

# Primjena 3D - ispisanog reaktora za provedbu tretmana pulsirajućim električnim poljem

---

Dević, Dorian

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:654727>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Dorian Dević

**PRIMJENA 3D - ISPISANOG REAKTORA ZA  
PROVEDBU TRETMANA PULSIRAJUĆIM  
ELEKTRIČNIM POLJEM**

*Rad je izrađen u Laboratoriju za Procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tomislave Vukušić Pavičić, te uz pomoć dr. sc. Višnje Stulić.*

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Tomislavi Vukušić Pavičić na vrlo ugodnoj atmosferi tijekom izvedbe cjelokupnog rada, uloženom vremenu, prijateljskom pristupu te brojnim savjetima i pomoći oko pisanja diplomskog rada kao i oko svega što me zanimalo i što mi je bilo potrebno. Također se zahvaljujem i dr. sc. Višnji Stulić na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada te savjetima i pomoći pri pisanju rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Tončiju Reziću na prijateljskim i stručnim savjetima te na pomoći pri ispisu reaktora korištenog u ovom radu.*

*Također se želim zahvaliti Franki Markić mag. educ. biol. et chem. na čestim ostajanjima u laboratoriju s ciljem pomoći i mojeg detaljnijeg shvaćanja nekih od metoda korištenih u ovom radu, prijateljskim savjetima te uvijek veseloj atmosferi tijekom rada.*

*No, ipak, najveću zahvalnost zaslužuju moji roditelji Sanja i Goran, moj mlađi brat Bruno te cjelokupna obitelj i prijatelji koji su mi u svakom trenu dana i noći uvijek bili nadohvat ruke i pružili mi podršku kakvu ne bih mogao ni zamisliti. Bez njih, moje studiranje ne bi bilo isto, a gotovo sam siguran, niti moguće.*

*Hvala Vam što ste bili uz mene!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Upravljanje sigurnošću hrane

### PRIMJENA 3D - ISPISANOG REAKTORA ZA PROVEDBU TRETMANA PULSIRAJUĆIM ELEKTRIČNIM POLJEM

Dorian Dević, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058210086

**Sažetak:** U ovom istraživanju konstruiran je protočni 3D - ispisani reaktor u kojem su provedeni predtretmani ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz povrća. Sirovine korištene u radu su batat (*Ipomoea batatas* L.) i paprika (*Capsicum annuum* L.). Ispitivane su razlike u boji, masenim udjelima fenolnih spojeva i karotenoida te antioksidacijskih svojstava pri varijabilnim parametrima pulsirajućeg električnog polja – duljina pulsa (0,5; 1,25; 2,0  $\mu$ s) te vrijeme tretmana (6; 9; 12 min), dok je jakost električnog polja bila konstantna (4,26 kV cm<sup>-1</sup>). Metode korištene za analizu uzoraka su spektrofotometrijsko i HPLC određivanje udjela karotenoida, spektrofotometrijsko određivanje udjela ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti i parametara boje. U provedbi eksperimenta također je praćena promjena pH i električne provodljivosti. Najveći maseni udio  $\beta$ -karotena u uzorcima paprike bio je kod uzorka P2 (0,148 mg g<sup>-1</sup> s.tv.), a kod uzoraka batata u uzorku B9 (0,119 mg g<sup>-1</sup> s.tv.). Uočene su prednosti i mane konstrukcije protočnog reaktora te predložene promjene za buduće konstrukcije.

**Ključne riječi:** 3D - ispis, pulsirajuće električno polje, fenolni spojevi, karotenoidi

**Rad sadrži:** 42 stranice, 24 slike, 5 tablica, 44 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Višnja Stulić

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Zoran Herceg (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (mentor)
3. prof. dr. sc. Tonči Rezić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 26. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Safety Management

### APPLICATION OF 3D PRINTED REACTOR FOR PULSED ELECTRIC FIELD TREATMENTS

Dorian Dević, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058210086

**Abstract:** In this research, a flow-through 3D printed reactor was constructed, in which pretreatments for the extraction of bioactive components from vegetables were conducted. The raw materials used in the study were sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.). Differences in color, mass fractions of phenolic compounds, carotenoid compounds, and antioxidant properties were examined under variable pulsed electric field ( $4,26 \text{ kV cm}^{-1}$ ) parameters – pulse duration (0.5; 1.25; 2.0  $\mu\text{s}$ ) and treatment time (6; 9; 12 minutes). Methods used for sample analysis were spectrophotometric and HPLC determination of carotenoid content, spectrophotometric determination of total polyphenol content and antioxidant activity, as well as color parameters. During the experiment, changes in pH and electrical conductivity were also monitored. The highest  $\beta$ -carotene content in the pepper samples was observed in sample P2 ( $0.148 \text{ mg g}^{-1} \text{ d.m.}$ ), while in the sweet potato samples, it was found in sample B9 ( $0.119 \text{ mg g}^{-1} \text{ d.m.}$ ). The advantages and disadvantages of the flow reactor design were noted, and modifications for future designs were proposed.

**Keywords:** 3D print, pulsed electric field, phenolic compounds, carotenoids

**Thesis contains:** 42 pages, 24 figures, 5 tables, 44 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Tomislava Vukušić Pavičić PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Višnja Stulić PhD

#### Reviewers:

1. Zoran Herceg, PhD, Full professor (president)
2. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Tonči Rezić, PhD, Full professor (member)
4. Klara Kraljić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 26<sup>th</sup>, 2024

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. 3D - ISPIS</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. BATAT</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4. PAPRIKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5. FENOLNI SPOJEVI</b> .....	<b>6</b>
<b>2.6. KAROTENOIDI</b> .....	<b>8</b>
2.6.1. $\beta$ -karoten .....	9
2.6.2. Likopen .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>10</b>
3.1.1. Pribor i aparatura .....	10
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	<b>11</b>
3.2.1. Konstrukcija i trodimenzionalni ispis protočnog reaktora za tretman PEP-om .....	11
3.2.2. Provedba eksperimenta .....	14
3.2.3. Određivanje pH i električne provodljivosti .....	14
3.2.4. Parametri boje .....	15
3.2.5. Određivanje karotenoida spektrofotometrijskom metodom .....	15
3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom .....	16
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	17
3.2.8. Određivanje karotenoida kromatografskom (HPLC) metodom .....	19
3.2.9. Obrada podataka .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. 3D - ISPIS PROTOČNOG REAKTORA</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2. VRIJEDNOSTI pH I ELEKTRIČNE PROVODLJIVOSTI</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA PARAMETARA BOJE</b> .....	<b>26</b>
<b>4.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA UDJELA KAROTENOIDA</b> .....	<b>28</b>
4.4.1. Likopen .....	28
4.4.2. $\beta$ -karoten .....	29
4.4.3. Klorofil A .....	30
4.4.4. Klorofil B .....	31



<b>4.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....</b>	<b>34</b>
<b>4.7. ANALIZA UDJELA KAROTENOIDA POMOĆU HPLC-a .....</b>	<b>35</b>
4.7.1. $\beta$ -karoten.....	35
4.7.2. Likopen .....	36
<b>4.8. OBRADA PODATAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>

## 1. UVOD

Pojava naprednih digitalnih tehnologija u proizvodnji dodaje novu dimenziju obradi polimera i unosi veliki potencijal u pogledu proizvodnje održivih, laganih konstrukcija te izrade složenih multifunkcionalnih proizvoda u samo jednom koraku obrade.

Za postupke aditivne proizvodnje koriste se razni materijali poput metala, polimera, keramike, biomaterijala i sl. S obzirom na razvijenost postupaka aditivne tehnologije, materijali koji se koriste za 3D - ispis mogu biti u krutom, tekućem i praškastom stanju. U odnosu na tradicionalne postupke proizvodnje, aditivna proizvodnja pruža gotovo umjetničku slobodu u dizajnu i izradi komponenti uz automatizirane sustave bez upotrebe kalupa, strojne obrade i velikih količina otpadnog materijala, s minimalnim utjecajem na okoliš. Tehnologija aditivne proizvodnje omogućuje masovnu prilagodbu uz niske troškove, pomoću koje će trgovci u bliskoj budućnosti izrađivati dijelove po narudžbi na licu mjesta te tako smanjiti, ili u potpunosti izbaciti, potrebu za skladištenjem velikog broja specijaliziranih dijelova.

Pulsirajuće električno polje je netermalna tehnologija procesiranja hrane koja se temelji na izlaganju namirnice električnom polju s ciljem inaktivacije mikroorganizama, ali i ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz hrane. U procesima ekstrakcije koristi se kao predtretman zbog pojave elektroporacije do koje dolazi tijekom izlaganja, a potpomaže otvaranju pora i olakšanoj ekstrakciji željenih komponenti.

Cilj ovog rada bio je izraditi protočni reaktor za predtretmane pulsirajućim električnim poljem primjenom aditivne tehnologije u svrhu ispitivanja utjecaja na ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz povrća. Na uzorcima batata i paprike spektrofotometrijskim i kromatografskim analizama željelo se utvrditi kakav je utjecaj postavljenih parametara tretmana pulsirajućim električnim poljem na maseni udio karotenoida i fenolnih spojeva u uzorcima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. 3D - ISPIS

U aditivnoj proizvodnji, poznatoj i kao trodimenzionalni (3D) ispis, računalno dizajnirani virtualni 3D - objekti pretvaraju se putem digitalne obrade u stvarne trodimenzionalne objekte dodavanjem slojeva jednog na drugi tijekom 3D - ispisa. Za razliku od subtraktivne ili formativne proizvodnje, objekti se izrađuju u jednom koraku bez potrebe za kalupima ili dodatnom obradom (Schirmeister i sur., 2019).

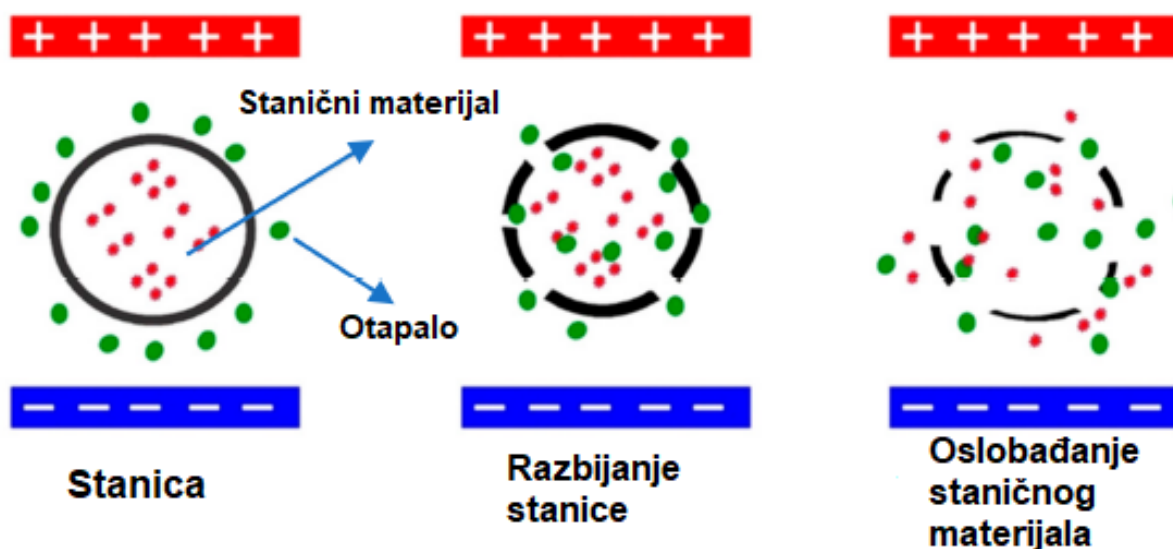
3D - ispis je proizvodni proces u kojem se objekt stvara aditivno, sloj po sloj. Digitalni 3D - model, izrađen pomoću softvera za računalno potpomognuto projektiranje (engl. *Computer - Assisted Design, CAD*) ili 3D - skeniranjem, „reže se“ na pojedinačne slojeve koji zatim daju kôd putanje alata za 3D - pisač. Ovisno o korištenoj tehnologiji, stroj primjenjuje specifičan proces kako bi ponovno stvorio model u fizičkom svijetu, od osnovnog sloja do vrha, sve dok objekt ne bude dovršen. Tehnologija je proglašena revolucionarnim iskorakom u proizvodnji iz više razloga uključujući mogućnost automatizacije proizvodnje, izravnu izradu CAD modela bez potrebe za skupim alatima i stvaranje složenih geometrija koje je nemoguće proizvesti drugim proizvodnim metodama. Iako aditivna proizvodnja postoji od 1980 - ih, doživjela je novi val interesa u medijima s povećanom pažnjom posvećenom industriji početkom 2010. godine zbog pojave jeftinih stolnih 3D - pisaa (Molitch-Hou, 2018).

Među tehnologijama aditivne proizvodnje, 3D - ispis temeljen na ekstruziji, kao što je proizvodnja rastaljenim filamentom (engl. *Fused filament fabrication, FFF*), također poznata pod imenom modeliranje topljenim depozitima (engl. *Fused deposition modeling, FDM*), uvelike je najpopularnija tehnologija aditivne proizvodnje. U ovom procesu polimerni filamenti ili rastopljeni polimeri uvode se u zagrijanu mlaznicu koja omogućuje ekstruziju polimernih niti kako bi se sloj po sloj izgradili 3D - objekti prema 3D - modelima izrađenim računalno potpomognutim dizajnom, CAD (Schirmeister i sur., 2019).

Aditivna proizvodnja je moćan alat koji omogućava smanjenje složenosti u opskrbnom lancu na različite načine. Zsigurno neće u potpunosti zamijeniti postojeće konvencionalne metode proizvodnje, no očekuje se da će revolucionizirati mnoga manja specifična područja proizvodnje. Postoji pet ključnih prednosti koje aditivna proizvodnja ima u odnosu na tradicionalnu proizvodnju, a to su: cijena, brzina, kvaliteta, inovacija/transformacija i utjecaj. Tehnologija također omogućuje masovnu prilagodbu uz niske troškove, pomoću koje trgovci već sada mogu dizajnirati i personalizirati proizvode bez dugog vremena isporuke. Omogućivanjem ispisa dijelova na udaljenim lokacijama putem lokalnih distributera smanjuju se ograničenja isporuke robe. Rezultat toga su skraćivanje opskrbnog lanca i ušteda jer transport i skladištenje zaliha više nisu potrebni zbog čega se predviđa da će tehnologija eksponencijalno rasti, a potreba za velikim količinama zaliha postati prošlost (Attaran, 2017).

## 2.2. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

Pulsirajuće električno polje (PEP) je netermalna tehnologija procesiranja hrane koja ima vrlo široku primjenu. Tretman pulsirajućim električnim poljem izaziva u namirnicama biljnog podrijetla pojavu stresa na staničnoj razini čime se povećava efikasnost ekstrakcije unutarstaničnih tvari (Andreou i sur., 2020). Navedena tehnologija se temelji na izlaganju namirnice električnom polju što izaziva elektroporaciju citoplazmatskih membrana čime se pojačava difuzija otopljenih tvari koje se nalaze unutar stanice (Pataro i sur., 2020). Jedna od najvećih prednosti upotrebe ove tehnologije za poboljšanje ekstrakcije je upravo njezina netermalna osobina koja osigurava nepromijenjenu kvalitetu tretirane namirnice te zadržavanje nutritivnih svojstava (Andreou i sur., 2020). Tehnologija pulsirajućeg električnog polja koristi umjerenu do visoku snagu električnog polja u rasponu od 100 – 300 V cm<sup>-1</sup> u šaržnom načinu rada i 20 – 80 kV cm<sup>-1</sup> u kontinuiranom načinu ekstrakcije. Dva su pogleda uobičajena među različitim znanstvenim hipotezama koje se odnose na mogući mehanizam PEP-a. Kad govorimo o biološkoj staničnoj membrani, prvi od ta dva pogleda je ubrzavanje kemijski baziranih reakcija različitih spojeva radi poboljšanja topljivosti otapala, a drugi je proces elektroporacije (slika 1). Elektropermeabilizacija ili elektroporacija uključuje vanjsku električnu silu koja povećava propusnost staničnih membrana. Hrana ili drugi ciljani materijali postavljaju se između dviju elektroda i visokonaponskog električnog polja. Stanična membrana se probija stvaranjem hidrofilnih pora koje otvaraju proteinske kanale. Membrana posljedično gubi svoju strukturnu funkcionalnost, a biljni stanični materijal se ekstrahira (Ranjha i sur., 2021).



