinkovite pri sobnoj temperaturi pri čemu se minimizira negativan učinak topline na nutritivna svojstva i druga svojstva kvalitete prehrambenih proizvoda (Misra i sur., 2016). Neki od primjera netoplinskih tehnika su procesiranje hrane visokim tlakom, ozonom, iradijacijom, ultrazvukom, pulsirajućim električnim ili oscilirajućim magnetskim poljem. Od spomenutih tehnika, u prehrambenoj industriji komercijalizirane su tehnike procesiranja visokim tlakom i pulsirajućim električnim poljem (Vukić i sur., 2018). U posljednjih par godina zabilježen je porast broja znanstvenim radova koji istražuju potencijal hladne plazme kao nove netoplinske tehnike konzerviranja hrane (Misra i sur., 2016).

2.2. HLADNA PLAZMA

Plazma je kvazineutralan, djelomično ili potpuno ionizirajući plin koji se sastoji od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona UV zračenja (Misra i sur., 2016). Plazma se često naziva i četvrto agregatno stanje. Promjena agregatnog stanja od krutog do tekućeg, a zatim i do plinovitog događa se povećanjem unosa energije u određeni sustav. Isto tako, unos energije iznad određene granice u plinovitoj fazi uzrokuje ionizaciju molekula što rezultira materijom u pobuđenom stanju, odnosno plazmom (Thirumdas i sur., 2014). Prema energiji, temperaturi i gustoći elektrona, plazma se može klasificirati na vruću (engl. *high temperature plasma* ili *thermal plasma*) i hladnu plazmu (engl. *cold plasma* ili *non-thermal plasma*) (Petitpas i sur., 2007). Vruća plazma nastaje zagrijavanjem plina do dovoljno visoke temperature (i do 20 000

K) pri čemu dolazi do ionizacije plina. U vrućoj se plazmi sve kemijske vrste, elektroni i ioni nalaze u termodinamičkoj temperaturnoj ravnoteži (Misra i sur., 2016). U hladnoj plazmi elektroni mogu doseći temperature od 10 000 do 100 000 K (1 – 10 eV), dok temperatura atoma i molekula plina može ostati niska kao sobna temperatura (Petitpas i sur., 2007). Svaki oblik energije koji može ionizirati plin može se koristiti za generaciju plazme, kao npr. električna, toplinska, optička (UV svjetlo), radioaktivna energija (gama zračenje) te X-zrake. Ipak, najefikasnija u ionizaciji plina su električna ili elektromagnetska polja (Pankaj, 2018). U plazmi nastaje veliki broj elektrona ($n_e = 10^{11} - 10^{16} \text{ cm}^{-3}$) koji prihvaćaju energiju od električnog polja te se ubrzavaju. To dovodi do velikog broja sudara između elektrona i atoma te molekula u plinu. Sudar može rezultirati promjenom smjera ili energije elektrona, ali zbog različitih masa između elektrona i atoma te molekula, ne dolazi do razmjene energije (Whitehead, 2016). Naime, razmjena energije između dviju čestica različitih masa (m_1 i m_2) tijekom njihovog sudara ovisi o omjeru njihovih masa (m_1/m_2). Ioni imaju približno jednaku masu kao neutralne molekule ($m_1/m_2 \sim 1$) te kod njihovog sudara dolazi do potpune raspodjele energije. Nasuprot ionima, elektroni imaju puno manju masu te kod sudara s neutralnim molekulama ($m_1/m_2 \ll 1$) neće doći do izmjene energije. Stoga se elektroni zagrijavaju više nego ioni, i u prisutnosti električnog polja temperatura elektrona brzo postaje mnogo viša nego temperatura plina (Turner, 2016).

2.2.1. Kemija hladne plazme

Povećanje kinetičke energije elektrona rezultira povećanim brojem sudara u plinovitoj fazi što dovodi do nastanka iona, elektrona, radikala te zračenja različitih valnih duljina. Tijekom sudara elektrona s atomima ili molekulama, može doći do različitih reakcija kao što su:

- Ionizacija: $e + M \rightarrow M^+ + 2e$
- Disocijativna ionizacija: $e + AB \rightarrow A^+ + B + 2e$
- Vezanje elektrona: $e + M \rightarrow M^-$
- Disocijativno vezanje elektrona: $e + AB \rightarrow A^- + B$
- Ekscitacija: $e + M \rightarrow M^* + e$
- Disocijacija: $e + AB \rightarrow A + B$

Ove reakcije nazivaju se primarnim reakcijama plazme i vjerojatnost njihova odvijanja ovisi o energiji elektrona. Produkti nastali u primarnim reakcijama su reaktanti u sekundarnim reakcijama plazme (Whitehead, 2016).

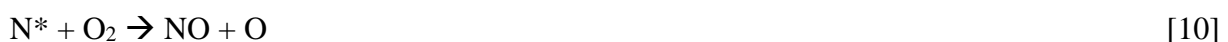
Hidroksilni radikal (OH•) može nastati u primarnim reakcijama disocijacije vode [1] ili u sekundarnim reakcijama neutralizacije iona [2] pri čemu nastaju i vodikovi radikali (H•). Također, može nastati u reakcijama kisika [3] i dušika u pobuđenom stanju [4] koji su se formirali u primarnim reakcijama plazme.



Nastali radikali mogu međusobno reagirati pri čemu nastaju stabilne molekule H₂ [5], H₂O₂ [6] te H₂O [7].



U sekundarnim reakcijama plazme također nastaju dušikovi oksidi (NO, NO₂, N₂O i N₂O₅) plazma pražnjenjem u medij koji sadrži dušik i kisik, kao što je npr. zrak. Prvi korak u takvim reakcijama jest rekombinacija dušikovitih i kisikovih atoma, formiranih u primarnim reakcijama sudara elektrona, pri čemu nastaje dušikov(II) oksid (NO) [8]. NO može nastati i reakcijom kisika u pobuđenom stanju s molekulskim dušikom [9] ili reakcijom dušika u pobuđenom stanju i molekulskog kisika [10].



Nastali NO zatim može oksidirati do dušikovog(IV) oksida pomoću molekulskog kisika [11] ili ozona [12].



NO_2 ulazi u reakcije rekombinacije s atomom kisika pri čemu nastaju radikalne vrste, kao što je NO_3 [13] koji ulazi u reakcije rekombinacije s drugim NO_2 pri čemu nastaje dušikov pentoksid (N_2O_5) [14].



Također, NO_2 može reagirati i s atomom dušika pri čemu nastaje dušikov(I) oksid (N_2O) [15].



Plazma pražnjenjem u plin koji sadrži kisik nastaje ozon. Prvi korak jest disocijacija molekule kisika na dva atoma kisika [16] nakon čega slijedi rekombinacija atoma kisika sa molekulama kisika [17].



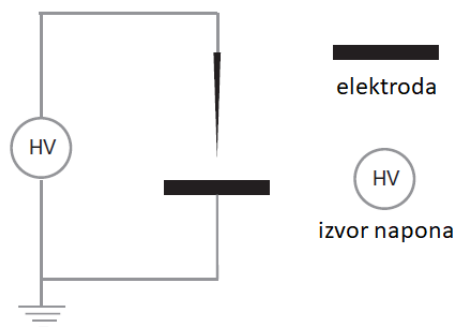
2.2.2. Načini generacije hladne plazme

Za generaciju hladne plazme može se koristiti energija u različitim oblicima kao što su električno ili magnetsko polje te radio-frekvencije ili frekvencije mikrovalova (Thirumdas i sur., 2014) te stoga plazmu, s obzirom na način generiranja, možemo podijeliti na:

- Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija
- Radio – frekventna plazma
- Mikrovalno inducirana plazma (Laroussi i sur., 2006).

Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija, ovisno o dizajnu, mogu biti kontinuirana i pulsirajuća. Kontinuiranim pražnjenjem stvaraju se plazma lukovi (engl. *arc discharge*) i plazma jet, dok se u pulsirajućem načinu rada razlikuje korona pražnjenje (engl. *corona discharge*) i dielektrično barijerno pražnjenje (engl. *dielectric barrier discharge*).

Korona pražnjenje (Slika 1.) je neravnotežna plazma koja se javlja samo kada je električno polje visoko nehomogeno. Koriste se oštre elektrode malog radijusa kao npr. igla, oštri rubovi i tanka žica, a nazivaju se korona elektrode ili aktivne elektrode. Proces ionizacije ograničen je na uski prostor oko visokonaponske korona elektrode zbog nehomogenosti električnog polja. Prema polaritetu visokonaponske elektrode, korona pražnjenje može biti pozitivno i negativno. Kod pozitivnog korona pražnjenja, visokonaponska elektroda je anoda, dok je kod negativnog katoda. Nedostatak korona pražnjenja jest nehomogeno tretiranje te je i površina koja se može tretirati mala (Lu i sur., 2016).



Slika 1. Jedan od primjera konfiguracije elektroda za korona pražnjenje: točka-ploča geometrija elektroda (prema Lu i sur., 2016).

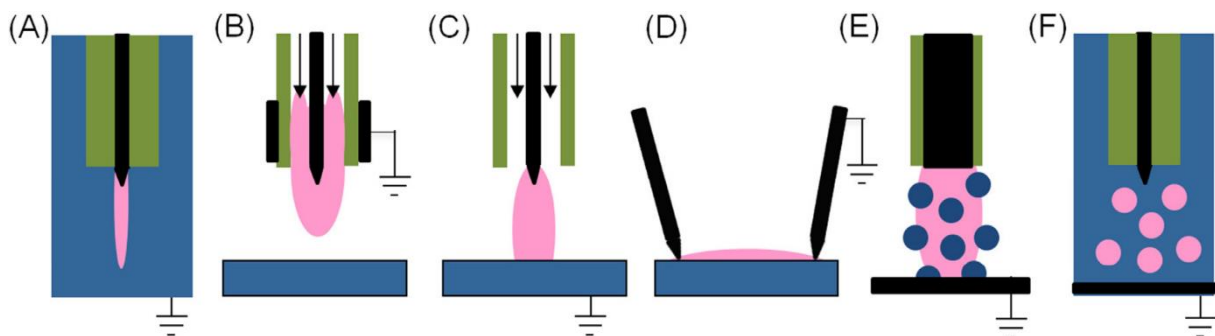
2.2.3. Plazma u tekućinama

Posljednjih godina u području znanosti i tehnologije plazme sve se više istražuju interakcije plazma-tekućine, odnosno električno pražnjenje u tekućinama, za obradu otpadnih voda, mikrobiološku inaktivaciju, biomedicinske tretmane, sinteze nanomaterijala te kemijske sinteze i razgradnje (Bruggeman i sur., 2016).

Električno pražnjenje izaziva razne fizikalne i kemijske promjene u tekućinama. Od fizikalnih promjena najznačajnije su pojava udarnih valova, kavitacije te UV zračenje (Jiang i sur., 2016), dok kemijske promjene uključuju nastajanje vodikovih, kisikovih i hidroksilnih radikala ($H\bullet$, $O\bullet$, $OH\bullet$) te raznih reaktivnih molekula kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) te ozon (O_3).

Za generiranje plazma pražnjenja u tekućinama razvijeni su različiti reaktori koji se mogu podijeliti u 3 kategorije (Slika 2.):

- Direktno pražnjenje u tekućinu (A)
- Pražnjenje u plin iznad tekućine (B - D)
- Pražnjenje u višefazno okruženje kao što je pražnjenje u mjehuriće unutar tekućine ili pražnjenje u aerosol ili pjenu (E i F).



Slika 2. Shematski prikaz različitih plazma pražnjenja u tekućine. (A): direktno pražnjenje u tekućinu; (B)-(D): pražnjenje u plin iznad tekućine gdje je (B) plazma jet bez direktnog kontakta s tekućinom, (C) plinska plazma s tekućom elektrodom, (D) pražnjenje na površinu tekućine; (E): plinska plazma s pražnjenjem u aerosolo; (F): pražnjenje u mjehuriće (Bruggeman i sur., 2016).

Hladna plazma pokazuje visoki potencijal za procesiranje tekućih toplinsko osjetljivih proizvoda, kao što su voćni sokovi za koje toplinski tretman ima štetan utjecaj na senzorska, organoleptička i nutritivna svojstva. Istraživanja su većinom usmjerena na inaktivaciju mikroorganizama u sokovima gdje se hladna plazma pokazala kao vrlo uspješna metoda konzerviranja postigavši redukciju višu od 5 log₁₀ CFU/mL (Pankaj, 2018) što je prema FDA minimum za inaktivaciju patogenih bakterija i bakterija koje izazivaju kvarenje (Tiwari i Rice, 2012). Uz mikrobiološku inaktivaciju, česta su istraživanja utjecaja plazme na boju, fenolni sastav soka te senzorske karakteristike, dok je utjecaj na antioksidativni kapacitet soka manje istraživano. Kratak prikaz utjecaja hladne plazme na mikrobiološke i kemijske promjene različitih vrsta sokova prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Utjecaj hladne plazme na mikrobiološke i kemijske promjene u različitim vrstama voćnih sokova (Pankaj, 2018).

Vrsta soka	Vrsta plazme	Mikrobiološke promjene	Kemijske promjene
sok od nara	plazma jet	/	• povećana stabilnost antocijana
sok od trešnje	plazma jet	/	• veća koncentracija fenolnih spojeva nego nakon termičkog tretmana
sok od naranče	DBD plazma	• 5 log redukcija <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> i <i>Escherichia coli</i>	• bez značajnog utjecaja na sastav fenolnih spojeva, boju i pH vrijednost • degradacija u sadržaju oligosaharida
sok od jabuke	plazma jet	• 5 log redukcija <i>C. freundii</i>	/

2.3. VODA KAO OSNOVNI SASTOJAK HRANE

Voda je kapljevina bez boje, mirisa i okusa čiji su konstitutivni elementi vodik i kisik. Molekula vode je trokutaste strukture s kutom od 104,5 ° između dvije OH veze. Zbog velike razlike u relativnim elektronegativnostima vodika i kisika, molekula vode je polarna molekula (odnosno ima dipolni karakter) zbog čega je izvrsno otapalo pa u prirodi nikad nije sasvim kemijski čista. Specifični toplinski kapacitet vode je 4,18 kJ kg⁻¹ K⁻¹ pri 20 °C što je visoka vrijednost za kapljevinu. Električna vodljivost čiste vode je niska (0,042 μS cm⁻¹) što je čini električnim izolatorom. Ukoliko voda sadrži ione otopljenih soli koji vode struju, vodljivost će biti znatno veća (Mijatović i Matošić, 2013). Voda je, uz proteine, ugljikohidrate, lipide i vitamine, osnovni sastojak hrane koja podržava mnoge kemijske reakcije te se njenim uklanjanjem iz hrane usporavaju kemijske reakcije i inhibira rast mikroorganizama. Voda se u hrani može nalaziti kao slobodna, vezana, okolna ili višeslojna voda. Voda utječe na strukturu

hrane kroz fizikalne interakcije s drugim sastojcima hrane. Relativna dostupnost vode u hrani izražava se kao vodena aktivnost (a_w – vrijednost) i za čistu vodu iznosi 1, odnosno 100%. Određivanje a_w - vrijednosti bitno je za kontrolu rasta mikroorganizama u hrani, kao i za kontrolu kemijskih reakcija u hrani (npr. brzina Maillardovih reakcija se povećava kada a_w – vrijednost padne na 0,8; enzimaska hidroliza masti postaje beznačajna ispod a_w – vrijednosti 0,4).

2.4. OKSIDATIVNI I DUŠIČNI STRES

Uobičajene biokemijske reakcije, veća izloženost štetnom okruženju te veće količine ksenobiotika unesenih hranom dovode to tvorbe reaktivnih kisikovih (ROS – engl. *reactive oxygen species*) i dušikovih vrsta (RNS – engl. *reactive nitrogen species*) u biološkim sustavima (Nimse i Pal, 2015). ROS i RNS su produkti normalnog staničnog metabolizma te nisu štetni u niskim koncentracijama, dok u većim koncentracijama, koja nastaje kao rezultat poremećaja ravnoteže između reakcija nastajanja i uništavanja ROS i RNS, dolazi do pojave oksidativnog, odnosno dušičnog stresa (Valko i sur., 2007). Komponente stanica, kao što su stanični proteini, lipidi i DNA, mijenjaju se u uvjetima oksidativnog i dušičnog stresa što dovodi do raznih oboljenja (Nimse i Pal, 2015). Reaktivne kisikove i dušikove vrste dijele se na radikalne (slobodni radikali) i neradikalne vrste (Tablica 2.). Slobodni radikali mogu se definirati kao molekule ili fragmenti molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskim ili molekulskim orbitalama. Nesporeni elektroni odgovorni su za visoku reaktivnost slobodnih radikala (Valko i sur., 2007). Slobodni radikali „napadaju“ najbližu stabilnu molekulu te joj uzimaju elektron, a molekula s izgubljenim elektronom time postaje slobodni radikal čime započinje lančana reakcija nastajanja radikala (Zang i sur., 2017). Negativan učinak radikala može se uspješno neutralizirati djelovanjem antioksidansa. Antioksidansi se mogu kategorizirati na enzimatske (npr. superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaze) i neenzimatske (npr. vitamin C, fenolni spojevi, katorenoidi, glutation) antioksidanse. Enzimatski antioksidansi kataliziraju pretvorbu štetnih oksidacijskih produkata u vodikov peroksid, a zatim u vodu, a neenzimatski antioksidansi prekidaju lančane reakcije nastajanja radikala doniranjem vodikovog protona (Nimse i Pal, 2015).

Tablica 2. Reaktivne kisikove i dušikove vrste.

Reaktivne kisikove vrste (ROS)			
Radikalne vrste		Neradikalne vrste	
Superoksid radikal	$\bullet\text{O}_2^-$	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroksilni radikal	$\bullet\text{OH}$	Hipoklorna kiselina	HOCl
Peroksilni radikal	$\bullet\text{OOR}$	Ozon	O_3
Alkoksilni radikal	$\bullet\text{OR}$	Singletni kisik	$^1\text{O}_2$
Hidroperoksilni radikal	$\bullet\text{OOH}$	Peroksinitrit	ONOO^-
Reaktivne dušikove vrste (RNS)			
Radikalne vrste		Neradikalne vrste	
Dušikov oksid	$\text{NO}\bullet$	Peroksinitrit	ONOO^-
Dušikov dioksid	$\text{NO}_2\bullet$	Alkilni peroksinitrit	ROONO
		Didušikov trioksid	N_2O_3
		Didušikov tetraoksid	N_2O_4
		Dušikasta kiselina	HNO_2
		Nitronij kation	NO_2^+
		Nitroksil anion	NO^-
		Nitroksil kation	NO^+
		Nitril klorid	NO_2Cl

2.5. JABUKA I SOK OD JABUKE

Voće i povrće, kao sastavni dio zdrave prehrane, bogat su izvor različitih mikronutrijenata. Kao voće, i voćni sokovi bogati su magnezijem, kalijem, vitaminom A i vitaminom C, folnom kiselinom te drugim komponentama voća, kao što su fenolni spojevi i dijetalna vlakna (AIJN, 2014).

