

Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na prinos ukupnih fenola iz suhe kore rajčice

Gregorović, Romia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:361628>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

Romia Gregorović

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKOG INTENZITETA NA
PRINOS UKUPNIH FENOLA IZ
SUHE KORE RAJČICE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj na Zavodu za opće programe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, te uz pomoć Josipe Dukić, mag. ing



European
Commission

Horizon 2020
European Union funding
for Research & Innovation

Ovaj diplomski rad je napravljen u sklopu projekta „FunTomP – Functionalized Tomato Products“ (PRIMA H2020 GA2032) inicijative PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area), financiranog sredstvima programa Europske unije za istraživanje i inovacije, Horizon 2020 (Obzor, 2020).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA PRINOS UKUPNIH FENOLA IZ SUHE
KORE RAJČICE

Romina Gregorović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058206151

Sažetak:

Svrha ovog rada je utvrditi utjecaj ultrazvučne ekstrakcije i konvencionalne ekstrakcije na prinos ukupnih fenola iz suhe kore rajčice. Tijekom ultrazvučne ekstrakcije praćena je promjena temperature kako bi se mogla izračunati ukupna snaga. Najveći prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana postignut je ultrazvučnom ekstrakcijom i iznosio je $4,92 \pm 0,56$ mg/g_{s.tv.} uz primjenu 100 %-tne amplitude, 9 minuta tretiranja i deionizirane vode kao otapala. Nakon 7. dana skladištenja najveći prinos ukupnih fenola također je postignut uz primjenu ultrazvučne ekstrakcije i iznosio je $4,86 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.} uz amplitudu od 100 %, 6 minuta tretmana i udio etanola od 25 %. Najveća vrijednost ukupne snage iznosila je 59,22W pri 100 %-tnoj amplitudi, 9 minuta tretiranja i udjelu etanola od 25 %. U programu STATGRAPHICS napravljen je dizajn eksperimenta te su određeni statistički značajni parametri i optimalni uvjeti ekstrakcije.

Ključne riječi: *ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, konvencionalna ekstrakcija, fenolni spojevi, suha kora rajčice, skladištenje*

Rad sadrži: 65 stranica, 11 slika, 19 tablica, 69 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Josipa Dukić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. prof. dr. sc. Verica Dragović Uzelac (član)
4. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (zamjenski član)

Datum obrane: 6. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of General Programmes
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND ON THE YIELD OF TOTAL PHENOLS FROM DRY TOMATO PEEL

Romina Gregorović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058206151

Abstract:

The aim of this research is to determine the influence of ultrasound-assisted extraction and conventional extraction on the yield of total phenols from dry tomato peel. The temperature change was monitored during the ultrasound-assisted extraction in order to calculate the total power. The highest yield of total phenols immediately after treatment was 4.92 ± 0.56 mg/g_{s.tv.}, obtained by ultrasound-assisted extraction with an amplitude of 100 %, 9 minutes of treatment and deionized water as solvent. After the 7th day of storage, the highest yield of total phenols was 4.86 ± 0.02 mg/g_{s.tv.}, also obtained by ultrasound-assisted extraction with an amplitude of 100 %, 6 minutes of treatment and an ethanol content of 25%. The highest value of total power was 59.22W with an amplitude of 100 %, 9 minutes of treatment and an ethanol content of 25%. In the STATGRAPHICS program, the design of the experiment was made and statistically significant parameters together with optimal extraction conditions were determined.

Keywords: *ultrasound-assisted extraction, conventional extraction, phenolic compounds, dry tomato peel, storage*

Thesis contains: 65 pages, 11 figures, 19 tables, 69 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Josipa Dukić, MSc*

Reviewers:

1. Sven, Karlović, PhD, Associate professor (president)
2. Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Verica, Dragović Uzelac, PhD, Full professor (member)
4. Jasenka, Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 6th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ODRŽIVO UPRAVLJANJE OTPADOM.....	2
2.2. RAJČICA	3
2.2.1. Osnovne značajke biljke i kemijski sastav	3
2.2.2. Obrada nusproizvoda rajčice	5
2.2.3. Fenolni sastav kore rajčice.....	6
2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	8
2.4. ULTRAZVUK.....	8
2.4.1. Definicija ultrazvuka i podjela.....	8
2.4.2. Sustavi za proizvodnju ultrazvuka	9
2.4.3. Kavitacija	10
2.4.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	11
2.4.5. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom 11	11
2.4.6. Dizajn eksperimenta i metoda odzivne površine	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Suha kora rajčice.....	16
3.1.2. Označavanje uzoraka	16
3.1.3. Kemikalije i standardi.....	16
3.1.4. Laboratorijski uređaji i pribor.....	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija suhe kore rajčice primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom.....	18
3.2.2. Određivanje ukupne snage.....	20
3.2.3. Konvencionalna ekstrakcija suhe kore rajčice u vodenoj kupelji.....	22
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	23
3.2.5. Izrada baždarnog pravca:	23
3.2.6. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase.....	25
3.2.7. Obrada podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA SUHE TVARI SUŠENJEM DO KONSTANTNE	

MASE.....	28
4.2. REZULTATI IZRAČUNA UKUPNE SNAGE, GUSTOĆE SNAGE I ULTRAZVUČNOG INTENZITETA.....	28
4.3. REZULTATI PRINOSA UKUPNIH FENOLA NAKON TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA.....	30
4.4. REZULTATI PRINOSA UKUPNIH FENOLA NAKON TRETMANA KONVENCIONALNOM EKSTRAKCIJOM U VODENOJ KUPELJI.....	35
4.5. OBRADA REZULTATA.....	39
4.5.1. Ultrazvučna snaga.....	39
4.5.2. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja)	42
4.5.3. Prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta.....	46
4.5.4. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja)	50
4.5.5. Prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji	54
5. ZAKLJUČAK	57
6. LITERATURA.....	58

1. UVOD

Rajčica spada među povrće koje se najčešće uzgaja i konzumira na svjetskoj razini. Tijekom njene prerade u različite prehrambene proizvode dolazi do nastanka značajne količine nusproizvoda koji se zajedničkim imenom nazivaju komina rajčice (Abbassi i sur., 2021). Komina rajčice sastoji se od kore i sjemenki te predstavlja izniman problem za industriju zbog nedovoljno učinkovitih načina upravljanja otpadom. Kako bi se smanjilo onečišćenje okoliša, potaknulo recikliranje i povećao prihod industrije, potrebno je usvojiti nove načine iskorištavanja nusproizvoda (Fernando i sur., 2021). Stoga se razvija inovativni koncept održive proizvodnje koja se temelji na ekološki prihvatljivoj upotrebi prehrambenog otpada kao sirovine za nove proizvode (Farcas i sur., 2022).

Kora rajčice predstavlja potencijal za prehrambenu industriju jer sadrži mnoge bioaktivne komponente koje imaju povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka poput karotenoida, vitamina, vlakana, proteina i fenolnih spojeva (Kumar i sur., 2021). Iako se biološki značaj rajčice najviše vezuje uz prisustvo karotenoida, danas se sve više istražuju fenolni spojevi zbog njihovih antioksidativnih, antimutagenih i citotoksičnih svojstava (Perea-Dominguez i sur., 2018).

Prinos fenolnih komponenti iz kore rajčice može se poboljšati pravilnim izborom ekstrakcijskog postupka. Pritom je važno da ekstrakcijski postupak ne narušava stabilnost fenolnih spojeva te da se upotrebljavaju otapala sigurna za ljudsku potrošnju (Arrudaa i sur., 2019). Toplinskim tretiranjem može se produljiti rok valjanosti proizvoda od rajčice, ali tada postoji opasnost od narušavanja njihove nutritivne i senzorske kvalitete tijekom skladištenja (Jadhav i sur., 2021; Vallverdú-Queralt i sur., 2011b). Smanjenje toplinske degradacije postiže se upotrebom netoplinskih postupaka, a kao održiva alternativa predlaže se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Medina-Torres i sur., 2017).

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti utjecaj netoplinskog tretmana ultrazvukom visokog intenziteta i konvencionalnog tretmana (pomoću ultrazvučne kupelji) na prinos ukupnih fenola iz suhe kore rajčice uz utvrđivanje ukupne snage za vrijeme netoplinskog tretmana. Također je praćena i stabilnost fenolnih spojeva tijekom skladištenja kako bi se ustanovila promjena u kvaliteti proizvoda. Optimizacija ekstrakcijskih parametara provedena je za oba postupka s ciljem povećanja prinosa i smanjenja troškova analize.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ODRŽIVO UPRAVLJANJE OTPADOM

Porast broja stanovnika, konkurentnost na tržištu i klimatske promjene u današnje su vrijeme glavni razlozi koji dovode do neodržive upotrebe prirodnih resursa i na taj način utječu na promjene u proizvodnji hrane (Imbert, 2017). Prema podacima Organizacije za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*) procijenjeno je da se jedna trećina hrane proizvedene na svijetu (1,3 milijardi tona) godišnje odbacuje tijekom proizvodnog postupka ili završava kao otpad. Od toga se 14 % jestivih dijelova hrane gubi u fazama od berbe do distribucije u maloprodajne centre, a 17 % otpada nastaje na razini maloprodaje i kućanstva (FAO, 2023).

Najzastupljenija kategorija je otpad nastao iz industrije voća i povrća koji obuhvaća jestive ili nejestive dijelove voća i povrća odbačene tijekom prerade, distribucije i konzumacije. U zemljama u razvoju najviše otpada voća i povrća nastaje zbog nedovoljnog kapaciteta skladištenja i transporta. S druge strane, u industrijaliziranim zemljama najveća količina otpada voća i povrća stvara se u maloprodaji radi postavljenih standarda kvalitete i u kućanstvu kao posljedica ponašanja potrošača (Esparza i sur., 2020; Coman i sur., 2019). U industriji voća i povrća tijekom prerade se stvara približno 25 – 30 % otpada sastavljenog od lišća, korijenja, gomolja, kore i sjemenki. Razgradnja otpada na odlagalištima dovodi do otpuštanja štetnih stakleničkih plinova, zagađenja podzemnih voda i promjene kvalitete tla zbog čega nusproizvodi predstavljaju značajan ekološki problem. Uz to, tijekom industrijske prerade voća i povrća osim krutog otpada nastaje i velika količina otpadnih voda koje također zahtijevaju prikladno upravljanje (Nayak i sur., 2019; Sagar i sur., 2018).

Prema sadašnjoj hijerarhiji upravljanja otpadom najpoželjnija opcija je sprječavanje nastajanja otpada zbog povoljnog utjecaja na okoliš, ali se također smatra i najviše izazovnom opcijom zbog ekonomskih i tehnoloških ograničenja. Nakon toga slijede aktivnosti ponovne upotrebe hrane u obliku donacije i aktivnosti recikliranja poput proizvodnje hrane za životinje ili kompostiranja. Kada nije moguće primijeniti navedene aktivnosti, upravljanje otpadom dijeli se na metode valorizacije i metode odlaganja koje su prikazane u tablici 1 (Imbert, 2017).

Tablica 1. Metode upravljanja otpadom (prema Esparza i sur., 2020; Imbert, 2017)

Metode oporavka (valorizacija)		Metode odlaganja (konvencionalne metode)	
Biorafinerija	Pretvorba otpada u biomaterijale (npr. bioplastika)	Spaljivanje bez oporavka energije	Kontrolirano izgaranje otpada radi smanjenja krute tvari
Anaerobna digestija	Proizvodnja obnovljive energije u odsustvu kisika (npr. metan)	Odlagališta otpada	Postrojenja dizajnirana za odlaganje otpada
Spaljivanje	Kontrolirano izgaranje otpada radi dobivanja energije	Obrada otpadnih voda	Ispiranje ostataka hrane u kanalizaciju ili u postrojenje namijenjeno za tretiranje otpadne vode
Ekstrakcija	Valorizacija bioaktivnih komponenti	Odbacivanje	Otpad se odbacuje na kopnu ili u more

Otpad voća i povrća predstavlja potencijal za valorizaciju jer sadrži vrijedne bioaktivne komponente koje se mogu oporabiti pomoću postupka ekstrakcije. Konvencionalna ekstrakcija otapalima najčešće se upotrebljava zbog jednostavnosti i niskih troškova, no ima i nekoliko nedostataka kao što su dugo vrijeme tretiranja, niska selektivnost i potreba za velikim volumenima otapala. Kako bi se poboljšao prinos ciljane komponente i spriječio gubitak funkcionalnih svojstava krajnjeg proizvoda, danas se uvode nove tehnologije poput ultrazvučne ekstrakcije ili ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Esparza i sur., 2020; Coman i sur., 2019).

2.2. RAJČICA

2.2.1. Osnovne značajke biljke i kemijski sastav

Rajčica je plod biljke *Solanum lycopersicum* L. iz obitelji Solanaceae i uzgaja se u području umjerene klime diljem svijeta (Madia i sur., 2021). Prema podacima iz FAOSTATA, u 2021. godini je na svijetu proizvedeno 189 133 955 tona rajčica na 5 167 388 hektara površine (FAOSTAT, 2023).

Plodovi rajčice razlikuju se po boji (crvena, žuta, ljubičasta, zelena), obliku (ovalan ili sferičan) i veličini (1,5 – 7,5 cm) (Laranjeira i sur., 2022). Boja ploda mijenja se pod utjecajem različitih karotenoida ovisno o fazi zrelosti. U ranoj fazi plod je zelene boje nastale od klorofila, a sazrijevanjem mijenja boju od žute prema narančastoj zbog prisutnosti beta-karotena. U fazi potpune zrelosti plod rajčice crvene je boje zbog utjecaja likopena (Ademosun i sur., 2021). Prosječan kemijski sastav rajčice prikazan je u tablici 2 (Ali i sur., 2021).

Tablica 2. Prosječan kemijski sastav rajčice (prema Ali i sur., 2021)

Parametar	Vrijednost
Energija (kcal/100 g)	34,67 ± 18,74
Pepeo (%)	8,75 ± 1,69
Vlaga (g/100 g)	91,18 ± 6,83
Ukupni proteini (g/100 g)	17,71 ± 5,40
Masti (g/100 g)	4,96 ± 1,19
Ugljikohidrati (g/100 g)	5,96 ± 1,37
Ukupni šećeri (g/100 g)	50,60 ± 3,69
pH	3,83 ± 0,21
Kiselost (%)	0,48 ± 0,07
Reducirajući šećeri (%)	35,84 ± 4,57
Fruktoza (%)	2,88 ± 0,49
Glukoza (%)	2,45 ± 0,48
Saharoza (%)	0,02 ± 0,05
Ukupna vlakna (g/100 g)	11,44 ± 9,31

Osim navedenog, rajčica predstavlja i dobar izvor minerala koji su važni za mnoge tjelesne funkcije. U rajčici je identificirano 23 minerala, a od toga su najzastupljeniji makrominerali kalij (403,02 ± 254,41 mg/100 g), fosfor (300,99 ± 32,12 mg/100 g) i magnezij (172,58 ± 58,92 mg/100 g). Od ostalih minerala zastupljeni su krom (193,80 ± 133,80 µg/100 g), aluminij (1241,38 ± 0,00 µg/100 g) i fluor (413,79 ± 0,00 µg/100 g). Bogat vitaminski sastav također obilježava rajčicu, a najprisutniji su vitamin C (36,16 ± 29,64 mg/100 g). B9 (14,00 ± 1,00 mg/100 g), vitamin A (614,44 ± 248,18 IU/100 g), vitamin E (15,08 ± 1,06 µg/100 g) i vitamin K (98,28 ± 0,00 µg/100 g). Najzastupljenije masne kiseline su polinezasićene masne kiseline (57,55 ± 23,51 g/100 g), a od esencijalnih masnih kiselina najčešća je linolna kiselina

(49,40 ± 4,16 g/100 g). U rajčici je identificirano 17 aminokiselina, a od toga je najviša razina glutamata (10,13 ± 4,44 g/100 g proteina). Esencijalne aminokiseline u prosjeku čine 39,75 % ukupnih proteina u rajčici i među njima je najčešća aminokiselina leucin (2,80 ± 2,28 g/100 g proteina). Važno je napomenuti da rajčica sadrži i značajne količine karotenoida koji imaju funkciju antioksidansa. Među njima su najzastupljeniji likopen (8002,50 ± 243.54 µg/100 g) i β-karoten (9942,16 ± 264,74 µg/100 g). Antioksidativna aktivnost pripisuje se i sterolima čija ukupna količina u rajčici iznosi 1283,25 ± 239.39 mg/kg, a glavni identificirani steroli su β-sitosterol (720.00 ± 175.64 mg/kg) i stigmasterol (387,50 ± 88,71 mg/kg) (Ali i sur., 2021).

2.2.2. Obrada nusproizvoda rajčice

Rajčice se mogu konzumirati u svježem obliku ili se prerađuju u umake, konzervirane rajčice, sokove i *ketchup*. Industrijskom obradom rajčice posljedično dolazi do gubitka 5 – 30 % materijala koji se naziva komina rajčice (Abbassi i sur., 2021; Kumar i sur., 2021). Na svjetskoj razini godišnje nastaje između 5,4 i 9,0 milijuna tona komine rajčice koja se sastoji od približno 33 % sjemenki, 27 % kore i 40 % pulpe (Abbassi i sur., 2021; Madia i sur., 2021; Coman i sur., 2019).

Glavni problem industrije prerade rajčice je prihvatljivo upravljanje otpadom zbog negativnog utjecaja na okoliš (Coman i sur., 2019). Iako se nusproizvodi rajčice uglavnom upotrebljavaju u obliku hrane za životinje ili komposta, u novije vrijeme razmatra se njihova primjena kao sirovina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Trombino i sur., 2021; Perea-Dominguez i sur., 2018). Naime, komina rajčice je izvor bioaktivnih komponenti poput polifenola, karotenoida, vlakana, proteina i pigmenta pa stoga predstavlja potencijal za stvaranje ekonomske dobiti (Abbassi i sur., 2021, Madia i sur., 2021). Nusproizvodi rajčice mogu se podvrgnuti postupku ekstrakcije bioaktivnih komponenti koje se upotrebljavaju u proizvodnji funkcionalne hrane (Socas-Rodriguez i sur., 2021; Perea-Dominguez i sur., 2018).