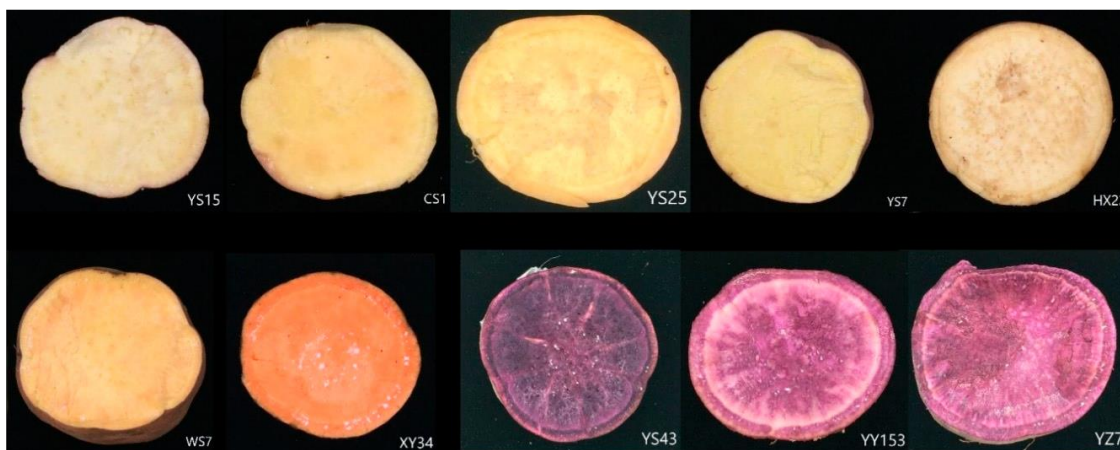
**Slika 1.** Mehanizam elektroporacije kod ekstrakcije PEP - om (prema Ranjha i sur., 2021)

Ova tehnologija koristi se za inaktivaciju različitih mikroorganizama i enzima ili za smanjenje njihove aktivnosti u mliječnim proizvodima, proizvodima od jaja, sokovima i drugim tekućim namirnicama kako bi se osigurala sigurnost i odgovarajuća kvaliteta hrane koja zadovoljava zahtjeve potrošača (Kempkes i Munderville, 2017). Budući da se apsorbira mala količina energije tijekom PEP konzerviranja, temperatura obrađene hrane ostaje niska u usporedbi s konvencionalnim tehnikama pasterizacije. PEP se također koristi za predobradu krutih namirnica poput jabuka, ljuski jaja, krumpira i mesa. Pulsirajuće električno polje često povećava učinkovitost i prinos procesa ekstrakcije, kao što su ekstrakcija šećera iz cikle, soka iz grožđa ili jabuka, te bioaktivnih spojeva iz voća i povrća (Arshad i sur., 2020).

Pulsirajuće električno polje, prema dosad provedenim istraživanjima, dokazano poboljšava ekstrakciju saharoze iz šećerne repe (Almohammed i sur., 2016), prirodnih bojila poput betaina iz cikle (López i sur., 2008), karotenoida iz rajčice (Bot i sur., 2018), fenolnih spojeva iz crvenog vina (López i sur., 2008) i ulja iz kukuruza, maslina i uljane repice (Guderjan i sur., 2005).

### 2.3. BATAT

Batat ili slatki krumpir (*Ipomoea batatas* L.) višegodišnja je biljka iz porodice *Convolvulaceae*. U mnogim zemljama njegov uzgoj i proizvodnja od ključne su važnosti jer pridonose smanjenju nestašice hrane u vremenima krize poput prirodnih katastrofa ili ratova. Pripada najvažnijim, najsvestranijim i još uvijek nedovoljno iskorištenim prehrambenim kulturama na svijetu s godišnjom proizvodnjom većom od 90 milijuna tona, od čega proizvodnji najviše doprinose azijske i afričke zemlje, a posebice Kina (Alam, 2021). Boja kore korijena batata varira od bijele, krem, žute, narančaste, ružičaste i crvene pa sve do ljubičaste. Meso također može biti bijele boje ili različitih nijansi krem, žute, narančaste i ljubičaste boje (Alam i sur., 2016). Varijacije u obojenosti mesa batata prikazane su na slici 2.



**Slika 2.** Presjeci korijena batata u karakterističnim bojama (Sun i sur., 2019)

Gotovo svaki dio batata (stabljika, list i korijen) može se jesti, no treba znati da različiti dijelovi biljke mogu varirati u sadržaju hranjivih i manje hranjivih tvari te bioaktivnih spojeva. Korijen se diljem svijeta najčešće konzumira, a osim djelomične upotrebe kao stočna hrana, listovi batata uglavnom su zanemareni. Korištenje listova slatkog krumpira kao povrća moglo bi značajno povećati dostupnost hrane u zemljama koje se često suočavaju s nestašicama hrane. U određenim dijelovima svijeta, listovi slatkog krumpira u manjoj se mjeri jedu kao svježe povrće (Islam, 2014).

Radi sastava bogatog karotenoidima i ukupnim sadržajem polifenola, batat narančaste boje postaje sve važnija namirnica koja predstavlja najjeftiniji izvor antioksidansa, pružajući više zdravstvenih koristi. Konzumacija korijena batata narančaste boje također može osigurati održiv unos vitamina A, koji ima ključnu ulogu u prevenciji i liječenju noćnog sljepila (Alam i sur., 2020).

Suočeni s rastućom nestašicom hrane, proizvođači hrane i znanstvenici postaju sve više zainteresirani za nedovoljno iskorišteno povrće poput slatkog krumpira, odnosno batata. Još jedna od velikih prednosti kulture batata jest ta da se može ubirati više puta godišnje, dajući znatno veće prinose od ostalog lisnatog povrća. Osim toga, to je jedno od rijetkih povrća koje se može uzgajati tijekom monsunске sezone, što listove slatkog krumpira čini jedinim dostupnim zelenim povrćem nakon prirodnih nepogoda u nekim azijskim zemljama (Sun i sur., 2019).

Iako su mnoga istraživanja dokazala da batat ima antioksidativno djelovanje, još uvijek postoji nedostatak informacija o fitokemijskim profilima i bioaktivnim komponentama u batatu. Međutim, pitanje o povezanosti antioksidativne sposobnosti batata s ljudskim zdravljem još uvijek nije sasvim odgovoreno. Epidemiološke i kliničke studije pokazuju da je prehrana s visokom antioksidativnom sposobnošću povezana sa značajnim smanjenjem razine C - reaktivnog proteina u plazmi, smanjenjem učestalosti ishemijskog moždanog udara te ukupnog rizika od krvožilnih bolesti i kolorektalnog karcinoma (Sun i sur., 2019).

## **2.4. PAPIKA**

Paprika (*Capsicum annuum* L.) je jedna od najčešće konzumiranih namirnica diljem svijeta zbog svojih privlačnih boja i snažnog okusa. Osim svojih senzorskih svojstava, paprika je također dobar izvor hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva poput vitamina, karotenoida, antocijana, fenolnih kiselina i flavonoida (Hamed i sur., 2019). Biljka paprika od posebnog je interesa zbog svog visokog sadržaja karotenoida poput  $\beta$ -karotena,  $\alpha$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina, luteina i zeaksantina. Ostali karotenoidi iz paprike također pokazuju biološku aktivnost u in vivo i in vitro studijama te privlače sve veću pažnju (na primjer, neoksantin inhibira kemijski izazvanu karcinogenezu) (Rodríguez-Rodríguez i sur., 2020).

U paprikama, ovi različiti karotenoidi prisutni su u mesnatim dijelovima ploda, brzo se razvijaju i nakupljaju kako plod sazrijeva. Tijekom procesa sazrijevanja, kloroplasti se diferenciraju u kromoplaste koji sadrže različite karotenoide, a koji zajednički doprinose različitim bojama ploda, prelazeći od zelene do smeđe, a zatim do žute, narančaste, crvene i/ili tamno crvene u konačnoj fazi sazrijevanja, ovisno o sorti (Mohd Hassan i sur., 2019). Sastav karotenoida u paprikama je složen i varira, kako kvalitativno, tako i kvantitativno, ovisno o sorti i boji. Na primjer,  $\beta$ -karoten, lutein, kapsantin i kapsorubin su uobičajeni za sve sorte. S druge strane,  $\beta$ -kriptoksantin,  $\alpha$ -karoten, zeaksantin, violaksantin i drugi manje uobičajeni karotenoidi (neoksantin, anteraksantin), kao i drugi bezbojni karotenoidi, čija potencijalna uloga počinje biti proučavana (kao što su fitoen ili fitofluen), razlikuju se po sastavu i prisutnosti u paprici ovisno o njenoj sorti i boji (Mohd Hassan i sur., 2019).

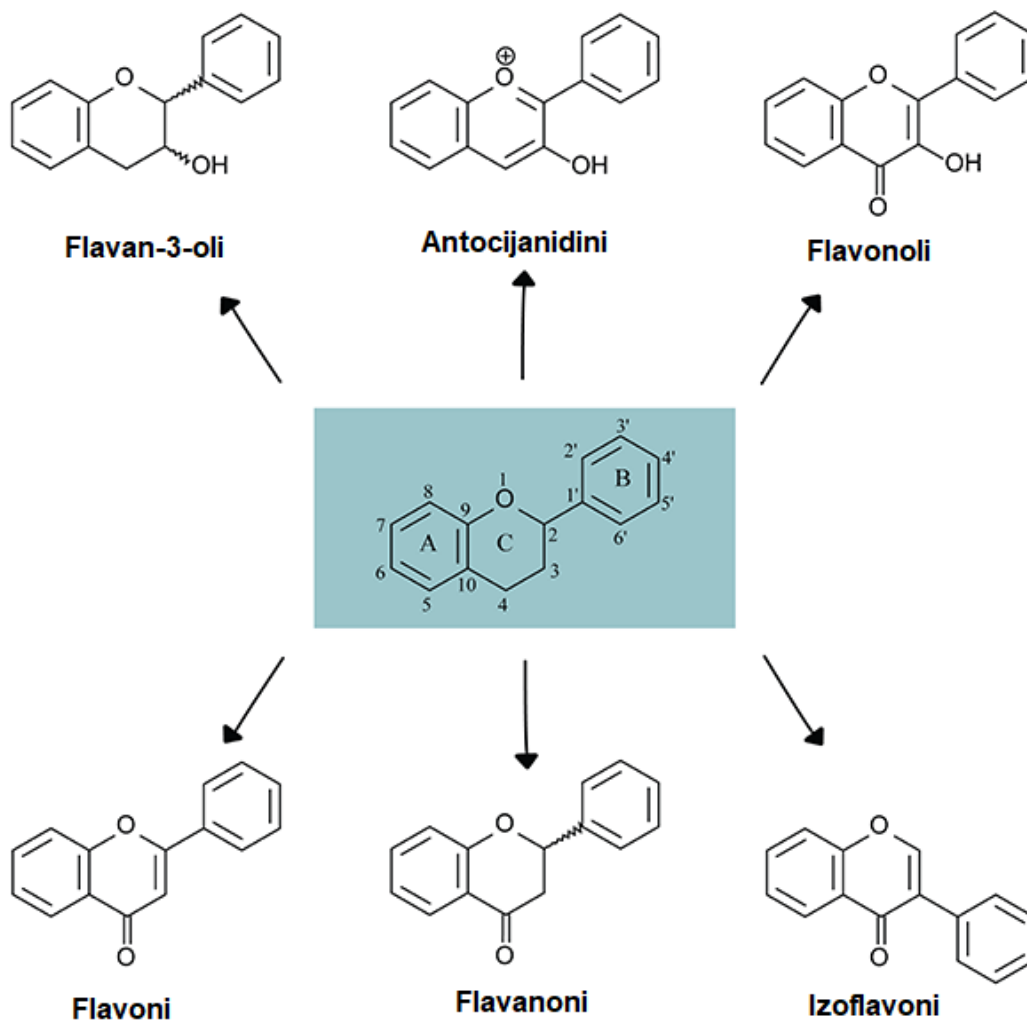
Kapsaicinoidi su sastojci u paprikama koji su odgovorni za ljutinu. Stupanj ljutine karakterizira se u Scovilleovim jedinicama topline (engl. *Scoville heat units, SHU*) koje se mjere na temelju koncentracija kapsaicinoidnih spojeva unutar ploda. SHU ljestvica mjeri koliko se puta ekstrakt treba razrijediti kako bi ljutina postala neprepoznatljiva u otopini šećerne vode. Unutar placentnih tkiva razvijajuće paprike, kapsaicinoidi se sintetiziraju 20 do 30 dana nakon formiranja ploda i nastavljaju se nakupljati kako plod sazrijeva (Hamed i sur., 2019).

Nakon obrade paprike, u proizvodnom procesu zaostaje otpad (sjemenke, kora, stabljika i listovi), koji potencijalno predstavlja vrijedan sirovinski materijal za dobivanje fitokemijski značajnih spojeva (Šregelj i sur., 2019). Otpadni dijelovi paprike sadrže razne bioaktivne spojeve sa značajnim biološkim aktivnostima (in vivo i in vitro) i mogućim budućim primjenama. Bioaktivni spojevi definiraju se kao "prirodni prehrambeni sastojci biljaka koji imaju očekivane pozitivne ili negativne zdravstvene utjecaje i/ili toksične učinke kada se unose u organizam čovjeka". Njihova koncentracija ovisi o dijelu ploda (sjemenke, kora i meso), sorti ili kultivaru te uvjetima nakon berbe kao što su faza zrelosti, uvjeti skladištenja i metode obrade (Gry i sur., 2007).

## **2.5. FENOLNI SPOJEVI**

Fenolni spojevi (polifenoli) prisutni su u većini biljnih tkiva poput plodova, sjemenki, listova, stabljika i korijena. Svi fenolni spojevi sadrže barem jedan aromatski prsten s jednom hidroksilnom skupinom u svojoj strukturi. Postoji više od 8000 različitih biljnih fenolnih spojeva s velikom strukturnom raznolikošću, a mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi su najzastupljeniji fenolni spojevi u voću i povrću te čine gotovo dvije trećine prehrambenih fenolnih spojeva. Flavonoidi kao skupina imaju i najveću biološku aktivnost. Sadrže fenilbenzopiransku strukturu koja se sastoji od dvaju fenilnih prstena (A i B)

povezanih heterocikličkim piranskim prstenom (C). Flavonoidi se mogu podijeliti u šest skupina (slika 3), prema razlikama u piranskom prstenu. U svakoj skupini, pojedinačni spojevi razlikuju se prema obrascu hidroksilacije i metilacije prstena A i B (de la Rosa i sur., 2019).



**Slika 3.** Osnovne strukture flavonoida (prema Higdon, 2005)

Flavoni su osnovna struktura flavonoida. Flavoni su u velikoj mjeri prisutni u začinskom bilju i začinima poput celera, peršina, timijana i drugih, a također se nalaze u nekim vrstama voća, posebno u dinjama i lubenicama, te povrću poput slatke i ljute paprike, kineskom kupusu i artičokama. Skupina neflavonoida uključuje fenolne spojeve s vrlo raznolikim kemijskim strukturama, od kojih su većina manji i jednostavniji od flavonoida, ali postoje i neki spojevi s kompleksnim strukturama i visokim molekularnim masama. Najvažnija skupina neflavonoida u voću i povrću su fenolne kiseline, koje sadrže jednu fenilnu skupinu zamijenjenu jednom karboksilnom skupinom i jednom ili više OH skupina (de la Rosa i sur., 2019).



Prema istraživanjima, sadržaj polifenola u listovima batata je znatno veći nego u cijelom korijenu, mesu i kori batata, kao i u većini drugog komercijalno dostupnog povrća. U prethodnim istraživanjima otkriveno je da je ukupni sadržaj polifenola u listovima batata iz 40 sorti bio dva do tri puta veći nego u nekom uobičajenom povrću poput špinata (*Spinacia oleracea*) i kelja (*Spinacia oleracea*). Dosadašnje farmaceutske studije već su otkrile da polifenoli u listovima batata posjeduju razne biološke aktivnosti koje rezultiraju višestrukim zdravstvenim benefitima poput antioksidativnog, antikancerogenog, antimutagenog, antidiabetičkog, antihipertenzivnog i protuupalnog djelovanja čime je batat postigao visoki interes daljnjeg istraživanja (Mu i Sun, 2019).

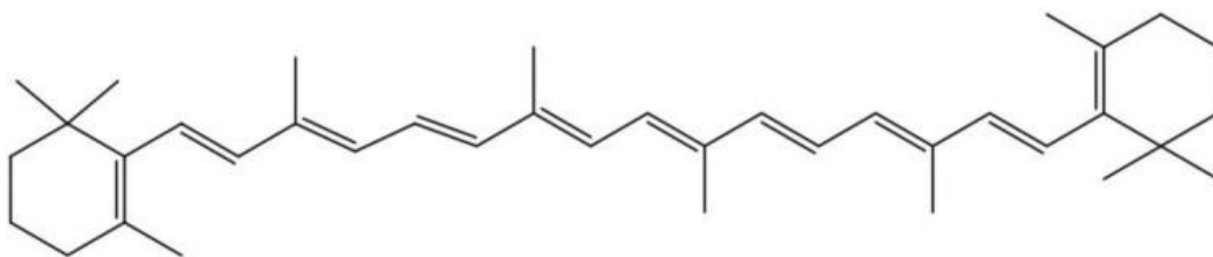
Plod paprike (*Capsicum annuum* L.), izvrstan je izvor antioksidansa u obliku polifenolnih spojeva, karotenoida te vitamina C i A, što papriku čini važnim izvorom hranjivih tvari u ljudskoj prehrani. Bitno je istaknuti važnost fenolnih spojeva od kojih su mnogi esencijalni sekundarni metaboliti koji pridonose poželjnim senzornim svojstvima hrane poput boje i arome. Otopine njihovih ekstrakata pokazale su snažna antifungalna, antibakterijska i kemoterapijska djelovanja (Abdalla i sur., 2019; Barbosa i sur., 2019).