Prema Pravilniku, NN 48/13, voćni sok definiran je kao proizvod koji može fermentirati, ali je nefermentiran, a proizvodi se od jestivog dijela voća koje je zdravo, svježe ili konzervirano hlađenjem ili smrzavanjem jedne ili više vrsta pomiješanih zajedno, a ima boju, aromu i okus

karakterističan za sok od voća od kojeg potječe. Sokovi se prema udjelu suhe tvari voća u suhoj tvari soka dijele na 100 % voćne sokove, 100 % voćne sokove od koncentriranog voćnog soka te voćne nektare (25 – 50 %). Koncentrirani voćni sok se, prema Pravilniku, NN 48/13, proizvodi od voćnog soka jedne ili više vrsta voća fizikalnim uklanjanjem određene količine vode i to najmanje 50 % ako je proizvod namijenjen krajnjem potrošaču. Sadržaj topljive tvari konačnog proizvoda mora udovoljavati najmanjoj vrijednosti °Brix-a za rekonstituirane sokove što je definirano istim Pravilnikom. Najmanja vrijednost stupnjeva Brix-a za rekonstituirani voćni sok od koncentriranog voćnog soka od jabuke iznosi 11,2 °Brix.

Jedno od najčešće konzumiranih voća jest jabuka (Podsedeck i sur., 2000). Jabuka čini važan dio ljudske prehrane kao izvor monosaharida, minerala, dijetalnih vlakana i biološki aktivnih spojeva kao što su vitamin C (askorbinska kiselina) i fenolni spojevi. Njena konzumacija povezana je s smanjivanjem rizika nastanka raka, bolesti srca, astme i dijabetesa tipa II (Massini i sur., 2017). Zbog jednostavnije uporabe i sposobnosti da ublaži žeđ, konzumacija voća često je zamijenjena konzumacijom voćnih sokova. Sok od jabuke jedan je od najrasprostranjenijih prerađevina jabuke. Nakon berbe, jabuke se peru i sortiraju nakon čega slijedi redom usitnjavanje, prešanje te podvrgavanje djelovanju enzima. U proizvodnji bistrog jabučnog soka, u proces proizvodnje uključeno je i bistrenje te filtriranje, dok se kod proizvodnje mutnog jabučnog soka provodi centrifugiranje. Prije pakiranja u finalnu ambalažu, obavezno se provodi konzerviranje, najčešće pasterizacijom. Kod proizvodnje koncentriranog jabučnog soka provodi se koncentriranje, najčešće uparavanjem (Massini i sur., 2017). Kemijski sastav soka od jabuke uvjetovan je različitim faktorima kao što su kultivar, područje i uvjeti uzgoja, klima, stupanj zrelosti jabuka tijekom berbe, uvjeti i atmosfera skladištenja i transporta te način procesiranja jabuka (Eisele i Drake, 2005). U Tablici 3. prikazan je prosječan kemijski sastav soka od jabuke proizveden od različitih sorti jabuka.

Tablica 3. Kemijski sastav soka od jabuke (Eisele and Drake, 2005).

<i>Brix</i> °	11,36	<i>Jabučna kiselina</i>	847,70 mg/100 mL
<i>pH</i>	3,71	<i>Izolimunska kiselina</i>	3,80 mg/100 mL
<i>Ukupna kiselost</i> (% od jabučne kiseline)	0,87	<i>Limunska kiselina</i>	11,90 mg/100 mL
<i>Pepeo</i> (% w/w)	0,25	<i>Fumarna kiselina</i>	11,90 mg/100 mL
<i>Saharoza</i>	2,16 g/100 mL	<i>Natrij</i>	11,80 ppm
<i>Glukoza</i>	2,01 g/100 mL	<i>Kalij</i>	1511,00 ppm
<i>Fruktoza</i>	5,69 g/100 mL	<i>Magnezij</i>	64,90 ppm
<i>Sorbitol</i>	0,45 g/100 mL	<i>Kalcij</i>	41,90 ppm
<i>Omjer Glukoza/Fruktoza</i>	3,05 g/100 mL	<i>Željezo</i>	0,10 ppm
<i>Kininska kiselina</i>	41,80 mg/100 mL	<i>Kloridi</i>	1,40 ppm

2.6. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL SOKA OD JABUKE

Antioksidacijskom potencijalu soka od jabuke najviše doprinose fenolni spojevi (70 – 80 %), dok vitamin C doprinosi nešto manje od 5 % (Massini i sur., 2017). Zahvaljujući visokom udjelu vitamina C, konzumacija sokova doprinosi normalnoj funkciji imunološkog sustava i potpomaže povećanju apsorpcije željeza (AIJN, 2014).

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji posjeduju zajedničku kemijsku strukturu koja se sastoji od aromatskog prstena s jednom ili više vezanih hidroksilnih skupina (Xu i sur., 2017). U biljkama je pronađeno preko 8000 fenolnih spojeva koji se mogu podijeliti u dvije grupe – flavonoidi i neflavonoidi. Flavonoidi imaju zajedničku C6 – C3 – C6 strukturu koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana preko tri ugljikova atoma. Podijeljeni su u 6 grupa – flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavan-3-oli (katehini, proantocijanidini i kondenzirani tanini). Prisutni su u obliku aglikona, glikozida i metoksiliranih spojeva (Kyselova, 2011). Od neflavonoida, koji su jednostavnije strukture nego flavonoidi, najbrojnije su fenolne kiseline koje se dijele na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline.

Antioksidacijskom kapacitetu soka od jabuke najviše doprinose flavan-3-oli (monomeri katehina i procijanidini) (Schempp i sur., 2016) koji čine 55 – 60 % ukupnih fenolnih spojeva jabuke (Massini i sur., 2017). Osim flavan-3-ola, dominantni fenolni spojevi jabuke su

hidroksicimetna kiselina, dihidroalkoni, antocijani i flavonoli (Wang i sur., 2015). Navedene komponente nalaze se u soku u nižim koncentracijama što ovisi o načinu procesiranja jabuke i stupnju akumulacije komponenata u voćnim tkivima ovisno o fiziološkoj fazi, klimatskim uvjetima i uvjetima uzgoja. Flavonol glikozidi i antocijani većinom se nalaze u kožici voća te se, zbog spore difuzije, u soku nalaze u malim koncentracijama (Massini i sur., 2017). Najzastupljenija vrsta hidroksicimetne kiseline u soku od jabuke je klorogenska kiselina, dok je od dihidroalkona najzastupljeniji floridizin. Najzastupljeniji predstavnici flavonola jabuke su kvercetin glikozidi (Wang i sur., 2015). Hidrofilni polifenolni spojevi, kao što je klorogenska kiselina, nalaze se u znatno višim koncentracijama u soku u usporedbi s hidrofobnim polifenolnim spojevima, kao što je kvercetin (Massini i sur., 2017). Fenolni spojevi imaju snažna antioksidacijska svojstva, zahvaljujući velikom broju dvostrukih veza i hidroksilnih grupa (Tsao i sur., 2005), koja im omogućuju inaktivaciju slobodnih radikala donirajući vodikov atom čime se prekida lančana reakcija nastajanja slobodnih radikala *in vivo* i *in vitro* (Wang i sur., 2015) stoga fenolni spojevi imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje. Pružajući antioksidativnu zaštitu, fenolni spojevi sprečavaju oksidaciju lipida i DNA te nastanak raka. Istraživanja su pokazala da sudjeluju u prevenciji nastanka kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa te drugih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom. Osim antioksidacijskih svojstava, fenolni spojevi pokazuju i protuupalna, antivirusna te antimikrobna svojstva (Xu i sur., 2017). Visoko molekularni procijanidini služe kao hrana „dobrim“ bakterijama u debelom crijevu te sudjeluju u smanjenju rizika nastanka raka debelog crijeva, dok se kombinacijom vlakana i fenolnih spojeva jabuke postižu antidijabetički i antikolesterolemični učinci (Massini i sur., 2017).

Za određivanje antioksidacijskog potencijala voća i voćnih sokova (koji se izražava kao Trolox ekvivalent ili vitamin C ekvivalent) najčešće se koriste sljedeće metode: (1) ABTS ili TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*); (2) FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*); (3) ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*); (4) TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*); (5) CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*); i (6) DPPH metoda. DPPH je stabilan slobodan radikal s jednim nesparenim elektronom te se najčešće koristi u kvantitativnim analizama elektronske spinske rezonancije (Zang i sur., 2017).

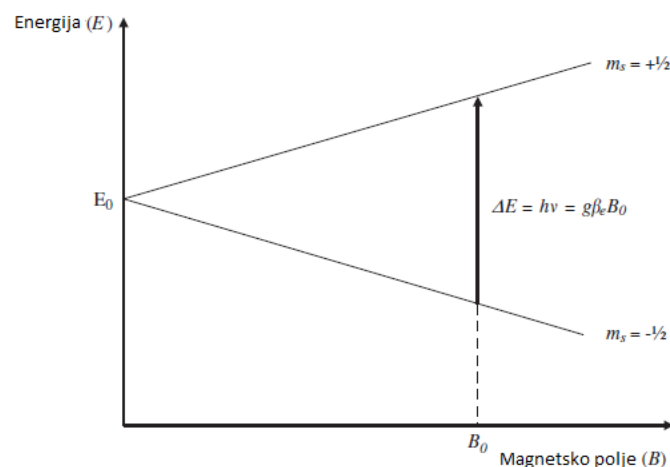
2.7. ELEKTRONSKA SPINSKA REZONANCIJA

Elektronska spinska rezonancija je spektroskopska metoda koja omogućuje direktnu detekciju slobodnih radikala i drugih paramagnetskih vrsta, kao što su ioni prijelaznih metala (Zang i sur., 2017). Paramagnetske vrste sadrže ione ili atome s nesparenim elektronima. Nespareni elektron posjeduje rezultantni magnetski moment ($\vec{\mu}$) koji je s njegovim spinom (\vec{S}) povezan prema formuli [18]:

$$\vec{\mu} = \mu_B g \vec{S} \quad [18]$$

gdje je g Landeov g -faktor (za slobodni elektron iznosi 2,0023), a μ_B Bohrov magnetron ($9,27 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$).

Osnovni princip ESR metode jest interakcija elektromagnetskog zračenja (zračenje mikrovalova) s paramagnetskim sustavom u magnetskom polju (Cammack, 1999). Uzorak se uvodi u homogeno vanjsko magnetsko polje. Spin elektrona ($S = 1/2$) paramagnetskog sustava u uzorku, u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja, može zauzeti različite orijentacije koje se razlikuju po energiji. Najjednostavniji slučaj jest ion ili slobodni radikal s jednim nesparenim elektronom. U tom slučaju, orijentacija elektronskog spina, s obzirom na smjer vanjskog polja, može biti paralelna (α -elektroni) i antiparalelna (β -elektroni) magnetskom polju (Brückner, 2007). Energije α - i β - elektrona nisu jednake te se javlja Zeemanov efekt (Slika 3.), odnosno dolazi do razdvajanja energijskih razina elektrona α - i β - spina paramagnetskog sustava (Pirker i sur., 2008).



Slika 3. Zeemanov efekt (prema Pirker i sur., 2008).

Razlika u energiji između tih razina (ΔE) proporcionalna je magnetskom polju (B) prema jednadžbi [19] i upravo je princip elektronske spinske rezonancije da se paramagnetskom sustavu dovede energija elektromagnetskog mikrovalnog zračenja koja odgovara toj razlici. Mikrovalno zračenje aplicira se okomito na magnetsko polje, a do apsorpcije dolazi kada je energija zračenja $h\nu$ jednaka ΔE (Pirker i sur., 2008) čime dolazi do prijelaza elektrona između energijskih razina elektrona α - i β - spina (Bešić, 2010) te su time ispunjeni uvjeti za rezonanciju i može se snimiti ESR spektar.

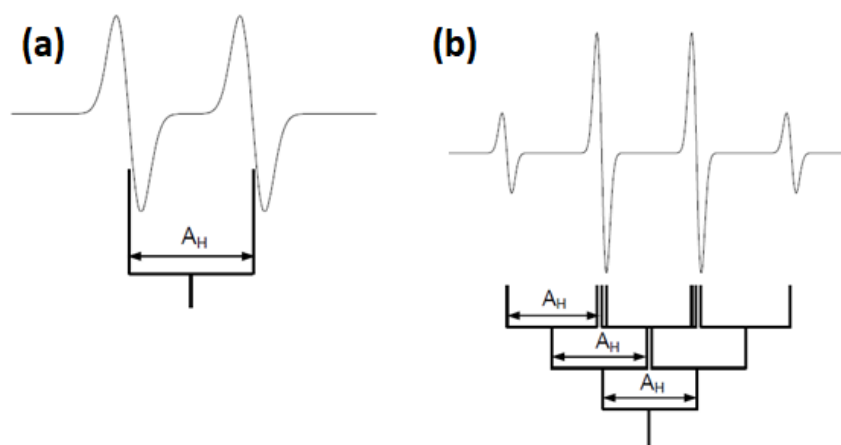
$$\Delta E = g \mu_B B \quad [19]$$

gdje je g Landeov g -faktor, a μ_B Bohrov magnetron.

2.7.1. Hiperfino cijepanje rezonantnih linija

Spin nesporenog elektrona, osim međudjelovanja s vanjskim magnetskim poljem, može međudjelovati i sa susjednim jezgrama rezultantnog spina (I) različitog od nule. Ovakvo međudjelovanje naziva se hiperfinim međudjelovanjem, a u ESR spektru uzrokuje cijepanje osnovne rezonantne linije na više njih što se naziva hiperfinim cijepanjem. Uzrok cijepanju jest dodatno magnetsko polje, koje potječe od spina jezgre, a „osjeća“ nesporeni elektron u blizini. Međudjelovanje spina elektrona i spina jezgre uzrokuje stvaranje $2I + 1$ orijentaciju jezgrinog spina u odnosu na vanjsko magnetsko polje, s $2I + 1$ projekcija spina jezgre na smjer vanjskog magnetskog polja. Svaka orijentacija (projekcija) odgovara drugoj energiji što uzrokuje cijepanje osnovne rezonantne linije na $2I + 1$ liniju jednakog intenziteta (Bešić, 2009).

U radikalima organskih molekula jezgre rezultantnog spina različitog od nule su jezgre vodika ($I = \frac{1}{2}$) i dušika ($I = 1$). Hiperfino međudjelovanje spina elektrona sa spinom protona uzrokovat će cijepanje osnovne rezonantne linije na dvije (dubletno cijepanje) ($2 * \frac{1}{2} + 1 = 2$), dok će međudjelovanjem sa spinom jezgre dušika doći do tripletnog cijepanja osnovne rezonantne linije ($2 * 1 + 1 = 3$). Rezultantni spinovi jezgra kisika i ugljika su jednaki nuli te se u ESR spektrima ne opažava hiperfino djelovanje nesporenog elektrona s ovim jezgrama (Bešić, 2009). Na Slici 4. prikazani su primjeri dubletnog (a) i trostrukog dubletnog hiperfinog cijepanja (b).



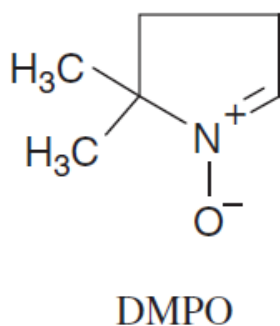
Slika 4. (a): Dupletno hiperfino cijepanje rezonantne linije (A_H); (b): Trostruko dupletno hiperfino cijepanje rezonantne linije pri čemu nastaju četiri rezonantne linije omjera intenziteta 1:3:3:1 (Bešić, 2009).

2.7.2. Pomoćne tehnike ESR spektroskopije

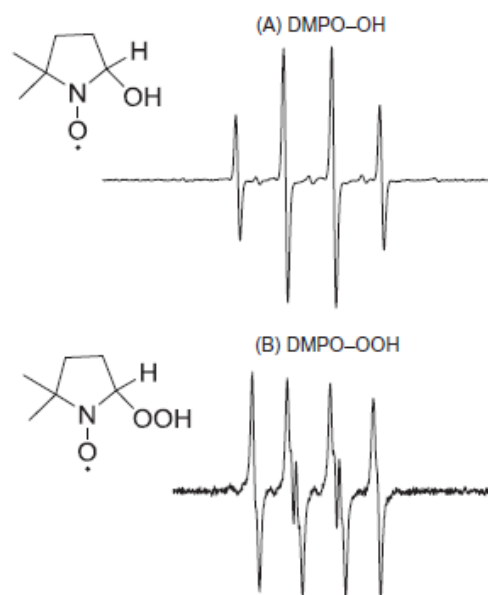
Pomoćne tehnike ESR spektroskopije su: (1) metoda spinskih zamki; (2) metoda spinskih oznaka; i (3) ESR oksometrija (Bešić, 2010).

2.7.2.1. Metoda spinskih zamki

Nespareni elektron slobodnog radikala brzo sparuje svoj spin reakcijom s drugim molekulama ili radikalima što rezultira kratkim vremenom poluživota radikala te se za detekciju takvih kratkoživućih radikala koristi metoda spinskih zamki (engl. *spin trapping technique*) koja predstavlja pomoćnu tehniku ESR spektroskopije (Bešić, 2010). Spinska zamka je dijamagnetska tvar koja brzo i specifično reagira s slobodnim radikalom pri čemu se formira stabilan produkt (spinski adukt) dužeg poluživota koji može biti identificiran pomoću ESR signala. Najčešće korištene spinske zamke su nitroni i nitrozo spojevi, kao što su npr. MNP (2-metil-2-nitrozopropan), DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid; Slika 5.) i PBN (N-tert-butil- α -fenilnitron), koji u reakciji s radikalom tvore nitrokside (Cammack, 1999). Na slici 6. prikazani su primjeri ESR spektra DMPO adukata.



Slika 5. Molekulska struktura DMPO-a (Pirker i sur., 2008).



Slika 6. ESR spektari DMPO adukata (Villamena, 2017).