Prilikom valorizacije otpada važno je odrediti udio vlage koji služi kao parametar za procjenu stabilnosti i mikrobiološke sigurnosti ekstrakata ili krajnjih proizvoda. Prehrambeni otpad sklon je degradaciji zbog visokog udjela vlage pa se u valorizaciji često primjenjuje korak sušenja (Socas-Rodriguez i sur., 2021). Cilj takvog predtretmana je smanjiti sadržaj vode i enzimsku aktivnost u biljnom matriksu (Coman i sur., 2019). Sušenje poboljšava učinkovitost ekstrakcijskog postupka jer dovodi do bubrenja i hidratacije biljnog materijala u kontaktu s otapalom. Posljedično se povećavaju pore stanične stijenke i kontaktna površina između otapala i biljnog materijala, a to može povoljno utjecati na prinos fenolnih spojeva (Medina-Torres i

sur., 2017). Osim toga, sušenjem se produljuje rok valjanosti proizvoda i smanjuju se troškovi transporta zbog manje mase. Nakon postupka sušenja komina rajčice sastoji se od približno 44 % sjemenki i 56 % kore i pulpe zajedno (Abbassi i sur., 2021). Iako ima mnogo prednosti, postupak sušenja može se negativno odraziti na senzorsku kvalitetu nusproizvoda rajčice kao što su izgled, okus i tekstura (Jadhav i sur., 2021).

2.2.3. Fenolni sastav kore rajčice

Fenolne komponente su sekundarni biljni metaboliti koji se sintetiziraju prilikom normalnih metaboličkih procesa ili tijekom oštećenja prouzročnog mikroorganizmima, temperaturom i UV zračenjem. U biljkama djeluju kao antioksidansi jer doniraju vodikove atome reaktivnim kisikovim vrstama i na taj način sprječavaju oštećenja stanica uzrokovana slobodnim radikalima. Zbog navedenih antioksidativnih svojstava smatra se da fenolne komponente u prehrani imaju ulogu u prevenciji različitih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Osim obrambene uloge, fenolni spojevi utječu i na senzorska svojstva hrane poput mirisa, okusa i boje (Alara i sur., 2021; Albuquerque i sur., 2021; Ali i sur., 2021). Stupanj zrelosti biljke, klima, tlo, geografska lokacija i uvjeti skladištenja neki su od važnih čimbenika koji utječu na njihov udio u biljkama (Sharmin i sur., 2016).

Fenolne komponente sadrže barem jedan aromatski prsten i hidroksilnu grupu i po kemijskoj strukturi dijele se u dvije osnovne skupine na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi u strukturi imaju 15 atoma ugljika, odnosno dva aromatska prstena A i B povezana s heterocikličkim piranskim prstenom C. Prema vezi između B i C prstena i supstituciji C prstena flavonoidi se dijele u šest podskupina na flavone, flavanone, flavane, flavonole, izoflavone i antocijanidine (Albuquerque i sur., 2021).

Neflavonoidi su skupina koja se sastoji od fenolnih kiselina, stilbena, tanina, neolignana i kumarina. Među njima su najjednostavnija grupa fenolne kiseline koje sadrže jedan aromatski prsten vezan s karboksilnom kiselinom i dijele se na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicinaminske kiseline (Albuquerque i sur., 2021; Pattnaik i sur., 2021; Khan i sur., 2018).

Valdez-Morales i sur. (2014) su istraživali fenolne komponente iz kore četiri vrsta rajčica (*Grape*, *Cherry*, *Bola* i *Saladette*). Nakon provedene Folin-Ciocalteu analize zaključili su da je prinos ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima kore rajčice bio u rasponu od 71,6 do 351,6 mg EGK/100 g brašna kore rajčice (engl. *Gallic acid equivalents*, *EGK*). Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*,

HPLC) su identificirali 8 vrsta fenolnih kiselina i 8 vrsta flavonoida te su ustanovili da se približno 60 % prinosa ukupnih fenola odnosi na flavonoide i 30 % na fenolne kiseline. U tablici 3. prikazane su vrste fenolnih komponenti identificirane u uzorcima kore rajčice.

Tablica 3. Fenolne komponente u uzorcima kore rajčice (prema Valdez-Morales i sur., 2014)

Fenolne komponente		Vrsta	Koncentracija (mg/100 g _{s.tv.})		
			Najniža	Najviša	
Fenolne kiseline	Hidroksicinaminske kiseline	Kafeinska kiselina	5,11 ± 1,24	22,06 ± 3,24	
		Vanilinska kiselina	1,57 ± 0,11	11,27 ± 0,50	
		Ferulinska kiselina	1,36 ± 0,05	4,56 ± 0,22	
		Sinapska kiselina	2,66 ± 0,80	4,22 ± 0,17	
		Klorogenska kiselina	0,41 ± 0,10	3,24 ± 0,72	
		p-kumarna kiselina	0,64 ± 0,04	1,57 ± 0,15	
		Transcimetna kiselina	0,22 ± 0,06	2,42 ± 0,28	
		Hidroksibenzojeve kiseline	Galna kiselina	0,00 ± 0,00	0,95 ± 0,13
Flavonoidi	Flavonoli	Kvercetin-3-O-β-glukozid	15,12 ± 2,04	47,99 ± 2,71	
		Rutin	4,56 ± 0,49	20,09 ± 0,13	
		Izohamnetin	1,03 ± 0,03	3,17 ± 0,12	
		Kamferol	1,06 ± 0,20	3,74 ± 0,58	
		Kvercetin	0,19 ± 0,01	2,58 ± 0,18	
		Miricetin	0,16 ± 0,00	0,66 ± 0,05	
		Flavanoni	Naringenin	0,00 ± 0,00	4,86 ± 0,39
		Flavoni	Apigenin	0,82 ± 0,04	1,55 ± 0,23

2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola u biljnim materijalima najčešće se određuje putem kolorimetrijske Folin-Ciocalteu metode koja se bazira na reakcijama prijenosa elektrona između Folin-Ciocalteu reagensa i fenolnih spojeva (Lamuela-Raventós i sur., 2018; Sanchez-Rangel i sur., 2013). Točan sastav Folin-Ciocalteu reagensa nije poznat, ali se smatra da sadrži smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline (Platzer i sur., 2021).

Reakcija između fenolnih spojeva i Folin-Ciocalteu reagensa odvija se pri $\text{pH} = 10$ koji se postiže dodatkom natrijevog karbonata. U alkalnim uvjetima dolazi do stvaranja fenoksid-iona koji ulazi u reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom, pritom se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens se reducira do volframovih oksida i molibdenovih oksida plavog obojenja (Platzer i sur., 2021). Plavi kompleks može se kvantificirati spektrofotometrijski na valnim duljinama od 750 nm do 765 nm, a intenzitet apsorpcije povećava se linearno s koncentracijom fenolnih komponenti (Gulcin, 2020; Hudz i sur., 2019). Rezultati prinosa ukupnih fenola većinom se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline koja se uobičajeno upotrebljava kao referentni standard (Gulcin, 2020).

Folin-Ciocalteu metoda je brza, jednostavna i jeftina i stoga se primjenjuje kao rutinska laboratorijska analiza (Blainski i sur., 2013). Nedostatci metode uključuju osjetljivost na pH , reakcijsko vrijeme i temperaturu te nespecifičnost Folin-Ciocalteu reagensa. Uz to, metoda se provodi u vodenom mediju pa je primjena za lipofilne komponente ograničena (Munteanu i Apetrei, 2021).

2.4. ULTRAZVUK

2.4.1. Definicija ultrazvuka i podjela

Ultrazvučni valovi su zvučni valovi koji se nalaze u rasponu frekvencija od 20 kHz do 10 MHz i nastaju u nizu ciklusa širenja i skupljanja (Medina-Torres i sur., 2017). Prema Medina-Torres i sur. (2017) glavne značajke ultrazvučnih valova su:

1. duljina: udaljenost između dvije točke širenja ili skupljanja
2. amplituda: najveća visina vala
3. frekvencija (Hz): broj ciklusa po jedinici vremena
4. brzina (m/s): umnožak frekvencije i valne duljine

5. snaga (W): omjer između prenesene energije i vremena tretiranja
6. intenzitet (W/cm²): omjer jedinice snage po jedinici površine

Ultrazvuk se prema intenzitetu dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta. Značajke ultrazvuka niskog intenziteta su visoke frekvencije u rasponu od 2 MHz do 10 MHz i intenzitet manji od 1 W/cm². Takva vrsta ultrazvuka nema razoran učinak na medij koji se tretira jer stvara slabiji fenomen kavitacije. Zbog navedenih obilježja koristi se u analizama hrane za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava materijala. Ultrazvuk visokog intenziteta obilježavaju niska frekvencija i ultrazvučni intenzitet viši od 1 W/cm². U ovoj vrsti ultrazvuka stvara se snažniji kavitacijski učinak pa se stoga upotrebljava u raznolikim postupcima poput ekstrakcije, emulzifikacije, homogenizacije, inaktivacije enzima, kontrole kristalizacije, sušenja i smrzavanja (Chavan i sur., 2022; Khadhraoui i sur., 2021; Nowacka i sur., 2021; Sedem Dzah i sur., 2020).

Ultrazvuk se može upotrebljavati samostalno ili u kombinaciji s drugim tretmanima. Naziv ultrasonikacija koristi se kada se ultrazvuk primjenjuje na niskim temperaturama kako bi se očuvale komponente osjetljive na toplinu. Termosonikacija je naziv za istovremenu primjenu ultrazvuka i povišene temperature s ciljem poboljšane inaktivacije mikroorganizama. Upotreba povišenog tlaka zajedno s ultrazvukom pri niskim temperaturama naziva se manosonikacija. Manotermosonikacija je naziv za istovremenu primjenu ultrazvuka, povišenog tlaka i temperature čiji je cilj poboljšati učinkovitost fenomena kavitacije i povećati inaktivaciju mikroorganizama (Chavan i sur., 2022).

2.4.2. Sustavi za proizvodnju ultrazvuka

Sustavi za proizvodnju ultrazvučnih valova sastoje se od generatora, pretvornika i sustava za isporuku ultrazvuka. Generator pretvara električnu energiju u izmjeničnu struju na određenoj frekvenciji, a nakon toga ju pretvornik pretvara u mehaničke vibracije. Pritom pretvornik može biti magnetostriksijski, piezoelektrični ili pokrenut tekućinom i smatra se ključnim uređajem u ultrazvučnom sustavu. Sustav isporuke nalazi se na kraju ultrazvučnog sustava i ima svrhu prijenosa mehaničkih vibracija do ultrazvučnog reaktora (Tao i Sun, 2015).

Dvije osnovne vrste sustava za proizvodnju ultrazvuka su ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda. Sustav s ultrazvučnom kupelji upotrebljava se u rasponu frekvencija između 40 kHz i 100 kHz, a snaga ultrazvučne kupelji ovisi o vrsti i broju pretvornika koji se nalaze u podnožju kupelji ili s vanjske strane (Paniwnyk i sur., 2017). Prilikom izvođenja tretmana u

kupelji, ultrazvučni valovi prvo prolaze kroz otapalo u kupelji i zid spremnika, a tek nakon toga dolaze u ekstrakcijski medij. Takav tretman stoga se naziva neizravnom sonikacijom i rezultira nižom brzinom ekstrakcije i slabijim učinkom kavitacije od onih dobivenih primjenom sustava sa sondom. Prednost upotrebe ultrazvučne kupelji je jednostavno rukovanje i ekonomičnost, a mogućnost kontaminacije je manja u odnosu na izravni tretman. Nedostaci primjene su niska reproducibilnost i niski prinosi bioaktivnih komponenti (Sedem Dzah i sur., 2020; Wen i sur., 2018).

Ultrazvučni sustav sa sondom napravljen je od materijala poput nehrđajućeg čelika i aluminija i obilježava ga izravno djelovanje ultrazvuka na uzorak (Patel i sur., 2021). Prednost upotrebe ultrazvučne sonde je veća brzina reakcije i masenog prijenosa zbog odsustva prepreka tijekom širenja ultrazvučnog vala. Neposredni kontakt ultrazvučnog vala i medija dovodi do snažnijeg kavitacijskog učinka i posljedično do poboljšanja ekstrakcijskog prinosa. Nedostatak ove vrste sustava je kontaminacija sonde ostacima ekstrakcijskog medija, moguća korozija sonde i gubitak hlapljivih komponenti (Sedem Dzah i sur., 2020; Wen i sur., 2018).

2.4.3. Kavitacija

Ultrazvučni valovi osciliraju kroz fizički medij i pritom se stvaraju područja s varijacijama višeg i nižeg tlaka koja se nazivaju ciklusima širenja i skupljanja. Tijekom negativnog tlačnog ciklusa dolazi do razdvajanja molekula tekućine i stvaranja praznina koje se nazivaju kavitacijski mjehurići. Ciklusi širenja i skupljanja potom dovode do difuzije plina iz tekućine u kavitacijske mjehuriće. Plin se nakuplja u mjehurićima koji zbog toga kontinuirano rastu putem mehanizma rektifikacijske difuzije. Mjehurići rastu dok ne dostignu kritičnu rezonantnu veličinu koja ovisi o primijenjenoj frekvenciji. Kada se primjenjuje ultrazvuk niskog intenziteta, nastali mjehurići nazivaju se stabilnim kavitacijskim mjehurićima. Prijelazni kavitacijski mjehurići oblikuju se pri akustičnim intenzitetima većim od 10 W/cm^2 i njihova značajka je da se šire do polumjera dvostruko većeg od polaznog. Na kraju ciklusa skupljanja dolazi do njihovog nasilnog urušavanja (Chavan i sur., 2022; Pattnaik i sur., 2021). Prilikom implozije mjehurića oslobađa se velika količina energije i nastaju mjesta s visokim temperaturama od 5000 K i tlakom većim od 50 MPa . Implozija nema utjecaj na cjelokupni sustav jer djeluje lokalizirano i kratkotrajno (Jadhav i sur., 2021; Khadhraoui i sur., 2021; Mohd Basri i sur., 2021). Zbog kontinuiranog stvaranja i kolapsa kavitacija u sustavu dolazi do stvaranja mikromlaznica usmjerenih prema površini čvrstog matriksa (Khadhraoui i sur., 2021).

2.4.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcijski postupak može se opisati kao prijenos ciljanih komponenti od sirovina do otapala (Tao i Sun, 2015). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na principu kavitacije i smatra se učinkovitijom u odnosu na konvencionalne ekstrakcijske postupke zbog kraćeg vremena tretiranja, jednostavnosti, uštede energije i povećanog prinosa (Sharayei i sur., 2019). Osim toga, ultrazvučni tretman pogodan je za ekstrakciju komponenti osjetljivih na toplinu jer se odvija pri relativno niskim temperaturama. Na taj način sprječava se toplinska degradacija komponenti, a posljedično se smanjuje i isparavanje otapala (Mohd Basri i sur., 2021; Tao i Sun, 2015).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom zasniva se na više različitih mehanizama. Fragmentacija je prvi mehanizam uključen u ekstrakcijski proces koji nastaje kada se čestice matriksa sudaraju s ultrazvučnim valovima. Zbog nastalog sudara čestice se smanjuju pa se tako olakšava maseni prijenos. Erozijska nastaje kada kavitacijski mjehurići implodiraju na površini biljnog matriksa i posljedično se povećava raspoloživost otapala. Sonokapilarnost i sonoporacija djeluju na način da poboljšavaju prodiranje otapala kroz kanale nastale implozijom kavitacijskih mjehurića i mijenjaju propusnost stanične membrane. Mehanizam naprezanja dovodi do urušavanja kavitacijskog mjehurića u otapalo zbog pojave oscilacije (Medina-Torres i sur., 2017). Posljedica nastalih oštećenja stanične stijenke je da bioaktivne komponente unutar stanice postaju pristupačnije za ekstrakciju (Khadhraoui i sur., 2021).

2.4.5. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

2.4.5.1. Otapalo

Prilikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom potrebno je odabrati otapalo ovisno o afinitetu za ciljane komponente, viskoznosti, točki vrelišta, specifičnoj gustoći i polarnosti. Najčešća otapala koja se odabiru za ekstrakciju bioaktivnih komponenti su voda i organska otapala poput etanola, metanola, acetona i izopropanola (Sedem Dzah i sur., 2020). No, upotreba čistih organskih otapala može dovesti do dehidratacije, razaranja biljnih stanica i denaturacije proteina stanične stijenke te se tako otežava ekstrakcija. Kako bi se poboljšao prinos fenolnih spojeva, često se koriste mješavine vodene faze i organske faze u različitim omjerima ovisno o polarnosti ciljane komponente (Medina-Torres i sur., 2017). Za ekstrakciju fenolnih spojeva preporuča se primjena etanola jer je općenito priznat kao sigurno otapalo (engl. *Generally recognised as safe, GRAS*) pa je i krajnji proizvod siguran za ljudsku upotrebu. Uz

navedeno, obilježava ga visok afinitet prema fenolnim spojevima i podrijetlo iz obnovljivih izvora (Kumar i sur., 2021).

2.4.5.2. *Omjer otapala i otopljene tvari*

Važan čimbenik koji utječe na maseni prijenos tijekom ekstrakcijskog postupka je omjer otapala i otopljene tvari. Izbor optimalnog omjera otapala i otopljene tvari može poboljšati ekstrakcijski prinos zbog visokog koncentracijskog gradijenta. Povećanje razine otopljene tvari iznad optimalne dovodi do smanjenja ekstrakcijskog prinosa jer je volumen otapala nedovoljan za ostvarivanje masenog prijenosa iz krute tvari u otapalo i spriječen je prijenos ultrazvučne energije u otapalo (Tao i Sun, 2015). S druge strane, primjena volumena otapala većeg od optimalnog dovodi do ubrzanja postupka difuzije i povećanja prinosa, no može dovesti i do ekstrakcije neželjenih spojeva. Tada se povećava trošak ekstrakcijskog postupka zbog daljnjih postupaka obrade i nastaje veća količina otpada (Medina-Torres i sur., 2017).

2.4.5.3. *Temperatura*

Temperatura je jedan od glavnih parametara koji utječe na ekstrakcijsku učinkovitost, a njen odabir ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima biljnog materijala i prisutnim vrstama fenolnih spojeva (Sedem Dzah i sur., 2020). Provođenje ekstrakcije na višim temperaturama može pozitivno utjecati na ekstrakcijski prinos jer dolazi do opadanja viskoznosti i površinske napetosti otapala. Visoke temperature uz to pogoduju nastanku većeg broja kavitacijskih mjehurića i povećavaju kontaktnu površinu između otapala i krute tvari. Otapalo zbog toga bolje prodire u matriks i posljedično se poboljšava topljivost ciljane komponente i maseni prijenos (Kumar i sur., 2021; Medina-Torres i sur., 2017). No, uslijed primjene povišenih temperatura dolazi i do porasta tlaka pare otapala te u šupljine kavitacijskih mjehurića ulazi više pare otapala. Intenzitet implोजije se smanjuje zbog povišenog tlaka pare i niže površinske napetosti pri čemu nastaju manja oštećenja stanica, a to negativno utječe na ekstrakcijski prinos (Kumar i sur., 2021; Chemat i sur., 2017). Unatoč prednostima upotrebe povišene temperature, prilikom ultrazvučne ekstrakcije fenolnih spojeva uobičajena je primjena nižih temperatura kako bi se spriječila njihova hidroliza i oksidacijska degradacija te poboljšala stabilnost (Sedem Dzah i sur., 2020).