## **2.6. KAROTENOIDI**

Karotenoidi su sveprisutni u prirodi u različitim namirnicama i imaju važne uloge u biološkim, kemijskim i fiziološkim procesima života. Znanstveni dokazi o učincima antioksidativnih tvari niske molekularne mase, uključujući karotenoide, uspostavljeni su zahvaljujući radu stotina istraživačkih timova tijekom stoljeća istraživanja. Biljke mogu samostalno sintetizirati karotenoide, stoga se oni u velikoj mjeri nalaze u hrani biljnog podrijetla, a njihov sastav je promjenjiv i općenito složen. Količina i vrsta karotenoida u zelenim tkivima biljaka relativno su ujednačene među biljnim vrstama, dok postoji znatno veća varijabilnost u ostalim dijelovima biljaka poput cvjetova, plodova i sjemenki. Karotenoidi se nalaze u fotosintetskim i nefotosintetskim tkivima. U fotosintetskim zelenim tkivima imaju važne uloge u procesu fotosinteze, kao što su određivanje fotosustava, prikupljanje svjetlosti i fotoprotekcija. U nefotosintetskim tkivima određuju boje, mirise i okuse (Zia-UI-Haq, 2021). Karotenoidi su esencijalni u ljudskoj prehrani. Biljna hrana s niskim razinama  $\beta$ -karotena pridonosi globalnom problemu nedostatka vitamina A, što je potaknulo istraživačke i proizvodne napore za proizvodnju konvencionalnih usjeva obogaćenih provitaminom A, poznatih kao „zlatni” usjevi. Pokazalo se da konzumacija plodova sa usjeva obogaćenih karotenoidom provitaminom A značajno poboljšava razinu vitamina A u ljudskom organizmu (Sun i sur., 2018).

### 2.6.1. $\beta$ -karoten

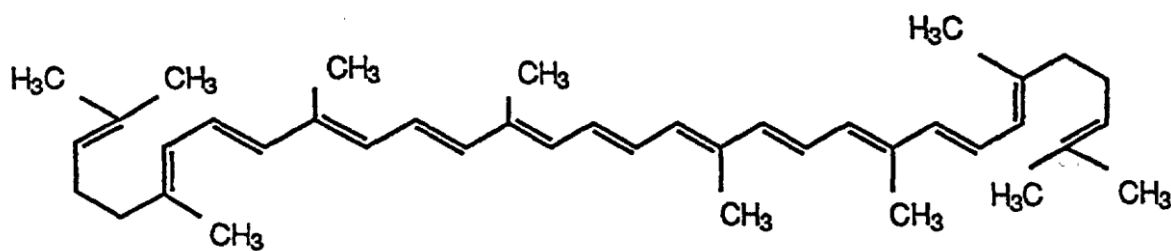
Karotenoid  $\beta$ -karoten (slika 4) je spoj koji je prisutan u izobilju u ljudskoj prehrani i stoga se nalazi u svim ljudskim tkivima, uključujući krv. Među brojnim funkcijama  $\beta$ -karotena u ljudskom tijelu, važna je njegova uloga u opskrbi organizma provitaminom A, što dalje utječe na razvoj embrija, pravilan rast i razvoj te kvalitetu vida. Osim bioaktivnosti, vrijednost  $\beta$ -karotena kao prehrambenog dodatka proizlazi i iz njegovih svojstava kao bojila. U prehrambenoj industriji,  $\beta$ -karoten se koristi kao narančasto - crveni pigment u mnogim proizvodima, uključujući netermički obrađena bezalkoholna pića s okusom tropskog voća, jestive masti, sireve, peciva i sladoled (Bogacz-Radomska i Harasym, 2018).



**Slika 4.** Kemijska struktura  $\beta$ -karotena (Chen i sur., 2021)

### 2.6.2. Likopen

Likopen (slika 5) je biljni karotenoid koji daje crvenu boju voću i povrću poput rajčice, lubenice, papaje, ružičaste guave, marelica, mrkve i crvene paprike. Biljke ga prirodno sintetiziraju. Strukturom je tetraterpen (terpen koji se sastoji od osam izoprenskih jedinica) i ima molekulsku formulu  $C_{40}H_{64}$ . Likopen se nalazi u cis obliku (u ljudskoj krvi) i trans obliku (u biljkama). Nije topiv u vodi, ali je topiv u organskim otapalima poput kloroforma, heksana, benzena, metilen-klorida, acetona i petroletera. Među karotenoidima, za likopenom vlada velik interesa zbog njegove visoke antioksidativne aktivnosti. Likopen također ima snažno antifungalno djelovanje na gljivicu *Candida albicans*, uzrokujući značajna oštećenja staničnih membrana (Desai i sur., 2018).



**Slika 5.** Strukturna formula likopena (Elango i Asmathulla, 2017)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su uzorci komercijalno dostupne mljevene slatke crvene paprike (S-Budget, Spar, Austrija) te sušeni mljeveni batat lokalnih uzgajivača.

##### 3.1.1. Pribor i aparatura

Pribor:

- falkon epruvete (50 mL)
- gumena crijeva
- kvarcne kivete (3,5 mL)
- medicinska igla
- metalna lađica
- plastične šprice (10 mL)
- plastično koljeno
- PTFE filteri (0,45  $\mu$ m pore)
- staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- staklene epruvete
- staklene menzure (25 mL, 250 mL, 1000mL)
- staklene odmjerne tikvice (10 mL, 25 mL i 100 mL)
- staklene vijalice za HPLC
- stakleni lijevak
- špatula od nehrđajućeg čelika
- teflonska crijeva
- žličica od nehrđajućeg čelika

Aparatura:

- analitička vaga KERN ALJ 220-4NM, KERN & Sohn, Njemačka
- centrifuga Rotina 380R, Hettich, Njemačka
- HPLC, Agilent Technologies, SAD
- mehanička pipeta Hirschmann (10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L i 1-5 mL), Merck, Njemačka
- multiparametarski pH – metar/ konduktometar Edge, HANNA INSTRUMENTS, SAD
- peristaltička pumpa Velp Scientifica SP311, Velp Scientifica, Italija
- spektrofotometar Secomam UviLine 9400, Secomam Groupe Aqualabo, Francuska

- spektrofotometar Spectroquant Prove 300, Merck Darmstadt, Njemačka
- tehnička vaga, Sartorius, Velika Britanija
- tresilica Vortex 4 basic, Ika, Njemačka
- trodimenzionalni pisač Bambu Lab P1S, Bambulab, Njemačka
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digiplus DL 255 H, Bandelin electronic, Njemačka
- uređaj za pulsirajuće električno polje HVG60/1 PEP, Impel d.o.o., Hrvatska

Kemikalije:

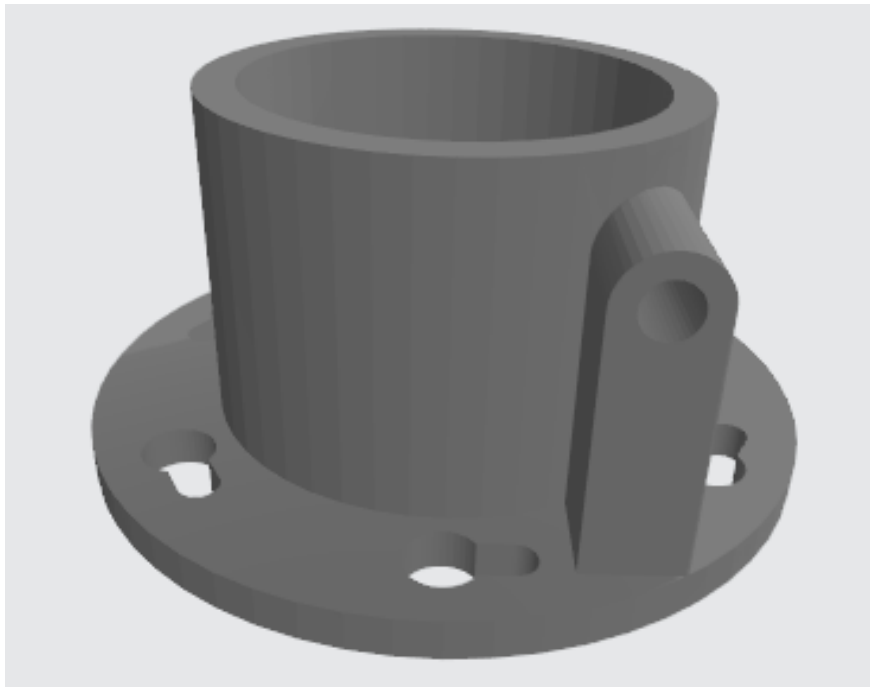
- aceton, Gram-mol, Hrvatska
- DPPH, Fluka, SAD
- dušik 4.6, Messer, Njemačka
- filament za 3D - pisač, Devil Design PET-G, Poljska
- Folin-Ciocalteu reagens, Merck, SAD
- heksan, Gram-mol, Hrvatska
- metanol, Kemika, Hrvatska
- metil tert-butileter, Kemika, Hrvatska
- natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

## **3.2. METODE RADA**

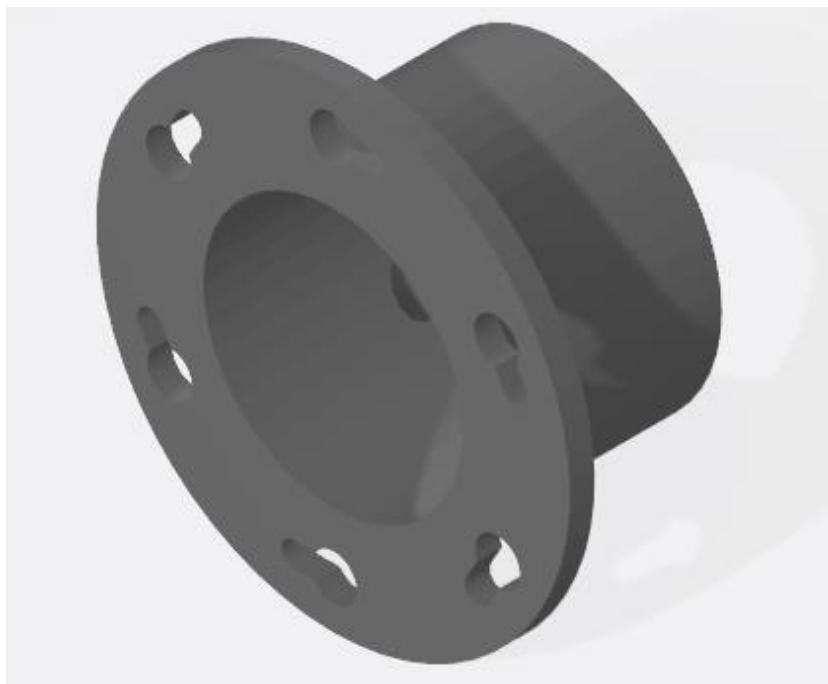
### 3.2.1. Konstrukcija i trodimenzionalni ispis protočnog reaktora za tretman PEP-om

S obzirom na to da je veliki dio ovog diplomskog rada bio izvođenje nacrtu reaktora korištenjem programa AutoCAD 2025 (Autodesk, SAD), njegov ispis na 3D - pisaču Bambu Lab P1S i kasnije provođenje eksperimenta u njemu, prvotni dio eksperimentalnog dijela bio je crtanje same konstrukcije. Osnovne dimenzije reaktora zadane su zbog već postojećih elektroda koje se koriste u tretmanu pulsirajućeg električnog polja, odnosno njegov vanjski promjer (62 mm) i oblik donje baze koja se vijcima pričvršćuje za donju elektrodu vanjskog promjera (95 mm). Reaktor je stoga izveden u valjkastom obliku, ukupne visine 47 mm. Radi primjerene čvrstoće i krutosti, debljina stijenke reaktora iznosila je 5 mm. Glavna strukturna i idejna promjena u izvedbi samog reaktora, u odnosu na već korištene, jest uvođenje protoka kroz reaktor za vrijeme trajanja tretmana PEP – om. S obzirom na to da dno i poklopac reaktora (kada je u potpunosti sklopljen i spreman za puštanje u pogon) čine elektrode za PEP, 3D - ispisani reaktor je zapravo središnji dio, odnosno valjak na kojemu je bilo potrebno dizajnirati ulaz uzorka. Ulaz je izveden kao cijev postavljena tangencijalno na obod valjkaste konstrukcije reaktora u gornjoj polovici reaktora te samo dovoljno udaljena od vrha kako ne bi stvarala

smetnje pri postavljanju gornje visokonaponske elektrode (slika 6). Cijev je također morala biti prikladnih debljina i parametara kako ne bi narušavala strukturne značajke same konstrukcije. Cijev je postavljena tangencijalno kako bi se pri ulasku uzorka u reaktor potaknulo miješanje te bolja homogenost uzorka i otapala za vrijeme trajanja tretmana. Zbog samog principa 3D - ispisa (sloj po sloj) te mogućih nedostataka u čvrstoći pri ispisu dijelova koji se ne nadograđuju direktno na prethodno ispisani sloj, nužno je pripaziti na dobro dizajniranje potporne strukture takvim elementima. Iz tog je razloga cijev koja predstavlja tangencijalni ulaz uzorka konstrukcijski punom masom spojena sa donjom bazom reaktora kako ne bi došlo do promjene/pucanja pri ispisu ili nekih drugih strukturnih oštećenja u rukovanju sa reaktorom. S obzirom na to da donja elektroda uzemljena već sadrži u sredini otvor koji se po potrebi može zatvoriti te ima ugrađen navoj, tu smo karakteristiku iskoristili kao izlazni tok uzorka iz reaktora pomoću jednog „L“ plastičnog koljena na koji je povezana plastična cijev te kasnije gumeno crijevo koje se spaja na peristaltičku pumpu. Izlaz iz peristaltičke pumpe povezan je gumenim crijevom sa tangencijalnim ulazom u reaktor kako bi se postigla kružna veza te konstantan protok u reaktoru. Donji dio konstrukcije sa vidljivih 6 perforacija dizajniranih za pričvršćivanje tijela reaktora za donju elektrodu (elektrodu uzemljena) prikazan je na slici 7.



**Slika 6.** Nacrt konstrukcije protočnog reaktora izrađene u programu AutoCAD 2025 (vlastita fotografija)



**Slika 7.** Prikaz donjeg dijela konstrukcije konstruiranog protočnog reaktora (vlastita fotografija)

Parametri ispisa i osnovni podaci o 3D – pisaču prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Parametri ispisa i podaci o 3D – pisaču

Tehnologija 3D - ispisa	Proizvodnja rastaljenim filamentom (engl. <i>Fused filament fabrication, FFF</i> )
Marka i model 3D - pisača	Bambu, Bambu Lab P1S
Vrsta filameta i proizvođač	Devil Design PET - G, Poljska
Debljina sloja	0,2 mm
Temperatura dizne (prvi sloj)	240
Temperatura dizne (ostali slojevi)	250
Temperatura podloge (prvi sloj)	75
Temperatura podloge (ostali slojevi)	80
Program za podešavanje parametara ispisa, tzv. „Slicer“	Bambu Studio v1.9.3

### 3.2.2. Provedba eksperimenta

Prije početka provedbe svakog eksperimenta postavljena je peristaltička pumpa sa namještenim protokom ( $0,37 \text{ L h}^{-1}$ ), povezana gumenim crijevima i plastičnim koljenom sa 3D - ispisanim protočnim reaktorom koji se prije svake nove uporabe temeljno očistio, isprao deioniziranom vodom i osušio. Prije svakog tretmana u plastične falkon epruvete od 50 mL odvagano je 5 g uzorka te menzурom odmjerenom 100 mL otapala acetona: heksana (4:6, v/v). Uzorak i otapalo su kvantitativno preneseni u protočni reaktor. Svakom uzorku je zatim izmjeren pH i električna provodljivost pomoću pH - metra i konduktometra. Prvi dio eksperimenta bio je tretman pulsirajućim električnim poljem (PEP). Donja elektroda (uzemljena) je već bila pričvršćena za reaktor i služila mu kao dno, a gornja (visokonaponska) elektroda je postavljena kao poklopac reaktoru, nakon što je završilo punjenje reaktora uzorkom i otapalom. Obje elektrode izrađene su od nehrđajućeg čelika, a udaljenost između elektroda iznosila je 47 mm. Frekvencija uređaja za PEP iznosila je 100 Hz, jakost električnog polja  $4,26 \text{ kV cm}^{-1}$ , a vrijeme tretmana se mijenjalo sa brojem uzorka (6; 9; 12 min). Sa brojem uzorka mijenjala se i duljina pulsa (0,5; 1,25; 2,0  $\mu\text{s}$ ).

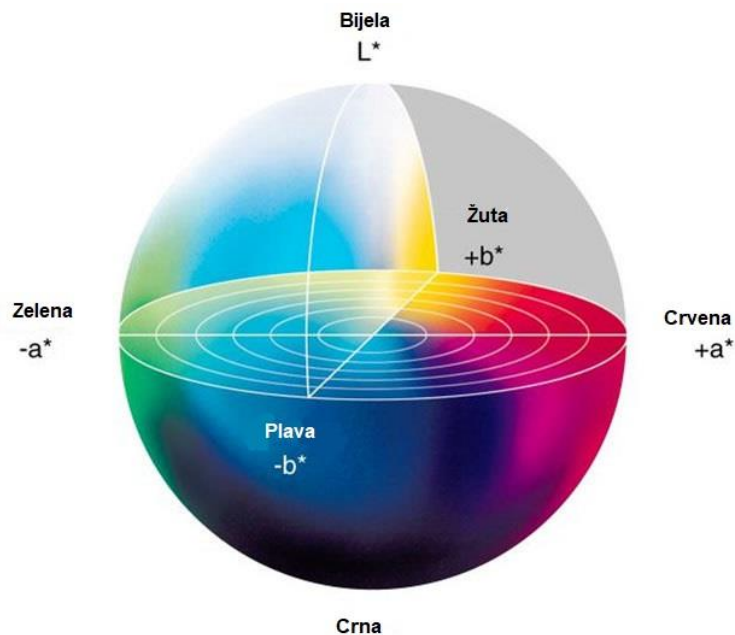
Nakon završenog tretmana pulsirajućim električnim poljem, uzorak sa otapalom odijeljen je u dvije plastične falkon epruvete od 50 mL koje su zatim postavljene u ultrazvučnu kupelj. Tretman ultrazvučnom kupelji bio je proveden na maksimalnom intenzitetu (100 %), kupelj je maksimalne snage 640 W, a frekvencija je iznosila 35 kHz. Tretman je proveden na sobnoj temperaturi ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u trajanju od 30 minuta. Ultrazvučna kupelj je kod nultog uzorka i paprike i batata (P0, B0) bila početni dio eksperimenta. Sljedeći korak bilo je centrifugiranje. Centrifugiranje se provodilo na temperaturi od  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , u trajanju od 10 minuta i pri maksimalnoj brzini vrtnje od  $7000 \text{ o min}^{-1}$ . Nakon centrifugiranja prvo se provodilo ponovno mjerenje pH i električne provodljivosti. Tretiranim uzorcima se nakon završenih tretmana spektrofotometrijski odredila boja, udio karotenoida, ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost te završno, na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC-u), udio likopena i  $\beta$ -karotena. Sva mjerenja provedena su u dvije paralele.