2.8. BLISKA - INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Bliska - infracrvena spektroskopija ili NIR spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy*) jest visokoenergetska vibracijska spektroskopija koja obuhvaća područje elektromagnetskog spektra od 750 do 2500 nm ($13,333$ do 4000 cm^{-1}) te se pokazala se kao brza, nedestruktivna i precizna analitička metoda (Pasquini, 2018). Vibracijska spektroskopija primjenjuje se za identifikaciju molekula na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno periodičkih promjena kuteva i međuatomskih udaljenosti. Vibracijske spektroskopske tehnike temelje se na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetskog zračenja, a NIR spektroskopija temelji se na apsorpciji zračenja. NIR spektroskopija primjenjuje se za praćenje i kontrolu fizikalnih i kemijskih procesa te kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu (Jednačak i Novak, 2013). Sve se češće koristi u istraživanjima znanosti o prehrani zbog osjetljivosti na CH, NH i OH apsorpciju komponenta hrane (Ozaki i sur., 2007). NIR spektri odlikuju se velikim omjerom signala i šuma, a položaj i intenzitet vrpce može se točno odrediti što je osobito važno za kvantitativnu analizu. Moguće je snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima zbog slabe apsorpcije vode i stakla. Ipak, vrpce u NIR spektrima su manje informativne te može doći i do njihovog preklapanja (Jednačak i Novak, 2013). Stoga je dobivene podatke potrebno obraditi multivarijantnim metodama analize koje

predstavljaju kemometrijske metode za dobivanje informacija iz kemijskih podataka pomoću statističkih postupaka. Jedna od najčešće primjenjivanih jest Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Components Analysis*, PCA).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kako tretman visokonaponskim pražnjenjem, s argonom kao radnim plinom, utječe na tvorbu i stabilnost OH• radikala u soku od jabuke i destiliranoj vodi. Tretman se provodio na različitim frekvencijama (60, 90, 120 Hz) kroz različito vrijeme (3, 5, 10 min). Metoda elektronske spinske rezonancije (ESR) bila je provedena nedugo nakon tretmana te nakon 24 h od tretmana pri čemu su se analizirali uzorci koji su bili skladišteni na sobnoj temperaturi i na temperaturi od 4 °C. Također, uzorci su bili analizirani blisko – infracrvenom spektroskopijom (NIR) kako bi se grupirali pomoću PCA analize prema strukturnim promjenama. Cilj istraživanja bio je odrediti i kako tretman visokonaponskim pražnjenjem utječe na antioksidacijski kapacitet soka od jabuke. Analize su također provedene nedugo nakon tretmana te nakon 24 h od tretmana na uzorcima koji su skladišteni na sobnoj temperaturi i temperaturi od 4 °C.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Materijali za tretman visokonaponskim pražnjenjem

1) Sok od koncentriranog soka od jabuke

Na osnovi receptura iz *Pravilnika o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN/ 48/2013)* pripremljen je sok od koncentriranog soka od jabuke s minimalno 11,2 °Bx . Za pripremu su korištene sljedeće sirovine:

- Koncentrirani voćni sok od jabuke
Za pripremu je korišten koncentrirani sok od jabuke s $70 \pm 0,5$ °Bx (Dona trgovina d.o.o., Matije Gupca 10, G. Stubica, Hrvatska). Topljiva suha tvar određivala se pomoću digitalnog refraktometra DR201-95 (Kruss, Njemačka).

- Voda

U svrhu pripreme soka korištena je voda čiji su parametri kvalitete u skladu sa zahtjevima Zakona o vodi za ljudsku potrošnju NN 104/17.

2) Destilirana voda

Za potrebe eksperimenta korištena je destilirana voda koja je dobivena postupkom elektroionizacije te čija je električna vodljivost manja od 2 $\mu\text{s/cm}$.

3.2.2. Označavanje uzoraka

Tablica 4. Označavanje uzoraka destilirane vode.

		Vrijeme analize ESR metodom		
		Uzorci analizirani odmah nakon tretmana	Uzorci analizirani 24 h nakon tretmana	
			Uvjeti čuvanja uzoraka	
			24 h sobna temp.	24 h 4 °C
Netretiran uzorak		V0	V10	V20
60 Hz	3 min	V1	V11	V21
	5 min	V2	V12	V22
	10 min	V3	V13	V23
90 Hz	3 min	V4	V14	V24
	5 min	V5	V15	V25
	10 min	V6	V16	V26
120 Hz	3 min	V7	V17	V27
	5 min	V8	V18	V28
	10 min	V9	V19	V29

Tablica 5. Označavanje uzoraka soka od jabuke.

		Vrijeme analize ESR metodom		
		Uzorci analizirani odmah nakon tretmana	Uzorci analizirani 24 h nakon tretmana	
			Uvjeti čuvanja uzoraka	
			24 h sobna temp.	24 h 4 °C
Netretiran uzorak		S0	S10	S20
60 Hz	3 min	S1	S11	S21
	5 min	S2	S12	S22
	10 min	S3	S13	S23
90 Hz	3 min	S4	S14	S24
	5 min	S5	S15	S25
	10 min	S6	S16	S26
120 Hz	3 min	S7	S17	S27
	5 min	S8	S18	S28
	10 min	S9	S19	S29

3.2.3. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

3.2.3.1. Za određivanje $\text{OH}\cdot$ radikala ESR metodom

- 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksidi (DMPO), $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$, $M_r=113,16 \text{ g mol}^{-1}$, Merck KGaA, Njemačka
- Dinatrijev fosfat, Kemika, Hrvatska
- Mononatrijev fosfat, Kemika, Hrvatska
- Aktivni ugljen, Kemika, Hrvatska

3.2.3.2. Za određivanje antioksidacijskih svojstava soka ESR metodom

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M_r=394,32 \text{ g mol}^{-1}$, Merck KGaA, Njemačka
- Etanol, Kemika, Hrvatska

3.2.4. Oprema

- Digitalni refraktometar DR201-95, Kruss, Njemačka
- Infracrveni termometar PCE-777, PCE Instruments, Njemačka
- pH metar 340i/SET, WTW, Weilheim, Njemačka
- Digitalni konduktometar λ 340i/SET, WTW, Weilheim, Njemačka
- Izvor napajanja (120 W, 4mA; 1200 W, 40 mA slow start), Spellman, UK
- Rotirajuća sklopka s elektromotorom
- Osciloskop Hantek DS05202BM s naponskom sondom Tektronix P6015A
- Tachometer UNI-T UT 371, Češka
- Pumpa Masterflex Easyload 1/PTM milipore
- Elektrode:
 - Visokonaponska elektroda: igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3,81 cm, titanska žica promjera 1 mm
 - Točkasta elektroda uzemljenja
- ESR spektrometar E-109, Varian Inc., SAD
- Mikrovalni most ER 041 XG, Bruker, Njemačka
- Kolorimetar CM-3500 d, Konica Minolta, Japan
- NIR spektrometar Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm

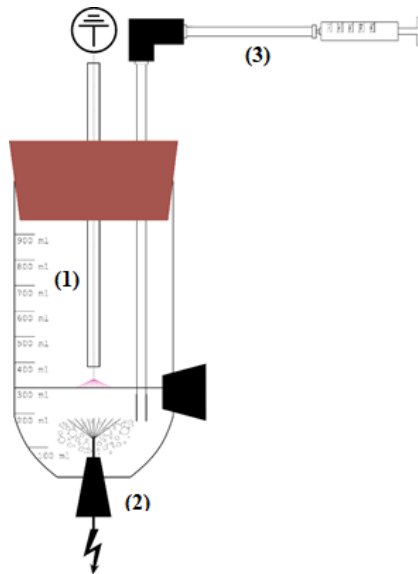
3.3. METODE RADA

3.3.1. Određivanje suhe topljive tvari (°Bx)

Nakon pripreme soka, u cilju provjere da li su pripremljeni sokovi u skladu s *Pravilnikom o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN 48/2013)*, određivala se suha topljiva tvar izražena u °Bx pomoću digitalnog refraktometra (DR201-95, Kruss, Njemačka).

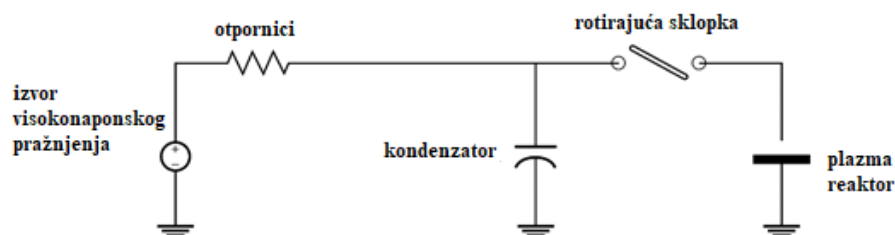
3.3.2. Tretman visokonaponskim pražnjenjem

Plazmom (odnosno, visokonaponskim pražnjenjem) tretirani su sok od jabuke te destilirana voda. Volumen tretiranog uzorka iznosio je 100 mL, a tretman se provodio u tzv. hibridnom reaktoru volumena 300 mL s otvorom na dnu te gumenim čepom s prilagođenim otvorima s gornje strane reaktora (Slika 7.). Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u konfiguraciji točka-točka. Iglučna visokonaponska elektroda nalazila se s donje strane reaktora i kroz nju je bio upuhivan argon (čistoće 99,99%; Messer Croatia, Hrvatska) protokom 4 L/min, dok se elektroda uzemljena od nehrđajućeg čelika nalazila s gornje strane reaktora. Udaljenost između elektroda iznosila je 1,5 cm.



Slika 7. Hibridni plazma reaktor: (1) – elektroda uzemljenja; (2) – visokonaponska elektroda (igla s otvorom za upuhivanje argona); (3) – uzorkovanje.

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK) izlazne snage 1200 W spojen u strujni krug s otpornicima 9,5 M te kondenzatorom kapaciteta 0,75 nF (Slika 8.). Izlazni napon mjereno je naponskom sondom Tektronix P6015A spojenom na osciloskop Hantek DS05202BM. Tretmani su se provodili kod tri različite frekvencije (60, 90 i 120 Hz) kroz različito vrijeme (3, 5 i 10 min).



Slika 8. Shematski prikaz strujnog kruga generatora plazme.

3.3.3. Mjerenje temperature uzoraka prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem

Promjene temperature uzoraka prije i nakon tretmana plazmom mjerene su digitalnim infracrvenim termometrom (Infrared Thermometer, PCE-777, PCE Instruments, Njemačka).

3.3.4. Mjerenje pH vrijednosti i električne vodljivosti prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem

Za određivanje pH vrijednosti uzoraka prije i nakon tretmana korišten je pH metar (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Njemačka).

Mjerenje vodljivosti uzoraka prije i nakon tretmana vršilo se na digitalnom konduktometru (λ 340i/SET, WTW, Weilheim, Njemačka).

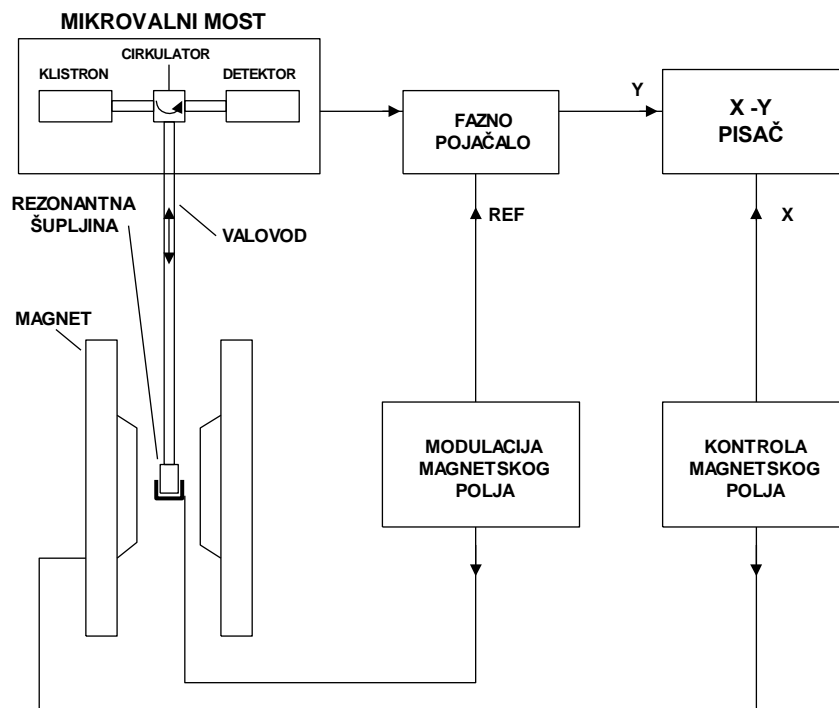
3.3.5. Elektronska spinska rezonancija

ESR metoda provedena je na ESR spektrometru Varian E-109 (Varian Inc., SAD) koji je opremljen mikrovalnim mostom ER 041 XG (Bruker, Njemačka) (Slika 9.).

3.3.5.1. ESR spektrometar

ESR spektrometar (Slika 9.) sastoji se od izvora zračenja (klistron), apsorpcijske ćelije (rezonantna šupljina unutar koje se koncentrira promjenjivo mikrovalno polje na uzorak) i detektora (kristalna dioda osjetljiva na mikrovalne frekvencije). Rezonantna šupljina s uzorkom stavlja se između polova elektromagneta koji imaju vodeni sustav za hlađenje. Mikrovalni most čine klistron, valovod, izolator, cirkulator i sklop za automatsku kontrolu frekvencija. Klistron je generator mikrovalova, a njegovi glavni dijelovi su katoda, rešetkasta anoda i reflektor. Rezonantna šupljina klistrona mehaničkom rezonancijom modulira brzinu prelaska elektrona od katode prema reflektoru te tako modulirani elektronski snopovi proizvode promjenjivo elektromagnetsko polje koje se prenosi valovodom prema rezonantnoj

šupljini s uzorkom. Izolator se nalazi na izlasku iz klistrona te je njegova funkcija propuštanje mikrovalne snage u samo jednom smjeru čime štiti klistron od eventualno reflektirane snage iz šupljine. Generirani valovi imaju frekvenciju od 8,8 do 9,6 GHz. Cirkulator predstavlja raskrscnicu valovoda prema klistronu, rezonantnoj šupljini i detektoru. Sva snaga klistrona se usmjerava prema rezonantnoj šupljini, a reflektirana snaga prema detektoru. Uzorak za mjerenje stavlja se u rezonantnu šupljinu između polova elektromagneta na mjesto gdje je gustoća silnica promjenjivog magnetskog polja najveća te se na taj način postiže maksimalna apsorpcija elektromagnetskog zračenja. Osjetljivost detekcije povećava se moduliranjem magnetskog polja frekvencijom od 100 kHz. U tu svrhu služe modulacijske zavojnice postavljene s vanjske strane zidova šupljine. Energija mikrovalnog zračenja ulazi u rezonantnu šupljinu kroz otvor na stjenci čija se veličina može mijenjati vijkom. Detekcija se vrši faznim detektorom koji je osjetljiv samo na frekvencije kojom se modulira magnetsko polje te tako šum svih ostalih frekvencija ostaje izvan detekcije. Na opisani način dobiva se uobičajeni ESR spektar koji zbog načina detekcije ima oblik prve derivacije apsorpcijske krivulje u ovisnosti o promjeni magnetskog polja. Signal se upućuje na računalo.



Slika 9. Blok shema ESR spektrometra Varian E-109.

3.3.5.2. Određivanje hidroksilnih radikala ESR metodom

Kod određivanje prisutnosti OH• radikala koristila se spinska zamka DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid; Merck KGaA, Njemačka) koja se pripremila na sljedeći način:

1. 11,6123 g Na₂HPO₄ i 2,839 g NaH₂PO₄ dodalo se u 1 L destilirane vode nakon čega se dodalo 5% 25 M DTPA. Priređena otopina fosfatnog pufera ostavila se 2 sata na sobnoj temperaturi te se nakon toga filtrirala. 113,2 mg DMPO rastopilo se u 1 mL otopine fosfatnog pufera s 150 mg aktivnog ugljena nakon čega je slijedilo miješanje 1 min te centrifugiranje kroz 5 min (10 000 rpm). Dobiveni se supernatant brzo zamrznuo tekućim dušikom i čuvao na – 70 °C do korištenja za analizu.

Reakcijom spinske zamke DMPO i hidroksilnih radikala nastaju stabilni nitroksil-radikali (DMPO-OH spin adukti) koji su pogodni za detekciju ESR spektroskopijom.

Uzorak soka/destilirane vode pomiješali su se u omjeru 250 µL uzorak : 10 µL DMPO. Dio volumena prebacio se u staklenu kapilaru koja se stavila u rezonantnu šupljinu između polova elektromagneta ESR spektrometra. ESR spektri snimani su pri centralnom polju od 3308 G uz magnetski raspon od 100 G, snagu mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudu modulacije 4 G i pojačanje 5000 te vremenom snimanja magnetskog polja od 20 s. Za snimanje i obradu ESR spektra korišten je EW (EPRWare) Scientific Software Service program.

Simulacija snimljenih spektara napravljena je u Easyspin programu za simulaciju, programski paket Matlab (MATLAB R2011b, The MathWorks, Inc., Massachusetts, United States) (Stoll i Schweiger, 2006). Od svih snimljenih spektara najprije je oduzet pozadinski signal (šum, nosač, šupljina) te je tako dobiveni spektar simuliran. Pri simulaciji za DMPO-OH adukte korišteni su hiperfini parametri $a_H = a_N = 1.49$ mT i širina linije od minimuma do maksimuma u iznosu od 0.1 mT. Promjene broja radikala za različite tretmane izračunate su dvostrukom integracijom simuliranih spektara. Kao kontrolni uzorci korišteni su netretirana destilirana voda i netretirani sok od jabuke u kojima nije detektiran ESR signal.

3.3.5.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke ESR metodom*

U svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke korišten je stabilan radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; Merck KGaA, Njemačka) otopljen u etanolu. DPPH sparuje svoj elektron s vodikom antioksidansa pri čemu nastaje reducirani oblik DPPH-H. Koncentracija DPPH u etanolu bila je $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$. Prije analize uzoraka soka, snimljen je ESR spektar otopine DPPH u etanolu koji je predstavljao slijepu probu. Analizirani uzorak soka i DPPH otopljen u etanolu pomiješali su se u staklenoj kiveti u omjeru $4000 \mu\text{L DPPH} : 100 \mu\text{L soka}$. Sadržaj se vorteksirao te se dio prebacio u staklenu kapilaru koja se zatim stavlja u rezonantnu šupljinu između polova elektromagneta ESR spektrometra te se počinje sa snimanjem ESR spektra. Analiza traje 20 min, a počinje dodatkom DPPH u uzorak soka. Prvih 5 min ESR spektri su snimani svakih 30 s, a kasnije svakih 60 s.

ESR spektri snimani su pri centralnom polju od 3310 G uz magnetski raspon od 100 G, snagu mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudu modulacije 3,2 G i pojačanje 1000 te vremenom snimanja od 20 s. Za snimanje i obradu ESR spektra korišten je EW (EPRWare) Scientific Software Service program.

ESR spektrometri prikazuju spektre u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija te su stoga korištenjem EW programa računane vrijednosti dvostrukih integrala ESR spektra uzorka koje su proporcionalne broju radikala u uzorku. Princip ove metode jest praćenje pada intenziteta signala, odnosno pada vrijednosti dvostrukih integrala spektara u funkciji vremena proteklog od trenutka dodatka DPPH uzorku soka. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije radikala u odnosu na broj radikala u slijepoj probi (DPPH otopljen u etanolu).

3.3.6. NIR spektroskopija

NIR spektrometar (Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm) s instaliranim Control Development programom Spec 32 koristio se za snimanje uzoraka u NIR području spektra od 904 do 1699 nm. Svaki uzorak analizirao se tri puta nakon čega se izračunala srednja vrijednost spektra. Obrada rezultata NIR spektroskopije provodila se u programu Statistica ver. 8.1. (StatSoft, 2009).

3.3.7. Određivanje parametara boje sokova po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu boja

Boja uzoraka soka određivala se pomoću kolorimetra CM3500d (Konica Minolta, Japan) koji radi na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. Mjerenje se provodilo prije i nakon tretmana plazmom. Mjerile su se L^* , a^* i b^* vrijednosti, a kontrola mjerenja obavljala se preko softvera SpectraMagic NX. Uzorak za analizu (10 mL) stavio se u plastičnu kivetu (dimenzije: v/š/d 5/3,5/1 cm). Sva mjerenja bila su u SCI (Specular Component Included) modu (ASTM International (1987)).

