

Izolacija karotenoida iz biootpada kore sušene rajčice uporabom različitih otapala

Popović, Romana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:509386>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Romana Popović

803/ N

**IZOLACIJA KAROTENOIDA IZ
BIOOTPADA KORE SUŠENE
RAJČICE UPORABOM
RAZLIČITIH OTAPALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Senke Djaković, Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć mag. prim. kem. Mateje Toma.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv.prof. dr.sc. Senki Djaković što me uputila i usmjeravala kroz ovaj proces, što je znala cijeliti moje sposobnosti te iz toga izvukla ono najbolje. Bez njene dostupnosti, predanosti i podrške do zadnjih trenutaka kad mi je najviše trebalo, ne bi bilo moguće dovršiti ovaj rad.

Zahvaljujem mag. Mateji Toma na trudu da mi na jednostavan način sve približi i objasni, na pristupačnosti i na svim dobivenim savjetima. Hvala doc dr. sc. Jasmini Lapić na brigi oko napredovanja mog rada i ophođenju prema meni kao prema svom studentu te ostalim djelatnicima Laboratorija na susretljivosti.

Naravno, bez svoje obitelji ne bih ni stigla dokle jesam. Najveća zahvala od srca ide mojim roditeljima, mojima Maji i Renku što su mi u životu sve pružili, i više nego što je trebalo. Zahvalna sam što su me naučili ustrajnosti i što su me bezuvjetno podupirali od početka do kraja studiranja. Veliko hvala ide mojim mlađim sestrama Ivani i Karli koje su bile uz mene konstantno me podsjećajući da su mi najveća motivacija za dostizanje ciljeva.

Hvala prijateljici i kolegici Ani koja je prošla sa mnom sve faze izrade rada. Hvala svim bližnjima, prijateljima i kolegama za primljene poruke podrške bez obzira na udaljenost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

IZOLACIJA KAROTENOIDA IZ BIOOTPADA KORE SUŠENE RAJČICE UPORABOM RAZLIČITIH OTAPALA

Romana Popović, 803/N

Sažetak:

Biootpad rajčice predstavlja bogat izvor nutrijenata i fitokemikalija, između ostalog i karotenoidnih pigmenata, stoga se može iskoristiti za recikliranje u svrhu dobivanja biološki aktivnih spojeva. Ovim radom ispitana je i uspoređena učinkovitost izolacije karotenoida iz biootpada kore sušene rajčice primjenom dviju različitih metoda ekstrakcija, grijanjem u povrat ili refluksiranjem i ekstrakcijom po Soxhlet-u, uz korištenje niza otapala/ smjesa otapala različite polarnosti. Refluksiranjem su dobivene veće mase ekstrakata, kao i uporabom polarnijih otapala što upućuje na to da su temperatura i polarnost otapala važni parametri ekstrakcije. Dobiveni ekstrakti su pročišćeni preparativnom tankoslojnom i kolonskom kromatografijom te karakterizirani IR-spektroskopijom čime je potvrđena prisutnost karotenoida.

Ključne riječi: biootpad, rajčica, izolacija, karotenoidi, IR-spektroskopija

Rad sadrži: 44 stranice, 16 slika, 11 tablica, 48 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *izv.prof.dr.sc. Senka Djaković*

Pomoć pri izradi: *mag.prim.kem. Mateja Toma*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Antonela Ninčević Grassino*
2. Izv.prof.dr.sc. *Senka Djaković*
3. Doc.dr.sc. *Jasmina Lapić*
4. Prof.dr.sc *Irena Landeka Jurčević (zamjena)*

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

ISOLATION OF CAROTENOID FROM DRIED TOMATO PEEL WASTE BY USING DIFFERENT SOLVENTS

Romana Popović, 803/N

Abstract:

Tomato waste is considered as a rich nutrient source containing phytochemicals, among which are carotenoids pigments, therefore it can be recycled for the uses of biologically active compounds. This thesis carried out and compared carotenoid isolation efficiency from dried tomato peel waste by applying two different extraction methods, classical extraction or refluxing and Soxhlet extraction, using a series of solvents of different polarity. Larger amounts of extracts were obtained by refluxing, as well as with more polar solvents indicating that temperature and solvent polarity are important extraction parameters. The extracts were purified by preparative thin layer and column chromatography, then characterized by IR-spectroscopy which confirmed the presence of carotenoids.

Keywords: biowaste, tomato, isolation, carotenoids, IR-spectroscopy

Thesis contains: 44 pages, 16 figures, 11 tables, 48 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Senka Djaković*, Associate professor

Technical support and assistance: *Mateja Toma, mag.appl.chem.*

Reviewers:

1. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
2. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor
3. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor
4. PhD. *Irena Landeka Jurčević*, Full professor (substitute)

Thesis defended:

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Biootpad rajčice	2
2.1.1	Nutritivni sastav	3
2.2	Karotenoidi	4
2.2.1	Kemijska struktura karotenoida	4
2.2.2	Karotenoidi u rajčici	5
2.2.3	Biološki učinci karotenoida	6
2.3	Upotreba karotenoida iz biootpada rajčice.....	7
2.4	Metode ekstrakcije karotenoida	9
2.4.1	Grijanje u povrat ili refluksiranje	12
2.4.2	Ekstrakcija po Soxhlet-u	13
2.5	Metoda karakterizacije ekstrakata	13
2.5.1	Infracrvena (IR) spektroskopija	13
3	EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1	Materijali	15
3.2	Metode	15
3.2.1	Ekstrakcija karotenoida	16
3.2.2	Pročišćavanje dobivenih ekstrakata karotenoida.....	21
4	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1	Uvod	29
4.2	Ekstrakcija karotenoida	29
4.2.1	Grijanje u povrat ili refluksiranje (metoda A).....	30
4.2.2	Ekstrakcija po Soxhlet-u (metoda B)	31
4.3	Pročišćavanje dobivenih ekstrakata karotenoida	33
4.3.1	Preparativna tankoslojna kromatografija	33
4.3.2	Kolonska kromatografija.....	35
4.4	IR-spektroskopija.....	35
4.4.1	Analiza IR-spektara	35
5	ZAKLJUČCI	39
6	LITERATURA	40

1 UVOD

Prehrambena industrija tijekom proizvodnog procesa stvara značajne količine otpada i nusprodukata gdje tehnologija voća i povrća zauzima veliki udio. Promatrajući podatke za rajčicu kao jednu od najraširenijih povrtnih kultura, proizvodnja svježe i procesirane rajčice konstanto pokazuje porast s ukupnom svjetskom godišnjom proizvodnjom preko 177 milijuna tona. Upravo povećana stopa industrijske prerade uz nedostatak prikladne infrastrukture i metoda upravljanja otpadom dovode do gubitaka koji uzrokuju trošak s ekonomske strane, problem s aspekta zaštite okoliša, ali i nutritivni gubitak (FAOSTAT, 2016).

U posljednje vrijeme se povećao interes za recikliranjem, odnosno ponovnim iskorištavanjem biootpada hrane izolacijom određenih komponenti i njihovom direktnom upotrebom u druge svrhe. Biootpad može predstavljati bogat izvor nutrijenata i biološki aktivnih spojeva, a u slučaju rajčice riječ je, između ostalog, o karotenoidnim spojevima. Među najzastupljenijima su likopen i β -karoten, pigmenti koji daju karakterističnu boju ploda, te je zbog fizikalno-kemijskih i antioksidativnih svojstava njihova primjena već široko rasprostranjena (Johnson i Mayer, 2016).

Ovim diplomskim radom ispitana je učinkovitost izolacije karotenoida iz biootpada kore sušene rajčice konvencionalnim metodama ekstrakcije organskim otapalima – grijanjem u povrat (refluks) i ekstrakcijom po Soxhlet-u. Cilj ovog rada je odrediti otapalo koje rezultira najvećom količinom izoliranih karotenoida te nakon kromatografskog pročišćavanja ekstrakata karakterizirati izdvojene frakcije IR- spektroskopijom.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 BIOOTPAD RAJČICE

Rajčica (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je jednogodišnja biljka s jestivim crvenim okruglim plodovima (Slika 1). Od davnina čini sastavni dio prehrane ljudi zbog svojih senzorskih i kulinarskih svojstava. Preradom svježe rajčice nastaju različiti proizvodi koji se konzumiraju diljem svijeta: sok, umaci, juhe, pire, ketchup, cijeli sušeni plodovi itd.



Slika 1. Plodovi rajčice

Neiskorišteni dijelovi rajčice preostali nakon procesiranja, tzv. industrijski biootpad, sastoji se od kore, sjemenki i male količine pulpe, sačinjavajući sveukupno 1,5 – 5 % početne mase rajčice (Del Valle i sur., 2006). Pulpa rajčice je glavna sirovina za dobivanje proizvoda od rajčice jer se iz nje izdvaja sok za proizvodnju koncentrata rajčice koji dalje služi kao baza za ostale proizvode. Mala količina ostataka pulpe nakon procesiranja znači da su uvjeti proizvodnje bili pogodni za uspješnu ekstrakciju soka, što znači i manje otpada. Količina ukupnog biootpada rajčice varira, a udjeli kore, sjemenki i pulpe ovise o karakteristikama sirovog materijala i uvjetima prerade. Premda biootpad nema komercijalnu vrijednost, potencijal proizlazi iz bogatog sadržaja nutritivnih tvari (Sagar i sur., 2017).

2.1.1 Nutritivni sastav

Svježa i prerađena rajčica imaju visoku nutritivnu vrijednost zbog sadržaja vitamina, minerala i fitokemikalija, od kojih se ističu fenolni i karotenoidni spojevi (Savatović i sur., 2011).

Nedavno je ispitan nutritivni i antioksidativni sastav suhog biootpada rajčice. Dobivene su sljedeće nutritivne vrijednosti izražene u g kg⁻¹ biootpada (Nour i sur., 2018):

- proteini: 176,2 g kg⁻¹
- masti: 21,9 g kg⁻¹
- prehrambena vlakna: 524,4 g kg⁻¹
- mineralne tvari (pepeo): 42,1 g kg⁻¹.

Detaljnijom analizom u istom radu utvrđeno je da, od ukupne količine proteina, esencijalne aminokiseline iznose 34,2 %, od čega je najveći udio leucina te lizina i izoleucina. Nezasićenih masnih kiselina ima 77,04 % od ukupnih masnih kiselina, s linolenskom kao najzastupljenijom. Također je potvrđeno da osušeni biootpad rajčice sadržava znatne količine likopena (510,6 mg kg⁻¹) i β-karotena (95,6 mg kg⁻¹) te tako pruža dobra antioksidativna svojstva. Prosječni ukupni sadržaj fenola iznosi 1229,5 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) kg⁻¹ od kojih su flavonoidi zauzeli 415,3 mg ekvivalenta kvercetina (QE) kg⁻¹. Elagenska i klorogenska kiselina su dvije najzastupljenije fenolne kiseline dok su od flavonoida u najvećem udjelu prisutni rutin i miricetin (Nour i sur., 2018).

Što se tiče sadržaja nutrijenata unutar pojedinog dijela rajčice, u kori biootpada je prisutna većina proteina, prehrambenih vlakana te karotenoida, dok su masti i mineralne tvari prisutne u sjemenkama (Knoblich i sur., 2005.). Kora i sjemenke su se pokazale bogatijim izvorom polifenolnih spojeva od pulpe (Albanese i sur., 2014).

Silva i suradnici (2016) su također ispitali sastav biootpada rajčice od čega je bilo 61,5 % kore i 38,5 % sjemenki. Prosječna vlažnost je iznosila 66,58 ± 0,45 g na 100 g vlažne osnove što zahtijeva sušenje materijala kao pripremu za izolaciju kako bi se olakšala ekstrakcija određenih kemijskih spojeva te izbjegle moguće promjene ili razgradnja tijekom skladištenja. Prosječne približne vrijednosti nutrijenata izražene u gramima na 100 g biootpada (prehrambena vlakna: 50,74 ± 1,30, proteini: 20,91 ± 0,96, masti: 14,14 ± 1,22, mineralne tvari: 3,60 ± 0,05) su usporedive s onima koje su izmjerili Nour i suradnici (2018) te se može potkrijepiti činjenica da otpad rajčice definitivno ima potencijal kao izvor nutrijenata.

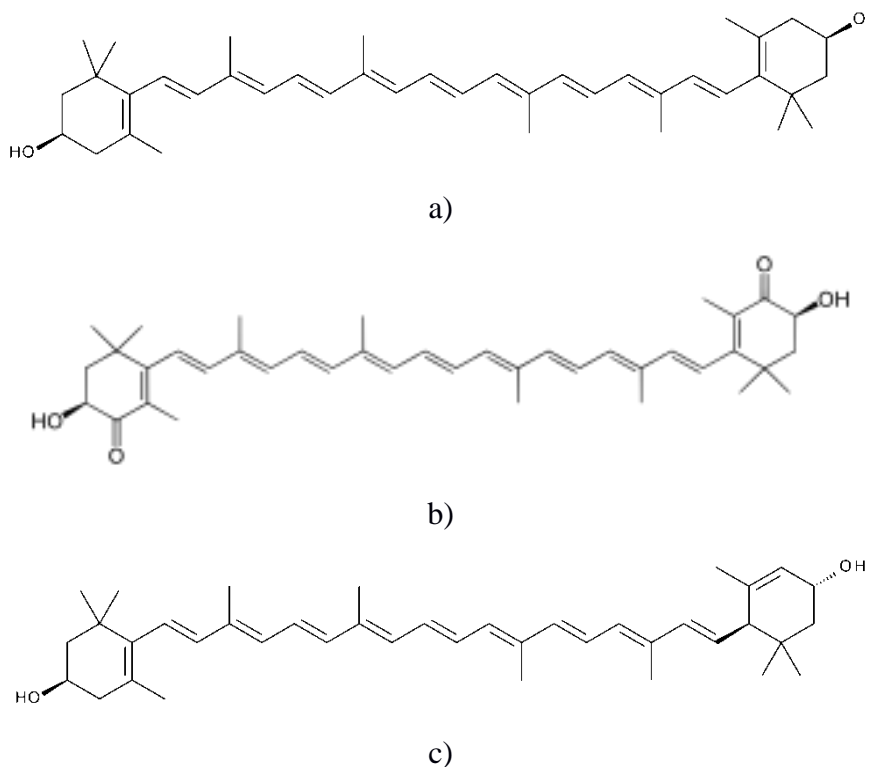
2.2 KAROTENOIDI

Karotenoidni spojevi, zvani još i tetraterpenoidi, su organski pigmenti topljivi u mastima koji se nalaze u biljkama, algama i fotosintetskim bakterijama. Daju karakterističnu boju voću i povrću, od svijetlo žute preko narančaste do jarko crvene, apsorbirajući valne duljine 400-550 nm UV/VIS spektra.