### 3.2.3. Određivanje pH i električne provodljivosti

Prije i nakon tretmana uzorcima su određene pH vrijednost i električna provodljivost ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) pomoću digitalnog pH/konduktometra.

### 3.2.4. Parametri boje

Nakon provedenog tretmana uzorcima je određena boja. Supernatant svakog uzorka nakon centrifugiranja profiltriran je korištenjem šprice volumena 5 mL uz PTFE filter promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$  te prenesen u kvarcne kivete. Uzorcima su zatim izmjereni parametri boje na spektrofotometru Spectroquant Prove 300. Kao slijepa proba korištena je otopina aceton: heksan (4:6, v/v). Boja se određivala prema metodi 2580 CIELAB D65/2°. U CIEL\*a\*b\* kromatskom sustavu (slika 6), određivanje položaja boje pomoću koordinata  $a^*$  i  $b^*$  (približno) odgovara određivanju njezine crvene/ zelene ( $a^*$ ) i plave/ žute ( $b^*$ ) komponente, u odnosu na boju u ishodištu koja ima vrijednost 0 (tzv. "neutralnu" boju), dok  $L^*$  označava psihometrijski indeks svjetline (Schloss i sur., 2018). Parametri sustava  $a^*$  i  $b^*$  su kromatske vrijednosti koje se kreću u rasponu od -120 do 120. Indeks  $L^*$  se kreće u rasponu od crne ( $L^*=0$ ) do bijele ( $L^*=100$ ) boje (Mihoci, 2015).



**Slika 8.** CIEL\*a\*b\* kromatski sustav boja (prema Cortez i sur., 2017)

### 3.2.5. Određivanje karotenoida spektrofotometrijskom metodom

Nakon završenog tretmana uzimao se supernatant centrifugiranog uzorka te profiltrirao pomoću šprice i PTFE filtera veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrat je zatim prebačen u kvarcne kivete te se spektrofotometrijski određivao udio karotenoida. Kao slijepa proba korištena je otopina aceton: heksan (4:6, v/v) (Luterotti i sur., 2013). Prema već standardiziranoj metodi (Nagata i Yamashita, 1992) određeni su udjeli karotenoida (likopena,  $\beta$ -karotena, klorofila A i klorofila B) na spektrofotometru Secomam UviLine 9400. Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom



analizom izraženi su kao mg komponente po g suhe tvari uzorka ( $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.). Kod korištene metode, mjere se apsorbancije uzoraka pri 663, 645, 505 i 453 nm. Iz zadanih vrijednosti i formula za računanje unesenih u spektrofotometar, uređaj automatski računa koncentracije traženih karotenoida. Sve su vrijednosti koncentracija i izmjerenih apsorbancija zapisane za svaki uzorak te je za dodatnu provjeru točnosti koncentracija svakog od ispitivanih karotenoida (likopena,  $\beta$ -karotena, klorofila A i klorofila B) izračunata i ručno. Jednadžbe koje su unesene u spektrofotometar i korištene za ručno računanje koncentracija su sljedeće:

Klorofil A (jednadžba 1):

$$\gamma \text{ (mg/ 100 mL)} = 0.999 * (A663) - 0.0989 * (A645) \quad [1]$$

Klorofil B (jednadžba 2):

$$\gamma \text{ (mg/ 100 mL)} = - 0.328 * (A663) + 1.77 * (A645) \quad [2]$$

$\beta$  – karoten (jednadžba 3):

$$\gamma \text{ (mg/ 100 mL)} = 0.216 * (A663) - 1.22 * (A645) - 0.304 * (A505) + 0.452 * (A453) \quad [3]$$

Likopen (jednadžba 4):

$$\gamma \text{ (mg/ 100 mL)} = - 0.0485 * (A663) + 0.204 * (A645) + 0.372 * (A505) - 0.0806 * (A453) \quad [4]$$

pri čemu je:

A663 – Apsorbancija mjerena pri valnoj duljini  $\lambda = 663$  nm

A645 – Apsorbancija mjerena pri valnoj duljini  $\lambda = 645$  nm

A505 – Apsorbancija mjerena pri valnoj duljini  $\lambda = 505$  nm

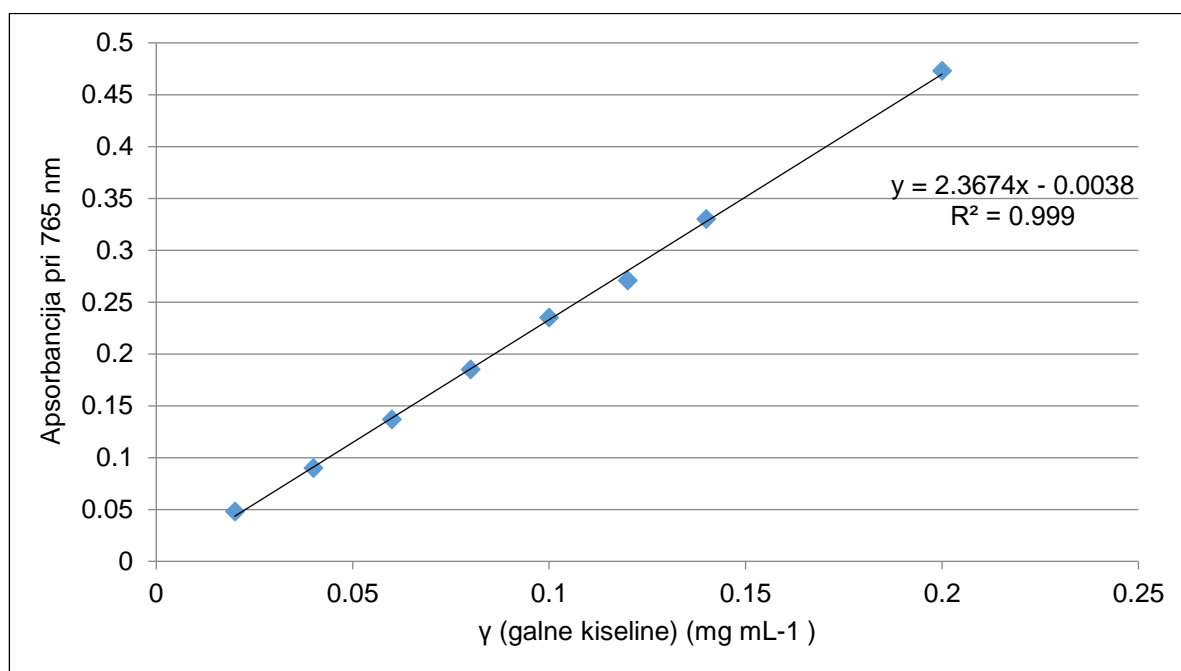
A453 – Apsorbancija mjerena pri valnoj duljini  $\lambda = 453$  nm

### 3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja korišten je za određivanje ukupnih fenola. Korištenjem PTFE filtera profiltrirano je 1 mL supernatanta, od čega je 0,5 mL preneseno u staklenu vijalicu i otpareno dušikom dok nije isparilo svo otapalo iz uzorka. Zatim je dodano 0,5 mL 80 %-tne otopine metanola kako bi se ponovno otopila suha tvar sa stijenki vijalice. Iz vijalica se kod određivanja ukupnih polifenola, i kasnije antioksidacijske aktivnosti, otpipetiralo tražene volumene ekstrakta. Kod određivanja sadržaja ukupnih polifenola u uzorcima batata, u staklene epruvete otpipetirano je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  Folinovog reagensa te 2 mL deionizirane vode. Kod uzoraka paprike se provodilo razrjeđenje zbog čega je otpipetirano 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta te 50  $\mu\text{L}$  deionizirane vode, a nakon toga dodano 200  $\mu\text{L}$  Folinovog reagensa te

2 mL deionizirane vode. Nakon pet minuta dodaje se 1 mL 20 % otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . U slijepu probu se umjesto ekstrakta dodaje 100  $\mu\text{L}$  deionizirane vode, 200  $\mu\text{L}$  Folinovog reagensa te 2 mL deionizirane vode. Također, kao i kod uzoraka, nakon 5 min dodaje se 1 mL 20 % otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Uzorci su nakon dodatka natrijevog karbonata promiješani i postavljeni na tamno mjesto. Kada je prošlo dva sata bez kontakta sa svjetlosti, uzorci su prebačeni u kvarcne kivete i na spektrofotometru Secomam UviLine 9400 im je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od  $\lambda = 765 \text{ nm}$ .

Spektrofotometrijskom metodom, koja se temelji na primjeni Folin-Ciocalteuvog reagensa, određivao se sadržaj ukupnih polifenola. Kao standard koristi se galna kiselina prema kojoj se izrađuje baždarni dijagram (slika 7). Koncentracija ukupnih polifenola za svaki uzorak računa se uvrštavanjem vrijednosti izmjerene apsorbancije u jednadžbu dobivenu konstrukcijom baždarnog pravca. Udio ukupnih fenola izražen je kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka ( $\text{mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ).



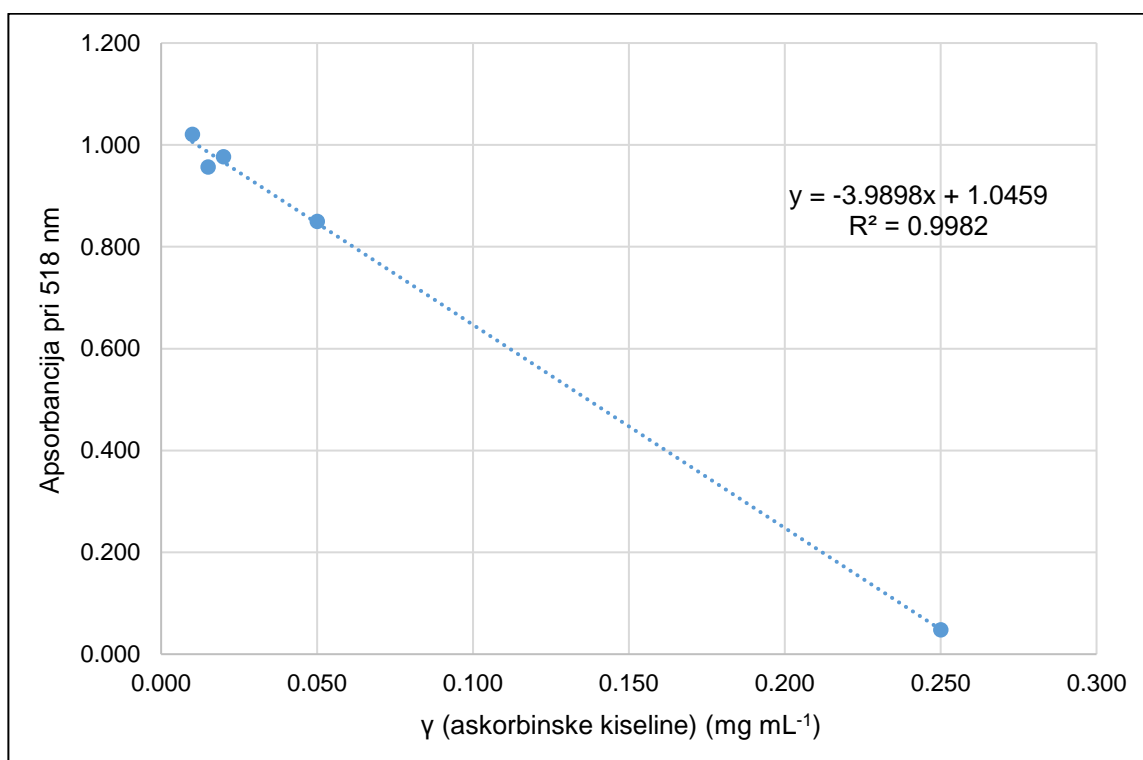
**Slika 9.** Baždarni dijagram standarda galne kiseline za određivanje sadržaja ukupnih polifenola

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Iz vijalica spomenutih u prvom koraku određivanja ukupnih polifenola otpipetirani su traženi volumeni ekstrakta otopljenog u 80 %-tnom metanolu. Kod uzoraka batata, u staklene epruvete otpipetirano je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta te 2 mL 0,1 mM otopine DPPH. Kod uzoraka paprike

bilo je potrebno provesti razrjeđenje zbog čega se, umjesto 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, u staklene epruvete otpipetiralo 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 50  $\mu\text{L}$  deionizirane vode uz dodatak 2 mL 0,1 mM otopine DPPH. Epruvete sa sadržajem se promiješaju na tresilici pri brzini od 2000  $\text{o min}^{-1}$ . Epruvete se nakon miješanja ostave stajati u mraku 25 minuta. Nakon 25 minuta, sadržaj iz epruveta se prenese u kivete te se na spektrofotometru Secomam UviLine 9400 mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od  $\lambda = 518 \text{ nm}$ . Kao slijepa proba korištena je 80 % (v/v) otopina metanola. Za izradu baždarnog dijagrama koristi se gradijent koncentracija askorbinske kiseline prema kojem se kasnije izračuna koncentracija antioksidansa i uspješnost redukcije.

Otopina DPPH (0,1 mM) pripremljena je na način da je na metalnoj lađici odvagano 3,94 mg DPPH, koji su kvantitativno preneseni u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno 80 %-tnom otopinom metanola. Odmjerna tikvica se odmah omota aluminijskom folijom kako ne bi došlo do reakcije DPPH u prisutnosti svjetla i dobro se promiješa na tresilici pri brzini od 2000  $\text{o min}^{-1}$ . Kao kontrola apsorbancije ( $A_0$ ) korištena je otopina pripremljena na način da je u epruvetu dodano 0,1 mL 80 % - tnog metanola te 2 mL otopine DPPH. Kontrola je, kao i ostali uzorci, stavljena na 25 min stajanja u mraku.



**Slika 10.** Baždarni dijagram askorbinske kiseline za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Sposobnost vezanja slobodnih radikala računa se kao omjer smanjenja intenziteta obojenja, a sukladno tome i apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka uzorka i apsorbancije

otopine DPPH u kojoj se ne nalazi uzorak, a prema jednadžbi (5):

$$\text{DPPH aktivnost čišćenja ( \% )} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad [5]$$

pri čemu je:

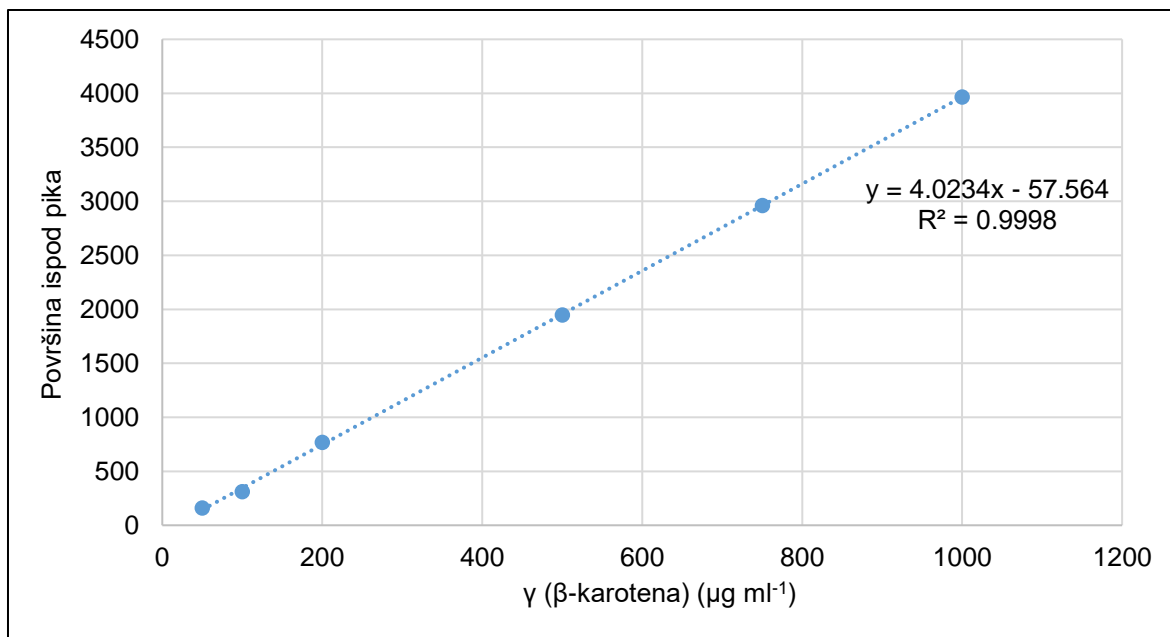
A0- kontrola apsorbancije (apsorbancija pripremljene otopine DPPH)