Parametar L^* predstavlja mjeru svjetlosti čija se vrijednost kreće od 0 (crno) do 100 (bijelo). Parametar a^* , ovisno o predznaku, iskazuje spektar od crvene (+ a^*) do zelene boje (- b^*), dok parametar b^* iskazuje spektar od žute (+ b^*) do plave boje (- b^*). Iz izmjerenih parametara L^* , a^* i b^* pomoću formula izračunaju se parametri C [20], H° [21] i ΔE [22].

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad [20]$$

$$H^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad [21]$$

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{\Delta L^{2*} + \Delta a^{2*} + \Delta b^{2*}} \quad [22]$$

Parametar C predstavlja zasićenje ili intenzitet boje, pri čemu je zasićenost boje slabija što su niže vrijednosti. Parametar H° predstavlja vizualni doživljaj boje (0 – 90° je crveno-narančasta boja; 90 - 180° je žuto-zelena boja; 180 - 270° je plavo-zelena boja; 270 – 360 ° je plavo-ljubičasta boja). Parametar ΔE predstavlja promjene u boji između netretiranog i tretiranih uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA VODE I SOKA OD JABUKE

U Tablicama 6. i 7. prikazane su vrijednosti temperature, pH i električne vodljivosti za uzorke destilirane vode i soka od jabuke prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem.

Tablica 6. Temperatura, pH vrijednost i električna vodljivost uzoraka vode prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem.

Uzorak	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	ΔT (°C)	pH ₁	pH ₂	σ ₁ (μS/cm)	σ ₂ (μS/cm)
V1	17,1	22,1	5	5,79	4,38	1,79	6,95
V2		25,00	7,9		3,80		15,60
V3		31,2	14,1		4,03		18,57
V4	17,8	22,5	4,7		4,10		7,34
V5		25,7	7,9		4,59		15,21
V6		32,5	14,7		3,70		27,11
V7	18,3	22,7	4,4		4,22		15,58
V8		25,4	7,1		4,00		18,01
V9		34,9	16,6		4,43		18,70

Tablica 7. Temperatura, pH vrijednost i električna vodljivost uzoraka soka od jabuke prije i nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem.

Uzorak	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	ΔT (°C)	pH ₁	pH ₂	σ ₁ (μS/cm)	σ ₂ (μS/cm)
S1	15,6	22,4	6,8	3,86	3,81	2136,00	2213,00
S2		25,8	10,2		3,82		2227,0
S3		34,3	18,7		3,76		2210,0
S4	17,8	23,8	6		3,83		2201,00
S5		27,9	10,1		3,82		2194,00
S6		36,5	18,7		3,80		2148,00
S7	17,1	25,3	8,2		3,85		2162,00
S8		31,2	14,1		3,79		2149,00
S9		35,3	18,2		3,82		2274,00

Tretman visokonaponskim pražnjenjem na 120 Hz kroz 10 min uzrokovao je najviši porast temperature kod uzoraka vode (uzorak V9; $\Delta T = 16,6$ °C) (Tablica 6.), dok je najviši porast temperature među uzorcima soka zabilježen nakon tretmana na 60 i 90 Hz kroz 10 min (uzorci S3 i S6; $\Delta T = 18,7$ °C) (Tablica 7.). Dasan i Boyaci (2018) zabilježili su porast temperature uzoraka soka od jabuke, naranče i rajčice za otprilike 10 °C nakon 3 min tretmana atmosferskom hladnom plazmom.

Tretman visokonaponskim pražnjenjem uzrokovao je pad pH vrijednosti i rast električne vodljivosti u svim uzorcima vode (Tablica 6.). Najveći pad pH vrijednosti te rast električne vodljivosti uočeni su u uzorku V6 (90 Hz, 10 min). Neki od mogućih uzroka pada pH vrijednosti su otapanje u vodi hidroksilnih radikala (OH•) koji nastaju tijekom plazma pražnjenja (Pankaj i sur., 2017) te vodikov kation (H⁺) koji disocira iz molekule vode (Xiang i sur., 2018). Visokonaponsko pražnjenje u vodi rezultira nastankom brojnih nabijenih čestica (elektroni te pozitivno i negativno nabijeni ioni) (Locke i sur., 2006) što uzrokuje porast u električnoj vodljivosti vode. Za razliku od vode, tretman visokonaponskim pražnjenjem nije uzrokovao značajne promjene u pH vrijednosti soka od jabuke čime je očuvana kiselost soka kao jedan od parametra kvalitete, kao ni promjene u električnoj vodljivosti. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da nastanak reaktivnih kemijskih vrsta ovisi o električnoj vodljivosti tretirane tekućine. Više vrijednosti električne vodljivosti tekućine rezultirat će

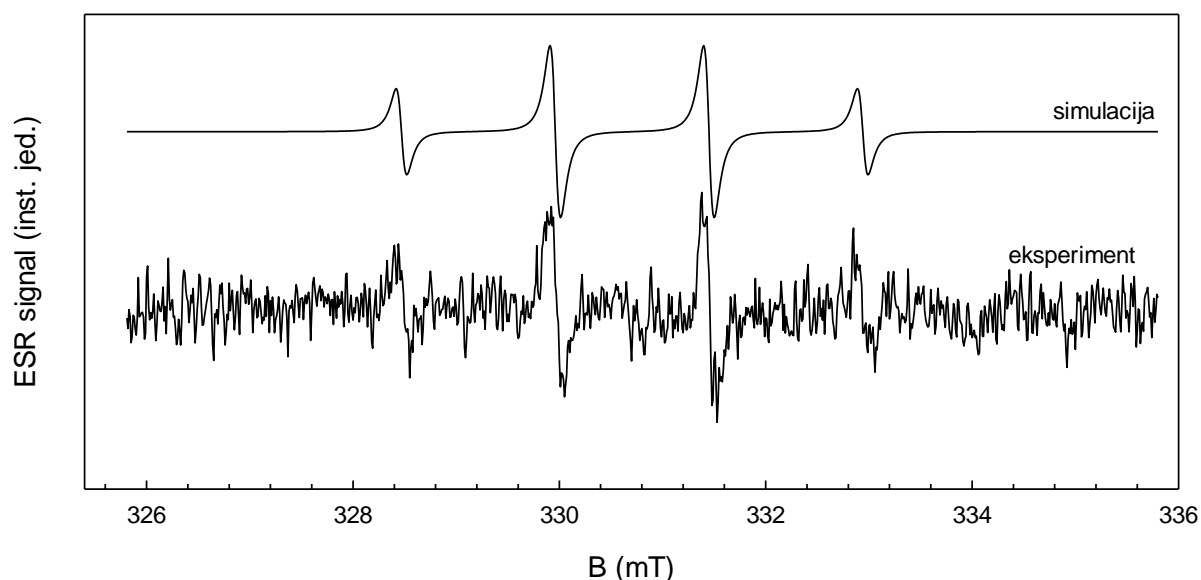
manjim nastankom reaktivnih kemijskih vrsta (Grymonpré i sur., 2001) što u konačnici ima za posljedicu manji utjecaj na parametre kvalitete ispitivane tekućine, a to je u ovom slučaju sok. Pankaj i sur. (2017) također nisu zabilježili značajne promjene u pH vrijednosti i električnoj vodljivosti soka od grožđa nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, kao ni Dasan i Boyaci (2018) značajne promjene u pH vrijednosti soka od jabuke, naranče i rajčice nakon tretmana atmosferskom hladnom plazmom.

4.2. ODREĐIVANJE HIDROKSILNIH RADIKALA POMOĆU ELEKTRONSKE SPINSKE REZONANCIJE

Plazma pražnjenje u tekućini rezultira nastankom brojnih reaktivnih kemijskih vrsta među koje pripadaju i hidroksilni radikali ($\text{OH}\cdot$) (Bruggeman i sur., 2016) koji nastaju i u primarnim i sekundarnim reakcijama plazme (Poglavlje 2.2.1.). Klasificirani su kao reaktivne kisikove vrste koje potencijalno mogu biti opasne za žive stanice. Visoka reaktivnost hidroksilne radikale čini učinkovitim reaktantima u naprednim oksidacijskim procesima (engl. *advanced oxidation processes*) za pročišćavanje otpadnih voda (gdje se otopljene organske tvari razgrađuju lančanim reakcijama radikala iniciranih $\text{OH}\cdot$ radikalima) kao i u inaktivaciji mikroorganizama gdje reagiraju s nezasićenim masnim kiselinama na membranama stanica što uzrokuje promjenu funkcija membranskih lipida te ulazak iona i polarnih molekula u stanicu što dovodi do smrti stanice (Bai i sur., 2011). Također, visoka reaktivnost čini ih kratkoživućim vrstama u atmosferskim pražnjenjima ($< 100 \mu\text{s}$) (Whitehead, 2016). Mogu se detektirati različitim metodama kao što su vakuum ultraljubičasta apsorpcijska (VUV) spektroskopija, laserom inducirana fluorescencijska (LIF) spektroskopija te elektronska spinska rezonancija (ESR) (Gorbanev i sur., 2016). Određivanje radikalnih vrsta u plazma tretiranim tekućinama koristeći ESR i različite spinske zamke opisano je u brojnim radovima. Tani i sur. (2012) opisali su metodu određivanja $\text{OH}\cdot$ radikala koristeći CYPMPO (5-(2, 2-dimetil-1, 3-propoksiciklofosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi) kao spinsku zamku, Takamatsu i sur. (2014) koristeći DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksidi) te Tresp i sur. (2013) koristeći BMPO (5-*tert*-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin N oksidi).

U ovome radu za određivanje hidroksilnih radikala korištena je metoda elektronska spinska rezonancija (ESR), a kao spinska zamka korišten je DMPO. Uzorci destilirane vode i soka od jabuke analizirani su neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem (gdje je kao

radni plin korišten argon) te 24 h nakon tretmana pri čemu su bili skladišteni na sobnoj temperaturi i na temperaturi od 4°C kako bi se ustanovila stabilnost nastalih hidroksilnih radikala. Među uzorcima destilirane vode analiziranih neposredno nakon tretmana, ESR spektar DMPO-OH adukta određen je jedino kod uzoraka tretiranih 10 min kod svih frekvencija (uzorci V3, V6 i V9). Primjer snimljenog i simuliranog ESR spektra za uzorak V3 dan je na Slici 10., a podaci za ostale uzorke prikazani su u Tablici 8. kao broj slobodnih radikala. Poznato je da plazma pražnjenje izaziva nastanak velikog broja različitih vrsta radikala koji zbog brzog kretanja molekula u tekućini, kao i zbog svoje visoke reaktivnosti, ulaze u reakcije rekombinacije s drugim molekulama ili međusobno (pri čemu nastaje vodikov peroksid) što je jedan od mogućih razloga zašto OH• radikali nisu određeni u drugim uzorcima destilirane vode analiziranih neposredno nakon tretmana.



Slika 10. ESR spektar DMPO-OH adukta snimljen u uzorku V3 (60 Hz, 10 min).

Tablica 8. Broj slobodnih radikala u uzorcima destilirane vode određen ESR metodom.

Uzorak	Broj radikala	Uzorak	Broj radikala	Uzorak	Broj radikala
V0	$4,44 \times 10^{13}$	V10	$8,31 \times 10^{13}$	V20	$5,06 \times 10^{13}$
V1	$6,99 \times 10^{13}$	V11	$1,40 \times 10^{14}$	V21	$7,87 \times 10^{13}$
V2	$6,60 \times 10^{13}$	V12	$1,47 \times 10^{14}$	V22	$8,99 \times 10^{13}$
V3	$1,47 \times 10^{14}$	V13	$2,22 \times 10^{14}$	V23	$8,21 \times 10^{13}$
V4	$1,36 \times 10^{14}$	V14	$8,70 \times 10^{13}$	V24	$1,51 \times 10^{14}$
V5	$2,06 \times 10^{14}$	V15	$9,62 \times 10^{13}$	V25	$1,44 \times 10^{14}$
V6	$6,22 \times 10^{14}$	V16	$9,33 \times 10^{13}$	V26	$1,71 \times 10^{14}$
V7	$1,85 \times 10^{13}$	V17	$1,66 \times 10^{14}$	V27	$1,19 \times 10^{14}$
V8	$1,48 \times 10^{13}$	V16	$1,67 \times 10^{14}$	V28	$1,07 \times 10^{14}$
V9	$1,36 \times 10^{14}$	V19	$1,47 \times 10^{14}$	V29	$1,28 \times 10^{14}$

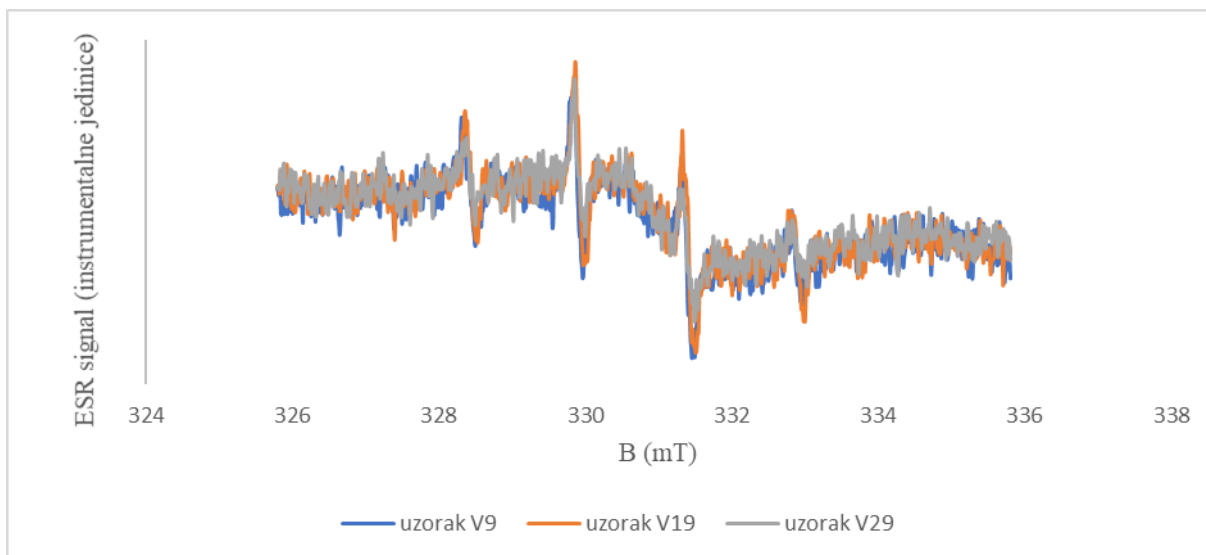
Tretman visokonaponskim pražnjenjem na 90 Hz rezultirao je nastankom najvećeg broja hidroksilnih radikala, dok je tretman na 120 Hz rezultirao njihovim najmanjim brojem (Tablica 8.). Plazmom izazvan nastanak OH• radikala ovisi o brojnim čimbenicima, a jedan od najznačajnijih jest vrsta korištenog plina. Kao radni plin korišten je argon koji u plinskoj fazi ulazi u reakcije s elektronima plazme [23] nakon čega reagira s molekulama vode pri čemu dolazi do formiranja hidroksilnih radikala [24] (Takamatsu i sur., 2014).



Takamatsu i sur. (2014) proučavali su nastanak reaktivnih kemijskih vrsta nakon tretmana plazma jetom u ovisnosti o vrsti plina. Najveću koncentraciju OH• radikala (210 μM) zabilježili su koristeći argon pomiješan s vodom kao radni plin, zatim padajućim redoslijedom za dušik (130 μM), argon (84 μM), helij (68 μM), kisik (32 μM), ugljikov dioksid (28 μM) i zrak. Osim u vodi, hidroksilni radikali nastaju plazma pražnjenjem u prostor iznad tekućine te difundiraju u tekućinu što su dokazali Kanazawa i sur. (2011) koristeći LIF spektroskopiju. Nimalo manje bitan parametar jest izvedba plazme. U ovome radu korišten je hibridni reaktor gdje plazma dolazi u direktan kontakt s vodom pri čemu veliki dio OH• radikala nastaje disocijacijom vode. Tani i sur. (2012) proučavali su ovisnost nastanka hidroksilnih radikala o

načinu izvedbe plazme koristeći helij kao radni plin. Najjači ESR signal, odnosno najveću koncentraciju OH• radikala, zabilježili su nakon tretmana plazma jetom u direktnom kontaktu plazme s površinom tekućine, dok su kod indirektnih kontakta plazme zabilježene niže koncentracije i to još niže ako je helij pomiješan s kisikom. Važni su parametri i sastav te vlažnost korištenog plina. Gorbanev i sur. (2016) zabilježili su nižu koncentraciju OH• radikala koristeći suhi helij u usporedbi s vlažnim helijem, kao i pad koncentracije OH• radikala uvođenjem kisika u helij što se može objasniti s redukcijom gustoće elektrona plazme povećanjem sadržaja molekula u plinu. Soloshenko i sur. (2009) također su zabilježili veću koncentraciju OH• radikala nakon dielektričnog barijernog pražnjenja korištenjem vlažnijeg zraka, i to 3 puta veću povećanjem vlažnosti zraka od 20 na 80%. U ovome radu kao radni plin korišten je argon čistoće 99,99%, dakle suhi argon, koji također nije rezultirao nastankom velikog broja hidroksilnih radikala nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem.

Iako u pojedinim uzorcima destilirane vode (uzorci V1, V2, V4, V5, V7 i V8) nije zabilježen ESR signal DMPO-OH adukta neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, on je zabilježen u istim uzorcima 24 h nakon tretmana. Na slici 11. dan je primjer za uzorke tretirane 10 min na frekvenciji od 120 Hz. ESR signal DMPO-OH adukta bio je jači kod uzoraka destilirane vode skladištenih 24 h na sobnoj temperaturi u odnosu na uzorke skladištene 24 h na temperaturi od 4 °C. Porast broja radikala nakon skladištenja najvjerojatnije je posljedica interakcije uzoraka s radikalima iz zraka, pošto uzorci nisu bili skladišteni u hermetički zatvorenim posudama, ili posljedica reakcija rekombinacija drugih vrsta radikala. Rezultati upućuju na činjenicu da se spomenute reakcije odvijaju brže na sobnoj temperaturi, nego na temperaturi od 4 °C.

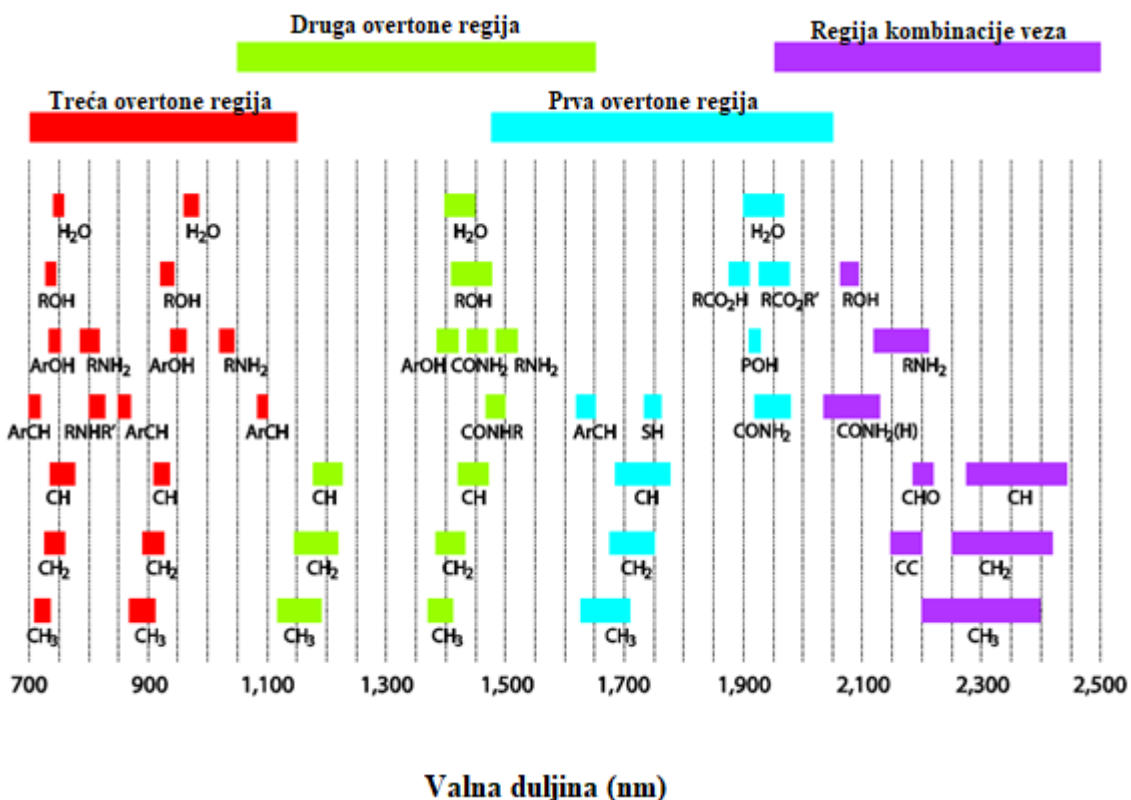


Slika 11. ESR spektri za uzorke destilirane vode koji su tretirani visokonaponskim pražnjenjem na frekvenciji od 120 Hz kroz 10 min i analizirani neposredno nakon tretmana (uzorak V9) te 24 h nakon tretmana pri čemu su bili skladišteni pri sobnoj temperaturi (uzorak V19) i na temperaturi od 4 °C (uzorak V29).

ESR signal DMPO-OH adukta nije uočen u uzorcima soka od jabuke analiziranih neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, kao ni nakon skladištenja. U uzorcima soka od jabuke hidroksilni radikali nisu „uhvaćeni“ pomoću spinske zamke DMPO iz razloga što se nastali hidroksilni radikali neutraliziraju s antioksidansima soka (fenolni spojevi i askorbinska kiselina). Pavithra i Vadivukkarasi (2015) dokazali su sposobnost fenolnih spojeva da neutraliziraju hidroksilne radikale, a tu sposobnost posjeduje i askorbinska kiselina (Nimse i Pal, 2015). Također, uspoređujući s destiliranom vodom, sok od jabuke ima više vrijednosti električne vodljivosti što rezultira manjom količinom nastalih reaktivnih kemijskih vrsta u soku tijekom plazma pražnjenja (Grymonpré i sur., 2001) (Poglavlje 4.1.).

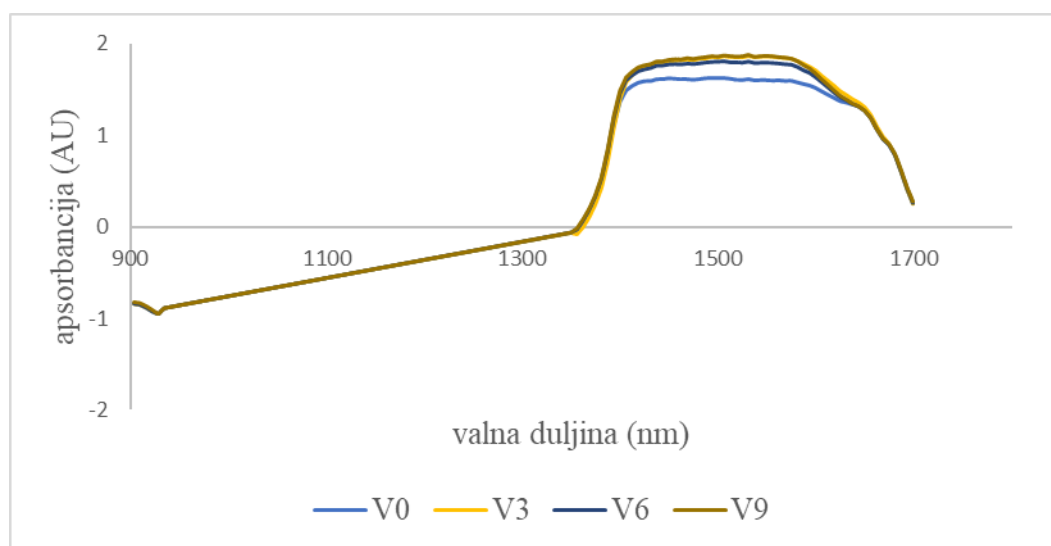
4.3. ODREĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA PRIMJENOM BLISKO-INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE

NIR spektroskopija pokazala se kao vrlo efikasna i napredna metoda za praćenje i kontrolu procesa u prehrambenoj industriji, isto kao i za kontrolu kvalitete prehrambenih proizvoda (Herceg i sur., 2016). Neki od primjera su primjena NIR spektroskopije u kontroli kvalitete ekstrakata divljih bobica tijekom skladištenja (Georgieva i sur., 2013), određivanje sadržaja šećera i kiselina u avokadu (Wedding i sur., 2013), određivanje pravog vremena berbe mandarina (Sánchez i sur., 2013) te određivanje ukupnih fenolnih spojeva biljke *Ilex paraguariensis* (Frizon i sur., 2015). NIR spektar obuhvaća kombinacije vibracijskih vrsta i overtone koji sadrže C-H, O-H i N-H kemijske veze, a dobivaju se preklapanjem odgovarajućih apsorbancija (Alishahi i sur., 2010) (Slika 12.). Za njegovu analizu koriste se različite kemometrijske metode (Georgieva i sur., 2013), a u ovome radu korištena je Analiza glavnih komponenti ili PCA analiza (engl. *Principal Components Analysis*).

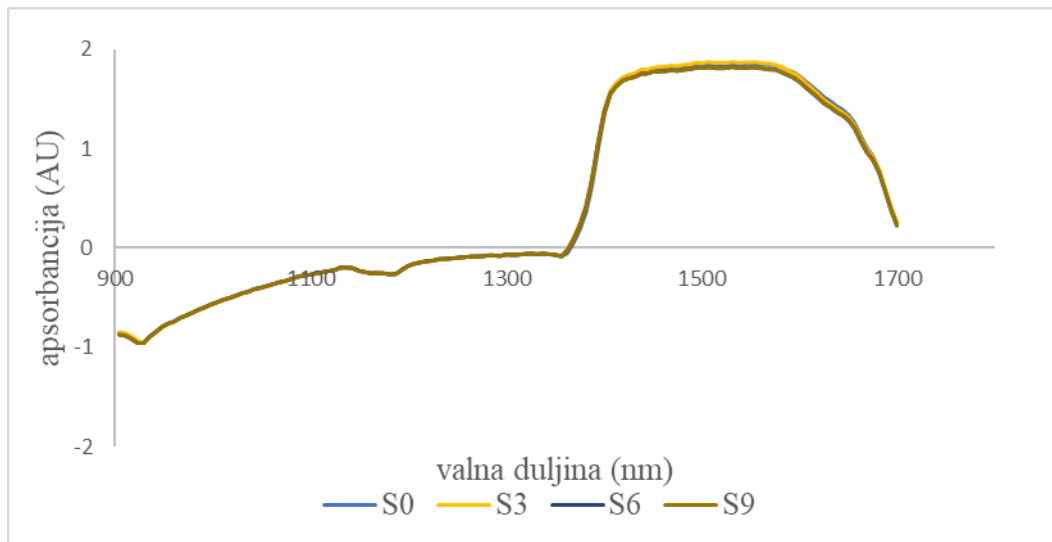


Slika 12. NIR apsorbancija prema skupovima i njihovih lokacija.

Netretirani i tretirani uzorci destilirane vode i soka od jabuke analizirani su NIR spektroskopijom kako bi se utvrdile promjene u strukturnim karakteristikama izazvane visokonaponskim pražnjenjem. Spektar je za sve uzorke snimljen u području valnih duljina od 904 do 1699 nm . Vrpce apsorbancije vode u NIR spektru javljaju se u širokom rasponu od 1300 do 1600 nm te od 1900 do 2200 nm, a nastaju kao rezultat preklapanja overtona i vibracijskih kombinacija istezanja, savijanja i titiranja intramolekularnih O-H veza, a također su osjetljive i na promjene u intermolekularnim vodikovim vezama (Gowen i sur., 2015). Navedeni raspon vrpca apsorbancije vode od 1300 do 1600 nm vidljiv je na NIR spektru uzoraka destilirane vode (Slika 13.) kao i kod uzoraka soka od jabuke (Slika 14.). Uspoređujući NIR spektar uzoraka destilirane vode (Slika 13.) i soka od jabuke (Slika 14.), značajnije razlike u spomenutom rasponu uočene su kod uzoraka destilirane vode. Raspon valnih duljina od 1434 do 1635 nm odgovara rasponu vibracija C-H veza (prvi overton), a vibracije u rasponu od 904 do 928 nm povezane su s trećim CH overtonom, drugim overtonom istezanja i kombinacije O-H veza u H₂O što i jesu kemijske veze i grupe karakteristične za fenolne spojeve i antioksidanse (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). Među uzorcima soka od jabuke uočene su značajne razlike u području valnih duljina od 919 do 928 nm te od 1357 do 1699 nm što upravo upućuje na strukturne promjene fenolnih spojeva.

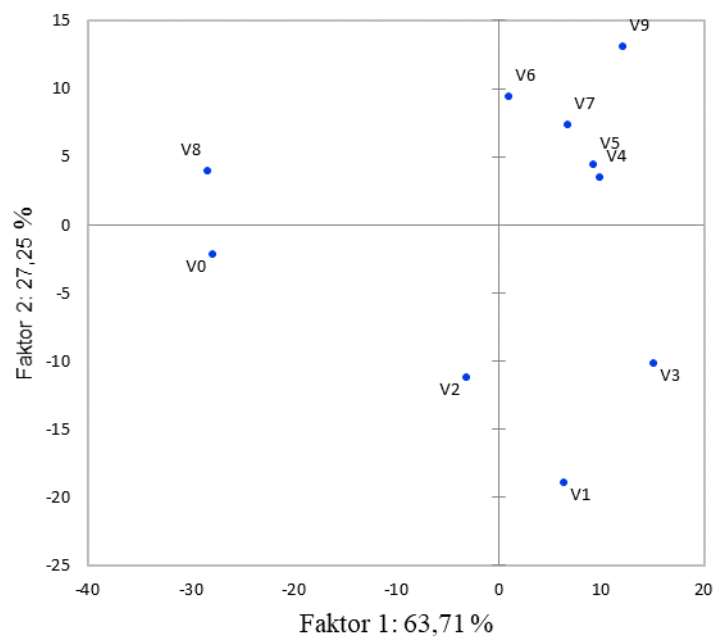


Slika 13. Usporedba NIR spektara netretiranog (V0) i tretiranih (V3, V6 i V9) uzoraka destilirane vode.

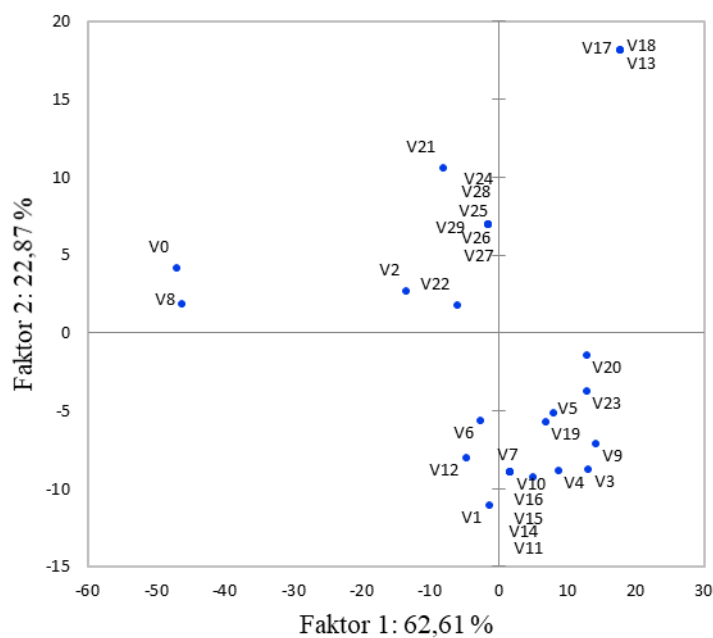


Slika 14. Usporedba NIR spektara netretiranog (S0) i tretiranih (S3, S6 i S9) uzoraka soka od jabuke.

Dakle, i kod uzoraka destilirane vode i kod uzoraka soka od jabuke uočeni su specifični dijelovi NIR spektra koji mogu uputiti na specifične razlike između uzoraka. Na temelju toga odlučeno je da nema razloga za promatranje cijelog spektra u obradi podatka te je napravljena redukcija. Kod uzoraka destilirane vode i soka od jabuke u obradi podataka korištene su vrijednosti apsorbancije u rasponu valnih duljina od 1357 do 1699 nm, a kod uzoraka soka od jabuke dodatno još vrijednosti apsorbancija u rasponu valnih duljina od 904 do 928 nm. Navedeni reducirani podaci korišteni su za PCA analizu. PCA analiza je kemometrijska metoda koja pojednostavljuje multivarijantne podatke u nekoliko dimenzija koje se lako razumiju i procjenjuju tako da se uzorci mogu grupirati što omogućuje vizualnu procjenu sličnosti i razlika između njih (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). Rezultati PCA analize prikazani su na Slikama 15., 16., 17. i 18.

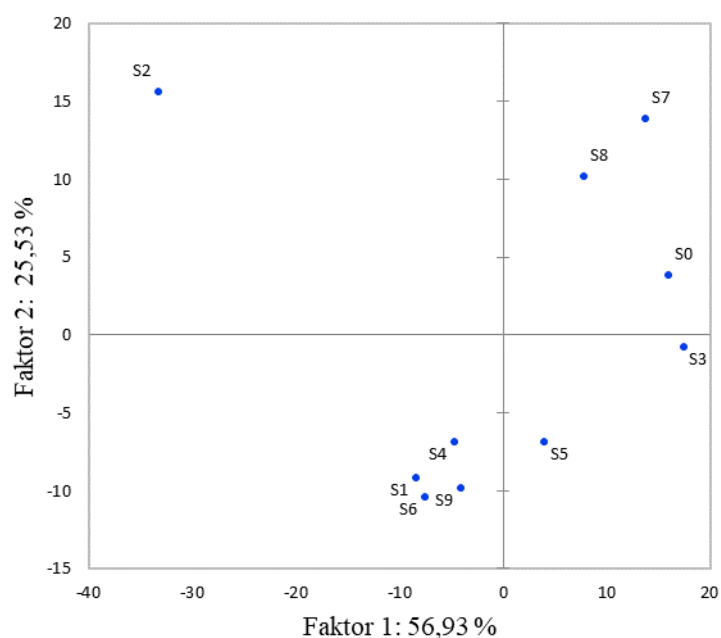


Slika 15. Projekcija prva dva faktora PCA analize za NIR spektre uzoraka destilirane vode analiziranih neposredno nakon tretmana (V0 – V9).

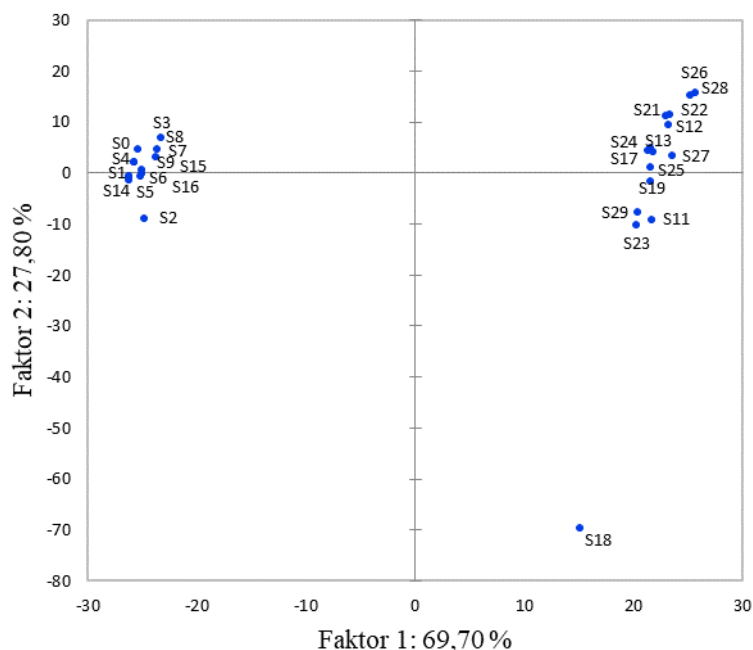


Slika 16. Projekcija prva dva faktora PCA analize za NIR spektre uzoraka destilirane vode analiziranih neposredno nakon tretmana (V0 – V9) te nakon skladištenja 24 h na sobnoj temperaturi (V11 – V19) i na temperaturi od 4 °C (V21 – V29).

Sa Slika 15. i 16. uočeno je znatno odstupanje uzoraka V2 (60 Hz, 5 min) i V8 (120 Hz, 5 min) od ostalih tretiranih uzoraka, a i PCA analiza upućuje na to da su prema strukturnim karakteristikama najbližiji netretiranom uzorku (V0) pošto su mu od svih uzoraka smješteni najbliže što znači da je u njima došlo do najmanjih strukturnih promjena. Na slici 15. nije uočeno znatno odstupanje uzoraka V3 (60 Hz, 10 min), V6 (90 Hz, 10 min) i V9 (120 Hz, 10 min) (jedini uzorci kod kojih je određen ESR signal DMPO-OH adukta) od ostalih tretiranih uzoraka što upućuje na činjenicu da u svim tretiranim uzorcima nastaju hidroksilni radikali koji uzrokuju strukturne promjene i brzo reagiraju s drugim reaktivnim vrstama te iz tog razloga nije zabilježen njihov ESR signal. Sa Slike 16. valja istaknuti uzorke destilirane vode skladištene 24 h na temperaturi od 4 °C (uzorci V21 – 29) koji su smješteni na lijevoj strani projekcije zajedno s netretiranim uzorkom (V0) što znači da su prema strukturnim karakteristikama sličniji netretiranom uzorku od uzoraka skladištenih 24 h na sobnoj temperaturi (uzorci V11 – V19) koji su smješteni na desnoj strani projekcije. Ove promjene mogu se povezati sa nastankom hidroksilnih radikala pošto su oni određeni u manjem broju u uzorcima skladištenim na temperaturi od 4 °C u usporedbi s uzorcima skladištenim na sobnoj temperaturi (Tablica 8.) (Poglavlje 4.2.).