2.4.5.4. *Frekvencija*

Ultrazvučna frekvencija je idući čimbenik koji je važan za postizanje optimalnog ekstrakcijskog prinosa jer utječe na stabilnost bioaktivnih komponenti. Naime, tijekom kolapsa kavitacijskih mjehurića dolazi do nastanka hidroksilnih radikala koji mogu sudjelovati u degradaciji bioaktivnih komponenti, a njihova količina povećava se na višim frekvencijama (Wang i sur., 2018; Tao i Sun, 2015). Primjena ultrazvuka visoke frekvencije i niskog intenziteta također dovodi do pojave većeg broja kavitacijskih mjehurića. No, tada se fenomen kavitacije teže izaziva jer mjehurići nemaju dovoljno vremena za oblikovanje i rast pa implodiraju manjim intenzitetom, a to negativno utječe na ekstrakcijski prinos (Sedem Dzah i sur., 2020; Chemat i sur., 2017).

Kako bi se ta pojava spriječila, ekstrakcijski postupak odvija se u rasponu nižih frekvencija od 20 kHz do 100 kHz (Khadhraoui i sur., 2021; Nowacka i sur., 2021; Medina-Torres i sur., 2017). Primjena ultrazvuka niske frekvencije i visokog intenziteta dovodi do stvaranja pogodnih mehaničkih sila i sila smicanja. Ciklusi širenja i skupljanja se produljuju pri nižim frekvencijama, što doprinosi nastanku manjeg broja kavitacijskih mjehurića većeg promjera. Takva vrsta mjehurića snažnije implodira te dolazi do boljeg prodiranja otapala i veće ekstrakcijske brzine (Kumar i sur., 2021; Sedem Dzah i sur., 2020).

2.4.5.5. *Vrijeme tretiranja*

Na učinkovitost ekstrakcijskog postupka utječe i trajanje ultrazvučnog tretmana. Početno produljenje trajanja sonikacije povoljno djeluje na fenomen kavitacije i poboljšava kontakt otopljene tvari i otapala. No, predugo trajanje ultrazvučnog tretmana može dovesti do strukturnih promjena ciljanih komponenti i smanjenja ekstrakcijskog prinosa (Kumar i sur., 2021).

2.4.5.6. *Amplituda*

Povećanjem amplitude povećavaju se ultrazvučni intenzitet i snaga i to utječe na rast energije povezane s kolapsom kavitacijskih mjehurića. Postupak ekstrakcije postaje intenzivniji jer se povećava broj ciklusa širenja i skupljanja te se tako može poboljšati ekstrakcijski prinos (Das i sur., 2022; Medina-Torres i sur., 2017). Primjena viših amplituda također je poželjna prilikom tretiranja uzoraka veće viskoznosti (Chavan i sur., 2022).

2.4.5.7. *Način rada*

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može se provoditi u kontinuiranom načinu bez intervala ili pulsirajućem načinu s intervalima. Upotreba kontinuiranog načina tijekom produljenog vremena pri visokoj frekvenciji ili snazi može dovesti do degradacije ili oksidacije fenolnih komponenti jer dolazi do stvaranja visoko reaktivnih hidroksilnih radikala (Medina-Torres i sur., 2017).

Kod pulsirajućeg načina rada su trajanje pulsa i intervali ključni za postizanje većeg ekstrakcijskog prinosa u kraćem vremenskom trajanju. U slučaju produljenog trajanja ekstrakcijskog tretmana preporuča se upotreba pulsirajućeg načina rada jer se tako ne narušava bioaktivnost ekstrahiranih komponenti i potrošnja energije je manja (Tao i Sun, 2015).

2.4.6. Dizajn eksperimenta i metoda odzivne površine

U stvarnom sustavu svi navedeni čimbenici mogu utjecati na učinkovitost ekstrakcijskog postupka i stoga je potrebno provesti optimizaciju s ciljem povećanja prinosa i smanjenja troškova. Optimalni radni uvjeti mogu se određivati na način da se prati promjena jednog parametra dok drugi parametri ostaju nepromijenjeni. Nedostatak takvog načina je da se u obzir ne uzimaju interakcije parametara pa je zato učinak parametara na odgovor nepotpun. Metoda odzivne površine uvodi se kao bolja metoda za analizu istovremenog učinka varijabli i sastoji se od grupe matematičkih i statističkih tehnika pomoću kojih se predviđaju optimalni uvjeti ekstrakcije koji se mogu potvrditi eksperimentalnim putem (Baş i Boyaci, 2007).

Metodom odzivne površine definira se utjecaj nezavisnih varijabli, samostalno ili u kombinaciji, na odgovor (Baş i Boyaci, 2007). Pritom se nezavisne varijable mogu mijenjati neovisno jedna o drugoj, dok su zavisne varijable pod utjecajem nekoliko nezavisnih varijabli (Yolmeh i Jafari, 2017). Prvi korak metode odzivne površine stoga je određivanje nezavisnih parametara i njihovih razina kako bi optimizacija bila uspješna. Nakon toga je potrebno izabrati eksperimentalni dizajn s nizom pokusa u kojima se promatra odgovor za određene postavke ulaznih varijabli unutar određenog područja (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

Regresijskom analizom rezultata potom se određuje polinomska jednadžba modela uz korištenje regresijskih koeficijenata sa statistički značajnim učinkom na odgovor. Jednadžbom modela predviđaju se optimalni uvjeti postupka koji će rezultirati najvećim ili najmanjim odzivom. Optimalni uvjeti ispravno su određeni ako je razlika između eksperimentalno dobivenih odgovora neznatna u odnosu na odgovore predviđene putem regresijske jednadžbe.

Tada se zaključuje da je matematički model dobro prilagođen eksperimentalnim podacima (Yolmeh i Jafari, 2017).

Predviđena jednažba modela se u zadnjem koraku može vizualizirati putem dijagrama odzivne površine i konturnih dijagrama. Dijagram odzivne površine je trodimenzionalni prikaz veze između odgovora i nezavisnih varijabli koji pruža informacije o pristajanju modela. Konturni dijagram je dvodimenzionalni prikaz dijagrama odzivne površine u kojemu se rasponi konstantnih zavisnih varijabli nalaze u ravnini nezavisnih varijabli. Oba dijagrama predstavljaju vizualizaciju procijenjenih odgovora, a ne stvarnu strukturu (Yolmeh i Jafari, 2017; Baş i Boyaci, 2007).

Metodom odzivne površine moguće je razviti i poboljšati proizvodni postupak, a glavna prednost je izvođenje manjeg broja pokusa u odnosu na klasične eksperimentalne metode uz procjenu učinka višestrukih parametara i njihovih interakcija na odgovor. No, svi sustavi nemaju podatke koji dobro pristaju polinomskoj jednažbi pa je to nedostatak metode (Yolmeh i Jafari, 2017; Baş i Boyaci, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Suha kora rajčice

Tijekom ovog istraživanja korištena je liofilizirana suha kora rajčice dobivena od voditelja projekta FunTomP. Uzorci suhe kore rajčice skladišteni su na sobnoj temperaturi na tamnom i suhom mjestu do ekstrakcije.

3.1.2. Označavanje uzoraka

27 uzoraka suhe kore rajčice tretirano je ultrazvukom visokog intenziteta i 9 uzoraka je tretirano toplinskom ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji s različitim kombinacijama ulaznih parametara. Oznake uzoraka i njihovo značenje prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Osnovne oznake uzoraka pripremljenih za tretmane ekstrakcija i njihovo značenje

Oznaka uzorka	Značenje oznake
TU	Uzorak suhe kore rajčice tretiran ultrazvukom visokog intenziteta uz dodatak ekstrakcijskog otapala
T	Uzorak suhe kore rajčice toplinski tretiran uz dodatak ekstrakcijskog otapala
1 – 27	Tretirano ultrazvukom visokog intenziteta uz 27 različitih kombinacija amplitude, vremena tretiranja i ekstrakcijskog otapala
0/3, 0/6, 0/9, 25/3, 25/6, 25/9, 50/3, 50/6, 50/9	Tretirano toplinskom ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji uz 9 različitih kombinacija vremena tretiranja i ekstrakcijskog otapala

3.1.3. Kemikalije i standardi

U ovom istraživanju upotrijebljeni su sljedeći reagensi:

1. Deionizirana voda (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska)
2. 96 %-tni etanol (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
3. 25 %-tni etanol
4. Priprema: Prema jednadžbi $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ se izračunava potrebni volumen 96 %-tnog etanola (V_1). Izračunati volumen 96 %-tnog etanola potom se dodaje u tikvicu te se dopunjuje deioniziranom vodom do oznake.

5. 50 %-tni etanol

Priprema: Prema jednadžbi $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ se izračunava potrební volumen 96 %-tnog etanola (V_1). Izračunati volumen 96 %-tnog etanola potom se dodaje u tikvicu te se dopunjuje deioniziranom vodom do oznake.

6. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens razrjeđuje se s deioniziranom vodom u omjeru 1:2.

7. 20 %-tna otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 800 mL vruće deionizirane vode te se hladi do postizanja sobne temperature. Nakon toga se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata i potom nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Otopina se filtrira nakon 24 sata.

8. Ishodna otopina galne kiseline 5 g/L (Acros Organics, New Jersey, SAD)

Priprema: 0,2500 g galne kiseline otapa se u 10 mL 96 %-tnog etanola te se potom nadopunjava deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 50 mL.

9. Standardne otopine galne kiseline 30 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L i 180 mg/L

Priprema: ishodna otopina galne kiseline razrjeđuje se deioniziranom vodom u odmjernim tikvicama od 100 mL do zadanih koncentracija te se pripremljene otopine koriste za izradu baždarnog pravca.

3.1.4. Laboratorijski uređaji i pribor

3.1.4.1. Aparatura

1. Sjeckalica povrća
2. Analitička vaga (NBL-254i, Adam Equipment, Oxford, UK)
3. Ultrazvučni aparat sa sondom (Sonicator Q700, Qsonica, Newtown, SAD)
4. Ultrazvučna kupelj s grijanjem (DT 100H, Bandelin electronic GmbH, Berlin, Njemačka)
5. Vakuum pumpa (Rocker 300, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka)
6. UV/VIS spektrofotometar (UV-2600i, Shimadzu, Kyoto, Japan)
7. Vorteks tresilica (MX-S, Dlab, Peking, Kina)
8. Testna (klíma) komora (HPP110, Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka)

3.1.4.2. Stakleno posuđe

1. Menzure (100 mL, 1000 mL)
2. Odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 1000 mL)
3. Čaše (250 mL)
4. Epruvete
5. Lijevci
6. Stakleni štapić
7. Petrijeve posudice
8. Boca za odsisavanje
9. Kvarcne kivete

3.1.4.3. Ostalo posuđe

1. Büchnerov lijevak
2. Eksikator
3. Automatske mikropipete Eppendorf (100 μ L, 1000 μ L, 5 mL)
4. Plastične epruvete Falcon (50 mL)
5. Pinceta
6. Stalak za epruvete
7. Filter papir
8. Aluminijska folija
9. Metalne žlice
10. Špatula
11. Stalak za epruvete

3.2. METODE

- 3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija suhe kore rajčice primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom

Ekstrakcija pomoću ultrazvuka visokog intenziteta provedena je pomoću uređaja Ultrasonic processor Q700, SAD. Dizajn eksperimenta napravljen je u programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., Warrenton, SAD) te je prikazan u tablici 5. Eksperiment se sastojao od 27 pokusa s različitim vrijednostima udjela etanola (0%, 25 % i 50 %), amplitude (50 %, 75 % i 100 %) i vremena ekstrakcije (3 min, 6 min i 9 min).

Tablica 5. Eksperimentalni dizajn za ultrazvučnu ekstrakciju s direktno uronjenom sondom

Oznaka uzorka	A [%]	t [min]	EtOH [%]
TU1	50	6	25
TU2	100	3	25
TU3	50	9	0
TU4	75	3	25
TU5	75	6	50
TU6	100	3	50
TU7	50	3	0
TU8	100	3	0
TU9	75	9	50
TU10	50	3	50
TU11	100	9	25
TU12	100	6	0
TU13	100	6	25
TU14	75	6	0
TU15	50	3	25
TU16	50	6	50
TU17	50	9	25
TU18	100	9	0
TU19	50	9	50
TU20	75	9	0
TU21	75	6	25
TU22	75	3	0
TU23	75	9	25
TU24	100	9	50
TU25	50	6	0
TU26	100	6	50
TU27	75	3	50

*A – amplituda, t – vrijeme tretiranja, EtOH – udio etanola

Suha kora rajčice se prije postupka ekstrakcije usitni pomoću kuhinjske sjeckalice za hranu na dijelove homogene veličine. Na analitičkoj vagi se u laboratorijsku čašu od 250 mL potom odvaži $4 \pm 0,1000$ g uzorka usitnjene kore rajčice. U menzuru se ulije 100 mL ekstrakcijskog otapala koje se zatim u laboratorijskoj čaši pomiješa s uzorkom. Unutar izolacijske kutije ultrazvučnog uređaja postavi se laboratorijska čaša te se u uzorak uroni ultrazvučna sonda promjera 12 mm i termo-članak čija je funkcija praćenje temperature prilikom ekstrakcije.

Kada se uzorak postavi u izolacijsku kutiju, na zaslonu uređaja zadaju se ekstrakcijski parametri određeni eksperimentalnim dizajnom koji uključuju postotak amplitude i vrijeme tretiranja te se postupak ekstrakcije pokreće.

Nakon završetka ultrazvučnog tretiranja uzorka, sonda se ispiri deioniziranom vodom kako bi se spriječila njena kontaminacija prije uranjanja u sljedeći uzorak. Kada je dovršena ultrazvučna ekstrakcija svih uzoraka, ekstrakti se filtriraju pomoću Büchnerovog ljevka spojenog na vakuum pumpu i pohranjuju u Falcon epruvete od 50 mL. Dio uzoraka koristi se odmah za kemijske analize, a dio uzoraka se skladišti na temperaturi od 4 °C u trajanju od sedam dana.

3.2.2. Određivanje ukupne snage

Tijekom ultrazvučnog tretmana uzoraka suhe kore rajčice na kontrolnom zaslonu očitava se temperatura nakon svakih 15 sekundi ekstrakcije sa svrhom izračunavanja ukupne snage u određenom vremenskom intervalu s obzirom na specifični toplinski kapacitet uzorka [1].

Jednadžba ukupne snage:

$$P_{uk} = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{t} \quad [1]$$

gdje je:

P_{uk} – ukupna snaga [W]

m – masa uzorka [g]

c_p – specifični toplinski kapacitet namirnice [J/K g]

dT – promjena temperature u vremenskom intervalu od 15 s [K]

t – vremenski interval [s]

Prije izračuna ukupne snage, potrebno je izračunati specifični toplinski kapacitet uzorka [2].

Jednadžba specifičnog toplinskog kapaciteta:

$$c_p = x_1 \cdot c_{p1} + x_2 \cdot c_{p2} + x_3 \cdot c_{p3} + x_4 \cdot c_{p4} + x_5 \cdot c_{p5} \quad [2]$$

gdje je:

c_p – specifični toplinski kapacitet uzorka [J/K g]

x_n – udio određene komponente: voda, ugljikohidrati, proteini, masti, pepeo

c_{pn} – specifični toplinski kapacitet komponente: voda, ugljikohidrati, proteini, masti, pepeo
[J/K g]

Korištenjem poznatih vrijednosti ukupne snage, volumena tretiranog uzorka i površine sonde moguće je izračunati gustoću snage [3] i ultrazvučni intenzitet [4].

Jednadžba za gustoću snage je:

$$P_V = \frac{P_{UK}}{V} \quad [3]$$

gdje je:

P_V – gustoća snage [W/cm³]

P_{UK} – ukupna snaga [W]

V – volumen uzorka [cm³]

Jednadžba za ultrazvučni intenzitet je:

$$UI = \frac{P_{UK}}{A} \quad [4]$$

gdje je:

UI – ultrazvučni intenzitet [W/cm²]

P_{UK} – ukupna snaga [W]

A – površina vrha ultrazvučne sonde [cm²]

3.2.3. Konvencionalna ekstrakcija suhe kore rajčice u vodenoj kupelji

Konvencionalna ekstrakcija uzoraka suhe kore rajčice provedena je zbog toga da se dobiveni rezultati prinosa ukupnih fenola mogu usporediti s rezultatima uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta. Toplinski tretman izveden je u ultrazvučnoj kupelji DT 100H (35 kHz) (Bandelin, Berlin, Njemačka) koja se koristila za zagrijavanje uzoraka. U tablici 6. prikazan je dizajn eksperimenta za konvencionalnu ekstrakciju koji se sastojao od 9 pokusa pri čemu se mijenjao udio etanola (0 %, 25 % i 50 %) i vrijeme tretiranja (3 min, 6 min i 9 min).