A1- apsorbancija uzorka

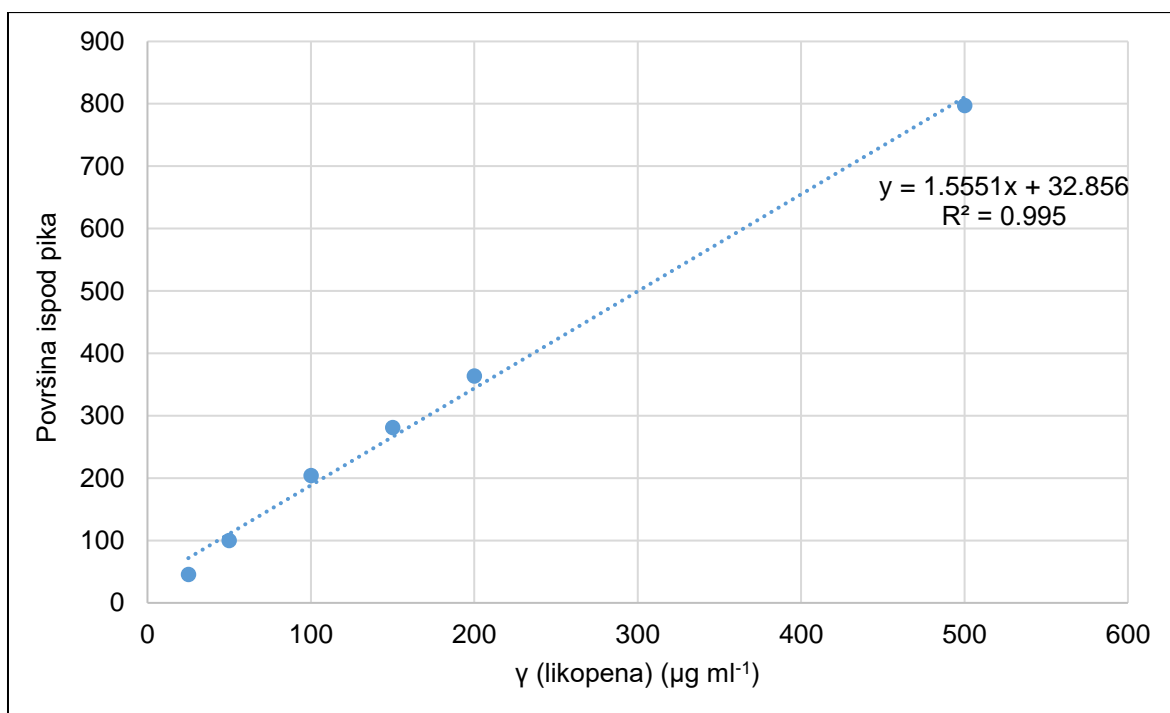
### 3.2.8. Određivanje karotenoida kromatografskom (HPLC) metodom

Supernatant svakog uzorka nakon centrifugiranja profiltriran je korištenjem šprice volumena 5 mL te PTFE filtera promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$ . U staklene vijalice od 1,5 mL otpipetirano je 0,5 mL ekstrakta te otpareno dušikom pomoću medicinske igle povezane teflonskom cijevi sa izlaznim ventilom spremnika dušika. Otparavanje je završilo kada se sa sigurnošću vizualno moglo utvrditi da se u vijalici više ne nalazi otapalo, odnosno da je zaostala samo suha tvar na stijenkama. U te iste vijalice je potom dodano 1,5 mL otapala B (MeOH: metil tert-butileter (10: 90, v/v) te je time uzorak bio spreman za analizu na HPLC uređaju.

Analiza karotenoida u uzorcima provedena je korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na C30 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) ugrađenoj na Agilent Technologies (LC 1200) HPLC sustav koji je bio zagrijan na 35 °C. U sustav je ubrizgano 10  $\mu\text{L}$  uzorka pri čemu je za razdvajanje korištena gradijentna kromatografija. Protok je za čitavo vrijeme trajanja analize iznosio 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Otapala koja su se koristila kao mobilna faza u postupku kromatografije su otapalo A (MeOH: metil tert-butileter: voda (90: 7: 3)) i otapalo B (MeOH: metil tert-butileter (10:90, v/v)). Kod detekcije i kasnije identifikacije traženih karotenoida korišten je DAD (engl. *diode array detector*) pri valnoj duljini od 280 nm, širini pojasa od 8 nm bez referentne valne duljine. Tijekom analize su snimani spektri na valnim duljinama  $\lambda = 450 \text{ nm}$  za  $\beta$ -karoten i  $\lambda = 470 \text{ nm}$  za određivanje likopena. Identifikacija pika koji odgovara traženom spoju provedena je usporedbom retencijskog vremena i UV spektra injektiranih standarada s retencijskim vremenima i UV spektrima pikova dobivenih analizom uzoraka. Za identifikaciju spojeva (njihovih pikova) i izradu baždarnih dijagrama, korištene su otopine standarda likopena (25-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i  $\beta$ -karotena (50-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Castro-Puyana i sur., 2017). Iz svakog standarda i pripadajućih koncentracija, kao i površina ispod pikova konstruirani su baždarni dijagrami za  $\beta$ -karoten (slika 9) i likopen (slika 10). Rezultati dobiveni HPLC analizom izraženi su kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka ( $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.).



**Slika 11.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije  $\beta$ -karotena nakon HPLC metode



**Slika 12.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije likopena nakon HPLC metode

### 3.2.9. Obrada podataka

Nakon prikupljanja rezultata svih provedenih analiza, u programu Statgraphics centurion 19 (Statgraphics technologies, SAD) provedena je analiza varijance (ANOVA). Rezultati svih provedenih analiza prikazani su grafički kao srednje vrijednosti dvaju paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija, pri čemu je razina značajnosti svi korištenih statističkih metoda iznosila 95 %. Kako bi se lakše odredili statistički značajni faktori, korišten je Pareto dijagram koji vrlo jasno pokazuje jesu li faktori u nekoj od analiza pokazali statistički značajne rezultate.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je dobiti uvid u funkcionalnost te moguću problematiku pri korištenju 3D - ispisanog protočnog reaktora kod tretmana uzoraka pulsirajućim električnim poljem. Bilo je potrebno uočiti nedostatke u korištenju protočne konstrukcije reaktora i otežavajuće okolnosti u rukovanju istim. Za vrijeme provođenja eksperimenta koristile su se dvije sirovine, paprika i batat, koje su tretirane prema istim parametrima, a kasnije analizirane identičnim metodama kako bi se dobio što točniji uvid u njihove razlike. U svrhu što točnijih podataka, eksperiment je proveden u dvije paralele pri svim analizama, a kako bi se u daljnjem tekstu rezultata i rasprave olakšalo označavanje broja uzorka i sirovine na koju se taj uzorak odnosi, korištene su kratice prikazane u tablici 2 kojima odgovaraju podešeni parametri tretmana pulsirajućim električnim poljem, također navedeni u tablici 2.

Uzorci batata označeni su velikim slovom „B“, a uzorci paprike velikim slovom „P“. Broj uz slovo pripadajuće sirovine označava redni broj uzorka, a iz tablice 2 vidljive su vrijednosti duljine pulsa i vrijeme tretmana pulsirajućeg električnog polja korišteno kod tog uzorka. Rezultati su prikazani grafički radi lakšeg i jasnijeg pregleda razlike u uzorcima, izuzev rezultata koji se odnose na vrijednosti dobivene mjerenjem pH i električne provodljivosti prije i nakon tretmana svakog uzorka. Rezultati svih analiza, koje za cilj imaju ispitati udio neke tvari u danom uzorku, izraženi su masenim udjelom kao mg komponente po gramu suhe tvari uzorka ( $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.).

**Tablica 2.** Osnovni parametri tretmana pulsirajućim električnim poljem za svaki uzorak

Skraćeni naziv uzorka	Duljina pulsa ( $\mu\text{s}$ )	Trajanje tretmana (min)
B0, P0	*tretman na ultrazvučnoj kupelji	30
B1, P1	0,5	6
B2, P2	1,25	6
B3, P3	0,5	9
B4, P4	1,25	9
B5, P5	2,0	12
B6, P6	2,0	9
B7, P7	1,25	12
B8, P8	2,0	6
B9, P9	0,5	12

#### 4.1. 3D - ISPIS PROTOČNOG REAKTORA

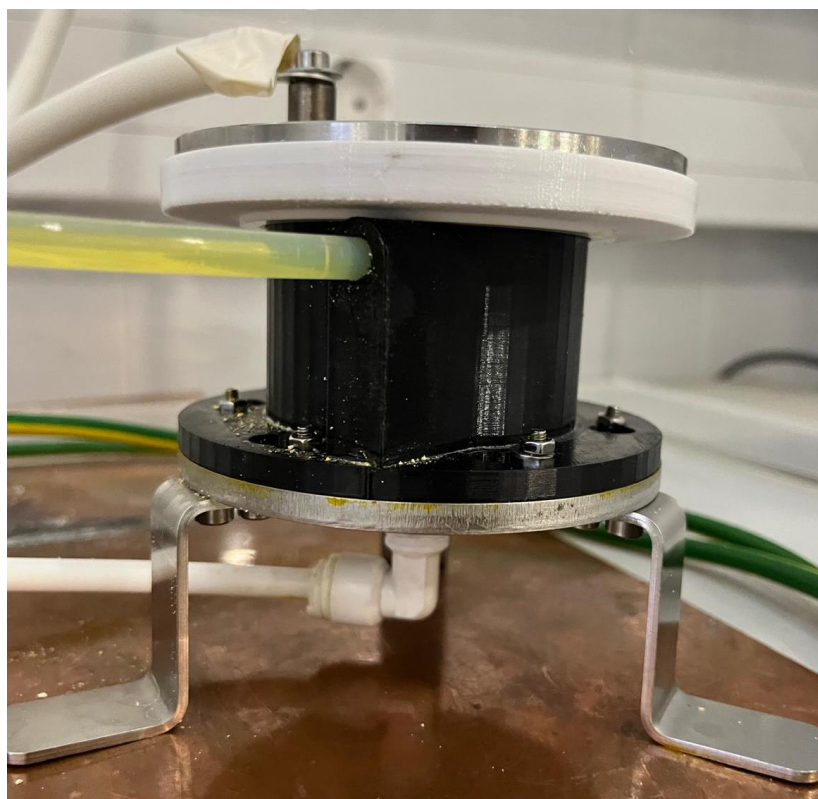
Nakon što je 3D konstrukcija izrađena u programu AutoCAD 2025 dostigla željeni izgled i razinu, nacrt je poslan na 3D – ispis proveden korištenjem Bambu Lab P1S 3D - pisača. Prije no što započne postupak 3D – ispisa, datoteku sa nacrtom spremljenu kao „.stl“ potrebno je obraditi u nekom od programa rezača, odnosno engl. „*slicera*“ koji se koriste za namještanje parametara ispisa. Gotovo svaki 3D – pisač koristi specifičan program rezač zbog čega se rezač koji je korišten u ovom radu naziva slično kao i sami 3D – pisač, to jest Bambu Studio v1.9.3. Rezači omogućuju da se model u STL datoteci raslojava u slojeve definirane visine, također sadrži informacije o vremenu i rezoluciji ispisa, pozicioniranju strukturnih potpornih struktura, gustoći potpornih struktura te broju slojeva koji su potrebni za izradu modela određene rezolucije. Filament korišten pri ispisu (Devil Design PET - G, Poljska) pokazao je odličnu čvrstoću i krutost materijala, a zbog postavljene debljine sloja ispisa (0,2 mm) te svojstva filameta i korištene metode 3D - ispisa, površina je golim okom vidljivo slojevita, no dovoljno glatka kako se uzorak ne bi zadržavao u naborima iste i kako bi se reaktor mogao očistiti nakon upotrebe (slika 13).

Kao što je već opisano u metodama, ulaz u reaktor konstruiran je kao otvor tangencijalno postavljen na obod valjkastog reaktora kako bi se prilikom ulaza uzorka u reaktor potaknulo miješanje. Prilikom provedbe eksperimenta, uvidjelo se postojanje efekta miješanja, ali zbog nemogućnosti povišenja brzine protoka, taj efekt je bio od male koristi za održavanje homogenosti uzorka tijekom provedbe PEP tretmana. Glavni razlozi koji su onemogućili povišenje protoka peristaltičkom pumpom prepoznati su kao nedovoljno dobro brtvljenje te korištenje različitih unutarnjih promjera cjevčica koje su korištene za spajanje reaktora sa peristaltičkom pumpom. U trenu kad se reaktor poklopi gornjom (visokonaponskom) elektrodom (slika 14), sustav se izolira od okoline te se zbog stalnog protoka u samom sustavu počinje stvarati podtlak. Zbog razlika u promjerima cjevčica (čak i vrlo malih) te potrebe za korištenjem spojnica između dvije nejednake cijevi, nastali podtlak može na spoju koji nije u potpunosti uspješno zabrtvljen „povući“ mjehuriće zraka u sustav te time ometati rad pulsirajućeg električnog polja zbog pojave efekta pražnjenja. Kako bi se to izbjeglo, u ovom radu korišten je nizak protok ( $0,37 \text{ L h}^{-1}$ ) pri kojem nije dolazilo do značajnog nastanka mjehurića u sustavu. Još jedan od prepoznatih problema prilikom korištenja spojnih crijeva koja nisu potpuno jednaka jest čišćenje sustava nakon tretmana. Na svakom spoju, koljenu ili naboru u sustavu, nakon tretmana zaostaje vrlo mala količina uzorka, no prije svakog ponovnog tretmana istu je potrebno očistiti. Kako bi čišćenje bilo što jednostavnije predlaže se upotreba cijevi istog promjera bez potreba za korištenjem dodatnih spojnica.





**Slika 13.** Protočni reaktor nakon završenog procesa 3D – ispisa (vlastita fotografija)



**Slika 14.** Protočni reaktor za vrijeme tretmana pulsirajućim električnim poljem (vlastita fotografija)

## 4.2. VRIJEDNOSTI pH I ELEKTRIČNE PROVODLJIVOSTI

Mjerenjem pH i električne provodljivosti prije početka tretmana pulsirajućim električnim poljem i nakon centrifugiranja zabilježene su vrijednosti koje bi se trebale moći koristiti kao jednostavna i brza metoda nastalih promjena u uzorcima. Navedene vrijednosti prikazane su tablično za papriku (tablica 3) i batat u tablici 4. Iz rezultata je vidljivo da kod usporedbe vrijednosti pH u obje korištene sirovine (prije i nakon tretmana) nema značajnih odstupanja. Kada se vrijednosti pH prije i nakon tretmana točnije usporede, može se uvidjeti da je kod uzoraka paprike tijekom eksperimenta došlo do blagog povišenja pH, a kod batata su vrijednosti pH u većini uzoraka nakon tretmana neznatno manje od početnih.

S obzirom na to da niti u jednom uzorku paprike ni batata izmjerena električna provodljivost ne prelazi  $0,50 \mu\text{S cm}^{-1}$ , vidljivo je da korišteno otapalo ima slabu sposobnost električne provodnosti. Čak i blage promjene upućuju na porast provodnosti nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem koji je kod uzoraka paprike izraženiji.

**Tablica 3.** Izmjerene vrijednosti pH i el. provodljivosti uzoraka paprike prije i nakon tretmana

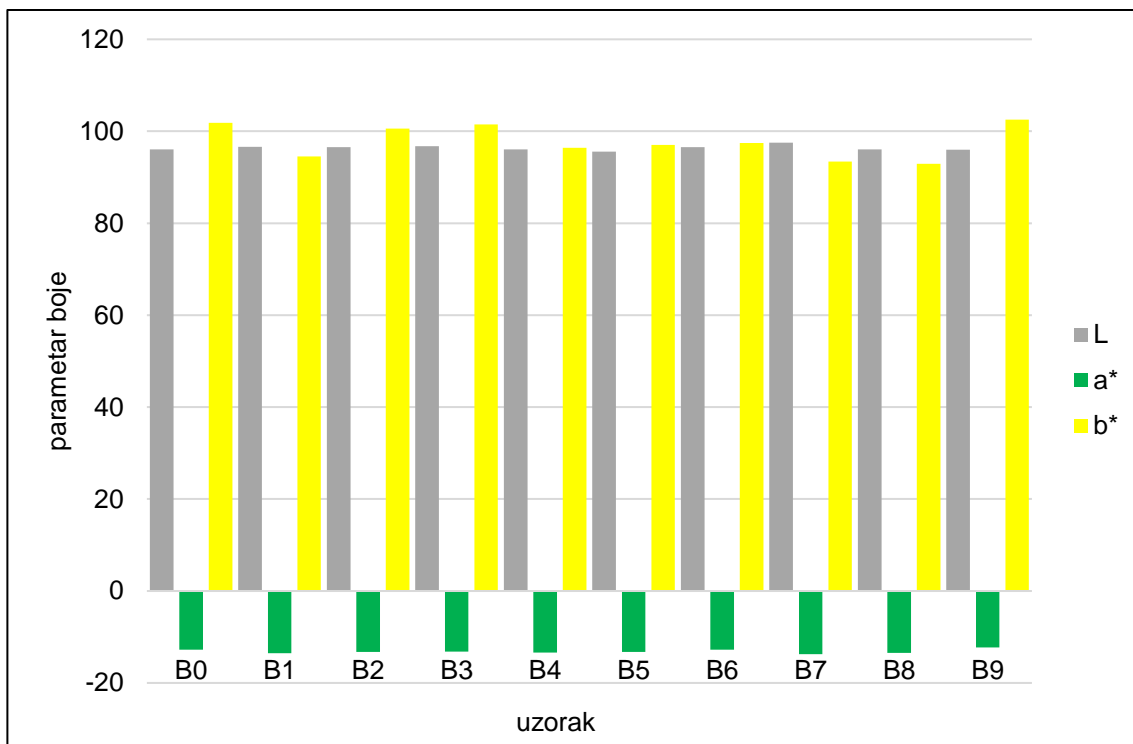
PAPRIKA	pH prije	pH nakon	el. provodljivost prije ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	el. provodljivost nakon ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
P0	5,35	5,42	0,27	0,41
P1	5,31	5,41	0,25	0,39
P2	5,43	5,57	0,25	0,39
P3	5,32	5,40	0,21	0,43
P4	5,33	5,40	0,24	0,35
P5	5,40	5,58	0,21	0,42
P6	5,32	5,55	0,28	0,35
P7	5,35	5,61	0,25	0,37
P8	5,41	5,51	0,29	0,38
P9	5,40	5,55	0,28	0,41

**Tablica 4.** Izmjerene vrijednosti pH i el. provodljivosti uzoraka batata prije i nakon tretmana

BATAT	pH prije	pH poslije	el. provodljivost prije ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	el. provodljivost nakon ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
B0	5,65	5,79	0,10	0,30
B1	5,63	5,61	0,09	0,10
B2	5,65	5,57	0,08	0,09
B3	5,71	5,65	0,10	0,10
B4	5,86	5,53	0,08	0,09
B5	5,66	5,62	0,09	0,10
B6	5,60	5,65	0,07	0,07
B7	5,35	5,30	0,09	0,10
B8	5,70	5,62	0,10	0,12
B9	5,75	5,47	0,15	0,17

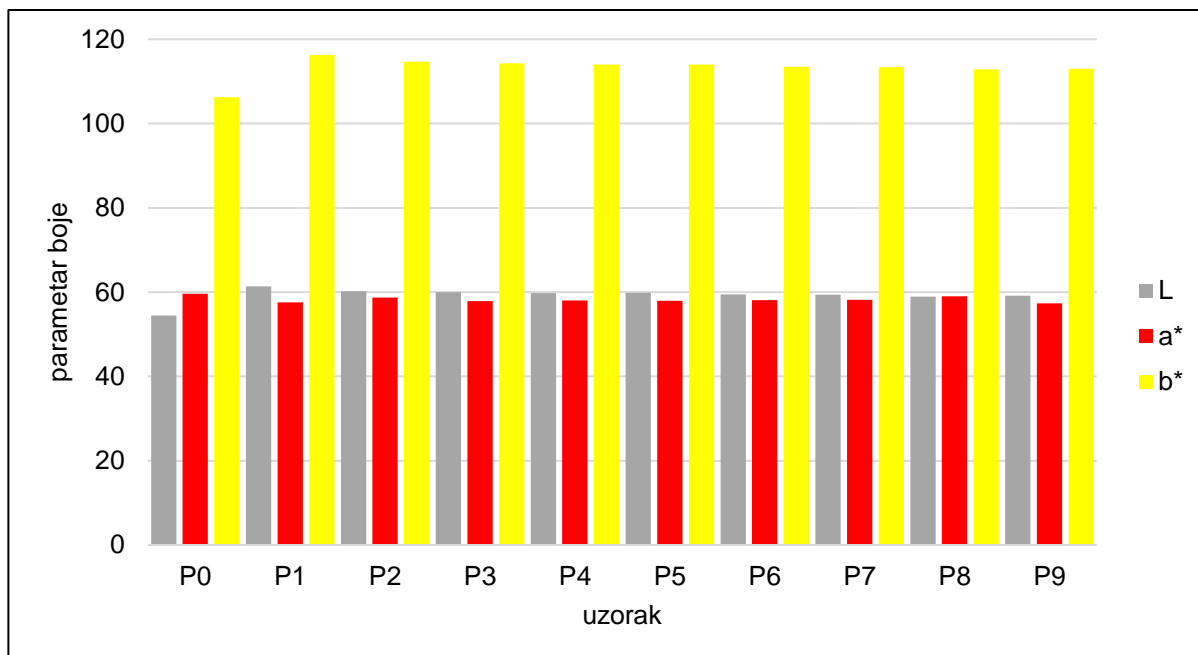
#### 4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA PARAMETARA BOJE

Na slici 15 grafički su prikazane vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  za uzorke batata. Parametar boje  $L^*$  predstavlja svjetlinu boje i kreće se u rasponu od crne (0) do bijele (100). Vrijednost  $L^*$  parametra gotovo je jednaka za sve uzorke batata, a izmjerena je u intervalu od 95,55 do 97,55. Tako visoke vrijednosti označavaju da je boja uzoraka vrlo svijetla, odnosno gotovo potpuno odgovara bijeloj boji. Vrijednosti parametra  $b^*$  za uzorke batata također su visoke i označavaju velik udio žute komponente u boji batata. Najviša vrijednost žute boje prisutna je u uzorku B9 te iznosi 102,53. Vrijednosti parametra  $a^*$  označavaju crvenu (pozitivna) ili zelenu boju (negativna vrijednost). Vrijednosti se, kao i kod parametra  $b^*$ , kreću u rasponu od -120 do 120. Kod svih uzoraka batata  $a^*$  parametar je negativan, što označava zelenu boju. Vrijednosti zelene boje batata kreću se u rasponu od -12,29 do -13,74 što znači da je zelena boja djelomično zaslužna za nijansu boje koju batat ima, no nema je dovoljno da bi se okom mogla primijetiti i prepoznati u karakterističnoj boji batata.



**Slika 15.** Izmjerene vrijednosti CIEL\*a\*b\* parametara boje za uzorke batata

Na slici 16 grafički su prikazane vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  za uzorke paprike.  $L^*$  vrijednosti svih uzoraka, osim netretiranog, bile su u intervalu 58,97 – 61,40 što označava otprilike sredinu raspona tog parametra te time uzorak koji je nešto svjetliji, odnosno bliži bijeloj boji.  $L^*$  parametar netretiranog (nultog) uzorka je nešto manji od ostalih i iznosi 54,48 iz čega vidimo da je uzorak tijekom tretmana posvijetlio (pobijelio), što nam ukazuje na uspješan postupak ekstrakcije. Vrijednosti parametra  $a^*$  kod uzoraka paprike pozitivne su, vrlo slične kod svih uzoraka, te u intervalu od 57,37 do 59,66 što odlikuje papriku karakterističnom crvenom bojom. Vrijednost  $a^*$  je najviša za nulti uzorak što znači da je tretmanom paprika izgubila na koncentraciji crvene boje. Vrijednost  $b^*$  kod nultog uzorka je najmanja i iznosi 106,23. U ostalim uzorcima parametar  $b^*$  nalazi se u rasponu od 112,88 – 116,31, što označava gotovo maksimum tog parametra (120), i ukazuje na već intenzivnu komponentu žute boje u početku, a samim tretmanom još intenzivniju kod svih uzoraka paprike.



**Slika 16.** Izmjerene vrijednosti CIEL\*a\*b\* parametara boje za uzorke paprike

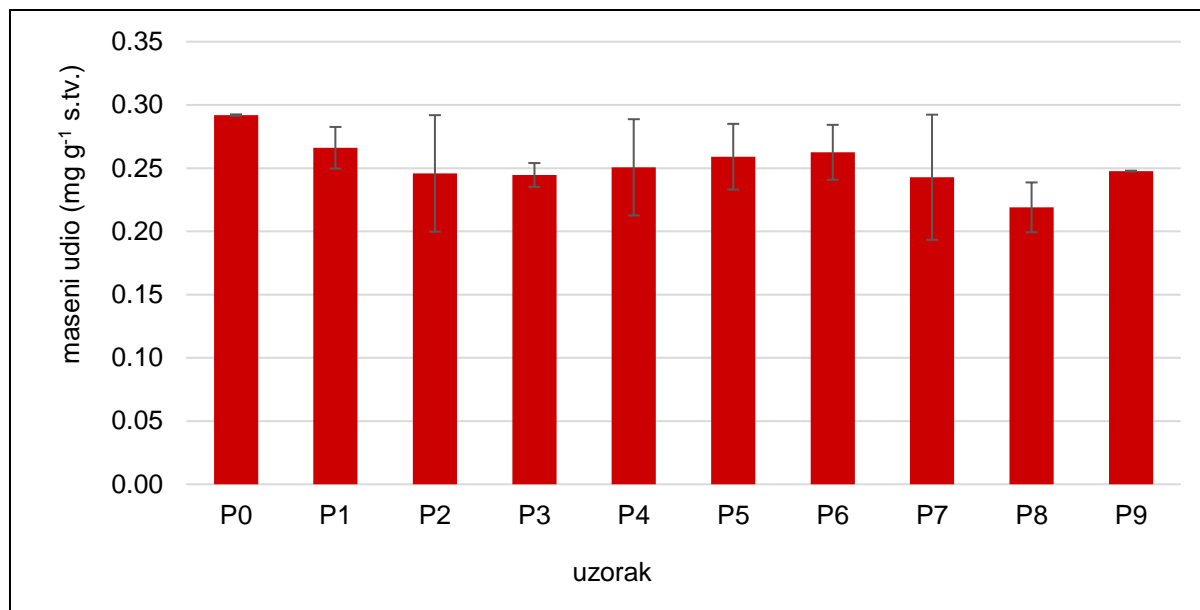
#### 4.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA UDJELA KAROTENOIDA

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem, zatim ultrazvučne kupelji te centrifugiranja, spektrofotometrijski su izmjereni i kasnije analizirani rezultati udjela četiri karotenoida: likopena,  $\beta$ -karotena, klorofila A i klorofila B. Svi rezultati prikazani su stupčastim dijagramima, a predstavljaju grafički prikaz ovisnosti masenog udjela ( $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.) o broju uzorka.

##### 4.4.1. Likopen

Ni jedan uzorak batata (uključujući nulti, netretirani) analizom rezultata dobivenih na spektrofotometru nije pokazao prisutnost likopena čak ni u niskim koncentracijama, što je očekivano s obzirom na sastav batata.

Na slici 17 nalazi se grafički prikaz rezultata analize masenog udjela likopena u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem.

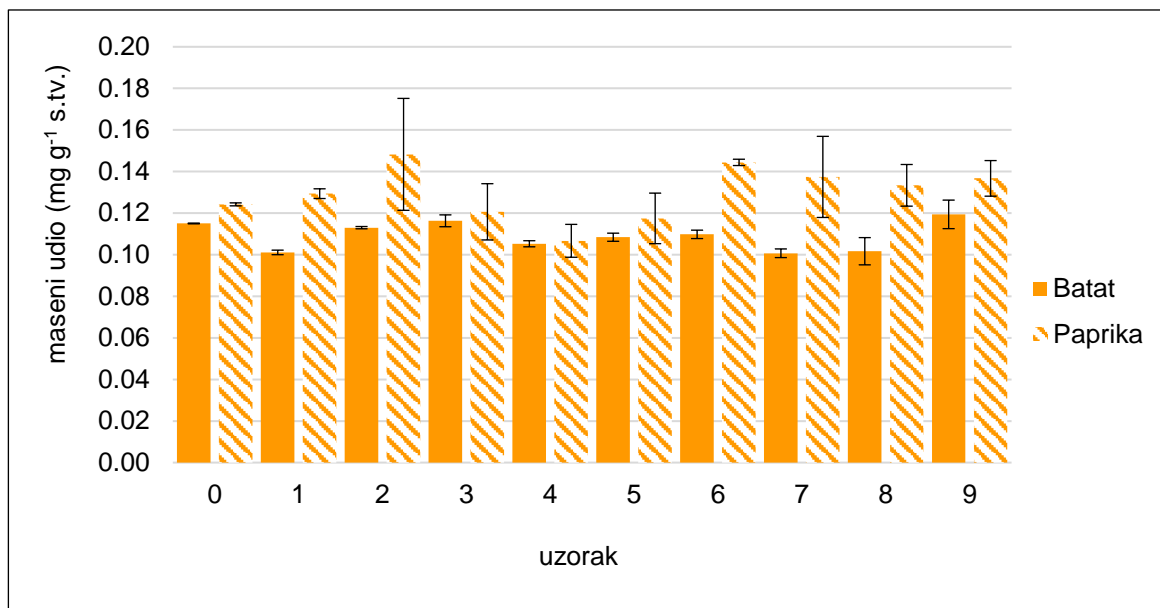


**Slika 17.** Rezultati analize udjela likopena u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Maseni udio likopena najveći je u nultom uzorku paprike te iznosi 0,292 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Nakon tretmana pulsirajućim poljem primjećujemo pad koncentracije likopena u uzorku, a maseni udjeli u uzorcima su približno jednaki i kreću se u rasponu 0,243 – 0,266; izuzev uzorka P8 koji ima najmanju vrijednost masenog udjela likopena, a ona iznosi 0,219 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Iz podataka je jasno vidljivo da je tijekom tretmana pulsirajućim električnim poljem došlo do smanjenja masenog udjela likopena u uzorcima u odnosu na nulti, netretirani uzorak. Upotrebom električnog pulsirajućeg polja te pojavom elektroporacije i elektropermeabilizacije dolazi do utjecaja na stabilnost likopena. Istraživanjima je dokazano da izazivanjem kratkih i snažnih električnih pulseva u tretiranom mediju dolazi do nastanka radikala (Kotnik i sur., 2019). Nastali radikali prouzročili su degradaciju likopena (vidljivo na slici 17) koji je sklon razgradnji i izomerizaciji zbog velike osjetljivosti na svjetlost, kisik, toplinu i niz ostalih čimbenika.

#### 4.4.2. β-karoten

Na slici 18 nalazi se grafički prikaz rezultata analize masenog udjela β-karotena u uzorcima paprike i batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem.

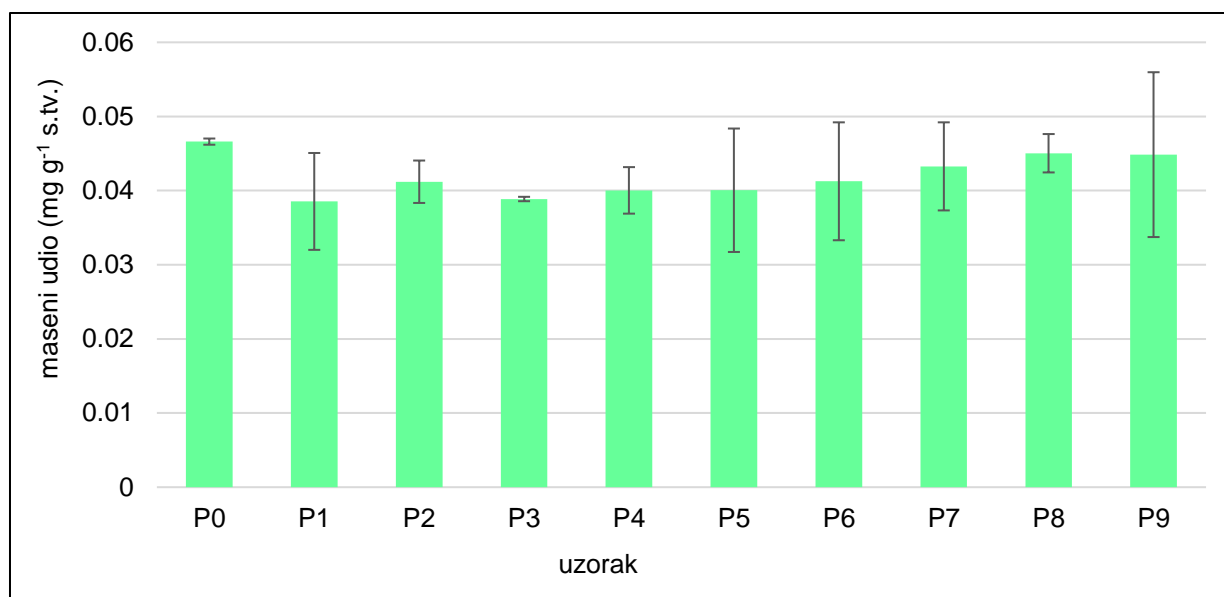


**Slika 18.** Rezultati analize udjela  $\beta$ -karotena u uzorcima paprike i batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Iz grafičkog prikaza rezultata spektrofotometrijske analize udjela  $\beta$ -karotena u uzorcima jasno je vidljivo da se kod obje sirovine (paprika i batat) primjećuje sličan trend rasta/ pada udjela  $\beta$ -karotena sukladno broju uzorka, odnosno podešenim parametrima tretmana pulsirajućeg električnog polja provedenog na određenom uzorku. Maseni udio nultog uzorka paprike (P0) iznosi  $0,124 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ , a maseni udio nultog uzorka batata (B0) iznosi  $0,115 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  Najveći maseni udio  $\beta$ -karotena u uzorcima paprike bio je kod uzorka P2 ( $0,148 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ), a kod uzoraka batata u uzorku B9 ( $0,119 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ). Najveća vrijednost masenog udjela  $\beta$ -karotena u batatu u usporedbi sa vrijednostima od  $0,001$  do  $0,190 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  koje su objavili Simonne i sur. (1993) pokazuje kako je maseni udio  $\beta$ -karotena očekivan i usporediv. Levy i sur. (1995) ispitivanjem udjela  $\beta$ -karotena u uzorcima paprike dobili su rezultate u rasponu  $0,012 - 1,643 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  S obzirom na to da je u ovom radu zabilježen najveći maseni udio  $\beta$ -karotena u paprici od  $0,148 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ , možemo zaključiti da su rezultati usporedivi.

#### 4.4.3. Klorofil A

Na slici 19 nalazi se grafički prikaz rezultata analize masenog udjela klorofila A u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. U uzorcima batata (uključujući nulti, netretirani) analizom rezultata dobivenih na spektrofotometru nije zabilježena prisutnost klorofila A, čak ni u niskim koncentracijama, što je bilo očekivano s obzirom na to da klorofil A u batatu ne bi ni trebao biti prisutan.



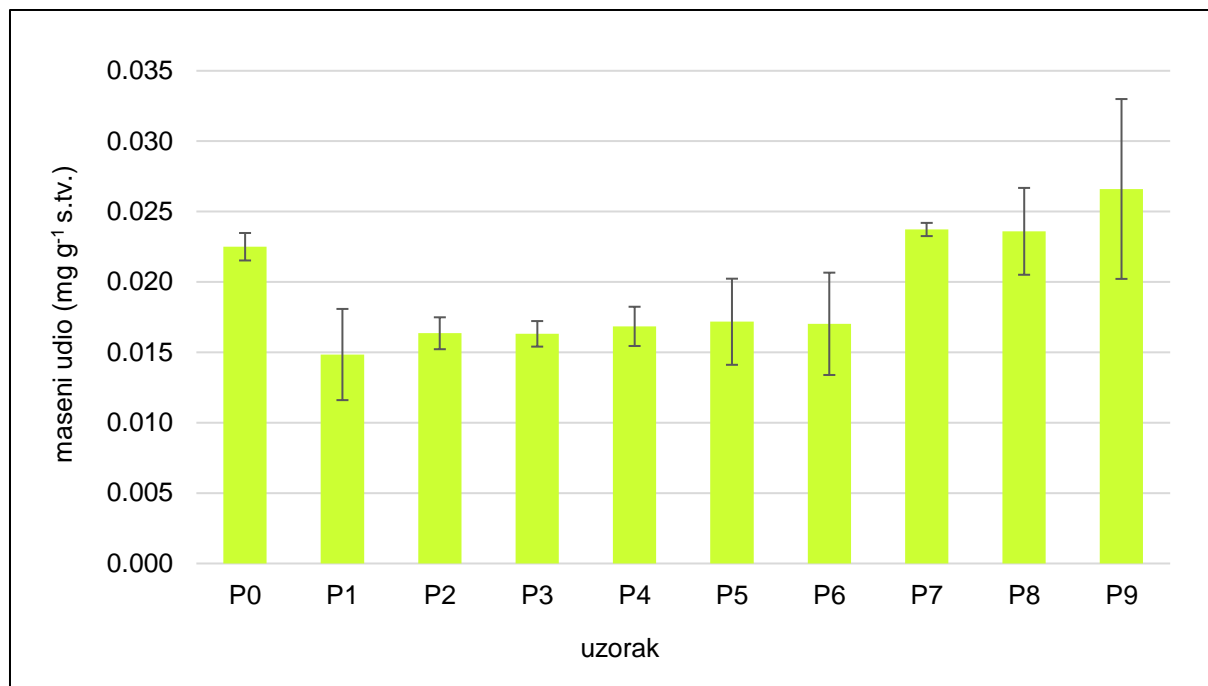
**Slika 19.** Rezultati analize udjela klorofila A u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Iz rezultata spektrofotometrijske analize udjela klorofila A u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem vidljivo je da je udio klorofila A bio najveći u nultom, netretiranom uzorku (P0), a iznosi 0,047 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Udio klorofila A u ostalim uzorcima bio je u rasponu 0,039 – 0,045 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Od tretiranih uzoraka najveći udio klorofila A bio je u uzorku P8 (0,045 mg g<sup>-1</sup> s.tv.) koji se tretirao pulsirajućim električnim poljem pri duljini pulsa 2,0  $\mu$ s te duljini tretmana od 6 minuta. Smanjenje masenog udjela klorofila A u tretiranim uzorcima uzrokovano je pojavom elektroporacije i nastajanjem radikala tijekom tretmana pulsirajućim električnim poljem.

#### 4.4.4. Klorofil B

Na slici 20 nalazi se grafički prikaz rezultata analize masenog udjela klorofila B u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Uzorci batata (uključujući nulti, netretirani) ne bi trebali sadržavati klorofil B, što je i potvrđeno analizom rezultata dobivenih na spektrofotometru. Pregledom rezultata ni u jednom uzorku batata nije zabilježena prisutnost klorofila B.



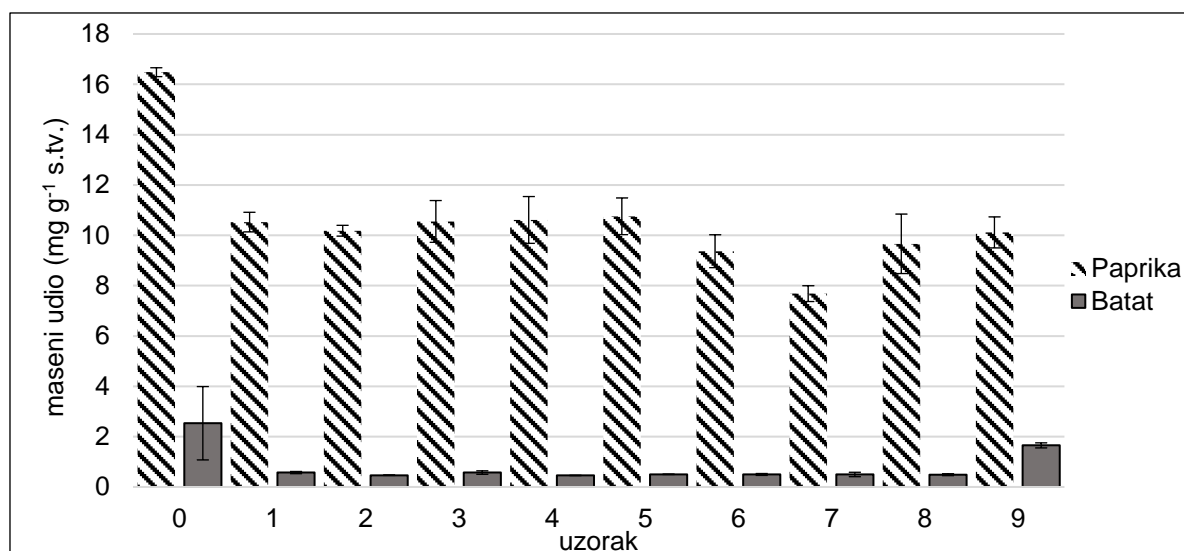


**Slika 20.** Rezultati analize udjela klorofila B u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Iz rezultata spektrofotometrijske analize udjela klorofila B u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem vidljivo je da je udio klorofila B u uzorcima P1 – P6 manji od udjela u početnom, nultom uzorku (P0), dok je pri tretiranju uzorka P7 – P9 udio klorofila B nešto veći no što je u netretiranom uzorku P0. Najveći maseni udjeli dobiveni su u uzorcima P7 i P9 koji su najduže tretirani (12 minuta). Nultom uzorku paprike određen je maseni udio klorofila B u iznosu od 0,023 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Kod tretiranih uzorka paprike najmanji udio klorofila B zabilježen je u uzorku P1 (0,015 mg g<sup>-1</sup> s.tv.), a najveći maseni udio u uzorku P9 koji iznosi 0,027 mg g<sup>-1</sup> s.tv., a tretiran je pulsirajućim električnim poljem pri duljini pulsa 0,5 μs te duljini tretmana od 12 minuta.

#### **4.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA**

Spektrofotometrijskom analizom udjela ukupnih polifenola dobiveni su rezultati prikazani grafički na slici 21.

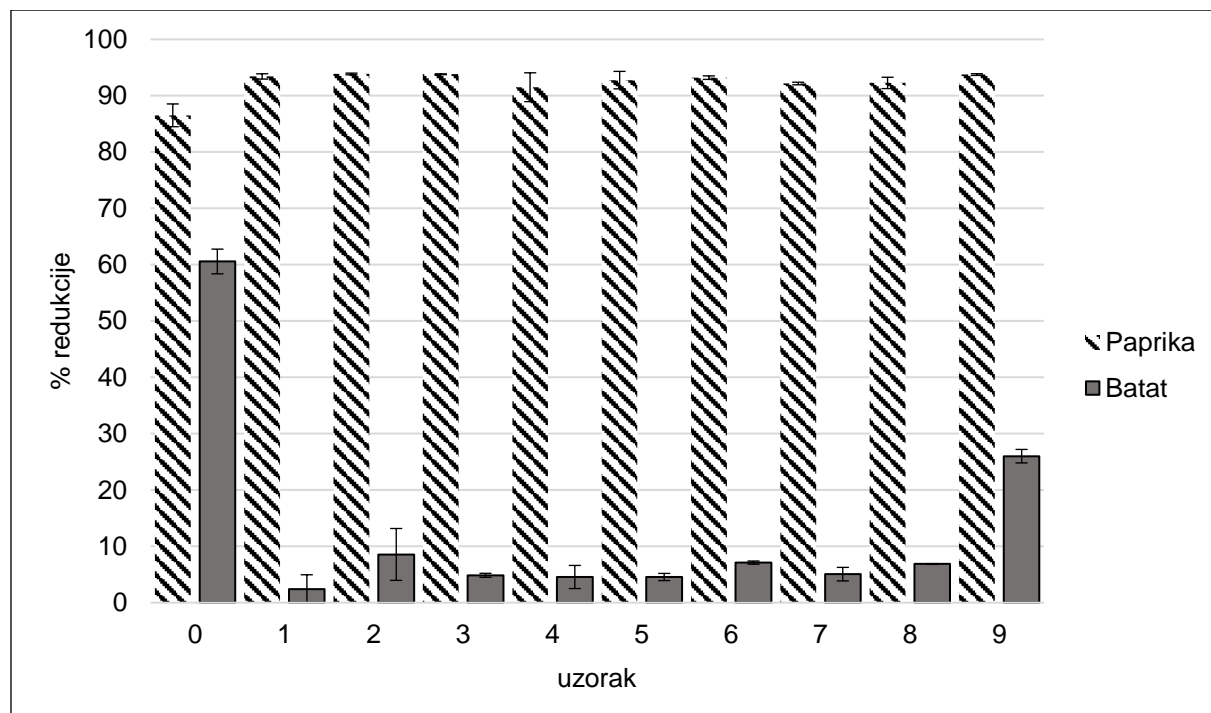


**Slika 21.** Rezultati analize udjela ukupnih polifenola u uzorcima paprike i batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Iz grafičkog prikaza sa slike 21 vidljiv je najveći maseni udio ukupnih polifenola u uzorcima paprike te u uzorcima batata u njihovom netretiranom, nultom uzorku (P0,B0). Maseni udio ukupnih polifenola nultog uzorka paprike (P0) iznosi 16,483 mg g<sup>-1</sup> s.tv., a maseni udio u nultom uzorku batata (B0) 2,531 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Kod batata je najmanji udio ukupnih polifenola u uzorku B4 (0,456 mg g<sup>-1</sup> s.tv.), a kod paprike u uzorku P7 te iznosi 7,682 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Kod uzoraka batata, vrijednosti masenog udjela ukupnih polifenola gotovo su iste za sve tretirane uzorke (B1 – B8), no kod uzorka B9 koji je tretiran pulsirajućim električnim poljem pri duljini pulsa od 0,5 μs i duljini tretmana 12 minuta, vidljiva je bitna razlika u određenom masenom udjelu te iznosi 1,651 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Kod tretiranih uzoraka paprike, vrijednosti masenog udjela ukupnih polifenola također su gotovo iste za većinu tretiranih uzoraka, no primjećeno je manje odstupanje uzorka P6 (tretman pri 2,0 μs; 9 min) te veće odstupanje uzorka P7 (tretman pri 1,25 μs; 12 min), čiji je iznos masenog udjela već naveden ranije u tekstu. Usporedbom uzorka batata sa najviše polifenola (B0) s podacima koje su objavili Teow i sur. (2007), a iznose 32,2 mg g<sup>-1</sup> s.tv., možemo zaključiti da je u korištenoj sirovini (batatu) došlo do degradacije jer je udio u našem slučaju 10 – ak puta manji od onog u navedenoj literaturi. Škrovánková i sur. (2017) istraživali su udio polifenola u raznim vrstama i uzorcima paprike što je rezultiralo vrijednostima udjela ukupnih polifenola od 14,67 do 28,78 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Prema tom rasponu vrijednosti rezultata možemo uvidjeti da je maseni udio polifenola u netretiranom uzorku paprike usporediv sa literaturom. Na rezultatima spektrofotometrijske analize polifenola (mjereno pri apsorbanciji od 765 nm) te masenog udjela likopena (apsorbancije u rasponu 453 – 663 nm) vidljiva je degradacija kod tretiranih uzoraka u odnosu na nulti uzorak. Rezultati su slični jer se apsorbancije u obje analize nalaze u vidljivom dijelu spektra.

#### 4.6. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Na slici 22, grafički su prikazani rezultati spektrofotometrijske analize antioksidacijske aktivnosti kod uzoraka paprike i batata. Slikom je prikazana ovisnost postotka (%) redukcije o rednom broju uzorka.



**Slika 22.** Rezultati analize antioksidacijske aktivnosti u uzorcima paprike i batata nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Antioksidacijska aktivnost nultog uzorka batata (B0) iznosila je 60,57 % redukcije, a uzorcima batata se postotak redukcije nakon provedenog tretmana smanjio što znači da su uzorci tretmanom izgubili na antioksidacijskoj aktivnosti. Takvi rezultati očekivani su jer je u rezultatima dobivenim spektrofotometrijskom analizom udjela ukupnih polifenola najveći udio imao upravo nulti uzorak (B0) zbog čega se očekivalo da će on posjedovati najveću antioksidacijsku aktivnost. Tretirani uzorci na slici 22 (antioksidacijska aktivnost), kao i na slici 21 (maseni udio ukupnih polifenola), nemaju velika odstupanja u uzorcima B1 – B8, no u obje analize primijećeno je odstupanje uzorka B9 koji ima veći maseni udio ukupnih polifenola, a samim time i veću antioksidacijsku aktivnost od ostalih tretiranih uzoraka batata, a ona iznosi 26,00 % redukcije.

Kod uzoraka paprike, prema određenim masenim udjelima ukupnih polifenola očekivalo se da će nulti uzorak (P0) imati najveći postotak redukcije, no analizom rezultata antioksidacijske aktivnosti pokazalo se da to nije tako. Netretirani uzorak P0 pokazao je antioksidacijsku aktivnost 86,51 % redukcije, što je najmanja antioksidacijska aktivnost svih uzoraka paprike.

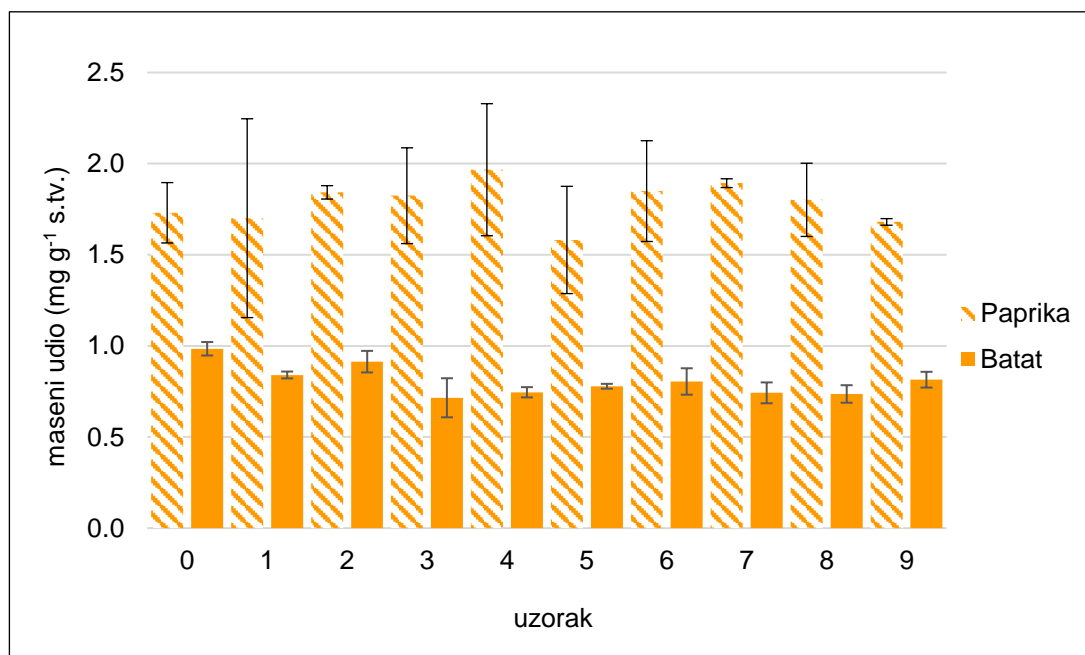
Tretirani uzorci paprike P1 – P9 posjeduju gotovo identičnu antioksidativnu vrijednost, a najveća zabilježena je kod uzorka P2 (93,86 % redukcije). S obzirom da se antioksidacijska svojstva paprike ne odnose isključivo na udio polifenola, već i na ostale bioaktivne spojeve poput karotenoida (najviše kapsaicina) i vitamina C, rezultati analize antioksidacijske aktivnosti i udjela polifenola ne moraju biti usporedivi. Provedenim tretmanom se poboljšala ekstrakcija bioaktivnih komponenti koje utječu na antioksidativna svojstva, što je rezultiralo porastom redukcije od 4 – 6 %.

#### 4.7. ANALIZA UDJELA KAROTENOIDA POMOĆU HPLC-a

Zadnji korak u analizi udjela spojeva u uzorcima bila je analiza udjela karotenoida korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Karotenoidi u obje sirovine analizirani su spektrofotometrijski, ali i korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti kako bi se bolje utvrdio te usporedio maseni udio dobiven u obje analize. Analizom udjela karotenoida u batatu korištenjem HPLC-a detektirana je prisutnost  $\beta$ -karotena, ali ni jednog od ostalih traženih karotenoida (likopen, klorofil A, klorofil B), što je u skladu sa rezultatima spektrofotometrijske analize.

##### 4.7.1. $\beta$ -karoten

Slikom 23 grafički su prikazani rezultati ovisnosti masenog udjela  $\beta$ -karotena o broju uzorka batata i paprike.



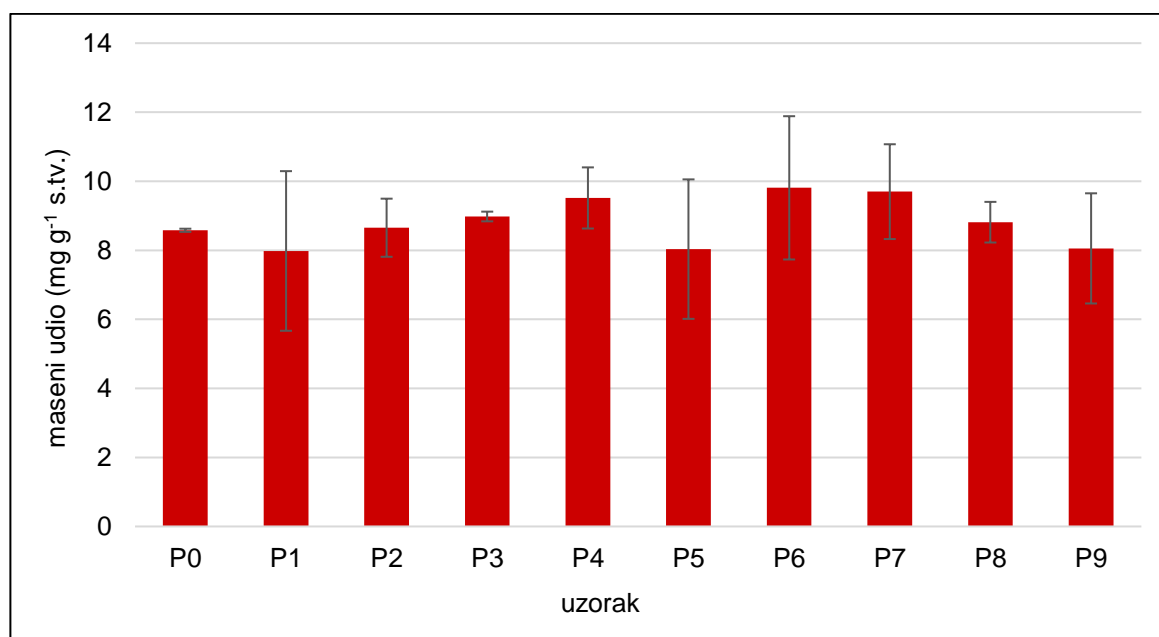
**Slika 23.** Rezultati HPLC analize udjela  $\beta$ -karotena u uzorcima batata i paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Na grafičkom prikazu možemo uočiti da je najveći udio  $\beta$ -karotena batata u nultom, netretiranom uzorku (B0) te iznosi  $0,984 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  U tretiranim uzorcima, najmanji maseni udio  $\beta$ -karotena zabilježen je u uzorku B3 ( $0,175 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ), a najveći maseni udio nalazi se u uzorku B2 te iznosi  $0,913 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  Usporedbom rezultata analize masenog udjela  $\beta$ -karotena u uzorcima batata spektrofotometrijskom metodom i uporabom HPLC–a ne dolazi do poklapanja dobivenih vrijednosti.

Kod uzoraka paprike, najveći maseni udio  $\beta$ -karotena prisutan je kod uzorka P4 i iznosi  $1,967 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  Netretirani (nulti) uzorak pokazao je vrijednost od  $1,730 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ , a najmanje  $\beta$ -karotena nalazilo se u uzorku P5 ( $1,581 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ).

#### 4.7.2. Likopen

Na slici 24 nalazi se grafički prikaz rezultata HPLC analize udjela likopena u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Iz rezultata možemo vidjeti da je PEP tretmanom maseni udio likopena u paprici u nekim uzorcima blago porastao, dok se u pojedinim neznatno smanjio. Najveći maseni udio zabilježen je u uzorku P6 i iznosi  $9,809 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ , dok je najmanji prisutan kod uzorka P5 i iznosi  $8,034 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  Maseni udio u nultom uzorku (P0) iznosi  $8,579 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$  Maseni udio likopena utvrđen HPLC analizom razlikuje se u uzorcima u odnosu na maseni udio likopena mjereno spektrofotometrijski. Rezultati dobiveni HPLC analizom zbog preciznije detekcije spojeva i njihove usporedbe sa standardima predstavljaju točnije vrijednosti. Svojstva likopena detaljnije su objašnjena u odlomku 4.1.1.



**Slika 24.** Rezultati HPLC analize udjela likopena u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

#### 4.8. OBRADA PODATAKA

Rezultati provedenih analiza statistički su obrađeni u programu Statgraphics 19. U tablici 5 nalaze se podaci analize varijance parametara A (duljina pulsa) i B (trajanje tretmana) pulsirajućeg električnog polja na izolaciju bioaktivnih spojeva analiziranih u ovom radu. Kada je vrijednost parametra „p“ manja od 0,05 taj se podatak smatra statistički značajnim. Statistički značajni podaci u tablici 5 podebljani su kako bi bili lakše uočljivi.

**Tablica 5.** Analiza varijance parametara A (duljina pulsa) i B (trajanje tretmana) pulsirajućeg električnog polja na izolaciju bioaktivnih spojeva

Uzorak		A		B		AA		BB		AB	
		f	p	f	p	f	p	f	p	f	p
Paprika	Polifenoli	0,20	0,6815	0,34	0,5989	0,56	0,5085	0,35	0,5952	0,16	0,7177
	Antioksidacijska aktivnost	1,20	0,3541	0,11	0,7587	1,04	0,3829	0,00	1,0000	0,08	0,7897
	Likopen (UV/VIS)	0,32	0,6094	0,35	0,5950	0,14	0,7299	5,21	0,1068	0,41	0,5657
	β-karoten (UV/VIS)	0,04	0,8626	0,18	0,6986	0,00	0,9742	0,39	0,5754	0,56	0,5070
	Klorofil A	5,69	0,0971	3,93	0,1417	0,02	0,9048	65,42	<b>0,0039</b>	18,19	<b>0,0236</b>
	Klorofil B	0,00	0,9941	10,16	<b>0,0498</b>	0,06	0,8213	31,20	<b>0,0113</b>	10,09	0,0503
	Likopen (HPLC)	1,32	0,3335	0,06	0,8272	2,70	0,1989	0,54	0,5169	4,72	0,1182
	β-karoten (HPLC)	0,03	0,8653	1,67	0,2873	14,34	<b>0,0323</b>	2,75	0,1957	9,36	0,0550
Batat	Polifenoli	4,03	0,1384	2,96	0,1839	1,63	0,2915	4,00	0,1394	0,99	0,3934
	Antioksidacijska aktivnost	1,02	0,3873	1,48	0,3102	0,37	0,5848	4,72	0,1181	0,65	0,4790
	β-karoten (UV/VIS)	0,63	0,4854	0,35	0,5935	0,26	0,6467	0,44	0,5550	0,25	0,6531
	β-karoten (HPLC)	0,06	0,8174	0,59	0,4983	0,11	0,7668	0,17	0,7067	0,71	0,4608

## 5. ZAKLJUČCI

Iz prikazanih rezultata, u ovom diplomskom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Konstrukcija reaktora koja je korištena u ovom radu pokazala se kao dobar početni korak prema korištenju protočnog tipa reaktora u tretmanu pulsirajućeg električnog polja.
2. Najveća električna provodljivost izmjerena je u uzorku P3, a iznosila je  $0,43 \mu\text{S cm}^{-1}$ , dok je najmanja izmjerena u uzorku B7 ( $0,07 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Vrijednosti pH su za uzorke paprike tijekom tretmana porasle, dok su kod batata blago pale.
3. Parametri boje  $L^*$  i  $b^*$  slični su kod obje korištene sirovine, visoke su vrijednosti što označava žute i svijetle uzorke. Najveća razlika je u parametru  $a^*$  koji je kod batata negativna vrijednost (zelena), a kod paprike pozitivna vrijednost (crvena boja).
4. Najveći maseni udio  $\beta$ -karotena u uzorcima paprike bio je kod uzorka P2 ( $0,148 \text{ mg g}^{-1}$  s.tv.), a kod uzoraka batata u uzorku B9 ( $0,119 \text{ mg g}^{-1}$  s.tv.). Maseni udio likopena najveći je u nultom uzorku paprike te iznosi  $0,292 \text{ mg g}^{-1}$  s.tv. Maseni udio klorofila A bio najveći u nultom, netretiranom uzorku (P0) te iznosi  $0,047 \text{ mg g}^{-1}$  s.tv., dok je najveći maseni udio klorofila B zabilježen u uzorku P9 ( $0,027 \text{ mg g}^{-1}$  s.tv.).

## 6. LITERATURA

Abdalla MUE, Taher M, Sanad MI, Tadros LK (2019) Chemical properties, phenolic profiles and antioxidant activities of pepper fruits. *J Agr Chem Biotechnol* **10(7)**, 133-140. <https://doi.org/10.21608/jacb.2019.53475>

Alam MK (2021) A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): Revisiting the associated health benefits. *Trends Food Sci Technol* **115**, 512-529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.001>

Alam MK, Ran, ZH, Islam SN (2016) Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. *Foods* **5(4)**, 64. <https://doi.org/10.3390/foods5030064>

Alam MK, Sams S, Rana ZH, Akhtaruzzaman M, Islam SN (2020) Minerals, vitamin C, and effect of thermal processing on carotenoids composition in nine varieties orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *J Food Compos Anal* **92**, 103582. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103582>

Almohammed F, Mhemdi H, Vorobiev E (2016) Pulsed electric field treatment of sugar beet tails as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Appl Energy* **162**, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.10.050>

Andreou V, Dimopoulos G, Dermesonlouoglou E, Taoukis P (2020) Application of pulsed electric fields to improve product yield and waste valorization in industrial tomato processing. *J Food Eng* **270**, 109778. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109778>

Arshad RN, Abdul-Malek Z, Munir A, Buntat Z, Ahmad MH, Jusoh YM, Bekhit AED, Roobab U, Manzoor MF, Aadil RM (2020) Electrical systems for pulsed electric field applications in the food industry: An engineering perspective. *Trends Food Sci Technol* **104**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.008>

Attaran M (2017) The rise of 3-D printing: The advantages of additive manufacturing over traditional manufacturing. *Business horizons*, **60(5)**, 677-688. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.05.011>

Barbosa S, Campmajó G, Saurina J, Puignou L, Núñez O (2019) Determination of phenolic compounds in paprika by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to product designation of origin authentication by chemometrics. *J Agric Food Chem* **68(2)**, 591-602. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06054>

Bogacz-Radomska L, Harasym J (2018)  $\beta$ -Carotene—properties and production methods. *Food Quality Safety*, **2(2)**, 69-74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>

Bot F, Verkerk R, Mastwijk H, Anese M, Fogliano V, Capuano E (2018) The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: The role of tomato matrix. *Food Chem* **240**, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.102>

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

Chen QH, Wu BK, Pan D, Sang LX, Chang B (2021) Beta-carotene and its protective effect on gastric cancer. *World J Clin Cases* **9(23)**, 6591. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i23.6591>



- Cortez R, Luna-Vital DA, Margulis D, Gonzalez de Mejia E (2017) Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **16(1)**, 180-198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>
- de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E (2019) Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publ **12**, 253-271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Desai PR, Holihosur PD, Marathe SV, Kulkarni BB, Vishal UK, Geetanjali RK, Rajeev RP, Hiremath SV (2018) Studies on isolation and quantification of lycopene from tomato and papaya and its antioxidant and antifungal properties. *Int J Agric Innov Res* **6(5)**, 257-260.
- Elango P, Asmathulla S (2017) A Systematic Review on Lycopene and its Beneficial Effects". *Biomed Pharmacol J* **10(4)**, 2113-2120. <https://doi.org/10.13005/bpj/1335>
- Gry J, Black L, Eriksen FD, Pilegaard K, Plumb J, Rhodes M, Kroon PA (2007) EuroFIR-BASIS—a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. *Trends Food Sci Technol* **18(8)**, 434-444. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.05.008>
- Guderjan M, Töpfl S, Angersbach A, Knorr D (2005) Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *J Food Eng* **67**, 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.029>
- Hamed M, Kalita D, Bartolo ME, Jayanty SS (2019) Capsaicinoids, polyphenols and antioxidant activities of *Capsicum annuum*: Comparative study of the effect of ripening stage and cooking methods. *Antioxidants* **8(9)**, 364. <https://doi.org/10.3390/antiox8090364>
- Higdon J (2005) Flavonoids. Linus Pauling Institute. Oregon State University. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>. Pristupljeno: 1. rujna 2024.
- Islam S (2014) Nutritional and medicinal qualities of sweetpotato tops and leaves. Cooperative Extension Program, University of Arkansas at Pine Bluff.
- Kempkes M, Munderville M (2017) Pulsed Electric Fields (PEF) processing of fruit and vegetables. In *2017 IEEE 21st international conference on pulsed power (PPC)* (pp. 1-7). IEEE. <https://doi.org/10.1109/PPC.2017.8291186>
- Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D (2019) Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annu. rev. biophys.* **48(1)**, 63-91. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>
- Levy A, Harel S, Palevitch D, Akiri B, Menagem E, Kanner J (1995) Carotenoid pigments and beta.-carotene in paprika fruits (*Capsicum* spp.) with different genotypes. *J Agric Food Chem* **43(2)**, 362-366. <https://doi.org/10.1021/jf00050a019>
- López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso J (2008) Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innov Food Sci Emerg Technol* **9**, 477- 482. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.11.001>
- Luterotti S, Marković K, Franko M, Bičanić D, Madžgalj A, Kljak K (2013) Comparisom of spectrophotometric and HPLC methods for food determination of carotenoids in foods. *Food Chem* **140**, 390-397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.003>

- Mihoci M (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Osvrti, Kem Ind* **64**, 11-12. <https://hrcak.srce.hr/file/218636>
- Mohd Hassan N, Yusof NA, Yahaya AF, Mohd Rozali NN, Othman R (2019) Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants* **8(10)**, 469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Molitch-Hou M (2018) Overview of additive manufacturing process. *Addit. Manuf.*, 1-38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812155-9.00001-3>
- Mu TH, Sun HN (2019) Sweet potato leaf polyphenols: preparation, individual phenolic compound composition and antioxidant activity. *Polyphenols in Plants* **2**, 365-380. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00022-0>
- Nagata M, Yamashita I (1992) Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon shokuhin kogyo gakkaishi* **39(10)**, 925-928. <https://doi.org/10.3136/nskkk1962.39.925>
- Pataro G, Carullo D, Falcone M, Ferrari G (2020) Recovery of lycopene from industrially derived tomato processing by-products by pulsed electric fields-assisted extraction. *Innov Food Sci Emerg Technol* **63**, 102369. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102369>
- Ranjha MMA, Kanwal R, Shafique B, Arshad RN, Irfan S, Kieliszek M, Aadil RM (2021) A critical review on pulsed electric field: A novel technology for the extraction of phytoconstituents. *Molecules* **26(16)**, 4893. <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>
- Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Prieto M, Olmedilla-Alonso B (2020) Assessment of carotenoid concentrations in red peppers (*Capsicum annum*) under domestic refrigeration for three weeks as determined by HPLC-DAD. *Food Chem* **6**, 100092. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100092>
- Schirmeister CG, Hees T, Licht EH, Mülhaupt R (2019) 3D printing of high density polyethylene by fused filament fabrication. *Addit Manuf* **28**, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2019.05.003>
- Schloss KB, Lessard L, Racey C, Hurlbert AC (2018) Modeling color preference using color space metrics. *Vis Res* **151**, 99-116. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.07.001>
- Simonne AH, Kays SJ, Koehler PE, Eitenmiller RR (1993) Assessment of  $\beta$ -carotene content in sweetpotato breeding lines in relation to dietary requirements. *J Food Compos Anal* **6(4)**, 336-345. <https://doi.org/10.1006/jfca.1993.1037>
- Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L (2018) Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Mol Plant* **11(1)**, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>
- Sun Y, Pan Z, Yang C, Jia Z, Guo X (2019) Comparative assessment of phenolic profiles, cellular antioxidant and antiproliferative activities in ten varieties of sweet potato (*Ipomoea Batatas*) storage roots. *Molecules* **24**, 4476. <https://doi.org/10.3390/molecules24244476>
- Šeregelj V, Tumbas Šaponjac V, Lević S, Kalušević A, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Vidaković A (2019) Application of encapsulated natural bioactive compounds from red pepper waste in yogurt. *J Microencapsul* **36(8)**, 704-714. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1668488>

Škrovánková S, Mlček J, Orsavová J, Juríková T, Dřímlová P (2017) Polyphenols content and antioxidant activity of paprika and pepper spices. *Potr S J F Sci* <https://doi.org/10.5219/695>

Teow CC, Truong VD, McFeeters RF, Thompson RL, Pecota KV, Yencho GC (2007) Antioxidant activities, phenolic and  $\beta$ -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem* **103(3)**, 829-838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.033>

Zia-Ul-Haq M (2021) Historical and introductory aspects of carotenoids. *Carotenoids: structure and function in the human body* 1-42. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_1)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Vlastoručni potpis