2.2.1 Kemijska struktura karotenoida

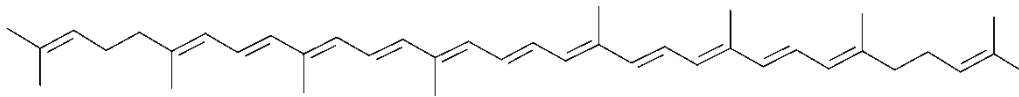
Postoji više od 750 poznatih karotenoida koji se, s obzirom na razlike u kemijskoj strukturi, mogu klasificirati u dvije grupe (Wang, 2014):

- ksantofili koji sadrže kisik kao dio funkcijske skupine, a glavni su predstavnici zeaksantin, astaksantin i lutein (Slika 2)

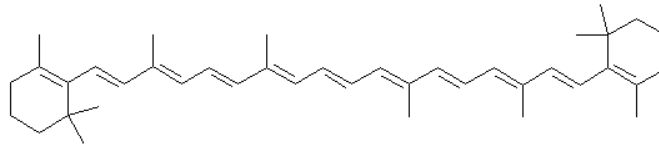


Slika 2. Kemijska struktura ksantofila: a) zeaksantin b) astaksantin, c) lutein

- karoteni koji sadrže samo ugljikovodični lanac bez funkcijske skupine, a glavni predstavnici su likopen i β -karoten (Slika 3).



a)



b)

Slika 3. Kemijska struktura karotena: a) likopen, b) β -karoten

Osnovna kemijska struktura karotenoida je bazirana na osam izoprenskih jedinica, odnosno to su tetraterpeni, s konjugiranim dvostrukim vezama u ugljikovodičnom lancu. S obzirom na to imaju li prsten(e) na krajevima lanca, mogu se dijeliti na acikličke, monocikličke i bicikličke karotenoide. Brojne su modifikacije koje dovode do postojanja karotenoida različite kemijske strukture (ugljikovodici, alkoholi, eteri, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, ...), no svima je zajednički polienski lanac kao centralni dio molekule što ih čini hidrofobnim spojevima. Njihova svojstva proizlaze iz kemijske strukture, što utječe i na kemijsku reaktivnost. Osjetljivi su na toplinu, svjetlo, prisutnost kisika, kisele i lužnate uvjete (Ishida i Bartley, 2009). U prirodi se nalaze u stabilnom *trans*-izomernom obliku, ali u prisutnosti osjetljivih čimbenika mogu lako izomerizirati. Zbog posjedovanja konjugiranih dvostrukih veza, imaju sposobnost prijenosa elektrona u molekuli. Delokalizacija elektrona utječe na to da lako stupaju u kemijske reakcije jer im je potrebna niska energetska vrijednost za pobuđivanje. To karotenoide svrstava u skupinu antioksidansa koji imaju zaštitnu funkciju u sprječavanju oksidacije.

2.2.2 Karotenoide u rajčici

Svježa rajčica sadrži velike količine karotenoida: oko 5,1 – 6,3 mg na 100 g mase svježe rajčice. Udio karotenoida je uvjetovan genotipom i uvjetima kultivacije, a sastav varira ovisno i o kojem dijelu biljke se radi (Regal i sur., 2014). Likopen je glavni karotenoid rajčice koji čini 80 - 90 % sadržaja ukupnih karotenoida i ujedno je pigment odgovoran za intenzivnu

crvenu boju ploda te se zrenjem ploda njegova koncentracija povećava. Drugi najzastupljeniji karotenoid je β -karoten. Osim navedena dva predstavnika karotena, prisutni su i drugi predstavnici skupine karotenoida: fitoeni (5,3 %), fitoflueni (2,8 %), α -karoten (3,7 %), lutein (2,0 %), a mogu se naći i male količine drugih ksantofila (~2 %) (Calvo i sur., 2007).

2.2.3 Biološki učinci karotenoida

Zaštitni učinak karotenoida proizlazi iz sposobnosti ponašanja kao antioksidansa – 'hvataju' slobodne radikale, sprječavaju inicijaciju lančane reakcije oksidacije i inhibiraju istu, te imaju važnu ulogu u zaštiti tkiva od fotooksidacije izazvane UV zračenjem. Likopen privlači pozornost svojim zdravstvenim dobrobitima budući da ima antioksidativni kapacitet dvostruko veći od β -karotena. Već je dokazano da likopen sprječava oksidaciju LDL-kolesterola (low-density lipoprotein), što znači da se povećanim prehranbenim unosom likopena može smanjiti rizik od razvoja kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti (Palozza i sur., 2012). Ispitivanjem djelovanja likopena u rajčici naspram čistog likopena, potvrđeno je da rajčica, osušena i samljevena u prah, koja sadrži istu količinu likopena kao i ekstrahirani čisti likopen, ima značajno veći preventivni utjecaj na lipidnu peroksidaciju od čistog likopena te se čini da postoji utjecaj i na smanjenje jetrenih triglicerida (Alshatwi i sur., 2010).

Osim antioksidativnog, karotenoidi imaju i antikancerogeno djelovanje. Likopen djeluje na sprječavanje rasta tumorskih stanica *in vivo* i *in vitro* te smanjuje rizik od raka prostate (Johnson i Mayer, 2016). I drugi karotenoidi djeluju preventivno na pojavu raka, ali nije zanemariva iznimna činjenica povećane incidencije raka pluća kod pušača koji su uzimali suplemente β -karotena (Goralczyk, 2009).

β -karoten djeluje kao antioksidans, ali ima i dodatnu funkciju koju dijeli sa α -karotenom i β -kriptoksantinom. Oni se ubrajaju u karotenoide s provitaminskom aktivnošću koji se nazivaju još i provitamini A jer služe kao prekursori za sintezu vitamina A (retinola). Retinol ili biološki aktivna forma retinoična kiselina utječe na održavanje funkcije vida, normalan rast i razvoj te modulaciju imunološkog odgovora. U funkciji vida ulogu još imaju lutein i zeaksantin, pigmenti smješteni unutar makule, centralnog dijela retine oka. Već duže vrijeme je poznata njihova uloga u sprječavanju makularne degeneracije te potencijalno i drugih bolesti oka poput katarakte, dijabetičke retinopatije ili retinopatije nedonoščadi (Eisenhauer,

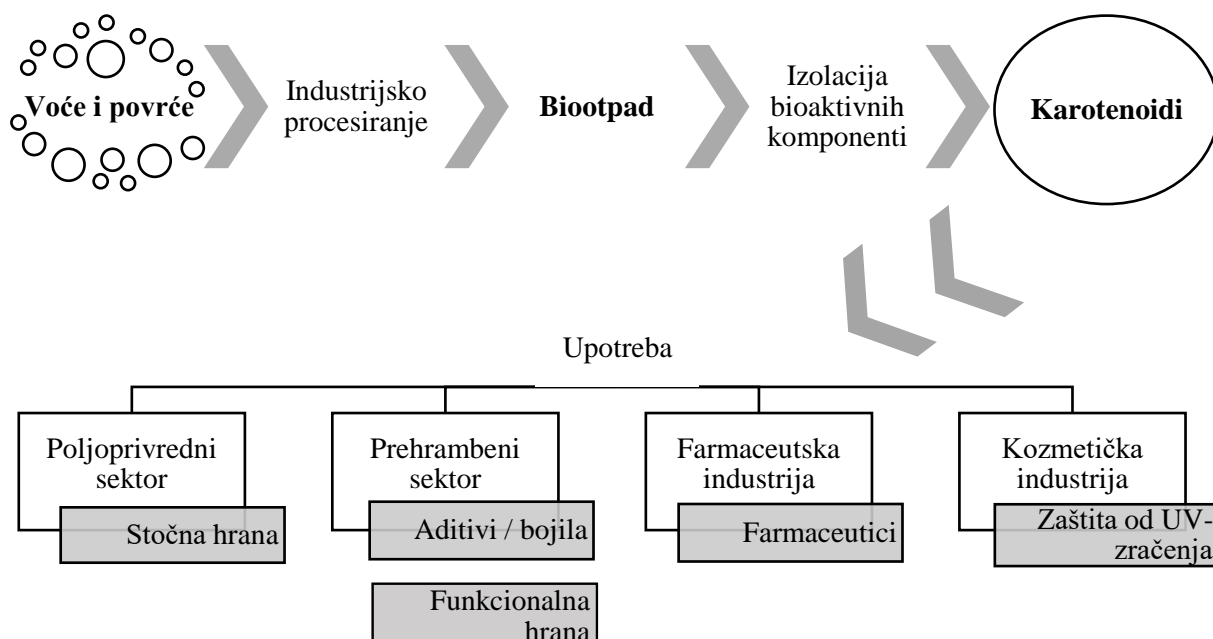
2017). Apsorbirajući plavo svjetlo i time smanjujući količinu svjetlosti niže valne duljine koja dopire do kritičnih dijelova oka, štite od oksidativnih oštećenja u vanjskim fotoreceptorima. No, prema najnovijim istraživanjima, astaksantin ima višestruko snažnije antioksidativno djelovanje od β -karotena i likopena te spada među najsnažnije prirodne antioksidanse. Pospješuje funkciju imunološkog sustava potičući proizvodnju T-stanica i otpuštanje citokina te može zaštititi molekulu DNA od oksidativnih oštećenja (Davinelli, 2018).

S ciljem poboljšanja zdravlja, postoji mogućnost uzimanja pojedinačnih karotenoida kao dodataka prehrani. Nedavno je provedeno eksperimentalno istraživanje kako bi se ispitalo utjecaj suplementacije suhe kore rajčice na zdravstvena stanja miševa kojima je prehrana bila bogata zasićenim masnim kiselinama i kolesterolom. Problemi koji se javljaju kod takve prehrane su aterogenska dislipidemija, steatoza i upala jetre, inzulinska rezistencija te intolerancija na glukozu. Suplementacija je rezultirala povećanom koncentracijom likopena u plazmi i smanjenjem razvoja pokazatelja metaboličkog sindroma, bez posebne ovisnosti o dozi, te je potvrđen i povoljan utjecaj na inzulinsku rezistenciju (Zidani i sur., 2017).

2.3 UPOTREBA KAROTENOIDA IZ BIOOTPADA RAJČICE

Karotenoidi se najviše koriste kao prehrambeni aditivi - bojila (Gowe, 2015) te kao sastavna komponenta funkcionalne hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Mogu se sintetizirati u kemijskom laboratoriju, ali isto tako putem recikliranja iz biootpada mogu biti iskorišteni za obogaćivanje i proizvodnju funkcionalne hrane kao i za dodavanje u stočnu hranu (Pinela i sur., 2017) (Slika 4).

Upotrebljivost biootpada rajčice se može povećati razvojem okolišno prihvatljivih tehnologija koje bi rezultirale novim sastojcima hrane ili novim proizvodima. Istražena je mogućnost upotrebe biootpada kod proizvodnje mikrobne biomase termofilnih i halofilnih sojeva, proizvodnje enzima i biopolimera te dobivanja antioksidativnih i antibakterijskih hidrolizata u fermentativnom sustavu (Di Donato, 2011). Tretiranjem kore rajčice s enzimima koji razgrađuju stijenku stanice za lakšu ekstrakciju, uspješno je provedeno dobivanje oleorezina i ulja obogaćenog likopenom (Zuorro i sur., 2014).



Slika 4. Shematski prikaz dobivanja karotenoida iz biootpada i njihova upotreba

Neki autori (Calvo i sur., 2008; Garcia i sur., 2009) su istraživali mogućnost ugrađivanja sušenog i samljevenog praha biootpada rajčice direktno u hranu ili prehrambene proizvode s ciljem razvoja nove hrane obogaćene bioaktivnim komponentama, tzv. funkcionalne hrane koja ima dokazan povoljan utjecaj na zdravlje. Pri tome najveći značaj ima antioksidativni učinak karotenoida, a drugi razlozi dodatka karotenoida u hranu su povezani s njihovim utjecajima na svojstva namirnica (primjerice, dobro poznato svojstvo žutog/ narančastog/ crvenog obojenja).

Nakon što su Calvo i sur. (2008) razvili suhe fermentirane kobasice obogaćene likopenom dodatkom suhe kore rajčice u mesnu mješavinu s ciljem obogaćivanja mesnih proizvoda antioksidansima, Garcia i sur. (2009) su istražili utjecaj direktnog dodavanja suhe kore rajčice u sirovo i kuhano juneće meso hamburgera. Dodatak od 4,5 % suhe kore je pokazao dobru prihvatljivost što se tiče senzorskih i fizikalno-kemijskih svojstava te zadržanu količinu likopena od 4,9 mg na 100 g kuhanog mesa.