Tablica 6. Eksperimentalni dizajn za konvencionalnu ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji

Oznaka uzorka	t [min]	EtOH [%]
T0/3	3	0
T0/6	6	0
T0/9	9	0
T25/3	3	25
T25/6	6	25
T25/9	9	25
T50/3	3	50
T50/6	6	50
T50/9	9	50

- t – vrijeme tretiranja, EtOH – udio etanola

Postupak započinje tako da se u laboratorijsku čašu od 250 mL izvaže $4 \pm 0,1000$ g usitnjenog uzorka, a potom se pomoću menzure dodaje 100 mL otapala. Ultrazvučna kupelj se za to vrijeme napuni vodom i zagrije na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pritom se ne namještavaju parametri sonikacije. Nakon što se postigla odgovarajuća temperatura vode, uzorci se uranjaju u kupelj i pokrivaju aluminijskom folijom. Temperatura uzoraka prati se termometrom i nakon dostizanja $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ započinje se s toplinskom ekstrakcijom u trajanju od 3, 6 ili 9 minuta ovisno o eksperimentalnom dizajnu. Kada je toplinski tretman završen, uzorci se filtriraju vakuum filtracijom pomoću Büchnerovog lijevka i pohranjuju u Falcon epruvete od 50 mL. Dio uzoraka se neposredno nakon filtracije koristi za daljnje kemijske analize, a drugi dio uzoraka skladišti se sedam dana u hladnjaku na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Određivanje udjela ukupnih fenola

Postupak određivanja:

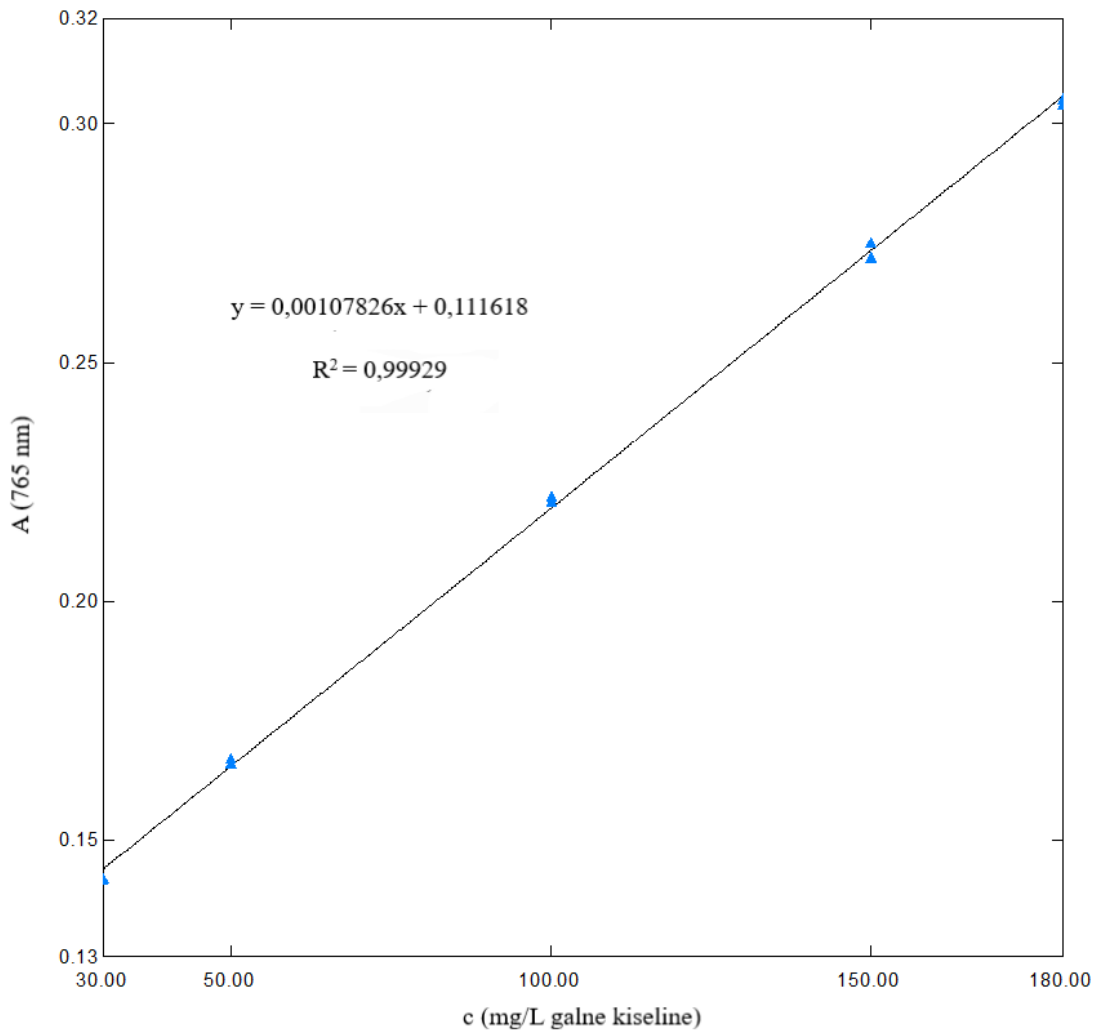
U staklenu epruvetu dodaje se 7,9 mL deionizirane vode, 0,1 mL filtrata ekstrahiranog uzorka suhe kore rajčice, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2 te 1,5 mL 20 %-tne zasićene otopine bezvodnog natrijevog karbonata. Postupak pripreme slijepa probe je isti, osim što se umjesto uzorka dodaje 0,1 mL deionizirane vode.

Otopina se potom promiješa na Vortex uređaju, a epruvete s uzorcima ostavljaju se na sobnoj temperaturi u mraku tijekom dva sata. Nakon dva sata su svi fenolni spojevi reagirali s Folin-Ciocalteu reagensom te se tada pomoću spektrofotometra mjeri apsorbanija plavog obojenja u odnosu na slijepu probu pri valnoj duljini od 765 nm. Sva mjerenja rade se u duplikatima.

3.2.5. Izrada baždarnog pravca:

Iz ishodne otopine galne kiseline masene koncentracije 5 g/L razrjeđenjem s deioniziranom vodom pripremaju se standardne otopine galne kiseline masenih koncentracija 30, 50, 100, 150, 180 mg/L u odmjernim tikvicama od 100 mL.

Postupak spektrofotometrijske reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom se ponovi, a umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje se 0,1 mL standardnih otopina galne kiseline. Nakon dva sata mjere se apsorbanije uzoraka standardnih otopina na 765 nm te se zajedno s poznatim koncentracijama galne kiseline koriste za izradu baždarnog pravca. Vrijednosti koncentracija standardnih otopina galne kiseline izraženih u mg/L nanose se na apscisu, dok se vrijednosti apsorbanije nanose na ordinatu. Baždarni pravac prikazan je na slici 1.



Slika 1. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Dobivena jednađba pravca je:

$$Y = 0,00107826x + 0,111618 \quad (R^2 = 0,99929)$$

Pri čemu su vrijednosti:

Y – izmjerena apsorbancija na 765 nm

X – koncentracija galne kiseline [mg/L]

R^2 – koeficijent determinacije

Nakon što su se izmjerile apsorbancije uzoraka ekstrakata suhe kore rajčice, vrijednosti se unose u dobivenu jednađbu pravca. Iz jednađbe se potom računaju nepoznate koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima suhe kore rajčice te se izražavaju u mg EGK/L, kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. Konačni rezultati izražavaju se u mg/g_{s.tv.}

3.2.6. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase

Udio ukupne suhe tvari u uzorku izračunava se sušenjem do konstantne mase. Sušenje staklenih posudica provodi se u testnoj (klima) komori na 105 °C. Osušene posudice premještaju se iz testne komore u eksikator gdje se hlade 20 minuta, a potom im se određuje masa s točnošću od ± 0,0002 g. Nakon toga se važe 2,5 g uzorka u pripremljene posudice koje se stavljaju u testnu komoru pri temperaturi od 105 °C ± 0,5 °C na sušenje u trajanju od sat vremena. Potom se provodi hlađenje u eksikatoru te se nakon 20 minuta posudice s uzorkom ponovno važu. Postupci sušenja, hlađenja i vaganja posudica s uzorkom ponavljaju se dok razlika u masi ne dostigne vrijednost od 0,001 g nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata. Nakon što se sušenjem dobije konstantna masa, izračunava se udio ukupne suhe tvari prema jednadžbi [5] i izražava se u postocima.

Izračun udjela ukupne suhe tvari:

$$ST (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \quad [5]$$

gdje je:

m_0 – masa prazne posudice (g)

m_1 – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.7. Obrada podataka

Obrada dobivenih podataka napravljena je u statističkom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., Warrenton, SAD). Program prvo provodi multivarijantnu statističku analizu (MANOVA) pomoću koje se proučavaju glavni učinci ulaznih varijabli, učinci interakcije između ulaznih varijabli i kvadratnih interakcija svake ulazne varijable na izlazne vrijednosti. P-vrijednost označava empirijsku (teorijsku) razinu značajnosti i iznosi 0,05. Parametri s p-vrijednošću manjom od 0,05 smatraju se statistički značajnima te se trebaju razmatrati prilikom dizajna eksperimenta za iduća istraživanja. Ispitivanje statističke značajnosti odvija se na način da se uspoređuje srednja vrijednost kvadrata pojedinog parametra s procjenom eksperimentalne pogreške. Pareto dijagram upotrijebljen je za grafički prikaz parametara poredanih po statističkoj značajnosti.

Nakon toga je u programu STATGRAPHICS provedena optimizacija uvjeta ultrazvučne ekstrakcije i konvencionalne ekstrakcije prilikom koje se dobivaju vrijednosti ulaznih parametara koje daju najveće izlazne vrijednosti prinosa ukupnih fenola i ultrazvučne snage. Za optimizaciju ekstrakcijskih uvjeta upotrijebljen je polinom optimizacije koji sadrži procijenjene regresijske koeficijente i vrijednosti varijabli navedene u izvornim jedinicama. Podaci o najnižim vrijednostima, najvišim vrijednostima i optimalnim vrijednostima nezavisnih varijabli navedeni su u tablici optimalnog odziva. Vrijednosti optimizacije grafički su prikazane pomoću dijagrama procjene odzivne površine.

Nezavisne varijable za ekstrakciju ultrazvukom visokog intenziteta su udio etanola (0 %, 25 % i 50 %), vremenski interval tretiranja (3 min, 6 min i 9 min) i amplituda (50 %, 75 % i 100 %), a zavisne varijable su ultrazvučna snaga [W], prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) [mg/g_{s.tv.}] i prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja [mg/g_{s.tv.}]. Kod toplinske ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji su nezavisne varijable udio etanola (0 %, 25 % i 50 %) te vremenski interval tretiranja (3 min, 6 min i 9 min), a zavisne varijable su prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) [mg/g_{s.tv.}] i prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja [mg/g_{s.tv.}].

4. REZULTATI I RASPRAVA

U prvom dijelu eksperimentalnog istraživanja napravljena je ekstrakcija uzoraka suhe kore rajčice pomoću ultrazvuka visokog intenziteta i toplinskog tretmana u ultrazvučnoj kupelji. 27 uzoraka suhe kore rajčice tretirano je ultrazvukom visokog intenziteta s varijacijama ulaznih parametara i tijekom tretmana je svakih 15 sekundi bilježena promjena temperature, kako bi se pomoću kalorimetrijske jednadžbe mogla izračunati ukupna snaga. Toplinskom metodom u ultrazvučnoj kupelji provedena je ekstrakcija 9 uzoraka suhe kore rajčice s različitim ulaznim parametrima. Neposredno nakon postupka ekstrakcije polovica uzoraka podvrgnuta je spektrofotometrijskom određivanju masenog udjela fenola, dok je druga polovica prije analize skladištena sedam dana u hladnjaku na 4 °C.

Smatra se da je toplinska degradacija glavni razlog smanjenja prinosa ukupnih fenola kada se provodi konvencionalna ekstrakcija na visokim temperaturama (Antony i Farid, 2022). U novije vrijeme se za ekstrakciju toplinski osjetljivih sastojaka upotrebljava ultrazvuk jer nema utjecaj na degradaciju bioaktivnih komponenti zbog kratkog vremenskog trajanja tretmana (Mohd Basri i sur., 2021). U radovima drugih autora ustanovljeno je da je prinos ukupnih fenola iz biljnog materijala bio viši kada se koristila ultrazvučna ekstrakcija u usporedbi s konvencionalnom toplinskom ekstrakcijom (Pattnaik i sur., 2021; Dobrinčić i sur., 2020; Dent i sur., 2015). Uzevši u obzir navedeno, ovo istraživanje je provedeno kako bi se promotrio utjecaj ekstrakcijskih parametara i skladištenja na prinos ukupnih fenola te dokazala veća učinkovitost ultrazvučnog tretmana u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju.

Poglavlje je podijeljeno u pet potpoglavlja, a pritom su eksperimentalni rezultati udjela suhe tvari, prinosa ukupnih fenola i ukupne snage prikazani u četiri potpoglavlja. Rezultati su obrađeni u Microsoft Excelu te su vrijednosti prinosa ukupnih fenola izražene kao srednja vrijednost dva mjerenja \pm standardna devijacija s mjernom jedinicom mg/g_{s.tv.} (tablica 8, tablica 9), dok je ultrazvučna snaga izražena u W (tablica 7). U petom potpoglavlju prikazana je statistička obrada podataka. Rezultati su statistički obrađeni u programu STATGRAPHICS Centurion kako bi se odredili statistički značajni parametri i napravila optimizacija ekstrakcijskih uvjeta koji će doprinijeti najvećim vrijednostima izlaznih varijabli (tablica 10 – tablica 19).

4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA SUHE TVARI SUŠENJEM DO KONSTANTNE MASE

Udio suhe tvari u kori rajčice izračunat je prema jednadžbi [5] i iznosi 94,39 %. Rezultat je u skladu s istraživanjem Abbassi i sur. (2021) koji su utvrdili da je sadržaj suhe tvari u kori rajčice iznosio 93,50 %.

4.2. REZULTATI IZRAČUNA UKUPNE SNAGE, GUSTOĆE SNAGE I ULTRAZVUČNOG INTENZITETA

Tablica 7. Izračun ultrazvučne snage, gustoće snage i ultrazvučnog intenziteta

Uzorak	A [%]	t [min]	EtOH [%]	P_{uk} [W]	P_v [W/cm ³]	UI [W/cm ²]
TU1	50	6	25	39,34	0,39	34,79
TU2	100	3	25	51,95	0,52	45,94
TU3	50	9	0	41,71	0,42	36,88
TU4	75	3	25	47,25	0,47	41,79
TU5	75	6	50	59,22	0,59	52,36
TU6	100	3	50	56,35	0,56	49,82
TU7	50	3	0	29,08	0,29	25,71
TU8	100	3	0	40,70	0,41	35,98
TU9	75	9	50	58,25	0,58	51,51
TU10	50	3	50	41,22	0,41	36,45
TU11	100	9	25	59,22	0,59	52,36
TU12	100	6	0	43,55	0,44	38,50
TU13	100	6	25	56,90	0,57	50,31
TU14	75	6	0	42,82	0,43	37,86
TU15	50	3	25	24,91	0,25	22,03
TU16	50	6	50	46,43	0,46	41,05
TU17	50	9	25	41,31	0,41	36,53
TU18	100	9	0	49,24	0,49	43,54
TU19	50	9	50	21,75	0,22	19,23
TU20	75	9	0	43,96	0,44	38,87

Tablica 7. Izračun ultrazvučne snage, gustoće snage i ultrazvučnog intenziteta – nastavak

TU21	75	6	25	55,45	0,55	49,03
TU22	75	3	0	32,98	0,33	29,16
TU23	75	9	25	49,86	0,50	44,08
TU24	100	9	50	37,20	0,37	32,90
TU25	50	6	0	40,25	0,40	35,59
TU26	100	6	50	36,45	0,36	32,23
TU27	75	3	50	26,10	0,26	23,08

*Za izračun P_{UK} korišteno je: $m = 104$ g, $c_p = 1,23$ J/g K ; A – amplituda, t – vrijeme tretiranja, EtOH – udio etanola, P_{uk} – ukupna snaga, P_v – gustoća snage (u 100 mL), UI – ultrazvučni intenzitet (promjer sonde = 12 mm)

Tablica 7. prikazuje upotrijebljene ulazne parametre ultrazvučnog tretmana (amplituda, vrijeme tretiranja i udio etanola) za 27 uzoraka suhe kore rajčice i izlazne parametre ukupne snage, gustoće snage i ultrazvučnog intenziteta. Izlazni parametri dobiveni su računski pomoću praćenja temperature svakih 15 sekundi postupka.

Iz rezultata se može vidjeti da su najveća ukupna snaga, gustoća snage i ultrazvučni intenzitet postignuti kod uzorka TU11 (59,22 W, 0,59 W/cm³, 52,36 W/cm²) s primijenjenim ekstrakcijskim parametrima od 100 % amplitude, 9 minuta tretiranja i 25 % etanola. Prema tome se može zaključiti da je ultrazvučna snaga proporcionalna ultrazvučnoj amplitudi i da dulje vrijeme tretiranja povoljno utječe na porast ultrazvučne snage. Najjači parametri ultrazvuka primijenjeni su kod uzorka TU24 gdje amplituda iznosi 100 %, vrijeme tretiranja je 9 minuta i udio etanola je 50 %. S obzirom na navedene parametre, u uzorku TU24 očekivane su najviše vrijednosti izlaznih parametara, no to nije postignuto (37,20 W, 0,37 W/cm³, 32,90 W/cm²).

Najslabiji parametri ultrazvuka primijenjeni su kod uzorka TU7 i uključuju amplitudu od 50 %, vrijeme tretiranja od 3 minute i udio etanola od 0 % te se stoga očekuje da će najmanja ukupna snaga, gustoća snage i ultrazvučni intenzitet biti postignuti kod tog uzorka. Dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjima, a najmanja ukupna snaga, gustoća snage i ultrazvučni intenzitet postignuti su kod uzorka TU19 (21,75 W, 0,22 W/cm³, 19,23 W/cm²). Uvjeti ekstrakcije kod spomenutog uzorka uključuju amplitudu od 50 %, vrijeme tretiranja od 9 minuta te udio etanola od 50 %.

Santos i sur. (2009) navode da je ultrazvučni intenzitet proporcionalan amplitudi ultrazvučnog izvora i da povećanje amplitude dovodi do povećanja ultrazvučnog intenziteta i

sonokemijskih učinaka. No, primjena visokih amplituda može dovesti do oštećenja ultrazvučne sonde, što rezultira miješanjem tekućine umjesto učinka kavitacije i slabijim prijenosom ultrazvuka kroz tekući medij (Das i sur., 2022; Santos i sur., 2009). Odstupanja u vrijednostima ukupne snage s obzirom na primijenjene parametre ultrazvuka stoga se povezuju s aglomeratima u uzorcima koji nastaju zbog slabijeg učinka ultrazvuka. Za njihovo razbijanje potrebno je uložiti veću snagu pa su krajnje vrijednosti ukupne snage, gustoće snage i ultrazvučnog intenziteta više od predviđenih.