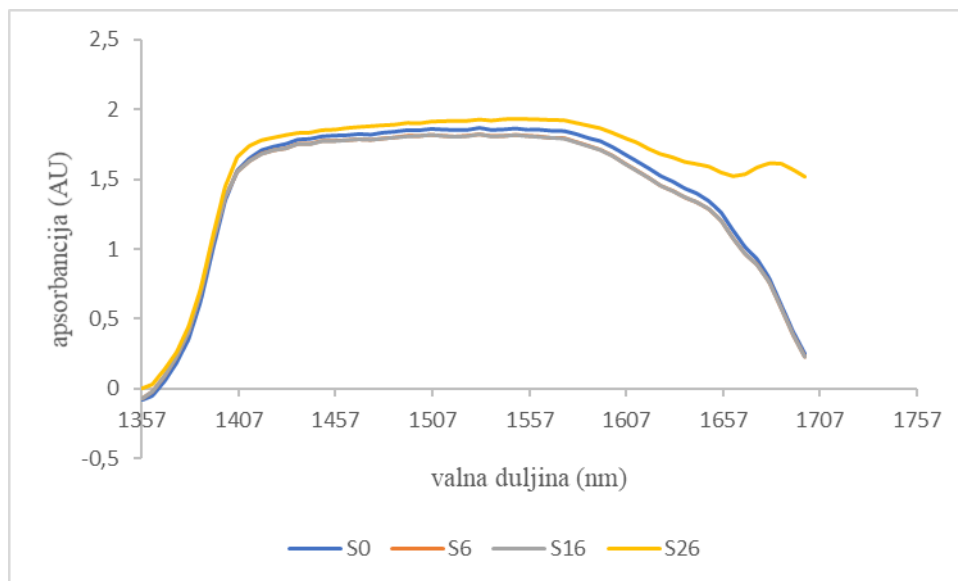


Slika 17. Projekcija prva dva faktora PCA analize za NIR spektre uzoraka soka od jabuke analiziranih neposredno nakon tretmana (S0 – S9).

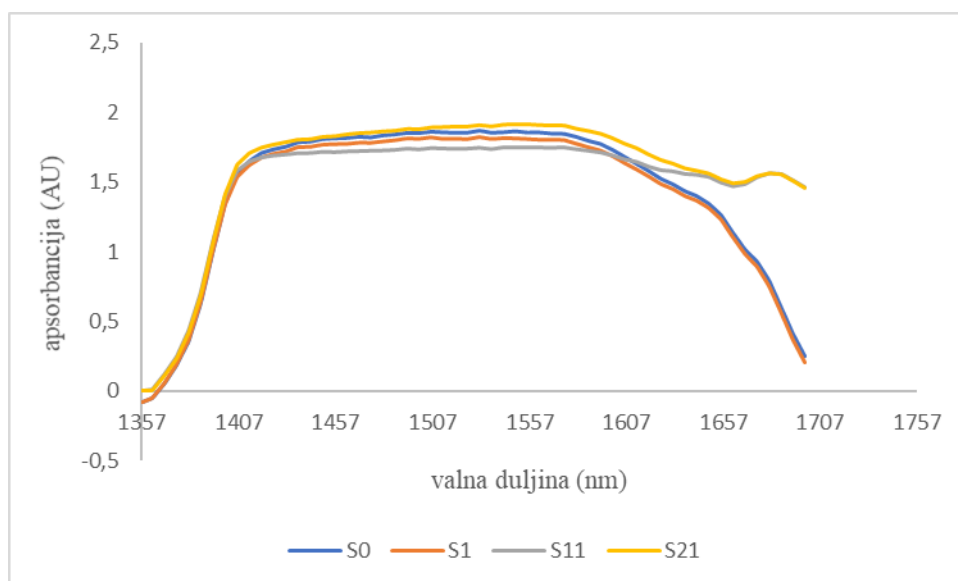


Slika 18. . Projekcija prva dva faktora PCA analize za NIR spektre uzoraka soka od jabuke analiziranih neposredno nakon tretmana (S0 – S9) te nakon skladištenja 24 h na sobnoj temperaturi (S11 – S9) i na temperaturi od 4 °C (S21 – S29).

Sa Slike 17. uočeno je znatno odstupanje uzoraka S2 (60 Hz, 5 min) od ostalih tretiranih uzoraka soka od jabuke, kao što je zabilježeno i za uzorak destilirane vode V2 (69 Hz, 5 min). Uzorci soka skladišteni na temperaturi od 4 °C smjestili su se na desnoj strani projekcije, a uzorci analizirani neposredno nakon tretmana te dio uzoraka skladišteni na sobnoj temperaturi (uzorci tretirani na 90 Hz – S14, S15 i S 16) na lijevoj strani projekcije zajedno s netretiranim uzorkom (S0) (Slika 18.). Sa Slike 19. vidljiv je razlog takve raspodjele, odnosno, strukturne promjene u fenolnim spojevima u uzorku skladištenom 24 h na sobnoj temperaturi (S16) znatno su sličnije sa uzorkom analiziranim neposredno nakon tretmana (S6) nego sa uzorkom skladištenim 24 na temperaturi od 4 °C (S26). Uzorci tretirani na 60 Hz i skladišteni na sobnoj temperaturi (S11, S12, S13) i 120 Hz (S17, S18 i 19) smjestili su se s uzorcima skladištenim na temperaturi od 4 °C na desnoj strani projekcije. Na slici 20. dan je primjer za slične strukturne promjene kod uzoraka skladištenim na sobnoj temperaturi (uzorak S11) i na temperaturi od 4 °C (uzorak S21). Ovakva raspodjela uzoraka analiziranih neposredno nakon tretmana i uzoraka skladištenim na različitim temperaturama na različite strane projekcije upućuje na činjenicu da temperatura skladištenja ima znatan utjecaj na strukturne promjene u fenolnim spojevima što je i vidljivo sa Slika 19. i 20.



Slika 19. Usporedba dijela NIR spektra (1357 do 1699 nm) za netretirani uzorak (S0), uzorak analiziran neposredno nakon tretmana (S6), uzorak skladišten 24 h na sobnoj temperaturi (S16) te uzorak skladišten 24 h na temperaturi od 4 °C (S26).



Slika 20. Usporedba dijela NIR spektra (1357 do 1699 nm) za netretirani uzorak (S0), uzorak analiziran neposredno nakon tretmana (S1), uzorak skladišten 24 h na sobnoj temperaturi (S11) te uzorak skladišten 24 h na temperaturi od 4 °C (S21).

4.4. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET SOKA OD JABUKE

Rijetka su istraživanja koja se bave utjecajem reaktivnih kemijskih vrsta, koje nastaju tijekom tretmana hladnom plazmom, na nutritivni sastav i određene komponente u hrani. Neke od istraživanih namirnica su kivi (Ramazzina i sur., 2015), dinja (Tappi i sur., 2016), sok od naranče (Almeida i sur., 2015) te nara (Bursać Kovačević i sur., 2016; Herceg i sur., 2016). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da je hladna plazma obećavajuća tehnologija koja može pružiti „fresh-like“ proizvode s minimalnom degradacijom bioloških komponenta kao što su askorbinska kiselina, karotenoidi, polifenoli, flavonoidi i antocijani (Rodríguez i sur., 2017). Voćni sokovi odličan su izvor askorbinske kiseline i fenolnih spojeva koji i najviše doprinose njegovom antioksidacijskom kapacitetu.

U ovome radu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta soka od jabuke korištena je elektronska spinska rezonancija. Analiza uzoraka provodila se neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem te 24 sata nakon tretmana na uzorcima koji su bili skladišteni na sobnoj temperaturi i temperaturi od 4 °C. Rezultati su prikazani u Tablicama 9. i 11. te su izraženi kao postotak inhibicije slobodnih radikala (%). Što je veći postotak inhibicije slobodnih radikala, uzorak ima veći antioksidacijski kapacitet.

U Tablici 9. prikazani su rezultati ESR metode za uzorke soka od jabuke analiziranih neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem. Kako bi se utvrdile statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između primijenjenih tretmana, izvršena je analiza varijance (ANOVA). Rezultati su prikazani u Tablici 10.

Tablica 9. Postotak inhibicije slobodnih radikala (%) određen ESR metodom neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem u uzorcima soka od jabuke.

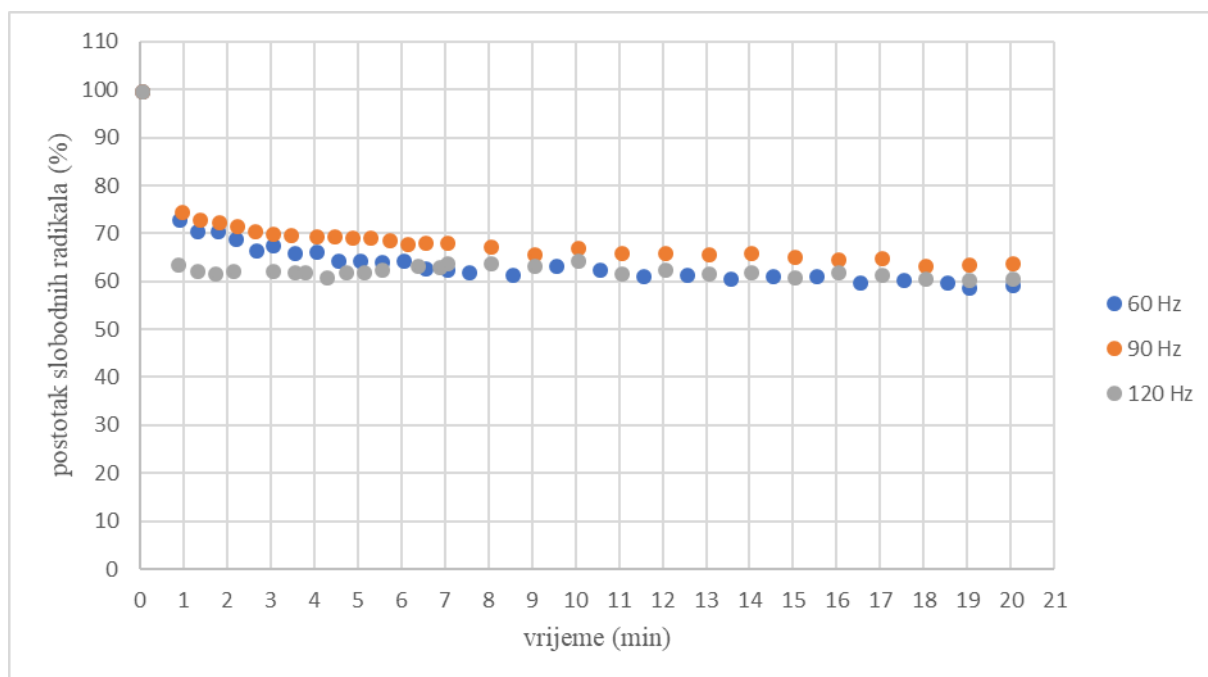
Uzorak	Postotak inhibicije slobodnih radikala (%)
S0	49,72
S1	40,27
S2	50,03
S3	80,02
S4	35,67
S5	42,94
S6	59,17
S7	38,88
S8	54,5
S9	64,56

Tablica 10. Analiza varijance parametara plazma tretmana (vrijeme i frekvencija) za antioksidacijski kapacitet.

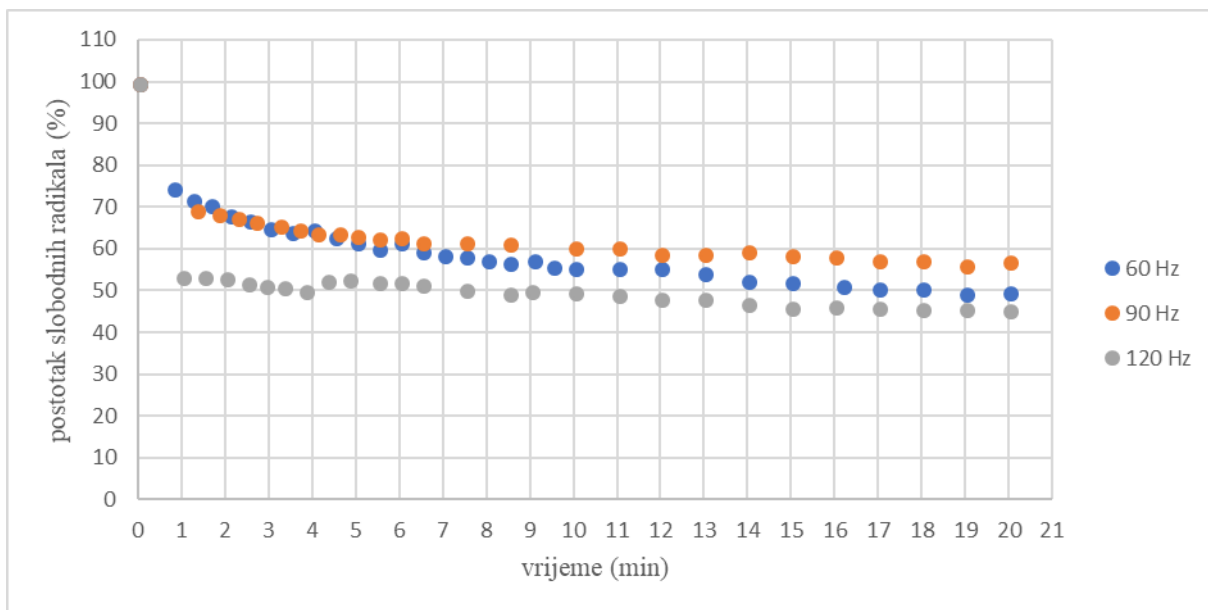
Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-Veličina	P-Veličina
A: Vrijeme	1338,13	1	1338,13	29,80	0,0028
B: Frekvencija	41,2892	1	41,2892	0,92	0,3817
AB	74,2573	1	74,2573	1,65	0,2548
Ukupna pogreška	224,534	5	44,9069		
Ukupna (korekcija)	1662,47	8			

Antioksidacijski kapacitet netretiranog uzorka soka od jabuke izražen kao postotak inhibicije slobodnih radikala iznosi 49,72 %. Među uzorcima koji su analizirani neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, najmanji postotak inhibicije slobodnih radikala

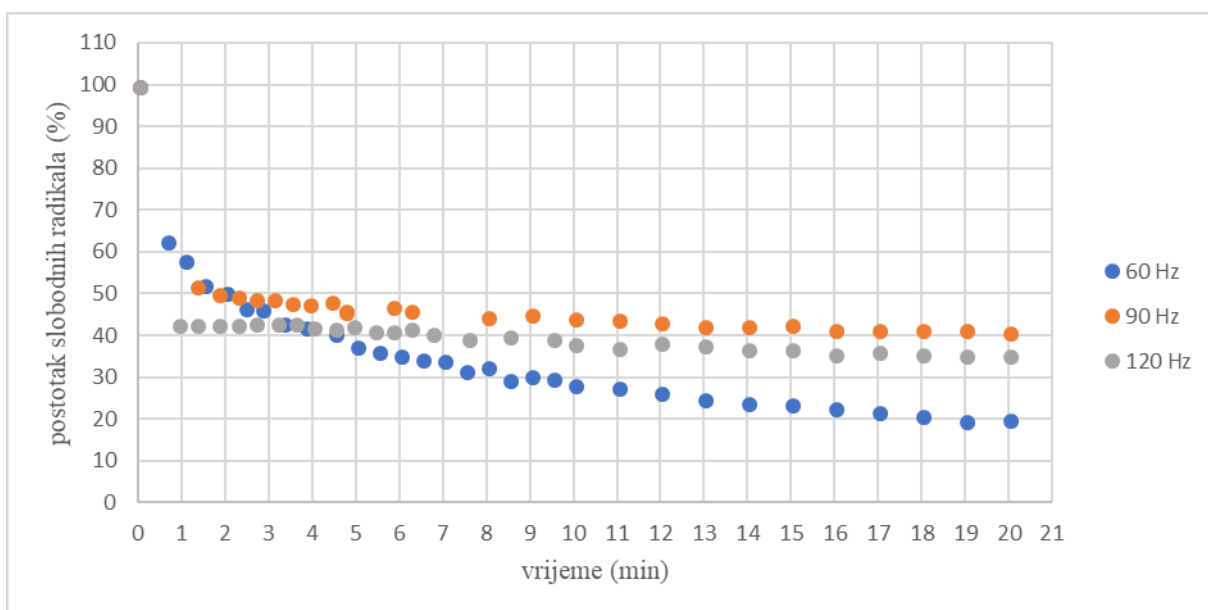
(35,67 %) te najveći pad antioksidacijskog kapaciteta od 28,26 % uspoređujući s netretiranog uzorkom (S0) zabilježen je u uzorku S4 (90 Hz, 3 min), dok je najveći postotak inhibicije slobodnih radikala (80,02 %) te najveći rast antioksidacijskog kapaciteta od 60,94 % zabilježen u uzorku S3 (60 Hz, 10 min) (Tablica 9.). Prema rezultatima analize varijance (Tablica 10.) značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet ima vrijeme tretmana ($p < 0,05$). Pad antioksidacijskog kapaciteta zabilježen je jedino kod uzoraka tretiranih 3 min kod svih frekvencija (uzorci S1, S4 i S7), dok je kod svih ostalih uzoraka zabilježen porast u odnosu na netretirani uzorak te je porast veći što je vrijeme tretmana duže (Tablica 9.). Uspoređujući jednake vremena tretmana kod različitih frekvencija vidljivo je da je tretman visokonaponskim pražnjenjem na 60 Hz rezultirao najvećom inhibicijom slobodnih radikala kod vremena tretmana od 3 (Slika 21.) i 10 min (Slika 23.), a tretman na 120 Hz kod 5 min tretmana (Slika 22.). Tretman na frekvenciji od 90 Hz rezultirao je najmanjom inhibicijom slobodnih radikala kod svih vremena tretmana (Slika 21.; Slika 22.; Slika 23.).



Slika 21. Postotak aktivnih slobodnih radikala određenih ESR metodom nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem od 3 min kod različitih frekvencija.



Slika 22. Postotak aktivnih slobodnih radikala određenih ESR metodom nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem od 5 min kod različitih frekvencija.



Slika 23. Postotak aktivnih slobodnih radikala određenih ESR spektroskopijom nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem od 10 min kod različitih frekvencija.