Kao još jedan alternativni pristup funkcionalnoj hrani, provedeno je istraživanje o utjecajima dodatka osušenog biootpada rajčice na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva te svojstva pečenja pšeničnog kruha. Opaženo je povećanje vlažnosti i elastičnosti, a smanjenje

specifičnog volumena i poroznosti krušnih mrvica. Dodatak od 6 % biootpada u pšenično brašno je rezultirao kruhom dobrih senzorskih svojstava, dok je povećanjem udjela do 10 % kruh bio općenito manje prihvatljivosti (Nour i sur., 2015).

Kako bi se poboljšala zaštita od lipidne peroksidacije, predloženo je i obogaćivanje manje jestivih ulja karotenoidima direktnim dodavanjem kore rajčice. U tehnologiji ulja i masti za čuvanje proizvoda od lipidne peroksidacije u primjeni su sintetski antioksidansi, poput BHT (butilhidroksitoluen), BHA (butilhidroksianisol), TBHQ (tercbutilhidrokinon), no zbog mogućih zdravstvenih rizika teži se upotrebi prirodnih antioksidansa koji se mogu dobiti iz nusprodukata industrijske proizvodnje (Robles-Ramirez i sur. 2016). Uz prethodno potvrđenu antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta biootpada kore rajčice dodanog u suncokretovo ulje (Rizk i sur., 2014), istražena je i učinkovitost sprječavanja oksidacije ulja uljane repice (kanola ulje) (Robles-Ramirez i sur., 2016). Usporedba je izvedena između ulja s dodanim etanolnim ekstraktima biootpada rajčice u različitim koncentracijama te sintetskim BHT naspram rafiniranog ulja bez antioksidansa. Određivanjem oksidativne stabilnosti utvrdilo se da ekstrakt biootpada rajčice zbog prisutnosti karotenoida može biti korišten kao prirodni antioksidativni aditiv za zaštitu biljnih ulja i dobra zamjena sintetskom antioksidansu.

Biootpad bi mogao poslužiti u održivoj proizvodnji novih polisaharida s antioksidativnom aktivnošću i sa sposobnošću formiranja biofilmova (Tommonaro i sur., 2008). U usporedbi s jestivim biofilmovima koji sadrže komercijalni β -karoten, oni biofilmovi u koje je ugrađen biootpad kore rajčice su pokazali isti stupanj degradacije karotenoida od 32 % nakon jednomjesečnog skladištenja, što potvrđuje moguću upotrebu biootpada kao izvora prirodnih antioksidansa (Gomez-Estaca i sur., 2015).

2.4 METODE EKSTRAKCIJE KAROTENOIDA

Ekstrakcijski proces se odnosi na prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo; pritom se otapalo ne smije miješati s tom fazom, odnosno željena tvar treba u njemu biti topljivija nego u polaznoj fazi (Rapić, 2008).

Posljednjih godina istraživanja su se bavila temom ekstrakcije karotenoida upravo iz biootpada rajčice (Lucini i sur., 2012; Nikolova i sur., 2014). Općenito, izolacija spojeva iz

kompleksnog sastava hrane nije lagana jer brojne fizikalne i kemijske barijere prisutne u namirnici sprječavaju prijenos mase tijekom ekstrakcijskog procesa. Prisutnost različitih tipova karotenoidnih spojeva s različitom polarnosti u različitim dijelovima namirnice također otežava njihovu ekstrakciju. Uz to, potrebno je ograničiti izlaganje toplini, svjetlu, kiselinama te produljenom ekstrakcijskom vremenu zbog osjetljivosti karotenoida i njihove moguće razgradnje.

Iz navedenih razloga nema opće prihvaćene ili standardne metode za izolaciju karotenoida, no pokušavaju se razviti metode s ciljem olakšavanja iste. Metode za ekstrakciju karotenoida iz prirodnih izvora dijele se na pet glavnih kategorija (Saini i Keum, 2018):

1. ekstrakcija otapalom - po Soxhletu, maceracijom, potpomognuta mikrovalovima ili ultrazvukom
2. ubrzana ekstrakcija otapalom, poznata i kao ekstrakcija pod visokim tlakom
3. ekstrakcija uz pulsirajuće električno polje
4. ekstrakcija suprekritičnim fluidom (superkritični ugljikov dioksid)
5. ekstrakcija uz uporabu enzima.

Zbog hidrofobne prirode karotenoida, najčešće se koristi klasična metoda ekstrakcije organskim otapalima, a za biootpad rajčice korišteno je refluksiranje i ekstrakcija po Soxhletu (Stajčić i sur., 2014). Uglavnom se nepolarna otapala poput heksana, petrol-etera, tetrahidrofurana koriste za izolaciju nepolarnih karotena ili esterificiranih ksantofila, dok su polarna otapala poput acetona, etanola i etil-acetata prikladnija za izolaciju polarnih karotenoida. Nedostatci ove metode ekstrakcije su: potrošnja veće količine otapala visoke čistoće, vremenski dugo traje, a moguć je raspad spojeva osjetljivih na toplinu i svjetlo tijekom ekstrakcijskog procesa. Upravo zbog toga se pokušava optimizirati ekstrakcijske uvjete ovisno o materijalu iz kojeg se žele izolirati karotenoidi, a neki od tih uvjeta su: vrsta otapala, vrijeme trajanja, temperatura procesa, broj ponavljanih ekstrakcija, omjer uzorka i otapala, veličina čestica početnog materijala.

Odabir otapala uglavnom se smatra najvažnijim faktorom kod ekstrakcije, a učinkovitost ekstrakcije je ovisna o tipu otapala i njegovoj polarnosti (Strati i sur., 2014). Ono bi trebalo otopiti ciljane komponente u dovoljno velikim količinama, a istovremeno ne bi trebalo otopiti neželjene spojeve i nečistoće.

Budući da se izolirani spojevi većinom žele primijeniti u hrani, izabrano otapalo treba zadovoljiti sljedeće zahtjeve (Galanakis, 2015):

- jeftin, lako dostupan u prehrambenoj industriji
- ima GRAS status ('generally recognized as safe')
- pogodan za ponovnu upotrebu
- inhibira enzimsku aktivnost gdje je potrebno
- inhibira oksidaciju i čuva funkcionalna svojstva željenih spojeva.

Dosad je provedeno nekoliko istraživanja koristeći različita otapala i/ili smjese kako bi se ispitao udio karotenoida koji je moguće dobiti ekstrakcijom iz biootpada rajčice. Lucini i sur. (2012) dokazali su da je etil-acetat najpogodnije otapalo za izolaciju β -karotena, a diklormetan za ostale karotenoide. Etil-acetat i smjesa otapala cikloheksan/ etil-acetat su izabrani za ekstrakciju zbog manje toksičnosti od diklormetana. U njihovom su radu detektirane značajne koncentracije likopena do treće ponovljene ekstrakcije, dok su koncentracije β -karotena bile mjerljive do druge ponovljene ekstrakcije.

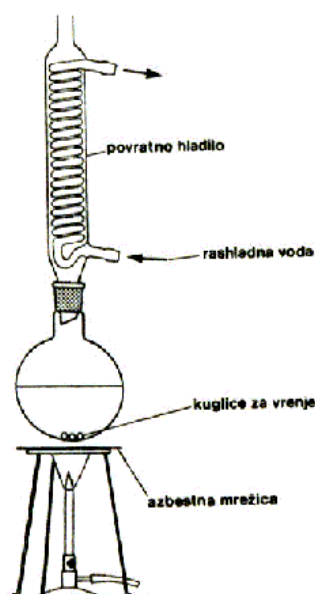
Slično tome, Strati i Oreopoulou (2011a) su svojim radom otkrili da smjesa otapala heksan/ etil-acetat u omjeru 45 : 55 daje najveći prinos karotenoida iz biootpada rajčice, a kombinacija heksana s etil-acetatom ili etanolom se pokazala boljom nego čista otapala individualno. Drugim njihovim istraživanjem (Strati i Oreopoulou, 2011b) najveći postotak izdvojenog likopena i β -karotena je dobiven korištenjem nepolarnog heksana i heksan/ etanol ekstrakta, dok je najveći postotak polarnog karotenoida luteina očekivano dobiven u etanolnom ekstraktu.

U radu Nikolove i sur. (2014) aceton se pokazao pogodnijim otapalom za ekstrakciju karotenoida iz sušene kore rajčice od čistog heksana i smjese heksan/ aceton/ etanol (50 : 25 : 25), vjerovatno zbog boljeg otapanja karotenoida i njihovog prijenosa iz biljnih stanica u otapalo. Isto tako, Robles-Ramirez i sur. (2016) mjerenjem ukupnog sadržaja karotenoida i ispitivanjem različitih otapala, aceton se pokazao najučinkovitijim za ekstrakciju karotenoida kojima je kasnije mjerena antioksidativna aktivnost. Istraživanjem ekstrakcijskih parametara, Ranveer i sur. (2013) su dobili najveću količinu likopena izvođenjem ekstrakcije sa smjesom tri različita otapala, heksan/ aceton/ etanol, no početni biootpad se sastojao od svih dijelova rajčice, ne samo kore. Ovisno o polarnosti karotenoida bira se i otapalo prikladne polarnosti.

Danas postoje nove opcije u izboru otapala od kojih se najviše izdvaja etil-laktat, a spominje se i D-limonen kao prirodnija alternativa (Fritsch i sur., 2017).

2.4.1 Grijanje u povrat ili refluksiranje

Refluksiranje ili grijanje u povrat je metoda kojom se provodi ekstrakcija krutina. Kuhanjem otapala u kojem se nalazi čvrsti uzorak, tražena komponenta se oslobađa i prelazi u otapalo zbog prodiranja otapala unutar čestica uzorka. Uzorak i otapalo se nalaze u tikvici s okruglim dnom na koju se postavi povratno vodeno hladilo (Slika 5).



Slika 5. Refluksiranje ili grijanje u povrat

Za jednolično vrenje pri refluksiranju, u okruglu tikvicu se prije početka zagrijavanja ubacuju kamenčići za vrenje. Mješavina se zagrije na temperaturu vrelišta otapala i refluksira određeno vrijeme, odnosno pare otapala izlaze iz tikvice do hladila, a kondenzat para lagano kapi natrag dolje u otapalo. Na kraju se topljiva tvar ekstrahira iz krutine bez prevelike potrošnje otapala. No, nužna je dekantacija ili filtracija nakon ekstrakcije (James, 1995).

2.4.2 Ekstrakcija po Soxhlet-u

Ekstrakcija po Soxhlet-u također podrazumijeva ekstrakciju otapalom, ali aparatura je malo naprednija od aparature za refluksiranje (Slika 6). Između povratnog vodenog hladila i tikvice s okruglim dnom koja sadrži otapalo nalazi se Soxhlet ekstraktor. On sadrži cilindar gdje se smjesti uzorak u krutom stanju koji se treba ekstrahirati. Otapalo se zagrije do točke vrenja te isparava. Para putuje kroz cijev ekstraktora, dolazi do hladila te kondenzat lagano kapa natrag u kruti uzorak. Otapalo ispuni cilindar gdje se nalazi uzorak dok se istovremeno topljive tvari ekstrahiraju u otapalu. Kad se cilindar skoro skroz napuni volumenom otapala, otapalo sa ekstraktom prolazi natrag u tikvicu kroz sifonsku cijev. Proces se ponavlja kroz cikluse i ekstrakt se akumulira u tikvici (James, 1995).



Slika 6. Ekstrakcija po Soxhlet-u

2.5 METODA KARAKTERIZACIJE EKSTRAKATA

2.5.1 Infracrvena (IR) spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija je instrumentalna metoda za detekciju, odnosno identifikaciju funkcijskih skupina prisutnih u molekuli. Zračenje u infracrvenom području odgovara energiji

koja izaziva molekulske vibracije. Uzorak izložen zračenju apsorbira svjetlo čija se frekvencija podudara s frekvencijom vibracije veze u molekuli. Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 4000 i 1200 cm^{-1} . Infracrveni spektar prikazuje karakteristične vrpce funkcionalnih skupina u točno unaprijed definiranim područjima valnih brojeva, prilikom čega je na apscisi uvijek valni broj (cm^{-1}), a na ordinati apsorbancija (%).

Područje frekvencije u IR-spektru ispod 1600 cm^{-1} sadrži velik broj vrpce. Uz malo karakterističnih rasteznih vibracija pojedinih veza, tu su i brojne vrpce koje odgovaraju deformacijskim vibracijama molekule te nekim složenim vibracijama. Taj dio spektra je karakterističan za određeni spoj, pa se naziva i područje "otiska prsta". Vrpce karakteristične za organske molekule javljaju se u području 3300 - 2800 cm^{-1} što se pripisuje rasteznim frekvencijama C–H veza. Vrpce koje se javljaju u području 3600 - 3200 cm^{-1} su karakteristične za hidroksilne skupine alkohola, a ukoliko je hidroksilna skupina dio karboksilne kiseline javlja se kao vrlo široka vrpca u području 3600 - 2500 cm^{-1} . Aromatski spojevi obično daju niz vrpce između 1600 i 1400 cm^{-1} , a vrpce u području 900 - 700 cm^{-1} se često primjenjuju za utvrđivanje načina supstitucije na aromatskom prstenu (Pine, 1994).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

S ciljem izolacije karotenoida inače prisutnih u svježoj rajčici, kao polazni materijal se koristio biootpad kore sušene rajčice. Za potrebe ovog diplomskog rada, uzorak je u samljevenom obliku nabavljen iz Laboratorija za analitičku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 7).



Slika 7. Korišteni biootpad kore sušene rajčice

Korištena otapala su destilirana prije upotrebe u ekstrakcijama: aceton (C_3H_6O), diklormetan (CH_2Cl_2), etanol (C_2H_6O), etil-acetat ($C_4H_8O_2$), heksan (C_6H_{14}), petrol-eter. Ostali kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja.

3.2 METODE

Uzorci su pročišćeni preparativnom tankoslojnom kromatografijom na pločama sa silikagelom („Merck“, Kieselgel 60 HF₂₅₄) te kolonskom kromatografijom, uporabom smjese otapala diklormetan/ metanol kao eluensa.

Za bolju detekciju razdvojenih komponenata korištena je UV- lampa pri valnoj duljini od 240 nm.

Snimljeni su IR-spektri razdvojenih frakcija kao otopine diklormetana, osim nekoliko krutih uzoraka koji su nanešeni na KBr pastile, na IR-spektrofotometru (Bomem MB 100 mid FT).

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, sl. = slaba, š. = široka vrpca.

3.2.1 Ekstrakcija karotenoida

Za izolaciju karotenoida korištene su metode ekstrakcije grijanje u povrat ili refluks (**Metoda A**) i ekstrakcije po Soxhlet-u (**Metoda B**). Nakon izolacije provedena je ekstrakcija tekuće-tekuće u lijevku za odjeljivanje i uparavanje ekstrakta radi mjerenja dobivene mase uzorka. Ekstrakcija je provedena uporabom šest otapala različite polarnosti: 1. diklormetan, 2. aceton, 3. etanol, 4. etil-acetat, 5. heksan i 6. petrol-eter, te dvije smjese otapala: 7. heksan/ aceton (1:1) i 8. heksan/ etil-acetat (1:1).

Svaka je metoda ponovljena dva puta s istim korištenim otapalom/ smjesom otapala i pri istim ekstrakcijskim uvjetima. Dobiveni uzorci su označeni prema korištenoj metodi slovima **A** ili **B**, prema korištenom otapalu brojevima **1-8** i prema tome radi li se o prvoj ili drugoj ekstrakciji brojevnim nastavcima **-1** ili **-2** (Tablica 1.).

Tablica 1. Oznake dobivenih uzoraka

Otapalo	Oznaka izoliranog uzorka			
	Metoda A		Metoda B	
	1. ekstrakcija	2. ekstrakcija	1. ekstrakcija	2. ekstrakcija
<i>Diklormetan</i>	A1-1	/	B1-1	/
<i>Aceton</i>	A2-1	A2-2	B2-1	B2-2
<i>Etanol</i>	A3-1	A3-2	B3-1	B3-2
<i>Etil-acetat</i>	A4-1	A4-2	B4-1	B4-2
<i>Heksan</i>	A5-1	A5-2	B5-1	B5-2
<i>Petrol-eter</i>	A6-1	A6-2	B6-1	B6-2
<i>Heksan/ aceton (1:1)</i>	A7-1	A7-2	B7-1	B7-2
<i>Heksan/ etil-acetat (1:1)</i>	A8-1	A8-2	B8-1	B8-2

Preliminarno se kao otapalo ispitao diklormetan **metodom A** i **metodom B**. Biootpad kore sušene rajčice mase 5 g s dodanih 75 mL diklormetana (biootpad : otapalo = 1 : 15) zagrijavao se 1 sat. Nakon ekstrakcije tekuće-tekuće i uparavanja dobivena je masa izoliranog uzorka refluksiranjem (**A1-1**), odnosno ekstrakcijom po Soxhlet-u (**B1-1**) i snimljen IR-spektar prvog ekstrakta (**A1-1**).

IR- spektar **A1-1**: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2920 (j., C–H), 2858 (sr., C=C), 1711 (sr., C=O), 1461, 1371 (sl., CH_2), 1023 (sl., C–O, C–C), 748, 716, 603.

3.2.1.1 *Metoda A: Grijanje u povrat ili refluksiranje*

Masa biootpada kore sušene rajčice od 15 g se odvaži na tehničkoj vagi, prebaci u tikvicu s okruglim dnom te se doda 150 mL čistog otapala (biootpad : otapalo = 1 : 10). U tikvicu se ubace kamenčići za vrenje i postavi se aparatura za refluksiranje (Slika 8). Temperatura se namjesti na temperaturu vrelišta korištenog otapala uz konstantan refluks. Refluksiranje se provodi tijekom dva sata. Dobiveni se ekstrakt različitog intenziteta žuto-narančaste boje, ovisno o otapalu, ohladi i filtrira preko Büchnerovog lijevka. Filtrat se potom izmučka u lijevku za odjeljivanje (vidi odlomak 3.2.1.2. *Ekstrakcija tekuće-tekuće*) te upari na rotacijskom vakuum uparivaču u prethodno izvaganu tikvicu s okruglim dnom. Na analitičkoj vagi se izvaži masa tikvice s uzorkom te se oduzimanjem mase prazne tikvice dobije masa izoliranog uzorka (Tablica 2.).



Slika 8. Korištena aparatura za refluksiranje

Za potrebe druge ekstrakcije, nakon odsisavanja preko Büchnerovog lijevka, preostali talog se ispere korištenim otapalom i sačuva za ponovnu upotrebu. Ponovi se identičan prethodno opisani postupak, počevši od prebacivanja taloga u novih 150 mL istog otapala uz refluksiranje dva sata do konačnog izračunavanja mase izoliranih komponenti (Tablica 3.).

Prilikom refluksiranja u dvjema smjesama otapala, dakle heksan : aceton = 1 : 1 i heksan : etil-acetat = 1 : 1, korišteno je 10 g biootpada kore sušene rajčice i 100 mL smjese otapala (50 mL heksana i 50 mL acetona, odnosno 50 mL heksana i 50 mL etil-acetata) čime je zadržan omjer biootpad : otapalo = 1 : 10. Postupak se provodi na opisani način za uporabu čistog otapala.

Tablica 2. Mase ekstrakata dobivene **metodom A** nakon prve ekstrakcije

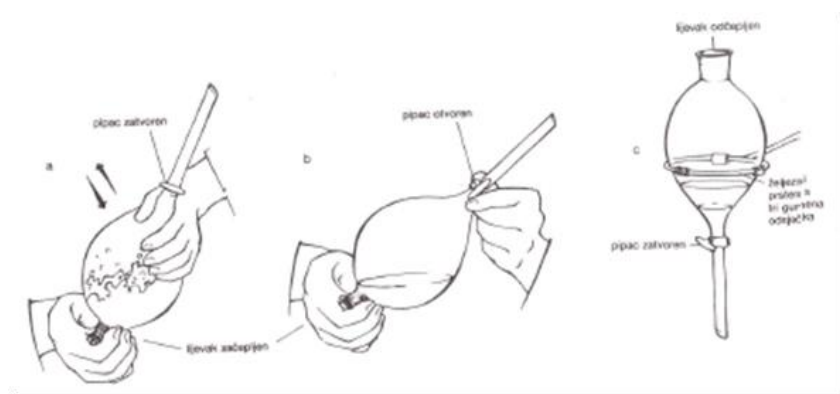
Uzorak	Otapalo	Masa (mg)
A1-1	<i>Diklormetan</i>	113,7
A2-1	<i>Aceton</i>	389,4
A3-1	<i>Etanol</i>	464,6
A4-1	<i>Etil-acetat</i>	328,5
A5-1	<i>Heksan</i>	124,5
A6-1	<i>Petrol-eter</i>	239,6
A7-1	<i>Heksan/ aceton (1:1)</i>	172,0
A8-1	<i>Heksan/ etil-acetat (1:1)</i>	237,8

Tablica 3. Mase ekstrakata dobivene **metodom A** nakon druge ekstrakcije

Uzorak	Otapalo	Masa (mg)
A2-2	<i>Aceton</i>	186,2
A3-2	<i>Etanol</i>	97,1
A4-2	<i>Etil-acetat</i>	105,0
A5-2	<i>Heksan</i>	53,1
A6-2	<i>Petrol-eter</i>	54,3
A7-2	<i>Heksan/ aceton (1:1)</i>	77,6
A8-2	<i>Heksan/ etil-acetat (1:1)</i>	117,5

3.2.1.2 Ekstrakcija tekuće-tekuće

Prije uparavanja, provodi se ekstrakcija tekuće-tekuće što znači da se filtrat izmučkava u lijevku za odjeljivanje s destiliranom vodom (Slika 9). Kad se slojevi odvoje, donji organski sloj se ispusti u postavljenu tikvicu i izmučkavanje se ponovi tri puta. U slučaju zamućivanja i nepostojanja definirane granice između slojeva, dodatak zasićene otopine natrijevog klorida služi za razbistravanje. Potom se sakupljeni organski slojevi prebace u suhu Erlenmeyerovu tikvicu, osuše s bezvodnim Na_2SO_4 kratko miješajući te se otopina profiltrira preko lijevka i komadića vate u tikvicu s okruglim dnom za uparavanje.



Slika 9. Ekstrakcija tekuće-tekuće (izmučkavanje)

3.2.1.3 Metoda B: Ekstrakcija po Soxhlet-u

Na tehničkoj vagi odvaži se masa od 5 g biootpada rajčice (Slika 10). U cilindar ekstraktora stavi se uzorak biootpada prekriven s malo vate s obje strane. Za postizanje istog omjera kao u postupku refluksiranja (biootpad : otapalo = 1 : 10) doda se 50 mL otapala te se zagrijava dva dva sata na temperaturi vrelišta otapala. Ekstrahirani uzorak se putem sifonske cjevčice sakuplja u okruglu tikvicu. Nakon hlađenja, ekstrakt se izmučka (vidi odlomak 3.2.1.2. *Ekstrakcija tekuće-tekuće*), a daljnji koraci do dobivanja mase uzorka (Tablica 4.) su identični onima u postupku refluksiranja.



a)



b)

Slika 10. Korištena aparatura za ekstrakcije po Soxhlet-u: a) cijela aparatura, b) Soxhlet kondenzator

Prilikom ekstrakcije po Soxhlet-u smjesama otapala, dakle heksan : aceton = 1 : 1 i heksan : etil -acetat = 1 : 1, koristi se ista količina od 5 g biootpada kore sušene rajčice i 50 mL smjese otapala (25 mL heksana i 25 mL acetona, odnosno 25 mL heksana i 25 mL etil-acetata). Daljni postupak je prethodno opisan, isti kao kod korištenja čistog otapala.

Tablica 4. Mase ekstrakata dobivene **metodom B** nakon prve ekstrakcije

Uzorak	Otapalo	Masa (mg)
B1-1	<i>Diklormetan</i>	32,4
B2-1	<i>Aceton</i>	139,1
B3-1	<i>Etanol</i>	177,8
B4-1	<i>Etil-acetat</i>	112,6
B5-1	<i>Heksan</i>	109,9
B6-1	<i>Petrol-eter</i>	60,3
B7-1	<i>Heksan/ aceton (1:1)</i>	175,2
B8-1	<i>Heksan/ etil-acetat (1:1)</i>	183,5

Druga ekstrakcija se ponovi nedugo nakon prve tako da se uzorak ostavi u cilindru ekstraktora, a doda se nova količina 50 mL korištenog otapala. Ponovi se identičan postupak završno s dobivenim masama uzorka (Tablica 5.).

Tablica 5. Mase ekstrakata dobivene **metodom B** nakon druge ekstrakcije

Uzorak	Otapalo	Masa (mg)
B2-2	<i>Aceton</i>	18,1
B3-2	<i>Etanol</i>	8,3
B4-2	<i>Etil-acetat</i>	16,2
B5-2	<i>Heksan</i>	17,0
B6-2	<i>Petrol-eter</i>	25,7
B7-2	<i>Heksan/ aceton (1:1)</i>	48,1
B8-2	<i>Heksan/ etil-acetat (1:1)</i>	42,8

3.2.2 Pročišćavanje dobivenih ekstrakata karotenoida

Kromatografija je postupak razdvajanja homogenih smjesa na komponente, koji se u slučaju tankoslojne kromatografije (TLC) temelji na adsorpcijskim procesima. Tvar se raspodjeljuje između dviju faza, stacionarne (adsorbensa) i mobilne (eluensa), pri čemu se uspostavlja ravnoteža, što znači da dio tvari ostane adsorbiran na tanak sloj adsorbensa nanesen na staklenu ploču, a dio se otopi u otapalu (eluensu). Kako se eluens uzdiže uz ploču zbog kapilarnih sila, ravnoteža se narušava i komponente putuju u smjeru kretanja otapala različitim brzinama i tako se razdvajaju. Kao adsorbensi pretežno se upotrebljavaju silika gel (silicijska kiselina) i aluminijev oksid, a prema sposobnosti eluiranja se bira otapalo pogodno za mobilnu fazu.

3.2.2.1 Preparativna tankoslojna kromatografija (PTLC)

Smjesa spojeva koja se nalazi u uparenom ekstrahiranom uzorku se pročišćava preparativnom tankoslojnom kromatografijom. Prije postupka pročišćavanja preparativnom tankoslojnom kromatografijom (PTLC) potrebno je ispitati različite eluense u svrhu što boljeg razdvajanja

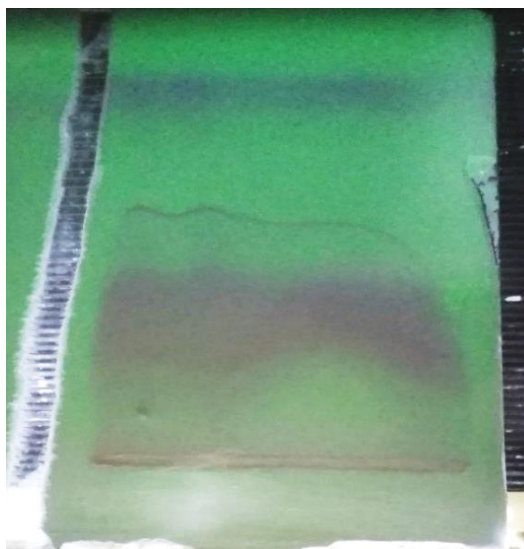
komponentata smjese (Slika 11). Po jedan ekstrakt svakog korištenog otapala je ispitan TLC-om nanoseći uzorke na pločicu silikagela (Slika 9.). Od svih ispitanih sustava (CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$, CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 0,5$, CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 8 : 2$, CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 7 : 3$), eluens CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 0,5$ pokazao se najpogodniji za razdvajanje komponentata smjese na kromatografskim pločama.



Slika 11. Ispitavanje uzoraka TLC-om za pronalazak prikladnog eluensa

Prije pročišćavanja, prvo su TLC-om u navedenom eluensu ispitani svi uzorci pojedinog otapala s ciljem spajanja uzoraka koji su ekstrahirani korištenjem istog otapala. Potvrđen je isti sastav ekstrakata istog otapala te su spojeni u jedan uzorak za daljnje pročišćavanje.

Na staklene ploče (20 x 20 cm) presvučene slojem silikagela nanosi se uzorak oko 2 cm od donjeg ruba ploča kao horizontalna ravna linija. Masa ispitivanog uzorka ne smije prelaziti 100 mg na jednoj ploči. Kad se uzorak nanese, ploča se uroni u eluens (CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 0,5$) u kadi. Zbog kapilarnih sila eluens se diže uz ploču i kromatogram se razvija dok fronta otapala stigne oko 2 cm od gornjeg ruba ploče (Slika 12). Ploča se potom izvadi, dobro osuši te se pojedinačne frakcije struganjem skinu s ploče i prebace u sinter lijevak priključen na vodenu sisaljku kako bi se svaka frakcija ekstrahirala pogodnim otapalom. Nakon uparavanja, izmjeri se masa dobivene pojedinačne frakcije, odnosno komponente smjese. Dobivenim frakcijama snimljeni su IR spektri s ciljem identifikacije izoliranih spojeva.



Slika 12. Primjer razvijenog kromatograma na preparativnoj silikagel ploči (pod UV lampom pri 254 nm)

PTLC spojenih uzoraka dobivenih ekstrakcijom u acetonu

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom acetona kao otapala za ekstrakciju (**A2-1**, **A2-2**, **B2-1**, **B2-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB2**) je iznosila 501,2 mg, izdvojene su dominantne frakcije (Tablica 6.) te je svakoj frakciji snimljen IR spektar s ciljem karakterizacije izoliranih komponenti.

Tablica 6. Frakcije pročišćenog acetonskog ekstrakta

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB21	Najgornja	193,5	38,6
AB22	Srednja	21,1	4,2
AB23	Najniža	37,3	7,4

IR-spektri:

AB21: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3383 (sl, O–H), 2922 (j., C–H), 2855 (j., C=C), 2358, 1739 (sr., C=O), 1460, 1377 (sr., CH_2), 1167 (sl., C–O, C–C), 723.

AB22: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2929 (j., C–H), 2858 (sr., C=C), 1711 (sr., C=O), 1371 (sl., CH_2), 1019 (sl., C–O, C–C), 749, 713, 471.

AB23: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3411 (j., O–H), 2927 (j., C–H), 2857 (j., C=C), 1731 (sr., C=O), 1564, 1453 (j., CH_2), 1061 (sr., C–O, C–C), 618.

PTLC spojenih uzoraka dobivenih ekstrakcijom u etil-acetatu

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom etil-acetata kao otapala za ekstrakciju (**A4-1**, **A4-2**, **B4-1**, **B4-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB4**) je iznosila 409,9 mg, izdvojene su dominantne frakcije (Tablica 7.) te je svakoj frakciji snimljen IR spektar s ciljem karakterizacije izoliranih komponenti.

Tablica 7. Frakcije pročišćenog etil-acetatnog ekstrakta

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB41	Najgornja	6,8	1,7
AB42	Srednja	31,8	7,8
AB43	Najniža	83,5	20,4

IR spektri:

AB41: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2929 (j., C–H), 2859 (sr., C=C), 1710 (sr., C=O), 1371 (sl., CH_2), 1020 (š.sl., C–O, C–C), 854, 749, 714, 477.

AB42: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2928 (j., C–H), 2857 (sr., C=C), 1708 (j., C=O), 1463, 1371 (sr.sl., CH_2), 1215, 945, 845, 747, 714, 475.

AB43: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3361 (š.sr., O–H), 2923 (j., C–H), 2856 (j., C=C), 1729 (sr., C=O), 1573, 1456 (sr., CH_2), 1069, 720.

PTLC spojenih uzoraka dobivenih ekstrakcijom u heksanu

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti

TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom heksana kao otapala za ekstrakciju (**A5-1**, **A5-2**, **B5-1**, **B5-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB5**) je iznosila 277,6 mg, izdvojene su dominantne frakcije (Tablica 8.) te je za svaku frakciju snimljen IR spektar s ciljem identifikacije izoliranih komponenti.

Tablica 8. Frakcije pročišćenog heksanskog ekstrakta

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB51	Gornja	31,5	46,2
AB52	Donja	7,3	10,7

IR- spektri:

AB51: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2928 (j., C–H), 2857 (sr., C=C), 1727 (sl., C=O), 1465, 1373 (sl., CH_2), 1023 (sl., C–O, C–C), 715, 470.

AB52: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 2929 (sr., C–H), 1710 (sr., C=O), 1370 (sl., CH_2), 964, 749, 713, 516.

PTLC spojenih uzoraka dobivenih ekstrakcijom u heksan/ acetonu

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom heksan/ acetona kao smjese otapala za ekstrakciju (**A7-1**, **A7-2**, **B7-1**, **B7-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB7**) je iznosila 310,9 mg, izdvojene su dominantne frakcije (Tablica 9.) te je za svaku frakciju snimljen IR spektar s ciljem identifikacije izoliranih komponenti.

Tablica 9. Frakcije pročišćenog heksan/ acetonskog ekstrakta

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB71	Najgornja	16,4	12,3
AB72	Gornja	5,5	4,1
AB73	Srednja	10,9	8,2
AB74	Najniža	23,6	17,7

IR spektri:

AB71: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3600 (sl., O–H), 2928 (j., C–H), 2857 (sr., C=C), 1733 (sr., C=O), 1465, 1371 (sl., CH_2), 1020 (š.sl., C–O, C–C), 748, 714, 516.

AB72: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2930 (j., C–H), 2859 (sr., C=C), 1711 (sr., C=O), 1464, 1373 (sl., CH_2), 1157, 1020 (š.sl., C–O, C–C), 858, 749, 718, 462.

AB73: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2930 (sr., C–H), 2859 (sr., C=C), 1711 (sr., C=O), 1372 (sl., CH_2), 965, 750, 716, 516.

AB74: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3381 (š.j., O–H), 2924 (j., C–H), 2857 (j., C=C), 1727 (sr., C=O), 1563, 1451 (j., CH_2), 1067 (sr., C–O, C–C), 721, 663.

PTLC spojenih uzoraka dobivenih ekstrakcijom u heksan/ etil-acetatu

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom heksan/ etil-acetata kao smjese otapala za ekstrakciju (**A8-1**, **A8-2**, **B8-1**, **B8-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB8**) je iznosila 462,4 mg, izdvojene su dominantne frakcije (Tablica 10.) te je za svaku frakciju snimljen IR spektar s ciljem identifikacije izoliranih komponenti.

Tablica 10. Frakcije pročišćenog heksan/ etil-acetatnog ekstrakta

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB81	Najgornja	148,0	32
AB82	Srednja	18,0	3,9
AB83	Najniža	41,9	9,1

IR-spektri:

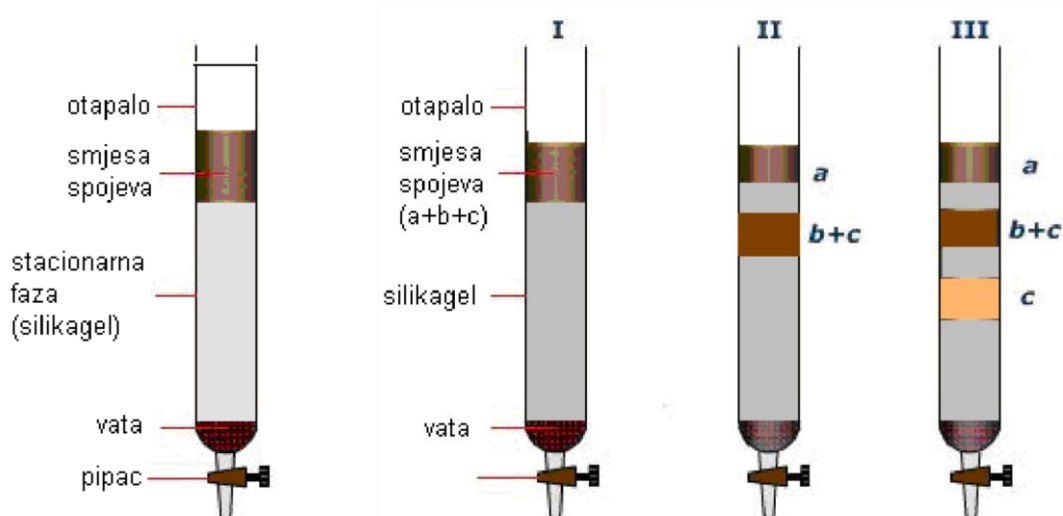
AB81: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3094 (sl., C–H, aromatski), 2929 (j., C–H), 2859 (j., C=C), 1710 (j., C=O), 1459, 1377 (sr., CH_2), 1290, 1175 (sl., C–O, C–C), 717, 600.

AB82: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2929 (j., C–H), 2859 (sr., C=C), 1710 (sr., C=O), 1464, 1372 (sl., CH_2), 1016 (sl., C–O, C–C), 857, 748, 716, 481.

AB83: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3331 (š.j. O–H), 2923 (j., C–H), 1554, 1454 (j., CH_2), 724.

3.2.2.2 Kolonska kromatografija (CC)

Kolonska kromatografija ili kromatografija na stupcu (CC) se također koristi za odjeljivanje sastojaka smjese (Slika 13.). Izvodi se u staklenoj koloni ispunjenoj krutim adsorbensom - silikagelom. Kolonu treba prethodno pripremiti jednoličnim raspoređivanjem adsorbensa. Prije svake kolonske kromatografije se pomoću TLC na pločicama pronalazi najpogodnije otapalo ili smjesa otapala za eluiranje. Mobilna faza protječe kolonom pod utjecajem gravitacije, otapa sastojke uzorka i ispire ih sa stupca adsorbensa. Kapljevina koja izlazi iz kolone naziva se eluat i skuplja se u više tikvica kako bi se odvojile frakcije (Rapić, 2008).



Slika 13. Kolonska kromatografija

Prije početka potrebno je pripremiti stacionarnu fazu (adsorbens) i odrediti mobilnu fazu (eluens). Prvi korak je priprema kolone koja se pažljivo napuni adsorbensom. Silikagel u praškastom obliku se suspendira u otapalu te se suspenzija ulijeva u staklenu cijev u navratima, čekajući da se silikagel ravnomjerno raspoređi. Važno je da otapalo stalno protječe kroz kolonu kako bi se izbjeglo nastajanje mjehurića zraka u stupcu. Kad se adsorbens raspoređi i osuši, kolona je spremna za upotrebu.

Pročišćavanje (CC) spojenih etanolnih ekstrakata

Nakon provedenih ekstrakcija **metodom A** i **metodom B**, na temelju potvrde identičnosti TLC-om spojena su četiri uzorka dobivena uporabom etanola kao otapala za ekstrakciju (**A2-1, A2-2, B2-1, B2-2**). Masa spojenih uzoraka (**AB2**) je iznosila 583,4 mg pa je pročišćavanje provedeno kromatografijom na stupcu.

No, potrebno je prethodno odabrati otapalo/smjesu otapala za mobilnu fazu. Uzorak spojenih ekstrakata je ispitan TLC-om i izabrani eluens je sustav $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 8 : 2$. Na vrh kolone potom se nanosi otopljeni ekstrakt i eluira odabranim sustavom. Eluat se hvata u Erlenmeyerovu tikvicu s tim da se svaka zasebna frakcija različite boje ispusti u čistu tikvicu. Uparavanjem su dobivene mase triju razdvojenih frakcija (Tablica 11.) te je svakoj frakciji snimljen IR spektar s ciljem karakterizacije izoliranih komponenti.

Tablica 11. Frakcije pročišćenog etanolnog ekstrakta

Oznaka	Opis frakcije	Masa frakcije [mg]	Postotak [%]
AB21	Žuta	200,9	34,3
AB22	Smeđa	301,3	51,6
AB23	Blijedo žućkasta	82,3	14,1

IR-spektri:

AB21: $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2928 (sr., C–H), 1735 (sl., C=O), 845, 749, 714, 515.

AB22: $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 2928 (sr., C–H), 1711 (sr., C=O), 1369 (sl., CH_2), 959, 852, 713, 517.

AB23: $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ (KBr): 3359 (sr, O–H), 2925 (j., C–H), 2857 (sr., C=C), 1711 (sr., C=O), 1459 (sl., CH_2), 1245, 1071 (sl., C–O, C–C), 723.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 UVOD

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati i usporediti učinkovitost izolacije karotenoidnih spojeva iz biootpada kore sušene rajčice primjenom dviju različitih ekstrakcijskih metoda, utvrditi najpogodnije otapalo kao bitan faktor kod ekstrakcije kruto-tekuće te pročistiti i karakterizirati dobivene frakcije. Za izolaciju karotenoida iz biljnih materijala ne postoji standardna metoda, no, zbog njihove hidrofobnosti, među najčešće korištenima je klasična ekstrakcija organskim otapalima. Dosad su primijećeni različiti prinosi ekstrakcije karotenoida iz namirnica, ali i biootpada rajčice (Strati i Oreopoulou, 2014). Različiti uvjeti ekstrakcije, poput izbora otapala, omjera uzorka i otapala, temperature procesa, vremenskog trajanja ekstrakcije, broja ponavljanih ekstrakcija, veličine čestica početnog uzorka, uz ovisnost o sorti rajčice, provedenim metodama procesiranja i vrsti biootpada, utječu na konačnu masu i udio pojedinih karotenoida u ekstraktu.

Prvi je dio ovog rada posvećen izolaciji karotenoida uz primjenu dvije metode ekstrakcije, **metoda A**: klasična ekstrakcija grijanjem u povrat (refluks) i **metoda B**: ekstrakcija po Soxhlet-u. U svrhu usporedbe, obje metode su ponovljene dva puta s istim korištenim otapalima/ smjesama otapala uz iste ekstrakcijske uvjete. Drugi dio se odnosi na pročišćavanje dobivenih ekstrakata preparativnom tankoslojnom kromatografijom i kolonskom kromatografijom te karakterizaciju pojedinih pročišćenih frakcija IR-spektroskopijom.

4.2 EKSTRAKCIJA KAROTENOIDA

Biootpad kore rajčice predstavlja izvor karotenoidnih pigmenata. Najzastupljeniji su karoteni; u pravilu je to prvenstveno likopen koji je odgovoran za prepoznatljivu crvenu boju rajčice, slijedi ga narančasti β -karoten, a od ksantofila je u najvećem udjelu prisutan lutein žute boje (Strati i Oreopoulou, 2011a). Mogu se naći i druge skupine karotenoida, poput fitoena i fitofluena, što posljedično otežava selektivnu izolaciju zbog velikog broja spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava. Najznačajnije svojstvo je polarnost otapala o kojem ovisi

učinkovitost ekstrakcije karotenoida. Karoteni su zbog svoje kemijske građe koje karakteriziraju dugi ugljikovodični lanci uz konjugirane dvostruke veze hidrofobni spojevi, stoga je nepolarno otapalo bolji izbor za ekstrakciju od polarnog. Ksantofili, kao derivati kisika, su bolje topljivi u polarnijim otapalima. Otapanjem krutog uzorka kore rajčice u pogodnom otapalu i zagrijavanjem tijekom određenog vremena omogućeno je otapanje karotenoida u biljnim stanicama i njihova ekstrakcija. Premda je klasična ekstrakcija uz primjenu organskih otapala najčešće primjenjivani postupak, u novije vrijeme istraživanja su posvećena i novim metodama ekstrakcije i njihovoj primjeni (Saini i Keum, 2018).

U prvom su dijelu rada preliminarno upotrebljene dvije ekstrakcijske metode (**metoda A** i **metoda B**) gdje je kao otapalo ispitan diklormetan koji se smatra otapalom srednje polarosti. Korištena osušena kora rajčice ne zahtijeva prethodnu pripremu uzorka, tj. nije potrebno sušenje, homogeniziranje i drobljenje do manje veličine čestica jer se već nalazi u stanju spremnom za podvrgavanje ekstrakciji. Sukladno prethodno proučenim literaturnim podacima (Strati i Oreopoulou, 2014) odabrani su uvjeti ekstrakcije: omjer biootpada i otapala 1:15 te vrijeme trajanja metode od jednog sata. Ekstrakcijom s diklormetanom dobivena je otopina žućkasto-narančaste boje. Nakon uparavanja ekstrakta na rotacijskom uparivaču izvagana je masa uzorka specifičnog mirisa od 113,7 mg dobivena **metodom A**, odnosno 32,4 mg dobivena **metodom B**. Uzorak je ispitan tankoslojnom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1$ te je snimljen IR-spektar ekstrakta za karakterizaciju izoliranih komponenti. Iz ovih rezultata jasno je vidljivo da je **metodom A** dobiven veći udio ekstrakta nego **metodom B** uporabom diklormetana kao otapala. Uzimajući u obzir nisko vrelište CH_2Cl_2 to bi mogao biti jedan od faktora nižeg iskorištenja **metode B**. U nastavku istraživanja korištena su otapala višeg vrelišta.

4.2.1 Grijanje u povrat ili refluksiranje (**metoda A**)

U svrhu izolacije karotenoida primijenjena je **metoda A** temeljena na korištenju organskog otapala i grijanju otopine u povrat (refluks). Tijekom primjene ove metode ispitana su otapala različite polarnosti te dvije smjese otapala od kojih je jedno polarno, a drugo nepolarno otapalo. Otapala koju su ispitana u ovom diplomskom radu su: aceton, etanol, etil-acetat, heksan, petrol-eter, smjesa heksan/ aceton (1:1) i smjesa heksan/ etil-acetat (1:1).

Temeljeno na preliminarnom eksperimentu, ekstrakcijski uvjeti, odnosno početna masa biootpada, omjer biootpad:otapalo i vremensko trajanje ekstrakcije, su podešeni drugačije. Masa početnog uzorka biootpada je povećana na maksimalnih 15 g u odnosu na istraživanja provedena u CH₂Cl₂, budući da je korišteni biootpad kore sušene rajčice usitnjen i pretežno praškastog oblika pa relativno mala masa zauzima veliki volumen. U svim provedenim ekstrakcijama promijenjen je omjer biootpad:otapalo na 1:10 te vrijeme trajanja ekstrakcije od dva sata. Dakle, povećana je koncentracija početnog uzorka i produljeno je vrijeme ekstrakcije kako bi se ispitaio utjecaj navedenih parametara na iskorištenje reakcije.

Nakon provedene ekstrakcije iz 15 g biootpada i 150 mL određenog otapala/ smjese otapala **metodom A** u trajanju od dva sata, dobivena je otopina žuto-narančaste boje s razlikama u intenzitetu obojenja što je ovisilo o korištenom otapalu. Također je uočena i ovisnost intenziteta boje otopine ekstrakta i mase izoliranog uzorka, odnosno najjači intenzitet je imao ekstrakt etanola, a najslabiji diklormetanski ekstrakt. Dobiveni se ekstrakti profiltriraju, ekstrahiraju vodom i upare te je dobivena smjesa spojeva. U eksperimentalnom su dijelu u tablici 2. (*vidi str. 18*) prikazane mase sedam uzoraka dobivenih korištenjem sedam različitih otapala i označenih od **A1-1** do **A8-1**. Otapala/ smjese otapala s različitim prinosom se mogu poredati u niz, počevši od onog s najvećim prinosom: etanol (464,6 mg), aceton (389,4 mg), etil-acetat (328,5 mg), petrol-eter (239,6 mg), heksan/ etil-acetat (237,8 mg), heksan/ aceton (172,0 mg), heksan (124,5 mg).

Ekstrakcijski ostatak podvrgnut je ponovljenom postupku ekstrakcije u istovjetnim uvjetima, odnosno otapalu. Za ponovljenu ekstrakciju korišten je isti volumen odabranog otapala (150 mL) uz uvjete identične prvom ekstrakcijskom postupku. U eksperimentalnom dijelu u tablici 3. (*vidi str. 18*) su prikazane mase izoliranih uzoraka ponovljenom ekstrakcijom označeni od **A2-2** do **A8-2**. Otapala poredana prema prinosu, od najvećeg do najmanjeg, su: aceton (186,2 mg), heksan/ etil-acetat (117,5 mg), etil-acetat (105,0 mg), etanol (97,1 mg), heksan/ aceton (77,6 mg), petrol-eter (54,3 mg), heksan (53,1 mg).

4.2.2 Ekstrakcija po Soxhlet-u (**metoda B**)

Kao usporedna metoda za izolaciju karotenoida korištena je ekstrakcija po Soxhlet-u. Nakon provedene ekstrakcije iz 5 g početnog uzorka biootpada kore rajčice i 50 mL otapala/ smjese otapala u trajanju od dva sata, dobivena je žuto-narančasta otopina ekstrakta te je izvedena ekstrakcija tekuće-tekuće. Uparavanjem ekstrakata dobivene su mase uzoraka izoliranih sa

sedam otapala/ smjesa otapala različite polarnosti i označenih od **B1-1** do **B8-1** što je prikazano u eksperimentalnom dijelu u tablici 4. (*vidi str. 20*) Masa dobivenog ekstrakta varirala je ovisno o korištenom otapalu: heksan/ etil-acetat (183,5 mg), etanol (177,8 mg), heksan/ aceton (175,2 mg), aceton (139,1 mg), etil-acetat (112,6 mg), heksan (109,9 mg), petrol-eter (60,3 mg).

Ekstrakcijski postupak je ponovljen još jednom uz iste uvjete kao i pri prvoj ekstrakciji. U eksperimentalnom dijelu u tablici 5. (*vidi str. 21*) su prikazane mase uzoraka dobivenih ponovljenom ekstrakcijom sa sedam otapala/ smjesa otapala, a uzorci su označeni od **B2-2** do **B8-2**. Prinosi druge ekstrakcije također su bila različiti: heksan/ aceton (48,1 mg), heksan/ etil-acetat (42,8 mg), petrol-eter (25,7 mg), aceton (18,1 mg), heksan (17,0 mg), etil-acetat (16,2 mg) i etanol (8,3 mg).

Usporedba rezultata dobivenih ekstrakcijom po Soxhlet-u i refluksiranjem

U svrhu ispitivanja optimalnih uvjeta za ekstrakciju karotenoida iz biootpada kore rajčice korištene su dvije metode, grijanje u povrat ili refluks (**metoda A**) i ekstrakcija po Soxhlet-u (**metoda B**), koje se razlikuju po svojoj izvedbi. U obje ekstrakcijske metode korišteni su isti uvjeti (otapala, omjer biootpad : otapalo = 1 : 10, vrijeme trajanja od dva sata, ekstrakcije su provedene dva puta). Tijekom ekstrakcije po Soxhlet-u uzorak biootpada i otapalo se ne nalaze na istom mjestu, nego otapalo kontinuirano prolazi kroz uzorak i vraća se u tikvicu s otapalom te je temperatura provođenja procesa niža u odnosu na temperaturu kod ekstrakcije po **metodi A**. Već nakon same provedene ekstrakcije mogla se uočiti razlika u intenzitetu obojenja konačne otopine koja je bila jačeg intenziteta korištenjem **metode A** primjenom istog otapala. Premda je vrelište otapala ograničavajući faktor prilikom postavljanja temperature i s obzirom na to da se žele izbjeći neželjene reakcije poput izomerizacije i/ ili oksidacije karotenoida, ovim radom je potvrđeno da povećanje temperature ipak rezultira većom količinom izoliranih željenih spojeva (Nikolova i sur., 2014).

Parametar koji se ovdje koristi je masa dobivenih smjesa spojeva nakon provedenih postupaka po **metodi A i B**. Na masu izoliranih ekstrakata utjecala je izabrana metoda i korišteno otapalo. Mase dobivene primjenom istih otapala, ali različitih metoda, ukazuju na veće vrijednosti dobivene refluksiranjem u odnosu na mase dobivene ekstrakcijom po Soxhlet-u. Mase dobivene ponovljenom ekstrakcijom primjenom istih otapala kod obje metoda su manje u odnosu na prvu ekstrakciju. Razlika između prve i druge ekstrakcije **metodom B** je veća nego razlika između prve i druge ekstrakcije **metodom A**. Može se primijetiti i da je

veća razlika u masi između prve i druge ekstrakcije primjenom čistih otapala u odnosu na primjenu smjesa otapala, kao što je i veća razlika kod primjene polarnijih otapala u odnosu na nepolarna.

Na temelju provedenih istraživanja u ovom dijelu diplomskog rada može se zaključiti da su dobiveni bolji rezultati korištenjem **metode A**, ako se kao parametar uzima masa dobivenog ekstrakta. Ovi rezultati se mogu protumačiti činjenicom da je temperatura otapala (para nastalih isparavanjem otapala) korištenjem **metode B** koje je u kontaktu s početnim biootpadom sušene kore rajčice niža nego kod **metode A** tako je i udio izoliranih spojeva niži, a i njihov sastav je različit. Dakle, temperatura je jedan od parametara koji utječu na provedbu eksperimenta, a drugi parametar je polarnost korištenog otapala/ smjese otapala. Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na veće mase ekstrakata kada je korišteno polarno otapalo i to u obje primijenjene metode. Sastav dobivenih ekstrakata ispitan je TLC-om, te su odijeljeni na nekoliko dominantnih frakcija preparativnom tankoslojnom ili kolonskom kromatografijom, a dobivenim frakcijama snimljeni su IR-spektri u svrhu karakterizacije.

4.3 PROČIŠĆAVANJE DOBIVENIH EKSTRAKATA KAROTENOIDA

Pročišćavanje dobivenih ekstrakata je provedeno dvjema metodama: preparativnom tankoslojnom kromatografijom i kolonskom kromatografijom. Prije pročišćavanja, TLC-om uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 0,5$ je ispitano jesu li komponente četiriju uzoraka ekstrahiranih istim otapalom iste u svrhu spajanja uzoraka. Sva četiri ekstrakta pojedinog otapala su se podudarala sastavom te su spojena u jedan uzorak koji je pročišćen i razdvojen na dominantne frakcije.

4.3.1 Preparativna tankoslojna kromatografija (PTLC)

Pročišćavanje je provedeno na preparativnim pločama za tankoslojnu kromatografiju. Izvagana je masa ekstrakta pojedinog otapala dobivenog spajanjem uzoraka **metode A** i **metode B** kako bi se odredio broj potrebnih ploča za pročišćavanje uzorka, s obzirom da se na pojedinu ploču nanosi maksimalno 100 mg uzorka. PTLC-om u eluensu $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9$

: 0,5, izdvojene su frakcije ekstrakta pojedinog otapala, bolje vidljive pod UV lampom pri valnoj duljini od 245 nm kao što je prikazano na slici 12. (*vidi str. 23*)

Spajanjem uzoraka **A2-1**, **B2-1**, **A2-2** i **B2-2** dobiven je jedan uzorak acetonskog ekstrakta (**AB2**) mase 501,2 mg čijim pročišćavanjem su dobivene tri dominantne frakcije: **AB21**, najgornja frakcija 193,5 mg (38,6 %), **AB22**, srednja frakcija 21,1 mg (4,2 %) i **AB23**, najniža frakcija 37,3 mg (7,4 %) (Tablica 6).

Uzorci **A4-1**, **B4-1**, **A4-2**, **B4-2** su spojeni u jedan uzorak etil-acetatnog ekstrakta (**AB4**) mase 409,9 mg te su pročišćavanjem također dobivene tri dominantne frakcije: **AB41**, najgornja frakcija 6,8 mg (1,7 %), **AB42** srednja frakcija 31,8 mg (7,8 %) i **AB43** najniža frakcija 83,5 mg (20,4 %) (Tablica 7).

Heksanski ekstrakt (**AB5**) nastao spajanjem uzoraka **A5-1**, **B5-1**, **A5-2** i **B5-2**, a čija je masa 277,6 mg, pročišćavanjem je razdvojen na dvije dominantne frakcije: **AB51**, najgornja frakcija 31,5 mg (46,2 %) i **AB52** najniža frakcija 7,3 mg (10,7 %) (Tablica 8).

Heksan/ acetonskom ekstraktu (**AB7**) dobivenom od spojenih uzoraka **A7-1**, **B7-1**, **A7-2** i **B7-2** i mase 310,9 mg su izdvojene četiri dominantne frakcije: **AB71**, najgornja frakcija 16,4 mg (12,3 %), **AB72**, gornja frakcija 5,5 mg (4,1 %), **AB73**, srednja frakcija 10,9 mg (8,2 %) i **AB64** najniža frakcija 23,6 mg (17,7 %) (Tablica 9).

Uzorci **A8-1**, **B8-1**, **A8-2** i **B8-2** su spojeni u heksan/ etil-acetatni ekstrakt (**AB8**) mase 462,4 mg te su dobivene tri dominantne frakcije: **AB81**, najgornja frakcija 148,0 mg (32,0 %), **AB82** srednja frakcija 18,0 mg (7,4 %) i **AB83** najniža frakcija 41,9 mg (9,1 %) (Tablica 10).

Usporedbom dobivenih vrijednosti dominantnih komponenti iz ekstrakata otapala različite polarnosti može se primjetiti da broj dobivenih frakcija i njihove mase variraju te da su udjeli pojedinih frakcija u ekstraktima različiti. Masa i udio srednje dominantne frakcije najmanje varira s obzirom na polarnost otapala. Pročišćavanjem heksanskog ekstrakta (**AB5**) su izdvojene dvije, a pročišćavanjem heksan/ acetonskog ekstrakta (**AB7**) četiri dominantne frakcije. Vjerovatno kao posljedica broja frakcija, najveći udio srednje frakcije je prisutan u **AB5** zbog izostanka jedne frakcije, a najmanji udio je u **AB7** jer postoji jedna dodatna frakcija. Pretežno najgornja izolirana frakcija ima najveću masu, a potom je slijedi najniža frakcija. Budući da su karoteni nepolarni spojevi, njihova prisutnost se očekuje u najgornjim frakcijama, dok se u nižim frakcijama očekuje pojavnost polarnijih spojeva, ksantofila. Najveće mase najgornjih frakcija su izdvojene iz acetonskog (**AB2**) i heksan/ etil-acetatnog (**AB4**) ekstrakta, što potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja izolacije karotenoida u kojima je najveća količina karotena dobivena korištenjem navedenih otapala za ekstrakciju (Robles-Ramirez i sur., 2016; Strati i Oreopoulou, 2011a).

4.3.2 Kolonska kromatografija

Zbog veće mase od 583,4 mg etanolnog ekstrakta (**AB3**) dobivenog spajanjem uzoraka (**A3-1**, **B3-1**, **A3-2**, **B3-2**) ekstrahiranih uz etanol **metodom A i metodom B**, za razdvajanje pojedinačnih komponenti ekstrakta izvedena je kromatografija na stupcu uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 8 : 2$ koji je prethodno ispitan TLC-om. Izdvojene su dvije frakcije različite boje uz prikupljeni ostatak s kolone: **AB31**, žuta 200,9 mg (34,3 %), **AB32**, smeđa 301,3 mg (51,6 %) i **AB33**, ostatak 82,3 mg (14,1 %). Različite komponente putuju različitim brzinama kroz kolonu ovisno o jakosti vezivanja na adsorbens i topljivosti u mobilnoj fazi. Silikagel je polaran te zato utjecajem nepolarne mobilne faze, nepolarne tvari putuju brže, dok polarne ostaju vezane na stacionarnu fazu. Dakle, žuta frakcija sadrži nepolarnije komponente, a smeđa polarnije. Smeđa frakcija je očekivano veće mase jer se radi o ekstraktu dobivenom korištenjem polarnog otapala etanola. To znači da je ekstrakcijom uz uporabu etanola izolirano više polarnih spojeva, što je u skladu s literaturnim podacima koji pokazuju da polarni ksantofili zauzimaju najveći udio etanolnog ekstrakta (Vagi i sur., 2007).

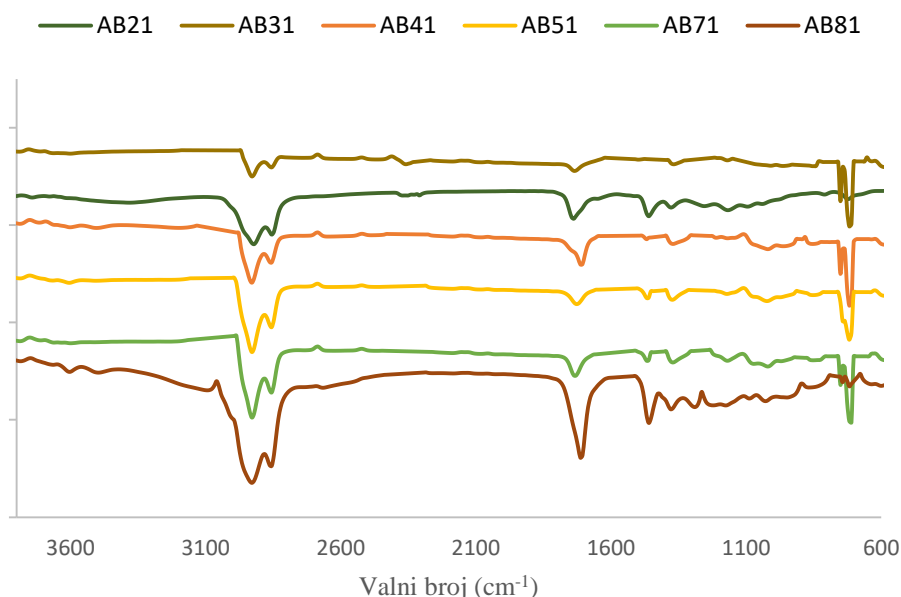
4.4 IR-SPEKTROSKOPIJA

Izlaganjem izolirane frakcije infracrvenom zračenju, ono se apsorbira i pobuđuju se molekulske vibracije izoliranih komponenti što je prikazano određenim signalom na snimljenom IR-spekttru. Iz podataka o valnom broju na kojima se pojavljuju određene apsorpcijske vrpce definira se tip molekule, odnosno definira se vrsta kemijske veze ili funkcijske skupine koja postoji u promatranoj molekuli pa se prema tome komponente mogu smjestiti u određenu skupinu kemijskih spojeva.

4.4.1 Analiza IR-spektara

IR-spektri snimljeni su kao diklormetanske otopine, svim frakcijama koje su topljive u njemu, dok su netopljivim frakcijama snimljeni IR-spektri kao KBr pastile. Spektralnom analizom dominantnih frakcija, izdvojenih iz ekstrakata svih korištenih otapala, vidljiva je apsorpcijska vrpca pri $\sim 2929 \text{ cm}^{-1}$ što je svojstveno za rastezne frekvencije veze C–H, a jak intenzitet vrpce

ukazuje na zasićene spojeve, odnosno alkane. Apsorpcijska vrpca jakog intenziteta prisutna u gotovo svim dominantnim frakcijama uočena je pri $\sim 2858\text{ cm}^{-1}$ i pripisuje se dvostrukoj C=C vezi (iznimno, kod najniže frakcije heksan/ etil-acetatnog ekstrakta je uočen izostanak ove apsorpcijske vrpce). U IR-spektrima srednjih frakcija svih ekstrakata ova apsorpcijska vrpca je srednjeg intenziteta, što ukazuje na manji udio spojeva koji sadrže C=C, a to je potvrđeno i dobivenom manjom masom srednje frakcije u odnosu na ostale izdvojene frakcije. Apsorpcijske vrpce jakog intenziteta koje se pripisuju C-H te C=C vezi mogu potvrditi prisutnost terpena, odnosno ugljikovodičnog lanca karotenoida (Slika 14).

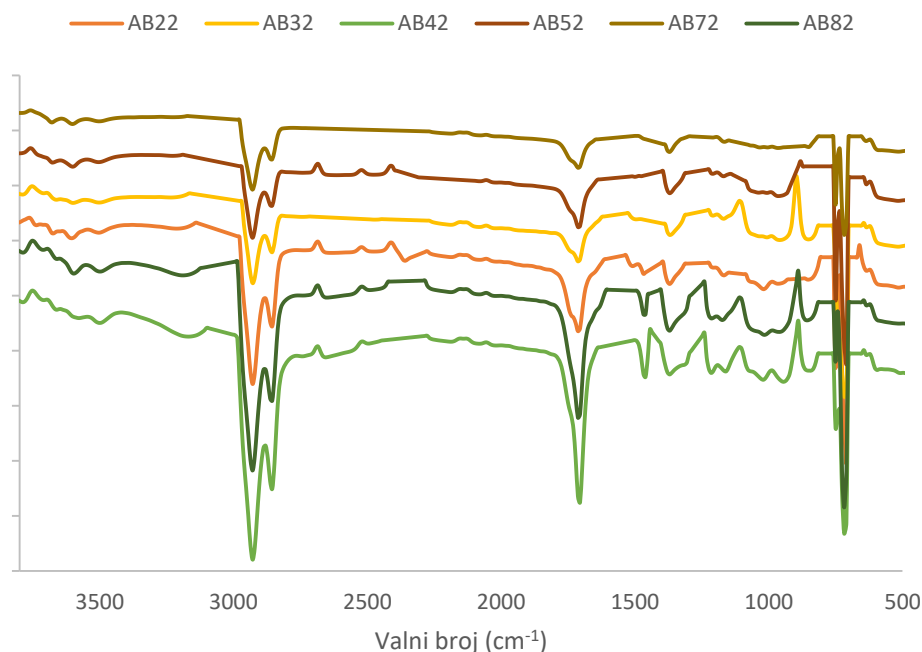


Slika 14. IR-spektri najgornjih frakcija* u području $3800\text{-}500\text{ cm}^{-1}$

* (acetonskog (**AB21**), etanolnog (**AB31**), etil-acetatnog (**AB41**), heksanskog (**AB51**), heksan/acetonskog (**AB71**) i heksan/ etil-acetatnog (**AB81**) ekstrakta te diklormetanskog (**A11**) ekstrakta)

Apsorpcijska vrpca prisutna u gotovo svim frakcijama pri $1710\text{-}1731\text{ cm}^{-1}$ različitog je intenziteta ovisno u upotrijebljenom otapalu (Slika 15), odnosno u ekstrakciji u kojoj se koristi heksan/etil-acetat kao otapalo, u najgornjoj se frakciji javlja u jakom intenzitetu, a u najnižoj frakciji nije uočena. Ova apsorpcijska vrpca pripisuje se karbonilnoj skupini (C=O). S obzirom da je prisutna apsorpcijska vrpca karakteristična za C=O skupinu vidljiva u gotovo svim frakcijama, ali različitog intenziteta, može se zaključiti kako se radi o ekstraktima koji

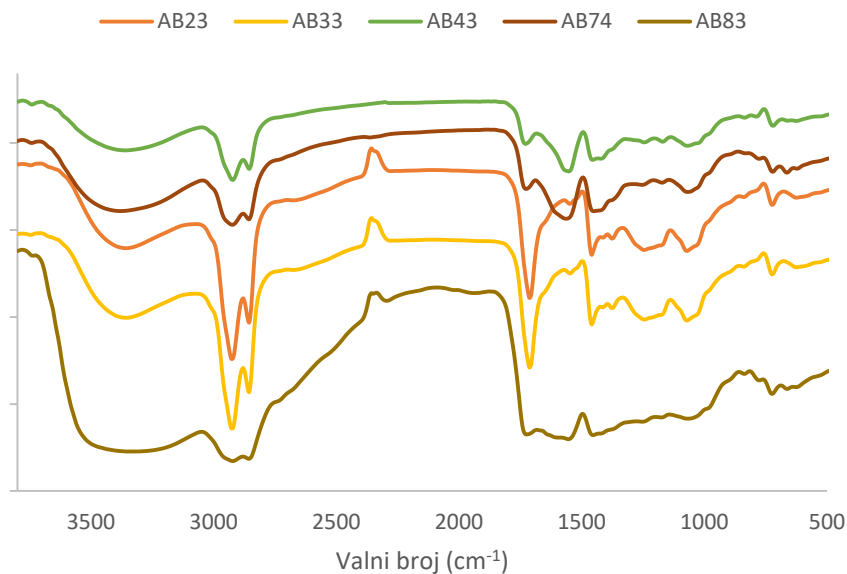
sadrže karotenoidne spojeve, a koji posjeduju karbonilnu skupinu iz skupine ksantofila. Također se može zaključiti da su prilikom korištenja polarnijih otapala izolirani i drugi spojevi koji sadrže karbonilnu funkciju, a ne pripadaju skupini karotenoida.



Slika 15. IR- spektri srednjih frakcija* u području 3800-500 cm⁻¹

* (acetonskog (**AB22**), etanolnog (**AB32**), etil-acetatnog (**AB42**), heksanskog (**AB52**), heksan/acetonskog (**AB72**) i heksan/etil-acetatnog (**AB82**) ekstrakta)

Najniže frakcije svih polarnih otapala i smjesa otapala su izdvojene i uočljiva je zajednička široka apsorpcijska vrpca 3100-3600 cm⁻¹ koja se pripisuje O-H hidroksilnoj skupini (Slika 16). Pročišćavanjem ekstrakata dobivenih korištenjem nepolarnih otapala, poput heksana, kao dominantne nisu izdvojene najniže frakcije nego samo srednje i najgornje. To potvrđuje činjenicu da u ekstraktu nepolarnog otapala nisu prisutni polarni spojevi koji bi se inače vezali za adsorbens i ostali kao najniže frakcije pri startnoj liniji kromatograma.



Slika 16. IR-spektri najnižih frakcija* u području 3800-500 cm^{-1}

*(acetonskog (**AB23**), etanolnog (**AB33**), etil-acetatnog (**AB43**), heksan/ acetonskog (**AB74**) i heksan/ etil-acetatnog (**AB83**) ekstrakta)

U IR-spektrima dominantnih frakcija su prisutne još dvije specifične apsorpcijske vrpce pri $\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$, različitog intenziteta, koja se pripisuje vibraciji asimetričnog svijanja C–H veze metilenske skupine ($-\text{CH}_2-$) u molekuli karotenoida, odnosno može se pripisati prisutnosti likopena. Druga se apsorpcijska vrpca nalazi pri $\sim 1371 \text{ cm}^{-1}$, slabog je intenziteta i može se pripisati simetričnom svijanju veze C–H u metilenskoj podjedinici ($-\text{CH}_3$) u β -iononskom prstenu u molekuli β -karotena (Kushwaha, 2014).

U nekim frakcijama, ovisno u upotrijebljenom otapalu, vidljiva je apsorpcijska vrpca oko 1157 cm^{-1} pripisana rasteznoj frekvenciji C–O veze koja bi mogla biti posljedica oksidacije karotenoida. Apsorpcijska vrpca prisutna pri 1020 cm^{-1} bi mogla ukazivati na deformaciju polienskog lanca karotenoida kao što je navedeno u istraživanju Yuana i sur. (2012). Uočene apsorpcijske vrpce jakog i srednjeg intenziteta pri frekvenciji 700-750 cm^{-1} te pri $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ bi se mogle pripisati prisutnosti *cis*, odnosno *trans* izomera (Rubio Diaz, 2010).

5 ZAKLJUČCI

1. Polarnost otapala/ smjese otapala i temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcijski proces su bitni parametri koji utječu na masu izoliranog ekstrakta. Primjenom metode refluksiranja (**metoda A**) dobivena je veća masa ekstrakata nego ekstrakcijom po Soxhlet-u (**metoda B**) zbog razlike u temperaturi. Također, primjenom polarnijih otapala izolirane su veće količine ciljanih spojeva.
2. Kromatografskim pročišćavanjem izdvojene su uglavnom po tri frakcije iz ekstrakta. Neovisno o polarnosti otapala, nepolarni karotenoidi prevladavaju u najgornjim frakcijama, a polarni u najnižim frakcijama.
3. Na temelju snimljenih IR-spektara potvrđeno je da se u izoliranim dominantnim frakcijama nalaze spojevi koji pripadaju skupini karotenoida, a za detaljniju analizu sastava ekstrakata potrebno je primijeniti i druge analitičke metode, poput NMR-spektroskopije.
4. Nakon provedenih izolacija, postoji mogućnost da dobiveni ekstrakti biootpada rajčice budu iskorišteni u svrhu obogaćivanja prehrambenih proizvoda bioaktivnim spojevima.

6 LITERATURA

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

Alshatwi, A.A., Al Obaaid, M.A., Al Sedairy, S.A., Al-Assaf, A.H., Zhang, J.J., Lei, K.Y. (2010) Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. *Nutr. Res.* **30**, 66 – 73.

Baaka, N., El Ksibi, I., Farouk Mhenni, M. (2017) Optimisation of the recovery of carotenoids from tomato processing wastes: application on textile dyeing and assessment of its antioxidant activity. *Nat. Prod. Res.* **31**, 196 – 203.

Calvo, M.M., Dado, D., Santa-Maria, G. (2007) Influence of extraction with ethanol and ethyl acetate on the yield of lycopene, B-carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *Eur. Food Res. Technol.* **224**, 567 – 571.

Calvo, M.M., Garcia, M.L., Selgas, M.D. (2008) Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Sci.* **80**, 167 – 172.

Catană, M., Catană, L., Iorga, E., Asănică, A.C., Lazăr, A.G., Lazăr, M.A., Belc, N. (2017) Achievement of some functional ingredients from tomato waste and winemaking by-products. *Horticulture* **61**, 423 – 432.

Davinelli, S., Nielsen, M.E., Scapagnini, G. (2018) Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients* **10**, 522 – 534.

Di Donato, P., Fiorentino, G., Anzelmo, G., Tommonaro, G., Nicholaus, B., Poli, A. (2011) Re-Use of Vegetable Wastes as Cheap Substrates for Extremophile Biomass Production. *Waste Biomass Valori.* **2**, 103 – 111.

Eisenhauer, B., Natoli, S., Liew, G., Flood, V.M. (2017) Lutein and Zeaxanthin—Food Sources, Bioavailability and Dietary Variety in Age-Related Macular Degeneration Protection. *Nutrients* **9**, 120 – 132.

FAOSTAT (2016) Global tomato production in 2016; Crops/World/2016. UN Food and Agriculture Organization, Statistics Division. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>, pristupljeno 22. srpnja 2018.

Fritsch, C., Staebler, A., Happel, A., Cubero Marquez, M.A., Aguilo-Aguayo, I., Abadias, M., Gallur, M., Cigognini, I.M., Montanari, A., Lopez, M.J., Suarez-Estrella, F., Brunton, N., Luengo, E., Sisti, L., Ferri, M., Belotti, G. (2017) Processing, Valorization and Application of Bio-Waste Derived Compounds from Potato, Tomato, Olive and Cereals: A review. *Sustainability-Basel* **9**, 1492 – 1538.

Galanakis, C.M. (2015) The Universal Recovery Strategy - Selection of the appropriate solvent. U: Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques, Elsevier Inc., London/San Diego/Waltham/Oxford, str. 68.

Garcia, M.L., Calvo, M. M., Selgas, D. M. (2009) Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Sci.* **83**, 45 – 49.

Gomez-Estaca, J., Calvo, M.M., Sanchez-Faure, A., Montero, P., Gomez-Guillen, M.C. (2015) Development, properties and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products. *LWT-Food Sci. Technol.* **64**, 189 – 196.

Goralczyk R. (2009) Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research. *Nutr. Cancer.* **61**, 767 – 774.

Gowe C. (2015) Review on Potential Use of Fruit and Vegetables By-Products as A Valuable Source of Natural Food Additives. *FSQM* **45**, 47 – 61.

Ishida, B.K., Bartley, G.E. (2009) Carotenoids: Chemistry, Source and Physiology. Elsevier Ltd., United States Department of Agriculture, National Agricultural Library, str. 92 – 100.

James, C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods, 1.izd., Blackie Academic & Professional, Glasgow

Johnson, E.J., Mayer, J. (2016) Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids>>. Pristupljeno 03. kolovoza 2018.

Knoblich, M., Anderson, B., Latshaw, D. (2005) Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *J. Sci. Food Agr.* **85**, 1166 – 1170.

Kushwaha, K., Saxena J., Tripathi, B.K., Agarwal, M.K. (2014) Detection of carotenoids in psychrotrophic bacteria by spectroscopic approach. *J. BioSci. Biotech.* **3**, 253 – 260.

Lucini, L., Pellizzoni, M., Baffi, C., Molinari, G.P. (2012) Rapid determination of lycopene and b-carotene by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agr.* **92**, 1297 – 1303.

Nikolova, M., Prokopov, T., Ganeva, D., Pevicharova, G. (2014) Effect of treatment parameters on the carotenoid extraction from tomato peels of bulgarian industrial varieties. *Food Envir. Safety* **13**, 283 – 289.

Nour, V., Ionica, M.E., Trandafir, I. (2015) Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 8260 – 8267.

Nour, V., Panaite, T.D., Ropota, M., Turcu, R., Trandafir, I., Corbu, A.R. (2018) Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste. *CyTA – J. Food* **16**, 222 – 229.

Palloza, P., Catalano, A., Simone, R.E., Mele, M.C., Citadini, A. (2012) Effect of Lycopene and Tomato Products on Cholesterol Metabolism. *Ann. Nutr. Metab.* **61**, 126 – 134.

Pine, S. H. (1994) *Organska kemija*, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb

Pinela, J., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B.P.P., Curran, T.P., Ferreira, I.C.F.R. (2017) Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today's society. *Innov. Food Sci. Emerg.* **41**, 160 – 171.

Ranveer, R.C., Samsheer, N.P., Sahoo, A.K. (2013) Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food Bioprod. Process.* **91**, 370 – 375.

Rapić, V. (2008) *Postupci priprave i izolacije organskih spojeva*. Školska knjiga, Zagreb.

Regal, P., Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC- Trend Anal. Chem.* **56**, 49-73.

doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011

Rizk, E.M., El-Kady, A.T., El-Biali, R.E.L. (2014) Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. *Ann. Agr. Sci.* **59**, 53 – 61.

Robles-Ramírez, M.C., Monterrubio-López, R., Mora-Escobedo, R., Beltrán-Orozco, M.C. (2016) Evaluation of extracts from potato and tomato wastes as natural antioxidant additives. *Arch. Latinoam. Nutr.* **66**, 66-74.

Rubio Diaz, D.E. (2010) Effect of Plant Genotype and Processing Techniques on Stability and Content of Tomato Carotenoids by Infrared Spectroscopy. *PhD Thesis*, The Ohio State University

Sagar, N.A., Sharma, S., Pareek, S. (2017) Extraction, Isolation and Utilisation of Bioactive Compounds from Fresh Fruit and Vegetable Waste. U: Utilization of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste, (Vuong, Q.V., ured.), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, str. 252 – 272.

Saini, R.K., Keum, Y.S. (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* **240**, 90 – 103.

Savatović, S., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Đilas, S. (2011) Tomato Waste: A potential source of hydrophilic antioxidants. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 129 – 137.

Silva, Y.P.A., Borba, B.C., Reis, M.G., Caliari, M., Ferreira, T.A.P.C. (2016) Tomato industrial waste as potential source of nutrients. XV International Technical Symposium Food: the tree that sustains life, Gramado, str. 24 – 27.

Stajčić, S., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Mandić, A., Četojević-Simin, D. (2014) Tomato waste: Carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. *Food Chem.* **172**, 225 – 232.

Strati, I.F., Gogou, E., Oreopoulou, V. (2015) Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food Bioprod. Process.* **94**, 668 – 674.

Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2011) Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 23 – 29.

Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2011) Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chem.* **129**, 747 – 752.

Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2014) Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Res. Int.* **65**, 311 – 321.

Tommonaro, G., Poli, A., De Rosa, S., Nicolaus, B. (2008) Tomato derived polysaccharides for biotechnological applications: chemical and biological approaches. *Molecules* **13**, 1384 – 1398.

Vagi, E., Simandi, B., Vasarhelyine, K.P., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B. (2007) Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. Supercrit. Fluid.* **40**, str. 218 – 226.

Wang X.D. (2014) Carotenoids. U: Modern Nutrition in Health and Disease, (Ross, C.A., Caballero, B., Cousins, R.J., Tucker, K.L., Ziegler, T.R., ured.), 11. izd., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore/Philadelphia, str. 427 – 439.

Yuan, L., Koehler, M., Baudelet, M., Richardson, M. (2012) Fusion of infrared and Raman spectroscopy for carotenoid analysis. Pitcon Conference and Expo 2012, Orlando, str. 1 – 13.

Zidani, S., Benakmoum, A., Ammouche, A., Benali, Y., Bouhadeb, A., Abbeddou, S. (2017) Effect of dry tomato peel supplementation on glucose tolerance, insulin resistance and hepatic markers in mice fed high-saturated-fat/high-cholesterol diets. *J. Nutr. Biochem.* **40**, 164 – 17.

Zuorro, A., Lavecchia, R., Medici, F., Piga, L. (2014) Use of Cell Wall Degrading Enzymes for the Production of High-Quality Functional Products from Tomato Processing Waste. *Chem. Engeneer. Trans.* **38**, 355 – 361.