4.3. REZULTATI PRINOSA UKUPNIH FENOLA NAKON TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA

Tablica 8. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja) i nakon 7. dana skladištenja

Uzorak	A [%]	t [min]	EtOH [%]	PUF [mg/g _{s.tv.}]	PUF7 [mg/g _{s.tv.}]
TU1	50	6	25	3,42 ± 0,10	4,33 ± 0,07
TU2	100	3	25	3,39 ± 0,05	4,74 ± 0,09
TU3	50	9	0	4,33 ± 0,03	3,95 ± 0,19
TU4	75	3	25	3,56 ± 0,26	3,73 ± 0,09
TU5	75	6	50	4,58 ± 0,14	4,55 ± 0,17
TU6	100	3	50	3,36 ± 0,05	3,60 ± 0,17
TU7	50	3	0	3,72 ± 0,28	3,56 ± 0,12
TU8	100	3	0	3,89 ± 0,17	3,53 ± 0,12
TU9	75	9	50	4,70 ± 0,35	4,74 ± 0,30
TU10	50	3	50	3,58 ± 0,09	3,34 ± 0,19
TU11	100	9	25	3,90 ± 0,12	4,79 ± 0,30
TU12	100	6	0	4,22 ± 0,09	3,83 ± 0,05
TU13	100	6	25	3,60 ± 0,10	4,86 ± 0,02
TU14	75	6	0	4,30 ± 0,02	3,47 ± 0,07
TU15	50	3	25	3,07 ± 0,19	3,15 ± 0,17
TU16	50	6	50	4,27 ± 0,33	4,16 ± 0,10
TU17	50	9	25	3,66 ± 0,40	4,39 ± 0,09

Tablica 8. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja) i nakon 7. dana skladištenja – *nastavak*

TU18	100	9	0	4,92 ± 0,56	3,39 ± 0,09
TU19	50	9	50	4,17 ± 0,19	4,16 ± 0,21
TU20	75	9	0	3,94 ± 0,28	3,67 ± 0,10
TU21	75	6	25	3,51 ± 0,19	4,47 ± 0,17
TU22	75	3	0	4,39 ± 0,36	3,45 ± 0,03
TU23	75	9	25	4,46 ± 0,24	4,55 ± 0,17
TU24	100	9	50	4,57 ± 0,26	4,48 ± 0,00
TU25	50	6	0	4,85 ± 0,07	3,58 ± 0,09
TU26	100	6	50	4,22 ± 0,26	4,10 ± 0,05
TU27	75	3	50	3,45 ± 0,17	3,23 ± 0,00

*rezultati izraženi kao srednja vrijednost koncentracija dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 94,39 %; A – amplituda, t – vrijeme tretiranja, EtOH – udio etanola, PUF – prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja), PUF7 – prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja

U tablici 8. prikazani su rezultati prinosa ukupnih fenola nakon tretiranja uzoraka suhe kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta. Prinos ukupnih fenola mjeren je neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije (0. dan skladištenja) te nakon 7. dana skladištenja.

Raspon prinosa ukupnih fenola neposredno nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja) kreće se od $3,07 \pm 0,19$ mg/g_{s.tv.} do $4,92 \pm 0,56$ mg/g_{s.tv.}. Uzorak TU18 koji je tretiran 9 minuta pri amplitudi od 100 % s deioniziranom vodom kao otapalom ima najveći prinos ukupnih fenola u iznosu od $4,92 \pm 0,56$ mg/g_{s.tv.}. Najmanji prinos ukupnih fenola primijećen je kod uzorka TU15 i iznosi $3,07 \pm 0,19$ mg/g_{s.tv.} s parametrima tretiranja koji uključuju amplitudu od 50 %, vrijeme tretiranja od 3 minute i udio etanola od 25 %.

Nakon 7. dana skladištenja ekstrakata suhe kore rajčice, raspon prinosa ukupnih fenola kreće se od $3,15 \pm 0,17$ mg/g_{s.tv.} do $4,86 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.}. U uzorku TU13 primijećen je najveći prinos ukupnih fenola koji iznosi $4,86 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.}. Kod spomenutog uzorka tijekom tretmana je primijenjena amplituda od 100 %, vrijeme tretiranja od 6 minuta i udio etanola od 25 %. Najmanji prinos ukupnih fenola u iznosu od $3,15 \pm 0,17$ mg/g_{s.tv.} izmjeren je u uzorku TU15 kod kojeg parametri tretmana obuhvaćaju amplitudu od 50 %, vrijeme tretiranja od 3 minute i udio etanola od 25 %.

Skladištenje tijekom razdoblja od sedam dana imalo je utjecaj na smanjenje prinosa ukupnih fenola kod 16 uzoraka. U tu kategoriju spadaju uzorci TU19 (-0,29 %), TU5 (-0,54 %), TU24 (-1,88 %), TU16 (-2,59 %), TU26 (-2,91 %), TU7 (-4,29 %), TU27 (-6,41 %), TU10 (-6,85 %), TU20 (-6,86 %), TU3 (-8,79 %), TU8 (-9,16 %), TU12 (-9,31 %), TU14 (-19,16 %), TU22 (-21,52 %), TU25 (-26,09 %), i TU18 (-31,19 %) kod kojeg je zabilježen najveći pad u prinosu. Promatranjem rezultata također se može zaključiti da je kod ostalih 11 uzoraka došlo do povećanja prinosa ukupnih fenola nakon sedam dana skladištenja. Povećanje prinosa odnosi se na uzorke TU9 (0,78 %), TU23 (2,21 %), TU15 (2,80 %), TU4 (4,83 %), TU6 (6,94 %), TU17 (20,15 %), TU11 (22,66 %), TU1 (26,55 %), TU21 (27,65 %), TU13 (35,18 %) i TU2 (39,89 %) kod kojeg je porast najveći.

Iz rezultata je također vidljivo da su najveći prinosi ukupnih fenola neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije (0. dan skladištenja) i nakon 7. dana skladištenja postignuti uz primjenu 100 % amplitude. To je u skladu s istraživanjem Dobrinčić i sur. (2020) u kojem se navodi da upotreba 100 %-tne amplitude pozitivno utječe na povećanje prinosa fenolnih spojeva iz lista masline.

Upotreba viših amplituda poboljšava učinak ultrazvuka jer se povećava broj ciklusa širenja i skupljanja ultrazvučnih valova. Više amplitude imaju utjecaj na rezonantnu veličinu kavitacijskih mjehurića koji se u kratkom vremenu nasilnije urušavaju. Između krutog matriksa i otapala tada se stvara veća dodirna površina i tako se poboljšava prodiranje otapala u matriks. Posljedično dolazi do većeg prinosa fenolnih spojeva jer se veća koncentracija otpušta u otapalo (Pattnaik i sur., 2021; Medina-Torres i sur., 2017).

Promatranjem rezultata može se zaključiti da je najveći prinos fenolnih spojeva postignut s 9 minuta tretiranja neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije (0. dan skladištenja) i sa 6 minuta tretiranja nakon 7. dana skladištenja. Rezultati su djelomično u skladu s istraživanjem Al-Dhabi i sur. (2017) u kojem se proučavala ovisnost prinosa ukupnih fenola iz upotrijebljenog taloga kave tretiranog ultrazvukom visokog intenziteta o vremenu tretiranja. Oni su primijetili da se u početnim fazama ekstrakcije prinos fenolnih spojeva povećava s duljinom trajanja tretmana zbog kombinacije kavitacije i povećanja topline koji dovode do bubrenja biljnog matriksa i povećanja pora u staničnoj stijenci. Kontakt između otopljene tvari i otapala se zatim poboljšava i raste brzina masenog prijenosa te posljedično dolazi do veće ekstrakcijske učinkovitosti. Nakon početnog poboljšanja u prinosu ukupnih fenola, primijećeno je da daljnje povećanje vremena ekstrakcije može dovesti do neželjene strukturne degradacije bioaktivnih komponenti i smanjenja prinosa. Također je navedeno da je potrebno uzeti u obzir

isplativost ekstrakcijskog procesa te da se veća ekonomičnost postiže kraćim vremenskim tretiranjem.

Christou i sur. (2021) su primijetili da predug vremenski tretman može imati negativan učinak na prinos fenolnih spojeva iz rogača tretiranog ultrazvukom visokog intenziteta jer se prilikom tretmana stvara veća količina topline. Posljedica toga su neželjene promjene poput oksidacije, a s time se smanjuje i prinos fenolnih spojeva. Setyaningsih i sur. (2019) uz to navode da optimalno vrijeme tretiranja fenolnih spojeva ovisi o složenosti biljnog matriksa. Zaključili su da se najveći prinosi ukupnih fenola postižu u vremenskom intervalu od 6 minuta do 60 minuta ovisno o biljnom matriksu.

Fernando i sur. (2021) su u svom istraživanju proučavali utjecaj otapala (voda, etanol ili metanol) na prinos ukupnih fenola u pulpi cikle tretiranoj ultrazvukom visokog intenziteta. Zaključili su da je u uzorcima tretiranim 30 %-tnim etanolom prinos ukupnih fenola bio 19,30 % viši nego u uzorcima tretiranim čistom vodom i 71 % viši nego u uzorcima tretiranim čistim etanolom. Rezultati se objašnjavaju time da upotrijebljena otapala imaju različitu polarnost, voda ima relativnu polarnost od 1.000, dok etanol ima relativnu polarnost od 0,654. Miješanje ekstrakcijskih otapala u različitim omjerima pospješuje ekstrakcijsku učinkovitost kada polarnost mješavine otapala odgovara polarnosti ciljanih molekula. Uz to, dodatak etanola u vodu smanjuje koekstrakciju pektina, topljivih vlakana i proteina i poboljšava ekstrakciju komponenti niže molekularne težine poput fenolnih spojeva. U istraživanju je također promatran utjecaj vremena skladištenja na prinos ukupnih fenola iz otpada cikle pri sobnoj temperaturi i temperaturi od -20 °C. Tijekom analize je primijećen porast prinosa ukupnih fenola do 2. tjedna skladištenja nakon kojeg je slijedio postepeni pad do kraja skladištenja. Povećan prinos ukupnih fenola objašnjen je na način da dolazi do otpuštanja fenolnih komponenti vezanih na proteine ili polisaharide i kemijskih reakcija koje uključuju fenolne komponente. Tijekom skladištenja također dolazi i do aktivacije enzima fenilalanin-amonijak-liaze koja regulira sintezu sekundarnih metabolita. To rezultira nastankom novih fenolnih spojeva tijekom skladištenja i povećanjem prinosa ukupnih fenola.

Uz navedeno, Medina-Torres i sur. (2017) govore da upotreba pojedinačnih organskih otapala otežava ekstrakcijski proces jer dovodi do dehidracije stanica i denaturacije proteina u staničnoj stijenci na koje se vežu fenolni spojevi. Također napominju da raspodjela fenolnih spojeva u stanici nije jednolika. Polarni fenolni spojevi nalaze se u staničnim vakuolama, dok se lignini, flavonoidi i fenoli netopljivi u vodi vežu na proteine i polisaharide i talože u staničnoj stijenci. Sahin i Samli (2013) su postigli najbolji ekstrakcijski prinos fenolnih spojeva iz lista

masline upotrebom 50 %-tnog etanola. Oni navode da u mješavini otapala voda djeluje kao sredstvo koje uzrokuje bubrenje matriksa i povećava kontaktnu površinu, dok etanol pomaže u cijepanju veze između ciljane komponente i biljnog matriksa. Osim navedenog, upotreba otapala niske viskoznosti i niske površinske napetosti pospješuje nastanak kavitacija (Medina-Torres i sur., 2017; Sahin i Samli, 2013).

Prema rezultatima za suhu koru rajčice može se primijetiti da je najveći prinos ukupnih fenola u uzorcima neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije (0. dan skladištenja) postignut s deioniziranom vodom, dok je nakon 7. dana skladištenja najveći prinos postignut upotrebom 25 %-tnog etanola. S obzirom na to da voda ima veću polarnost od etanola, možemo zaključiti da je skladištenjem uzoraka došlo do stvaranja manje polarnih ciljanih komponenti pa je tada upotreba 25 %-tnog etanola dala veći prinos fenolnih spojeva.

4.4. REZULTATI PRINOSA UKUPNIH FENOLA NAKON TRETMANA KONVENCIONALNOM EKSTRAKCIJOM U VODENOJ KUPELJI

Tablica 9. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja) i nakon 7. dana skladištenja

Oznaka uzorka	t [min]	EtOH [%]	PUF [mg/g _{s.tv.}]	PUF7 [mg/g _{s.tv.}]
T0/3	3	0	2,38 ± 0,02	2,51 ± 0,03
T0/6	6	0	2,47 ± 0,03	2,43 ± 0,09
T0/9	9	0	1,93 ± 0,03	1,94 ± 0,02
T25/3	3	25	2,04 ± 0,12	2,05 ± 0,17
T25/6	6	25	2,48 ± 0,02	2,45 ± 0,05
T25/9	9	25	2,56 ± 0,00	2,42 ± 0,03
T50/3	3	50	2,54 ± 0,10	2,36 ± 0,05
T50/6	6	50	3,02 ± 0,09	2,67 ± 0,05
T50/9	9	50	2,98 ± 0,07	2,88 ± 0,03

*rezultati izraženi kao srednja vrijednost koncentracija dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 94,39 %; t – vrijeme tretiranja, EtOH – udio etanola, PUF – prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja), PUF7 – prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja

Tablica 9. prikazuje rezultate prinosa ukupnih fenola nakon tretiranja uzoraka suhe kore rajčice metodom konvencionalne ekstrakcije u vodenoj kupelji. Prinosi ukupnih fenola izmjereni su neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom (0. dan skladištenja) te nakon 7. dana skladištenja.

Iz rezultata se može zaključiti da se raspon prinosa ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) kreće od 1,93 ± 0,03 mg/g_{s.tv.} do 3,02 ± 0,09 mg/g_{s.tv.}. Najveći prinos ukupnih fenola neposredno nakon ekstrakcije u iznosu od 3,02 ± 0,09 mg/g_{s.tv.} sadrži uzorak T50/6 koji je tretiran 6 minuta, a kao otapalo je upotrijebljen 50 %-tni etanol. S druge strane, najmanji prinos ukupnih fenola u vrijednosti od 1,93 ± 0,03 mg/g_{s.tv.} sadrži uzorak T0/9 koji je tretiran 9 minuta s deioniziranom vodom kao otapalom. Prema rezultatima se može

ustanoviti da je 50 %-tni etanol bolje otapalo za fenolne spojeve od 25 %-tnog etanola i deionizirane vode. Također je vidljivo da dulje vrijeme tretiranja uzoraka ne utječe nužno na porast prinosa ukupnih fenola.

Promotre li se rezultati prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja, može se zaključiti da se raspon kreće od $1,94 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.} do $2,88 \pm 0,03$ mg/g_{s.tv.}. Najveću vrijednost prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja pokazuje uzorak T50/9 u iznosu od $2,88 \pm 0,03$ mg/g_{s.tv.} koji je tretiran 9 minuta s 50 %-tnim etanolom kao otapalom. Najmanji prinos ukupnih fenola ima uzorak T0/9 u iznosu od $1,94 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.} koji je tretiran 9 minuta s deioniziranom vodom kao otapalom. To je u skladu s očekivanjima budući da je uzorak T0/9 pokazao najmanji prinos ukupnih fenola i neposredno nakon ekstrakcije (0. dana skladištenja). Prema rezultatima prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja također je vidljivo da je 50 %-tni etanol bolje otapalo za fenolne spojeve od deionizirane vode i 25 %-tnog etanola.

Iz rezultata se može primijetiti da je kod 6 uzoraka došlo do smanjenja prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja, a u tu kategoriju pripadaju uzorci T25/6 (-0,99 %), T0/6 (-1,49 %), T50/9 (-3,30 %), T25/9 (-5,75 %), T50/3 (-7,25 %), i T50/6 kod kojeg je zabilježen najveći pad u prinosu ukupnih fenola (-11,39 %). S druge strane, 3 uzroka pokazuju porast vrijednosti prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja. Tu spadaju uzorci T25/3 (0,60 %), T0/9 (0,64 %) i T0/3 (5,68 %) kod kojeg je primijećen najveći porast u prinosu ukupnih fenola.

Kada se usporede najveći prinosi fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja), vidljivo je da je prinos ukupnih fenola dobiven ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (TU18) veći za 63,08 % od prinosa dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom (T50/6). Slični rezultati dobiveni su i usporedbom najvećeg prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom (T50/9) i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (TU13). Prinos dobiven ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom veći je za 68,56 % od prinosa dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom.

Može se uočiti da je kod svih 27 uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta došlo do povećanja prinosa ukupnih fenola u odnosu na tretman konvencionalnom ekstrakcijom. To je u skladu s istraživanjem He i sur. (2016) u kojem se uspoređivala ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta s konvencionalnom ekstrakcijom pomoću otapala. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj vremena tretiranja, temperature ekstrakcije i omjera otapala i otopljene tvari na prinos ukupnih fenola iz vinske komine borovnice. Zaključili su da

je najviši prinos za ultrazvučnu ekstrakciju iznosio 16,41 mg EGK/g vinske komine borovnice nakon 30 minuta tretiranja, dok je najviši prinos kod konvencionalne ekstrakcije otapalom iznosio 5,08 mg EGK/g vinske komine borovnice nakon 35 minuta ekstrakcije. Slične zaključke navode i Dent i sur. (2015). U njihovom istraživanju zaključeno je da je prinos ukupnih fenola iz uzoraka kadulje tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta 20 % veći u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju otapalima. Također su uspoređivali utjecaj 30 %-tnog etanola, 30 %-tnog acetona i deionizirane vode i zaključili su da se najveći prinos ukupnih fenola postiže tretiranjem s 30 %-tnim etanolom.

Pad prinosa ukupnih fenola nakon skladištenja odgovara rezultatima istraživanja Vallverdú-Queralt i sur. (2011b) u kojem je proučavan utjecaj skladištenja na prinos ukupnih fenola u toplinski tretiranim sokovima rajčice i *ketchupima*. Analize su provedene nakon 3, 6 i 9 mjeseci te je prinos ukupnih fenola određen pomoću Folin-Ciocalteu metode. Autori su ustanovili da je skladištenje imalo značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola koji se smanjio za prosječno 12 % u sokovima rajčice i 7 % u *ketchupima*. Navedeno zapažanje povezali su s primjenom toplinske prerade i rezidualnom aktivnosti enzima peroksidaze koji je uključen u oksidativnu degradaciju fenolnih komponenti. No, primijećen pad prinosa ukupnih fenola nije imao negativan utjecaj na nutritivnu vrijednost proizvoda od rajčice.

Porast prinosa ukupnih fenola nakon skladištenja može se povezati s nespecifičnosti Folin-Ciocalteu reagensa. Iako se metoda s Folin-Ciocalteu reagensom najčešće koristi za određivanje fenolnih spojeva u rajčicama, izmjeren prinos može odstupati od stvarne vrijednosti. Rajčice u svom sastavu imaju askorbinsku kiselinu, ugljikohidrate i aminokiseline koji su reducirajuće supstance i stoga mogu ulaziti u interakciju s Folin-Ciocalteu reagensom pa su krajnje dobivene vrijednosti više od stvarnih (Vallverdú-Queralt i sur., 2011a).