Promjene antioksidacijskog kapaciteta mogu se povezati s promjenama fenolnih spojeva i askorbinske kiseline koji najviše doprinose antioksidacijskom kapacitetu voćnih sokova. Primjenom blisko-infracrvene spektroskopije uočene su promjene u strukturnim karakteristikama fenolnih spojeva u analiziranim uzorcima soka od jabuke (Poglavlje 4.3.). Fenolni spojevi u soku od jabuke većinom su vezani za ugljikohidrate (pektin) i proteine na staničnim stjenkama (Massini i sur., 2017). Pozitivan utjecaj na stabilnost fenolnih spojeva imaju šećeri prisutni u sokovima što su dokazali Kopjar i sur. (2012). Herceg i sur. (2016) istraživali su utjecaj plinske plazme na stabilnost fenolnih spojeva u soku od nara te su zabilježili porast koncentracije elaginske, klorogenske i ferulinske kiseline te katehina i punicijagina nakon tretmana. Također, Elez Garofulić i sur. (2015) zabilježili su porast koncentracije antocijana i fenolnih kiselina u soku od višnje nakon tretmana hladnom plazmom, kao i Bursać Kovačević i sur. (2016) porast koncentracije antocijana u soku od nara. Xiang i sur. (2018) nisu zabilježili značajne promjene u sastavu fenolnih spojeva u soku od jabuke nakon tretmana dielektričnim barijernim pražnjenjem. Hladna plazma uzrokuje djelomično ili potpuno pucanje biljne stanične membrane što rezultira otpuštanjem unutarstaničnih komponenta u izvanstanični prostor (Kobzev i sur., 2013) te bržim ulaskom tekućine u stanični materijal što poboljšava prijenos mase i oslobađanje fenolnih spojeva (Landbo i Meyer, 2001) čime se može objasniti njihov porast koncentracije. Almeida i sur. (2015) zabilježili su pad antioksidacijskog kapaciteta soka od naranče nakon direktnog izlaganja polju plazme (70 kV na 50 Hz) s dužim vremenom tretmana, dok kod indirektnog izlaganja nisu zabilježene značajne promjene. Pad antioksidacijskog kapaciteta od 50 % zabilježen je nakon tretmana u trajanju od 60 s što se poklapa s promjenama u koncentraciji fenolnih spojeva kod kojih je također zabilježen pad. Plazma pražnjenje rezultira nastankom „energetskih elektrona“ koji uzrokuju disocijacije molekule kisika pri čemu nastaju kisikovi atomi. Kisikovi atomi ulaze u reakcije s drugim molekulama kisika pri čemu se formira ozon (Misra i sur., 2014). Fenolni spojevi podložni su „napadu“ ozona (Stalter i sur., 2011) koji uzrokuje pucanje aromatskog prstena u fenolnim spojevima što dovodi do nastanka alifatskih spojeva kao što su hidroksilirani i kinonski spojevi (Pérez i sur., 2002). Degradacija fenolnih spojeva i askorbinske kiseline može se objasniti i njihovom sposobnošću da hvataju slobodne radikale koji nastaju plazma pražnjenjem. Također, plazma pražnjenje u tekućinu uzrokuje različite fizikalne pojave (kao što su emisija UV svjetla, nastanak zvučnih i udarnih valova te područja visokog tlaka i temperature) koje imaju degenerativan učinak na organske tvari (Locke i sur., 2006) pa tako i na fenolne spojeve. Može se zaključiti da hladna plazma potpomaže oslobađanju fenolnih spojeva koji su vezani za staničnu membranu što rezultira

porastom njihove koncentracije nakon čega u slobodnom obliku postaju skloniji degradaciji izazvanom reaktivnim vrstama koje nastaju plazma pražnjenjem. Iz tog razloga važno je optimizirati parametre tretmana hladnom plazmom (npr. vrijeme tretmana, frekvencija, vrsta i protok plina, volumen uzorka itd.) kako bi se postigle optimalne koncentracije fenolnih spojeva, a time i antioksidacijski kapacitet. Rodríguez i sur. (2017) određivali su antioksidacijski kapacitet kašastog soka od jabuke nakon tretmana hladnom plazmom (80 kHz) FRAP, DPPH i ABTS metodom. Rezultati svih metoda pokazali su brzi rast antioksidacijskog kapaciteta u prvih 5 min tretmana kod najmanjeg protoka plina (dušik) nakon čega je slijedio pad. Kod ovih uvjeta, najodgovorniji za promjenu antioksidacijskog kapaciteta jest vitamin C kod kojeg su zabilježene slične promjene, dok kod fenolnih spojeva nisu zabilježene značajne promjene. Rezultati FRAP metode pokazali su rast antioksidacijskog kapaciteta kojeg slijedi porast koncentracije fenolnih spojeva kod većeg protoka plina i dužeg vremena tretmana. Pad u koncentraciji vitamina C uočen je kod viših protoka plina i dužih vremena tretmana što je utjecalo na rezultate DPPH i ABTS metode koji ukazuju na veći antioksidacijski kapacitet kod nižeg protoka plina i kraćeg vremena tretmana. Različiti trendovi uočeni su korištenjem različitih metoda što ukazuje na činjenicu da određeni parametri tretmana imaju utjecaj na aktivnost bioloških aktivnih spojeva. Pankaj i sur. (2017) istraživali su stabilnost fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet (DPPH metodom) soka od grožđa nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem (80 kV). Nakon tretmana zabilježili su pad antioksidacijskog kapaciteta u svim tretiranim uzorcima, kao i pad koncentracije ukupnih fenola, ali porast u koncentraciji ukupnih flavonola. Najduži tretman od 4 min rezultirao je najvećim padom u koncentraciji ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta te najvećim rastom u koncentraciji ukupnih flavonola. Tretman visokonaponskim pražnjenjem nakon 1 i 2 min uzrokovao je manji pad antioksidacijskog kapaciteta i manji pad u koncentraciji ukupnih fenola uspoređujući s pasterizacijom (na 85 °C kroz 43 s).

U Tablici 11. prikazani su rezultati ESR metode za uzorke analizirane 24 h nakon tretmana.

Tablica 11. Postotak inhibicije slobodnih radikala (%) određen ESR metodom 24 h nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem u uzorcima soka od jabuke skladištenih na sobnoj temperaturi i na temperaturi od 4 °C.

Uzorci skladišteni 24 h na sobnoj temperaturi		Uzorci skladišteni 24 h na 4 °C	
Uzorak	Postotak inhibicije slobodnih radikala (%)	Uzorak	Postotak inhibicije slobodnih radikala (%)
S10	31,1	S20	29,12
S11	17,53	S21	39,56
S12	29,1	S22	38,93
S13	33,03	S23	50,94
S14	33,1	S24	61,19
S15	24,07	S25	41,85
S16	42,25	S26	50,97
S17	25,84	S27	61,49
S18	54,11	S28	35,01
S19	44,64	S29	36,07

U netretiranim uzorcima koji su skladišteni 24 h na sobnoj temperaturi (uzorak S10) i na temperaturi od 4 °C (uzorak S20) zabilježen je pad antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na netretirani uzorak S0 koji je analiziran neposredno nakon pripreme soka (Tablica 9.). Pad antioksidacijskog kapaciteta tijekom skladištenja rezultat je reakcija oksidacije i kondenzacije fenolnih spojeva (Reque i sur., 2014). U odnosu na uzorke soka analizirane neposredno nakon tretmana (Tablica 9.), u svim uzorcima soka skladištenim 24 h na sobnoj temperaturi zabilježen je pad antioksidacijskog kapaciteta, odnosno manji postotak inhibicije slobodnih radikala. Najmanji antioksidacijski kapacitet zabilježen je u uzorku S11 (17,53 %; 60 Hz, 3 min), a najveći u uzorku S18 (54,11 %; 120 Hz, 5 min) (Tablica 11.) kod kojeg je zabilježena i najmanja promjena antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na neskladišten uzorak tretiranih pod istim uvjetima (uzorak S8; Tablica 8.). Uzorci soka skladišteni 24 h na temperaturi od 4 °C (Tablica 11.) pokazuju manji antioksidacijski kapacitet, izuzev uzoraka S24 (61,19%; 90 Hz, 3 min) i S27 (61,49%; 120 Hz, 3 min), u usporedbi s uzorcima analiziranim neposredno nakon tretmana (Tablica 9.) te veći antioksidacijski kapacitet, izuzev uzoraka S28 (35,01%; 120 Hz, 5 min) i S29 (36,07 %; 120 Hz, 10 min), od uzoraka skladištenih na sobnoj

temperaturi što se objašnjava činjenicom da niže temperature pogoduju sporijoj degradaciji fenolnih spojeva (Kim i sur., 2018), a te promjene uočene su i primjenom blisko-infracrvene spektroskopije (Poglavlje 4.3.).

4.5. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA BOJU SOKA OD JABUKE

Boja voćnih sokova najčešći je prvotni parametar na temelju kojeg potrošači procjenjuju kvalitetu voćnih sokova i donose odluku o kupnji. Stoga se u kontrolu kvalitete sokova na području Europske Unije uključila i kontrola njihove boje (Vukić i sur., 2018).

Pasterizacija, tradicionalni postupak za konzerviranje voćnih sokova, uzrokuje ne-enzimatske reakcije posmeđivanja, poznate kao i Maillardove reakcije. U prisutnosti kisika, također se odvija enzimatsko posmeđivanje koje uključuje oksidaciju fenolnih spojeva s enzimima. Navedene reakcije rezultiraju nepoželjnim promjenama u boji voćnih sokova koje vizualno mogu davati dojam pokvarenog soka što umanjuje i njegovu komercijalnu vrijednost (Vukić i sur., 2018). U skladu sa zahtjevima potrošača, istraživanja u prehrambenoj industriji usmjerena su na netoplinske tehnike konzerviranja koje će, osim produženog roka trajanja proizvoda, osigurati i visoku kvalitetu proizvoda koja će se odraziti i na njihovu boju.

U Tablici 12. prikazani su parametri boje (L^* , a^* , b^* , C^* , H° i ΔE) netretiranog uzorka te tretiranih uzoraka soka od jabuke. Kako bi se utvrdile statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između primijenjenih tretmana, izvršena je analiza varijance (ANOVA). Rezultati su prikazani u Tablicama 13., 14. i 15.

Tablica 12. Boja soka od jabuke.

Uzorak	<i>L</i>*	<i>a</i>*	<i>b</i>*	<i>C</i>*	<i>H</i>°	ΔE
S0	93,47	-1,44	28,65	28,68	92,87	/
S1	93,21	-1,12	27,37	27,39	92,35	1,345
S2	93,7	-1,29	25,8	25,83	92,87	2,863
S3	94,83	-1,73	22,03	22,1	94,5	6,764
S4	93,49	-1,24	26,44	26,47	92,67	2,219
S5	93,68	-1,28	25,95	25,98	92,83	2,713
S6	94,79	-1,7	21,99	22,06	94,42	6,795
S7	93,6	-1,22	26,25	26,28	92,65	2,414
S8	93,87	-1,35	25,19	25,22	93,07	3,484
S9	95,05	-1,8	21,31	21,38	94,84	7,517

Tablica 13. Analiza varijance parametara plazma tretmana (vrijeme i frekvencija) za parametar *L**

Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-Veličina	P-Veličina
A: Vrijeme	3,50309	1	3,50309	318,09	0,0000
B: Frekvencija	0,0919646	1	0,0919646	8,35	0,0342
AB	0,00406923	1	0,00406923	0,37	0,5698
Ukupna pogreška	0,0550645	5	0,0110129		
Ukupna (korekcija)	3,66362	8			

Tablica 14. Analiza varijance parametara plazma tretmana (vrijeme i frekvencija) za parametar a^* .

Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-Veličina	P-Veličina
A: Vrijeme	0,502405	1	0,502405	226,77	0,0000
B: Frekvencija	0,008229	1	0,008229	3,71	0,1119
AB	0,000123077	1	0,000123077	0,06	0,8230
Ukupna pogreška	0,0110774	5	0,00221547		
Ukupna (korekcija)	0,522422	8			

Tablica 15. Analiza varijance parametara plazma tretmana (vrijeme i frekvencija) za parametar b^* .

Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-Veličina	P-Veličina
A: Vrijeme	39,9185	1	39,9185	335,52	0,0000
B: Frekvencija	0,923092	1	0,923092	7,76	0,0387
AB	0,0228481	1	0,0228481	0,19	0,6795
Ukupna pogreška	0,594874	5	0,118975		
Ukupna (korekcija)	41,5366	8			

Rezultati analize varijance ukazuju da na promjenu parametra L^* značaj utjecaj imaju vrijeme tretmana te frekvencija ($p < 0,05$) (Tablica 13.). Veće vrijednosti parametra L^* , odnosno svjetlija boja uzoraka, uočene su kod dužih tretmana pri višim frekvencijama. Najsvjetlija boja soka određena je u uzorku S9 (95,05; 120 Hz, 10 min), a najtamnija u uzorku S1 (93,21; 60 Hz, 3 min) koji je i jedini uzorak u kojem je zabilježen pad parametra L^* u odnosu na netretirani uzorak (Tablica 12.). Može se zaključiti da tretman visokonaponskim pražnjenjem

nije uzrokovao značajno posmeđivanje ili prosvjetljivanje soka od jabuke. Povećanje vrijednosti parametra L^* nakon tretmana plazmom također su zabilježili Almeida i sur. (2015) u soku od naranče, kao i Xiang i sur. (2018) u soku od jabuke. Vukić i sur. (2018) zabilježili su svjetliju boju uzoraka nakon dužeg tretmana (30 s) dielektričnim barijernim pražnjenjem te posmeđivanje kod kraćih tretmana (5 i 15 s) u soku od naranče i mrkve. Bursać Kovačević i sur. (2016) zabilježili su smanjenje parametra L^* u soku od nara nakon tretmana atmosferskom plinskom plazmom, kao i ovisnost parametra L^* o volumenu tretiranog uzoraka i protoku plina.

Za sok od jabuke karakteristično je žuto – zeleno područje kromatskog spektra u koje, po određenim vrijednostima parametara a^* , b^* i H° , pripadaju analizirani uzorci soka od jabuke (Tablica 12.). Svi analizirani uzorci imaju negativnu vrijednost parametra a^* što ukazuje na zelenu boju te pozitivnu vrijednost parametra b^* što ukazuje na žutu boju karakterističnu za sok od jabuke. Izračunata vrijednosti parametra H° za sve uzorke nalazi se u rasponu 90 – 180° što ukazuje na vizualni doživljaj žuto – zelene boje. Rezultati analize varijance ukazuju da na promjenu parametara a^* značajan utjecaj ima vrijeme tretmana (Tablica 14.) dok na parametar b^* , osim vremena tretmana, značajan utjecaj ima i frekvencija (Tablica 15.). Smanjenje parametara a^* uočeno je kod svih uzoraka soka od jabuke koji su tretirani 10 min (uzorci S3, S6 i S9), bez obzira na frekvenciju, što znači da je u tim uzorcima došlo do smanjenja intenziteta zelene boje uspoređujući s netretiranim uzorkom. U svim ostalim uzorcima zabilježen je porast parametra a^* nakon tretmana plazmom, dok je smanjenje vrijednosti parametra b^* , odnosno smanjenje intenziteta žute boje, zabilježeno kod svih tretiranih uzoraka soka od jabuke. Xiang i sur. (2018) također su zabilježili pad vrijednosti parametra a^* i b^* u soku od jabuke nakon tretmana dielektričnim barijernim pražnjenjem, dok su Vukić i sur. (2018) zabilježili pad vrijednosti parametra a^* nakon 5 i 15 s tretmana dielektričnim barijernim pražnjenjem, a rast nakon 30 s tretmana te sniženje vrijednosti parametra b^* kod svih vremena tretmana. Promjene parametara L^* , a^* i b^* mogu se objasniti promjenama u aktivnosti enzima uzrokovane plazmom što su dokazali Pankaj i sur. (2013) zabilježivši nižu aktivnost peroksidaze u rajčici kod dužih vremena tretmana i viših vrijednosti primijenjenog napona. Također, te promjene mogu uzrokovati plazma reaktivne vrste koje induciraju oksidacijske reakcije ili reakcije izomerizacije pigmenata u soku što rezultira promjenom vrijednosti parametara boje (Xiang i sur., 2018). Neki od primjera su oksidacija flavonola pri čemu nastaju produkti sa svjetlijom žutom bojom te reakcija

hidroksicimetne kiseline i flavan-3-ola pri čemu nastaje kofein koji je bezbojan ili svjetlo žute boje (Sant'Anna i sur., 2013).

Tretman visokonaponskim pražnjenjem uzrokovao je u svim uzorcima soka od jabuke smanjenje parametra C^* što znači smanjenje intenziteta boje soka. Vrijednosti parametra C^* , između tretiranih uzoraka, kreću se od 21,38 (uzorak S9; 120 Hz, 10 min) do 27,39 (uzorak S1; 60 Hz, 3 min) (Tablica 12.). Vukić i sur. (2018) zabilježili su smanjenje parametra C^* u soku od naranče i mrkve nakon 30 s tretmana plazmom, dok su kod kraćih tretmana zabilježili porast parametra C^* . Lukić i sur. (2017) nisu zabilježili značajne promjene parametra C^* , odnosno visokonaponsko pražnjenje nije rezultiralo promjenom intenziteta boje ispitivanih vina.

Najbolji parametar za određivanje promjene boje između netretiranog i tretiranih uzoraka jest ΔE pošto se izračunava uzimajući u obzir parametre a^* , b^* i L^* . Prema Cserhalmi i sur. (2006) promjena boje je „nezamjetljiva“ ukoliko je $0 < \Delta E < 0,5$, „jedva zamjetljiva“ za $0,5 < \Delta E < 1,5$, „zamjetljiva“ za $1,5 < \Delta E < 3$, „jasno vidljiva“ za $3 < \Delta E < 6$ i „velika“ za $6 < \Delta E < 12$. „Malo zamjetljiva“ promjena boje uočena je u uzorku S1 ($\Delta E = 1,345$) koji je tretiran na 60 Hz kroz 3 min. Povećanjem frekvencije i vremena tretmana uočene su „zamjetljive“ promjene boje u uzorcima S2 ($\Delta E = 2,863$; 60 Hz, 5 min), S4 ($\Delta E = 2,219$; 90 Hz, 3 min), S5 ($\Delta E = 2,713$; 90 Hz, 5 min), S7 ($\Delta E = 2,414$; 120 Hz, 3 min) i S8 ($\Delta E = 3,484$; 120 Hz, 5 min), te „velike“ promjene boje u svim uzorcima koji su tretirani 10 min bez obzira na frekvenciju (uzorak S3: $\Delta E = 6,764$; uzorak S6: $\Delta E = 6,795$; uzorak S9: $\Delta E = 7,517$). Dasan i Boyaci (2018) također su zabilježili povećanje promjene boje u soku od jabuke s povećavanjem vremena tretmana plazmom, dok su promjene u boji bilo znatno manje u soku od naranče, rajčice i trešnje. Radi usporedbe, ΔE za sok od jabuke nakon 120 s tretmana atmosferskom hladnom plazmom iznosio je 7,60, a za sok od naranče 1,64. Prema rezultatima Xiang i sur. (2018) tretman dielektričnim barijernim pražnjenjem uzrokovao je manje promjene boje soka od jabuke te najveća promjena boje iznosi $\Delta E = 4,85$ nakon 200 s tretmana.

Promjene vrijednosti parametara L^* , a^* , b^* , C^* , H° i ΔE mogu se povezati s promjenom antioksidacijskog kapaciteta analiziranih uzoraka (Tablica 9.) (Poglavlje 4.4.). Uspoređujući s netretiranim uzorkom, najveći porast antioksidacijskog kapaciteta uočen je u uzorcima soka u kojima je zabilježen najveći rast vrijednosti parametara L^* , H° i ΔE te najveći pad vrijednosti parametara a^* , b^* i C^* . Rezultati upućuju da veći antioksidacijski kapacitet imaju svjetliji uzorci s manjim intenzitetom zelene i žute boje. Plazma reaktivne vrste dovode do otpuštanja

dijela fenolnih spojeva koji su kovalentnom vezom vezani za matriks biljke (Rodríguez i sur., 2017) što dovodi do povećanja ukupnog sadržaja fenolnih spojeva te većim antioksidacijskom kapacitetom i promjenom boje soka jer fenolni spojevi u vezanom i slobodnom obliku ne rezultiraju jednakom bojom (npr. kinoni vezani za proteine rezultiraju tamnijim pigmentima) (Massini i sur., 2017). Također, boja soka uvelike ovisi o pH vrijednosti jer kod različitih pH vrijednosti različiti fenolni spojevi imaju različitu strukturu. Na primjer, antocijani, koji su prisutni u soku od jabuke, najstabilniji su kod niskih pH vrijednosti gdje poprimaju svoju karakterističnu crvenu boju kopigmentacijom s drugim komponentama. Povećavajući pH vrijednost iznad 4 dolazi do tvorbe žutih i plavih komponenti što u konačnici ima utjecaj na boju soka. Za fenolne spojeve općenito je karakteristična maksimalna kopigmentacija u rasponu pH vrijednosti od 3 do 5 (Nielesen i sur., 2013). Tretman visokonaponskim pražnjenjem nije uzrokovao značajne promjene u pH vrijednosti analiziranih uzoraka soka od jabuke (Tablica 7.) (Poglavlje 4.1.) te je i nakon tretmana očuvana pH vrijednosti pogodna za kopigmentaciju fenolnih spojeva. Time se može isključiti promjena pH vrijednosti kao uzrok promjene boje soka, već su to zasigurno reakcije inicirane oksidacijskim procesima pošto je i samo visokonaponsko pražnjenje oksidacijski proces.

5. ZAKLJUČCI

- Tretman visokonaponskim pražnjenjem uzrokovao je porast temperature i kod uzoraka destilirane vode i kod uzoraka soka od jabuke. Najveći porast temperature od 16,6 °C među uzorcima destilirane vode zabilježen je nakon tretmana kod 60 Hz kroz 10 min. Najveći porast temperature od 18,7 °C među uzorcima soka zabilježen je nakon tretmana kod 60 i 90 Hz kroz 10 min.
- Tretman visokonaponskim pražnjenjem uzrokovao je pad pH vrijednosti i rast električne vodljivosti kod svih uzoraka destilirane vode, dok kod uzoraka soka od jabuke nisu uočene značajne promjene fizikalno-kemijskog sastava. Najveće promjene pH vrijednosti ($\Delta\text{pH} = 2,09$) i električne vodljivosti ($\Delta\sigma = 25,32 \mu\text{S cm}^{-1}$) među uzorcima destilirane vode zabilježene su nakon tretmana kod 90 Hz i 10 min.
- Među uzorcima destilirane vode analiziranih neposredno nakon tretmana, ESR signal DMPO-OH adukta uočen je jedino u uzorcima V3 (60 Hz, 10 min), V6 (90 Hz, 10 min) i V9 (120 Hz, 10 min) pri čemu je najveći broj hidroksilnih radikala određen u uzorku V6.
- U skladištenim uzorcima destilirane vode zabilježen je veći broj hidroksilnih radikala u usporedbi s uzorcima analiziranih neposredno nakon tretmana. Veći broj hidroksilnih radikala određen je kod uzoraka skladištenim na sobnoj temperaturi u usporedbi s uzorcima skladištenim na temperaturi od 4 °C.
- Porast broja radikala nakon skladištenja najvjerojatnije je posljedica interakcije uzoraka destilirane vode s radikalima iz zraka, pošto uzorci nisu bili skladišteni u hermetički zatvorenim posudama, ili posljedica reakcija rekombinacija drugih vrsta radikala. Rezultati upućuju na činjenicu da se spomenute reakcije odvijaju brže na sobnoj temperaturi, nego na temperaturi od 4 °C.
- ESR signal DMPO-OH adukta nije zabilježen u uzorcima soka od jabuke ni neposredno nakon tretmana ni u skladištenim uzorcima.
- Fenolni spojevi i vitamin C prisutni u soku od jabuke brzo neutraliziraju nastale slobodne radikale.
- Primjenom blisko-infracrvene spektroskopije uočene su strukturne promjene izazvane visokonaponskim pražnjenjem za destiliranu vodu u rasponu valnih duljina od 1357 do 1699 te za sok od jabuke u rasponu od 904 do 928 nm te od 1357 do 1699 što upućuje na strukturne promjene fenolnih spojeva.

- Među uzorcima soka od jabuke koji su analizirani neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, najmanji postotak inhibicije slobodnih radikala (35,67 %) te najveći pad antioksidacijskog kapaciteta od 28,26 % uspoređujući s netretiranom uzorkom (S0) zabilježen je u uzorku S4 (90 Hz, 3 min), dok je najveći postotak inhibicije slobodnih radikala (80,02 %) te najveći rast antioksidacijskog kapaciteta od 60,94 % zabilježen u uzorku S3 (60 Hz, 10 min).
- U odnosu na uzorke soka analizirane neposredno nakon tretmana, u svim uzorcima soka skladištenim 24 h na sobnoj temperaturi zabilježen je pad antioksidacijskog kapaciteta, odnosno manji postotak inhibicije slobodnih radikala. Najmanji antioksidacijski kapacitet zabilježen je u uzorku S11 (17,53 %; 60 Hz, 3 min), a najveći u uzorku S18 (54,11 %; 120 Hz, 5 min).
- Uzorci soka skladišteni 24 h na temperaturi od 4 °C pokazuju manji antioksidacijski kapacitet, izuzev uzoraka S24 (61,19%; 90 Hz, 3 min) i S27 (61,49%; 120 Hz, 3 min), u usporedbi s uzorcima analiziranim neposredno nakon tretmana te veći antioksidacijski kapacitet, izuzev uzoraka S28 (35,01%; 120 Hz, 5 min) i S29 (36,07 %; 120 Hz, 10 min), od uzoraka skladištenih na sobnoj temperaturi.
- Najveće promjene vrijednosti parametara boje L^* , a^* , b^* , C^* , H° i ΔE , u usporedbi s netretiranim uzorkom, zabilježene su u uzorku S9 (120 Hz, 10 min).
- Veći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod svjetlijih uzoraka soka od jabuke s manjim intenzitetom zelene i žute boje.

6. LITERATURA

- AIJN (2014) *Liquid Food Market Report*, European Fruit Juice Association, Brussels, < <http://www.aijn.org/files/default/aijn2014-full.pdf> >. Pristupljeno 20. travnja 2018.
- Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., Cozzolino, D. (2010) Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **75**, 1–7.
- Almeida, F. D. L., Cavalcante, R. S., Cullen, P. J., Frias, J. M., Bourke, P., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S. (2015) Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg.* **32**, 127–135.
- Bai, N., Sun, P., Zhou, H., Wu, H., Wang, R., Liu, F., Zhu, W., Lopez, J. L., Zhang, J., Fang, J. (2011) Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Water by a Cold , He/O₂ Atmospheric Pressure Plasma Microjet. *Plasma Process. Polym.* **8**, 424–431.
- Bartoszek, M., Polak, J. (2016) A comparison of antioxidative capacities of fruit juices, drinks and nectars, as determined by EPR and UV-vis spectroscopies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **153**, 546–549.
- Bešić, E. (2010) Spektroskopija elektronske paramagnetske rezonancije (EPR), skripta, Zagreb.
- Brückner, A. (2007) Electron Paramagnetic Resonance: A Powerful Tool for Monitoring Working Catalysts. *Adv. Catal.* **51**, 265–308.
- Bruggeman, P. J., Kushner, M. J., Locke, B. R., Gardeniers, J. G. E., Graham, W. G., Graves, D. B., Hofman-Caris, R. C. H. M., Maric, D., Reid, J. P., Ceriani, E., Fernandez Rivas, D., Foster, J. E., Garrick, S. C., Gorbanev, Y., Hamaguchi, S., Iza, F., Jablonowski, H., Klimova, E., Kolb, J., Krcma, F., Lukes, P., Machala, Z., Marinov, I., Mariotti, D., Mededovic Thagard, S., Minakata, D., Neyts, E. C., Pawlat, J., Petrovic, Z. Lj., Pflieger, R., Reuter, S., Schram, D. C., Schröter, S., Shiraiwa, M., Tarabová, B., Tsai, P. A., Verletm, J. R. R., von Woedtke, T., Wilson, K. R., Yasui, K., Zvereva, G. (2016) Plasma-liquid interactions: A review and roadmap. *Plasma Sourc. Sci. T.* **25**, 1-59.

- Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 317–323.
- Cammack, R. (2017) EPR, Methods. U: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 2. izd. (Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W., ured.), Academic Press, Oxford, str. 457-469.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, Á., Tóth-Markus, M., Lechner, N. (2006) Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innov. Food Sci. Emerg.* **7**, 49–54.
- Dasan, B. G., Boyaci, I. H. (2018) Effect of Cold Atmospheric Plasma on Inactivation of Escherichia coli and Physicochemical Properties of Apple, Orange, Tomato Juices, and Sour Cherry Nectar. *Food Bioprocess Technol.* **11**, 334–343.
- Eisele, T. A., Drake, S. R. (2005) The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *J. Food Compos. Anal.* **18**, 213–221.
- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., Herceg, Z. (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT - Food Sci. Technol.* **62**, 894–900.
- Frizon, C. N. T., Oliveira, G. A., Perussello, C. A., Peralta-Zamora, P. G., Camlofski, A. M. O., Rossa, Ü. B., Hoffmann-Ribani, R. (2015) Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *LWT - Food Sci. Technol.* **6**, 795–801.
- Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Berry Fruits, *Food Technol. Biotechnol.* **54**, 236–242.
- Georgieva, M., Nebojan, I., Mihalev, K., Yoncheva, N. (2013) Application of NIR spectroscopy and chemometrics in quality control of wild berry fruit extracts during storage. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **8**, 67–73.
- Gorbanev, Y., O’Connell, D., Chechik, V. (2016) Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. *Chem. Euro. J.* **22**, 3496–3505.

- Gowen, A. A., Marini, F., Tsuchisaka, Y., De Luca, S., Bevilacqua, M., O'Donnell, C., Downey, G., Tsenkova, R. (2015) On the feasibility of near infrared spectroscopy to detect contaminants in water using single salt solutions as model systems. *Talanta* **131**, 609–618.
- Grymonpré, D. R., Sharma, A. K., Finney, W. C., Locke, B. R. (2001) The role of Fenton's reaction in aqueous phase pulsed streamer corona reactors. *Chem. Eng. J.* **82**, 189–207.
- Herceg, Z., Kovačević, D. B., Kljusurić, J. G., Jambrak, A. R., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665–672.
- Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71–80.
- Jiang, B., Zheng, J., Wu., M. (2016) Nonthermal Plasma for Effluent and Waste Treatment. U: *Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications* (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 309-342.
- Kanazawa, S., Kawano, H., Watanabe, S., Furuki, T., Akamine, S., Ichiki, R., Ohkubo, T., Kocik, M., Mizeraczyk, J. (2011) Observation of OH radicals produced by pulsed discharges on the surface of a liquid. *Plasma Sourc. Sci. T.* **20**, 1-8.
- Kim, A. N., Kim, H. J., Chun, J., Heo, H. J., Kerr, W. L., Choi, S. G. (2018) Degradation kinetics of phenolic content and antioxidant activity of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) puree at different storage temperatures. *LWT - Food Sci. Technol.* **89**, 535–541.
- Kobzev, E. N., Kireev, G. V., Rakitskii, Y. A., Martovetskaya, I. I., Chugunov, V. A., Kholodenko, V. P., Khramov, M. V., Akishev, Y. S., Trushkin, N. I., Grushin, M. E. (2013) Effect of cold plasma on the *E. coli* cell wall and plasma membrane. *Appl. Biochem. Micro.* **49**, 144–149.
- Kopjar, M., Jakšić, K., Piližota, V. (2012) Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *J. Food Process. Pres.* **36**, 545–552.
- Kyselova, Z. (2011) Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 173–183.

- Landbo, A. K., Meyer, A. S. (2001) Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J. Agr. Food Chem.* **49**, 3169–3177.
- Laroussi, M., Tendero, C., Lu, X., Alla, S., Hynes, W. L. (2006) Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil. *Plasma Process. Polym.* **3**, 470-473.
- Locke, B. R., Sato, M., Sunka, Hoffmann, M. R., Chang, J.-S. (2006) Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Indust. Eng. Chem. Res.* **45**, 882–905.
- Lu, P., Cullen, P. J., Ostrikov, K. (2016) Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma Sources. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 83-116.
- Lukić, K., Vukušić, T., Tomašević, M., Čurko, N., Gracin, L., Kovačević Ganić, K. (2017) The impact of high voltage electrical discharge plasma on the chromatic characteristics and phenolic composition of red and white wines. *Innov. Food Sci. Emerg.* (objavljeno online 10. studeni 2017.). doi: 10.1016/j.ifset.2017.11.004
- Massini, L., Rico, D., Martin-Diana, A. B. (2017) Quality Attributes of Apple Juice: Role and Effect of Phenolic Compounds. U: Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis (Rajauria, G., Tiwari, B. K., ured.), Academic Press, London, str. 45-57.
- Mijatović, I., Matošić, M. (2013) Tehnologija vode, skripta, Zagreb.
- Misra, N. N., Keener, K. M., Bourke, P., Mosnier, J. P., Cullen, P. J. (2014) In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. *J. Biosci. Bioeng.* **118**, 177–182.
- Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J. (2016) Plasma in Food and Agriculture. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 1-17.
- Nielsen, I. L. F., Haren, G. R., Magnussen, E. L., Dragsted, L. O., Rasmussen, S. E. (2003) Quantification of Anthocyanins in Commercial Black Currant Juices by Simple High-Performace Liquid Chromatography. Investigation of Their pH Stability and Antioxidative Potency. *J. Agr. Food Chem.* **51**, str. 5861-5866.
- Nimse, S. B., Pal, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **5**, 27986–28006.

- Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A. (2007) Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Pankaj, S. K. (2018) Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* **7**, 1-21.
- Pankaj, S. K., Misra, N. N., Cullen, P. J. (2013) Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. *Innov. Food Sci. Emerg.* **19**, 153–157.
- Pankaj, S. K., Wan, Z., Colonna, W., Keener, K. M. (2017) Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *J. Sci. Food Agr.* **97**, 4016–4021.
- Pasquini, C. (2018) Near Infrared Spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives – A review. *Anal. Chimi. Acta* (objavljeno online 5. listopad 2018.). doi: 10.1016/j.aca.2018.04.004
- Pavithra, K., Vadivukkarasi, S. (2015) Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Sci. Hum. Well.* **4**, 42–46.
- Pérez, M., Torrades, F., Domènech, X., Peral, J. (2002) Treatment of bleaching Kraft mill effluents and polychlorinated phenolic compounds with ozonation. *J. Chem. Technol. Biot.* **77**, 891-897.
- Petitpas, G., Rollier, J. D., Darmon, A., Gonzalez-Aguilar, J., Metkemeijer, R., Fulcheri, L. (2007) A comparative study of non-thermal plasma assisted reforming technologies. *Int. J. Hydrogen Energ.* **32**, 2848–2867.
- Pirker, K. F., Severino, J. F., Reichenauer, T. G., Goodman, B. A. (2008) Free radical processes in green tea polyphenols (GTP) investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biotechnol. Annu. Rev.* **14**, 349–401.
- Podsdek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowski, J. (2000) Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur. Food Res. and Technol.* **210**, 268–272.
- Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjim za konzumaciju (2013) *Narodne novine* **48**, Zagreb.

- Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P. (2015) Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biol. Tec.* **107**, 55–65.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. de O., de Jong, E. V. (2014) Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.* **33**, 111–116.
- Rodríguez, Ó., Gomes, W. F., Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N. (2017) Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale L.*). *LWT - Food Sci. Technol.* **84**, 457–463.
- Sánchez, M. T., De la Haba, M. J., Pérez-Marín, D. (2013) Internal and external quality assessment of mandarins on-tree and at harvest using a portable NIR spectrophotometer. *Comput. Electron. Agr.* **92**, 66–74.
- Sant’Anna, V., Gurak, P. D., Ferreira Marczak, L. D., Tessaro, I. C. (2013) Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes Pigments* **98**, 601–608.
- Schempp, H., Christof, S., Mayr, U., Treutter, D. (2016) Phenolic compounds in juices of apple cultivars and their relation to antioxidant activity. *J. Appl. Bot. and Food Qual.* **89**, 11–20.
- Soloshenko, I. A., Tsiolko, V. V., Pogulay, S. S., Kalyuzhnaya, A. G., Bazhenov, V. Y., Shchedrin, A. I. (2009) Effect of water adding on kinetics of barrier discharge in air. *Plasma Sourc. Sci. T.* **18**, 1-17.
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J. (2011) Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Res.* **45**, 1015-1024.
- Stoll, S., Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178**, 42-55.
- Takamatsu, T., Uehara, K., Sasaki, Y., Miyahara, H., Matsumura, Y., Iwasawa, A., Ito, N., Azuma, T., Kohno, M., Okino, A. (2014) Investigation of reactive species using various gas plasmas. *RSC Adv.* **4**, 39901–39905.

- Tani, A., Ono, Y., Fukui, S., Ikawa, S., Kitano, K. (2012) Free radicals induced in aqueous solution by non-contact atmospheric-pressure cold plasma. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 2012–2015.
- Tappi, S., Gozzi, G., Vannini, L., Berardinelli, A., Romani, S., Ragni, L., Rocculi, P. (2016) Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. *Innov. Food Sci. Emerg.* **33**, 225–233.
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U. S. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys.* **10**, 1–11.
- Tiwari, B. K., Rice, G. (2012) Regulatory and Legislative Issues. U: Ozone in Food Processing (O'Donnell, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Rice, G., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 7-17.
- Tresp, H., Hammer, M. U., Winter, J., Weltmann, K. D., Reuter, S. (2013) Quantitative detection of plasma-generated radicals in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Phys. D Appl. Phys.* **46**, 1-8.
- Turner, M. (2016) Physics of Cold Plasma. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 17-52.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S. (2005) Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4989–4995.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B.* **39**, 44–84.
- Villamena, F. A. (2017) Reactive Species Detection in Biology from Fluorescence to Electron Paramagnetic Spectroscopy. Elsevier Ltd., Amsterdam.
- Vukić, M., Vujadinović, D., Ivanović, M., Gojković, V., Grujić, R. (2018) Color change of orange and carrot juice blend treated by non-thermal atmospheric plasma. *J. Food Process. Pres.* **42**, 1–7.
- Wang, X., Li, C., Liang, D., Zou, Y., Li, P., Ma, F. (2015) Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *J. Funct. Foods* **18**, 1086–1094.

- Wedding, B. B., Wright, C., Grauf, S., White, R. D., Tilse, B., Gadek, P. (2013) Effects of seasonal variability on FT-NIR prediction of dry matter content for whole Hass avocado fruit. *Postharvest Biol. and Tec.* **75**, 9–16.
- Whitehead, J. C. (2016) *The Chemistry of Cold Plasma. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications* (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 53-82.
- Xiang, Q., Liu, X., Li, J., Liu, S., Zhang, H., Bai, Y. (2018) Effects of dielectric barrier discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* and quality of apple juice. *Food Chem.* **254**, 201–207.
- Xu, C. C., Wang, B., Pu, Y. Q., Tao, J. S., Zhang, T. (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Medicines* **15**, 721–731.
- Zang, S., Tian, S., Jiang, J., Han, D., Yu, X., Wang, K., Li, D., Lu, D., Yu, A., Zhang, Z. (2017) Determination of antioxidant capacity of diverse fruits by electron spin resonance (ESR) and UV–vis spectrometries. *Food Chem.* **221**, 1221–1225.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta