

Izolacija bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda povrća primjenom predtretmana pulsirajućega električnoga polja

Kalčić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:683504>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Petra Kalčić

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ
NUSPROIZVODA POVRĆA PRIMJENOM
PREDTRETMANA PULSIRAJUĆEGA
ELEKTRIČNOGA POLJA**

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. Tomislave Vukušić Pavičić, te uz pomoć dr. sc. Višnje Stulić.



Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta „Opremanje poluindustrijskog praktikuma za razvoj novih prehrambenih tehnologija“ (KK.01.1.1.02.0001), Fondovi Europske Unije, u okviru poziva „Ulaganje u organizacijsku reformu i infrastrukturu u sektoru istraživanja, razvoja i inovacija“, koji se financira u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija za razdoblje 2014-2020“ iz Europskog fonda za regionalni razvoj.



Europska unija - Zajedno do fondova EU
www.strukturnifondovi.hr



Ovaj rad izrađen je u suradnji s Laboratorijem za elektronsku spinsku spektroskopiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u sklopu projekta pod nazivom „FunTomP“ (Functionalized Tomato Products) koordinatorice dr.sc. N. Maltar-Strmečki, znanstvene savjetnice financiranog iz PRIMA programa (Partnerstvo za istraživanja i inovacije na mediteranskom području) HORIZON 2020.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Tomislavi Vukušić Pavičić na stručnim savjetima, povjerenju, strpljenju, uloženom vremenu te prije svega na velikoj prijateljskog podršci tijekom cijele izrade i pisanja ovoga rada. Isto tako, zahvaljujem se i dr.sc. Višnji Stulić na pomoći pri izradi eksperimentalnog djela rada te na pomoći pri pisanju.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i sestri na podršci tijekom cijelog ovog putovanja. Hvala Vam na razumijevanju i na podršci u lijepim i teškim trenutcima. Hvala i mojim dragim prijateljima koji su mi studiranje učinili posebnim.

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

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ NUSPROIZVODA POVRĆA PRIMJENOM PREDTRETMANA PULSIRAJUĆEGA ELEKTRIČNOGA POLJA

Petra Kalčić, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058216053

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje predtretmana pulsirajućeg električnog polja (PEP) na učinak ekstrakcije bioaktivnih komponenti (karotenoida i fenolnih spojeva) iz nusproizvoda povrća (pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata). Uzorci su tretirani pri naponima od 2, 5 i 7,5 kV cm⁻¹ te vremenu tretiranja od 1,3 i 5 min pri frekvenciji od 100 Hz te trajanju impulsa od 2 μs. Najviši udio ukupnih fenolnih spojeva (2,437 mg g⁻¹ s.tv.) određen je u uzorku pokožice rajčice R5 (7,5 kV cm⁻¹, 5') s najvišom električnom provodljivošću (747 μS cm⁻¹). Uzorak mrkve M9 (5 kV cm⁻¹, 1') kojem je električna provodljivost 971 μS cm⁻¹ sadrži najviši udio ukupnih fenolnih spojeva (8,627 mg g⁻¹ s.tv.) od čega 0,884 mg g⁻¹ s.tv. ukupnog derivata ferulinske kiseline. Svi tretirani uzorci nusproizvoda ističu se antioksidativnim svojstvima s posebnim naglaskom na pokožicu rajčice. Karotenoidi su pokazali osjetljivost na predtretman PEP-om, te su najveći udjeli izmjereni u nultim uzorcima, što ukazuje na potrebu optimizacije procesa u daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: pulsirajuće električno polje, nusproizvodi, likopen, β-karoten, fenolni spojevi

Rad sadrži: 45 stranica, 22 slika, 6 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić

Pomoć pri izradi: dr.sc. Višnja Stulić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Zoran Herceg (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marija Badanjak Sabolović (član)
4. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (zamjenski član)

Datum obrane: 17. srpnja 2024.

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

Graduate university study programme: Food Engineering

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM VEGETABLE BY-PRODUCTS USING PULSED ELECTRIC FIELD THE PRE-TREATMENT

Petra Kalčić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058216053

Abstract: This study aimed to investigate the impact of pulsed electric field (PEF) pretreatment on the extraction of bioactive compounds, specifically carotenoids and phenolic compounds, from vegetable by-products such as tomato peel, carrot peel, and sweet potato peel. The samples underwent PEF treatment at voltages of 2, 5, and 7.5 kV cm⁻¹, with treatment durations of 1, 3, and 5 minutes, at a frequency of 100 Hz and a pulse duration of 2 μs. The highest concentration of total phenolic compounds (2.437 mg g⁻¹ dry weight) was observed in the R5 (7,5 kV cm⁻¹, 5') tomato peel sample, which also had the highest electrical conductivity (747 μS cm⁻¹). The carrot peel sample M9 (5 kV cm⁻¹, 3'), exhibiting an electrical conductivity of 971 μS cm⁻¹, contained the highest amount of total phenolic compounds (8.627 mg g⁻¹ dry weight), including 0.884 mg g⁻¹ dry weight of ferulic acid derivatives. All treated by-product samples demonstrated notable antioxidant properties, with tomato peel samples being particularly prominent. Carotenoids showed a sensitivity to PEF pretreatment, with the highest concentrations found in the untreated samples, indicating a need for further optimization of the process.

Keywords: pulsed electric field, by-products, lycopene, β-carotene, total phenolic compounds

Thesis contains: 45 pages, 22 figures, 6 tables, 50 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Tomislava Vukušić Pavičić, Associate Professor

Technical support and assistance: PhD Višnja Stulić

Reviewers:

1. PhD Zoran Herceg, Full professor (president)
2. PhD Tomislava Vukušić Pavičić, Associate professor (mentor)
3. PhD Marija Badanjak Sabolović, Associate professor (member)
4. PhD Ivona Elez Garofulić, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 17th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RAJČICA	2
2.2. MRKVA	3
2.3. BATAT	4
2.4. FENOLNI SPOJEVI	4
2.4.1. Vrste polifenola	5
2.5. KAROTENOIDI.....	6
2.6. SUŠENJE	8
2.7. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Pribor i aparatura	11
3.2. METODE RADA.....	12
3.2.1. Sušenje sirovina.....	12
3.2.2. Provedba eksperimenta	13
3.2.3. Određivanje pH i električne provodljivosti	13
3.2.5. Određivanje karotenoida spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom	14
3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom.....	16
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	17
3.2.8. Statistička analiza podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI UZORAKA	19
4.1.1. Sušenje sirovina.....	19
4.1.2. pH i električna provodljivost.....	20

4.1.3. Parametri boje.....	22
4.1.4. Određivanje udjela karotenoida spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom	25
4.1.5. Određivanje udjela ukupnih polifenola spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom	31
4.1.6. Određivanje sadržaja antioksidacijske aktivnosti	34
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

U prehrambenoj industriji nakon prerade namirnica biljnog i životinjskog podrijetla nastaje značajna količina nusproizvoda. To mogu biti kore, sjemenke, ljuske, sirutka, kosti, koža, pogače nakon ekstrakcije ulja. Nusproizvodi sadrže vrijedne bioaktivne komponente te se mogu koristiti u različite svrhe čime se povećava održivost te smanjuje otpad. U prehrambenoj industriji nusproizvodi se koriste za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (karotenoidi, polifenolni spojevi te dijetalna vlakna za dodatke prehrani). Nusproizvodi povrća kao što su pokožica rajčice, kora mrkve, kora batata sadrže značajne količine bioaktivnih komponenti kao što su karotenoidi, polifenoli i vitamini. Bioaktivne komponente imaju antioksidacijska, antikancerogena i protuupalna svojstva. Primjena predtretmana pulsirajućeg električnog polja predstavlja učinkovit i održiv način za izolaciju bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda povrća. Postoje brojne metode obrade nusproizvoda: ekstrakcija, fermentacija, sušenje, mljevenje. Za ekstrakciju bioaktivnih komponenti u posljednje se vrijeme sve više koriste predtretmani i tretmani poput pulsirajućeg električnog polja, ultrazvuka te superkritične ekstrakcije (Luengo i sur., 2014).

Pulsirajuće električno polje je jedna od inovativnih tehnologija. Netermalna je metoda i koristi kratke impulse visokog napona za tretiranje namirnica. Tretmanom pulsirajućim električnim poljem dolazi do propusnosti staničnih membrana (elektroporacija) što olakšava oslobađanje unutarstaničnih spojeva. Osim toga, povećana je efikasnost ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode, s obzirom da je to netermalan proces pomaže u očuvanju osjetljivih bioaktivnih spojeva koji bi se mogli degradirati pri visokim temperaturama te je to ekološki pristup zato što troši manje otapala i energije. Tretman pulsirajućim električnim poljem koristi se za ekstrakciju likopena i polifenolnih spojeva iz pokožice rajčice te ekstrakciju β -karotena iz kore mrkve i batata.

Inovativne tehnologije omogućuju učinkovitu izolaciju bioloških spojeva čime se povećava održivost i ekonomski potencijal prehrambene industrije. Iskorištavanjem nusproizvoda smanjuje se otpad, doprinosi se zaštiti okoliša te se stvaraju novi proizvodi s dodanom vrijednošću.

Cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje predtretmana pulsirajućeg električnog polja na učinak ekstrakcije bioaktivnih komponenti (karotenoida i fenolnih spojeva) iz nusproizvoda povrća (pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RAJČICA

Rajčica (*Solanum lycopersicum L.*) pripada obitelji *Solanaceae* te je druga po redu najvažnija povrtna kultura uz krumpir (Quinet i sur., 2019). Rajčica je višegodišnja biljka te se uzgaja diljem svijeta (Bhatkar i sur., 2021). Uzgaja se za konzumaciju u svježem obliku ili za preradevine. Rajčica sadrži mnoge spojeve (tablica 1) koji su važni za zdravlje (vitamini, karotenoidi, fenolni spojevi i drugi) (Quinet i sur., 2019). Ovi bioaktivni spojevi imaju važnu ulogu u osnaživanju imuniteta ljudskog organizma stoga što posjeduju mnoga pozitivna svojstva poput protuupalnih, antialergijskih, antimikrobnih, antioksidativnih i mnogih drugih djelovanja (Quinet i sur., 2019).

Kora rajčice bogata je likopenom koji je glavni karotenoid u rajčici. Likopen je zaslužan za karakterističnu crvenu boju plodova rajčice. Zbog svoje visoke antioksidativne aktivnosti koristi se kao nutraceutik čime smanjuje rizik od ateroskleroze i koronarne bolesti srca (Luengo i sur., 2014). Uz likopen, u rajčici se nalazi još i β -karoten. Likopen čini 80-90 % sadržaja ukupnih karotenoida u kori rajčice, dok β -karoten čini 2-3 % sadržaja ukupnih karotenoida (Albanese i sur., 2014).

Milijuni tona rajčice prerađuju se svake godine za proizvodnju različitih proizvoda kao što su kečap i pasirana rajčica prilikom čega zaostaju velike količine nusproizvoda (kora, pulpa i sjemenke) koji predstavljaju 10-40 % ukupne prerađene rajčice (Luengo i sur., 2014). Nusproizvodi rajčice izvrstan su izvor ugljikohidrata, proteina, minerala i komponenata kao što je likopen (Sariego Toledo i sur., 2022). Rajčice su bogate karotenoidima koji predstavljaju glavni izvor likopena u ljudskoj prehrani. Karotenoidi i fenolni spojevi doprinose hranjivoj vrijednosti rajčice te poboljšavaju njezina funkcionalna svojstva (Quinet i sur., 2019). Rajčica ima visok udio vlage od oko 90 % ili više što utječe na brže propadanje nakon berbe. Stoga se za produljenje roka trajanja koriste različite metode. Jedna od tih metoda je i sušenje koje se koristi kako bi se spriječilo kvarenje i produljio rok trajanja, ali i zbog smanjenja volumena i težine čime se poboljšava rukovanje i transport rajčice (Bhatkar i sur., 2021). Uz to, prije ekstrakcije likopena iz rajčice potrebno je smanjiti udio vlage kako bi se smanjila količina korištenog otapala potrebnog za ekstrakciju (Sariego Toledo i sur., 2010).

Tablica 1. Kemijski sastav, sadržaj minerala i masnih kiselina u pokožici rajčice (Prema: Elbadrawy i Sello, 2011)

Kemijski sastav	g/100 g	Udio minerala	mg/100g
proteini	10,50	Ca	160
masti	4,04	Mg	149
pepeo	5,90	Fe	1,50
ugljikohidrati	78,56	Cu	1,10
masne kiseline (%)		Cr	0,06
miristinska	0,34	Co	0,01
palmitinska	15,19	Ni	0,66
stearinska	6,84	Zn	3,12
ukupno zasićenih	22,37	Mn	1,40
palmitinska	1,82	Na	73,6
oleinska	19,14	Se	0,01
linolenska	52,41	Pb	0,05
linoleinska	4,26	Cd	0,02
ukupno nezasićenih	77,63	K	1097

2.2. MRKVA

Mrkva (*Daucus carota L.*) je jedan od najvažnijih usjeva s rasprostranjenošću diljem svijeta. Uglavnom se koristi svježa ili prerađena u sokove, pića, slatkiše te konzervirane dehidrirane proizvode. Mrkva je značajan izvor prirodnih bioaktivnih spojeva poput fenola, poliacetilena, karotenoida, askorbinske kiseline i tokoferola (Šeregelj i sur., 2020). Uz to sadrži prehrambena vlakna (Sharma i sur., 2011).

Zbog prisutnosti značajne razine niza različitih spojeva, mrkva se smatra funkcionalnom namirnicom sa značajnim svojstvima koja promiču zdravlje (Šeregelj i sur., 2020). Potrošnja mrkve i njenih prerađevina je u porastu zbog prepoznavanja namirnice kao važnog izvora prirodnih antioksidansa koji imaju antikancerogena djelovanja (Sharma i sur., 2011). Sadržaj vlage u mrkvi iznosi 86-89 %, a mrkva je i dobar izvor ugljikohidrata (oko 10,6 %) te minerala (kalcij, fosfor, željezo, magnezij) (Sharma i sur., 2011). Posljednjih godina prirodni spojevi dobili su posebnu pozornost zbog svojih potencijalnih bioloških svojstava i primjenjivosti. Nusproizvodi mrkve nakon industrijske prerade čine do 50 % sirovina koje su uglavnom do sada korištene za stočnu hranu i gnojivo. Međutim, nusproizvodi mrkve sadrže velike količine zaostalih vrijednih proizvoda koji su povezani s različitim prehrambenim i zdravstvenim prednostima (Šeregelj i sur., 2020). Mnoga istraživanja pokazala su da ti bioaktivni spojevi imaju antioksidativno djelovanje što je povezano s prevencijom i terapijom kardiovaskularnih bolesti, raka, dijabetesa i gastrointestinalnih bolesti (Šeregelj i sur., 2020)

2.3. BATAT

Slatki krumpir ili batat (*Ipomoea batatas L.*) je namirnica koja se sve više koristi u svakodnevnoj prehrani, a sadrži brojne spojeve koji pomažu smanjiti rizik od kroničnih i degenerativnih bolesti. Boja kore batata kreće se od bijele, krem, žute, ružičaste i crvene sve do ljubičaste, dok boja mesa batata može biti bijela, žuta, narančasta ili čak ljubičasta (Khairul Alam, 2021). Gotovo svi dijelovi batata su jestivi stoga što sadrže mnogo hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva (Khairul Alam, 2021). Budući da se uzgaja u više od stotinu zemalja (Šeregelj i sur., 2020), batat je među najvažnijim, ali nedovoljno iskorištenim prehrambenim usjevima na svijetu s više od 90 milijuna tona godišnje proizvodnje čime najviše doprinose azijske i afričke zemlje (Khairul Alam, 2021).

Batat je bogat proteinima, vlaknima, vitaminom B, β -karotenom i mineralnim tvarima (željezo, kalcij, magnezij, cink) te polifenolnim spojevima (Khairul Alam, 2021).

Velike količine prehrambenog otpada postale su velika briga u cijelome svijetu. Zbog svog sastava nusproizvodi u prehrambenoj industriji mogu se koristiti u drugim proizvodnim procesima jer su bogat izvor dijetalnih vlakana, aroma, prirodnih boja i antioksidansa. Tijekom prerade batata zaostaje mnogo kore koja se smatra glavnim nusproizvodom, a bogata je polifenolnim spojevima te karotenoidima (Šeregelj i sur., 2020). Kora koja nastaje tijekom prerade batata trenutno ima malu komercijalnu vrijednost pa je potrebno povećati svjesnost o dobrobitima koje taj nusproizvod sadrži (Anastacio i sur., 2016). Kora batata sadrži visok udio fenola koji imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala te imaju pozitivno djelovanje u ljudskom organizmu (Anastacio i sur., 2016).

Modeliranje i optimizacija procesa prerade batata su vrlo važni te pridonose upotrebi kore batata kao jednog od važnih izvora fenolnih spojeva. Potrebno je optimizirati procese ekstrakcije fenolnih spojeva kako bi iskorištenje bilo što veće, odnosno kako bi se dobio najveći udio fenola te visoka antioksidacijska aktivnost (Anastacio i sur., 2016). Polifenolni spojevi ekstrahirani iz kore batata imaju antikancerogena svojstva, štite kardiovaskularni sustav te preveniraju šećernu bolest (Kurata i sur., 2019)

2.4. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže antioksidativna svojstva koja pomažu u zaštiti kroničnih bolesti od oštećenje slobodnih radikala. Polifenoli su fitokemikalije koje se nalaze u voću, povrću, čaju, kavi, čokoladi. U prirodi je identificirano više od 8000 polifenola, a njihova glavna uloga je antioksidativna aktivnost. Antioksidansi štite tijelo od oštećenja koja uzrokuju slobodni radikali i posebice u obrani od štetnog

djelovanja UV zračenja. 100 g svježeg voća u prosjeku sadrži 300 mg polifenola (Ganesan i Xu, 2017). Fenoli su vrlo važni sastojci biljaka zbog njihove sposobnosti rekombinacije ili tzv. „gašenja“ slobodnih radikala poput hidroksilnih radikala ili superoksida (Elbadrawy i Sello, 2011).

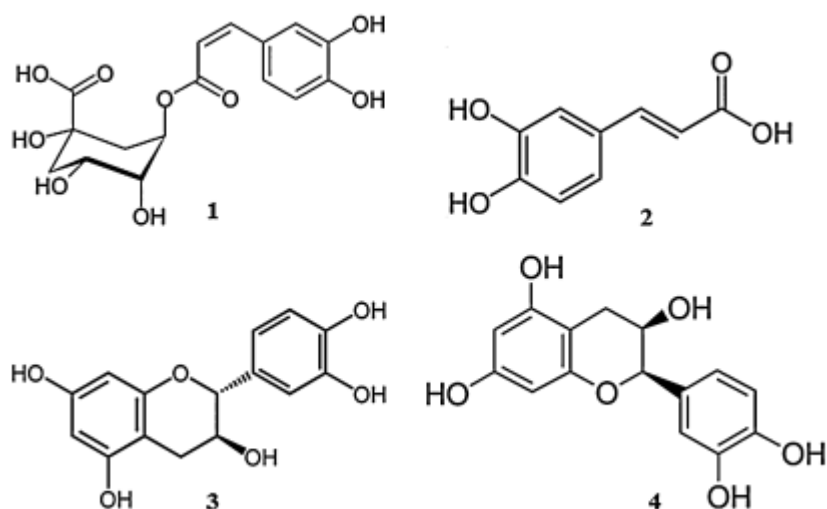
2.4.1. Vrste polifenola

S obzirom na broj fenolnih skupina i strukturnih elemenata polifenolni spojevi se dijele u četiri različite kategorije: flavonoidi, stilbeni, lignani, fenolne kiseline. Flavonoidi imaju potencijalni učinak na uklanjanje radikala i upalne reakcije, a najviše ih ima u voću, povrću, mahunarkama, crnom vinu te zelenom čaju. Dijele se na flavone, flavonole, flavanone, izoflavone, antocijanidine, kalkone i katehine. Stilbeni se nalaze u crnom vinu i kikirikiju, a najpoznatiji predstavnik stilbena je resveratrol. Lignani se nalaze u sjemenkama (lan), mahunarkama, žitaricama i određenom povrću, dok se fenolne kiseline nalaze u kavi, čaju, cimetu. Razlikujemo dvije podskupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Ganesan i Xu, 2017).

U kori rajčice nalazi se nekoliko vrsta flavonoida koji imaju koristan učinak na zdravlje, a to su rutin, naringenin i kvercetin. Rutin utječe na smanjenje udjela triglicerida u jetri i srcu, a djeluje i protuupalno. Naringenin je protuupalni regulator metabolizma masti, a kvercetin pokazuje antioksidativne, antiagregacijske, antikancerogene i protuupalne učinke (Elbadrawy i Sello, 2011).

U kori mrkve nalaze se klorogenske kiseline i njeni derivati te p-hidroksibenzojeve kiseline zajedno sa brojnim derivatima cimetne kiseline (Ma i sur., 2014). Osim navedenih fenolnih spojeva mrkva sadrži kafeinsku kiselinu, epikatehin i katehin, kamferol, kvercetin i luteolin (slika 1). Ovi spojevi koji se mogu ekstrahirati iz kore mrkve mogu se dodavati u drugu hranu (Jabbar i sur., 2014).

U kori batata nalaze se fenolne kiseline i flavonoidi. Od fenolnih kiselina najzastupljenije su kafeinska kiselina te njeni derivati i klorogenska kiselina i njeni derivati, a flavonoidi su najzastupljeniji u obliku pigmenata (karotenoidi). Od flavonoida najzastupljeniji su kvercetin glikozidi. Osim toga u kori batata nalaze se p-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina (Kurata i sur., 2019).



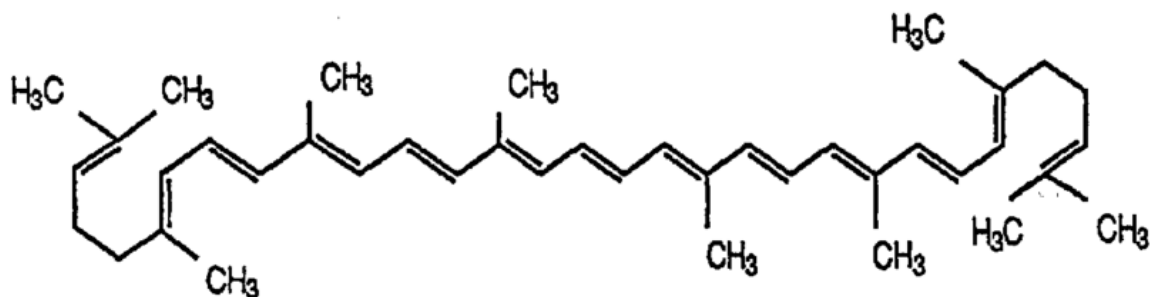
Slika 1. Strukturne formule fenolnih spojeva: klorogenske kiseline (1), kafeinske kiseline (2), katehina (3) i epikatehina (4) (Jabbar i sur., 2014)

2.5. KAROTENOIDI

Izraz karotenoidi se odnosi na obitelj sa više od 600 različitih biljnih pigmenata koji su odgovorni za mnoge boje lišća (crvena, narančasta, žuta,...), voća i cvijeća, kao i boje ptica, insekata, riba i rakova. Karotenoidi imaju poliizoprenu strukturu, a jedna od najvažnijih funkcija karotenoida u ljudskoj prehrani je da djeluju kao prekursori vitamina A (provitamin A). Karotenoidi provitamina A podupiru održavanje zdrave diferencijacije epitelnih stanica te normalnu reproduktivnu sposobnost (Karnjanawipagul i sur., 2010). Karotenoidi se sastoje od niza konjugiranih C=C veza, a ta dvostruka veza odgovorna je za njihova pigmentirajuća svojstva. Također, ovi spojevi imaju sposobnost stupanja u interakciju sa slobodnim radikalima i singlentnim kisikom zbog čega imaju antioksidativnu aktivnost (Young i Lowe, 2018). Uz provitamin A postoje još i lutein, zeaksantin, astaksantin i likopen koji također igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju kao biološki antioksidansi koji štite stanice tkiva od oksidativnih štetnih učinaka slobodnih radikala i singlentnog kisika. Mnoga istraživanja pokazala su korelaciju između unosa karotenoida i smanjenog rizika od nekih bolesti kao što su rak, aterogeneza, oštećenja neurona (Karnjanawipagul i sur, 2010).

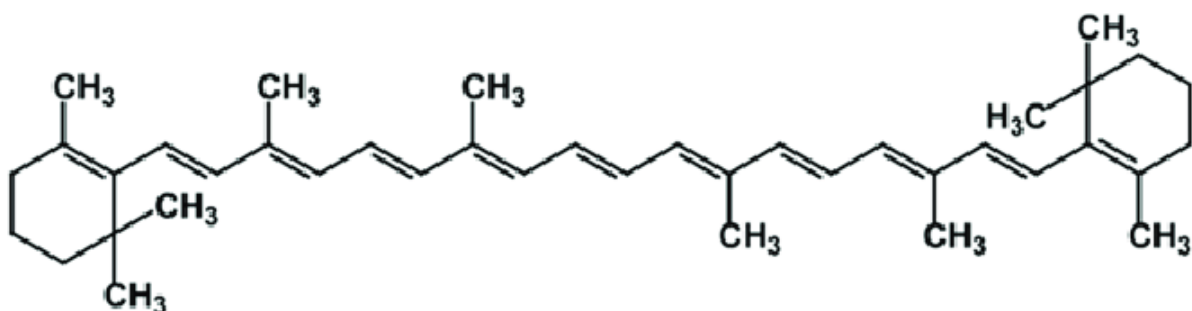
Likopen i β -karoten su najzastupljeniji karotenoidi u kori rajčice, mrkve i batata. Likopen (slika 2) je glavni nezasićeni pigment koji se nalazi u perikarpu rajčice. U svježim rajčicama likopen se nalazi u najstabilnijem obojenijem *trans*- obliku, ali tijekom prerade dolazi do izomerizacije i oksidacije pri čemu *trans*- oblik prelazi u *cis*- oblik koji je nestabilan

te manje obojen (Bhatkar i sur., 2021). Iako je *cis*- oblik nestabilniji u organskim otapalima pokazuje veću topljivost pa posljedično dolazi do povećane ekstrakcije likopena (Bhatkar i sur., 2021). Toplinskom obradom uzoraka dolazi do oslobađanja likopena koji je vezan za proteine (Bhatkar i sur., 2021). Likopen osim antioksidativnih svojstava ima antikancerogena svojstva te pomaže u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (Panthee i sur., 2013).



Slika 2. Strukturna formula likopena (Kavimani, 2017)

β -karoten (slika 3) je glavni karotenoid u mrkvi te jedan on najčešće proučavanih karotenoida. Osim što daje boju namirnicama prekursor je vitamina A te je prirodno prisutan kao mješavina različitih izomera (*cis* i *trans*) β -karotena (Gul i sur., 2015). β -karoten pokazuje provitaminsku aktivnost te je također sklon izomerizaciji (Bhatkar i sur., 2021). Slabo je topiv u vodi te je nestabilan u prisutnosti svjetla, topline i kisika, a ima potencijal da proizvede dvije molekule retinola u prisutnosti kisika. (Gul i sur., 2015). β -karoten je topiv u mastima, a većina β -karotena je prisutna u *trans*-obliku. Ima snažan antioksidativni kapacitet te je zaslužan za smanjenje rizika od srčanih bolesti, pomaže u jačanju imunološkog sustava te je važan nutrijent za poboljšanje vida (Gul i sur., 2015).



Slika 3. Strukturna formula β -karotena (Shankaranarayanan, 2018)

Za određivanje karotenoida obično se koristi tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) (Karnjanawipagul i sur., 2010).

2.6. SUŠENJE

Sušenje je jedna od najstarijih i najraširenijih metoda konzerviranja hrane (Lovrić, 2003.). Proces sušenja karakterizira progresivno smanjenje sadržaja vlage s ciljem dobivanja suhog proizvoda (Zhang i sur., 2016). Razlikujemo prirodno sušenje (uklanjanjem vode sunčevim zračenjem ili prirodnim strujanjem zraka) ili umjetno sušenje (pod kontroliranim uvjetima). Proces sušenja zasniva se na osmoanabiozi koja djeluje kao dehidracija do nekog udjela vode u hrani (10-20 %). Sušenjem se iz hrane uklanjaju hidratna i konstitucijska voda pri čemu dolazi do smanjenja moći rehidracije, posmeđivanja koje ne nastaje djelovanjem enzima. (Lovrić, 2003.)

Sirovine koje se podvrgavaju procesu sušenja možemo razvrstati u dvije kategorije:

- *higroskopne*: parcijalni tlak vode postaje manji od tlaka para vode kod istog kritičnog sadržaja vlage
- *nehigroskopne*: parcijalni tlak vode u njima jednak je tlaku para čiste vode (Lovrić, 2003.)

Glavni cilj sušenja je spriječiti kvarenje namirnica djelovanjem mikroorganizama te spriječiti kvarenje namirnica kemijskim promjenama. Također, sušenjem se postiže smanjenje mase ili volumena hrane (Lovrić, 2003) u svrhu lakšeg skladištenja i transporta.

U početku procesa sušenja variranje težine je konstantno što znači da je i brzina sušenja konstantna, a taj proces događa se zbog puno manjeg unutarnjeg otpora transportu vode od onog za uklanjanje vlage (Botelho i sur., 2011). Kod tih uvjeta otpor prijenosu topline i mase je ograničen isključivo na struju zraka, ali s obzirom da su u idealnom sistemu ti uvjeti konstantni, otpor se mijenja s vremenom zbog čega je to period konstantne brzine (Lovrić, 2003.). Drugo razdoblje je proces padajuće brzine gdje stopa gubitka vode nije konstantna (Botelho i sur., 2011). Kod perioda padajuće brzine prevladavaju uvjeti zasićenja prema površini, a period padajuće brzine završava kada u središtu materijala nema više vode za održavanje parcijalnog tlaka (Lovrić, 2003).

Kod nehigroskopnih namirnica period padajuće brzine završava sa završetkom sušenja, a u higroskopnim namirnicama do perioda padajuće brzine dolazi kada je parcijalni tlak vode u svim dijelovima ispod tlaka zasićenja (Lovrić, 2003).

2.7. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

Pulsirajuće električno polje (PEP) je jedna od inovativnih metoda ekstrakcije koja posljednjih godina privlači sve veće zanimanje zbog svoje ekonomske učinkovitosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Yan i sur., 2015). Osim za poboljšanje ekstrakcije pulsirajuće električno polje predloženo je kao sredstvo za izazivanje stresa u biljnim stanicama čime se postiže biosinteza aktivnih komponenti (Ranjha i sur., 2021).

To je inovativna netermalna tehnologija čiji se proces temelji na isprekidanoj primjeni istosmjerne struje visokog napona (kV) za vrlo kratke vremenske intervale (μs ili ms) kroz proizvod koji se nalazi između dvije elektrode. Uspostavom razlike potencijala tj. napona, između elektroda dolazi do razdvajanja naboja. Stoga se između njih uspostavlja homogeno električno polje. Jakost električnog polja proporcionalna je količini naboja na elektrodama. Osim toga, jakost električnog polja ovisi o udaljenosti između elektroda i primijenjenom naponu (Martinez i sur., 2020). Prilikom tretmana pulsirajućim električnim poljem koriste se visokonaponski impulsi od nano do milisekunde koji dovode do permeabilizacije stanične membrane (Vaessen i sur., 2020). Tijekom procesa pulsirajućim električnim poljem stvaraju se električna polja $0\text{-}50\text{ kV cm}^{-1}$, a pulsevi koji se koriste su viši od električnih polja s intenzitetom $10\text{-}80\text{ kV cm}^{-1}$ (Syed i sur., 2017).

Tretmanom sa pulsirajućim električnim poljem dolazi do strukturnih promjena u staničnoj membrani te dolazi do pojave elektroporacije (Ou i sur., 2016). Elektroporacija je proces koji uzrokuje stvaranje pora u citoplazmatskoj membrani stanica čime se povećava njena propusnost te dolazi do nekontroliranog transporta molekula kroz membranu (Martinez i sur., 2016). Većina istraživanja koristi pulsirajuće električno polje za ekstrakciju bioaktivnih spojeva u kombinaciji sa konvencionalnim metodama kao što je miješanje (Yan i sur., 2015).

Pulsirajuće električno polje jedna je od inovativnih tehnika ekstrakcije koja posljednjih godina zadobiva sve veći interes zbog svoje ekonomske učinkovitosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Yan i sur., 2015). Zbog sposobnosti elektroporacije stanične membrane pulsirajuće električno polje koristi se kao predtretman koji olakšava obnavljanje bioaktivnog materijala nakon čega slijede tradicionalni koraci ekstrakcije (Ranjha i sur., 2021).

Jakost električnog polja za ekstrakciju komponenti je u rasponu $0,1\text{-}10\text{ kV cm}^{-1}$ što je dovoljno za biljna tkiva (perikarp ili mezokarp plodova) (Ranjha i sur., 2021). Korištenje viših intenziteta jakosti električnog polja (preko 10 kV cm^{-1}) rijetko se primjenjuje zato što dolazi do stvaranja jakih vodikovih radikala koji bi mogli napasti bioaktivne spojeve (Yan i sur., 2015).

Sam proces tretmana provodi se *in vitro* na način da se uzorak nanese između dvije elektrode, a uz to postoji i *in vivo* postupak koji se koristi za istraživanje tumora (Garner, 2019).

Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem pokazala se kao obećavajuća tehnologija za ekstrakciju vrijednih spojeva iz biljnih materijala pri čemu dolazi do elektroporacije citoplazmatske membrane. Tretman pulsirajućim električnim poljem pojačava difuziju otopljenih tvari koje se nalaze unutar stanice (Luengo i sur., 2014). Što je kraće trajanje pulsa stvaraju se manje pore koje onda omogućavaju ionima prolazak kroz staničnu membranu, a kod viših vrijednosti električnog polja se pore povećavaju i dolazi do ireverzibilnog istjecanja staničnog sadržaja (Frey i sur., 2006). Tretmanom membrana gubi svoju strukturu i funkcionalnost te se biljni materijal ekstrahira (Ranjha i sur., 2021).

Tretman pulsirajućim električnim poljem koristi se i za inaktivaciju mikroorganizama u uzorcima hrane. Učinak pulsirajućeg električnog polja na membrane živih stanica mogu biti reverzibilne ili ireverzibilne ovisno o fizikalno-kemijskim i biološkim čimbenicima tretmana. Brojna istraživanja pokazala su da je mjesto u stanici kod kojeg dolazi do interakcije električnog polja lipidni dio stanične membrane, a istraživanje se temelji na mjerenjima električne struje kroz dvosloj lipidne membrane zbog utjecaja visoke vrijednosti električnog polja te utječe na transport molekula u stanicu ili iz stanice (Seratlić i sur., 2013). Fosfolipidna dvoslojna struktura stanične membrane prelazi iz gelaste strukture u tekuće stanje te se olakšava proces elektroporacije zbog povećanja temperature te zbog povećane fluidnosti membrane (Jaeger i sur., 2010).

Kada su stanice podvrgnute tretmanu pulsirajućim električnim poljem, naboji se akumuliraju duž stanične membrane te kao rezultat toga nastaje razlika u potencijalima. Stanična membrana ponaša se kao propusni dielektrik, a zbog povećanja napona stvaraju se pore ispunjene vodom koje čine lipidni dvosloj prilikom što uzrokuje pojavu elektroporacije. Tada dolazi do povećane propusnosti stanične membrane (Frey i sur., 2006).

Prednost ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem je da je to netermički tretman koji ne utječe na kvalitetu ekstrahiranih proizvoda (Luengo i sur., 2014).

Korištenjem novih tehnologija u proizvodnji hrane, cilj je unaprijediti kvalitetu prehrambenih proizvoda, smanjiti potrošnju vode i emisiju štetnih plinova te povećati energetske učinkovitost (Arshad et al., 2021). Primjena pulsirajućeg električnog polja zadovoljava potrebe za održivom preradom hrane jer zahtijeva manje resursa, a prerađena hrana zadržava svoju nutritivnu vrijednost i ima dulji rok trajanja (Arshad i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su osušena pokožica rajčice, kora mrkve te kora batata.

3.1.1. Pribor i aparatura

Pribor:

- menzure (25 mL, 250 mL)
- metalna ladica
- odmjerne tikvice (10 mL, 25 mL i 100 mL)
- pinceta
- plastične falkonice (50 mL)
- staklene čaše (100 mL, 200 mL)
- stakleni ljevak
- šprice (10 mL) i filteri (0,45 µm pore)
- žličica

Aparatura:

- centrifuga Centric 150, *Tehnica*, Slovenija
- HPLC, *Agilent Technologies*, SAD
- komorna sušara, *Elektrovina*, Hrvatska
- konduktometar pH 340i/SET, *WTW*, Njemačka
- mehanička pipeta Hirschmann (10-100 µL, 100-1000 µL i 1-5 mL), *Merck*, Njemačka
- mlinac, *Imetec Tenacta Group*, Kina
- spektrofotometar Secomam UviLine 9400, *Secomam Groupe Aqualabo*, Francuska
- spektrofotometar Spectroquant Prove 300, *Merck Darmstadt*, Njemačka
- tehnička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- tresilica Benchmark, *Benchmixier V2*, *Benchmark Scientific Inc*, SAD

- ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digiplus DL 255 H, *Bandelin electronic*, Njemačka
- uređaj za pulsirajuće električno polje HVG60/1 PEP, *Impel d.o.o.*, Hrvatska
- vlagomjer PMB 53, *Adam Equipment*, SAD

Kemikalije:

- aceton, *Gram-mol*, Hrvatska
- DPPH, *Fluka*, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, *Merck*, SAD
- heksan, *Gram-mol*, Hrvatska
- metanol, *Kemika*, Hrvatska
- metil tert-butileter, *Kemika*, Hrvatska
- natrijev karbonat, *Kemika*, Hrvatska

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sušenje sirovina

Za pripremu uzoraka osušeni su svježi uzorci pokožice rajčice, kore batata te kore mrkve koji su oguljeni iz sirovina (slika 4). Pokožica rajčice sušena je na temperaturi od 60 °C, 75 minuta, a relativna vlažnost pokožice rajčice na početku sušenja iznosila je 87,23 % dok je na kraju sušenja iznosila 9,27 %. Kora batata sušena je na 55 °C, 90 minuta, a relativna vlažnost kore batata na početku sušenja iznosila je 84,36 % dok je na kraju sušenja iznosila 12,76 %. Kora mrkve sušena je na 55 °C, 85 minuta, a relativna vlažnost kore mrkve na početku sušenja iznosila je 89,84 % dok je na kraju sušenja iznosila 14,37 %. Sve sirovine sušene su do postizanja konstantne mase. Relativna vlažnost izmjerena je vlagomjerom na početku sušenja te nakon postizanja konstantne mase na način da je stavljeno 2 g uzorka u vlagomjer te su uzorci spaljivani pri 105 °C do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja uzorci su samljeveni u mlincu, te skladišteni u eksikatoru u plastičnim posudicama.



Slika 4. Priprema pokožice rajčice i kore mrkve za sušenje (vlastita fotografija)

3.2.2. Provedba eksperimenta

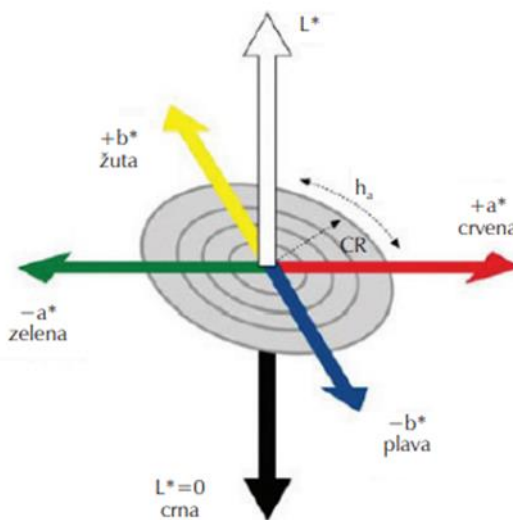
U plastične falkonice od 50 mL odvagano je 2 g uzorka kore (pojedinačno kora rajčice, mrkve, batata) te je nadopunjeno sa 25 mL 80 % otopine metanola. Za pripremu 1 L 80 % otopine metanola odmjeren je 800 mL metanola te 200 mL deionizirane vode. Za provedbu eksperimenta korišten je uređaj za pulsirajuće električno polje. Uređaj se sastoji od tri kontrolne jedinice koja kontrolira ispravnost uređaja, visokonaponskog izvora napajanja koji je zadužen za pretvorbu ulaznog izmjeničnog napona od 230 V u istosmjerni napon u rasponu od 1 do 60 kV te visokonaponskog generatora impulsa. U reaktor uređaja dodano je 25 mL pripremljenog uzorka iz plastične epruvete. Uzorci su tretirani pri naponu od 2, 5 i 7,5 kV cm⁻¹ u trajanju od 1, 3 i 5 min, pri frekvenciji od 100 Hz i vremenu trajanja pulsa od 2 μs. Udaljenost između elektrode uzemljenja i visokonaponske elektrode iznosila je 1 cm. Obje elektrode izvedene su od nehrđajućeg čelika. Nakon tretmana izmjerene su pH vrijednost te električna provodljivost. Nakon toga tretiranim uzorcima spektrofotometrijski je određen udio karotenoida, boja, udio ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost te na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC-u) udio likopena i β-karotena te udio najznačajnijih fenolnih spojeva.

3.2.3. Određivanje pH i električne provodljivosti

Nakon tretmana uzorcima su izmjerene pH vrijednost i električna provodljivost (μS cm⁻¹) pomoću digitalnog pH/konduktometra.

3.2.4. Parametri boje

Pripremljenim ekstraktima određena je boja je na spektrofotometru Spectroquant Prove 300. Razlikujemo XYZ i CIE $L^*a^*b^*$ sustav boja. U XYZ sustavu boja X i Y označavaju koordinate boja, a Z svjetlinu, a položaj boje može se definirati precizno. CIE $L^*a^*b^*$ prostor (slika 5) temeljen je na objektivnom vrednovanju boja i najbliži je vizualnoj percepciji. Unutar CIELAB-a definirani su psihometrijski indeks svjetline (L^*) te dvije koordinate boje (a^* i b^*) pri čemu se kromatičnost boje definira u odnosu na neutralnu os koja ima vrijednost 0. Parametar a^* definira odnos između crvene (pozitivna vrijednost) i zelene boje (negativna vrijednost). Parametar b^* definira odnos žute (pozitivna vrijednost) i plave boje (negativna vrijednost). Parametri a^* i b^* su kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Mihoci, 2015). L^* vrijednost je kvantitativni atribut relativne svjetline pri čemu se svaka boja može smatrati jednakovrijednim pripadnikom sive ljestvice u rasponu između crne ($L^*=0$) i bijele ($L^*=100$) boje (Mihoci, 2015).



Slika 5. Sustav boja (prema Mihoci, 2015)

3.2.5. Određivanje karotenoida spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom

a) spektrofotometrijska metoda

Udio karotenoida određen je prije i nakon tretmana. Uzorci se profiltriraju pomoću lijevka i filter papira. Filtrat se sačuvao te je korišten za određivanje ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti, dok je od taloga odvagano 1 g uzorka. U 1 g uzorka dodano je

12,5 mL otopine aceton:heksan (4:6). Uzorci su stavljeni na tresilicu 15 min te su potom centrifugirani 5 min na 5000 okretaja u minuti (0 min^{-1}). Uzorci se profiltriraju pomoću šprice i filtera te se spektrofotometrijski određuje udio karotenoida. Kao slijepa proba korištena je otopina aceton: heksan (4:6) (Luterotti i sur., 2013).

Udjeli karotenoida (likopena, β -karotena, klorofila A i klorofila B) određeni su na spektrofotometru Secomam UviLine 9400. Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom analizom izraženi su kao mg komponente po g suhe tvari uzorka (mg g^{-1} s.tv.).

b) Identifikacija i kvalitativna analiza karotenoida HPLC metodom

Identifikacija i kvalitativna analiza karotenoida u ekstraktima uzoraka provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na C30 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm \times 4,6 mm, 5 μm , 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na Agilent Technologies (LC 1200) HPLC sustav zagrijan na 35 °C. Injektirano je 10 μL pripremljenog ekstrakta, a za razdvajanje je korištena gradijentna kromatografija (tablica 2) ukupnog protoka $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ kroz čitavo vrijeme trajanja analize. Mobilna faza bilo je otapalo A (MeOH:metil tert-butileter:voda (90:7:3)) i otapalo B (MeOH:metil tert-butileter (10:90, v/v)).

Tablica 2. Gradijent za HPLC-UV/VIS/PDA analizu klorofila i karotenoida (Castro-Puyana i sur., 2017)

t (min)	otapalo A	otapalo B
0	100	0
20	70	30
35	50	50
45	20	80
50	0	100
52	100	0

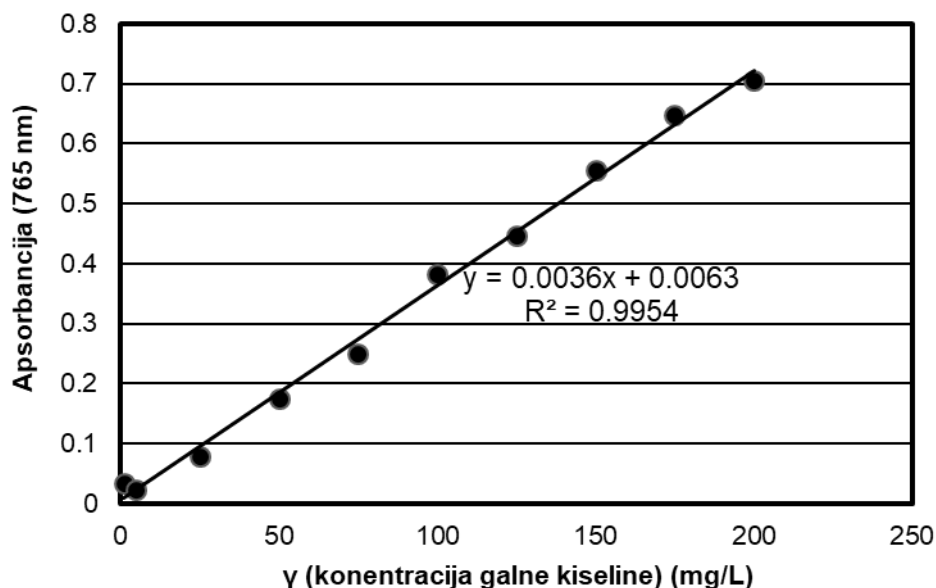
Za detekciju i identifikaciju karotenoida korišten je DAD (*eng.* diode array detector) pri valnoj duljini od 280 nm, širina pojasa (*eng.* bandwidth) 8 nm, bez referentne valne duljine. Za vrijeme trajanja analize snimani su UV spektri od 190-400 nm. Identifikacija karotenoida provedena je usporedbom retencijskog vremena i UV spektra željenog pika s retencijskim vremenima UV spektrima ranije navedenih injektiranih standarada. Pripremljene su otopine standarda likopena ($25\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$) i β -karotena ($50\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri koncentracijama navedenim za svaku komponentu. Rezultati dobiveni HPLC analizom izraženi su kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka (mg g^{-1} s.tv.) (Castro-Puyana i sur., 2017).

3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom

a) spektrofotometrijska metoda

Sadržaj ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na primjeni Folin-Ciocalteuovog reagensa. Reagens se reducira u prisutnosti fenolnog iona te dolazi do promjene njegove boje. Fenolni ion dobije se dodatkom lužnate otopine natrijevog karbonata fenolima koji su slabe kiseline (Shortle i sur., 2014).

Kao standard koristi se galna kiselina. Iz jednadžbe pravca (slika 6) izračuna se koncentracija ukupnih polifenola u uzorku. Rezultat je izražen kao mg galne kiseline L⁻¹. Udio ukupnih fenola izražen je kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka (mg g⁻¹ s.tv.).



Slika 6. Baždarni pravac standarda galne kiseline za određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Filtrat koji je dobiven nakon filtracije korišten je za određivanje ukupnih fenola. U plastične kivete otpipetirano je 100 μL ekstrakta, 200 μL Folinovog reagensa te 2 mL deionizirane vode. Nakon 5 min dodaje se 1 mL 20 % otopine Na₂CO₃. Uzorci se promiješaju te se ostave stajati u mraku 2 sata. Nakon toga se na spektrofotometru mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od λ=765 nm. Slijepa proba sastoji se od 100 μL deionizirane vode, 200 μL Folinovog reagensa, 2 mL deionizirane vode. Nakon 5 min dodaj se 1 mL 20 % otopine Na₂CO₃.

Za pripremu 20 % otopine Na_2CO_3 u odmjernej tikvici volumena 1000 mL otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata u 800 mL vruće deionizirane vode. Otopina se zatim ohladi te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon toga profiltrira.

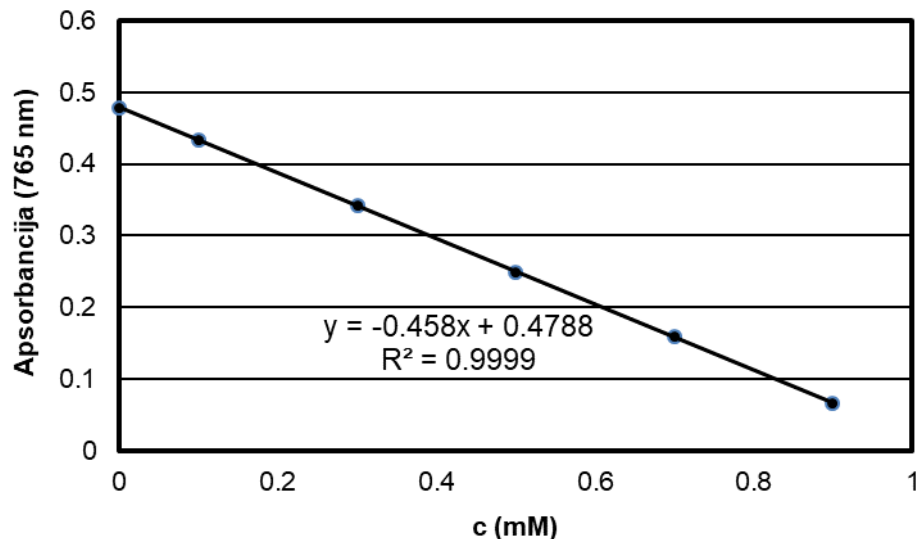
b) identifikacija i kvalitativna analiza fenolnih spojeva HPLC analizom

Identifikacija i kvalitativna analiza fenolnih spojeva u ekstraktima uzoraka provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na C30 nepolarnoj koloni (Zorbax ODS 250 mm × 4,6 mm) instaliranoj na Agilent Technologies HPLC sustav zagrijan na 20 °C. Injektirano je 20 μL pripremljenog ekstrakta, a za razdvajanje je korištena gradijentna kromatografija ukupnog protoka 0,9 mL min^{-1} kroz čitavo vrijeme trajanja analize. Mobilne faze bile su 3 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (otapalo A) i 3 % otopina mravlje kiseline u vodi (otapalo B).

Za detekciju i identifikaciju polifenola korišten je DAD (*eng.* diode array detector) pri valnoj duljini od 280 nm, širina pojasa (*eng.* bandwidth) 8 nm, bez referentne valne duljine. Za vrijeme trajanja analize snimani su UV spektri od 190-400 nm. Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena i UV spektra željenog pika s retencijskim vremenima i UV spektrima ranije navedenih injektiranih standarda u zadanim koncentracijama. Rezultati dobiveni HPLC analizom izraženi su kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka (mg g^{-1} s.tv.) (Dent i sur., 2013).

3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Filtrat koji je dobiven nakon filtracije korišten je za određivanje antioksidacijske aktivnosti. U plastične kivete otpipetirano je 100 μL ekstrakta te 2 mL 0,1 mM otopine DPPH. Uzorci se pomiješaju te se ostave u mraku 25 min. Nakon toga se na spektrofotometru mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od $\lambda=518$ nm. Kao slijepa proba korištena je 80 % otopina metanola. Kao standard koristi se 1 mM otopina Trolox-a. (Kedare i Singh, 2011). Napravi se koncentracijski niz otopina standarda Trolox-a iz kojeg se dobije baždarni pravac (slika 7).



Slika 7. Baždarni pravac standarda Trolox-a za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Sposobnost vezanja slobodnih radikala izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka uzorka i apsorbancije otopine DPPH u koju nije dodan uzorak, prema jednadžbi (1):

$$\text{DPPH aktivnost čišćenja (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

gdje su:

A_0 - kontrola apsorbancije (apsorbancija pripremljene otopine DPPH)

A_1 - apsorbancija uzorka

3.2.8. Statistička analiza podataka

Na dobivenim rezultatima tretmana modelnog sustava provedena je analiza varijance (ANOVA) u programu Statgraphics centurion 19 (Statgraphics technologies, SAD). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost tri paralelna mjerenja \pm standardna devijacija, a razina značajnosti svih korištenih statističkih metoda bila je 95 %. Pareto dijagrami prikazuju statistički značajne faktore u području desno od plave linije koji su poredani po značajnosti. Ovi dijagrami mogu poslužiti kao vizualni prikaz prethodno izračunatih statistički važnih faktora putem ANOVE.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je razviti metodu za ekstrakciju likopena i β -karotena iz pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Uzorci su tretirani pri frekvenciji od 100 Hz, vremenu trajanja pulsa od 2 μ s te pri različitim vrijednostima napona te vremena trajanja tretmana što je prikazano u tablici 3. Uzorcima su neposredno nakon tretmana izmjerene pH vrijednost i električna provodljivost (slika 9), zatim boja uzoraka prije i nakon tretmana (slika 10, 11, 12), udio karotenoida (slika 13, 14, 15), udio ukupnih polifenola (slika 18), antioksidacijska aktivnost (slika 22), udio likopena i β -karotena HPLC analizom (tablica 4) te udio fenolnih spojeva HPLC analizom (slika 19, 20, 21).

Tablica 3. Oznake uzoraka tretiranih pulsirajućim električnim poljem

Oznaka uzorka	Napon (kv cm ⁻¹)	Vrijeme (min)
R0, M0, B0	/	/
R1, M1, B1	5	5
R2, M2, B2	7,5	3
R3, M3, B3	2	1
R4, M4, B4	2	3
R5, M5, B5	7,5	5
R6, M6, B6	5	1
R7, M7, B7	7,5	1
R8, M8, B8	2	5
R9, M9, B9	5	3

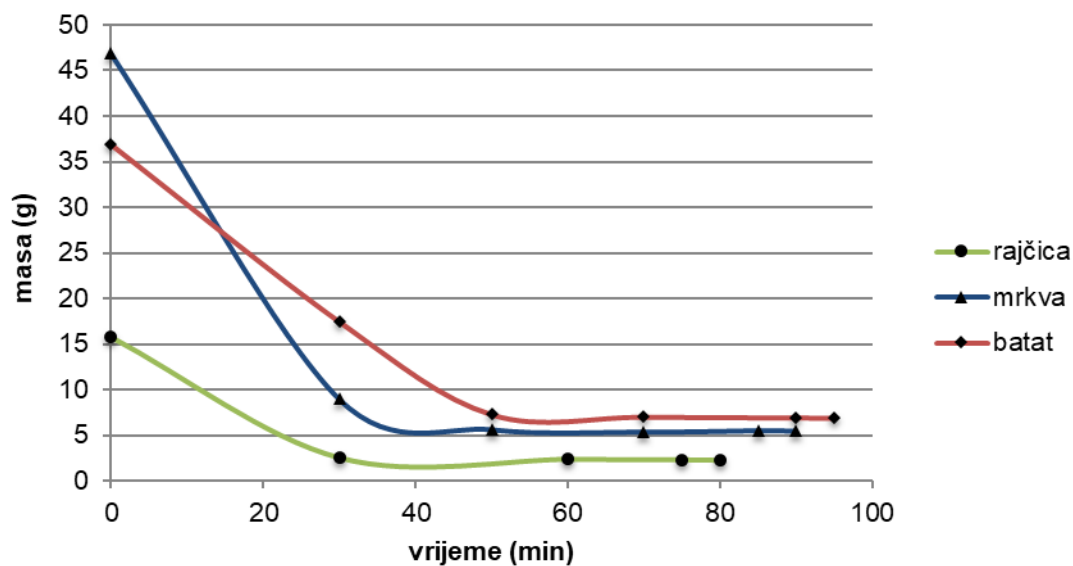
R-pokožica rajčice, M-kora mrkve, B-kora batata, 0-netretirani uzorak

Zbog jednostavnijeg navođenja uzoraka tijekom rasprave koristit će se oznake iz tablice 3.

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI UZORAKA

4.1.1. Sušenje sirovina

Sirovine pokožice rajčice, mrkve i batata sušene su u komornoj sušari do postizanja konstantne mase (slika 8).



Slika 8. Grafički prikaz sušenja pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata do konstantne mase

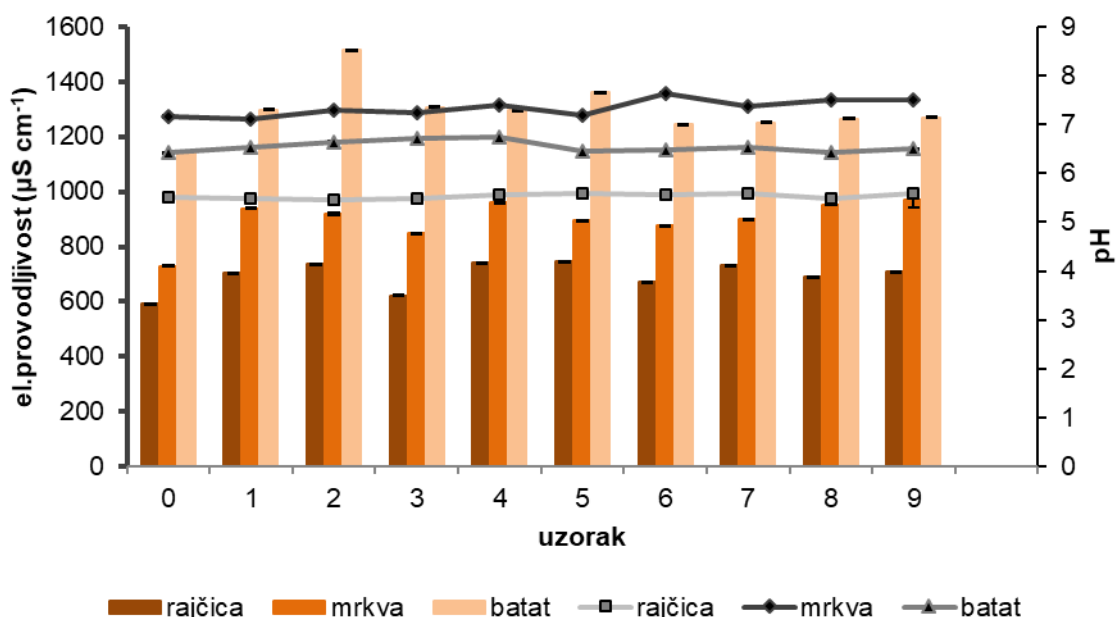
Pokožica rajčice sušena je 75 minuta, nakon 30 minuta sušenja vidljivo je smanjenje mase (slika 8). Kora mrkve sušena je 85 minuta, a nakon 50 minuta dolazi do postizanja konstantne mase. Kora batata sušena je 90 minuta, ali tek nakon 50 minuta je vidljivo postizanje konstantne mase.

Pokožica rajčice, kora mrkve i kora batata su nehigroskopne namirnice. Prilikom procesa sušenja došlo je do smanjenja mase što je vidljivo na slici 7. Kod sušenja pokožice rajčice u periodu padajuće brzine (0-30 min) uklanja se vezana voda, a zatim slijedi period konstantne brzine sušenja (30-75 min) kada se uklanja slobodna voda.

Temperatura sušenja također ima vrlo važnu ulogu u očuvanju udjela likopena i β -karotena. Zbog poboljšanja zadržavanja likopena i β -karotena predloženo je da se rajčice suše na temperaturama nižim od 70 °C (Salni i sur., 2019).

4.1.2. pH i električna provodljivost

pH vrijednost i električna provodljivost uzoraka mogu se vidjeti na slici 9. Na slici 9 prikazane su vrijednosti za pokožicu rajčice, kora mrkve te kora batata.



Slika 9. Rezultati analize pH i električne provodljivosti prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem na pokožicu rajčice, koru mrkve i koru batata

pH vrijednost netretiranog uzorka te tretiranih uzoraka značajno se ne razlikuju. Električna provodljivost netretiranog uzorka iznosi $593 \mu\text{S cm}^{-1}$. Električna provodljivost tretiranih uzoraka veća je u odnosu na netretirani uzorak. Najveća je za uzorak R5 i iznosi $747 \mu\text{S cm}^{-1}$, a najmanja za uzorak R3 i iznosi $622 \mu\text{S cm}^{-1}$. Uzorak R3 osim što ima najmanju električnu provodljivost ima najmanji udio ukupnih fenolnih spojeva ($1,955 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), dok uzorak s najvećom električnom provodljivošću (R5) ima najveći udio ukupnih fenolnih spojeva ($2,437 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.).

pH vrijednost kore mrkve viša je nego pH vrijednost pokožice rajčice. Električna provodljivost netretiranog uzorka je najniža ($730 \mu\text{S cm}^{-1}$), a tretiranih uzoraka je viša. Najviša vrijednost je za uzorak M9 ($971 \mu\text{S cm}^{-1}$). Netretirani uzorak (M0) ima najniži udio ukupnih fenolnih spojeva ($1,150 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), dok uzorak s najvećom električnom provodljivošću (M9) ima najviši udio ukupnih fenolnih spojeva ($8,627 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.).

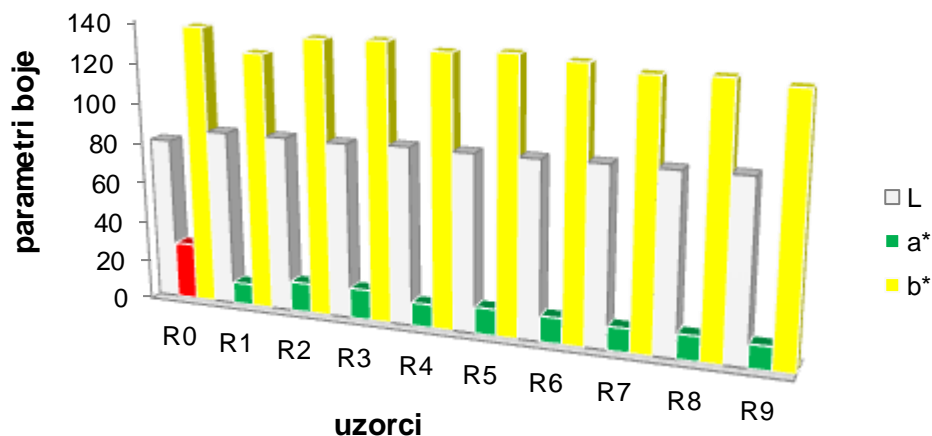
pH kore batata iznosi oko 6,50. Električna provodljivost kore batata najviša je od svih prethodnih uzoraka (mrkve i pokožice rajčice). Za netretirani uzorak (B0) iznosi $1146 \mu\text{S cm}^{-1}$, a za uzorak B2 je najviša i iznosi $1516 \mu\text{S cm}^{-1}$. Uzorak B0 ima najmanji udio ukupnih fenolnih spojeva ($3,049 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), dok uzorak B2 sadrži $3,629 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. što je više u odnosu na uzorak s najmanjom električnom provodljivošću.

Panthee i sur. (2013) proveli su istraživanje na uzorcima rajčice kojim su dokazali da se pH vrijednost tretiranih i netretiranih uzoraka značajno ne razlikuju, odnosno pH vrijednost

se nije promijenila bez obzira na promjenu napona ili vremena tretiranja uzoraka. Nakon provedenih tretmana promijenio se udio likopena, odnosno došlo je do ekstrakcije likopena (Panthee i sur., 2013). Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do smanjenja udjela likopena u uzorcima pokožice rajčice. Netretirani uzorak (R0) sadrži $0,135 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv., dok uzorak R1 sadrži $0,062 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.

4.1.3. Parametri boje

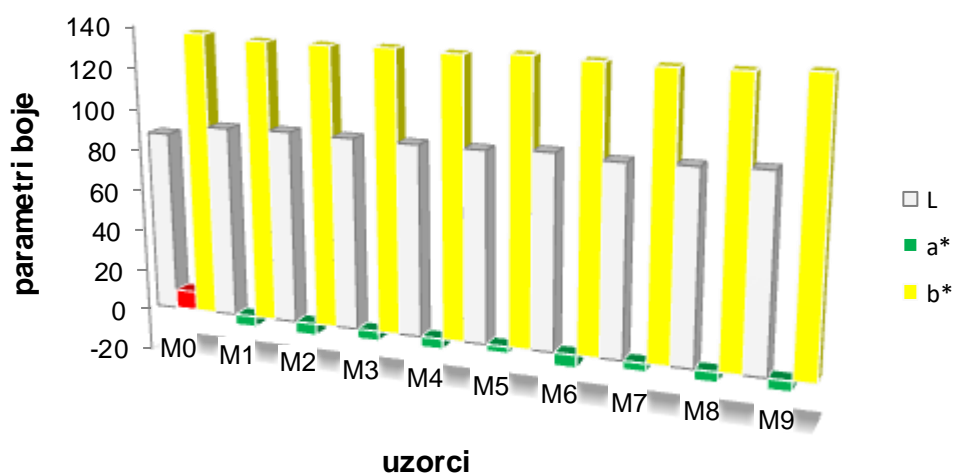
Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem spektrofotometrijski je određena promjena boje uzoraka. Boja je prva karakteristika hrane koju potrošač percipira. Sušenje vrućim zrakom u sušari utječe na boju uzoraka. Visoka temperatura dovodi do neenzimskog posmeđivanja koje uzrokuje potamnjenje uzoraka (Bhatkar i sur., 2021). Ukoliko se primjenjuju visoke temperature sušenja može doći do navedenih promjena, no u ovom pokusu uzorci su sušeni na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ što ne bi trebalo uzrokovati navedene promjene.



Slika 10. Grafički prikaz parametara boje (L , a^* , b^*) netretiranog i tretiranih uzoraka kore rajčice
R0 (netretirani uzorak); R1 (5 kV cm^{-1} , 5'); R2 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 3'); R3 (2 kV cm^{-1} , 1'); R4 (2 kV cm^{-1} , 3'); R5 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 5'); R6 (5 kV cm^{-1} , 1'); R7 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 1'); R8 (2 kV cm^{-1} , 5'); R9 (5 kV cm^{-1} , 3')

Na slici 10 vidljive su vrijednosti L^* , a^* i b^* za sve tretirane uzorke pokožice rajčice, uključujući i netretirani uzorak. L^* vrijednost kod svih uzoraka je približno jednaka pozitivna vrijednost što odgovara bijeloj boji, odnosno uzorci su svijetli. Parametar a^* za netretirani uzorak (R0) iznosi 27,74 i prikazan je crvenom bojom na slici 10, a tretirani uzorci (R1-R9) su bliže negativnoj vrijednosti, odnosno bliže zelenoj boji pri čemu parametar a^* za uzorak R1 iznosi 10,62. Parametar b^* iznosi približno 130 te se nalazi u pozitivnom dijelu osi (žuta

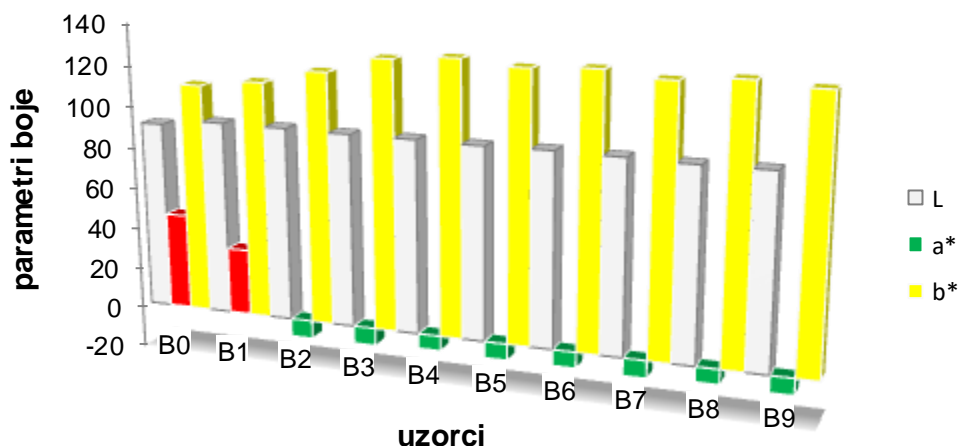
boja). Najviša vrijednost parametra a^* očitana je za uzorak R0 (27,74), a najniža za uzorak R1 (10,56). Najviša vrijednost parametra b^* je 137,43 za uzorak R0, a najniža 126,33 za uzorak R1, dok je najviša vrijednost za parametar L očitana za uzorak R9 (87,27), a najniža vrijednost očitana je za uzorak R0 (80,18). Netretirani uzorak (R0) ima najviši udio likopena ($0,135 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$) te najviši udio β -karotena ($0,102 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$). Uzorak R1 ima najmanji udio likopena ($0,062 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$), a uzorak R9 ima najmanji udio β -karotena ($0,056 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$). Iz ovih podataka se može zaključiti da uzorci s najvišim udjelom likopena i β -karotena imaju najviše vrijednosti parametara a^* i b^* , odnosno bliže su crvenoj i žutoj boji. Tretmanom pulsirajućim električnim poljem smanjuje se udio likopena i β -karotena te vrijednosti parametara a^* i b^* .



Slika 11. Grafički prikaz parametara boje (L, a^* , b^*) netretiranog i tretiranih uzoraka kore mrkve
M0 (netretirani uzorak); M1 (5 kV cm^{-1} , 5'); M2 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 3'); M3 (2 kV cm^{-1} , 1'); M4 (2 kV cm^{-1} , 3'); M5 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 5'); M6 (5 kV cm^{-1} , 1'); M7 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 1'); M8 (2 kV cm^{-1} , 5'); M9 (5 kV cm^{-1} , 3')

Na slici 11 može se vidjeti promjena parametara boje za koru mrkve. Vidljivo je da je parametar L^* približno jednak za sve tretmane, a parametar b^* se također znatno ne razlikuje uspoređujući vrijednosti s promjenom tretmana. Najviša vrijednost parametra a^* iznosi 9,07 (M0) te je na slici 11 prikazan crvenom bojom zato što mu je vrijednost pozitivna, a najniža vrijednost parametra a^* iznosi -6,21 za uzorak M6. Uzorci M1-M9 prikazani su zelenom bojom zato što se nalaze u negativnom dijelu osi. Najviša vrijednost parametra b^* je za uzorak M0 (136,68), a najniža vrijednost je za uzorak M7 (126,33). Najviša vrijednost parametra L^* iznosi 92,91 za uzorak M6, a najniža vrijednost parametra L^* je 80,18 (M0). Vidljiva je promjena parametra a^* jer je vrijednost za netretirani uzorak (M0) pozitivna (9,07), dok su vrijednosti parametra a^* za tretirane uzorke (M1-M9) negativne zbog čega su bliže

zelenoj boji. Netretirani uzorak (M0) ima najviši udio likopena ($0,047 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$) te najniži udio β -karotena ($0,152 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$). Tretmanom pulsirajućim električnim poljem dolazi do porasta koncentracije likopena i β -karotena. Uzorak s najnižom vrijednosti parametra a^* (M6) sadrži $0,199 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ β -karotena, dok uzorak s najvišom vrijednosti parametra b^* (M7) sadrži najviši udio β -karotena ($0,208 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$). Uzorci s najvišim udjelima β -karotena bliže su zelenoj, odnosno plavoj boji.



Slika 12. Grafički prikaz parametara boje (L , a^* , b^*) netretiranog i tretiranih uzoraka kore batata B0 (netretirani uzorak); B1 (5 kV cm^{-1} , 5'); B2 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 3'); B3 (2 kV cm^{-1} , 1'); B4 (2 kV cm^{-1} , 3'); B5 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 5'); B6 (5 kV cm^{-1} , 1'); B7 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 1'); B8 (2 kV cm^{-1} , 5'); B9 (5 kV cm^{-1} , 3')

Na slici 12 vidi se da je L^* vrijednost uzoraka približno jednaka. Za parametar b^* vidljiv je porast vrijednosti od netretiranog uzorka (B0) do tretiranog uzorka (B4). Parametar a^* za netretirani uzorak (B0) te tretirani uzorak (B1) nalaze se na pozitivnom dijelu osi što odgovara crvenoj boji (slika 12), dok su za ostale tretirane uzorke (B2-B9) vrijednosti negativne što odgovara zelenoj boji (slika 12). Najviša vrijednost parametra a^* iznosi 46,29 za uzorak B0, a najniža vrijednost je -8,77 za uzorak B2. Najviša vrijednost parametra b^* zabilježena je za uzorak B4 (131,43), a najniža vrijednost zabilježena je za uzorak B0 (111,06). Najviša vrijednost parametra L^* je 93,63 za uzorak B1, a najniža vrijednost parametra L^* je za B0 (90,86). Netretirani uzorak (B0) sadrži najviši udio β -karotena ($0,192 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$) te ima najvišu vrijednost parametra a^* te najnižu vrijednost parametra b^* . Uzorak B2 ima najniži udio β -karotena ($0,155 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$) te najnižu vrijednost parametra a^* te je bliže zelenoj boji.

Provedene su brojne analize koje pokazuju da je jakost električnog polja glavni parametar prilikom tretmana pulsirajućim električnim poljem koji utječe na boju rajčice (Gonzales-Casado i sur., 2018). Promjene u svjetlini boje mogu biti potaknute procesom smanjenja barijera između organela koji omogućava ulazak enzima u kontakt sa supstratima

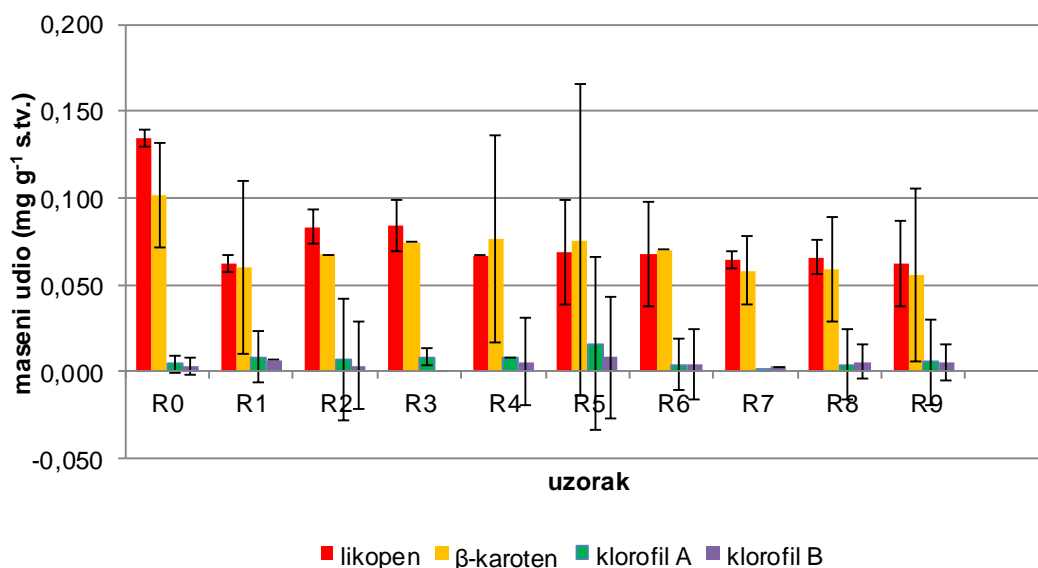
kao posljedica elektroporacije i migracije staničnog sadržaja (Gonzales-Casado i sur., 2018). Primjena viših vrijednosti tretmana uzrokovala je porast vrijednosti parametara a^* i b^* .

Kora mrkve tretirana pulsirajućim električnim poljem pokazuje značajno smanjenje parametra L^* u odnosu na netretirani uzorak. Smanjenje parametra L^* , odnosno svjetline uzrokuje proces elektroporacije pri čemu dolazi do otpuštanja unutarstaničnog sadržaja (Alam i sur., 2018). Wiktor i sur., u svom istraživanju prilikom tretmana pulsirajućim električnim poljem pri $1,85 \text{ kV cm}^{-1}$ i 50 impulsa dobili su povećanje parametra L^* u odnosu na netretirani uzorak (2015). Veća vrijednost parametra a^* daje informaciju o povećanju udjela crvene boje što se može povezati s pojavom enzimske reakcije posmeđivanja tijekom sušenja uzoraka. Niži intenzitet električnog polja uzrokovao je porast vrijednosti parametra a^* , dok je viši intenzitet tretmana rezultirao smanjenjem vrijednosti parametra a^* (Wiktor i sur., 2015). Parametar b^* (žuta boja) povećan je nakon primjene višeg intenziteta električnog polja (Wiktor i sur., 2015).

4.1.4. Određivanje udjela karotenoida spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom

a) spektrofotometrijska metoda

Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem spektrofotometrijski je određen udio karotenoida u uzorcima pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata. Određeni su udjeli likopena, β -karotena, klorofila A i klorofila B. Rezultati su prikazani na slikama 13, 14, 15.



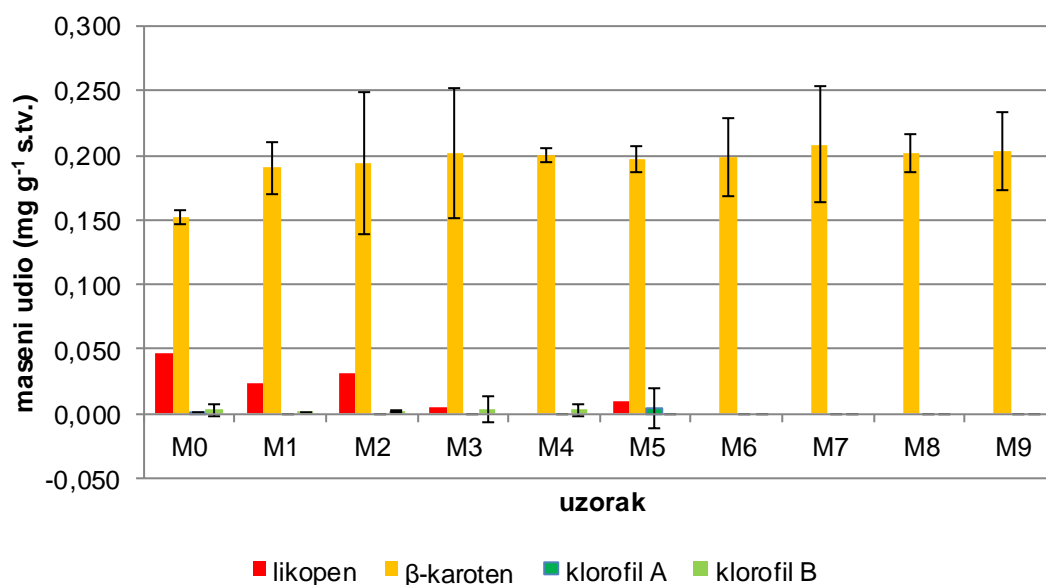
Slika 13. Rezultati analize udjela karotenoida u uzorcima rajčice prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem
R0 (netretirani uzorak); R1 (5 kV cm^{-1} , 5'); R2 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 3'); R3 (2 kV cm^{-1} , 1'); R4 (2 kV cm^{-1} , 3'); R5 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 5'); R6 (5 kV cm^{-1} , 1'); R7 ($7,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 1'); R8 (2 kV cm^{-1} , 5'); R9 (5 kV cm^{-1} , 3')

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do smanjenja udjela likopena, vrijednosti za tretirane uzorke približno su jednake (slika 13). Uzorak R0 sadrži 0,135 mg g⁻¹ s.tv. likopena, dok je najniža vrijednost za uzorke R1 i R9 (0,062 mg g⁻¹ s.tv.). Uzorci R1 i R9 tretirani su pri naponu od 5 kV cm⁻¹, te su im pH vrijednosti približno slične i iznose 5,54 (slika 9). pH vrijednosti utječu na stabilnost likopena. Ako se likopen nalazi u uvjetima pH 2-4 doći će do 96-99 % gubitka likopena u odnosu na uvjete pH 5-8 gdje su gubitci 47-54 % (Saini i sur., 2019).

Udio β-karotena nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem također se smanjuje. Najviša vrijednost β-karotena je za uzorak R0 (0,102 mg g⁻¹ s.tv.), a najniža vrijednost β-karotena je za uzorak R9 i iznosi 0,056 mg g⁻¹ s.tv.

Udio klorofila A za netretirani uzorak i za tretirane uzorke su približno jednake. Najniža vrijednost je za uzorak R7 (0,001 mg g⁻¹ s.tv.), dok je najviša vrijednost za uzorak R5 (0,016 mg g⁻¹ s.tv.).

Udio klorofila B za netretirani uzorak i za tretirane uzorke su približno jednake te nema većih odstupanja. Uzorak R3 ne sadrži klorofil B.

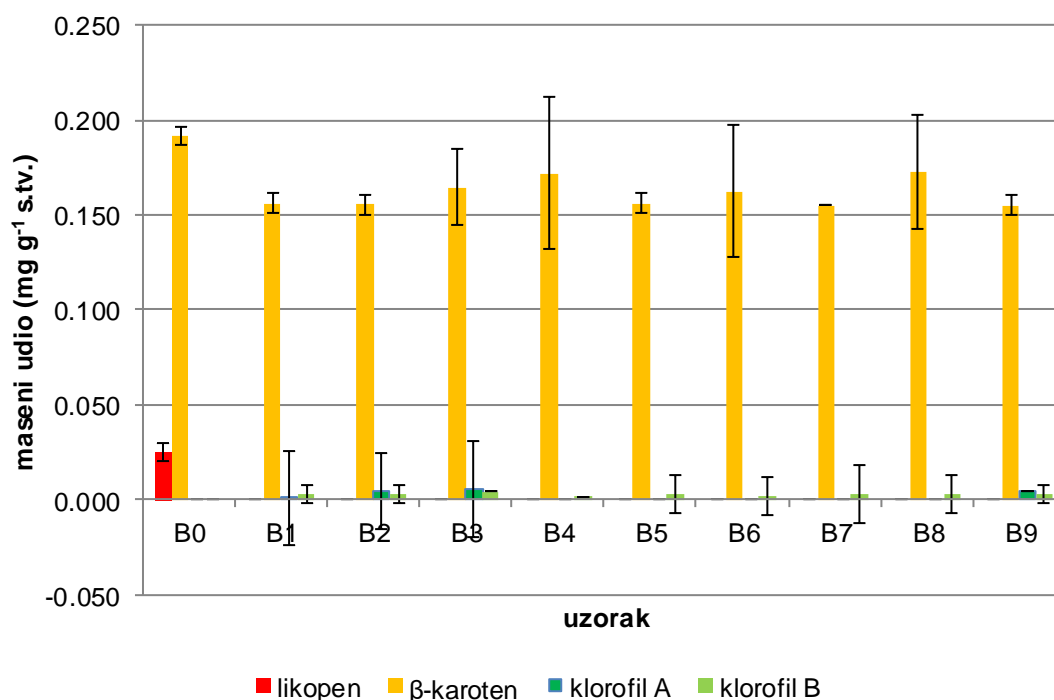


Slika 14. Rezultati analize udjela karotenoida u uzorcima mrkve prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem
M0 (netretirani uzorak); M1 (5 kV cm⁻¹, 5'); M2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); M3 (2 kV cm⁻¹, 1'); M4 (2 kV cm⁻¹, 3'); M5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); M6 (5 kV cm⁻¹, 1'); M7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); M8 (2 kV cm⁻¹, 5'); M9 (5 kV cm⁻¹, 3')

U kori mrkve ima vrlo malo likopena. Uzorak M0 sadrži najviši udio likopena (0,047 mg g⁻¹ s.tv.), dok uzorci M4, M6, M7, M8 i M9 ne sadrže likopen.

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do porasta udjela β -karotena. Najviši udio β -karotena zabilježen je u uzorku M7 (0,208 mg g⁻¹ s.tv.), dok je najniži udio β -karotena zabilježen u uzorku M0 i iznosu 0,152 mg g⁻¹ s.tv. Uzorak M7 tretiran je pri naponu od 7,5 kV cm⁻¹ u vremenu od 1 min.

U kori mrkve nema klorofila A, u uzorku M0 zabilježeno je tek 0,001 mg g⁻¹ s.tv. Klorofil B se u kori mrkve također nalazi u niskim koncentracijama. Uzorci M0, M1, M2, M3 i M4 sadrže približno 0,002 mg g⁻¹ s.tv., dok ostali uzorci (M5-M9) uopće ne sadrže klorofil B.



Slika 15. Rezultati analize udjela karotenoida u uzorcima batata prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem
 B0 (netretirani uzorak); B1 (5 kV cm⁻¹, 5'); B2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); B3 (2 kV cm⁻¹, 1'); B4 (2 kV cm⁻¹, 3'); B5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); B6 (5 kV cm⁻¹, 1'); B7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); B8 (2 kV cm⁻¹, 5'); B9 (5 kV cm⁻¹, 3')

Kora batata sadrži 0,025 mg g⁻¹ s.tv. likopena u uzorku B0, dok u ostalim uzorcima (B1-B9) nema likopena. Udio β -karotena u kori batata prije tretmana pulsirajućim električnim poljem (B0) iznosi 0,192 mg g⁻¹ s.tv., dok je nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem zabilježeno smanjenje udjela β -karotena. Najniža vrijednost β -karotena je u uzorcima B2, B7 i B9 (0,155 mg g⁻¹ s.tv.).

U kori batata nalaze se vrlo niske koncentracije klorofila A. U uzorcima B0, B4, B5, B6, B7 i B8 nema klorofila A, dok se najviše klorofila A nalazi u uzorku B3 (0,006 mg g⁻¹ s.tv.).

U netretiranom uzorku kore batata (B0) nije zabilježen klorofil B, dok u tretiranim uzorcima ima vrlo malo klorofila B te su udjeli približno jednaki. Najviši udio klorofila B je u uzorku B3 (0,004 mg g⁻¹ s.tv.).

b) identifikacija i kvalitativna analiza udjela karotenoida nakon HPLC analize

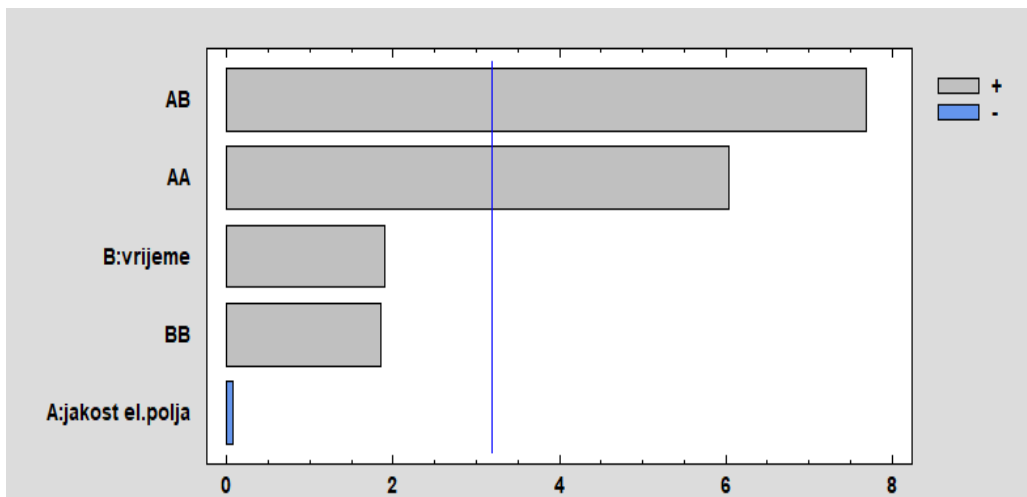
Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem HPLC analizom određeni su udjeli likopena i β-karotena u pokožici rajčice te udjeli β-karotena u kori mrkve i kori batata.

Tablica 4. Rezultati analize likopena i β-karotena u uzorcima prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem u uzorcima rajčice, mrkve i batata

uzorak	likopen (mg g ⁻¹ s.tv.)	β-karoten (mg g ⁻¹ s.tv.)	uzorak	β-karoten (mg g ⁻¹ s.tv.)	uzorak	β-karoten (mg g ⁻¹ s.tv.)
R0	4,886	5,508	M0	1,983	B0	1,633
R1	1,003	1,505	M1	0,614	B1	0,679
R2	1,320	1,798	M2	0,640	B2	0,718
R3	1,522	0,931	M3	0,794	B3	0,684
R4	0,964	1,458	M4	0,695	B4	0,772
R5	0,943	1,413	M5	0,852	B5	0,756
R6	0,940	1,413	M6	0,535	B6	0,604
R7	0,719	1,174	M7	0,577	B7	0,626
R8	0,918	1,389	M8	0,586	B8	0,689
R9	0,768	1,214	M9	0,521	B9	0,679

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do smanjenja udjela likopena i β-karotena u pokožici rajčice (tablica 4). Najviša vrijednost likopena zabilježena je za netretirani uzorak (R0) te iznosi 4,886 mg g⁻¹ s.tv., dok najniža vrijednost likopena iznosi 0,7199 mg g⁻¹ s.tv. za uzorak R7. Najviši udio β-karotena za pokožicu rajčice iznosi 5,508 mg g⁻¹ s.tv. (R0), dok je najniža vrijednost zabilježena za uzorak R3 (0,931 mg g⁻¹ s.tv.). Primjenom statističke analize dobivenih rezultata nije primijećen statistički značajan utjecaj parametara tretmana pulsirajućeg električnog polja na promjenu koncentracije likopena u uzorcima (p>0,05) (tablica 5 i 6)

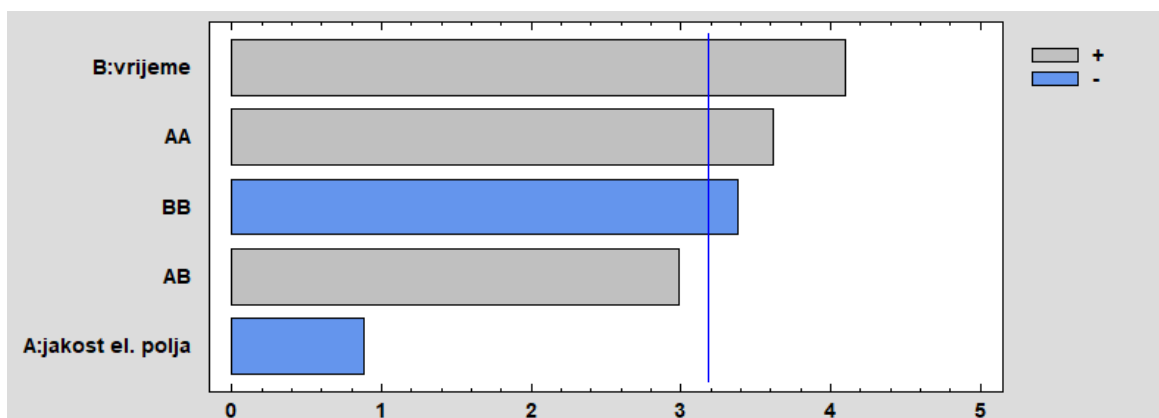
Udio β-karotena u kori mrkve za netretirani uzorak (M0) iznosi 1,983 mg g⁻¹ s.tv., dok najniža vrijednost iznosi 0,521 mg g⁻¹ s.tv. za uzorak M9. Parametri tretmana pulsirajućim električnim poljem su imali statistički značajan utjecaj na udio β-karotena u uzorcima kore mrkve (p<0,05) (tablica 5).



Slika 16. Pareto dijagram ekstrakcije β -karotena u uzorcima kore mrkve tretirane pulsirajućim električnim poljem

Pareto dijagram prikazuje statistički značajne faktore u području desno od plave linije (slika 16) koji su poredani po značajnosti: vrijeme i jakost električnog polja. Ovaj dijagram može poslužiti kao vizualni prikaz prethodno izračunatih statistički važnih faktora putem ANOVE (tablica 5). Pareto dijagram prikazuje kako vrijeme tretiranja uzoraka pulsirajućim električnim poljem ima najveći utjecaj na ekstrakciju β -karotena iz kore mrkve.

Tretmanom pulsirajućim električnim poljem smanjuje se udio β -karotena u kori batata. Najviša vrijednost je za uzorak B0 ($1,633 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$), dok je najniža vrijednost za uzorak B6 i iznosi $0,604 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ Parametri tretmana pulsirajućim električnim poljem su imali statistički značajan utjecaj na udio β -karotena u uzorcima kore batata ($p < 0,05$) (tablica 5).



Slika 17. Pareto dijagram ekstrakcije β -karotena u uzorcima kore batata tretirane pulsirajućim električnim poljem

Slika 17 prikazuje Pareto dijagram ekstrakcije β -karotena iz kore batata. Iz dijagrama se može vidjeti kako je statistički najznačajniji parametar za ekstrakciju vrijeme. U statistički značajne faktore još utječe kvadrat vremena te kvadrat jakosti električnog polja. Ovaj dijagram također može poslužiti kao vizualni prikaz prethodno izračunatih statistički važnih faktora putem ANOVE (tablica 5).

Nakon primjene tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do značajnog porasta koncentracija ukupnih karotenoida i likopena u kori rajčice (Gonzales-Casado i sur., 2018). Tretman pulsirajućim električnim poljem dovodi do povećanja ukupnih karotenoida zbog aktivacije metaboličkog puta karotenoida te zbog povećanja mogućnosti ekstrakcije iz uzorka pokožice rajčice zbog permeabilizacije stanične membrane (Gonzales-Casado i sur., 2018).

Luengo i sur. (2014) navode da je udio likopena u pokožici rajčice veći je nego u pulpi rajčice. Primjenom povećanog intenziteta jakosti električnog polja ekstrakcija likopena iz kore je povećana. Može se primijetiti da je ekstrakcija karotenoida iz pokožice rajčice povećana primjenom pulsirajućeg električnog polja. Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do porasta udjela β -karotena u kori mrkve (tablica 4).

Luengo i sur. (2014) u svom istraživanju koristili su jakosti polja od 3, 5 i 7 kV cm⁻¹, a najbolju ekstrakciju postigli su primjenom jakosti polja od 3 i 5 kV cm⁻¹. Povećanje ekstrakcije nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem događa se zbog učinka elektroporacije koji uzrokuje propusnost stanične membrane. Povećanje propusnosti stanične membrane koja djeluje kao polupropusna barijera olakšava prodiranje korištenih otapala u stanice te uzrokuje otpuštanje karotenoida koji se nalaze unutar stanice (Luengo i sur., 2014). Primjenom tretmana pulsirajućeg električnog polja sa jakosti električnog polja od 5 kV cm⁻¹ smanjeno je vrijeme dobivanja iste količine karotenoida (600mg/100g) u netretiranim i tretiranim uzorcima od 200 do 85 min (Luengo i sur., 2014). Primjenom napona od 5 kV cm⁻¹ dobiveno je 0,032 mg g⁻¹ s.tv. ukupnih karotenoida što je niže nego netretirani uzroci. Razlog bi mogla biti biološka raznolikost rajčice koja je dovela do nižih vrijednosti iako je primijenjena viša jakost polja (Pataro i sur., 2018).

Rezultati dobiveni HPLC analizom u skladu su sa spektrofotometrijski dobivenim rezultatima zato što likopen predstavlja više od 80 % ukupnog sadržaja karotenoida u rajčicama te je to najdominantniji karotenoid u pokožici rajčice (Pataro i sur., 2018).

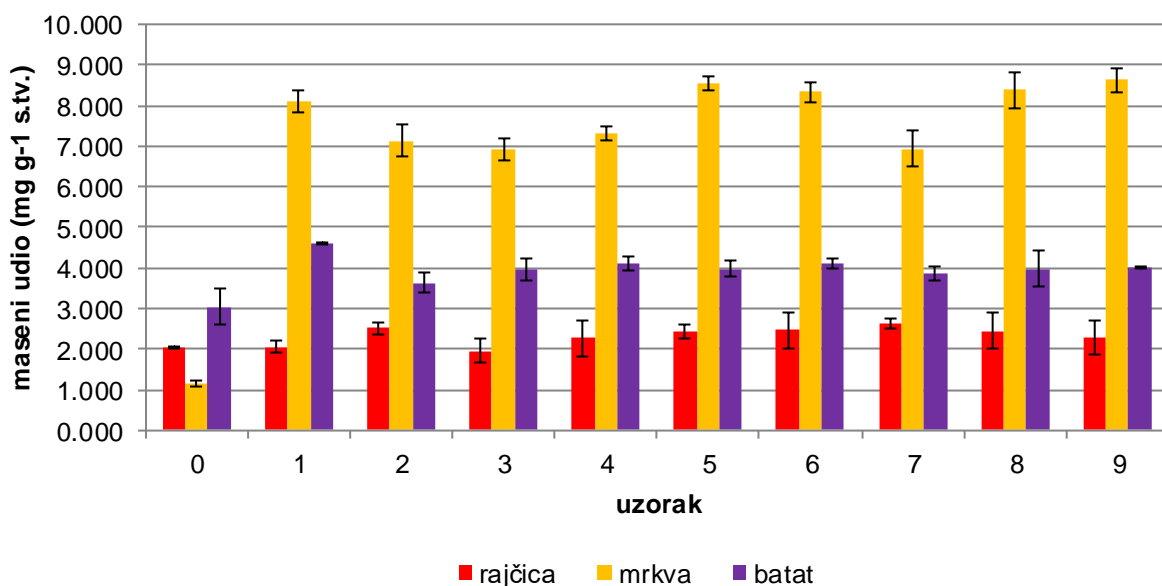
Osim tretmana pulsirajućim električnim poljem vrlo važnu ulogu u procesu ekstrakcije ima i odabir otapala. Aceton je polarno otapalo, a heksan je nepolarno otapalo te je cilj bilo ekstrahirati karotenoide iz obje faze. Prilikom procesa ekstrakcije došlo je do smanjenja udjela likopena u pokožici rajčice (tablica 4). Udio β -karotena u pokožici rajčice i kori batata se smanjivao tretmanom pulsirajućim električnim poljem, dok se udio β -karotena za koru mrkve povećavao prilikom tretmana pulsirajućim električnim poljem. Unatoč kompaktnosti biljnog tkiva, aceton je dobro otapalo za ekstrakciju jer može prodrijeti u netaknute biljne stanice pokožice rajčice gdje se nalaze karotenoidi te ih može otopiti (Pataro i sur., 2018).

Maseni udio karotenoida u kori batata za netretirane uzorke kreće se od 12 do 19,67 mg/ 100 g (Šregelj i sur., 2020). U netretiranom uzorku kore batata (B0) udio β -karotena je 0,192 mg g⁻¹ s. tv.

4.1.5. Određivanje udjela ukupnih polifenola spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom

a) spektrofotometrijska metoda

Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem spektrofotometrijski je određen udio ukupnih fenola u uzorcima pokožice rajčice, kore batata i kore mrkve (slika 18).



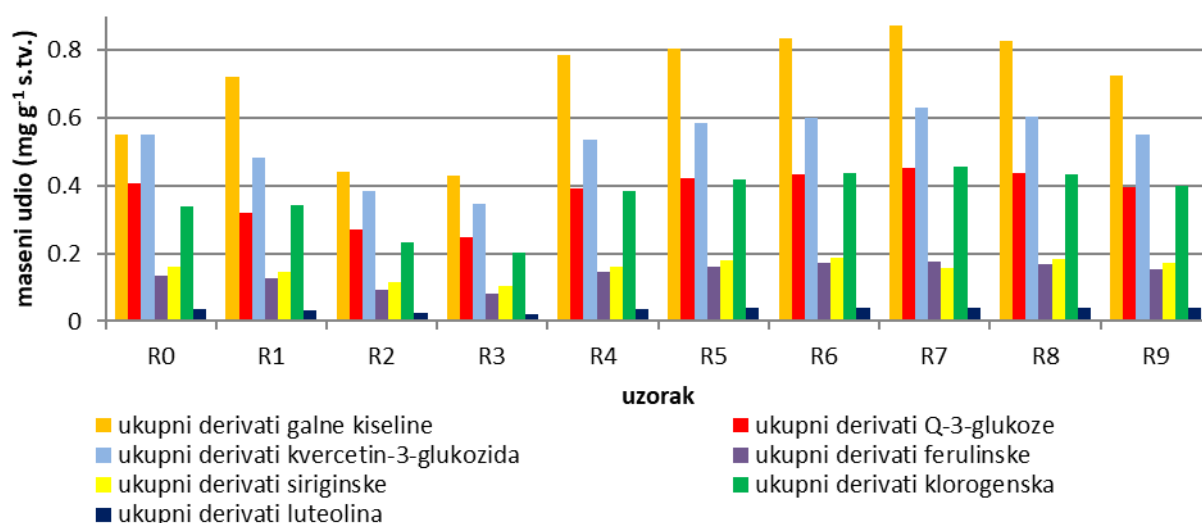
Slika 18. Rezultati analize udjela ukupnih polifenola u uzorcima prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem u uzorcima rajčice, mrkve i batata 0 (netretirani uzorak); 1 (5 kV cm⁻¹, 5'); 2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); 3 (2 kV cm⁻¹, 1'); 4 (2 kV cm⁻¹, 3'); 5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); 6 (5 kV cm⁻¹, 1'); 7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); 8 (2 kV cm⁻¹, 5'); 9 (5 kV cm⁻¹, 3')

Iz dobivenih rezultata na slici 18 vidljivo je značajno povećanje udjela fenola u uzorcima nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Najviše vrijednosti zabilježene su prilikom ekstrakcije spojeva iz kore mrkve. Netretirani uzorak mrkve ima najnižu vrijednost udjela ukupnih fenola (1,1497 mg g⁻¹ s.tv.), a najvišu vrijednost udjela ukupnih fenola ima uzorak M9 (8,6272 mg g⁻¹ s.tv.). Kod pokožice rajčice te kore batata zabilježen je porast udjela ukupnih fenola u odnosu na netretirani uzorak, no povećanje nije toliko kao kod kore

mrkve. Kod pokožice rajčice za uzorak R3 (1,9551 mg g⁻¹ s.tv.) zabilježen je niži udio ukupnih fenola u odnosu na R0 (2,0423 mg g⁻¹ s.tv.). Kod kore batata vrijednosti udjela ukupnih fenola za tretirane uzorke kreću se između 3 i 4 mg g⁻¹ s.tv.

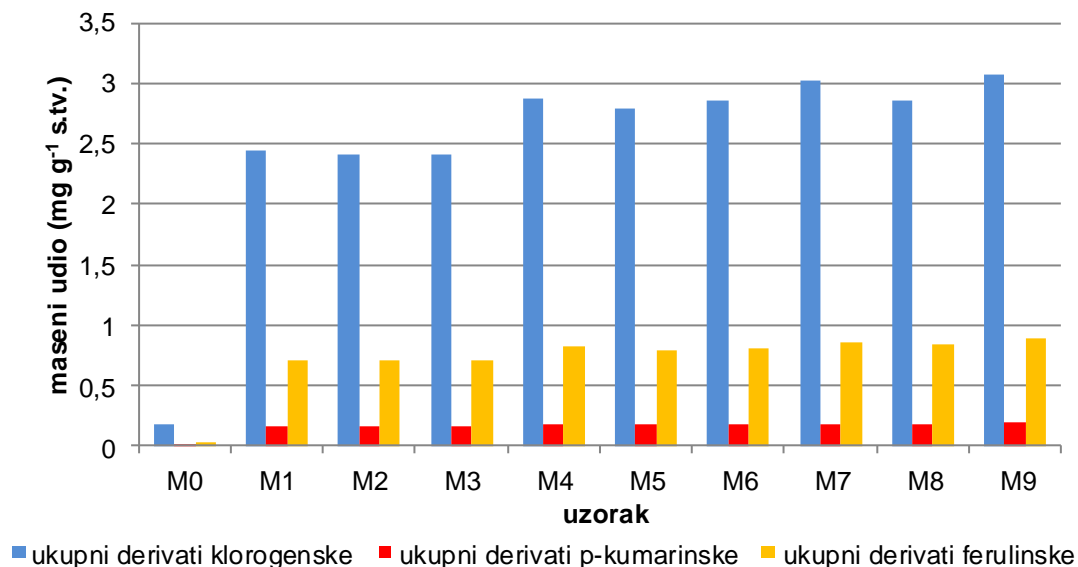
b) identifikacija i kvalitativna analiza udjela fenolnih spojeva nakon HPLC analize

Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem HPLC analizom određen je udio fenolnih kiselina u uzorcima pokožice rajčice (slika 19), kore mrkve (slika 20) te kore batata (slika 21).



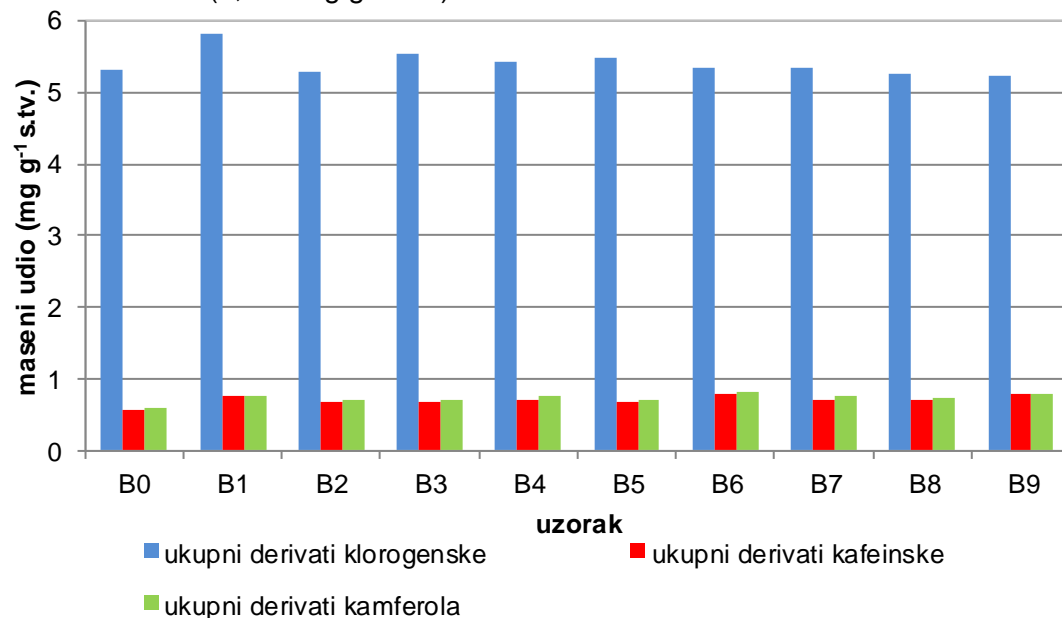
Slika 19. Rezultati analize fenolnih spojeva u uzorcima rajčice prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem R0 (netretirani uzorak); R1 (5 kV cm⁻¹, 5'); R2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); R3 (2 kV cm⁻¹, 1'); R4 (2 kV cm⁻¹, 3'); R5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); R6(5 kV cm⁻¹, 1'); R7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); R8 (2 kV cm⁻¹, 5'); R9 (5 kV cm⁻¹, 3')

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem u pokožici rajčice pronađene su brojne fenolne kiseline (slika 19). U netretiranom uzorku najviše ima galne kiseline i kvercetin-3-glukozida (0,549 mg g⁻¹ s.tv.) te Q-3-glukoze (0,405 mg g⁻¹ s.tv.), dok luteolina ima najmanje, svega 0,037 mg g⁻¹ s.tv.



Slika 20. Rezultati analize fenolnih spojeva u uzorcima mrkve prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem
 M0 (netretirani uzorak); M1 (5 kV cm⁻¹, 5'); M2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); M3 (2 kV cm⁻¹, 1'); M4 (2 kV cm⁻¹, 3'); M5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); M6 (5 kV cm⁻¹, 1'); M7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); M8 (2 kV cm⁻¹, 5'); M9 (5 kV cm⁻¹, 3')

U kori mrkve (slika 20) u netretiranom uzorku ima najviše klorogenske fenolne kiseline (0,185 mg g⁻¹ s.tv.), a najmanje ima p-kumarinske fenolne kiseline (0,009 mg g⁻¹ s.tv.). Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem u kori mrkve došlo je do porasta udjela klorogenske, p-kumarinske i ferulinske fenolne kiseline. Najznačajniji je porast ferulinske kiseline u uzorku M9 (0,884 mg g⁻¹ s.tv.).



Slika 21. Rezultati analize fenolnih spojeva u uzorcima batata prije i nakon tretmana
 B0 (netretirani uzorak); B1 (5 kV cm⁻¹, 5'); B2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); B3 (2 kV cm⁻¹, 1'); B4 (2 kV cm⁻¹, 3'); B5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); B6 (5 kV cm⁻¹, 1'); B7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); B8 (2 kV cm⁻¹, 5'); B9 (5 kV cm⁻¹, 3')

Udio klorogenske kiseline u netretiranom uzorku i tretiranim uzorcima kore batata približno je jednak i nije se značajno promijenio (slika 21). Primjerice, za netretirani uzorak B0 iznosi 5,326 mg g⁻¹ s.tv., dok za uzorak B6 iznosi 5,342 mg g⁻¹ s.tv. Udio kafeinske fenolne kiseline tretmanom pulsirajućim električnim poljem raste. Najniži udio kafeinske kiseline je za uzorak B0 (0,565 mg g⁻¹ s.tv.), a najviši za uzorak B6 (0,782 mg g⁻¹ s.tv.). Udio kamferola također je u porastu nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem, najviši je za uzorak B6 (0,809 mg g⁻¹ s.tv.). Uzorak B6 tretiran je pri naponu 5 kV cm⁻¹ u vremenu trajanja od 1 min. Neposredno nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem mrkve je imala smanjen udio ferulinske kiseline (56,3 %), protokatehinske kiseline (78,1 %) i p-kumarinske kiseline (42,3 %) u usporedbi s netretiranim uzorcima mrkve (Lopez-Gamez i sur., 2020).

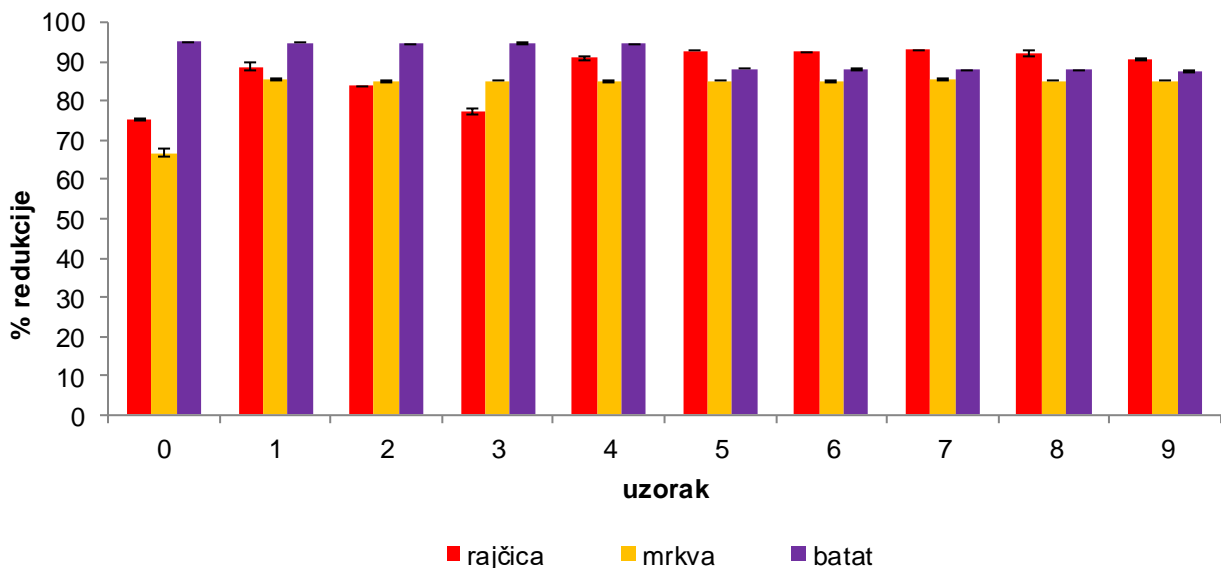
Na slici 18 prikazan je udio ukupnih fenolnih spojeva u pokožici rajčice, kori mrkve i kori batata prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem, dok je na slikama 19, 20 i 21 prikazan udio pojedinih fenolnih kiselina u navedenim uzorcima. Iz navedenog se može zaključiti da rezultati određeni spektrofotometrijski prate rezultate dobivene nakon HPLC analize. Najznačajniji je porast ukupnih fenola u kori mrkve, odnosno pojedinih fenolnih kiselina određenih HPLC analizom.

Glavne fenolne kiseline u pokožici rajčice su kafeinska, katehinska, galna, i vanilinska. (Elbadrawy i Sello, 2011).

U kori batata nalazi se veći udio fenolnih spojeva, nego u ekstraktima gomolja zato što su fenolni spojevi uglavnom koncentrirani u epidermalnom i subepidermalnom sloju biljaka zbog uloge zaštite protiv UV zračenja (Šeregelj i sur., 2020).

4.1.6. Određivanje sadržaja antioksidacijske aktivnosti

Na slici 22 prikazana je antioksidacijska aktivnost uzoraka pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata. Uočeno je kako je najviša vrijednost zabilježena kod netretiranog uzorka kore batata (B0), dok je najniža vrijednost zabilježena kod netretiranog uzorka kore mrkve (M0). Kod uzoraka pokožice rajčice te kore mrkve zabilježen je porast vrijednosti % redukcije. % redukcije za netretirani uzorak R0 iznosi 75,11 %, dok je za tretirani R9 uzorak % redukcije 90,48 %. Kod uzoraka kore batata zabilježen je pad % redukcije.



Slika 22. Rezultati analize antioksidacijske aktivnosti u uzorcima prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem u uzorcima rajčice, mrkve i batata 0 (netretirani uzorak); 1 (5 kV cm⁻¹, 5'); 2 (7,5 kV cm⁻¹, 3'); 3 (2 kV cm⁻¹, 1'); 4 (2 kV cm⁻¹, 3'); 5 (7,5 kV cm⁻¹, 5'); 6 (5 kV cm⁻¹, 1'); 7 (7,5 kV cm⁻¹, 1'); 8 (2 kV cm⁻¹, 5'); 9 (5 kV cm⁻¹, 3')

Što je veća jakost polja, veća je antioksidacijska moć uzoraka pokožice rajčice (Pataro i sur., 2018). Uzorak rajčice (R7) koji je tretiran s najvišom vrijednost jakosti polja (7,5 kV cm⁻¹) ima najveću antioksidacijsku moć (93,10 %). Najviše antioksidacijsko djelovanje pronađeno je u pokožici rajčice (Salni i sur., 2019). Elbadrawy i Sello (2011) također su dobili visoke vrijednosti postotka redukcije. Nakon provedene reakcije s DPPH dobili su vrijednosti za uzorke pokožice rajčice od 97,23 %, 97,07 % te 86,30 % za netretirane uzorke.

Nakon reakcije s DPPH dolazi do promjene boje što ukazuje na potencijal čišćenja ekstrakta antioksidansa zbog sposobnosti doniranja vodika. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala povezana je sa reakcijom supstitucije hidroksilnih skupina u aromatskim prstenima fenola. (Elbydrawy i Sello, 2011).

Tablica 5. Analiza varijance parametara pulsirajućeg električnog polja (A: jakost električnog polja, B: vrijeme) na ekstrakciju bioaktivnih komponenti

Uzorak		A		B		AA		BB		AB	
		f	p	f	p	f	p	f	p	f	p
rajčica	likopen ¹	0,35	0,5937	0,23	0,6671	0,57	0,5066	0,00	0,9767	2,04	0,2481
	β-karoten ¹	0,83	0,4293	1,40	0,3214	0,01	0,9357	0,93	0,4050	0,16	0,7141
	ukupni fenoli ²	3,75	0,1483	0,05	0,8422	0,50	0,5291	0,05	0,8417	3,10	0,1767
	antioksidacijska aktivnost	0,35	0,594	0,46	0,5433	0,23	0,6623	0,04	0,8491	1,40	0,3223
mrkva	β-karoten ¹	0,01	0,9427	3,61	0,1537	36,48	0,0091	3,42	0,1671	59,25	0,0046
	ukupni fenoli ²	0,00	0,9921	2,83	0,1912	2,81	0,1922	0,014	0,7330	0,01	0,9161
	antioksidacijska aktivnost	0,76	0,4465	0,05	0,8449	0,00	0,9910	1,34	0,3312	0,06	0,8294
batat	β-karoten ¹	0,77	0,4449	16,76	0,0264	13,05	0,0364	11,4	0,0432	8,91	0,0584
	ukupni fenoli ²	0,97	0,3983	1,19	0,3556	3,65	0,1520	1,02	0,3878	0,05	0,8325
	antioksidacijska aktivnost	0,05	0,8401	0,00	0,9674	0,01	0,9445	0,09	0,7793	0,38	0,5814

¹ HPLC analiza; ² UV/VIS
statistička značajnost p<0,05

Tablica 6. Statistički parametri regresije i analize fizikalno-kemijskih parametara uzoraka

Uzorak		R-kvadratna vrijednost (%)	Standardna pogreška
rajčica	likopen	51,5430	0,2895
	beta-karoten	52,6704	0,2719
	ukupni fenoli	71,2656	0,1907
	antioksidacijska aktivnost	45,3744	6,3231
mrkva	beta-karoten	97,1634	0,0314
	ukupni fenoli	65,8781	0,6861
	antioksidacijska aktivnost	42,3297	0,1916
batat	beta-karoten	94,4328	0,0209
	ukupni fenoli	69,6142	0,2364
	antioksidacijska aktivnost	15,0024	5,6078

Tablica 5 je primjer analize varijance s dva promjenjiva faktora (vrijeme i jakost električnog polja). P-vrijednost je manja od 0,05 za vrijeme tretiranja za ekstrakciju β -karotena iz kore batata, za kvadrat jakosti električnog polja za ekstrakciju β -karotena iz kore mrkve i batata, za kvadrat vremena za ekstrakciju β -karotena iz kore batata te za umnožak vremena i jakosti električnog polja za ekstrakciju β -karotena iz kore mrkve.

Tablica 6 Prikazuje R-kvadratnu vrijednost te standardnu pogrešku za uzorke pokožice rajčice, kore mrkve i kore batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. R-kvadratna vrijednost objašnjava 97,1634 % varijabilnosti u prinosu ukupnog β -karotena iz kore mrkve te 94,4328 % varijabilnosti u prinosu ukupnog β -karotena iz kore batata.

Casado i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su pratili promjene karotenoida u pokožici rajčice nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Maksimalna koncentracija likopena postignuta je kada su rajčice bile podvrgnute najintenzivnijem tretmanu pulsirajućeg električnog polja. Tretman je proveden pri jakosti električnog polja od 2 kV cm^{-1} te s 30 pulseva, a udio likopena iznosi $0,607 \text{ mg g}^{-1} \text{ s}$. tv. Povećanje sadržaja likopena povezano je s poboljšanjem ekstrakcije unutarstaničnih komponenti kao rezultat elektroporacije (Casado i sur., 2018). Međutim, tretmani pulsirajućim električnim poljem povezani su sa selektivnim oštećenjem staničnih membrana što može dovesti do reverzibilnog ili ireverzibilnog stvaranja pora pa se ovisno o intenzitetu tretmana udio likopena povećava i smanjuje. Tretmani koji

koriste jakost električnog polja $0,4-2 \text{ kV cm}^{-1}$ su doveli do povećanja sadržaja likopena (Casado i sur., 2018). Pokožica rajčice koja je tretirana pri višim vrijednostima jakosti polja ima niži udio likopena u sastavu (tablica 4), a da bi se udio likopena povećavao potrebno je koristiti niže vrijednosti jakosti električnog polja. Karotenoidi imaju koristan učinak na zdravlje zbog svog antioksidacijskog kapaciteta, odnosno mogu brzo zaštititi biomolekule od oksidacije. Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem povećana je antioksidacijske aktivnost (Luengo i sur., 2014.)

Promjene ukupnog sadržaja polifenola u pokožici rajčice pripisuju se promjenama u nekim pojedinačnim spojevima te je u korelaciji sa udjelom ferulinske ili klorogenske kiseline. Uzorak rajčice koji je tretiran pri $1,2 \text{ kV cm}^{-1}$ sadrži visok udio ukupnih polifenola te karotenoida, dok rajčica koja je tretirana pri 2 kV cm^{-1} sadrži niži udio ukupnih polifenola. Koncentracija ferulinske kiseline više su u tretiranim uzorcima, nego u netretiranim uzorcima (Queralt i sur., 2013). Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo je do porasta sadržaja ukupnih polifenola te ferulinske ili klorogenske kiseline (Vallverdu i sur., 2013).

Nakon HPLC analize u pokožici rajčice, kori mrkve i kori batata pronađene su visoke koncentracije klorogenske kiseline. Sadržaj klorogenske kiseline u netretiranoj pokožici rajčice iznosio je $0,335 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv., dok se nakon primjene tretmana pulsirajućeg električnog polja s naponom od $0,4 \text{ kV cm}^{-1}$ udio klorogenske kiseline povećao na $0,843 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. (Vallverdu i sur., 2013). Klorogenska kiselina jedna je od najrasprostranjenijih polifenolnih kiselina jer se nalazi u različitim namirnicama te ima antioksidativna svojstva (Naveed i sur., 2018). Klorogenska kiselina ima nekoliko zdravstvenih prednosti kao sredstvo protiv hipertenzije. Provedena su brojna istraživanja koja potvrđuju da konzumiranje namirnica koje sadrže klorogensku kiselinu utječe na smanjenje krvnog tlaka bez štetnih učinaka (Naveed i sur., 2018).

p-kumarinska kiselina jedna je od najvažnijih fenolnih kiselina koja ima antimikrobno i antikancerogeno djelovanje te je jedna od najznačajnijih protuupalnih sastojaka hrane (Boz, 2015). p-kumarinska kiselina štiti od pojave srčanih bolesti jer smanjuje lipidnu peroksidaciju te oksidaciju kolesterola, a antimikrobni učinak p-kumarinske kiseline povećava se sa smanjenjem pH vrijednosti (Boz, 2015).

Primjena pulsirajućeg električnog polja izazvala je porast p-kumarinske te ferulinske kiseline u kori mrkve. Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem udio p-kumarinske kiseline se povećao s $0,043 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. na $0,094 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. (Lopez-Gamez i sur., 2021). Promjene u udjelu fenola nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem teško je objasniti zbog heterogenosti i složenosti kemijskih spojeva. Međutim, udjeli spojeva veće molekulske mase kao što je kafeinska kiselina nisu se promijenili nakon tretmana, dok se udio p-

kumarinske kiseline nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem povećao. Na navedene rezultate su utjecale mikrostrukturne modifikacije koje su dovele do otpuštanja bioaktivnih spojeva iz matriksa tkiva, ali potrebna su daljnja istraživanja za razumijevanje i istraživanje promjena izazvanih pulsirajućim električnim poljem (Lopez-Gamez i sur., 2021).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata na izolaciju bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda povrća primjenom predtretmana pulsirajućeg električnog polja može se zaključiti sljedeće:

1. Uzorak R5 osim što ima najvišu električnu provodljivost ($747 \mu\text{S cm}^{-1}$) ima najviši udio ukupnih fenolnih spojeva ($2,437 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), uzorak M9 kojem je električna provodljivost $971 \mu\text{S cm}^{-1}$ također ima najviši udio fenolnih spojeva ($8,627 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), a uzorak B2 s električnom provodljivošću $1516 \mu\text{S cm}^{-1}$ sadrži $3,629 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. ukupnih fenolnih spojeva.
2. Netretirani uzorak pokožice rajčice (R0) koji ima najvišu vrijednost parametra a^* ($27,74$) te parametra b^* ($137,43$) ima najveći udio likopena ($0,135 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), bliže je crvenoj boji. Netretirani uzorak mrkve (M0) sadrži najniži udio β -karotena ($0,152 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) te su mu vrijednosti parametra a^* ($9,07$) i b^* ($136,98$) najviše. Uzorak kore batata (B2) ima najniži udio β -karotena ($0,155 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) te najnižu vrijednost parametra a^* ($-8,77$). Uzorak s najvišom vrijednosti parametra b^* (M7) sadrži najviši udio β -karotena ($0,208 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv., odnosno bliže je zelenoj boji).
3. Netretirani uzorak mrkve (M0) sadrži najnižu vrijednost udjela ukupnih fenola ($1,1497 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), dok uzorak M9 sadrži najviši udio ukupnih fenola ($8,6272 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) od čega $0,884 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. ukupnog derivata ferulinske kiseline. Najviši udio ukupnih fenolnih kiselina zabilježen je za uzorak B1 ($4,613 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), a uzorak B1 također sadrži najviši udio ukupnog derivata klorogenske kiseline ($5,816 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.). Kod pokožice rajčice za uzorak R3 ($1,9551 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) zabilježen je niži udio ukupnih fenola u odnosu na R0 ($2,0423 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) U netretiranom uzorku pokožice rajčice (R0) najviše ima galne kiseline i kvercetin-3-glukozida ($0,549 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.).

6. LITERATURA

Alam, M., R., Lyng, J., G., Frontuto, D., Marra, F., Cinquanta, L. (2018). Effect of Pulsed Electric Field Pretreatment on Drying Kinetics, Color, and Texture of Parsnip and Carrot. *J Food Sci* **83 (8)**, 2159-2166.

Albanese, D., Adiletta, G., D'Acunto, M., Cinquantana, L., Di Matteo, M. (2014) Tomato peel drying and carotenoids stability of the extracts. *Intl J Food Sci Tech* **49**, 2458-2463.

Anastacio, A., Silva, R., Carvalho, S., I. (2016) Prenolics extraction from sweet potato peels: modeling and optimization by response surface modelling and artificial neural network. *J Food Sci Tech* **53**, 4117-4125.

Arshad, R., N., Abdul-Malek, Z., Roobab, U., Munir, M., A., Naderipour, A., Qureshi, M., I., Bekhit, A., E., D., Liu, Z., W., Aadil, R., M. (2021) Pulsed electric field: A potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends Food Sci Tech* **111**, 43-54.

Bhatkar, S., N., Shivanand, S., S., Aurn, S., M., Bhaskar, N., T. (2021) Drying of tomatoes and tomato processing waste: a critical review of the quality aspects. *Drying Tech* **39 (2)**, 1-25.

Botelho, M.,F., Vorrea, C., P., Goneli, L., D., A., Martins, A., M., Magalhaes, F., E., A., Campos, C., S. (2011) Periods od constant and falling-rate for infrared drying of carrot slices. *Rev Bras Eng Agr Amb* **15**, 845-852.

Boz, H. (2015) p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *Intl J Food Sci Tech* **50(11)**, 2323–2328.

Casado, G., S., Belloso, M., O., Martinez, E., P., Fortuny, S., R. (2018) Application of pulsed electric fields to tomato fruit for enhancing the bioaccessibility of carotenoids in derived products. *Food Funct* **9**, 2282-2289.

Castro-Puyana, M., Marina M., L., Plaza, M. (2017) Water as Green Extraction Solvent: Principles and Reasons for its Use. *Curr Opin in Green Sustain Chem* **5**, 31-36.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol Biotechnol* **51(1)**, 84-91.

Elbadrawy, E., Sello, A. (2011) Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arab J Chem* **9**, S1010-S1018.

Frey, W., White, J., A., Price, R., O., Blackmore, P., F., Joshi, R., P., Nuccitelli, R., Beebe, S., J., Schoenbach, K., H., Kolb, J., F. (2006) Plasma Membrane Voltage Changes during Nanosecond Pulsed Electric Field Exposure. *Biophysical J* **90**, 3608-3615

Ganesan, K., Xu, B. (2017) A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients* **9**, 455-472.

Garner, L.A. (2019) Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Applied Microbiol Biotech* **103**, 7917-7929..

Gonzales-Casado, S., Belloso, O., M., Martinez, P., E., Fortuny, R., S. (2018) Enhancing the carotenoid content of tomato fruit with pulsed electric field treatments: Effects on respiratory activity and quality attributes. *Postharvest Biology Tech*, **137**, 113-118.

Gul, K., Tak, A., Singh, A., K., Singh, P., Yousuf, B., Wani, A., A. (2015) Chemistry, encapsulation and health benefits of β -carotene- A review. *Cogent Food Agric* **1**:1018696

Jabbar, S., Abid, M., Wu, T., Hashin, M., M., Saeeduddin, M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2014) Ultrasound- assisted extraction of bioactive compounds and antioxidants from carrot pomace: a response surface approach. *J Food Proc Preserv* **39 (6)**, 1878-1888.

Jaeger, H., Meneses, N., Moritz, J., Knorr, D. (2010) Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. *J Food Engineering* **100**, 109-118.

Karnjanawipagul, P., Nittayanuntawech, W., Rojsanga, P., Suntornsuk, L. (2010) Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry. *Mahidol Univ J Pharm Sci* **37**, 8-16.

Kedare, S., B., Singh, R., P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412-422.

Khairul, Alam, M. (2021) A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): Revisiting the associated health benefits. *Trends Food Sci Tech* **115**, 512-529.

Kurata, R., Sun, H., N., Oki, T., Okuno, S., Ishiguro, K., Sugawara, T. (2019) Sweet potato polyphenols. *Sweet potato*, 177-222.

López-Gámez, G., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2020). Pulsed electric fields affect endogenous enzyme activities, respiration and biosynthesis of phenolic compounds in carrots. *Postharvest Biology Tech* **168**, 111284.

López-Gámez, G., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2021) Pulsed electric field treatment strategies to increase bioaccessibility of phenolic and carotenoid compounds in oil-added carrot purees. *Food chem* **364**, 130377.

Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, 1. izd., Hinus, Zagreb, str. 179-183.

Luengo, E., Alvarez, I., Raso, J. (2014) Improving carotenoid extraction from tomato waste by pulsed electric fields. *Front Nutr* **1**, 14.

Luterotti, S., Marković, K., Franko, M., Bičanić, D., Madžgalj, A., Kljak, K. (2013) Comparisom of spectrophotometric and HPLC methods for food determination of carotenoids in foods. *Food Chem* **140**, 390-397.

Martinez, J., M., Cebrian, G., Alvarez, I., Raso, J. (2016) Release of Mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* Autolysis Induced by Pulsed Electric Field. *Front Microbiol* **7**:1435.

Martínez, J., M., Delso, C., Álvarez, I., Raso, J. (2020). Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 530-552.

Mihoci, M. (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Osvrti, Kem Ind* **64**, 11-12.
<https://hrcak.srce.hr/file/218636>

Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A., A., Khan, G., J., Shumzaid, M., Ahman, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Ghzani, M., F., Hua, W., L., XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **97**, 67–74.

Ou, Q.X., Nikolic-Jaric, M., Gänzle, M., (2016) Mechanisms of inactivation of *Candida humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Bioelectrochem* **115**, 47-55.

Panthee, D., R., Perkins-Veazie, P., Randall, D., Brown, A., F. (2013) Lycopene Estimation in Tomato Lins Using Infrared Absorbance and Tomato Analyzer. *Int J Veg Sci* **19:3**, 240-255.

Pataro, G., Carullo, D., Siddique, A., D., Falcone, M., Donsi, F., Ferrari, G. (2018) Improved extractability of carotenoids from tomato peels as side benefits of PEF treatment of tomato fruit for more energy-efficient steam-assisted peeling. *J Food Engineering* **223**, 65-73.

Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, FJ., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.,P., Luitt, S. (2019) Tomato Fruit Development and Metabolism. *Front Plant Sci* 10:1554.

Ranjha, M., M., A., N., Kanwal, R., Shafique, B., Arshad, R., N., Irfan, S., Kieliszek, M., Kowalczewski, P., L., Irfan, M., Khalid, M., Z., Roobab, U., Aadil, R., M. (2021) A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *Molecules* **26**, 4893.

Saini, R., K., Bekhit, A., El-Din A., Roohinejad, S., Rengasamy, K., R., Keum, Y., S. (2019). Chemical stability of lycopene in processed products: A review of the effects of processing methods and modern preservation. *J Agr Food Chem* **68**, 712-726.

Sarlego, Toledo, Y., Carnero, Macias, R., Zumalacárregui, Cárdenas, B., Cruz, Viera, L. (2022) Tomoato skin drying: Mathematical modeling and effect on lycopene content extracted with Moringa olifera oil. *Afinidad* **79**, 596.

Seratlić, S., Bugarski, B., Radulović, Z., Dejmek, P., Wadsö, L., Nedović, V. (2013) Electroporation Enhances the Metabolic Activity of *Lactobacillus plantarum* 564. *Food Technol Biotechnol* **51 (4)**, 446-452.

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

Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834.

Syed, A.Q., Ishaq, A., Rahman, U.U., Aslam, S., Shukat, R. (2017) Pulsed electric field technology in food preservation: A review. *J Nutri Health Food Eng* **6**, 168-172.

Šeregelj, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas-Šaponjac, V., Vulić, J., Stajčić, S. (2020) Encapsulation and degradation kinetics of bioactive compounds from sweet potato peel during storage. *Food Tech Biotech* **58**, 314-324.

Šeregelj, V., Vulić, J., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas-Šaponjac, V., Stajčić, S. (2020) Natural bioactive compounds in carrot waste for food applications and health benefits. *Stud Natural Products Chem* **67**, 307-344.

Vaessen, E., M., J., Kemme, H., A., Timmermans, R., A., H., Schutyser, M., A., I., den Besten, H., M., W. (2020) Temperature and presence of ethanol affect accumulation of intracellular trehalose *Lactobacillus plantarum* WCFS1 upon pulsed electric field treatment. *Bioelectrochem* **137**, 107680..

Vallverdú Q., A., Oms, O., G., Odriozola, S., I., Lamuela R., R. M., Martín, B., O., Elez, M., P. (2013). Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments. *Food Chem* **136(1)**, 199–205.

Wiktor, A., Nowacka, M., Dadan, M., Rybak, K., Lojkowski, W., Chudoba, T., Witrowa-Rajchert, D. (2015) The effect of pulsed electric field on drying kinetics, color, and microstructure of carrot. *Drying Tech* **34(11)**, 1286-1296.

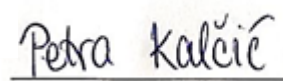
Yan, L., G., He, L., Xi, J. (2015) High Intensity Pulsed Electric Field as an Innovative Technique for Extraction of Bioactive Compounds - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57(13)**, 2877-2888.

Young, J., A., Lowe, L., G. (2018) Carotenoids- Antioxidant Properties. *Antioxidants* **2018**, 7,28.

Zhang, Z., Liu, Z., Liu C., Li, D., Jiang, N., Liu, C. (2016) Effects of Ultrasound Pretreatment on Drying Kinetics and Quality Parameters of Button Mushroom Slcies. *Drying Tech* **34**, 1-4.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in black ink that reads "Petra Kalčić". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Vlastoručni potpis