Klimczak i sur. (2007) su istraživali utjecaj vremena skladištenja i temperature na sadržaj ukupnih fenola u sokovima od naranče putem Folin-Ciocalteu metode i HPLC metode na 18 °C, 28 °C i 38 °C tijekom 2, 4 i 6 mjeseci. Kada se sadržaj ukupnih fenola određivao putem Folin-Ciocalteu metode, vrijeme i temperatura skladištenja imali su značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola u sokovima te je nakon 4 mjeseca skladištenja došlo do smanjenja ukupnih fenola pri svim istraživanim temperaturama. No, kada se skladištenje produljilo na 6 mjeseci, primijećen je porast u prinosu ukupnih fenola što se objašnjava time da su tijekom vremena nastale komponente u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom i tako prividno povećale sadržaj ukupnih fenola. Za razliku od toga, kada se pri istim ekstrakcijskim uvjetima primijenila HPLC metoda, došlo je do pada u prinosu fenolnih spojeva za prosječno 10 – 12 % nakon 6

mjeseci skladištenja. Mandić i sur. (2008) su u istraživanju također uspoređivali vrijednosti prinosa ukupnih fenola dobivene pomoću Folin-Ciocalteu reagensa i HPLC metode te su zaključili da su rezultati dobiveni putem Folin-Ciocalteu metode bili prosječno 1,5 do 2,5 puta veći od rezultata dobivenih HPLC metodom (Antony i Farid 2022; Mandić i sur., 2008).

Rezultati za ekstrakte suhe kore rajčice slažu se s navedenim istraživanjima jer je pri skladištenju u nekim uzorcima došlo do porasta u prinosu ukupnih fenola, dok je u drugim uzorcima primijećen pad prinosa. Postoji mogućnost da je u pojedinim uzorcima izmjeren prinos ukupnih fenola veći od stvarne vrijednosti zbog interakcije komponenti s Folin-Ciocalteu reagensom. Iako se HPLC metoda predlaže kao bolja alternativa zbog veće specifičnosti, u obzir je potrebno uzeti i ekonomičnost postupka.

Kada se rezultati dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom usporede s rezultatima dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji, vidljivo je da postoji razlika u odabiru otapala. S obzirom na to da je u konvencionalnoj ekstrakciji najveći prinos ukupnih fenola postignut upotrebom 50 %-tnog etanola, može se zaključiti da su ciljane komponente manje polarnosti u odnosu na one dobivene s deioniziranom vodom ili 25 %-tnim etanolom kod ultrazvučne ekstrakcije. Moguće je da tijekom konvencionalnog tretmana dolazi do ekstrakcije nepolarnih fenolnih spojeva iz vakuole stanice pa stoga upotreba manje polarnog otapala daje veći prinos. Nastanak spojeva manje polarnosti može se objasniti i toplinskom degradacijom koja se odvija prilikom konvencionalne ekstrakcije.

4.5. OBRADA REZULTATA

4.5.1. Ultrazvučna snaga

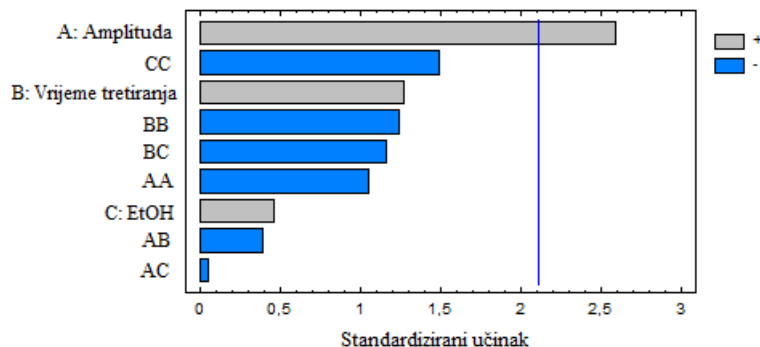
Tablica 10. Analiza varijanci za ultrazvučnu snagu

Izvor	Zbroj kvadrata	D _f – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A	619,018	1	619,018	6,71	0,0191
B	149,963	1	149,963	1,62	0,2196
C	19,4324	1	19,4324	0,21	0,6522
AA	101,972	1	101,972	1,10	0,3079
AB	13,8542	1	13,8542	0,15	0,7033
AC	0,278982	1	0,278982	0,00	0,9568
BB	142,73	1	142,73	1,55	0,2306
BC	124,268	1	124,268	1,35	0,2620
CC	204,681	1	204,681	2,22	0,1548
Ukupna pogreška	1569,12	17	92,3013	-	-
Ukupna korekcija	2945,32	26	-	-	-

*A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC – interakcija amplitude i udjela etanola, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC – interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, CC – kvadratna interakcija udjela etanola; R-kvadratno = 46,7249 %, R-kvadratno (prilagođeno za D_f) = 18,5204 %, standardna pogreška, procjena = 9,60735, srednja apsolutna pogreška = 6,08202, Durbin-Watsonova statistika = 1,14958 (p = 0,0065), Lag 1 rezidualna autokorelacija = 0,317914

Tablica 10. daje primjer analize varijanci za ultrazvučnu snagu i testira tri nezavisne varijable: A, B i C te interakcije varijabli AA, AB, AC, BB, BC i CC. Može se uočiti da p-vrijednost za parametar A iznosi 0,0191 te da se stoga značajno razlikuje od 0 na razini značajnosti od 5 %.

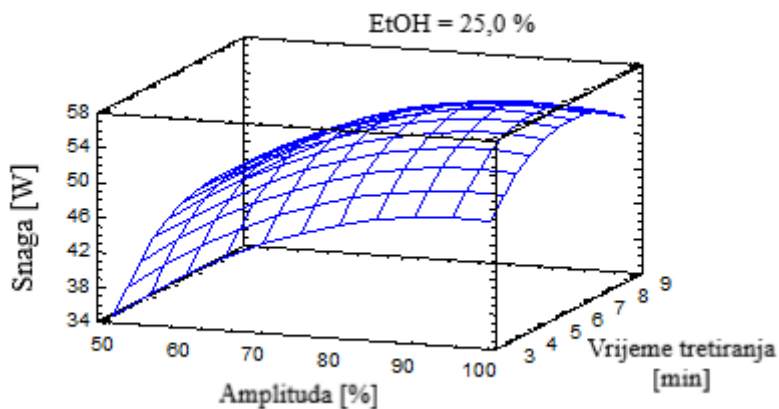
R-kvadratno statistika iznosi 46,7249 % i time se objašnjava 46,7249 % varijabilnosti snage, odnosno 18,5204 % u slučaju prilagodbe za stupnjeve slobode. Durbin-Watsonova statistika pokazuje p-vrijednost jednaku 0,0065, što znači da postoji mogućnost serijske autokorelacije zbog redoslijeda podataka na razini značajnosti od 5 %.



Slika 2. Pareto dijagram za ultrazvučnu snagu

Slika 2. prikazuje Pareto dijagram za ultrazvučnu snagu iz kojeg se vide statistički značajni parametri. Grafički prikaz potvrđuje analizu varijanci te se zaključuje da je amplituda statistički značajan parametar koji utječe na vrijednost ultrazvučne snage.

Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjem Dukić i sur. (2022) gdje se promatrao utjecaj parametara ultrazvuka visokog intenziteta na prinos proteina i ukupnih fenola iz lista šećerne repe. Statističkom analizom podataka utvrđeno je da je amplituda imala statistički značajan utjecaj na ukupnu snagu u suhim uzorcima lista šećerne repe tretiranima ultrazvukom uz dodatak hladne deionizirane vode ili deionizirane vode sobne temperature te u svježem uzorku lista šećerne repe tretiranom ultrazvukom uz dodatak hladne deionizirane vode.



Slika 3. Procjena površine odziva za ultrazvučnu snagu

Na slici 3. prikazan je dijagram procjene površine odziva za ultrazvučnu snagu. Iz slikovnog prikaza vidljivo je da je najmanja vrijednost ultrazvučne snage dobivena primjenom

amplitude od 50 % i vremena tretiranja od 3 minute. Povećanjem amplitude i vremena tretiranja povećava se vrijednost ultrazvučne snage koja dostiže najveću vrijednost primjenom amplitude između 90 % i 100 % i vremena tretiranja između 6 minuta i 7 minuta.

Tablica 11. Optimizacija ultrazvučne snage

Polinom optimizacije	Optimalan odziv			
$P = -46,843 + 1,31604 \cdot A + 9,61239 \cdot B + 0,784553 \cdot C - 0,00659605 \cdot A^2 - 0,0143264 \cdot A \cdot B - 0,000243959 \cdot A \cdot B - 0,541925 \cdot B^2 - 0,0429069 \cdot B \cdot C - 0,00934507 \cdot C^2$	Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
	A	50,00	100,00	92,07
	B	3,00	9,00	6,64
	C	0,00	50,00	25,53
Optimalna P = 55,68 W				

*P – snaga, A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola

U tablici 11. dan je polinom optimizacije i prikaz vrijednosti optimalnog odziva za vrijednost ultrazvučne snage. U tablici optimalnog odziva prikazana je kombinacija razina faktora koji daju najveću vrijednost ultrazvučne snage. Iz rezultata optimalnog odziva vidljivo je da optimalna vrijednost amplitude iznosi 92,07 %. Optimalno vrijeme tretiranja iznosi 6,64 minute, a optimalna vrijednost udjela etanola je 25,53 %. Optimalna vrijednost ultrazvučne snage prema navedenoj kombinaciji faktora iznosi 55,68 W.

4.5.2. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja)

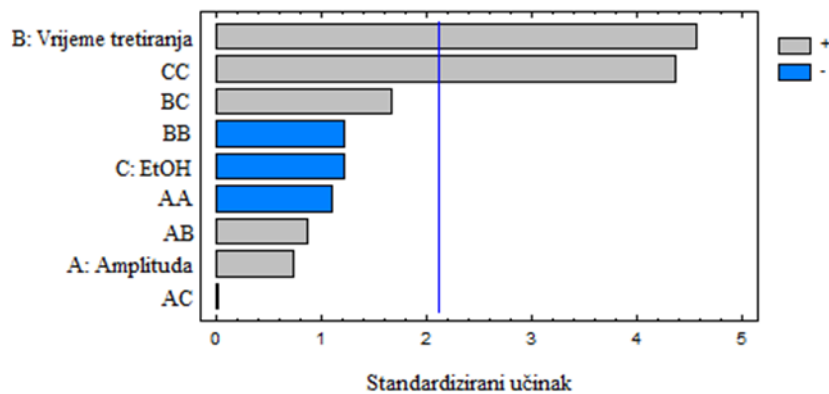
Tablica 12. Analiza varijanci za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – ultrazvučna ekstrakcija

Izvor	Zbroj kvadrata	D _f – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A	0,0549353	1	0,0549353	0,53	0,4766
B	2,16298	1	2,16298	20,86	0,0003
C	0,15173	1	0,15173	1,46	0,2430
AA	0,126918	1	0,126918	1,22	0,2840
AB	0,0765784	1	0,0765784	0,74	0,4021
AC	0,000012654	1	0,000012654	0,00	0,9913
BB	0,152684	1	0,152684	1,47	0,2416
BC	0,286513	1	0,286513	2,76	0,1148
CC	1,98334	1	1,98334	19,13	0,0004
Ukupna pogreška	1,76293	17	0,103702	-	-
Ukupna korekcija	6,75862	26	-	-	-

*A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC – interakcija amplitude i udjela etanola, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC – interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, CC – kvadratna interakcija udjela etanola; R-kvadratno = 73,9159 %, R-kvadratno (prilagođeno za D_f) = 60,1067 %, standardna pogreška, procjena = 0,322027, srednja apsolutna pogreška = 0,209111, Durbin-Watsonova statistika = 1,62062 (p = 0,1557), Lag 1 rezidualna autokorelacija = 0,16807

U tablici 12. predstavljena je analiza varijanci za prinos ukupnih fenola u ekstraktima suhe kore rajčice tretiranima ultrazvukom visokog intenziteta. Analizom varijanci testirana su tri nezavisna učinka: A, B i C te njihove interakcije AA, AB, AC, BB, BC i CC. Usporedbom srednje vrijednosti kvadrata navedenih parametara i procjene eksperimentalne pogreške zaključeno je da su dva učinka statistički značajna. P-vrijednost parametra B iznosi 0,0003, dok p-vrijednost interakcije CC iznosi 0,0004 te se oba značajno razlikuju od nule na razini pouzdanosti od 5 %.

R-kvadratna statistika objašnjava 73,9159 % varijabilnosti u prinosu ukupnih fenola, odnosno 60,1067 % u slučaju prilagodbe za stupnjeve slobode. Na temelju vrijednosti Durbin-Watsonove statistike čija je p-vrijednost veća od 0,05 i iznosi 0,1557, zaključuje se da nema serijske autokorelacije zbog redoslijeda podataka na razini značajnosti od 5,0 %.



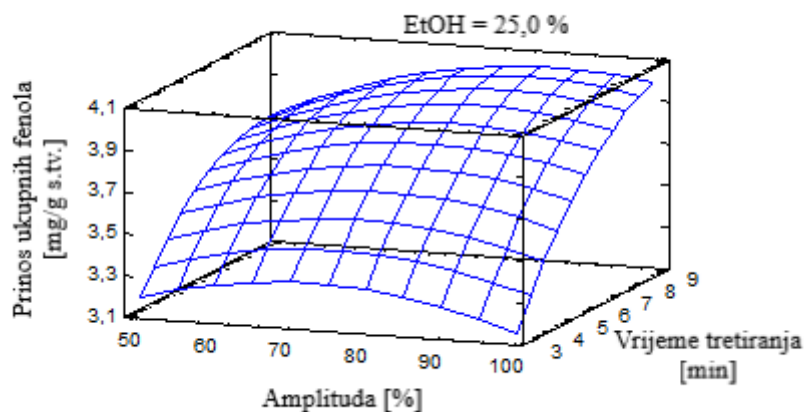
Slika 4. Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – ultrazvučna ekstrakcija

Slika 4. prikazuje Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta (0. dan skladištenja). Iz dijagrama je vidljivo prisustvo faktora sa statističkim značajem. Parametar s najvećim statističkim značajem za prinos ukupnih fenola je parametar B (vrijeme tretiranja), a nakon njega slijedi interakcija CC (kvadratna interakcija udjela etanola). Navedeni rezultati odgovaraju analizi varijance iz tablice 5.

Liao i sur. (2022) su istraživali utjecaj različitih parametara ultrazvučnog tretmana na prinos ukupnih fenola iz kore ljubičastog patlidžana. Statističkom obradom podataka utvrdili su da su ekstrakcijska temperatura i vrijeme tretiranja imali najznačajniji utjecaj na prinos kao pojedinačni parametri i u interakciji s ostalim parametrima. Nakon toga slijedili su interakcijski učinci koncentracije etanola i ekstrakcijske temperature te interakcijski učinci koncentracije etanola i vremena tretiranja. U drugom istraživanju Sharayei i sur. (2019) su proučavali utjecaj ultrazvučne amplitude (20 %, 60 % i 100 %) i ekstrakcijskog vremena (5 min, 10 min i 15 min) na prinos ukupnih fenolnih spojeva iz vodenog ekstrakta kore šipka. Nakon provedene statističke analize zaključili su da su ultrazvučna amplituda i vrijeme tretiranja imali statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola. Statističkom obradom rezultata prinosa ukupnih

fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) primijećeno je djelomično podudaranje s navedenim istraživanjima zbog statističkog značaja vremena tretiranja na prinos ukupnih fenola.

U radu Chen i sur. (2017) proučavao se utjecaj parametara ultrazvučne ekstrakcije na prinos ukupnih fenola iz crnih goji bobica. Ekstrakcijski parametri uključivali su vrijeme tretiranja, ultrazvučnu snagu, omjer otapala i otopljene tvari te udio etanola. Analizom varijance utvrđeno je da su statistički značajni parametri za prinos ukupnih fenola redom bili udio etanola, kvadratna interakcija udjela etanola, omjer otapala i otopljene tvari, ultrazvučna snaga, interakcija omjera otapalo: otopljena tvar i udjela etanola te kvadratna interakcija ultrazvučne snage. Statistički značaj kvadratne interakcije udjela etanola podudara se s rezultatima za suhu koru rajčice.



Slika 5. Procjena površine odziva za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – ultrazvučna ekstrakcija

Slika 5. daje prikaz procjene površine odziva za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice dobivenima ekstrakcijom pomoću ultrazvuka visokog intenziteta. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je najmanji prinos ukupnih fenola postignut pri amplitudi od 100 % i vremenu tretiranja od 3 minute. Produljenjem vremena tretiranja povećava se prinos ukupnih fenola i najveća vrijednost postignuta je pri vremenu tretiranja od 9 minuta s amplitudom između 80 % i 90 %.

Tablica 13. Optimizacija prinosa ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – ultrazvučna ekstrakcija

Polinom optimizacije	Optimalan odziv			
$\text{PUF} = 2,46621 + 0,0307659*A + 0,196855*B - 0,0619061*C - 0,000232705*A^2 + 0,00106513*A*B - 0,00000164302*A*B - 0,0177247*B^2 + 0,00206025*B*C + 0,000919906*C^2$	Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
	A	50,00	100,00	86,52
	B	3,00	9,00	9,00
	C	0,00	50,00	50,00
Optimalan PUF = 4,68 mg/g _{s.tv.}				

*PUF – prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja), A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola

Tablica 13. prikazuje regresijsku jednadžbu i optimalan odziv za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije (0. dan skladištenja). Iz rezultata optimalnog odziva vidljivo je da je optimalna vrijednost amplitude 86,52 %. Optimalno vrijeme tretiranja iznosi 9 minuta, a optimalna vrijednost udjela etanola je 50 %. Optimalan rezultat prinosa ukupnih fenola iznosi 4,68 mg/g_{s.tv.}.

4.5.3. Prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta

Tablica 14. Analiza varijanci za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – ultrazvučna ekstrakcija

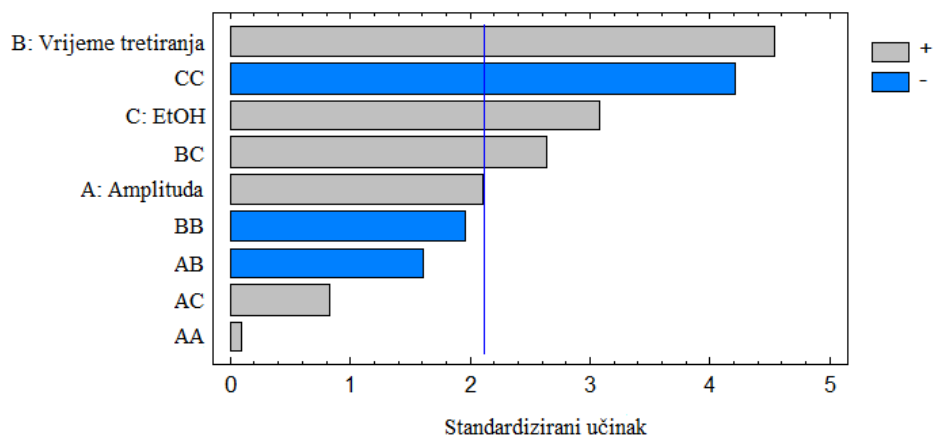
Izvor	Zbroj kvadrata	D _f – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A	0,397827	1	0,397827	4,39	0,0514
B	1,86717	1	1,86717	20,61	0,0003
C	0,854619	1	0,854619	9,43	0,0069
AA	0,000697463	1	0,000697463	0,01	0,9311
AB	0,232332	1	0,232332	2,56	0,1277
AC	0,0616073	1	0,0616073	0,68	0,4210
BB	0,341889	1	0,341889	3,77	0,0688
BC	0,63061	1	0,63061	6,96	0,0173
CC	1,59268	1	1,59268	17,58	0,0006
Ukupna pogreška	1,54035	17	0,0906091	-	-
Ukupna korekcija	7,51979	26	-	-	-

*A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC – interakcija amplitude i udjela etanola, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC – interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, CC – kvadratna interakcija udjela etanola; R-kvadratno = 79,516 %, R-kvadratno (prilagođeno za D_f) = 68,6715 %, standardna pogreška, procjena = 0,301013, srednja apsolutna pogreška = 0,197717, Durbin-Watsonova statistika = 1,9108 (p = 0,4341), Lag 1 rezidualna autokorelacija = 0,0347229

Tablica 14. prikazuje analizu varijanci za prinos ukupnih fenola u ekstraktima suhe kore rajčice nakon 7. dana skladištenja koji su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta. Usporedbom srednje vrijednosti kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške ispitana su tri nezavisna parametra: A, B i C te interakcije parametara AA, AB, AC, BB, BC, CC. Statistički značajni rezultati su parametar B čija vrijednost iznosi 0,0003, parametar C s rezultatom 0,0069 te interakcije BC s p-vrijednosti 0,0173 i CC čija p-vrijednost iznosi 0,0006.

R-kvadratna statistika pokazuje 79,516 % varijabilnosti prilagođenog modela za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja, odnosno 68,6715 % kada se prilagodi za stupnjeve

slobode. Durbin-Watsonova statistika ima p-vrijednost jednaku 0,4341, što je više od 0,05 te se iz toga vidi da nema serijske autokorelacije zbog redoslijeda podataka na razini značajnosti od 5 %.

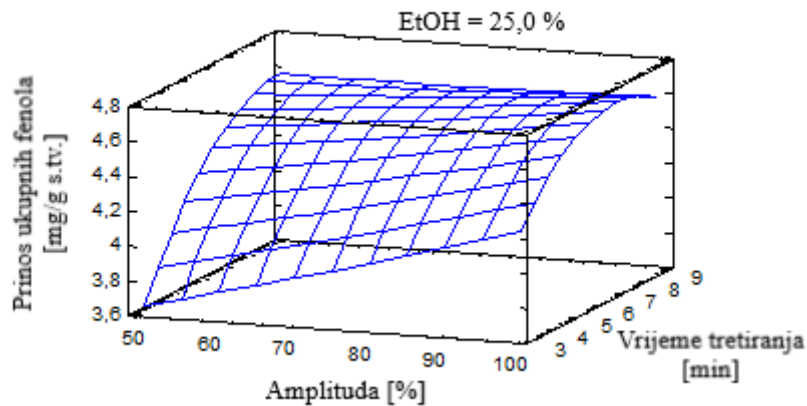


Slika 6. Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – ultrazvučna ekstrakcija

Na slici 6. nalazi se Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice dobivenih ekstrakcijom pomoću ultrazvuka visokog intenziteta. Desno od plave crte se prema opadajućem redoslijedu nalaze statistički značajni parametri B (vrijeme tretiranja), CC (kvadratna interakcija udjela etanola), C (udio etanola) i BC (interakcija vremena tretiranja i udjela etanola). Pareto dijagram odgovara rezultatima iz tablice 14.

U istraživanju Mkadmini Hammi i sur. (2015) provedena je optimizacija ultrazvučne ekstrakcije antioksidativnih komponenti iz kineske datulje pomoću metode odzivne površine. Proučavao se utjecaj vremena tretiranja (5 minuta – 45 minuta), koncentracije etanola (0 % – 100 %), temperature (sobna temperatura – 65 °C) i omjera otapalo: otopljena tvar (10 mL/g – 70 mL/g) na prinos ukupnih fenola. Nakon provedene statističke analize zaključeno je da su vrijeme tretiranja i udio etanola imali značajne kvadratne učinke na prinos ukupnih fenola ($p < 0,05$). Sve nezavisne varijable bile su značajne za prinos ukupnih fenola, a od interakcija su značajnost pokazali interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, interakcija omjera otapalo: otopljena tvar i koncentracije etanola, interakcija ekstrakcijske temperature i omjera otapalo: otopljena tvar i interakcija koncentracije etanola i ekstrakcijske temperature. Zaključeno je da su optimalni parametri ekstrakcije bili udio etanola od 50 %, vrijeme tretiranja od 25 minuta, ekstrakcijska temperatura od 63 °C i omjer otapalo: otopljena tvar 67 mL/g. Statistička

značajnost vremena tretiranja, udjela etanola, kvadratne interakcije udjela etanola i interakcije vremena tretiranja i udjela etanola podudara se s rezultatima dobivenima za uzorke suhe kore rajčice. S obzirom na to da nije proučavan utjecaj vremena skladištenja na prinos ukupnih fenola, rezultati za suhu koru rajčice se ne mogu u potpunosti usporediti s navedenim istraživanjem.



Slika 7. Procjena površine odziva za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – ultrazvučna ekstrakcija

Slika 7. prikazuje dijagram procjene površine odziva za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice dobivenih ekstrakcijom pomoću ultrazvuka visokog intenziteta. Iz slikovnog prikaza vidljivo je da se najmanji prinos dobiva pri ultrazvučnom tretmanu s amplitudom od 50 % i pri vremenu tretiranja od 3 minute. Povećanjem primijenjene amplitude povećava se prinos ukupnih fenola te dostiže najvišu vrijednost pri amplitudi od 100 % i vremenu tretiranja između 7 i 8 minuta.

Tablica 15. Optimizacija prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – ultrazvučna ekstrakcija

Polinom optimizacije	Optimalan odziv			
$\text{PUF7} = 1,64548 + 0,0116245*A + 0,488366*B + 0,0229957*C + 0,0000172506*A^2 - 0,00185525*A*B + 0,000114642*A*B - 0,0265231*B^2 + 0,00305653*B*C - 0,000824345*C^2$	Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
	A	50,00	100,00	100,00
	B	3,00	9,00	7,74
	C	0,00	50,00	35,26
Optimalan PUF7 = 4,76 mg/g _{s.tv.}				

*PUF7 – prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja, A – amplituda, B – vrijeme tretiranja, C – udio etanola

U tablici 15. nalazi se polinom optimizacije i vrijednosti optimalnog odziva za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Iz tablice s rezultatima optimalnog odziva, vidljivo je da optimalna vrijednost primijenjene amplitude iznosi 100,00 %. Optimalna vrijednost vremena tretiranja je 7,74 minute, dok optimalna vrijednost udjela etanola iznosi 35,26 %. Optimalna vrijednost prinosa ukupnih fenola pri navedenoj kombinaciji parametara iznosi 4,76 mg/g_{s.tv.}

4.5.4. Prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja)

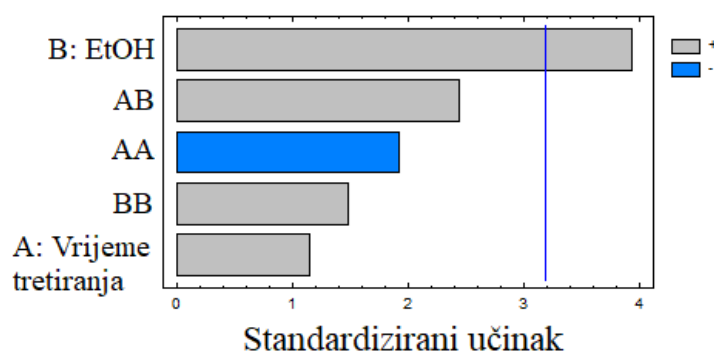
Tablica 16. Analiza varijanci za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – konvencionalna metoda

Izvor	Zbroj kvadrata	D _f – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A	0,0442624	1	0,0442624	1,31	0,3353
B	0,520951	1	0,520951	15,43	0,0294
AA	0,124645	1	0,124645	3,69	0,1504
AB	0,200904	1	0,200904	5,95	0,0926
BB	0,0741112	1	0,0741112	2,19	0,2351
Ukupna pogreška	0,1013	3	0,0337668	-	-
Ukupna korekcija	1,06617	8	-	-	-

*A – vrijeme tretiranja, B – udio etanola, AA – kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB – interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, BB – kvadratna interakcija udjela etanola; R-kvadratno = 90,4987 %, R-kvadratno (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 74,6632 %, standardna pogreška, procjena = 0,183757, srednja apsolutna pogreška = 0,0897631, Durbin-Watsonova statistika = 1,27256 (p = 0,0301), Lag 1 rezidualna autokorelacija = 0,29941

Tablica 16. prikazuje analizu varijanci za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja). Prilikom ispitivanja statističke značajnosti u obzir su uzete nezavisne varijable A i B te njihove interakcije AA, AB i BB. Faktor B ima p-vrijednost manju od 0,05 i iznosi 0,0294 te prema tome predstavlja statistički značajan faktor. Može se uočiti da su statistički značajni parametri različiti za konvencionalnu ekstrakciju i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom.

R-kvadratno iznosi 90,4987 %, odnosno 74,6632 % prilagođeno za stupnjeve slobode, što objašnjava 90,4987 %, odnosno 74,6632 % varijabilnosti rezultata prinosa ukupnih fenola. Usporedbom R-kvadrata za konvencionalnu ekstrakciju i ultrazvučnu ekstrakciju, vidljivo je da je kod ultrazvučne ekstrakcije vrijednost R-kvadratne statistike niža. Durbin-Watsonova statistika ima p-vrijednost jednaku 0,0301. Budući da je p-vrijednost manja od 0,05, postoji mogućnost serijske korelacije zbog redosljeda podataka na razini značajnosti od 5 %,



Slika 8. Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – konvencionalna metoda

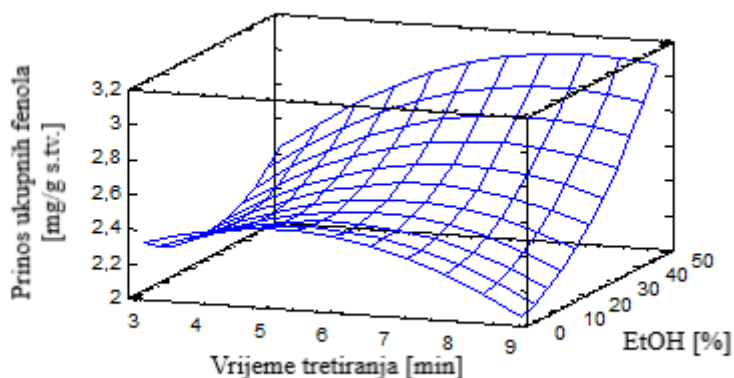
Na slici 8. prikazan je Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja). Parametri koji se na dijagramu nalaze desno od plave linije predstavljaju statistički značajne rezultate. Iz dijagrama se prema tome može zaključiti da je za prinos ukupnih fenola statistički značajan parametar udio etanola B. Lijevo od plave linije prema opadajućem redoslijedu nalaze se interakcije varijabli AB, AA i AB i nezavisna varijabla A te oni nemaju statistički značaj. Dobiveni rezultati su u skladu s provedenom analizom varijanci.

Turkmen Erol i sur. (2022) su istraživali utjecaj koncentracije otapala, omjera otopljene tvari i otapala te vremena tretiranja na prinos ukupnih fenola iz kore kestena. Ekstrakcija je izvedena konvencionalnim tretmanom uz etanol i metanol kao otapala, a određivanje ukupnih fenola provedeno je pomoću Folin-Ciocalteu metode. Kod ekstrakcije etanolom, statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola imali su omjer otopljene tvari i otapala, udio etanola i kvadratni učinak vremena tretiranja. Optimalni uvjeti za ekstrakciju etanolom bili su omjer otopljene tvari i otapala od 1:10, udio etanola od 60 % i vrijeme tretiranja od 82,41 min te je pri tim vrijednostima postignut prinos od 39,02 mg EGK/g_{s.tv.}. Eksperimentalni rezultati bili su slični predviđenima (38,40 mg EGK/g_{s.tv.}), a oba otapala su imala sličan utjecaj na prinos.

Nakon provedene statističke obrade može se utvrditi djelomično podudaranje rezultata konvencionalne ekstrakcije suhe kore rajčice s navedenim istraživanjem koje se odnosi na statistički značaj udjela etanola na prinos ukupnih fenola.

Hernández-Carranza i sur. (2016) su u svom istraživanju proučavali utjecaj vremena tretiranja i ekstrakcijske temperature na prinos fenolnih spojeva iz komine jabuke, kore naranče

i kore banane. Primijećeno je da je prinos ukupnih fenola bio niži u komini jabuke (227 – 394 mg EGK/100 g_{s.tv.}) od vrijednosti dobivenih za koru naranče (391 – 689 mg EGK/100 g_{s.tv.}) i koru banane (304 – 500 mg EGK/100 g_{s.tv.}). Također je primijećeno da parametri imaju različitu statističku značajnost ovisno o nusproizvodu. Kod komine jabuke su svi parametri bili statistički značajni. Kvadratni učinak temperature nije utjecao na ekstrakciju fenola iz kore banane, dok su u kori naranče značajni faktori bili vrijeme tretiranja i ekstrakcijska temperatura te njihova interakcija. Statistička obrada rezultata konvencionalne ekstrakcije suhe kore rajčice nije pokazala sličnost s navedenim istraživanjem. Razlike u statističkoj značajnosti nezavisnih varijabli na prinos ukupnih fenola mogu se pripisati izboru drugačijeg biljnog matriksa i različitim uvjetima ekstrakcije.



Slika 9. Procjena površine odziva za prinos ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – konvencionalna metoda

Iz dijagrama procjene površine odziva na slici 9. može se zaključiti da se najmanja vrijednost prinosa ukupnih fenola dobiva pri vremenu tretiranja od 9 minuta i udjelu etanola od 0 %. Povećanjem udjela etanola povećava se prinos ukupnih fenola te se najveća vrijednost dobiva pri udjelu etanola od 50 % i vremenu tretiranja u rasponu između 7 i 8 minuta.

Tablica 17. Optimizacija prinosa ukupnih fenola neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja) – konvencionalna metoda

Polinom optimizacije	Optimalan odziv			
$\text{PUF} = 1,70123 + 0,286786*A - 0,0215423*B - 0,0277383*A^2 + 0,00298815*A*B + 0,000307997*B^2$	Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
	A	3,00	9,00	7,86
	B	0,00	50,00	50,00
Optimalan PUF = 3,11 mg/g _{s.tv.}				

*PUF – prinos ukupnih fenola nakon 0. dana skladištenja, A – vrijeme tretiranja, B – udio etanola

Tablica 17. uključuje polinom optimizacije i vrijednosti optimalnog odziva za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice neposredno nakon tretmana konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (0. dan skladištenja). Iz dobivenih rezultata primjećuje se da je optimalno vrijeme tretiranja uzoraka 7,86 minuta, a optimalna vrijednost udjela etanola iznosi 50 % i jednaka je najvišoj vrijednosti udjela etanola. Optimalan prinos ukupnih fenola prema dobivenim rezultatima iznosi 3,11 mg/g_{s.tv.} i ta vrijednost je manja od rezultata dobivenog za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom.

4.5.5. Prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja uzoraka suhe kore rajčice dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji

Tablica 18. Analiza varijanci za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – konvencionalna metoda

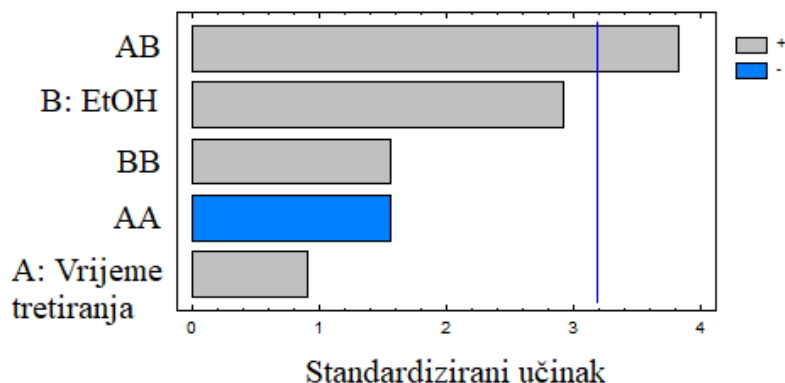
Izvor	Zbroj kvadrata	D _f – stupnjevi slobodne	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A	0,0169439	1	0,0169439	0,81	0,4337
B	0,177196	1	0,177196	8,50	0,0617
AA	0,050935	1	0,050935	2,44	0,2159
AB	0,305392	1	0,305392	14,66	0,0314
BB	0,0510401	1	0,0510401	2,45	0,2155
Ukupna pogreška	0,0625111	3	0,020837	-	-
Ukupna korekcija	0,664018	8	-	-	-

*A – vrijeme tretiranja, B – udio etanola, AA – kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB – interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, BB – kvadratna interakcija udjela etanola; R-kvadratno = 90,5859 %, R-kvadratno (prilagođeno za D_f) = 74,8958 %, standardna pogreška, procjena = 0,14435, srednja apsolutna pogreška = 0,0736981, Durbin-Watsonova statistika = 1,43621 (p = 0,0501), Lag 1 rezidualna autokorelacija = 0,253408

U tablici 18. nalazi se prikaz analize varijanci za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji nakon 7. dana skladištenja. Statistička značajnost testirana je za nezavisne varijable A i B te interakcije varijabli AA, AB i BB. P- vrijednost za interakciju AB iznosi 0,0314, što je manje od 0,05. Na temelju tog podatka zaključuje se da je interakcija AB statistički značajan parametar na razini pouzdanosti od 95 % te da utječe na prinos ukupnih fenola. Usporedbom rezultata konvencionalne ekstrakcije u vodenoj kupelji s rezultatima dobivenima pomoću ultrazvučne ekstrakcije, vidi se razlika u statističkoj značajnosti parametra.

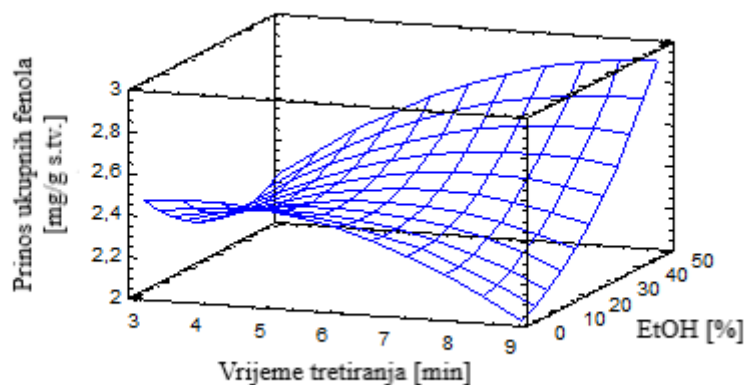
Prema vrijednosti R-kvadratne statistike, primjećuje se da prilagođeni model objašnjava 90,5859 % varijabilnosti rezultata prinosa ukupnih fenola, odnosno 74,8958 % u slučaju prilagodbe za stupnjeve slobode. Usporedbom R-kvadratne statistike za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i konvencionalnu ekstrakciju, vidljivo je da je kod konvencionalne ekstrakcije postignuta viša vrijednost. Durbin-Watsonova statistika pokazuje p-vrijednost od 0,0501 te stoga ne postoji serijska povezanost zbog rasporeda podataka na razini značajnosti od

5 %.



Slika 10. Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – konvencionalna metoda

Slika 10. prikazuje Pareto dijagram za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji nakon 7. dana skladištenja. Na grafičkom prikazu uočljivo je da vrijednost AB (interakcija vremena tretiranja i udjela etanola) prelazi plavu liniju čime se potvrđuje statistički značaj tog parametra određen analizom varijanci. Također je vidljivo da parametri B i A te interakcije BB i AA nemaju statistički značajan učinak na prinos ukupnih fenola. Dobiveni rezultati su u skladu s provedenom analizom varijanci iz tablice 18.



Slika 11. Procjena površine odziva za prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – konvencionalna metoda

Na slici 11. nalazi se graf procjene površine odziva za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji nakon 7. dana skladištenja. Iz grafa je vidljivo da se najmanji prinos dobiva pri vremenskom tretiranju od 9 minuta i udjelu etanola od 0 %. Najviša vrijednost postiže se pri vremenu tretiranja od 9 minuta i udjelu etanola od 50 %.

Tablica 19. Optimizacija prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja – konvencionalna metoda

Polinom optimizacije	Optimalan odziv			
$\text{PUF7} = 2,20817 + 0,138391 * A - 0,0280109 * B - 0,0177317 * A^2 + 0,00368415 * A * B + 0,0002556 * B^2$	Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
	A	3,00	9,00	9,00
	B	0,00	50,00	50,00
	Optimalan PUF7 = 2,91 mg/g _{s.tv.}			

*PUF7 – prinos ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja, A – vrijeme tretiranja, B – udio etanola

Tablica 19. sadrži jednadžbu eksperimentalnog modela te rezultate optimalnog odziva za prinos ukupnih fenola u uzorcima suhe kore rajčice dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji nakon 7. dana skladištenja. U tablici optimalnog odziva vidljivo je da je optimalna vrijednost vremena tretiranja uzoraka suhe kore rajčice jednaka 9 minuta, što odgovara najvećem primijenjenom vremenu tretiranja. Optimalan rezultat udjela etanola iznosi 50 % i ta vrijednost također odgovara najvišem primijenjenom udjelu etanola. Optimalan prinos ukupnih fenola nakon provedene optimizacije iznosi 2,91 mg/g_{s.tv.}, a to je manja vrijednost od prinosa dobivenog neposredno nakon tretmana (0. dan skladištenja). Usporedbom optimalne vrijednosti prinosa ukupnih fenola nakon 7. dana skladištenja dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i konvencionalnom ekstrakcijom, vidljivo je da se veći rezultat dobiva kada se primjenjuje ultrazvuk visokog intenziteta.

5. ZAKLJUČAK

1. Najveći prinos ukupnih fenola u uzorcima tretiranim ultrazvukom neposredno nakon tretmana (nakon 0. dana skladištenja) iznosio je $4,92 \pm 0,56$ mg/g_{s.tv.} uz primjenu 100 %-tne amplitude, 9 minuta tretiranja i deionizirane vode kao otapala. Statistička analiza pokazala je da su vrijeme tretiranja i kvadratna interakcija udjela etanola statistički značajni parametri ($p < 0,05$).
2. Poslije 7. dana skladištenja najveći prinos ukupnih fenola u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokog intenziteta iznosio je $4,86 \pm 0,02$ mg/g_{s.tv.} kada se primijenila amplituda od 100 %, 6 minuta vremenskog tretiranja i udio etanola od 25 %. Statistički značajni parametri su vrijeme tretiranja, udio etanola, interakcija vremena tretiranja i udjela etanola i kvadratna interakcija udjela etanola.
3. Neposredno nakon tretiranja (nakon 0. dana skladištenja) najveći prinos ukupnih fenola dobiven pomoću ultrazvučne ekstrakcije veći je za 63,08 % od najvećeg prinosa dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom. Poslije 7. dana skladištenja najveći prinos ukupnih fenola dobiven pomoću ultrazvučne ekstrakcije veći je za 68,56 % od najvećeg prinosa dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom.
4. Optimizirani parametri za uzorke tretirane ultrazvukom neposredno nakon ekstrakcije (0. dan skladištenja) iznose 86,52 % amplitude, 9 minuta vremenskog tretiranja i 50 % udjela etanola. Nakon 7. dana skladištenja optimalni parametri su 100 % amplitude, 7,74 min tretiranja i 35,26 % udjela etanola.
5. Najveća ultrazvučna snaga iznosi 59,22 W i postignuta je pri amplitudi od 100 %, 9 minuta tretiranja i udjelu etanola od 25 %. Amplituda je statistički značajan parametar za ultrazvučnu snagu ($p < 0,05$). Optimalni ekstrakcijski uvjeti za dobivanje najveće ultrazvučne snage su 92,07 % amplitude, 6,64 min vremenskog tretiranja i 25,53 % udjela etanola.
6. Suha kora rajčice predstavlja sirovinu bogatu fenolnim komponentama s potencijalom u proizvodnji funkcionalnih proizvoda.
7. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta je alternativa toplinskim metodama ekstrakcije pomoću koju se može ostvariti održiva proizvodnja uz iskorištavanje bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda prehrambene industrije.

6. LITERATURA

Abbassi N, Talhajt SA, Fadel S i Ahra M (2021) Tomato Pomace Valorization By Oil And Bioactive Compounds Extraction: Case Of Souss-Massa Region. *Am J Innov Res Appl Sci* **12**, 211–216.

Ademosun OT, Adebayo AH, Ajanaku KO (2021) *Solanum lycopersicum* and *Daucus carota*: effective anticancer agents (a mini review). *J Phys Conf Ser* **1943**, 012169. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1943/1/012169>

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* **4**, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Al-Dhabi NA, Ponmurugan K, Maran P (2017) Development and Validation of Ultrasound-Assisted Solid-Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Waste Spent Coffee Grounds. *Ultrason Sonochem* **34**, 206–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>

Albuquerque BR, Heleno SA, Oliveira MBPP, Barros L, Ferreira ICFR (2021) Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct* **12**, 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>

Ali MY, Sina AAI, Khandker SS, Neesa L, Tanvir EM, Kabir A i sur. (2021) Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Tomatoes and Their Impact on Human Health and Disease: A Review. *Foods* **10**, 45. <https://dx.doi.org/10.3390/foods10010045>

Antony A, Farid M (2022) Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *App Sci* **12**, 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>

Arrudaa HS, Silvab EK, Pereiraa GA, Angolinia CFF, Eberlinc MN, Meirelesb MAA, i sur. (2019) Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. *Ultrason Sonochem* **50**, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.002>

Baş D, Boyaci IH (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* **78**, 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>

Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC (2013) Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* **18**, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>

Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK (2022) Application of High Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. *Foods* **11**, 122. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* **34**, 540–560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chen S, Zeng, Z, Hu N, Bai B, Wang H, Suo Y (2017) Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chem* **242**, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.105>

Christou A, Stavrou IJ, Kapnissi-Christodoulou CP (2021) Continuous and pulsed ultrasound-assisted extraction of carob's antioxidants: Processing parameters optimization and identification of polyphenolic composition. *Ultrason Sonochem* **76**, 105630. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105630>

Coman V, Teleky BE, Mitrea L, Martău GA, Szabo K, Călinoiu LF i sur. (2019) Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. *Adv Food Nutr Res* **91**, 157–225. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.07.001>

Das RS, Tiwari BK, Chemat F, Garcia-Vaquero M (2022) Impact of ultrasound processing on alternative protein systems: Protein extraction, nutritional effects and associated challenges. *Ultrason Sonochem* **91**, 106234. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106234>

Dent M, Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Bosiljkov T, Ježek D, Brnčić M (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem Biochem Eng Q* **29**, 475–484. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2168>

Dobrinčić A, Repajić M, Garofulić IE, Tuđen I, Dragović-Uzelac V, Levaj B (2020) Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols. *Processes* **8**, 1008. <https://doi.org/10.3390/pr8091008>

Dukić J, Hunić M, Nutrizio M, Režek Jambrak A (2022) Influence of High-Power Ultrasound

on Yield of Proteins and Specialized Plant Metabolites from Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* var. *altissima*). *Appl Sci* **12**, 8949. <https://doi.org/10.3390/app12188949>

Esparza I, Jimenez-Moreno N, Bimbela F, Ancín-Azpilicueta C, Gandía LM (2020) Review Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *J Environ Manage* **265**, 110510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110510>

FAO (2023) Food loss and waste. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/nutrition/capacity-development/food-loss-and-waste/en/>. Pristupljeno 20. veljače 2023.

FAOSTAT (2023) Crops and livestock products. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Pristupljeno 20. veljače 2023.

Farcas AC, Socaci AS, Nemes SA, Salanta LA, Chis MS, Pop CR i sur. (2022) Cereal Waste Valorization through Conventional and Current Extraction Techniques-An Up-to-Date Overview. *Foods* **11**, 2454. <https://doi.org/10.3390/foods11162454>

Fernando GSN, Wood K, Papaioannou EH, Marshall LJ, Sergeeva NN, Boesch C, i sur. (2021) Application of ultrasound-assisted extraction method to recover betalains and polyphenols from red beetroot waste. *ACS Sustain Chem Eng* **9**, 8736–8747. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01203>

Gulcin I (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* **94**, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

He B, Zhang LL, Yue XY, Liang J, Jiang J, Gao XL i sur. (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace, *Food Chem* **204**, 70–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>

Hernández-Carranza P, Ávila-Sosa R, Guerrero-Beltrán JA, Navarro-Cruz AR, Corona Jiménez E, Ochoa-Velasco CE (2016) Optimization of Antioxidant Compounds Extraction from Fruit By-Products: Apple Pomace, Orange and Banana Peel. *J Food Process Pres* **40**, 103–115. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12588>

Hudz N, Yezerska O, Shanaida M, Sedláčková VH, Wiczorek PP (2019) Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia* **66**, 209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976>

Imbert E (2017) Food waste valorization options: opportunities from the bioeconomy. *Open Agric.* **2**, 195–204. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0020>

Jadhav HB, Annapure US, Deshmukh RR (2021) Non-thermal Technologies for Food Processing. *Front Nutr* **8**, 657090. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.657090>

Khadhraoui B, Ummat V, Tiwari BK, Fabiano-Tixier AS, Chemat F (2021) Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. *Ultrason Sonochem* **76**, 105625. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105625>

Khan MK, Ahmad K, Hassan S, Imran M, Ahmad N, Changmou X (2018) Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innov Food Sci Emerg Technol* **45**, 361–381. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.006>

Khuri A, Mukhopadhyay S (2010) Response Surface Methodology. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat* **2**, 128–149. <https://doi.org/10.1002/wics.73>

Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, Gliszczynska-Swiglo A (2007) Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Compos Anal* **20**, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Lamuela-Raventós RM (2018) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. U: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F (ured.) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications, Wiley, str. 107–115. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

Laranjeira T, Costa A, Faria-Silva C, Ribeiro D, de Oliveira JMPF, Simões S, Ascenso A (2022) Sustainable Valorization of Tomato By-Products to Obtain Bioactive Compounds: Their Potential in Inflammation and Cancer Management. *Molecules* **27**, 1701. <https://doi.org/10.3390/molecules27051701>

Liao J, Xue H, Li J (2022) Extraction of phenolics and anthocyanins from purple eggplant peels by multi-frequency ultrasound: Effects of different extraction factors and optimization using

uniform design. *Ultrason Sonochem* **90**, 106174.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106174>

Madia VN, De Vita D, Ialongo D, Tudino V, De Leo A, Scipione L i sur. (2021) Recent Advances in Recovery of Lycopene from Tomato Waste: A Potent Antioxidant with Endless Benefits. *Molecules* **26**, 4495. <https://doi.org/10.3390/molecules26154495>

Mandić AI, Dilas SM, Četković GS, Čanadanović-Brunet JM, Tumbas VT (2008) Polyphenolic composition and antioxidant activities of grape seed extract. *Int J Food Prop* **11**, 713–726. <https://doi.org/10.1080/10942910701584260>

Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N (2017) Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **7**, 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>

Mohd Basri MS, Abdul Karim Shah NN, Sulaiman A, Mohamed Amin Tawakkal IS, Mohd Nor MZ, Ariffin SH i sur. (2021) Progress in the Valorization of Fruit and Vegetable Wastes: Active Packaging, Biocomposites, By-Products, and Innovative Technologies Used for Bioactive Compound Extraction. *Polymers* **13**, 3503. <https://doi.org/10.3390/polym13203503>

Mkadmini Hammi K, Jdey A, Abdelly C, Majdoub H, Ksouri R (2015) Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology, *Food Chem* **184**, 80–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.047>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Nayak A, Bhushan B (2019) An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *J Environ Manage* **233**, 352–370. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.041>

Nowacka M, Dadan M, Janowicz M, Wiktor A, Witrowa-Rajchert D, Mandal R i sur. (2021) Effect of nonthermal treatments on selected natural food pigments and color changes in plant material. *Comp. Rev Food Sci Food Saf* **20**, 5097–5144. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12824>

Paniwnyk L, Alarcon-Rojo A, Rodriguez-Figueroa JC, Toma M (2017) The Use of Ultrasound as an Enhancement Aid to Food Extraction. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.)

Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food, Academic Press, Cambridge, str. 399–440.

Patel LK, Singh AK, Sharma V, Kala P (2021) Analysis of a hybrid ultrasonic horn profile using finite element analysis. *Mater Today Proc* **41**, 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.465>

Pattnaik M, Pandey P, Martin GJO, Mishra HN, Ashokkumar M (2021) Innovative Technologies for Extraction and Microencapsulation of Bioactives from Plant-Based Food Waste and Their Applications in Functional Food Development. *Foods* **10**, 279. <https://doi.org/10.3390/foods10020279>

Perea-Dominguez XP, Hernandez-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S (2018) Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *J Food Sci Technol* **55**, 3453–3461. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3269-9>

Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Eisner P (2021) How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants* **10**, 811. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>

Sagar NA, Pareek S, Sharma S, Yahia EM, Lobo MG (2018) Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **17**, 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>

Şahin S, Şamlı R (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason Sonochem* **20**, 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>

Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Basilio Heredia J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velazquez DA (2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* **5**, 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>.

Santos HM, Lodeiro C, Capelo-Martínez JL (2008) The Power of Ultrasound. U: Capelo-Martínez JL (ured.) *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Wiley, New Jersey, str. 1–16.

Sedem Dzah C, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G i sur. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci* **35**, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

Setyaningsih W, Saputro IE, Carrera CA, Palma M (2019) Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. *Food Chem* **288**, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.107>

Sharmin T, Ahmed N, Hossain A, Hosain MM, Mondal SC, Haque MR i sur. (2016) Extraction of Bioactive Compound from Some Fruits and Vegetables (Pomegranate Peel, Carrot and Tomato). *Am J Food Nutr* **4**, 8–19. <https://doi.org/10.12691/ajfn-4-1-2>.

Sharayei P, Azarpazhooh E, Zomorodi S, Ramaswamy HS (2019) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT-Food Sci Technol* **101**, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>

Socas-Rodríguez B, Álvarez-Rivera G, Valdés A, Ibáñez E, Cifuentes A (2021) Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization?. *Trends Food Sci Technol* **114**, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>

Tao Y, Sun DW (2015) Enhancement of Food Processes by Ultrasound: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**, 570–594. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.667849>

Trombino S, Cassano R, Procopio D, Di Gioia ML, Barone E (2021) Valorization of Tomato Waste as a Source of Carotenoids. *Molecules* **26**, 5062. <https://doi.org/10.3390/molecules26165062>

Turkmen Erol N, Incedayi B, Sari F, Copur OU (2022) Valorization of agricultural by-product: Optimization of alcohol-based extraction of polyphenols from chestnut peel using Box-Behnken Design. *Int Food Res J* **29**, 86–97. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.1.10>

Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Martínez-Huelamo M, Jáuregui O, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM (2011a) Phenolic Profile and Hydrophilic Antioxidant Capacity as Chemotaxonomic Markers of Tomato Varieties. *J Agric Food Chem* **59**, 3994–4001. <https://doi.org/10.1021/jf104400g>

Vallverdú-Queralt A, Arranz S, Medina-Remón A, Casals-Ribes I, Lamuela-Raventós RM (2011b) Changes in Phenolic Content of Tomato Products during Storage. *J Agric Food Chem* **59**, 9358–9365. <https://doi.org/10.1021/jf202140j>

Valdez-Morales M, Espinosa-Alonso LG, Espinoza-Torres LC, Delgado-Vargas F, Medina-Godoy S (2014) Phenolic content, and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel and seeds, and tomato by-products. *J Agric Food Chem* **62**, 5281–5289. <https://doi.org/10.1021/jf5012374>

Wang W, Chen W, Zou M, Ruiling L, Wang D, Hou F i sur. (2018) Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *J Food Eng* **234**, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.016>

Wen C, Zhang J, Zhang H, Dzah CS, Zandile M, Duan Y i sur. (2018) Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops - A review. *Ultrason Sonochem* **48**, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>

Yolmeh M, Jafari SM (2017) Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Technol* **10**, 413–433. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis