

Mogućnost primjene otpada rajčice kao nutraceutika

Radovečki, Reana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:814041>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Reana Radovečki

**Mogućnost primjene otpada rajčice kao
nutraceutika**

DIPLOMSKIRAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na iznimnom strpljenju, uloženom trudu i vremenu te pristupačnosti i stručnom vodstvu tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala mojim divnim prijateljicama i sestri koji su bili uz mene tijekom cijelog mog studiranja, uvijek spremni saslušati sve moje jadikovke i probleme te mi obogatili studentske dane i pretvorili ih u lijepe uspomene.

Hvala mojoj baki i dedi koji su se uvijek ponosili sa mnom te nakon svakom ispita žurno iščekivali da im javim kako je prošlo, a svakom položenom ispitu se veselili kao da je zadnji.

Hvala mom Marinu koji je od prvog dana bio tu za mene kao moja najveća podrška i stijena; uz tebe je sve bilo lakše.

I na kraju, najviše se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi od samog početka školovanja bili najveći oslonac, potpora i vjetar u leđa te vjerovali u mene čak i onda kada ja sama nisam.

Hvala vam moji divni ljudi, vi ste bili moja snaga i bez vas ništa od ovog ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Otpad hrane	1
1.1.1 Nastanak otpada hrane	1
1.1.2. Utjecaj na okoliš	3
1.1.3. Potencijal primjene otpada hrane.....	4
1.1.4. Prirodni bioaktivni spojevi iz otpada hrane.....	5
1.1.4.1. Zakonska regulativa.....	6
1.1.4.1.1. Europska unija.....	6
1.1.4.1.2. Sjedinjene Američke Države.....	7
1.1.4.2. Sigurnost primjene spojeva iz otpada hrane u proizvodnji hrane - kontaminanti	8
1.1.4.3. Sigurnost primjene spojeva iz otpada hrane u proizvodnji hrane – toksičnost bioaktivnih sastavnica	10
1.1.5. Otpad rajčice	12
1.2. Nutraceutici	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Karotenoidi rajčice.....	20
4.1.1. Likopen.....	20
4.1.1.1. Protuupalno i antikancerogeno djelovanje likopena	22
4.1.1.2. Učinak prerade rajčice na sadržaj likopena	25
4.1.2. Beta karoten	26
4.1.2.1 Biološki učinci beta karotena.....	28
4.1.3. Ekstrakcija karotenoida iz otpada rajčice	32
4.1.4. Bioraspoloživost karotenoida	36
4.2. Polifenoli rajčice.....	39
4.2.1. Biološki učinci polifenola.....	41
4.2.2. Bioraspoloživost polifenola	43

4.3. Pektini	46
4.3.1. Ekstrakcija pektina	48
4.3.2. Karakterizacija pektina.....	49
4.3.3. Primjena i biološki učinci pektina.....	50
4.4. Metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz sekundarnih sirovina.....	52
4.4.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	53
4.4.1.1. Soxhlet ekstrakcija	54
4.4.1.2. Hidrodestilacija	55
4.4.1.3. Maceracija.....	56
4.4.2. Zelene ekstrakcijske tehnike.....	57
4.4.2.1. Ekstrakcija superkričnim fluidom.....	57
4.4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	59
4.4.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	60
4.4.2.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija	61
4.4.2.5. Ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja	63
5. ZAKLJUČCI	65
6. LITERATURA	66
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	74
7.1. SAŽETAK.....	74
7.2. SUMMARY	74

1. UVOD

1.1 Otpad hrane

Proizvodnja hrane jedan je od najvećih uzročnika promjena u korištenju zemljišta i gubitka bioraznolikosti, a rasipanje hrane predstavlja propuštenu priliku za unaprjeđenje globalne opskrbe hranom kao i za smanjenje negativnog utjecaja na okoliš, zdravlje ljudi i iskorištavanje prirodnih resursa. U Europi i svijetu sve je razvijenija svijest o problematici vezanoj uz otpad hrane i neracionalnom trošenju resursa tijekom proizvodnje hrane, posebice jer je riječ ne samo o okolišnom već i o pitanju socijalno-ekonomske i moralne prirode. Promatrajući sveobuhvatnu problematiku vezanu uz otpad od hrane, koncept sprječavanja nastanka ove vrste otpada i procjenu njegova utjecaja na okoliš potrebno je bazirati na pristupu koji obuhvaća cijeli životni ciklus proizvoda. Životni ciklus uključuje primarnu (poljoprivrednu) proizvodnju, rukovanje i skladištenje nakon berbe/žetve, preradu, distribuciju, potrošnju i završetak životnoga ciklusa tj. dobivanje statusa otpada (www.haop.hr).

1.1.1 Nastanak otpada hrane

Hrana predstavlja jednu od osnovnih ljudskih potreba. Dnevno se ogromne količine hrane bacaju, počevši od primarne proizvodnje do konačne konzumacije hrane. Do 42% otpada od hrane nastaje aktivnostima u kućanstvu, 39% gubitaka nastaje u industriji proizvodnje hrane i 14% u sektoru usluživanja hrane (gotova hrana, catering i restorani), dok se 5% gubi tijekom distribucije (Kumar i sur., 2017). Agroindustrijski i kućni prehrambeni otpad od hrane obično se baca na odlagališta ili spaljuje, što stvara ozbiljne ekološke i zdravstvene probleme. Ovaj otpad se različito kategorizira ovisno o tome gdje nastaje u prehrambenom lancu pa se tako koriste izrazi „gubitak hrane“ i „otpad od hrane“. „Gubitak hrane“ događa se prije nego što hrana stigne do potrošača kao rezultat problema u fazama proizvodnje, skladištenja, obrade i distribucije i ne koristi se za bilo koju drugu produktivnu upotrebu, kao što je primjerice korištenje kao hrane za životinje. Pojam „otpad od hrane“ odnosi se na hranu koja je prikladna za konzumaciju, ali se svjesno odbacuje u fazi maloprodaje ili konzumacije. Dakle gubici hrane događaju se u cijelom prehrambenom lancu sve do maloprodajne razine, dok se bacanje hrane događa u maloprodaji i fazi korištenja od strane potrošača (www.eufic.org.hr). Studija koju je

provela Organizacija Ujedinjenih naroda za hranu i poljoprivredu (*eng. Food and Agriculture Organization-FAO*) pokazala je da se jedna trećina (otprilike 1300 milijuna tona godišnje) ukupne hrane proizvedene za ljude baca u cijelom svijetu (FAO, 2014.), a regionalno gledano, središnja i južna Azija zajedno čine najveću stopu gubitaka hrane (21 %), a slijede je Sjeverna Amerika i Europa (16 %). Regija Australije i Novog Zelanda bilježi najmanji gubitak hrane od 6 %. Lipinski i sur. (2013) izvijestili su da 56 % ukupnog svjetskog otpada od hrane stvaraju razvijene i industrijalizirane zemlje Europe, Sjeverne Amerike i zemlje poput Kine, Japana i Južne Koreje. Razlozi za gubitak i bacanje hrane mogu se pripisati lošoj klimi, korištenju starih tehnika u žetvi, nedostatku skladišnih objekata i nezadovoljavajućem korištenju od strane kupaca. Gubici i rasipanje hrane mogu se smanjiti, ali se ne mogu u potpunosti izbjeći. Otpad od hrane uključuje biljni otpad koji uglavnom sadrži koru, stabljike, sjemenke, ljuske, mekinje, pulpu, dok životinjski otpad uključuje otpad od uzgoja životinja, prerade mliječnih proizvoda, plodove mora i klaonički otpad (Arun i sur., 2020). Među poljoprivredno-prehrambenim otpadom voće, povrće, korijenje, gomolji i žitarice zajedno imaju najveće stope otpada. U proizvodnji voća dominiraju citrusi, lubenice, banane, jabuke, grožđe i mango, dok se od povrća najviše proizvodi rajčica, luk, krastavci i kupus, a od korijena i gomolja mrkva i krumpir (Vilas-Boas i sur., 2021).

Iako postoje individualne i organizacijske inicijative i programi koje predlažu različite vladine institucije, kao što je Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država (*eng. Environmental Protection agency - EPA*), koje kontinuirano pokušavaju prevladati ovaj problem, gubitak hrane još uvijek je neriješen problem u našem društvu. Stoga postaje jasno da otpad koji je uključen u proizvodnju i preradu hrane treba ne samo smanjiti, već i „reciklirati“ kako bi se osigurala održiva valorizacija nusproizvoda prerađivačke industrije (Laranjeira i sur., 2022).

1.1.2. Utjecaj na okoliš

Tipične faze u lancu opskrbe hranom su uzgoj, prikupljanje, sortiranje, pakiranje, transport, stavljanje na tržište i prodaja i konzumacija. Hrana se baca u svim fazama - statistike pokazuju da najviše otpada nastaje upravo u zadnjoj fazi – u domaćinstvima. Što se kasnije u lancu hrana baci to je veći negativan utjecaj na okoliš jer je u proizvodnji do te točke uloženo više energije i prirodnih resursa. Postoji niz načina na koje bacanje hrane negativno utječe na ekosustav.

Kada bacamo hranu rasipamo prirodne resurse koji se koriste za proizvodnju te hrane, a tri glavna su energija, gorivo i voda. Voda je potrebna za sve faze procesa proizvodnje hrane kao i za sve vrste hrane koja se proizvodi. To uključuje navodnjavanje i primjenu pesticida te vodu potrebnu za uzgoj stoke, peradi i ribe. Rasipajući hranu posredno povećavamo i potrošnju vode. Uzgoj biljaka i uzgoj životinja također iscrpljuje veliku količinu slatke vode. Hrana poput voća i povrća puna je vode i zahtijeva veliku količinu vode za rast. Osim toga, različite vrste biljaka trebaju različite količine vode za rast. Životinje također trebaju veliku količinu vode kako za svoj rast tako i za hranu. Vijeće za obranu prirodnih resursa (*eng. Natural Resources Defense Council, NRDC*) ustanovilo je da se bacanjem hrane izgubi četvrtina naših zaliha vode u obliku nepojedene hrane, a budući da zemlje imaju ozbiljan nedostatak vode, očuvanje slatke vode trebala bi biti globalna misija (www.earth.org.hr).

Također, otpad od hrane negativno utječe i na klimatske promjene budući da se njegovim neodgovornim odlaganjem stvaraju velike količine stakleničkih plinova. Procjenjuje se da 8-10% ukupnih emisija otpada na emisije stakleničkih plinova iz bačene hrane. Naime razgradnjom bačene hrane nastaju metan (CH_4), ugljični dioksid (CO_2), dušik (N) i dr. (Laranjeira i sur., 2022). Otpad prehrambene industrije je u kontekstu klimatskih promjena problematičan primarno zbog emisija metana čiji je staklenički potencijal veći od CO_2 , stoga se tijekom posljednjih nekoliko godina probudio veliki interes za tehnologiju biomase koja koristi frakcije otpada za proizvodnju goriva. Osim što predstavlja alternativu korištenju fosilnih energija, ova tehnika mogla bi dodatno valorizirati odbačene frakcije hrane. Budući da emisija metana tijekom razgradnje hrane predstavlja veliki problem, alternativno korištenje tih frakcija za proizvodnju goriva pojavljuje se kao zanimljiva alternativa, ne samo korisna za okoliš, već i za industrije i lance koji proizvode takav višak, omogućujući daljnju valorizaciju (Laranjeira i sur., 2022).

Neodgovorna upotreba prehrambenih proizvoda također ima nepovoljan utjecaj na bioraznolikost. Budući da je ekosustav Zemlje kompleksan i sofisticiran sustav, promjene u

iskorištavanju zemljišta i općenito poljoprivreda utječu na biološku raznolikost (www.ceip.hr) Dva su načina na koje trošimo zemlju: zemljište koje koristimo za proizvodnju hrane i zemljište koje koristimo za odlaganje hrane. 900 milijuna hektara neobrađive zemlje koristi se za uzgoj stoke za proizvodnju mesa i mliječnih proizvoda. Budući da je meso u velikoj potražnji, obradivi krajolici pretvaraju se u pašnjake za životinje.

Osim što tako se tako uništava prirodni krajolik također se narušava i bioraznolikost budući da će pretvaranje obradivog zemljišta u pašnjake uzrokovati gubitak staništa za životinje, a također bi moglo ozbiljno poremetiti prehrambene lance u ekosustavu (www.earth.org.hr). Upotreba pesticida još je jedan od razloga koji dovodi do nestanka biološke raznolikosti. Pesticidi koji se koriste u proizvodnji hrane imaju štetne posljedice i mogu dovesti do izumiranja čitavih vrsta : ptica, sisavaca, vodozemaca i kukaca, uključujući i pčele koje su od iznimne važnosti za globalnu proizvodnju hrane jer oprašuju tri četvrtine svih usjeva. Što se više hrane proizvodi i baca, to je veći utjecaj na biološku raznolikost. Smanjenjem prehrambenog otpada smanjuje se potreba za primjenom pesticida i dodatnim poljoprivrednim zemljištima čime se ostavlja više prostora za prirodne ekosustave. Budući da živimo u dobu 6. velikog izumiranja pri čemu je poljoprivreda vodeći uzročnik gubitka bioraznolikosti očuvanje životinjskih vrsta trebalo bi biti u interesu cijele ljudske populacije (www.ceip.hr).

1.1.3. Potencijal primjene otpada hrane

S obzirom da otpad od hrane predstavlja ozbiljan i rastući ekološki problem potrebno je pronaći održive načine njegove valorizacije što uključuje i iskorištavanje otpada kao izvora bioaktivnih tvari i stvaranja proizvoda s dodanom vrijednošću. Otpad od hrane često je bogat biološki vrijednim spojevima kao što su polifenoli, karotenoidi, prehrambena vlakna, ugljikohidrati i proteini. Ove bioaktivne molekule imaju golem potencijal da se koriste kao funkcionalna hrana, nutraceutici, u farmaceutske svrhe te kao kozmeceutici (Arun i sur., 2020; Lai et al., 2017. ; Sath i sur., 2018).

Dakle može se zaključiti kako je otpad od hrane, bilo biljnog ili životinjskog podrijetla, vrijedan izvor bioaktivnih molekula i biopolimera. Njegovo adekvatno iskorištavanje kao sekundarne sirovine može smanjiti troškove i ekološki otisak proizvodnje te smanjiti količinu i ekološki otisak otpada. (Arun i sur., 2020).

1.1.4. Prirodni bioaktivni spojevi iz otpada hrane

Jedna od najprihvaćenijih definicija bioaktivnih spojeva je da su to prirodni ili sintetski spojevi sa sposobnošću interakcije s jednim ili više procesa u živom organizmu što može rezultirati širokim rasponom bioloških učinaka (Vilas-Boas i sur., 2021). Bioaktivni spojevi iz hrane imaju sposobnost moduliranja različitih metaboličkih procesa te pokazuju antioksidativne, antikancerogene i imunomodulatorne učinke.

Postoje dvije glavne skupine bioaktivnih spojeva u hrani, esencijalni i neesencijalni. Esencijalni nutrijenti uključuju vitamine i minerale koji su nužni za održavanje specifičnih biokemijskih procesa u organizmu dok u neesencijalne bioaktivne spojeve hrane ubrajamo polifenole (flavonoide), karotenoide, fitosterole, glukozinolate, saponine, alkaloidne, eterična ulja i ostale koji nisu nužni za funkcioniranje orgnizma, ali pokazuju poželjne biološke učinke te doprinose optimalnom zdravlju stanica i tkiva direktnim učincima i pojačavanjem djelovanja esencijalnih hranjivih tvari (Garcia i Raghavan, 2021). Iako su sintetski bioaktivni spojevi odobreni u mnogim zemljama za primjenu u prehrambenoj industriji, potrošači su im sve manje i manje skloni. Stoga postoji sve veći interes za zamjenu ovih sintetskih spojeva prirodnim bioaktivnim spojevima. Ovi prirodni spojevi mogu se koristiti kao prehrambeni aditivi, dodaci prehrani ili nova hrana (Vilas-Boas i sur., 2021).

Poseban fokus recentnih istraživanja stavljen je na otpad od voća i povrća budući da nastaje u velikim količinama, a bogat je različitim vrstama nutritivno vrijednih spojeva. Aktualni trendovi u prehrambenoj industriji i stalna potraga za zdravim proizvodima sugeriraju da je interes potrošača za prirodnom i visokokvalitetnom hranom sve veći. Štoviše, svjetska zdravstvena kriza izazvana COVID-19 preusmjerila je trenutni stav potrošača, percepciju i obrasce ponašanja na smanjenje bacanja hrane. Stoga je afinitet potrošača prema prirodnim bioaktivnim spojevima dodatno porastao u proteklim godinama, posebice zbog svijesti potrošača o dokazima da pravilna i uravnotežena prehrana ima pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Ipak, ponovno uvođenje oporavljenog poljoprivredno-prehrambenog otpada u prehrambeni lanac kompleksno je i suočava se s mnogim izazovima koji uključuju imperativ osiguravanja sigurnosti (zdravstvene ispravnosti) i biološke stabilnosti. Zbog toga se ti sastojci ubrajaju u kategoriju tzv. nove hrane koja mora biti podvrgnuta opsežnim sigurnosnim procjenama koje se mijenjaju u skladu s različitim zakonodavstvima različitih zemalja (Vilas-Boas i sur., 2021).

1.1.4.1. Zakonska regulativa

1.1.4.1.1. Europska unija

Opći zakon o hrani (*eng. General Food Law, GFL*), europski je regulatorni okvir za hranu koji ima za cilj osigurati maksimalnu razinu zaštite zdravlja ljudi i interesa potrošača dok utvrđuje ispravno funkcioniranje unutarnjeg europskog tržišta za hranu i hranu za životinje. GFL je također temeljna uredba Europske agencije za sigurnost hrane (*eng. European Food Safety Agency, EFSA*) koja pruža znanstvene savjete i tehničku podlogu za sve europske zakone i politike u vezi s pitanjima sigurnosti hrane i hrane za životinje. Uredba Europske zajednice 178/2002 i smjernice Codex Alimentarius-a¹ reguliraju upotrebu otpada hrane i nusproizvoda kao sastojaka hrane ili prirodnih dodataka hrani. Stoga, kada se nusproizvodi hrane predlažu za korištenje kao prirodni dodaci, a ne odgovaraju važećim propisima, moraju dobiti odgovarajuće odobrenje kao nova hrana prema Uredbi Europske zajednice 258/97. Uredba o novoj hrani (*eng. Novel Food Regulation, NFR*) imala je posebnu stavku 2015/2283 koja se bavi hranom i sastojcima hrane koji se prije 15. svibnja 1997. nisu koristili u ljudskoj prehrani. Nova hrana mora proći procjenu sigurnosti, a zahtjev mora biti u skladu s Preporukom Europske zajednice 97/618. Kada nova prehrambena tvar nije uključena u popis sastojaka od 15. svibnja 1997., preporučuje se da se uključi u priloge Direktive o hrani za posebne prehrambene potrebe, Direktive o dodacima prehrani i Uredbe o obogaćenoj hrani te to treba podnijeti Europskoj komisiji, Glavnoj upravi za zdravlje i sigurnost hrane. EFSA je 2009. godine objavila smjernice pod nazivom "Procjena sigurnosti botaničkih proizvoda i botaničkih pripravaka namijenjenih za upotrebu kao dodataka prehrani". Ove su se smjernice usredotočile na botaničke pripravke namijenjene za upotrebu u dodacima prehrani, ali su primjenjive i u drugim područjima prehrane. Sigurnosna procjena uzima u obzir identifikaciju i prirodu izvornog materijala koji uključuje dio biljke (sjeme, lišće i druge bioproizvode), proces proizvodnje (metoda ekstrakcije, korištena otapala) za dobivanje botaničkih pripravaka i kemijsku karakterizaciju sastojaka. Bioaktivni spojevi mogu ući na tržište kao dodaci hrani za poboljšanje tehnologije i senzorne funkcije (prehrambeni aditivi), kao dodatak prehrani ili kao funkcionalna hrana. Različite primjene podrazumijevat će različite propise koje treba slijediti. Postupak odobravanja

¹ Codex Alimentarius (lat. "knjiga zakona o hrani") je zbroj međunarodno priznatih standarda, pravila postupanja, smjernica i drugih preporuka vezanih uz hranu, proizvodnju hrane i sigurnost hrane za uporabu. Prihvaćen je i u Hrvatskoj

prehrambenih aditiva utvrđen je Uredbom Europske komisije br. 1331/2008, a sigurnost regulira EFSA koja na temelju tih podataka procjenjuje razinu ispod koje se unos tvari može smatrati sigurnim, takozvani prihvatljivi dnevni unos (*eng. Acceptable Daily Intake ADI*). Nakon prihvaćanja povjerenstvo daje prijedlog za eventualno ovlaštenje aditiva i predaje ga na glasovanje Stalnom odboru za prehrambeni lanac i zdravlje životinja kojemu prethodi predstavljanje Vijeću i Europskom parlamentu. Međutim, prijedlog se još uvijek može odbiti ako nije u skladu s uvjetima zakonodavstva Europske unije (Vilas-Boas i sur., 2021).

1.1.4.1.2. Sjedinjene Američke Države

Iskorištavanje prehrambenog otpada u SAD-u regulirano je djelovanjem Uprave za hranu i lijekove (*eng. Food and Drug Administration, FDA*) kao glavnog organa savezne vlade odgovornog za osiguravanje sigurnosti hrane i provedbu Saveznog zakona o hrani, lijekovima i kozmetici (*eng. Federal Food, Drug and Cosmetic Act, FFDC*) te Zakona o javnozdravstvenoj službi (*eng. Public Health Service Act, PHSA*). Identifikacija i prevencija fizičkih, bioloških ili kemijskih opasnosti koje mogu predstavljati rizike za ljudsko zdravlje kontrolira se konceptom Analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (*eng. Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP*). Mogućnosti iskorištavanja bioaktivnih sastojaka iz otpada kao sastavnica funkcionalne hrane ili dodataka prehrani ograničene su, prvenstveno zbog sigurnosnih aspekata.

Sastojci koji se koriste kao funkcionalna hrana trebaju ispunjavati sve zahtjeve opisane za konvencionalnu hranu u FFDC. Dodaci prehrani u SAD-u mogu sadržavati vitamine, minerale, biljke, aminokiseline te različite metabolite i ekstrakte. Svi sastojci dodataka prehrani koji su stavljeni na tržište prije provedbe Zakona o zdravlju i obrazovanju o dodacima prehrani iz 1994. (*eng. Dietary Supplement Health and Education Act, DSHEA*) smatraju se sigurnima i mogu se koristiti. Međutim, nakon tog datuma sastojci koji su lansirani smatraju se novim sastojcima i mora ih ocijeniti Uprava za hranu i lijekove. Novi prehrambeni sastojci moraju sadržavati samo sastojke koji su prisutni u zalihama hrane i nisu kemijski promijenjeni te također imaju povijest uporabe i dokaze o sigurnosti (Vilas-Boas i sur., 2021).

1.1.4.2. Sigurnost primjene spojeva iz otpada hrane u proizvodnji hrane - kontaminanti

Iskorištavanje bioaktivnih spojeva iz otpada hrane bitno je ograničeno zbog velikog rizika kontaminacije pri čemu se kao najčešći kontaminanti spominju ostaci pesticida, mikotoksini, ostale mikrobiološke kontaminacije, teški metali i biogeni amini. Stoga je nužno provesti provjeru zdravstvene ispravnosti sirovine i dobivenih ekstrakata prilikom provjere je li otpad hrane zapravo prikladan za ekstrakciju bioaktivnih molekula.

Kako bi se suzbilo štetno djelovanje nametnika tijekom uzgoja usjeva koriste se pesticidi. Biljni nusproizvodi koji su tretirani pesticidima mogli bi potencijalno uzrokovati probleme jer se ekstrakti dobiveni iz tih nusprodukata više neće smatrati „prirodnim” proizvodom. Prema zakonodavstvu Europske unije, EFSA je odgovorna za godišnje izvješće o analizi količine pesticida u hrani na europskom tržištu. Prilikom nabave izvornog materijala treba spriječiti kontaminaciju pesticidima, budući da i vrlo niske razine ostataka pesticida u sirovini mogu stvarati sigurnosnu i zakonsku prepreku iskorištavanju tog materijala. Odabir otapala kao što su npr. n-heksan i acetonitril za postupke ekstrakcije od velike je važnosti jer mogu selektivno otopiti, pa čak i koncentrirati pesticide. Drugi važan kontaminant koji se mora kontrolirati su mikotoksini. To su gljivični sekundarni metaboliti koji su široko rasprostranjeni diljem svijeta u mnogim vrstama hrane i stočne hrane. Najmanja mikro-gljivična infestacija biljaka može dovesti do kontaminacije mikotoksinima, zadržavajući se u konačnim proizvodima što može ugroziti njihovu upotrebu za proizvodnju visokokvalitetnih dodataka prehrani i sigurnost njihove konzumacije. Među svim mikotoksinima, aflatoksini, ohratoksin A, deoksinivalenol i zearalenon privukli su veliku pozornost zbog svoje visoke učestalosti i teških učinaka na zdravlje ljudi i životinja. Neki od štetnih učinaka mikotoksina na zdravlje ljudi uključuju učinke poput kancerogenih, genotoksičnih, hepatotoksičnih, teratogenih, estrogenih, imunosupresivnih, nefrotoksičnih ili neurotoksičnih. Ne postoje propisana ograničenja za razine mikotoksina u biljnim dodacima prehrani, međutim, maksimalne zakonske granice za pojedine mikotoksine u hrani određene su Uredbom Europske unije 1881/2006. Samo su dva mikotoksina bila obuhvaćena zakonodavstvom kada je riječ o biljkama - aflotoksini i okratoksin A. Može se zaključiti kako je još uvijek potrebna procjena izloženosti jer postoji samo nekoliko studija na ovu temu. Mnoge vrste otpadnog materijala još uvijek sadrže veliki broj mikroba koji dovode do razgradnje proteina što rezultira stvaranjem jakih mirisa. Također, u mnogim vrstama poljoprivredno-prehrambenog otpada još uvijek su prisutni aktivni enzimi koji ubrzavaju ili intenziviraju reakcije povezane s kvarenjem. Još jedan od problema prilikom

iskorištavanja otpada hrane je visoka aktivnost vode u istome. Količina raspoložive vode određuje hoće li mikroorganizam rasti ili preživjeti. Plijesni su dobro prilagođene uvjetima niske vlažnosti, dok će druge proizvesti spore ili ući u stanje preživljavanja sve dok vlaga ne bude dovoljno visoka za djelovanje bakterija. Također, do kontaminacije poljoprivrednih proizvoda ili nusproizvoda može doći primjenom kontaminiranih gnojiva, posebno životinjskog podrijetla djelovanjem patogena koji se prenose hranom (npr. *Salmonella* spp. i *E. coli*).

Onečišćenja metalima (npr. olovo, živa, arsen i kadmij) posebno su uznemirujuća zbog njihove redovite prisutnosti u dodacima prehrani unatoč tome što izazivaju veliku toksikološku zabrinutost. Jedan primjer su rižine mekinje koje se koriste kao dodatak zdravoj prehrani, a ipak sadrže razine anorganskog arsena koji se smatra kancerogenim (~1 mg/kg suhe tvari). Još jedan od izazova u pitanjima sigurnosti predstavljaju i biogeni amini. Biogeni amini su bazični dušikovi spojevi nastali uglavnom dekarboksilacijom aminokiselina ili aminacijom i transaminacijom aldehida i ketona. Mogu imati neželjene zdravstvene učinke kod ljudi koji uključuju osip, edeme, glavobolje, hipotenziju, povraćanje, palpitacije, proljev i probleme sa srcem. Nalaze se u širokom spektru namirnica bogatih proteinima biljnog ili životinjskog podrijetla kao što su mliječni proizvodi, meso, riba i alkoholna pića te predstavljaju markere svježine hrane i pokazatelji su neadekvatnih uvjeta obrade i skladištenja hrane.

Jedna od alternativa s, mogućnošću industrijske primjene, za uklanjanje kontaminanata iz ekstrakata dobivenih iz sekundarnih sirovina su membranski procesi kao što su mikrofiltracija, ultrafiltracija i nanofiltracija. Navedeni postupci mogu se koristiti za obnavljanje, odvajanje i frakcioniranje specifičnih bioaktivnih spojeva, posebno iz otpadnih voda. Predloženi su integrirani procesi mikrofiltracije nakon kojih slijedi ultrafiltracija za dobivanje fenolnih spojeva kao što su npr. klorogenična kiselina i apigenin-7-O-glukozid iz otpadnih voda artičoka te hidrositiosol, prokatehinska kiselina, tirosol, kafeinska kiselina i p-kumarinska kiselina iz otpadnih voda koje zaostaju nakon prerade masline. Najučinkovitiji način za kontrolu prisutnosti mikotoksina u sirovini je sprječavanje rasta gljivica i proizvodnje mikotoksina. Kako bi se to postiglo moraju se primijeniti tehnike dobre poljoprivredne prakse na terenu koje uključuju kontrolu žetve i uvjeta skladištenja poboljšanim metodama poput kontrolirane atmosfere, kao i kontrole drugih fizičkih metoda kao što su čišćenje, mljevenje itd. Za uklanjanje bakterijskih kontaminacija i kontrolu mikotoksina često se koriste neke od strategija kao što su toplinska obrada i ionizirajuće zračenje, no takve tehnike mogu ugroziti kvalitetu konačnog proizvoda.

Uspostava HACPP-a učinkovita je strategija za prevenciju, kontrolu i periodično praćenje mikotoksina u svim fazama od polja do potrošača (Vilas-Boas i sur., 2021).

1.1.4.3. Sigurnost primjene spojeva iz otpada hrane u proizvodnji hrane – toksičnost bioaktivnih sastavnica

Prije nego što se bioaktivni spojevi iz otpada hrane plasiraju na tržište mora se ispitati i njihova potencijalna toksičnost. Glavna svrha provođenja testova toksičnosti prehrambenih aditiva, nutraceutika ili dodataka prehrani je pružiti što više informacija o klinički značajnim promjenama biomarkera koji mogu upućivati na bolest odnosno histopatološke promjene u organima i tkivima nakon akutne ili produljene izloženosti ispitivanim spojevima. Toksikološka ispitivanja obavezna su u svim procjenama sigurnosti, bez obzira na zemlju i zakone koji su u njima na snazi. U zemljama Europske unije toksikološka procjena praćena je smjernicama EFSA-e. Ove su smjernice izrađene kako bi se izvršila procjena sigurnosti novih prehrambenih aditiva, vitamina i minerala, dodataka prehrani i biljnih proizvoda te slijede pristup ispitivanja razine toksičnosti koji je predložen za prehrambene aditive 2012. godine. Smjernice EFSA-e koriste višeslojni pristup, odnosno sekvencijsku strategiju testiranja, gdje se ono dijeli u tri skupine. Prva skupina (razina 1) uključuje analizu osnovnih podataka potrebnih za sve spojeve. Glavni cilj testova razine 1 je utvrditi stabilnost i bioraspoloživost spojeva ili produkata razgradnje iz gastrointestinalnog trakta putem validiranih modela, uključujući mikrobiotu crijeva (uzimajući u obzir *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* modele apsorpcije i bioraspoloživosti). Druga skupina (razina 2) provodi se korištenjem *in vivo* studija na animalnim modelima i obvezna je za spojeve koji se apsorbiraju i pokazuju *in vitro* toksičnost ili genotoksičnost u gastrointestinalnom sustavu, tj. spojeve koji su pozitivni u testovima razine 1. Na kraju slijedi razina 3 koja je obvezna u slučaju da ispitivanja razine 2 pokažu bioakumulaciju, *in vivo* genotoksičnost i kroničnu toksičnost ispitivanih spojeva. U tom će slučaju biti potrebne toksikokinetičke studije s ponavljanim dozama na životinjama. Također, na ovoj razini potrebno je analizirati svaki pojedinačni slučaj uzimajući u obzir sve dostupne podatke. Razina 3 može uključivati i specifična testiranja neurotoksičnosti, imunotoksičnosti i endokrinih učinaka. Dakle, svi spojevi podliježu analizi osnovnih potrebnih testova (razina 1) i ovisno o rezultatima možda će trebati daljnje testiranje. Višeslojni pristup osmišljen je za procjenu četiri ključna područja: toksikokinetike, toksičnosti (kronične, subkronične, karcinogene) te

genotoksičnosti, reproduktivne- i razvojne toksičnosti. Genotoksičnost procjenjuje učinak tvari na DNA. Poznato je da su genetske modifikacije i zametne stanice povezane s teškim zdravstvenim stanjima kao što su degenerativne bolesti i rak, a javljaju se i pri niskim razinama izloženosti. Nadalje, promjene na deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) mogu izazvati pobačaje, neplodnost i/ili nasljedna oštećenja. Uzimajući u obzir štetne posljedice genetskog oštećenja na ljudsko zdravlje, genotoksičnost i mutageni potencijal osnovne su komponente procjene rizika. Amesov test često je korišten u testovima genotoksičnosti, a našao je primjenu i u dokazivanju nemutagenosti tri već komercijalizirana nutraceutika koji su dobiveni iz komine grožđa, vinove loze i ekstrakta jabuke te predstavljaju prirodne ekstrakte bogate polifenolima (Ribeiro i sur., 2021).

U SAD-u, FDA daje smjernice za toksikološko ocjenjivanje prehrambenih aditiva. Potrebni sigurnosni podaci definirani su konceptom razine zabrinutosti koji se procjenjuje uzimajući u obzir potencijalni unos aditiva kod ljudi i njegovu molekularnu strukturu. Rezultati toksikoloških studija zatim se koriste za izračun prihvatljivog dnevnog unosa (*eng. Acceptable Daily Intake, ADI*) koji se zatim uspoređuje s vrijednostima procijenjenog dnevnog unosa (*eng. Estimated Daily Intake, EDI*); ako je procijenjeni dnevni unos manji od prihvatljivog dnevnog unosa, prehrambeni aditiv je siguran pod tim uvjetima. Razina očekivane toksičnosti spoja dodjeljuje se na temelju njegove molekularne strukture (niska (A), srednja (B) ili visoka (C)) te procjene kumulativne izloženosti ljudi. Primjeri spojeva kategorije A uključuju masti, masne kiseline, ketone, estere, monocikličke ugljikovodike, kiseline i ljudske metabolite ugljikohidrata i lipida. Kategorija B uključuje anorganske soli željeza, bakra, cinka, aminokiselina i proteina. Kategorija C uključuje amide i imine, policikličke aromatske ugljikovodike, spojeve s nitro, N-nitrozo, azidnim i purinskim skupinama. Koncept razine zabrinutosti može biti niski (I), srednji (II) ili visoki (III) ovisno o procjeni toksikološke sigurnosti spoja. Prehrambeni aditivi iz razine zabrinutosti I trebaju imati provedenu kratkoročnu studiju hranjenja na određenoj vrsti glodavaca u trajanju od najmanje 28 dana i kratkoročni test potencijala genetskih mutacija. Razina zabrinutosti II zahtijeva prethodni test za razinu zabrinutosti I plus testiranje u 90-dnevnoj studiji hranjenja na vrstama glodavaca i neglodavaca, studiju višegeneracijske reprodukcije s fazom razvojne toksičnosti i studije metabolizma/farmakokinetike. Aditivi koji pripadaju razini zabrinutosti III zahtijevaju opsežnije ispitivanje, uz studije na dvije vrste glodavaca, i kroničnu studiju hranjenja od najmanje 1 godine na vrstama koje nisu glodavci.

Većina studija za ispitivanje toksičnosti i u zemljama Europske unije i u SAD-u provodi se pomoću metoda opisanih u Organizaciji za ekonomsku suradnju i razvoj (*eng. The*

Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD). Ove metode su međunarodno uspostavljene smjernice za ispitivanje s ciljem procjene učinaka kemikalija na ljudsko zdravlje i okoliš te se trebaju temeljiti na dobroj laboratorijskoj praksi (Vilas-Boas i sur., 2021).

1.1.5. Otpad rajčice

Prema podacima FAO (2019), velik dio otpada hrane dolazi od voća i povrća te čini čak 0,5 milijardi tona godišnje od 1,3 milijarde tona ukupnog otpada. Voće i povrće predstavlja lako kvarljivu hranu pa samim tim često završi kao otpad. To se može objasniti činjenicom da se voće i povrće obično proizvodi u prevelikim količinama i neodgovorno koristi te lako postaje otpad. Otpad koji nastaje od voća i povrća čine sjemenke, jezgra, kora, vinova loza, ljuska, komina, koštice i mahune. U većini voća i povrća jede se samo meso ili pulpa, međutim, velike količine fitokemikalija i hranjivih tvari i dalje su prisutne upravo u otpadnim frakcijama. Takav otpad bogat je već spomenutim bioaktivnim spojevima kao što su karotenoidi, alkaloidi, glukozinolati, flavonoidi i fenolne kiseline koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje te posjeduju antioksidativna, protuupalna, antikancerogena svojstva i sposobnost moduliranja metaboličkih procesa. Ovi se spojevi mogu ekstrahirati iz otpada hrane različitim tehnikama ekstrakcije, a zatim se ekstrahirani spoj može koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji. Zbog svega navedenog upravo se otpad od voća i povrća našao u središtu interesa budući da čini veliku količinu ostataka u lancu opskrbe hranom i bogat je različitim vrstama spojeva koji se mogu koristiti u brojne svrhe (Garcia i Raghavan, 2021).

Rajčica je jedna od najraširenijih i najrasprostranjenijih povrtnih kultura porijeklom iz Južne Amerike. Rajčice se konzumiraju svježe i prerađuju u široku paletu industrijskih proizvoda kao što su paste, sokovi, juhe, džemovi, umaci i drugo (Stajčić i sur., 2015). S obzirom na svoj mineralni i nutritivni sastav, rajčica se smatra visokovrijednom i nutritivno bogatom namirnicom, a istraživanja pokazuju da redovita konzumacija ove namirnice može spriječiti i/ili djelovati na određene ljudske bolesti (Laranjeira i sur., 2022). Rajčica je važan izvor spojeva s priznatim pozitivnim učincima na zdravlje ljudi, poput smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti, tumora probavnog trakta, upalnih procesa, kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, dijabetesa i pretilosti. Ta su svojstva povezana s prisutnošću hidrofilnih (uglavnom

askorbinske kiseline i fenola) i lipofilnih antioksidansa, uključujući karotenoide (uglavnom likopen i β -karoten) i vitamin E (Raiola i sur., 2015). Zbog svega navedenog rajčica dobiva sve veći značaj u ljudskoj prehrani. Industrija rajčice raste diljem svijeta, postigavši ukupnu proizvodnju od preko 182 milijuna tona u 2018. godini. Prema posljednjim dostupnim podacima, Kina je nositelj većine globalne proizvodnje rajčice, a slijede je Sjedinjene Američke Države (Laranjeira i sur., 2022). U Europskoj uniji rajčica je povrće koje se najviše uzgaja, sa 17,9 milijuna tona proizvedenih u 2016. Prema EUROSTAT-u, od tog ukupnog broja, više od 10 milijuna tona je namijenjeno za preradu za proizvodnju paste od rajčice, umaka, pirea, kečapa ili konzervirane rajčice (Szabo i sur., 2018). Kao i većina velikih proizvodnih industrija, industrija rajčice suočava se s problemom otpada hrane. Činjenica da su rajčice posebno osjetljive na prisutnost vanjskih okolišnih faktora, kao što su visoka temperatura i vlaga, povećava ovaj problem. S druge strane, potreba da se osigura dovoljno svježih rajčica za konzumaciju i za preradu u druge proizvode u većini slučajeva dovodi do prekomjerne proizvodnje, a time i više ostataka. Također, važno je napomenuti da frakcije rajčice odložene u okoliš i neubrane rajčice koje ostanu na poljima mogu dovesti do već spomenute opasnosti za okoliš. Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država (*eng. Environmental Protection Agency, EPA*) procijenila je da se oko 31% svih svježih rajčica koje se konzumiraju u kućanstvu baci u SAD-u. To predstavlja otprilike 21 rajčicu po osobi svake godine (Laranjeira i sur., 2022).

Utvrđeno je da su ljuska i sjemenke rajčice bogat izvor antioksidativnih spojeva, stoga uklanjanje kožice i sjemenki rajčice tijekom prerade rezultira značajnim gubitkom ovih antioksidansa i njihovih potencijalnih zdravstvenih prednosti. Količina otpada koja nastaje tijekom prerade rajčice, u kombinaciji s potencijalno korisnim karakteristikama komponenti otpada, opravdava sve veći interes istraživača i proizvođača za ekstrakciju karotenoida i ostalih bioaktivnih spojeva iz otpada od rajčice (Stajčić i sur., 2015).

Glavninu otpada rajčice čine bačene rajčice i komina rajčice. Komina rajčice je izvor proteina, masti i prehrambenih vlakana. Prehrambena vlakna obično se definiraju kao polisaharidi biljnog podrijetla koji su neprobavljivi i ne apsorbiraju se u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Unatoč tome što nemaju stvarnu nutritivnu vrijednost, prehrambena vlakna važna su za ljudsko zdravlje jer djeluju na prevenciju gastrointestinalnih poremećaja i srčanih bolesti. Topljiva vlakna smanjuju razine LDL kolesterola kod pacijenata s hiperkolesterolemijom, dok netopljive frakcije pozitivno utječu na peristaltiku crijeva. Neka prehrambena vlakna mogu hraniti „dobre“ bakterije djelujući kao prebiotici. Suha komina rajčice obično sadrži oko 12%

masti, 20% proteina i 30% sirovih vlakana (Laranjeira i sur., 2022). Općenito, komina rajčice, koja se sastoji od približno 60% sjemenki i 40% kore, koristi se kao hrana za stoku ili se baca na kontrolirana odlagališta stvarajući znatne troškove prijevoza što je štetno za okoliš i dovodi do gubitaka resursa (Szabo i sur., 2018).

Prosječno, komina rajčice na kraju procesa prerade predstavlja 3-5 % inicijalno upotrijebljenog sirovog materijala, a sastoji se od kore, sjemenki i pulpe koja ostaje nakon obrade. Unatoč tome što se ti nusproizvodi obično odbacuju, oni su još uvijek izvori obogaćeni hranjivim tvarima i vitaminima. Sjemenke i kore rajčice imaju drugačiji sastav. Kora je bogata karotenoidima (likopen i beta-karoten) te fenolnim spojevima, dok sjemenke sadrže uglavnom visokokvalitetne proteine (s visokim udjelom lizina). Ključni sastojak kore rajčice je likopen, a u kori rajčice također su identificirani i kvantificirani i fenolni spojevi s važnim biološkim djelovanjem poput kavene, ferulinske i klorogenske kiseline te kvercetina (Garcia i Raghavan., 2021). Pravilno odlaganje i iskorištavanje komine rajčice neizbježno je i od iznimne važnosti za prehrambenu industriju. Ako ju pravilno ne odlažemo, komina rajčice bit će podložna kvarenju zbog visokog sadržaja vode i hranjivih tvari, dok istovremeno racionalno iskorištavanje pretvara kominu u iskoristiv izvor bioloških spojeva (Lu i sur., 2019).

Otpribliže 60% ukupne komine rajčice čini frakcija sjemenki. Sjemenke rajčice pokazale su se kao zanimljiv izvor masti, poput palmitinske i oleinske kiseline te proteina koji sadrže veće količine lizina i treonina (Laranjeira i sur., 2022). Prosječni sadržaj proteina u komini rajčice je 21,9%, a u odmašćenom sjemenu rajčice 38,7%, što sugerira da odmašćeno sjeme rajčice ima hipokolesterolemijska svojstva i može se koristiti kao sastojak hrane za prevenciju kardiovaskularnih bolesti zbog značajnog sadržaja visokokvalitetnih biljnih proteina (Szabo i sur., 2018). Također se pokazalo da su sjemenke rajčice potencijalni izvor elemenata u tragovima poput natrija (Na), kalcija (Ca), magnezija (Mg) i kalija (K) koji su neophodni za ljudsko zdravlje jer održavaju tjelesnu homeostazu, tj. volumen krvi, količinu tekućine, pH razinu i pravilnu funkciju mišića, živaca, srca i mozga. Kora je izvor drugih aminokiselina kao što su valin, lizin i leucin. Osim toga, komina rajčice pokazala se izvorom mangana (Mn), željeza (Fe), bakra (Cu), cinka (Zn), naringenina i klorogenske kiseline (Laranjeira i sur., 2022).

Komina rajčice, bogat je izvor uljnih smola bogatih karotenoidima. Uljne smole su kombinacija pigmentata, masnih kiselina, masti, sterola i drugih spojeva koji se obično ekstrahiraju uzastopnim konvencionalnim metodama ekstrakcije otapalom.

Uljne smole obično sadrže koncentrate aroma i aktivnih frakcija te se brzo apsorbiraju u organizmu i djeluju kao snažni antioksidansi. Uljne smole rajčice su polukrute smjese lipofilne prirode sastavljene od eteričnog ulja i smola. Uljne smole likopena jedne su od najtraženijih, ne samo u prehrambenoj, već i u kozmetičkoj i farmaceutskoj proizvodnoj industriji.

Uljne smole rajčice obično se ekstrahiraju konvencionalnim organskim otapalom ili superkritičnom CO₂ ekstrakcijom. Ove tehnike ekstrakcije mogu se primijeniti samostalno ili u kombinaciji s drugim metodama. U kombinaciji s metodama ekstrakcije enzima, koje koriste pektinolitičke, celulolitičke ili bilo koje druge enzime koji omogućuju uništavanje stanične stijenke mogu se postići veći prinosi ekstrakcije uljne smole jer je aktivna frakcija biodostupnija nakon pucanja stanične stijenke.

Trenutno se uljne smole rajčice uglavnom koriste u prehrambenoj industriji. Njihov snažan antioksidativni kapacitet i pigmentacija čine ove uljne smole izvrsnim prirodnim dodacima hrani. U mesnoj industriji uljne smole rajčice su obično se koriste kao prirodno bojilo ili antioksidans. Dodavanje uljnih smola rajčice mesnim proizvodima omogućuje produženi rok trajanja, povećano crvenilo mesa i daljnje odgađanje promjene boje mesa, smanjenu oksidaciju lipida i stvaranje neugodnog okusa tijekom razdoblja skladištenja i hlađenja. Stoga uljne smole rajčice mogu djelovati kao prirodni aditiv za održavanje cjelovitosti i kvalitete mesnih proizvoda. Osim toga, uljne smole bogate likopenom djeluju kao učinkovit prehrambeni stabilizator za rafinirano maslinovo i suncokretovo ulje te pokazuju slično djelovanje kao i drugi uobičajeni dodani konzervansi protiv oksidacije ulja koja se prirodno događa tijekom razdoblja skladištenja. Dakle, ova uljna smola može se koristiti kao prirodni konzervans, stabilizator i farmaceutski aktivan spoj (Laranjeira i sur., 2022).

Osim komine rajčice ostale frakcije koje treba uzeti u obzir su zelene rajčice (koje nisu ubrane), te lišće i korijenje. Zelene rajčice bogate su glikoalkaloidima poput tomatina. Tomatin se sastoji od dvije molekule: α -tomatina i dehidrotomatina koje se nakupljaju u svakom organu biljke rajčice. Sazrijevanjem rajčice sadržaj ovih dviju molekula u plodu značajno opada. Mnoga su istraživanja opisala potencijalne učinke tomatina za ljudsko zdravlje - pokazalo se da tomatin pokazuje antioksidativna, protuupalna, antibiotska i antifungalna svojstva. Također su dokazani imunomodulirajući i kardiovaskularni učinci. Osim toga, dokazano je da tomatin inhibira rast velikog broja stanica raka, poput debelog crijeva, dojke, pluća i prostate (Laranjeira i sur., 2022).

1.2. Nutraceutici

Nutraceutici su tvari koje su hrana ili dio hrane i pružaju zdravstvene dobrobiti sprječavanjem ili liječenjem bolesti. Pojam "nutraceutik" uveo je S. DeFelice ranih 80-ih godina te ga je brzo usvojila zajednica dodataka prehrani. Prema DeFeliceovoj definiciji, nutraceutici mogu varirati od izoliranih hranjivih tvari, dodataka prehrani i posebnih dijeta do genetski modificirane hrane, biljnih proizvoda i prerađene hrane kao što su žitarice, juhe i pića. Ova se definicija odnosi na sve kategorije hrane i dijelova hrane, u rasponu od dodataka prehrani kao što je folna kiselina, koja se koristi za prevenciju spine bifide, do pileće juhe, koja se uzima za ublažavanje tegoba od prehlade.

Ova definicija također uključuje bioinženjersku dizajnersku biljnu hranu, bogatu antioksidativnim sastojcima i stimulirajuću funkcionalnu hranu ili farmaceutsku hranu. Stoga se izraz nutraceutik odnosi na velik broj klasa tvari koje pripadaju kategorijama koje već podliježu različitim propisima. Ovo je također jedan od razloga zašto većina regulatornih tijela ne smatra nutraceutike dobro definiranom, homogenom skupinom proizvoda s vlastitim posebnim propisima.

Tržište nutraceutika se širi i trenutno uključuje funkcionalnu hranu (npr. probiotike, omega-3 masne kiseline, ionizirane soli, brendirano pšenično brašno), funkcionalna pića (mliječna i negazirana pića, sokove i pića od voća i povrća, biljne čajeve, sportska i energetska pića), dodatke prehrani (proteini i peptidi, vitamini, minerali), biljke (uključujući alge, gljive i fitokemikalije), masne kiseline i vlakna, kao i neke specifične proizvode za osobnu njegu. Vrijednost globalnog tržišta nutraceutika eksponencijalno je porasla u posljednjem desetljeću i očekuje se da će dosegnuti 302 300 milijuna dolara do 2022., u odnosu na 184 092 milijuna dolara 2015., sa ukupnom godišnjom stopom rasta od približno 7%.

DeFelice je podijelio nutraceutike na "potencijalne nutraceutike", tj. tvari koje potencijalno mogu pružiti određeno zdravlje ili dobrobit, i "utvrđene nutraceutike", za koje postoji dovoljno kliničkih podataka koji podupiru tvrdnje o zdravlju. Zdravstvene tvrdnje su u središtu većine marketinških aktivnosti, ali moraju biti potkrijepljene dobrim znanstvenim istraživanjima i kliničkim studijama koje trebaju odobriti regulatorna tijela. To je potaknulo i akademiju i industriju da pokrenu istraživačke napore s ciljem dokazivanja učinkovitosti određenih nutraceutika i dobivanja odgovarajućih zdravstvenih tvrdnji. Dok su se mnogi nutraceutici pokazali sigurnima i učinkovitim u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima, još uvijek postoji mnoštvo proizvoda na tržištu s neutemeljenim tvrdnjama. To je s pravom navelo zdravstvene

vlasti diljem svijeta da provedu regulatorna ograničenja za provjeru tvrdnji o učinkovitosti i sigurnosti, što mora biti potkrijepljeno opsežnim pretkliničkim i kliničkim istraživanjem i rigoroznim programima kontrole kvalitete. Europa, SAD, Kanada, Australija/Novi Zeland i Japan prednjače u inicijativi čiji je cilj uvođenje strogih kontrola i provjera dopuštenih zdravstvenih tvrdnji. Diljem svijeta ova je inicijativa široko prihvaćena i mnoge su druge zemlje uvele zakone s ciljem reguliranja uvođenja nutraceutika na tržište. Stoga je nakon 1990. broj publikacija koje izvješćuju o istraživanju nutraceutskih proizvoda eksponencijalno porastao, što se odražava i na pretraživanje u PubMedu (Cicero i Rizzo, 2021).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prehrambeno-prerađivačka industrija kontinuirano odlaže značajne količine otpada od hrane u okoliš od čega velik dio čini otpad voća i povrća. Klimatska kriza i kriza bioraznolikosti s kojima se čovječanstvo trenutno suočava zahtjevaju hitnu i temeljitu reorganizaciju sustava opskrbe hranom što između ostalog uključuje i smanjenje stvaranja i odlaganja otpada hrane u okoliš.

S tim ciljem, velik broj istraživanja usmjeren je na razvoj učinkovitih i ekološki-prihvatljivih postupaka ekstrakcije biološki aktivnih sastavnica prisutnih u otpadu te istraživanju njihovih bioloških svojstava i mogućnosti primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

Ovaj diplomski rad daje pregled znanstvenih istraživanja o potencijalu primjene otpada rajčice kao sekundarne sirovine osobito u kontekstu primjene u razvoju nutraceutika i funkcionalne hrane.

Rezultati ovog istraživanja dat će kritički osvrt na mogućnosti i ograničenja u dobivanju bioaktivnih spojeva iz komine rajčice te mogućnosti njihove primjene u razvoju proizvoda dodane vrijednosti i njihovog povratka u industrijske lance primjenom koncepta kružnog gospodarstva.

3. MATERIJALI I METODE

Podaci potrebni za pisanje ovog teorijskog diplomskog rada prikupljeni su korištenjem pretraživača: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) i Google Scholar (<https://scholar.google.com/>) te mrežnih stranica različitih regulatornih agencija iz područja sigurnosti hrane/dodataka prehrani. Pretraživanje je provedeno u periodu od 29.04.2023. do 02.07.2023. korištenjem ključnih riječi *tomato*, *tomato waste*, *food waste*, *extraction*, *bioactive compounds*, *pectin*, *lycopene*, *nutraceuticals*, *pomace*, *peel*, *seeds*, *carotenoids*, *beta carotene*, *polyphenols*, *tomato byproducts* i njihovih kombinacija. Kao literaturni izvori korišteni su pregledni i originalni znanstveni radovi, znanstvene i stručne knjige.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karotenoidi rajčice

Karotenoidi su bioaktivni spojevi koji su u visokim koncentracijama prisutni u kori rajčice te posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti. To su pigmenti topljivi u lipidima koji se nalaze u kloroplastu i kromoplastu mnogih biljaka i daju im žutu, narančastu ili crvenu boju. U prirodi postoji oko 700 karotenoida različitih kemijskih struktura koji se mogu kategorizirati u dvije glavne skupine - spojevi bez kisika (alfa karoten, beta karoten i likopen) koji se nalaze u mrkvi, rajčici, narančama i bundevama te spojevi koji sadrže kisik (ksantofili - lutein, neoksantin i zeaksantin) i uglavnom ih nalazimo u tamnozelenom lisnatom povrću. Konzumacija karotenoida povezana je sa smanjenjem obolijevanja od raka i kardiovaskularnih bolesti te usporavanjem procesa starenja, primarno zahvaljujući njihovim antioksidativnim i protuupalnim učincima. Neki od ovih spojeva također imaju važnu biološku funkciju kao provitamini vitamina A (beta karoten, alfa karoten i beta kriptoksantin). Zbog navedenih blagotvornih svojstava mogu se koristiti kao nutraceutici u dodacima prehrani, i funkcionalnoj hrani ili kao bojila u prehrambenim proizvodima i kozmetici. (Garcia i Raghavan, 2021).

4.1.1. Likopen

Likopen je glavni karotenoid prisutan u rajčici, koji čini više od 80% ukupnih karotenoida rajčice u potpuno zrelih crvenih plodovima, gdje je odgovoran za njihovu karakterističnu boju (Stajčić i sur., 2015). Jedini izvor likopena je prehrana jer ljudsko tijelo ne može sintetizirati karotenoide. Shodno tome, primarni izvori likopena za ljude su rajčica i proizvodi na bazi rajčice, koji čine do 85% unosa (Szabo i sur., 2018). Likopen se najviše akumulira u kori rajčice s koncentracijom koja je tri do pet puta veća nego u svježem voću te približnim sadržajem od 0,88 do 4,2 mg/100 g, ovisno o sorti, zrelosti i načinu prerade (Garcia i Raghavan., 2021). Rajčice također sadrže umjerene količine alfa i beta karotena te luteina. Antioksidativna aktivnost likopena i drugih karotenoida povezana je s njihovom sposobnošću gašenja singletnog kisika i hvatanja peroksilnih radikala, a može se pojačati prisutnošću drugih bioaktivnih spojeva, poput ostalih karotenoida i vitamina, zbog sinergističkog antioksidativnog djelovanja.

(Stajčić i sur., 2015; Szabo i sur., 2018). Jedna od najvažnijih osobina likopena je učinkovita deaktivacija niza slobodnih radikala, poput vodikovog peroksida, dušikovog dioksida te tio i sulfonilnih radikala, kao i vrlo destruktivnih hidroksilnih radikala, lipidnog peroksi radikala i singletnog kisika.

Nedavne studije su pokazale da dnevna konzumacija proizvoda od rajčice značajno smanjuje oštećenje DNK uzrokovano tretiranjem Fe^{2+} i poboljšava zaštitu od UV zračenja i iona prijelaznih metala (Szabo i sur., 2018). Postoje brojna istraživanja koja pokazuju da je likopen snažniji hvatač reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) od mnogih drugih karotenoida i drugih antioksidansa, uključujući vitamin E, a konstanta brzine za gašenje singletnog kisika likopenom gotovo je dvostruko veća od one za beta karoten. Općenito, vjeruje se da više konjugiranih dvostrukih veza i otvaranje beta jononskog prstena povećavaju sposobnost gašenja singletnog kisika. Također, otkriveno je da karotenoidi inhibiraju rast nekoliko staničnih linija raka uključujući stanice raka prostate, pluća, dojke, dvije stanične linije raka debelog crijeva i stanice raka leukemije. Osim ovih svojstava, pokazalo se da likopen potiče međustaničnu komunikaciju i modulira hormone, imunološki sustav i druge metaboličke putove (Stajčić i sur., 2015). Teodoro i sur. (2012.) utvrdili su sposobnost likopena da inhibira staničnu proliferaciju, zaustavi stanični ciklus u različitim fazama i povećá apoptozu, uglavnom u linijama raka dojke, debelog crijeva i prostate. Navedena istraživanja sugeriraju da likopen djeluje na inhibiciju karcinogeneze putem nekoliko mehanizama, tj. uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta, poboljšavanjem sustava detoksikacije, supresijom progresije staničnog ciklusa, kao i modulacijom puteva prijenosa signala. Također, ovi podaci pokazuju da je antiproliferativni učinak likopena ovisan o staničnom tipu, vremenu i dozi (Stajčić i sur., 2015).

Potražnja za likopenom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji je velika. Prirodni likopen ekstrahira se iz cijelih rajčica koje se uzgajaju u tu svrhu, a komercijalno dostupan proizvod vrlo je skup, stoga je identifikacija odgovarajućih tehnologija za dobivanje likopena iz industrijskih nusproizvoda od velikog interesa (Szabo i sur., 2018).

4.1.1.1. Protuupalno i antikancerogeno djelovanje likopena

Likopen ispoljava svoju protuupalnu aktivnost kroz nekoliko mehanizama: smanjenje proupalnih citokina, kao što su IL-1, IL-6, TNF- α , i smanjenje drugih proupalnih medijatora, kao što je proizvodnja dušikovog oksida (NO), ekspresija inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i ciklooksigenaze 2 (COX-2). Drugi mehanizam djelovanja je smanjenje oksidativnog stresa čime se smanjuje ekspresija nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) te se na taj način inhibira ekspresija proupalnih citokina. Još jedan mogući put za smanjenje upale je kroz inhibiciju protein kinaze u makrofazima.

Upala je usko povezana s razvojem raka. Kada se akutna upala ne povuče, može doći do kronične upale, pri čemu se stvara odgovarajuće mikrokruženje s makrofagima, limfocitima, proupalnim citokinima, reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) te signalnim molekulama koje mogu aktivirati onkogene te oštetiti proteine i DNK igrajući na taj način važnu ulogu u razvoju raka, invaziji i stvaranju metastaza.

Studije antikancerogenog djelovanja likopena su pokazale da likopen jača endogenu obranu protiv oksidacijskog stresa tako što pojačava aktivnost katalaze, superoksid dismutaze ili čak glutation peroksidaze, omogućujući smanjenje reaktivnih kisikovih vrsta. Ovaj spoj je također modulirao razine već spomenutih proupalnih citokina [faktor nekroze tumora- α (TNF- α), IL1, IL6 i IL8], citokina uključenih u izbjegavanje imunološkog odgovora [transformirajući faktor rasta-beta (TGF- β) i IL10] i u proces angiogeneze kao što je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). Proupalna signalizacija također se smanjila nakon tretmana likopenom smanjenjem razine fosforilacije određenih proteina i putem supresije nekih onkogenih signala. Studije na ljudima otkrile su da je primjena likopena dobivenog iz rajčice povezana s nižim razinama faktora rasta inzulina (IGF-1) u plazmi koji predstavlja faktor rasta odgovoran za rast stanica raka. Osim toga, likopen iz rajčice povećao je serumske razine IGF veznog proteina (IGFBP) 1 i 2, što je smanjilo vezanje IGF-1 i 2 na odgovarajuće receptore, čime se spriječila aktivacija rasta stanica (Laranjeira i sur., 2022).

Rak pluća najčešći je rak u svijetu, s 13% ukupnih slučajeva dijagnosticiranih u 2012., a slijede ga rak dojke, debelog crijeva i prostate. Antitumorski učinci likopena istraživani su u studiji na tvorovima koji su bili izloženi dimu cigareta. Rezultati su pokazali da i visoke i niske doze likopena sprječavaju razvoj skvamozne metaplazije u tvorova (Liu i sur., 2003). Epidemiološka studija provedena na 332 ljudi s dijagnosticiranim rakom pluća i 865 kontrolnih subjekata pokazala je da ljudi s najvećim unosom kombinacije tri karotenoida (betakaroten, alfa-karoten

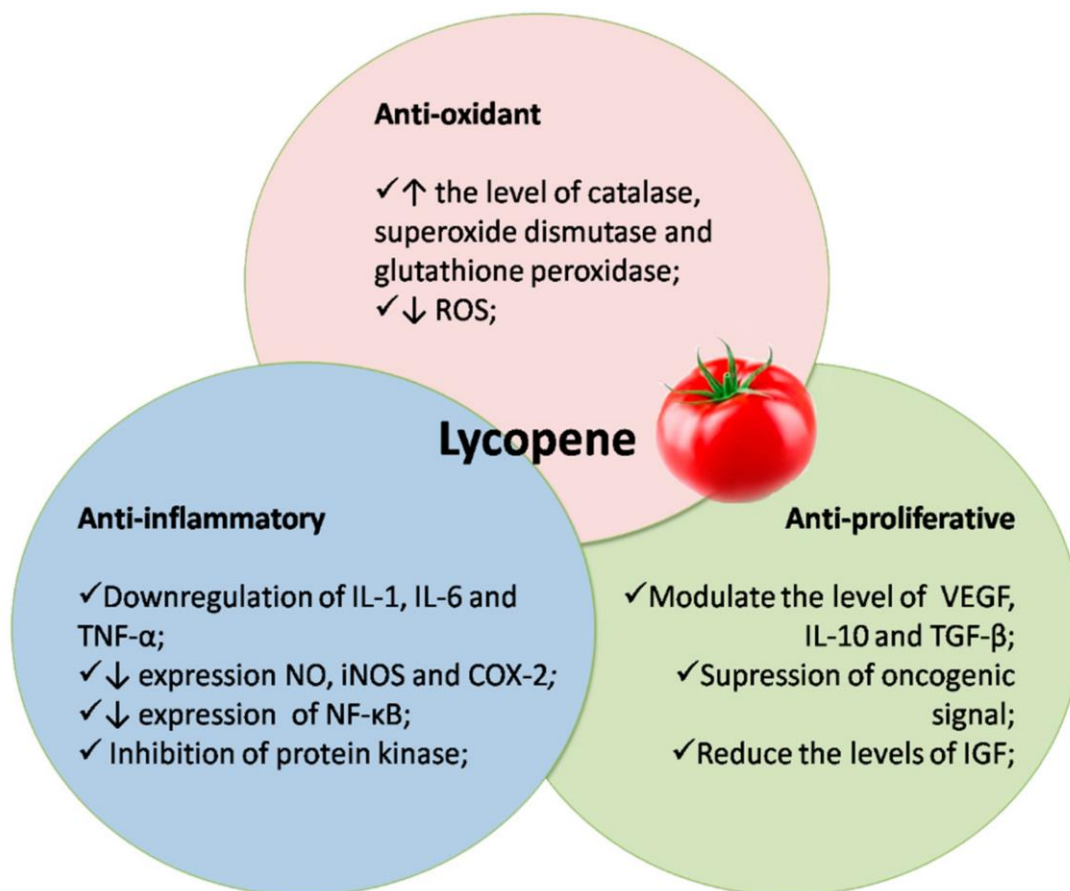
i lutein) imaju najmanji rizik od razvoja raka pluća. Ova studija je zaključila da osim likopena, drugi sastojci rajčice također mogu imati zaštitne učinke protiv raka pluća (Szabo i sur., 2018). Rak prostate je drugi vodeći rak u muškaraca. U dvije provedene studije utvrđeno je da je primjena likopena značajno smanjila razine prostata-specifičnog antigena u bolesnika s rakom prostate. Također, u leukocitima bolesnika s rakom prostate likopen je smanjio razinu 8-hidroksi-20-deoksigvanozina, markera oštećenja DNA.

U žena je rak dojke drugi vodeći rak. U populaciji s visokim rizikom od raka dojke, likopen je smanjio razinu slobodnog faktora rasta sličnog inzulinu. U studiji na pacijenticama s rakom dojke, likopen je spriječio neke od negativnih učinaka terapije na kožu, a razine likopena bile su u obrnutoj korelaciji s 8-hidroksi-20-deoksigvanozinom u mokraći (Laranjeira i sur., 2022). Nedavni pregled glavnih komponenti mediteranske prehrane (maslinovo ulje, crno vino i rajčice) otkrio je pozitivne učinke ove vrste prehrane na razvoj raka debelog crijeva. Rajčice, koje se smatraju središnjim dijelom mediteranske prehrane i glavnim izvorom likopena, mogle bi spriječiti kolorektalni rak. Učinci soka od rajčice i mrkve na gastrointestinalni lumen istraženi su kako bi se utvrdilo može li prehrana bogata karotenoidima modificirati relevantne procese u karcinogenezi debelog crijeva. Nakon dva tjedna konzumiranja sokova s visokim udjelom beta-karotena i likopena, u fecesu su otkrivene povećane razine karotenoida. Međutim, antikarcinogeni učinci ne mogu se pripisati samo ovim dvjema komponentama (Szabo i sur., 2018).

Što se tiče ublažavanja kroničnih bolesti povezanih s upalom, likopen se pokazao kao potencijalna alternativa farmakološkoj terapiji. Oralni lichen planus (OLP) česta je kronična upalna mukokutana bolest oralne sluznice nepoznate etiopatogeneze. Pokazalo se da likopen (iz prirodnog ekstrakta rajčice), kada se daje kroz meke gel kapsule pacijentima s erozivnim OLP-om otpornim na lokalne steroide, smanjuje razine 8-izoprostana u serumu. Taj se učinak očituje kao smanjenje veličine oralnih crvenih lezija i pretvaranje erozija i ulkusa u eritem ili njihov potpuni nestanak (Eita i sur., 2021). Kushwaha i sur. (2019) također su proveli kliničko ispitivanje u kojem su objavili da su kapsule likopena učinkovite u liječenju i prevenciji OLP lezija, no potrebno je provesti još istraživanja po tom pitanju.

Također, istraživano je i može li konzumacija hrane bogate likopenom zaštititi ljude od eritema izazvanog UV zračenjem. U tu svrhu, pasta od rajčice unosila se s maslinovim uljem. Pastu od rajčice (40 g), koja sadrži približno 16 mg likopena dnevno, 9 je dobrovoljaca konzumiralo s 10 g maslinovog ulja tijekom 10 tjedana. Do 10. tjedna konzumiranja paste od rajčice, razine likopena u serumu ispitanika su se povećale, a stvaranje eritema, koji je glavni pokazatelj reakcija na opekline od sunca, bilo je 40% niže. Uočen je visok stupanj zaštite od akutnih i

potencijalno dugoročnih aspekata fotooštećenja inhibicijom ultraljubičaste (UV) R-inducirane ekspresije matriksne metaloproteinaze 1 (MMP-1) u dermisu, smanjenjem kolagenolitičke aktivnosti i povećanjem sinteze kolagena. Također je primijećeno da antioksidans likopen može potaknuti potencijalni regenerativni odgovor na UV zračenje. Nedavno je dokazano i da kompleks hranjivih tvari rajčice bogat likopenom može štiti od UVA/B i UVA1 zračenja na molekularnoj razini (Laranjeira i sur., 2022). Mehanizmi antioksidativnog, protuupalnog i antiproliferativnog djelovanja likopena prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz glavnih mehanizama učinaka likopena kao biomolekule s protuupalnim, antikancerogenim i antioksidativnim učincima (preuzeto iz Laranjeira i sur., 2022).

4.1.2. Beta karoten

β -karoten još je jedan karotenoid odgovoran za karakterističnu narančastu boju voća i povrća te je drugi najzastupljeniji obojeni karotenoid u rajčicama i glavni karotenoid prisutan u sjemenkama rajčice. β -karoten se naširoko koristi u prehrambenoj industriji kao aditiv, posebno kao bojilo za hranu. Njegov glavni značaj za ljudsko zdravlje povezan je s antioksidativnim djelovanjem i činjenicom da je prekursor vitamina A (Laranjeira i sur., 2022). Pregradnja u vitamin A i vitamin A ovisni učinci kod ljudi najjasnije je dokazana funkcija beta-karotena.

Djelovanjem enzima likopen-beta-ciklaze, likopen se pretvara u beta-karoten uvođenjem beta jononskog prstena na oba kraja molekule. Kemijska struktura beta karotena prikazana je na Slici 3. Prehrambeni izvori beta karotena uključuju narančasto i svijetlozeleno povrće, a ovaj se spoj nalazi u visokim koncentracijama u mrkvi, naranči, kelju, špinatu, zelju repe, marelici i rajčici. Studija koju su proveli Kalogeropoulos i suradnici (2012) pokazala je da cijele rajčice sadrže niže količine beta-karotena ($86,1 \pm 4,4$ mg/kg) nego što se nalazi u njihovim nusproizvodima ($149,8 \pm 6,4$ mg/kg) koji se sastoje od ljuski i sjemenki rajčice (Szabo i sur., 2018).

Karotenoidi se sintetiziraju u biljkama i mikroorganizmima iz acetil-koenzima A. Prvi C-40 spoj iz skupine karotena je fitoen, koji se zatim može dehidrogenirati u druge acikličke karotenoide i konačno ciklizirati u karotene. Ciklički karoteni se zatim mogu oksidirati u hidroksilirane i epoksidne derivate, pretvoriti u alenske i manje zasićene derivate ili oksidativno cijepati u kraće produkte. Ovim posljednjim postupkom nastaje vitamin A; cijepanje karotenoida je do sada jedini poznati put nastanka vitamina A. On nastaje prvenstveno u životinjskom svijetu, iako ga stvaraju i neki mikroorganizmi.

Godine 1960. Glover je istraživao različite puteve kojima se karotenoidi mogu pretvoriti u vitamin A. Naznačio je da se mogu dogoditi dvije primarne oksidativne reakcije, jedna na središnjoj 15,15' dvostrukoj vezi (centralno cijepanje), a druga na jednoj ili više drugih dvostrukih veza (ekscentrično cijepanje). Produkt središnjeg cijepanja beta karotena bile bi dvije molekule retinala, dok bi produkt ekscentričnog cijepanja bio jedan dugi i jedan kratki β -apo-karotenal, npr. ciklocitral i β -apo-8'-karotenal, pucanjem 7':8' dvostruke veze. Na temelju eksperimentalnih podataka koji su pokazali da je nešto β -apo-karotenala nastalo iz β -karotena, kao i teoretskih argumenata, dao je prednost ekscentričnom mehanizmu cijepanja. Enzim β -karotenoid-15,15'-dioksigenaza djelomično je pročišćen iz crijeva nekoliko vrsta, a identificiran je u i nekoliko drugih organa. Ovaj enzim pretvara β -karoten u dvije molekule retinala te zahtijeva molekularni kisik, a inhibiran je reagensima koji vežu sulfhidril i agensima

za keliranje iona željeza. Većina karotenoida provitamina A, uključujući β -apo-karotenale, cijepa se na retinal pomoću ovog enzima. Iako su zabilježene neke kvantitativne razlike u relativnim stopama cijepanja ovih derivata i β -karotena, stvarne stope cijepanja su slične. Općenito, u odnosu na aldehidni oblik, β -apo-karotenoli su bolji supstrati dok su β -apo-karotenske kiseline lošiji supstrati za ovaj enzim. Retinal je jasno identificiran kao jedan produkt reakcije, ali drugi manji, polarniji fragment nije. Ovaj drugi produkt vjerojatno se oslobađa netaknut, ali nije isključeno postupno cijepanje. Maksimalna aktivnost ovog enzima kod kunića otprilike je 200 puta veća od one potrebne za ispunjenje nutritivnih potreba, ali je do 50% manja od onih za koje se očekuje da će izazvati znakove toksičnosti vitamina A, što je u skladu s općim nalazom da karotenoidi, čak i kada se daju u visokim dozama, ne uzrokuju hipervitaminozu A. β -karotenoid 15,15'-dioksigenaza crijeva utječe i sadržaj proteina u prehrani i status vitamina A. Aktivnost intestinalnog enzima smanjena je za približno 50% vrlo niskim (5%) unosom proteina. Ekscentrično cijepanje nedvojbeno se događa u biljkama i nekim mikroorganizmima, a moglo bi se pojaviti i kod sisavaca. Do sada, međutim, nijedna karotenoidna dioksigenaza sisavaca sa specifičnošću ekscentrične veze nije identificirana i karakterizirana.

Značajan dio vitamina A u ovim eksperimentima nastao je nekim drugim putem. Pretvorba β -karotena u β -apo-karotenal bila je niska (<2,4%), a samo vrlo mala količina (2-3%) primijenjenog, jednolično označenog β -karotena pretvorena je u ugljični dioksid. Doista, označeni retinal se također pretvorio u ugljični dioksid približno istom brzinom. Stoga je oksidacija u ugljični dioksid fragmenata nastalih u pretpostavljenoj postupnoj konverziji β -apo-karotenala u retinal bila mnogo manja od očekivane (Olson, 1989).

O doprinosu beta-karotena stvaranju vitamina A kod ljudi raspravljalo se detaljno i u preglednom radu Webera i Grunea (2012). Rezultati studije pokazali su da je teško utvrditi preporučeni unos hranom za postizanje optimalne apsorpcije vitamina A zbog različitih čimbenika koji utječu na biokonverziju i bioraspoloživost provitamin A karotenoida.

Nedostatak vitamina A dovodi do tisuća slučajeva sljepoće i uzrokuje visoke stope smrti dojenčadi. Jedna od glavnih strategija za sprječavanje deficita vitamina A u slabije razvijenim regijama je poboljšanje dostupnosti hrane koja sadrži vitamin A. U tom kontekstu, industrijski otpad predstavlja jeftin izvor bioaktivnih spojeva koji bi se mogli valorizirati za smanjenje problema povezanih s nedostatkom vitamina A (Szabo i sur., 2018).

nastaju kao posljedica okoliša bogatog slobodnim radikalima u plućima pušača. Mondul i sur. (2013) otkrili su da dodatak β -karotena ukazuje na indukciju enzima citokroma P450 CYP1A2 i CYP2E1. Budući da se nekoliko lijekova koji se koriste za kardiovaskularne bolesti metabolizira pomoću CYP1A2, interakcija β -karotena s propisanim lijekovima mogla je rezultirati povećanom smrtnošću. Ovi nalazi naglašavaju važnost povećanja našeg znanja o mogućim interakcijama između dodataka prehrani i lijekova.

Eliassen i sur. (2012) proveli su objedinjenu analizu osam kohortnih studija u kojima su procijenjeni karotenoidi u serumu i rizik od raka dojke. Ova je studija ukazala na smanjeni relativni rizik obolijevanja od raka dojke kod žena s višim karotenoidima u plazmi. Među karotenoidima rajčice, autori su pronašli niži relativni rizik za likopen, a zatim β -karoten.

Pantavos i sur. (2015) analizirajući unos antioksidansa hranom u 3209 žena otkrili su da je nizak unos α -karotena i β -karotena povezan s većim rizikom od raka dojke među pušačima.

Rezultati studije koju su proveli Blot i sur. (1993) ukazali su na značajno smanjenje smrtnosti od raka, a posebno od raka želuca nakon suplementacije β -karotena, vitamina E i selena.

Smatra se da snažan antioksidativni učinak objašnjava kemoprotektivno djelovanje beta karotena. Uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) važno je u kemoprevenciji raka budući da mogu olakšati procese povezane s karcinogenezom putem oksidacije staničnih biomolekula. Osim antioksidativnog kapaciteta karotenoida, i drugi mehanizmi pridonose prevenciji raka, uključujući imunološku modulaciju, signaliziranje hormona i faktora rasta, regulatorne mehanizme napredovanja staničnog ciklusa, diferencijaciju stanica i apoptozu (Marti i sur., 2016).

Također se pokazalo da karotenoidi imaju zaštitne učinke na zdravlje kardiovaskularnog sustava. Posebno je dokazana negativna korelacija između serumskih koncentracija β -karotena i pojavnosti ateroskleroze, pri čemu visoke koncentracije beta karotena u krvi štite stijenke krvnih žila od oštećenja. Unos all-trans- i 9-cis- β -karotena smanjuje i razine kolesterola u plazmi i aterosklerotskih lezija u apolipoproteinom E deficijentnim miševima. Bechor i sur. (2016) potvrdili su da se 9-cis- β -karoten iz prehrane nakuplja u peritonealnim makrofagima i povećava efluks kolesterola u HDL, štiteći od razvoja ateroskleroze. Zhou i sur. (2020) ispitivali su aktivnost β -karoten oksigenaze 1 (BCO1), zaduženu za pretvorbu karotenoida u vitamin A, pružajući dokaze da ta pretvorba regulira izlučivanje jetrenih lipoproteina i razvoj ateroskleroze kod miševa. Amengual i sur. (2020) potvrdili su ove dokaze, pokazujući da aktivnost BCO1 utječe na ukupnu količinu cirkulirajućeg kolesterola i kod miševa i kod mladih odraslih jedinki. Zahvaljujući svojoj sposobnosti hvatanja radikala i antioksidativnom djelovanju, karotenoidi smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, uključujući iznenadnu srčanu smrt, neke vrste raka,

makularnu degeneraciju povezanu sa starenjem te moždani udar. Osim toga, dokazano je da karotenoidi smanjuju razinu LDL-kolesterola u plazmi i poboljšavaju osjetljivost na inzulin i učinkovitost HDL-a, čime također igraju ključnu ulogu u smanjenju rizika od pojave metaboličkog sindroma (Molteni i sur., 2022). Druge studije pokazuju da prehrana bogata 9-cis-beta-karotenom može inhibirati aterosklozu smanjenjem koncentracije LDL kolesterola u plazmi i inhibicijom razvoja masne jetre i upale u mišjem modelu ateroskleroze. I patološki pregled i ekspresija gena pokazali su da prehrana bogata beta-karotenom smanjuje upalu u jetri miševa te ekspresiju IL-1a, VCAM-1 i E selektina. Pokazalo se da prehrana s visokim kolesterolom potiče ekspresiju nekoliko proupalnih gena u jetri, a sugerirano je da upala jetre doprinosi aterosklerozi; stoga smanjene razine ovih gena u miševa može pridonijeti zaštiti od oštećenja jetre izazvanih prehranom i, posljedično, aterogeneze. Također, prehrana bogata 9-cis-beta karotenom značajno je smanjila razine mRNA CYP7a, enzima koji ograničava brzinu sinteze žučnih kiselina i posljedično može smanjiti apsorpciju kolesterola u crijevima. Prehrana bogata 9-cis-beta-karotenom također je smanjila ekspresiju drugih gena uključenih u metabolizam kolesterola, ABCG1, ABCG5 i ABCG8. Ovi transporteri se eksprimiraju u jetri i igraju ulogu u izlučivanju kolesterola i stoga se može očekivati da smanjuju aterogenezu. Blagotvorni učinci na lipide u plazmi kod ljudi sugeriraju da 9-cis-beta-karoten ima potencijal za inhibiciju progresije ateroskleroze kod ljudi i vjerojatno ima potencijal za smanjenje upalnog procesa općenito (Gammone i sur., 2015).

Još jedan zanimljiv mehanizam za razjašnjenje zašto karotenoidi mogu spriječiti kardiovaskularne bolesti je modulacija biorasploživosti vaskularnog NO. Dobro je poznato da je jedan od najranijih patogenih događaja u aterosklerozi predstavljen prekomjernom ekspresijom adhezijskih molekula stanične površine, što uzrokuje vezanje normalno netrombogenih cirkulirajućih stanica, kao što su monociti, na endotel. Aktivacija NF-kB puta pokreće regulaciju ekspresije vaskularnih staničnih adhezijskih molekula (VCAM-1), intercelularnih staničnih adhezijskih molekula (ICAM-1) i E-selektina kao odgovor na različite upalne citokine. NO, kojeg konstitutivno stvaraju endotelne stanice, igra važnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze i u proupalnom odgovoru koji karakterizira rane faze ateroskleroze: inhibira vaskularni upalni odgovor blokiranjem NF-kB nuklearnog prijenosa. Nedavna studija izvijestila je da beta-karoten, slično likopenu, utječe na NF-kB-ovisnu ekspresiju adhezijske molekule i interakcije endotelnih stanica ljudske pupčane vene (HUVEC) inducirane TNF-alfa i štiti biorasploživost NO, smanjujući na taj način TNF- alfa-inducirani nitrooksidativni stres.

U modelu vaskularne upale, prisutnost visokih koncentracija beta-karotena povezana je sa značajnim povećanjem razine NO i bioraspoloživosti, što je naznačeno povećanjem razina cGMP. Dakle, povećano oslobađanje NO dovodi do smanjene regulacije ekspresije NF- κ B-ovisne adhezijske molekule u endotelu stanica. Održavanje bioraspoloživosti endotelnog NO stoga se smatra korisnim za endotelne funkcije i općenito za vaskularno zdravlje (Gammone i sur., 2015).

Prisutnost karotenoida u koži, u vanjskom dijelu stratum corneum-a, pojačava bazalnu dermalnu obranu od UV oštećenja, promičući tako zdravlje kože. Pokazalo se da prehrana bogata likopenom i β -karotenom štiti od pojave opekline od sunca i stvaranja eritema izazvanog UV zračenjem. Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja uključuju sposobnost karotenoida da spriječe peroksidaciju lipida gašenjem singletnog kisika ili hvatanjem slobodnih radikala; da inhibiraju UVA-induciranu ekspresiju hem-oksigenaze 1 uključene u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze i da pružaju zaštitu od mutacije mitohondrijske DNA povezane sa starenjem izazvanim UV zračenjem i karcinogenezom. Osim toga, dokazano je da karotenoidi inhibiraju metaloproteaze, enzime povezane s foto-starenjem, i preveniraju imunosupresivne učinke koji se javljaju kao posljedica pretjeranog izlaganja UV zračenju (Molteni i sur., 2022).

4.1.3. Ekstrakcija karotenoida iz otpada rajčice

Karotenodi se iz otpada rajčice mogu ponovno uvesti u prehrambene lance primjenom različitih ekstrakcijskih metoda koje će biti detaljnije opisane kasnije. Često se koriste konvencionalne tehnike ekstrakcije odnosno Soxhlet ekstrakcija te ekstrakcija superkritičnim fluidom, mikrovalno potpomognuta ekstrakcija, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija i enzimski potpomognuta ekstrakcija. Soxhlet ekstrakcija glavna je konvencionalna tehnika ekstrakcije otapalom koja se primjenjuje za ekstrakciju karotenoida iz otpada rajčice. Unatoč činjenici da je prinos karotenoida dobiven ekstrakcijom po Soxhletu visok, ta tehnika nije preferirana zbog moguće degradacije termolabilnih spojeva kao što su karotenoidi na visokoj temperaturi i dugom trajanju ekstrakcije. Izbor otapala obično se smatra najvažnijim faktorom. Kako su karotenoidi topljivi u uljima, za ekstrakciju karotenoida ispitana su uobičajena organska otapala, uključujući heksan, aceton, etanol, etil acetat, kloroform i petrolej eter, kao i mješavine polarnih i nepolarnih otapala u različitim omjerima. Otapala poput dietiletera i tetrahidrofurana nisu poželjna jer mogu sadržavati perokside koji reagiraju s karotenoidima.

Oksigenirani derivati (ksantofili) su topljiviji u hidrofilnim otapalima, dok karoteni imaju hidrofobnu prirodu i ograničenu topljivost u vodi te su topljiviji u nepolarnim otapalima. Vagi i sur. (2007) usporedili su prinose nekoliko karotenoida Soxhlet ekstrakcijom pomoću heksana i etanola i pronašli gotovo deseterostruko povećanje prinosa likopena u heksanskom ekstraktu, dok je prinos β -karotena bio je gotovo isti korištenjem oba otapala. Etanolni ekstrakt sadržavao je uglavnom polarne ksantofile. Sličan trend primijećen je u studiji Calva i sur. (2007.) koji su procijenili prinos ekstrakcije korištenjem otapala etanola i etilnog acetata. Otkrili su da je prinos potpunog trans-likopena u ekstraktu etilnog acetata bio dvadeset puta veći od odgovarajućeg prinosa dobivenog u etanolu. Također, Strati i Oreopoulou (2011a) izvijestili su o sljedećem redoslijedu u prinosu likopena iz sušenog otpada od rajčice ekstrahiranog konvencionalnim organskim otapalima: aceton > etil acetat > heksan > etanol. Kloroform je također korišten u Soxhlet ekstrakciji osušene kože rajčice i nusproizvoda osušene rajčice sa zadovoljavajućim prinosima likopena. Čini se da kombinacija polarnih otapala s nepolarnim heksanom poboljšava otapanje nepolarnih karotenoida (likopen i β -karoten). Prema Strati i Oreopoulou (2011b) korištenje mješavine polarnih i nepolarnih otapala, etil acetata i heksana, pokazalo se prikladnim za ekstrakciju nepolarnih karotenoida (likopena i β -karotena) u dovoljnom postotku (96% ukupno ekstrahiranih karotenoida), kao i polarnog luteina (4% ukupno ekstrahiranih karotenoida). Lutein je također selektivno ekstrahiran iz sjemenki i kože rajčice korištenjem

mješavine otapala aceton:etanol (2:1, v/v) i jednostavnim postupkom čišćenja. Većina nepolarnih otapala koja imaju visoku učinkovitost ekstrakcije smatraju se otrovnima. U sve većem broju zemalja većina organskih otapala je zabranjena ili dopuštena za ekstrakciju prehrambenih proizvoda s iznimno niskim rezidualnim koncentracijama (1 mg/kg u slučaju heksana) budući da mogu biti povezani s opasnim učincima. Nedavno je etil laktat predložen kao snažno otapalo za ekstrakciju karotenoida, uglavnom β -karotena i likopena. To je ekološki prihvatljivo otapalo, proizvedeno fermentacijom ugljikohidratne sirovine i potpuno je biorazgradivo u CO₂ i vodi. Prema Strati i Oreopoulou (2011a), etil laktat je dao najveći prinos karotenoida iz otpada rajčice (243 mg/kg suhe osnove), u usporedbi s acetonom (52 mg/kg) ili etil acetatom (46 mg/kg).

Osim izbora otapala, važan čimbenik koji utječe na prinos ekstrakcije je i temperatura. Povećanje temperature pozitivno utječe na proces prijenosa mase i, posljedično, na prinos ekstrakcije likopena i drugih karotenoida. Povećanje temperature ekstrakcije općenito podrazumijeva povećanje kapaciteta otapala za solubilizaciju ciljnih spojeva, povećanje stope difuzije, bolje kidanje veza između ciljnog spoja i matrice, smanjenje viskoznosti otapala, i smanjenje površinske napetosti. Međutim, ograničavajući faktor za izbor temperature ekstrakcije je vrelište otapala koje se koristi i potreba za izbjegavanjem neželjenih reakcija kao što su izomerizacija i/ili oksidacija karotenoida (Strati i Oreopoulou, 2011a).

Kaur i sur. (2008) pokazali su da se prinos likopena povećava s povećanjem vremena ekstrakcije i broja koraka ekstrakcije. Strati i Oreopoulou (2011.a) primijetili su sličan trend povećanja prinosa karotenoida s brojem ekstrakcija.

Veličina čestica još je jedan parametar koji utječe na prinos karotenoida. Prinos se povećava sa smanjenjem veličine čestica zbog većeg kontakta međufazne površine kada su čestice manje; međutim, premale čestice mogu uzrokovati nakupljanje ekstrakcijskog sloja, što može rezultirati učincima kanaliziranja.

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija još je jedna metoda koja se koristi za izolaciju karotenoida. Brojni radni parametri kao što su veličina uzorka, sadržaj vlage, veličina čestica, vrsta otapala, snaga i frekvencija ultrazvuka, vrijeme sonikacije te omjer tekućine i krutine su presudni za postizanje učinkovite ekstrakcije. Niskofrekventni ultrazvuk (16-100 kHz) može se koristiti za ekstrakciju komponenti kao što su hidrofilni flavonoidi (antocijanini, tanini) i hidrofobni karotenoidi (likopen, beta karoten, kapsaicin i lutein) iz hortikulturnih proizvoda kao što su mrkva, đumbir, rajčica, grožđe, masline, komina masline i paprika i iz njihovog prerađivačkog otpada (Strati i sur., 2014). Eh i Teoh (2012) primijenili su optimiziranu ultrazvukom potpomognutu metodu ekstrakcije likopena iz rajčice uz primjenu smjese otapala

n-heksan:etanol:aceton (2:1:1, v/v/v). i ustanovili da se prinos ekstrakcije all-trans-likopena povećao za 75,93% u usporedbi s optimiziranom konvencionalnom metodom ekstrakcije, a istovremeno nije došlo do razgradnje ili izomerizacije likopena (Strati i sur., 2014).

Na mikrovalno potpomognutu ekstrakciju karotenoida može utjecati velik broj čimbenika, kao što su snaga, frekvencija i vrijeme primjene mikrovalova, sadržaj vlage i veličina čestica matrice uzorka, vrsta i koncentracija otapala, omjer krutine i tekućine, temperatura ekstrakcije, tlak ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije. U okviru gore navedenih čimbenika, odabir otapala se smatra najkritičnijim. Postoje 3 glavna fizikalna parametra za odabir odgovarajućeg otapala: topljivost, dielektrična konstanta i faktori disipacije. Ova tehnika primjenjuje se za izdvajanje karotenoida polarne prirode, tj. astaksantina iz mikroalgi i iz crvenog kvasca *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Kako bi se spriječila razgradnja i oksidacija labilnih spojeva poput β -karotena tijekom ekstrakcije, predložena je niskotemperaturna vakuumska mikrovalna ekstrakciju iz različitih uzoraka hrane, koja je istovremeno izvođena na niskoj temperaturi i u vakuumu (Strati i sur., 2014).

Pri ekstrakciji superkritičnim fluidom superkritični etan i smjesa etana i propana pokazali su se boljim otapalima od superkritičnog CO₂, što je dovelo do brže ekstrakcije i većeg oporavka karotenoida. Zbog svoje niske polarnosti, CO₂ je manje učinkovit u ekstrakciji visoko polarnih spojeva iz njihovih matrica. Iz tog razloga, dodatak pojačivača topivosti, koji se naziva suotapalo ili modifikator, može promijeniti karakteristike procesa i tako pogodovati ekstrakciji polarnih spojeva. Suotapala ili modifikatori uključuju heksan, metanol, etanol, izopropanol, acetonitril i diklorometan. Međutim, etanol se preporučuje kao suotapalo u ekstrakciji superkritičnim fluidima zbog njegove niže toksičnosti i mogućnosti miješanja u CO₂. Pri ekstrakciji superkritičnim fluidima važan parametar je i temperatura. Prilikom ekstrakcije trans-likopena iz industrijskog otpada rajčice korištenjem superkritičnog CO₂, Nobre i sur. (2009) otkrili su da se oporavak trans-likopena povećao s 40% na 93% kada je temperatura ekstrakcije povećana s 40 na 60 °C. Međutim, daljnjim povećanjem na 80 °C, oporavak trans-likopena je smanjen. To se pripisuje izomerizaciji trans-likopena. Slično, Shi i sur. (2009) primijetili su da je na temperaturama ekstrakcije od 80 °C i viših došlo do pada krivulje topljivosti likopena u superkritičnog CO₂, što je pripisano toplinski induciranoj razgradnji likopena. Predloženo je da bi temperatura ekstrakcije za termolabilne spojeve trebala biti između 35 i 60 °C, što je blizu kritične točke ugljikovog dioksida (Strati i sur., 2014).

Većina literature ukazuje na to da povećanje ekstrakcijskog tlaka superkritičnog CO₂, dovodi do povećanja količine ekstrahiranog likopena. Vrijednosti tlaka u rasponu između 200 i 450 Ba daju optimalne rezultate ovisno o drugim parametrima procesa, posebno o temperaturi

ekstrakcije, a za obnavljanje likopena primjenom superkritičnog CO₂, tlak varira između 300 i 400 bara. Povećanje prinosa likopena pri višim tlakovima ekstrakcije uglavnom je posljedica povećanja gustoće superkritičnog CO₂, kada se tlak poveća. Pri višim gustoćama, otapanje otopljene tvari u superkritičnom CO₂, je pojačano zbog veće interakcije između otopljene tvari i superkritične tekućine. Neke su studije otkrile da iako povećanje tlaka dovodi do povećanja prinosa likopena, izvan optimalne točke dodatno povećanje tlaka dovodi do njegovog smanjenja. Slično temperaturi i tlaku, učinak povećanja brzine protoka superkritičnog CO₂, dovodi do većeg prinosa likopena. Međutim, daljnje povećanje brzine protoka iznad optimalne točke dovodi do nižih prinosa likopena. Topal i sur. (2006.) testirali su brzine protoka superkritičnog CO₂, u rasponu od 1,5 do 4,5 mL/min i otkrili najveći prinos likopena pri brzini protoka od 2,5 mL/min (Strati i sur., 2014).

4.1.4. Bioraspoloživost karotenoida

Važno pitanje u prehrani je bioraspoloživost i biodostupnost bioaktivnih spojeva i unesenih hranjivih tvari. Biodostupnost se definira kao frakcija nutrijenta koja se tijekom probave oslobodi iz matriksa namirnice i dostupna je za apsorpciju u tankom crijevu. Taj pojam bitno je razlikovati od pojma bioraspoloživosti koji se definira kao udio nutrijenta koji nakon unosa per os dopiye do systemske cirkulacije ili specifičnog mjesta djelovanja. Drugim riječima, bioraspoloživost je količina unesenih bioaktivnih tvari koja je u stanju utjecati na ciljna tkiva. Molekula može imati snažnu antioksidacijsku aktivnost *in vitro*, no *in vivo* može pokazivati vrlo malu biološku aktivnost jer vrlo mala količina ishodnog spoja dopiye u ciljna tkiva (Bagarić, 2020). Kako bismo odredili bioraspoloživost spojeva od interesa, najtočniji model bi bio *in vivo* ispitivanje ljudske probave, no kako je to tehnički zahtjevno i skupo te uključuje etička ograničenja, koriste se *in vitro* metode. Takve metode trebaju strogo oponašati fiziološke procese te biti fleksibilne i točne, a rezultati reproducibilni. *In vitro* simulacije probave mogu se na temelju svoje kompleksnosti podijeliti na statične i dinamične modele (Horvat, 2019).

Što se tiče biodostupnosti, ona se može smanjiti ili poboljšati tijekom gastrointestinalne probave zbog interakcije s drugim komponentama hrane kao što su lipidi, šećeri i vlakna. Biodostupnost se često određuje *in vitro* simulacijom probave u želucu i tankom crijevu a intestinalna permeabilnost se istražuje primjenom Caco-2 staničnog monosloja. Kao i bioraspoloživost, i biodostupnost je karakterizirana fizičkim karakteristikama matrice hrane koje utječu na učinkovitost fizičkih, kemijskih i enzimskih probavnih procesa (Santos i sur., 2019).

Učinak karotenida na ljudski organizam ovisan je o biodostupnosti jer samo apsorbirana frakcija može imati učinak. Biodostupnost karotenoida ovisi o matriksu u kojem se nalazi, obliku, ali i karakteristikama organizma. Zbog svojeg lipofilnog karaktera upitna je njihova topljivost u uvjetima gastrointestinalnog trakta. Stabilnost spojeva također utječe na stupanj biodostupnosti, stoga formulacije u kojima se nalaze karotenoidi trebaju osiguravati što veću stabilnost zbog njihovog brzog raspada koji se događa pod utjecajem topline, svjetlosti, vodenog medija, te enzima u probavnom sustavu (Filić, 2022).

Jasno je da su biodostupnost i bioraspoloživost dva usko povezana pojma, budući da količina karotenoida koju tijelo iskoristi ovisi o njihovom prethodnom otpuštanju iz matrice hrane i njihovoj apsorpciji u crijevima. Dodatno, oboje utječu na biokonverziju karotenoida, što je omjer bioraspoloživih karotenoida provitamina A pretvorenih u retinol (Molteni i sur., 2022).

Nakon što se oslobode iz matrice hrane, kroz djelovanje probavnih enzima oralnog, želučanog i duodenalnog trakta, karotenoidi se izlijevaju u lumen crijeva što rezultira nastankom miješanih micela zajedno s drugim lipofilnim spojevima obroka, kao što je kolesterol, masne kiseline, acilgliceroli i fosfolipidi, kao i žučne soli jetrene sekrecije. Biodostupnost karotenoida definirana je postotkom karotenoida otopljenih u miješanim micelama. I sastav i veličina micela utječu na proces apsorpcije, što zauzvat utječe na bioraspoloživost karotenoida. Stoga dostupnost karotenoida ovisi o nekoliko različitih varijabli koje u prosjeku ne dopuštaju apsorpciju više od 5-30% unesene količine (Molteni i sur., 2022). U crijevima se karotenoidi apsorbiraju pasivnom difuzijom nakon čega slijedi ugradnja u hilomikrone i opći krvožilni sustav putem limfnog sustava. Zatim se ugrađuju u lipoprotein u jetri i otpuštaju u krvotok. Do danas, mehanizam tkivne apsorpcije karotenoida ostaje nejasan. Prijavljeno je da određena tkiva različito apsorbiraju karotenoide, a njihov glavni depozitor je masno tkivo (Szabo i sur., 2018).

Glavni faktori koji utječu na bioraspoloživost karotenoida su vrsta karotenoida, molekularne veze, količina konzumiranih karotenoida, matrica, efektori apsorpcije i biokonverzije, nutritivni status domaćina, genetski čimbenici, čimbenici povezani s domaćinom i matematičke interakcije (Molteni i sur., 2022).

Komponente i karakteristike matrice hrane značajno utječu na biodostupnost i bioraspoloživost karotenoida. Uočene su značajne razlike u otpuštanju iste vrste karotenoida između različitih matrica hrane. Lišće zelenih biljaka akumulira karotenoide u kloroplastima unutar tilakoidne membrane te tvore stabilne proteinske komplekse. Karotenoidi u ovom slučaju imaju ulogu u fotosintezi te u stabilnosti i fluidnosti membrane. Zbog njihova vezanja za proteine membrane, teško su bioiskoristivi. Karotenoidi ne-zelenih biljaka, ostalog voća i povrća, najčešće se akumuliraju u kromoplastima. Kromoplasti mogu potjecati iz kloroplasta sazrijevanjem plodova te mogu biti globularnog i tubularnog oblika. Globularni je zastupljen kod manga i naranči, a tubularni se zapaža kod rajčice i korijena mrkve te sadrži karotenoide u kristaličnom obliku što uzrokuje znatno manju bioiskoristivost od karotenoida iz globularnih kromoplasta. Ovisno o matriksu u kojem se nalaze karotenoidi, obrada hrane može poboljšati ili smanjiti bioiskoristivost karotenoida. Mehaničkom obradom hrane; sjeckanjem, guljenjem, usitnjavanjem, karotenoidi se oslobađaju iz staničnih struktura te se ovim putem uvijek poboljšava bioiskoristivost. Termička obrada može pridonijeti bioiskoristivosti ukoliko su karotenoidi u kristaličnoj formi. Termička obrada i prehrana bogata masnoćama povećavaju mogućnost otapanja ovih kristalica i time se povećava bioiskoristivost namirnice. S druge

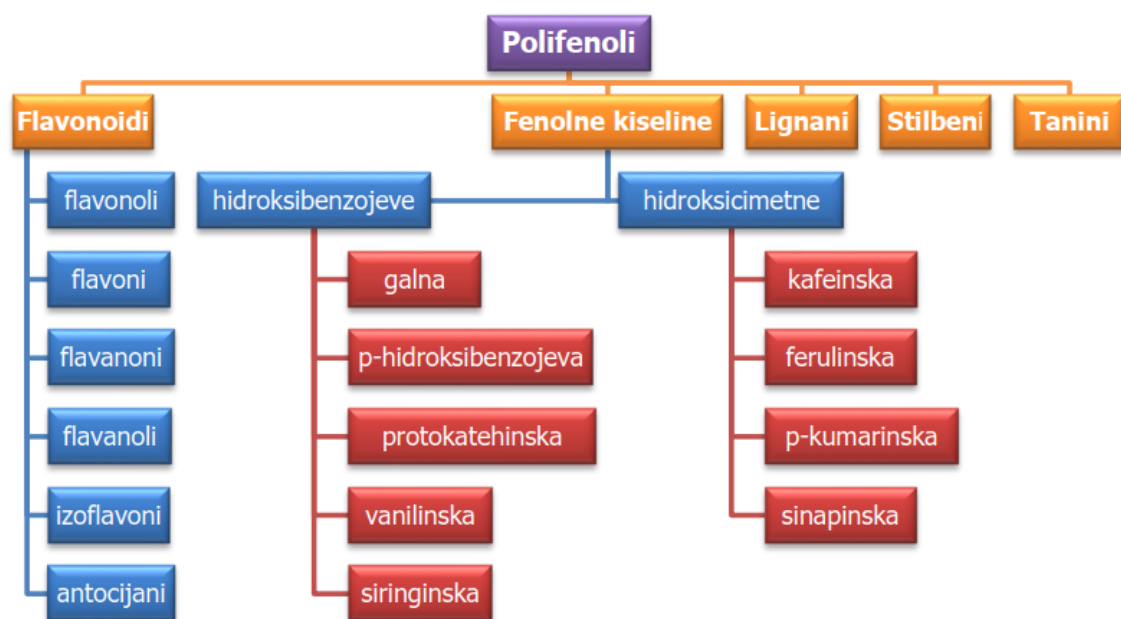
strane, slobodni karotenodi izloženi toplini ili ultraljubičastom zračenju često podliježu degradaciji ili izomerizaciji te im je smanjena bioiskoristivost (Marunica, 2020).

Za karotenoide provitamina A, kao što je beta karoten, postoji interes za određivanje bioraspoloživosti sa stajališta vrijednosti vitamina A. Glavni dijetalni provitamin A karotenoidi osim beta karotena su alfa karoten i kriptoksantin. Obično se pretpostavlja da se 50 % takvih karotenoida koje apsorbira crijevna sluznica podvrgavaju metabolizmu da bi na kraju dali retinil estere, koji se izlučuju zajedno s preostalim karotenoidima u hilomikronima. Vitamin A proizveden metabolizmom karotenoida provitamina A apsorbira se isključivo u obliku retinil estera povezanih s hilomikronima. Jetra ne izlučuje retinil estere, što može rezultirati nezasićenošću skladišnog kapaciteta jetre. Posljedično, teoretski je moguće procijeniti prinos karotenoida provitamina A u crijevima mjerenjem odgovora retinilnog estera u postprandijalnoj cijeloj plazmi. Međutim, u praksi je to teško izvedivo zbog niske trenutne koncentracije hilomikron retinil estera, relativno niske osjetljivosti izravnog određivanja koncentracije retinil estera HPLC-om i prisutnosti velikih količina drugih lipida u ekstrahiranoj plazmi (Parker i sur., 1999).

4.2. Polifenoli rajčice

Otpad rajčice (kora, sjemenke i pulpa) sadrži i značajne količine polifenola koji se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi za formulaciju funkcionalne hrane ili kao aditivi u prehrambenim sustavima za produljenje roka trajanja (Miletić, 2017). Utvrđeno je da su koža i sjemenke rajčice bogatiji izvori polifenolnih spojeva od pulpe (Nour i sur., 2018). Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka nastali u biosintetskim putevima šikiminske kiseline, fenilpropanoide i pentozofosfata (Miletić, 2017). Sadrže jedan ili više aromatskih prstenova i jednu ili više hidroksilnih skupina u svojoj osnovnoj strukturi. Postoji nekoliko klasa polifenola, kao što su fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina) i flavonoidi (flavonoli, flavanoni, flavoni, izoflavoni i antocijanidin) koji su sveprisutni u biljkama i uglavnom su prisutni kao glikozidi. Hidroksibenzojeva kiselina uključuje galnu, salicilnu, p-hidroksibenzojevu, protokatehuinsku, vanilinsku i siringinsku kiselinu. S druge strane, hidroksicimetne kiseline uključuju ferulinsku, p-kumarnu, klorogensku i sinapinsku kiselinu. U polifenole ubrajamo i polimere poput lignina, važnog za strukturu biljke te tanina koji sudjeluju u obrani biljaka (Garcia i Raghavan, 2021). Na Slici 4. prikazana je podjela polifenola prema osnovnim strukturalnim karakteristikama

Glavni polifenoli rajčice su derivati hidroksicimetne kiseline, flavanoni, flavonoli i antocijani. Osim toga, u plodovima rajčice također su prisutni flavonolni glikozidi poput rutina i kempferol-3-rutinozida. Naringenin kalkan je glavni polifenol pronađen u rajčici s koncentracijama do 18,2 mg/100g. Flavanon naringenin prisutan je u nižim koncentracijama, do 1,3 mg /100 g. Kvercetin je glavni flavonol i jedan od najvažnijih flavonoida iz rajčice, a njegov sadržaj varira od 0,7 do 4,4 mg/100 g u različitim vrstama rajčice. Također se može naći u glikoziliranom obliku kao rutin, s koncentracijama do 4,5 mg/100g.. Klorogenska kiselina je glavni polifenol iz obitelji hidroksicimetne kiseline, a njen sadržaj u rajčici kreće se između 1,4 i 3,3 mg/100g. Ostali flavonoli kao što su kempferol i miricetin nalaze se u kultiviranoj rajčici u značajno manjim količinama, a u većoj mjeri su prisutni u srodnim divljim vrstama (Marti i sur., 2016).



Slika 4. Shematski prikaz podjele polifenola (preuzeto iz Miletić, 2017).

4.2.1. Biološki učinci polifenola

Fenolni spojevi pokazuju širok raspon fizioloških svojstava poput antialergijskih, protuupalnih, antimikrobnih, antioksidativnih, antitrombotskih, kardioprotektivnih, vazodilatatornih i antikarcinogenih učinaka (Miletić, 2017). Posljedično, konzumacija polifenola povezana je s prevencijom kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti i raka. Ti učinci na ljudsko zdravlje ovise o klasi polifenola, konzumiranoj količini, bioraspoloživosti i izvoru iz kojeg je ekstrahiran (Garcia i Raghavan, 2021). Ovi pozitivni učinci pripisuju se njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, odnosno sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, za doniranje atoma vodika ili elektrona, ili kationa kelirajućih metala. Primjerice, antioksidacijska aktivnost kod fenolne kiseline ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilnu funkcionalnu skupinu (Miletić, 2017).

Polifenoli pokazuju brojne učinke na tumorogenu transformaciju stanica te na tumorske stanice *in vitro* i *in vivo* pri čemu se strukturalno različiti polifenoli razlikuju po svojim kemoprotektivnim sposobnostima. Primjerice redosljed moći suzbijanja proliferacije stanica raka ljudske jetre *in vitro* 68 različitih vrsta polifenola bio je kalkoni > flavoni > kromoni > izoflavoni > flavanoni > kumarini (Loa i sur., (2009). Smanjeni rizik obolijevanja od raka dojke povezuje se s visokim unosom flavonola i flavona, ali nisu nađene značajne povezanosti za druge polifenole rajčice kao što su flavanoni i antocijanidini. Prehrana bogata kvercetinom također se povezuje s nižim rizikom od pojave raka dojke u žena (Knekt i sur., 2002). Čini se da fenolni spojevi također štite od raka debelog crijeva - velika studija koju su proveli Rossi i sur. (2006) pokazala je da su dijete s većim unosom flavonola i antocijanidina povezane s nižim rizikom obolijevanja od raka debelog crijeva. Također su dokazani kemopreventivni učinci polifenola protiv raka pluća. Rezultati studije koju su proveli Knekt i sur. (1997) pokazali su da se ovi kemoprotektivni učinci unosa flavonoida hranom mogu uglavnom pripisati kvercetinu. Što se tiče raka jetre, Lagiou i sur. (2008) također su pronašli kemoprotektivni učinak prehrambenog unosa flavona (>1,16 mg/dan) na razvoj hepatocelularnog karcinoma kod pacijenata bez hepatitisa. Također je pronađena obrnuta povezanost između konzumacije flavan-3-ola (>66,3 mg/dan), antocijanidina (>152,7 mg/dan) i ukupnih flavonoida (>358,1 mg/dan) hranom i pojavnosti i kolangiokarcinoma. Djelovanje kvercetina u studijama *in vivo* povezano je s inhibicijom i indukcijom signalnih puteva u stanicama raka jetre te njegovim snažnim antioksidativnim djelovanjem i posljedičnom prevencijom ROS-induciranih mutacija DNA u ključnim genima za kontrolu staničnog ciklusa. Uz gašenje ROS-a, antioksidativni

zaštitni učinak flavonoida može biti povezan s njihovom modulirajućom aktivnošću nekoliko detoksikacijskih enzima kao što su lipoksigenaza, ciklooksigenaza, inducibilna sintaza dušikovog oksida, monooksigenaza, ksantin oksidaza i NADH oksidaza. Štoviše, kvercetin također može djelovati u remodeliranju kromatina i tako ometati epigenetske promjene koje su važne u napredovanju raka. Učinak polifenola na enzime faze I i II također može modulirati prokarcinogeni metabolizam. Modulacija molekularnog puta NF- κ B još je jedan mehanizam kemoprevencijskih svojstava polifenola. U tom smislu, kavena kiselina bi inhibirala rast i metastaze kroz modulaciju ekspresije proteina uključenih uglavnom u NF- κ B molekularni put (Marti i sur., 2016).

Osim kao biološki aktivne sastavnice polifenoli se u hrani mogu koristiti i u druge svrhe. Primjerice, predstavljaju jednu od najčešće korištenih grupa bioaktivnih spojeva ekstrahiranih iz otpada hrane koji se primjenjuju radi očuvanja stabilnosti nekih biljnih i životinjskih masti te bi mogli predstavljati ekološki prihvatljivu zamjenu sintetskim antioksidansima, kao što su butilirani hidroksitoluen i propil galat. Nadalje, fenoli se mogu koristiti kao dezinficijensi u prehrambenoj i kemijskoj industriji budući da pokazuju antimikrobnu učinkovitost protiv niza mikroorganizama značajnih u kontekstu kvarenja hrane (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i drugi). Međutim, fenoli ekstrahirani iz otpada moraju proći provjeru spektra antibakterijskog učinka, kako bi se definirale optimalne koncentracije u hrani i kako ne bi utjecali na senzorna svojstva konačne hrane (Garcia i Raghavan, 2021).

4.2.2. Bioraspoloživost polifenola

Većina polifenola prisutna je u hrani u obliku estera, glikozida ili polimera koji se ne mogu apsorbirati u prirodnom obliku. Ove tvari moraju hidrolizirati crijevni enzimi ili mikroflora debelog crijeva prije nego što se mogu apsorbirati. Tijekom apsorpcije polifenoli se konjugiraju u enterocitima, a kasnije u jetri. Ovaj proces uglavnom uključuje procese metilacije, sulfatacije i glukuronidacije. Konjugacija je proces metaboličke detoksikacije koji je zajednički mnogim ksenobiotičima te ograničava njihove potencijalne (toksične) učinke u organizmu i smanjuje im bioraspoloživost na način da olakšava njihovu žučnu i urinarnu eliminaciju povećanjem njihove hidrofilnosti. Mehanizmi konjugacije su vrlo učinkoviti, a aglikoni općenito ili nisu prisutni u krvi ili su prisutni u niskim koncentracijama nakon konzumiranja nutritivnih doza. Cirkulirajući polifenoli su konjugirani derivati koji su u velikoj mjeri vezani za albumin. Polifenoli mogu prodrijeti u tkiva, posebice ona u kojima se metaboliziraju, ali njihovu sposobnost nakupljanja unutar specifičnih ciljnih tkiva potrebno je dodatno istražiti. Polifenoli i njihovi derivati eliminiraju se uglavnom putem mokraće i žuči. Polifenoli se bilijarnim putem izlučuju u duodenum gdje u distalnim dijelovima crijeva bivaju podvrgnuti djelovanju bakterijskih enzima, posebice glukuronidaze, nakon čega se mogu reapsorbirati. Ovo enterohepatičko recikliranje može dovesti do duže prisutnosti polifenola u tijelu (Manach i sur., 2014).

Učinkovitost polifenola ovisi o njihovoj strukturalnoj cjelovitosti kao i o njihovoj bioraspoloživosti. Apsorpcija polifenola per os je slaba zbog nedovoljnog vremena zadržavanja u želucu, niske intestinalne permeabilnosti i/ili niske topljivosti. Na apsorpciju polifenola iz hrane prvenstveno utječu njihova fizikalno-kemijska svojstva koja su određena osnovnom strukturom, stupnjem glikozilacije i/ili acilacije, konjugacijom s drugim fenolima, veličinom molekule, stupnjem polimerizacije te topljivošću. Obično je bioraspoloživost ovih prirodnih spojeva nakon oralne primjene prilično niska zbog slabe topljivosti, male permeabilnosti i brzog metabolizma. Ograničena terapijska učinkovitost polifenola u prekliničkim i kliničkim studijama usko je povezana upravo s njihovom niskom bioraspoloživošću, (što rezultira subterapijskim koncentracijama na ciljnom mjestu djelovanja i posljedičnim izostankom učinka). Kako bi se prevladali ovi nedostaci, razvijeni su napredni terapijski sustavi za dostavu aktivne tvari čime se poboljšava bioraspoloživost i učinkovitost polifenola (Parisi i sur., 2014). Sadržaj fenola u rajčici značajno je uvjetovan tehnikom uzgoja, genotipom i uvjetima skladištenja. U većini voća i povrća (pa tako i u rajčici) fenolni spojevi su uglavnom vezani za

staničnu stijenkku te stoga neke metode procesuiranja (osobito one koje uzrokuju pucanje staničnih stijenki), mogu povećati bioraspoloživost fenolnih spojeva. (Laranjeira i sur., 2022). Bioraspoloživost polifenola značajno varira ovisno o strukturalnim karakteristikama. Iako ih ima u velikoj količini u našoj prehrani, proantocijanidini se vrlo slabo apsorbiraju ili se uopće ne apsorbiraju, pa je njihovo djelovanje ograničeno na lumen crijeva. Čini se da isto vrijedi i za antocijane, osim ako neki od njihovih metabolita još nisu identificirani, ali se dobro apsorbiraju. Unosi monomernih flavonola, flavona i flavanola prehranom relativno su niski, a koncentracije u plazmi rijetko prelaze 1 mol/L zbog već spomenute ograničene apsorpcije i brze eliminacije. Flavanoni i izoflavoni su flavonoidi s najboljim profilima bioraspoloživosti, a koncentracije u plazmi mogu doseći 5 mol/L. Međutim, distribucija ovih tvari ograničena je na agrume i soju. Naposljetku, hidroksicimetne kiseline nalaze se u raznim namirnicama, često u visokim koncentracijama, ali esterifikacija smanjuje njihovu crijevnu apsorpciju.

Kao opće pravilo, metaboliti polifenola brzo se eliminiraju iz plazme, što ukazuje da je svakodnevna konzumacija biljnih proizvoda neophodna za održavanje visoke koncentracije metabolita u krvi (Manach i sur., 2004).

Kiselost u želucu čini fenolne spojeve stabilnima i poboljšava oslobađanje pojedinih spojeva iz matriksa hrane. U lužnatom pH tankog crijeva moguće su strukturalne promjene strukture polifenola ili nastajanje kompleksa s proteinima ili probavnim enzimima što može značajno utjecati na biodostupnost.

Biodostupnost fenolnih spojeva i drugih antioksidansa iz matriksa hrane je ključna za njihovu bioraspoloživost i biološku učinkovitost budući da se samo komponente oslobođene iz matrice hrane mogu apsorbirati i u organizmu ostvariti svoje učinke (Santos i sur., 2019).

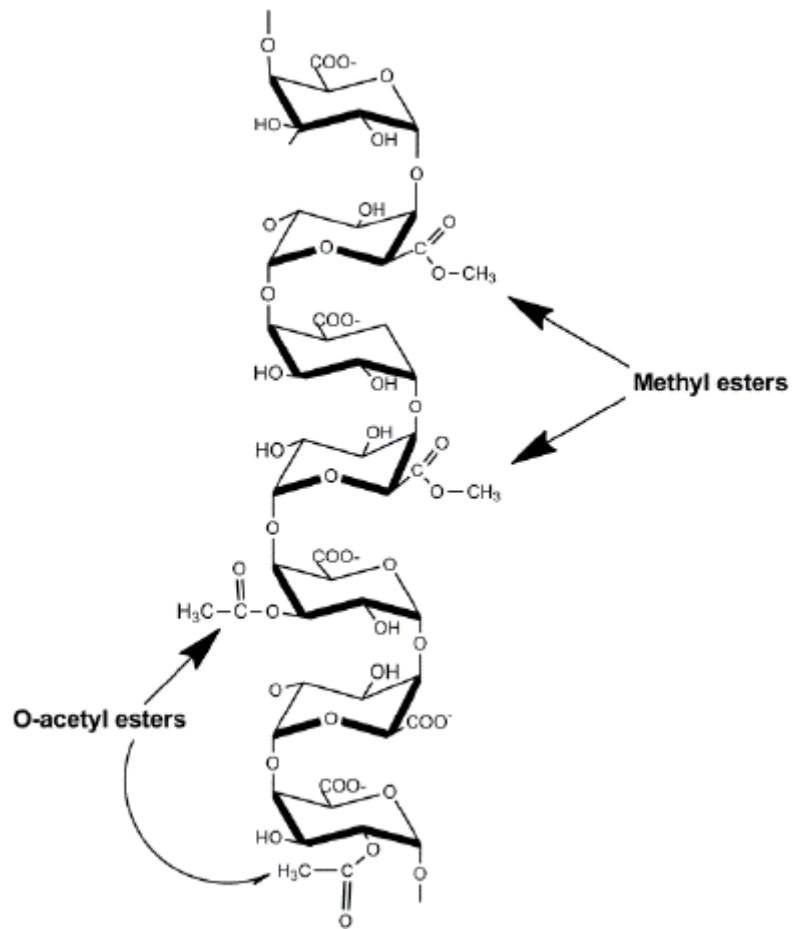
Bioraspoloživost polifenola određuje nekoliko čimbenika kao što su , intestinalna apsorpcija, stope glukuronidacije i izlučivanja iz enterocita, metabolizam u jetri, farmakokinetička svojstva, biološka aktivnost i raspodjela cirkulirajućih metabolita, vezanje na albumin, intracelularne koncentracije i metabolizam, nakupljanje u tkivima, izlučivanje putem žuči i urina, te metabolizam neprobavljive frakcije djelovanjem crijevne mikroflore te bioraspoloživost i biološka učinkovitost metabolita. Stoga je potencijal primjene i učinkovitost polifenola vrlo teško predviđati. Neki se polifenoli mogu manje učinkovito apsorbirati od drugih, ali unatoč tome postižu ekvivalentne koncentracije u plazmi (npr. zbog manjeg izlučivanja u lumen crijeva i slabijeg metabolizma i eliminacije).

Bolje poznavanje bioraspoloživosti bitno je za istraživanje učinaka polifenola na zdravlje, bez obzira na pristup koji se koristio. Činjenica da aglikoni nisu važni metaboliti u krvi zbog opsežne intestinalne i jetrene konjugacije do sada je uglavnom zanemarena, a mnoge *in vitro*

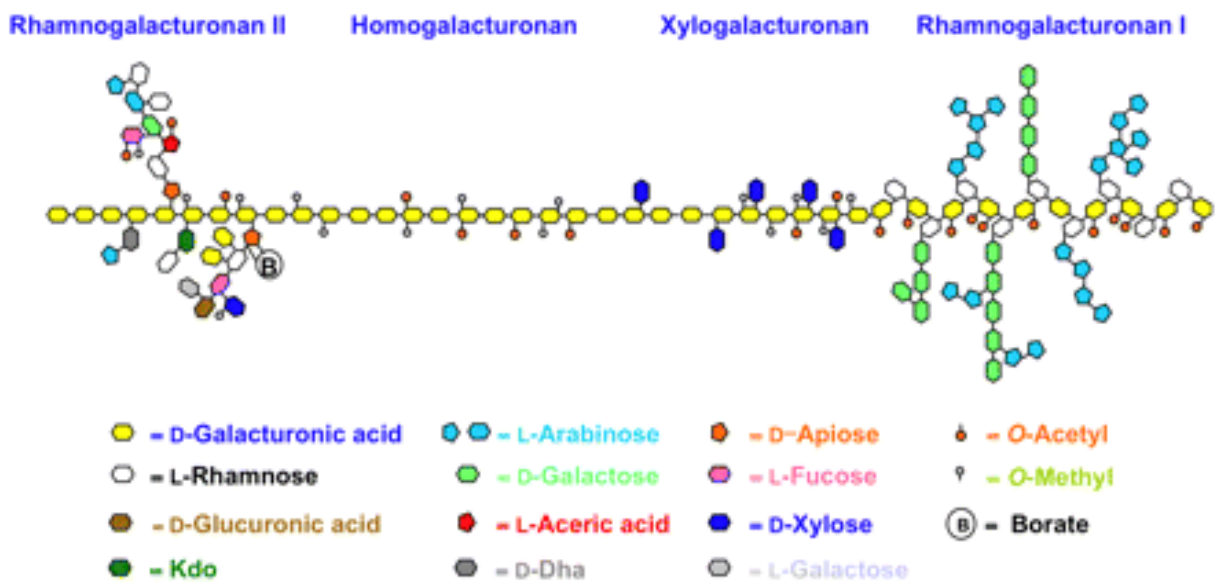
studije o mehanizmima djelovanja polifenola i dalje se koncentriraju na aglikone ili glikozide, a ne na identificirane metabolite, često u koncentracijama koje se realno ne mogu postići u tijelu. Stoga je bitno potvrditi učinke primijećene s aglikonima kroz studije koje koriste fiziološke koncentracije metabolita koji se stvarno nalaze u tijelu. Osim toga u budućim studijama potrebno je ispitati aktivnosti metabolita polifenola koji nastaju djelovanjem crijevne mikroflore. Kliničke studije bit će od velike pomoći u istraživanju utjecaja polifenola na zdravlje, pod uvjetom da su dostupni adekvatni biomarkeri. Bolje poznavanje nekih varijabli bioraspodjelivosti polifenola, poput kinetike apsorpcije, nakupljanja i eliminacije, olakšat će dizajn takvih studija. Istraživanja bioraspodjelivosti polifenola moraju nam u konačnici omogućiti određivanje metabolički dostupne frakcije aktivnog polifenola kako bi se te vrijednosti u epidemiološkim studijama mogle korelirati s opaženim učincima na zdravlje. (Manach i sur., 2014).

4.3. Pektini

Pektine možemo definirati kao smjesu polimernih oblika polisaharida koji se nalaze u staničnoj stijenci biljnog tkiva. Pektini se široko koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji. Svestrana primjena pektina proizlazi iz njegove složene molekularne strukture, različite raspodjele duljina lanaca (uglavnom monosaharida), stupnja metil esterifikacije i hidrodinamičkog radijusa (Nawaz i sur., 2021). Okosnicu njihove strukture čini D-galakturonska kiselina, izomer D-glukuronske kiseline. Ona može postojati u tri polimerna oblika od kojih je prvi homogalakturonan; linearni polimer sastavljen od podjedinica galakturonske kiseline povezanih α -1-4 glikozidnom vezom. Drugi polimerni oblik je ramnogalakturonan I; ponavljajući disaharid kojeg čine galakturonska kiselina i ramnoza povezane α -1-2 glikozidnom vezom. Posljednji polimerni oblik naziva se ramnogalakturonan II s homogalakturonskom osnovom na koju su vezani brojni kompleksni bočni lanci sačinjeni od ramnoze i ostalih neutralnih šećera. Dakle, smatra se da su pektini sastavljeni od barem 17 vrsta monosaharida od kojih prevladava D-galakturonska kiselina, a odmah za njom slijede ramnoza, D-galaktoza i L-arabinoza (Marić i sur., 2018). U bočnim lancima pektina pojavljuju se i drugi neutralni šećeri poput D-ksilopiranoze, D-glukopiranoze i L-fukopiranoze, dok se D-apioza, 2-O-metil-D-ksiloza i 2-O-metil-fukoza pojavljuju vrlo rijetko (Caffal i Mohnen, 2009). Polimerni oblik najzastupljeniji u staničnoj stijenci biljaka je homogalakturonan čije karboksilne skupine na C6 položaju mogu biti metil esterificirane te O-acetilirane na položaju O2 i O3. Slika 5. prikazuje homogalakturonan i položaje u strukturi na kojima može doći do O-acetilacije i metil esterifikacije. Na Slici 6. može se vidjeti shematski prikaz strukture pektina i različiti tipovi polisaharida koji ju mogu činiti.



Slika 5. Položaji O-acetilacije i metil esterifikacije homogalakturonana (preuzeto iz Caffal i Mohnen, 2009)



Slika 6. Shematski prikaz strukture pektina (preuzeto iz Harholt i sur., 2010)

4.3.1. Ekstrakcija pektina

Pektini se industrijski dobivaju uglavnom iz kore citrusnog voća i komine jabuke. Međutim, od nedavno se istražuju i neki netradicionalni izvori pektina kao što su voće i povrće ili nusproizvodi prehrambene industrije (Alancay i sur., 2017). Posebna pažnja u tom smislu pridaje se ostacima industrijske prerade rajčice. Dosadašnja istraživanja pokazuju da komina rajčice ima potencijal kao industrijski interesantan izvor pektina te da podrijetlo uzorka i način procesuiranja rajčice imaju značajan učinak na prinose i kvalitetu ekstrahiranih pektina (Dranca i Oroian, 2018).

Za ekstrakciju pektina iz biljnog materijala primjenjuje se više različitih metoda. Pronalaženje najprikladnije ekstrakcijske metode ima velik značaj u povećanju prinosa i kvalitete samog proizvoda (Marić i sur., 2018). Među ekstrakcijskim sredstvima koja se koriste za dobivanje pektina mogu se spomenuti voda, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) ili cikloheksandiamintetraoctena kiselina (CDTA), vruća razrijeđena kiselina i lužine. U pektinu ekstrahiranom kelirajućim agensom ostaje određena količina agensa koja će utjecati na funkcionalnost pektina, dok ekstrakcija lužinom osigurava dobivanje pektina s niskim stupnjem esterifikacije i smanjenom duljinom lanca. Ekstrakcija pektina pomoću vode je atraktivan ekološki prihvatljiv proces, jer ne stvara otpad. Industrija preferira upotrebu vruće razrijeđene kiseline kao sredstva za ekstrakciju zbog najvećeg prinosa i kvalitete u odabranim uvjetima ekstrakcije (Alancay i sur., 2017). U tu svrhu najčešće se koriste 0,05-2 M sumporna-, nitratna-, fosforna-, octena- ili klorovodična kiseline uz kontinuirano miješanje 1-2 sata na temperaturama od 80 do 100 °C. Uspješnost konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika ovisi o brojnim čimbenicima kao što su temperatura, pH vrijednost, svojstva otapala, brzina difuzije te stoga možemo zaključiti kako je ovaj korak ključan i ima najveću mogućnost prilagodbe raznih parametara u cilju optimizacije same metode kako bismo smanjili degradaciju, depolimerizaciju i deesterifikaciju samih pektina (Marić i sur., 2018).

4.3.2. Karakterizacija pektina

Važno je objasniti parametre koji su povezani sa strukturom i ukazuju na kvalitetu samih pektina i mogućnost ispoljavanja svojstava koja će odrediti daljnju primjenu. Pektini se upotrebljavaju kao stabilizatori, sredstva za geliranje i sredstva za zgušnjavanje (Dranca i Oroian, 2018). Jedan od parametara kojima možemo okarakterizirati pektine je ekvivalentna masa. Što je ekvivalentna masa veća, mogućnost pektina da formira gel je bolja. Ona varira ovisno o uvjetima ekstrakcije te će prilikom dužeg izlaganja pektina višim temperaturama zasigurno biti manja (Kute i sur., 2020). Drugi važan parametar koji opisuje vrijeme potrebno da pektin formira gel je metoksilni ostatak (udio metoksilnih skupina naspram ukupne mase pektina). Pektine sa metoksilnim udjelom većim od 7% karakteriziramo kao visoko metoksilirane pektine (HM) dok one s nižim vrijednostima od 7% kao nisko metoksilirane (LM) (Mohamed, 2016). Sljedeći bitan parametar je stupanj esterifikacije koji predstavlja udio esterificiranih karboksilnih skupina jedinica galakturonske kiseline. Razlikujemo visoko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije višim od 50% i nisko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije nižim od 50% (Marić i sur., 2018). Nisko esterificirani pektin podliježe ionotropnom geliranju u prisutnosti polivalentnih kationa kao što su Ca^{2+} i Zn^{2+} , ali na proces stvaranja gela također možemo utjecati i promjenom temperature i pH vrijednosti. Budući da samo disocirane karboksilne skupine sudjeluju u povezivanju s ionima, pH potreban za formiranje gela bit će viši od onog potrebnog kod visokoesterificiranih pektina gdje karboksilne skupine trebaju ostati nedisocirane. Čvrstoća gela izravno je povezana s metoksilnim ostatkom budući da on ukazuje na zauzetost karboksilnih skupina koje povezivanjem s ionima doprinose formiranju gela. Stoga, niskoesterificirani pektini s manjom vrijednošću metoksilnog ostatka zahtijevaju manje količine prisutnih iona za formiranje gela od onih s vrijednosti metoksilnog ostatka većom od 7%. Proces geliranja visoko esterificiranog pektina uključuje nekoliko vrsta intramolekularnih interakcija koje se uspostavljaju u prisutnosti šećera i kiselina (Löfgren, 2000). Visoko esterificirani pektin ne podliježe procesu ionotropnog geliranja u prisutnosti polivalentnih kationa zbog niskog udjela slobodnih karboksilnih skupina (Bayon i sur., 2017). Posljednji bitan parametar koji će utjecati na krajnju primjenu ekstrahiranog pektina je udio anhidrouronske (galakturonske) kiseline koji ukazuje na čistoću pektina i ne bi smio iznositi manje od 65 % ako se pektin primjenjuje u farmaceutske svrhe ili kao prehrambeni aditiv (Khamsucharit i sur., 2017). Nizak udio galakturonske kiseline ukazuje na prisutnost proteina, škroba i šećera u precipitiranom pektinu (Mohamed, 2016).

4.3.3. Primjena i biološki učinci pektina

Pektini se već dugi niz godina primjenjuju u prehrambenoj industriji kao gelirajuća sredstva u proizvodnji džemova i želea. Pri tome visoko esterificirani pektin zahtijeva prisutnost šećera, vode i kiseline da bi mogao formirati gel i uglavnom se koristi u proizvodnji džemova, jogurta i pekarskih proizvoda. Budući da niskoesterificirani pektin može formirati gel u prisutnosti kationa (najčešće se u tu svrhu formulaciji dodaje kalcij) prikladan je za primjenu u dijetetskim proizvodima (Tan i Nie, 2020). Pektini se također dodaju u formulacije proizvoda koji se podvrgavaju procesima smrzavanja i odmrzavanja te kao stabilizatori pri proizvodnji alkoholnih pića (Jagodić, 2021).

U novije vrijeme na važnosti dobiva primjena pektina u medicini i farmaceutskoj industriji. Ustanovljeno je da pektini imaju hipokolesterolemijska svojstva, ali se zbog visokog kapaciteta geliranja ne mogu se uključiti u prehrambene proizvode u višim koncentracijama jer negativno utječu na senzorna svojstva proizvoda. Pektin zaobilazi proces enzimske probave u tankom crijevu, ali ga mikroflora debelog crijeva lako razgrađuje. U ljudskom probavnom traktu pektin vezuje vodu i formira gel, što u konačnici dovodi do vezanja iona i žučnih kiselina. Sposobnost pektina da stvara gel smatra se mogućim mehanizmom njegovih korisnih učinaka na zdravlje, poput poboljšanog metabolizma kolesterola i lipida, poboljšanog pražnjenja želuca i hipoglikemijskog učinka. Pektini se također istražuju u prevenciji ili liječenju bolesti kao što su crijevne infekcije, ateroskleroza i pretilost. U muškaraca s hiperlipidemijom, pektin je povezan sa smanjenjem vlačne čvrstoće fibrina i povećanjem propusnosti fibrina. Fibrin je vlaknasti, neglobularni protein uključen u zgrušavanje krvi. Kvaliteta fibrina smatra se važnim čimbenikom rizika povezanim s aterosklerozom, moždanim udarom i koronarnom bolesti srca. Razgradnjom pektina u debelom crijevu nastaju kratkolančane masne kiseline, uključujući i octenu, za koju se pretpostavlja da ulazi u perifernu cirkulaciju i mijenja strukturu fibrina. Pektin djeluje kao prirodna profilaktička tvar protiv štetnog djelovanja toksičnih kationa. Snažan je u vezivanju i uklanjanju olova i žive iz gastrointestinalnog trakta. Intravenska injekcija pektina smanjuje vrijeme zgrušavanja krvi i kontrolira hemoragiju ili krvarenje. Pektin je također učinkovit u liječenju proljeva zbog svog baktericidnog djelovanja. Pektin usporava brzinu probave komponenti hrane u crijevima imobilizacijom komponenti hrane, što rezultira slabom apsorpcijom hrane. Također se smatra da pektin ima potencijalnu ulogu u prevenciji raka (Mudgil, 2017). U kolonu podliježe razgradnji djelovanjem bakterija prilikom čega nastaju kratkolančane masne kiseline koje su hrana kolonocitima. Na taj se način osnažuju imunogena

svojstva kolonocita te stoga dostatan unos pektina može biti prevencija kolitisa i raku debelog crijeva (Guillon i Champ, 2000). Na animalnim modelima je dokazano da pektini mogu spriječiti širenje metastaza i rast primarnog tumora. Mehanizam je sljedeći: galektin-3 koji je uključen u nekoliko faza progresije tumora, angiogeneze i odgovora na citotoksične lijekove prepoznaje galakturonsku podjedinicu pektina, veže se za nju i na taj način se inhibira. Stoga, modificirani pektini, u kombinaciji sa citotoksičnim lijekovima, imaju velik potencijal u povećanju učinkovitosti konvencionalne kemoterapije (Munarin i sur., 2012). Nadalje, sigurnost i učinkovitost lijekova može biti poboljšana vezanjem aktivne supstance na nosač od biološkog materijala. Prirodni polimeri su se za većinu načina dostave lijeka pokazali kao inertni i biokompatibilni nosači. Novije studije ukazuju da niskoesterificirani pektini u nazalnim pripravcima s kontroliranim oslobađanjem pokazuju mukoadhezivna svojstva koja se temelje na vodikovim vezama između mucina i slobodnih karboksilnih skupina pektina. U novije vrijeme, bioaktivne komponente poput vitamina, 13 minerala, karotenoida i esencijalnih ulja podliježu nano-inkapsulaciji u svrhu zaštite i povećanja bioraspoloživosti, topljivosti i permeabilnosti. Pektin ima obećavajuću ulogu kao inkapsulacijski materijal budući da djeluje kao stabilizator emulzija i posjeduje gelirajuća svojstva. Osim toga, ovisno o stupnju esterifikacije i metoksilnom udjelu pektini imaju različitu hidrofobnost. Visoko metoksilirani pektini su izrazito hidrofobni i mogu stupati u interakcije s hidrofobnim molekulama kao što su antibiotici i neki vitamini te na taj način poboljšavaju uklapanje lijeka u matriks i osiguravaju kontrolirano oslobađanje (Rehman i sur., 2019).

4.4. Metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz sekundarnih sirovina

Otpad rajčice bogat je izvor bioaktivnih spojeva kao što su karotenoidi, tokoferoli, polifenoli, masne kiseline, steroli i terpeni. Ekstrakcija ovih bioaktivnih tvari izazovan je i važan zadatak za njihov povratak u industrijske lance primjenom koncepta kružnog gospodarstva kako bi se mogli koristiti za novonastale trendove ljudske potražnje (Vilas-Boas i sur., 2021).

Sve tehnike ekstrakcije imaju iste ciljeve - izdvojiti ciljani bioaktivni spoj iz složene biljne matrice, povećati selektivnost i osjetljivost analitičke metode te osigurati ponovljivost (Smith 2003). Mnogo je čimbenika koji mogu utjecati na učinkovitost ekstrakcije, kao što su tlak, temperatura, matrica sirovine i karakteristike otapala (Garcia i Raghavan., 2022). Agroindustrijski ostaci bogati su celulozom, hemicelulozom i ligninom. Ovi polimeri ometaju postupke ekstrakcije pa se stoga moraju provesti neki postupci prethodne obrade za pravilnu ekstrakciju bioaktivnih tvari iz otpada hrane.

Fizička prethodna obrada uključuje smanjenje veličine mljevenjem, obradu parom, hidrotermolizu, mikrovalne i ultrazvučne tretmane. Kemijska prethodna obrada uključuje tretman s alkalijama, kiselinama, kalcijevim hidroksidom, amonijakom, organskim otapalima i vodikovim peroksidom.

Biološka prethodna obrada uključuje izravno tretiranje enzimima ili mikroorganizmima koji proizvode enzime koji mogu razgraditi celulozu i lignin (Arun i sur., 2020).

Bioaktivni spoj se može ekstrahirati iz otpada hrane konvencionalnim (maceracija, Soxhlet ekstrakcija i hidrodestilacija) ili nekonvencionalnim tehnikama (ekstrakcija superkritičnim fluidom, mikrovalno potpomognuta ekstrakcija, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija, enzimski potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja, ekstrakcija subritičnom vodom) (Garcia i Raghavan., 2022).

4.4.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Osnovno načelo konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika je ekstrahiranje odgovarajućim otapalom moguće uz primjenu topline (Zhang i sur., 2018). Neke česte konvencionalne metode ekstrakcije uključuju Soxhlet ekstrakciju, hidrodestilaciju te maceraciju.

Odabir otapala ključan je u procesu ekstrakcije. Alkoholi (metanol i etanol) su najčešće korištena otapala za ekstrakciju bioaktivnih spojeva u konvencionalnim metodama (Tiwari, 2015). Baysal i sur. (2000.) upotrijebili su etanol za ekstrakciju likopena i β -karotena iz komine rajčice koja je sadržavala sušenu i zgnječenu kožicu i sjemenke ploda zajedno sa superkritičnim CO₂ što je rezultiralo iskorištenjem do 50% (Kumar i sur., 2017).

Bandar i sur. (2013) otkrili su da je od različitih organskih otapala korištenih u njihovoj studiji, etanol bio najučinkovitiji, proizvodeći najveći prinos ekstrakcije, a heksan je dao najmanji prinos u ekstrakciji bioaktivnih spojeva konvencionalnim metodama (Kumar i sur., 2017).

Osim alkohola, za ekstrakciju se mogu koristiti i klorirana otapala kao što su kloroform, ugljikov tetraklorid i klorobenzen, te neklorirana otapala, kao što su aceton i acetonitril (Tiwari, 2015). Većina polifenola otapa se u polarnim otapalima, dok će nepolarna otapala poput heksana i acetona pomoći u ekstrakciji lipida i ulja (Salim, 2017). Preferirana su otapala s niskom toksičnošću, niskim vrelištem i sposobnošću brzog prijenosa mase. Veličina čestica također utječe na učinkovitost ekstrakcije.

Stupanj usitnjenosti sirovine vrlo je važan -manje čestice osiguravaju bolje prodiranje otapala; s druge strane, ako je veličina čestica uzorka prevelika, naknadni proces filtracije bit će otežan (Zhang i sur., 2018). Temperatura također igra važnu ulogu - visoke temperature povećavaju topljivost i difuziju, ali mogu uzrokovati gubitak otapala ili uzrokovati razgradnju termoosjetljivih spojeva (Garcia i Raghavan, 2022).

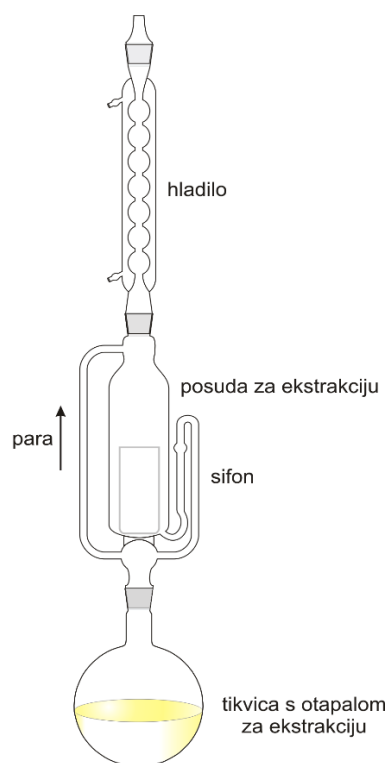
Konvencionalna ekstrakcija otapalom ima svoje prednosti - u usporedbi s drugim metodama jeftinija je i jednostavnija. S druge strane, konvencionalne ekstrakcijske tehnike karakteriziraju velika potrošnja otapala, visoki energetske zahtjevi, toplinska degradacija toplinski labilnih komponenti i predugo trajanje ekstrakcije. Neki primjeri ovih tehnika su Soxhlet ekstrakcija, hidrodestilacija i maceracija (Dhua i sur., 2022).

4.4.1.1. Soxhlet ekstrakcija

Ekstrakcija po Soxhletu radi na principu osmoze i difuzije, uz zagrijavanje sustava. Radi se o kontinuiranoj ekstrakciji što pomaže brzom otapanju željenih komponenata (Arun i sur., 2020). Izvorno je dizajnirana za ekstrakciju lipida iz čvrstog materijala. U Soxhletovom ekstraktoru pare otapala se kondenziraju u komoru s uzorkom i pomoću sifona prelijevaju nazad u tikvicu. Pri svakom ciklusu otopi se dio željene komponente koja se koncentrira u tikvici. Isparavanjem otapala pod vakuumom dobije se čista tvar (www.glossary.periodni.com). Na Slici 7. nalazi se grafički prikaz aparature za Soxhlet ekstrakciju.

Ekstrakcija po Soxhletu tehnika je koja u izvedbi nadilazi druge konvencionalne tehnike ekstrakcije osim u slučaju ekstrakcije termolabilnih spojeva. Učinkovitost ove metode (kao i svih drugih tehnika ekstrakcije) ovisi o karakteristikama biljke i veličini čestica budući da unutarnja difuzija može biti ograničavajući korak tijekom ekstrakcije. Prednosti Soxhlet ekstrakcije uključuju kontinuirani kontakt svježeg otapala s čvrstom matricom i odsutnost koraka filtracije nakon ispiranja. S druge strane, vrijeme ekstrakcije je dugo, potrošene su velike količine otapala, ne može se osigurati miješanje i postoji velika mogućnost termičke razgradnje karotenoida jer se ekstrakcija obično događa na točki vrenja otapala dulje vrijeme. Soxhlet ekstrakcija uglavnom se primjenjuje kao laboratorijska tehnika ili tehnika ekstrakcije na mikro skali (Strati i sur., 2014).

U studiji koju su proveli Giuffrè i Capocasale (2015) Soxhlet ekstrakcija petroleterom korištena je za dobivanje ulja iz sjemenki rajčice.



Slika 7. Grafički prikaz aparature za Soxhlet ekstrakciju (preuzeto iz Nikolić, 2018)

4.4.1.2. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je destilacija kojom se iz biljnog materijala obradom pomoću vode ili vodene pare dobivaju eterična ulja i hidrolat. Destilacija kao metoda izolacije eteričnih ulja temelji se na zagrijavanju biljnog materijala u vodi ili u prisustvu vodene pare. Porast temperature dovodi do isparavanja hlapljivih spojeva koji se potom kondenziraju. Osnovni nedostatak destilacije je nepovoljni utjecaj povišene temperature pri čemu mogu nastati, a najčešće i nastaju, spojevi koji izvorno nisu prisutni u biljnom materijalu iz kojeg se izoliraju hlapljivi spojevi. Takvi spojevi nazivaju se artefaktima, a nastaju dekompozicijom (razgradnjom) ili međusobnom reakcijom individualnih isparljivih spojeva prisutnih u biljnom materijalu. Kondenzirana voda zajedno sa djelomično otopljenim ili emulgiranim komponentama eteričnog ulja naziva se hidrosol ili hidrolat, a također se koristi kao mirisni proizvod osobito u kozmetici (ružina voda, lavandina voda i dr.). U industrijskim pogonima najčešće se koristi parna destilacija koja se primjenjuje za izolaciju eteričnih ulja iz svježeg biljnog materijala. Prednost parne destilacije

je, osim što isključuje toplinsku razgradnju i nastajanje artefakata, to što smanjuje mogućnost od požara. (Žilić, 2019).

4.4.1.3. Maceracija

Maceracija je postupak iscrpljivanja (ekstrakcije) djelotvornih tvari iz usitnjenih biljnih droga pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Kao otapalo koristi se destilirana voda, heksan, alkohol, eter, ocat, vino ili smjesa tih tekućina. Usitnjena droga u obliku praška prelije se otapalom (ekstraktnim sredstvom). Nakon iscrpljivanja odvoji se ekstraktna tekućina od iscrpljene droge. Ekstraktna tekućina ostavi se nekoliko dana na hladnome mjestu, zaštićenom od svjetla, da se izbistri, a zatim se filtrira (www.enciklopedija.hr).

U studiji koju su proveli Kehili i suradnici (2017.) uspoređivala se učinkovitost superkritične CO₂ ekstrakcije likopena kao uljne smole iz nusproizvoda kore rajčice iz tuniške industrije s onom konvencionalne ekstrakcije maceracijom pomoću heksana, etil acetata i etanola. Rezultati ove studije pokazali su da je tehnika superkritične CO₂ ekstrakcije dovela do značajno većeg prinosa likopena. Među tri primijenjena otapala, heksan je uočen kao najprikladnije otapalo za ekstrakciju likopena (50,83%), dok su etil acetat i etanol doveli do nižih, ali prilično sličnih prinosa likopena, od 26,74% odnosno 23,75% (Kehili i sur., 2017). Usporedno, studija Stratija i Oreopouloua (2011.) istraživala je prinose ekstrakcije likopena korištenjem maceracije s heksanom, acetonom, etil acetatom i etanolom. Rezultati ove studije također su otkrili da su najniži (66%) i najveći (84%) prinosi ekstrakcije likopena dobiveni korištenjem etanola i heksana. Ova se činjenica može objasniti uglavnom na temelju polariteta otapala i hidrofobnog afiniteta likopena (Strati i Oreopoulou, 2011). Budući da je likopen hidrofobni pigment, on se puno bolje otapa u heksanu koji ima najniži polaritet u usporedbi s etil acetatom i etanolom (Kehili i sur., 2018).

4.4.2. Zelene ekstrakcijske tehnike

Kako bi se prevladali nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije razvijene su druge metode ekstrakcije koje karakterizira kraće vrijeme ekstrakcije, bolja učinkovitost i selektivnost, kao i korištenje manjih količina otapala. Te se tehnike nazivaju nekonvencionalnim ili tehnikama zelene ekstrakcije (Mena-Garc i sur., 2019). Naziv "zelena ekstrakcija" koristi se zbog manje potrošnje energije, primjene netoksičnih otapala, obnovljivih sirovina i kraćeg trajanja ekstrakcije. Ove metode ekstrakcije su novi trendovi za dobivanje bioaktivnih spojeva iz mnogih biljnih izvora uključujući otpad hrane budući da predstavljaju održivu opciju u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije.

Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije slijede niz principa, kao što su inovacija u odabiru obnovljivih biljnih izvora kao što je otpad hrane, korištenje alternativnih otapala, smanjenje energije, proizvodnja koprodukata te dobivanje biorazgradivog i čistog ekstrakta. Većina organskih otapala su hlapljiva, zapaljiva, pa čak i otrovna. Korištenje alternativnih otapala dobra je opcija za zamjenu petrokemijskih otapala. Međutim, neka alternativna otapala imaju ograničenja, poput visoke viskoznosti i visoke točke vrelišta. Prinos ekstrakcije ovisit će o nekoliko čimbenika, kao što je dizajn procesa, odabir otapala i vrsta matrice. Nove tehnike ekstrakcije također se mogu koristiti kao predtretman ili u kombinaciji s alternativnim otapalima za poboljšanje ekstrakcije. Neki primjeri ovih tehnika su ekstrakcija superkritičnim fluidom, mikrovalno potpomognuta ekstrakcija, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija, enzimski potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja, te ekstrakcija subritičnom vodom (Garcia i Raghavan, 2022).

4.4.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom ekološki je prihvatljiva tehnika i obično se koristi za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora kao što su biljke, nusproizvodi hrane, alge i mikroalge. Superkritični ugljikov dioksid (SC-CO₂) atraktivna je alternativa organskim otapalima budući da nije eksplozivan, netoksičan je i jeftin. Posjeduje sposobnost solubilizacije lipofilnih tvari i može se lako ukloniti iz konačnih proizvoda.

Tijekom procesa ekstrakcije, sirovina se stavlja u spremnik za ekstrakciju opremljen regulatorima temperature i tlaka za održavanje potrebnih uvjeta. Nakon toga, spremnik za

ekstrakciju je pod pritiskom tekućine pomoću pumpe. Nakon što se tekućina i otopljeni spojevi transportiraju u separatore produkti se skupljaju kroz slavinu koja se nalazi u donjem dijelu separatora. Na kraju, tekućina se regenerira i kruži ili ispušta u okoliš. Odabir superkritičnih fluida vrlo je važan za pravilno funkcioniranje ovog procesa i širok raspon spojeva može se koristiti kao otapalo u ovoj tehnici (Kumar i sur., 2017). Superkritični fluidi imaju privremena fizikalno-kemijska svojstva (viskoznost, difuznost, gustoća, dielektrična konstanta itd.) između tekućina i plinova. Iznad kritične točke viskoznost superkritičnih fluida je niska, a difuznost visoka. Promjenom temperature i tlaka mogu se prilagoditi fizikalno-kemijska svojstva superkritičnih fluida. Njihova gustoća također se može modificirati promjenom temperature i tlaka kako bi se povećala topljivost ciljnih spojeva. Superkritični fluidi imaju poboljšanu mogućnost transporta, stoga mogu lako difundirati u čvrste tvari i dati bržu stopu ekstrakcije. Tvari koje se koriste kao superkritični fluidi su CO₂, voda, amonijak i ugljikovodici poput propana, etana i fluoriranih ugljikovodika (Dhua i sur., 2022).

CO₂ je najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju superkritičnim fluidom te ima kritičnu temperaturu i tlak od 31 °C i 74 bara i nudi stabilne radne uvjete za tlakove između 100 do 450 bara. Međutim, zbog niske polarnosti CO₂, ekstrakcija je uglavnom ograničena na nepolarne spojeve. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje može se dodati kemijski modifikator za poboljšanje polariteta kao što je etanol, metanol, voda i aceton (Garcia i Raghavan, 2022). Korištenje CO₂ pomaže u izbjegavanju njegovog ispuštanja u atmosferu i minimiziranju efekta staklenika. Zbog toga se ekstrakcija superkritičnim fluidom smatra ekološki prihvatljivom tehnologijom (Dhua i sur., 2022).

Bioaktivni spojevi mogu se ekstrahirati ovom tehnikom uz visoke prinose ekstrakcije. Rezultati pokazuju da se likopen može sa značajnim uspjehom ekstrahirati iz nusproizvoda industrije prerade rajčice ekstrakcijom superkritičnim fluidom uz korištenje CO₂ bez upotrebe suotapala. Utvrđeno je da su i temperatura i tlak utjecali na ekstrakciju likopena te da je optimalna kombinacija temperature i tlaka, 86 °C i 34,47 MPa, rezultirala ekstrakcijom 61,0% likopena prisutnog u uzorku korištenjem 500 mL CO₂ na protok od 2,5 mL/min. (Rozzi i sur., 2002).

4.4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima inovativna je i zelena ekstrakcijska tehnologija koja se kombinira s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije koje uključuju otapala za ekstrakciju različitih ciljanih spojeva. Zahvaljujući umjerenim kapitalnim troškovima, dobrim performansama u atmosferskim uvjetima i posebnom mehanizmu zagrijavanja, ova ekstrakcija vodeća je i najšire prihvaćena alternativna tehnika konvencionalnim metodama ekstrakcije. Prednosti ovog procesa su: skraćeno vrijeme ekstrakcije, niska potrošnja energije, povećani prinos, smanjena upotreba otapala, zadržavanje cjelovitosti ekstrahiranih spojeva, ekstrakcija i polarnih i nepolarnih spojeva istovremeno, ekstrakcija bez upotrebe otapala pojedinih spojeva kao što su ulja, određivanje analita u malim uzorcima od samo 0,1 g i manji sigurnosni rizik (Dhua i sur., 2022). Mnogo bioaktivnih spojeva može se dobiti ovom metodom ekstrakcije, kao što su fenoli, karotenoidi i flavonoidi. Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima kombinacija gradijenata topline i mase odgovorna je za ubrzanje i visok prinos ekstrakcije. Ekstrakcija započinje prodiranjem otapala u biljnu matricu, zatim se uz pomoć elektromagnetskih valova komponente razgrađuju, a solubilizirane komponente se prenose iz netopljive matrice u glavnu otopinu, završavajući odvajanjem tekuće i zaostale krute faze.

Ovakav tip ekstrakcije može se izvesti sa ili bez upotrebe otapala. Najviše se koristi etanol u kombinaciji s vodom zbog dobre sposobnosti apsorpcije mikrovalne energije i dobre topivosti spojeva. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju su izbor snage mikrovalova, temperatura ekstrakcije, vrijeme i količina otapala. Zabilježeno je da je omjer otapalo-krutina između 10:1 i 20:1 optimalan za ovu ekstrakciju (Garcia i Raghavan, 2022).

U studiji koju su proveli Ho i sur. (2015) dokazano je da su optimalni uvjeti za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju likopena iz otpada rajčice postignuti korištenjem omjera otapala i krutine 10:1 uz primjenu etil acetata kao otapala tijekom 1 minute. Dodatno, elektronske mikrofografije su pokazale da je ekstrakcija značajno poremetila staničnu strukturu rajčice, što je vjerojatno omogućilo poboljšani prinos likopena (Ho i sur., 2015).

4.4.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, koja se također naziva i sonikacija, koristi zvučne valove od 20 kHz do 100 MHz. Takav val putuje kroz medij i stvara kompresiju i ekspanziju, što dovodi do fenomena kavitacije. Proces kavitacije uključuje stvaranje, rast i kolaps sitnih mjehurića. Kada mjehurići prijeđu kritični promjer raspadaju se inducirajući veliku količinu energije koja kinetičko gibanje pretvara u toplinu. Procjenjuje se da mjehurići imaju temperaturu od približno 4700 °C i tlak od 1000 atm. Materijali koji imaju učinak kavitacije su tekućine i čvrste tvari koje sadrže tekućinu (Garcia i Raghavan, 2022).

Ultrazvuk izaziva difuziju otapala u stanične materijale, poboljšava prienos mase analita u otapalo i narušava strukturu stanične stijenke čime se olakšava otpuštanje bioaktivnih komponenti (Kumar i sur., 2017). Na prinos ekstrakcije uvelike utječu vlaga, veličina čestica, otapalo, temperatura, vrijeme sonikacije i tlak. Zabilježeno je da je pri niskim frekvencijama od 20 do 40 kHz prinos ekstrakcije veći, također niske temperature pojačavaju kavitaciju, a viskozna otapala ju smanjuju (Garcia i Raghavan, 2022). Prednosti ove ekstrakcije uključuju manju potrošnju energije, veći prinos proizvoda, kratko vrijeme obrade, smanjenje otpada i opasnih tvari te manju upotrebu kemikalija (Dhua i sur., 2022).

Kombinacija tehnika ekstrakcije može se koristiti za povećanje prinosa ekstrakcije. Studija koju su proveli Lianfu i Zelong (2008) pokazala je da se 97,4% likopena može ekstrahirati iz paste od rajčice pomoću mikrovalova (98 W) koji se dovode u ultrazvučnu kupelj koja radi na 40 kHz i 50 W, s vremenom ekstrakcije od 365 s i temperaturom od 86,4 °C koristeći etil acetat kao otapalo. Korištenjem samo ultrazvučno potpomognute ekstrakcije može se postići prinos likopena od 89,4% (Lianfu i Zelong, 2008).

U studiji koju su proveli Gomes i sur. (2021) provedeno je usporedno istraživanje konvencionalne i ultrazvukom potpomognute ekstrakcije polifenola iz otpada od prerade rajčice. Sadržaj fenola dobiven konvencionalnom ekstrakcijom iznosio je 76 %, a ovakav značajan rezultat u skladu je s korištenjem organskih otapala koja su manje polarna od vode čime se poboljšava ekstrakcija polifenola. Ultrazvučnom ekstrakcijom postignut je nešto veći oporavak fenolnih spojeva u odnosu na metodu konvencionalne ekstrakcije u kraćem vremenu (10 minuta). Temperaturna sonda je u deset minuta postigla 82 °C, pa je ekstrakcija prekinuta. U ovoj studiji, 10 minuta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom bilo je dovoljno za ekstrakciju sličnog udjela fenola kao u 40 minuta konvencionalne ekstrakcije.

Otpriblike 21 % fenolnih spojeva prisutnih u konvencionalnim i ultrazvučno potpomognutim ekstraktima u ovom istraživanju predstavljaju flavonoidi što je u skladu s prethodnim studijama koje su pokazale da su kore rajčice zanimljiv izvor nekoliko flavonoida poput rutina, naringenina i kvercetina.

U ovom slučaju rutin je odabran kao spoj testiran na biodostupnost. U oba ekstrakta, visoki postotak flavonoida izgubljen je tijekom simulirane probave, što je rezultiralo biodostupnošću od približno 13 %. Ove se vrijednosti smatraju prilično niskima u usporedbi s drugim studijama za biljne ekstrakte gdje biodostupnost flavonoida varira od 30 do 100%. Moguće je da je uočeni gubitak nastao tijekom koraka oralne probave zbog stvaranja netopivih agregata uzrokovanih interakcijom između proteina sline i polifenola. Uočena je potpuna degradacija ili značajno smanjenje glavnih fenolnih spojeva, uključujući rutin, tijekom želučane probave. Prijelaz iz kiselih želučanih uvjeta u blago alkalno crijevno okruženje koje sadrži žučne kiseline i pankreatin također može potaknuti razgradnju fenolnih spojeva.

Ekstrakti su pokazali dobru stabilnost tijekom uvjeta skladištenja, što ukazuje na njihovu moguću daljnju tehnološku primjenu.

Može se zaključiti kako se ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pokazala kao obećavajuća alternativa za ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva iz nusproizvoda rajčice koja se očituje i značajnom učinkovitošću zbog kraćeg vremena ekstrakcije (Gomes i sur., 2021).

4.4.2.4. Enzimski potpomognuta ekstrakcija

Enzimski potpomognuta ekstrakcija može se koristiti kao metoda pred-ekstrakcije ili ekstrakcije za dobivanje bioaktivnih spojeva. Stijenka biljne stanice se uništava, a bioaktivni spojevi vezani za lance ugljikohidrata i lipida se oslobađaju. Ovaj proces odvija se pod djelovanjem enzima kao što su celulaza, pektinesteraza, hemicelulaza, fruktoziltransferaza, pektinaza, α -amilaza i proteaza u ekstrakciji otapalom (Garcia i Raghavan, 2022). Ti enzimi pomažu razgraditi strukturu stanične stijenke i depolimerizirati polisaharide biljnih staničnih stijenki olakšavajući oslobađanje bioaktivnih spojeva (Kumar i sur., 2017).

Enzimski potpomognuta ekstrakcija ubraja se u tehnike zelene ekstrakcije zbog prirodnog podrijetla enzima i upotrebe vode umjesto opasnih otapala. Ova tehnika koristi se kada su spojevi biljne matrice sačuvani vodikovim ili hidrofobnim vezama u mreži polisaharid-lignin i nisu dostupni za uklanjanje pomoću otapala u tradicionalnom procesu ekstrakcije. Čimbenici

koji utječu na ekstrakciju su sadržaj vlage, veličina čestica materijala, kemijski sastav biljne matrice, vrsta i doza enzima, količina otapala, vrijeme i temperatura (Garcia i Raghavan, 2022). Enzimski potpomognuta ekstrakcija uglavnom se provodi putem dva mehanizma: vodenom ekstrakcijom uz pomoć enzima i hladnim prešanjem uz pomoć enzima. Vodena ekstrakcija potpomognuta enzimima uglavnom se koristi za ekstrakciju ulja iz sjemenki. Kod enzimski potpomognutog hladnog prešanja dolazi do hidrolize stanične stijenke zbog aktivnosti enzima (Dhua i sur., 2022).

Zuorro i sur. (2011.) proučavali su enzimski potpomognutu ekstrakciju likopena iz frakcije kore otpada od prerade rajčice i otkrili da se prinos likopena može znatno poboljšati upotrebom mješovitih enzimskih pripravaka s celulolitičkim i pektinolitičkim djelovanjem. Konkretno, prethodna obrada ljuske rajčice s pripravkom koji je sadržavao celulazu i pektinazu u omjeru 50:50 rezultirala je 8 do 18 puta većim prinosom ekstrakcije. Ova činjenica, zajedno s relativno niskom cijenom komercijalnih enzimskih pripravaka za hranu daje snažnu potporu mogućoj implementaciji procesa na industrijskoj razini (Zuorro i sur., 2011).

Međutim, enzimski potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva ima potencijalna komercijalna i tehnička ograničenja; enzimi su relativno skupi za obradu velikih količina sirovina, raspoloživi enzimski pripravci ne mogu u potpunosti hidrolizirati stanične stijenke biljaka te ekstrakciju potpomognutu enzimima nije uvijek moguće primijeniti u industrijskim razmjerima jer se enzimi ponašaju drugačije u različitim okolišnim uvjetima (ovisno o postotku otopljenog kisika, temperaturi i dostupnosti hranjivih tvari).

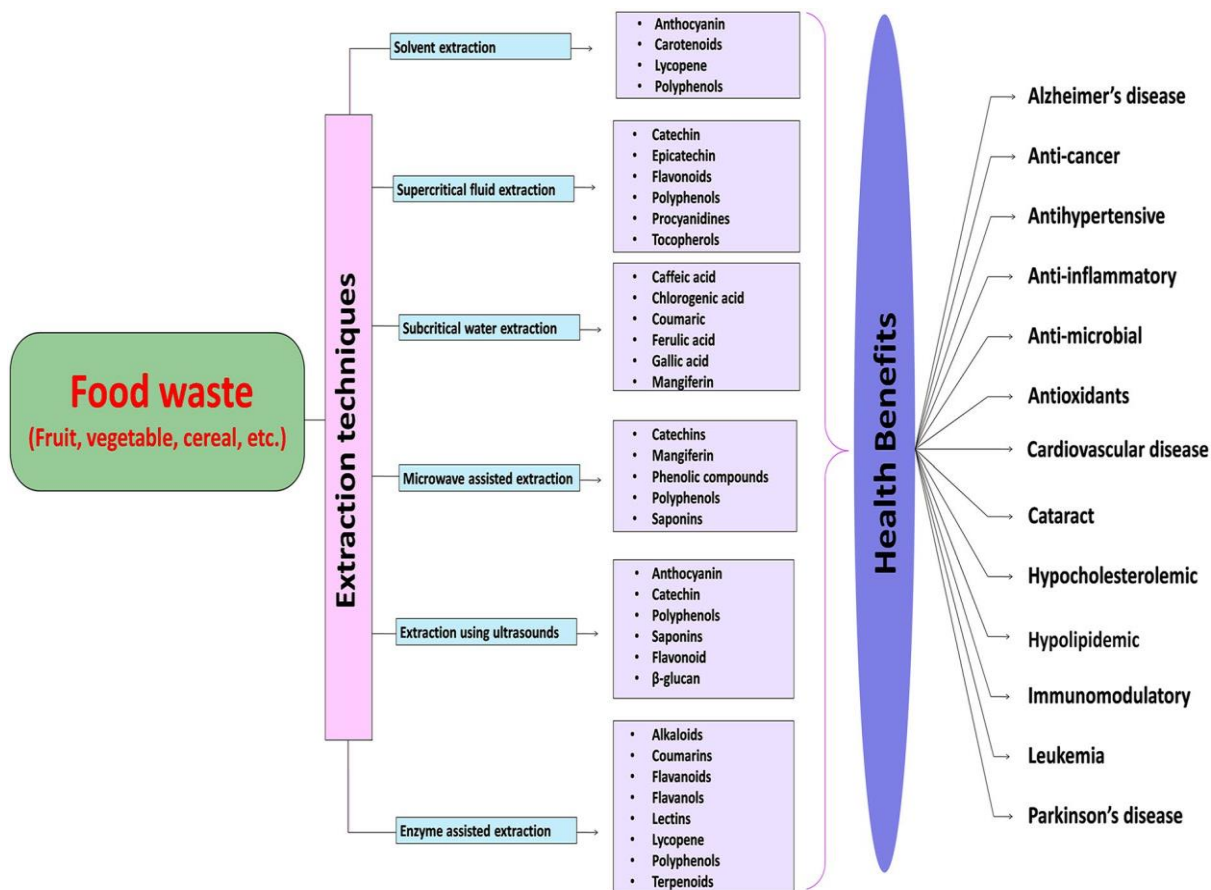
Međutim, ako bi se navedena ograničenja mogla prevladati, tada bi ekstrakcija temeljena na enzimima mogla pružiti priliku ne samo za povećanje prinosa ekstrakcije, nego i za poboljšanje kvalitete proizvoda korištenjem blažih uvjeta obrade kao što je niža temperatura ekstrakcije (Strati i sur., 2014).

4.4.2.5. Ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja

Ekstrakcija primjenom pulsirajućeg električnog polja vrlo je obećavajuća tehnika u razvoju za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz otpada hrane i nusproizvoda korištenjem električnog polja. Materijal koji se tretira postavlja se između dvije elektrode. Dovedeni napon stvara električno polje. Intenzitet ovog električnog polja osim o dovedenom naponu ovisi i o razmaku između dviju elektroda. Kada su biljne stanice izložene električnom polju citoplazmatske membrane se oštećuju i stvaraju se privremene (reverzibilne) ili trajne (ireverzibilne) pore. Ovaj fenomen, poznat kao elektroporacija, drastično povećava propusnost stanične membrane čime se povećava lakoća ekstrakcije. Umjereno električno polje (0,5 i 1 kV/cm električnog polja tijekom $10^{-4} - 10^{-2}$ s) dovodi do oštećenja stanične membrane uz minimalno povećanje temperature. Zbog toga je ovaj postupak prikladan za ekstrakciju spojeva osjetljivih na toplinu. Općenito, pulsirajuće električno polje koristi se kao predtretman za poboljšanje procesa ekstrakcije. Velik broj prehrambenih industrija usvojio je ovu tehniku za predobradu matrica hrane i povećanje prinosa ekstrakcije. Prednosti ekstrakcije primjenom pulsirajućeg električnog polja su niska potreba za energijom i to što ne utječe na cjelokupnu strukturu stanice zbog selektivne ekstrakcije unutarstaničnih spojeva. Zato su ekstrakti čišći te nema potrebe za dodatnim koracima pročišćavanja što dovodi do smanjenja ukupnih operativnih troškova (Dhua i sur., 2022).

Jayathunge i sur. (2017), istraživali su utjecaj predtretmana pulsirajućim električnim poljem umjerenog intenziteta na povećanje biodostupnosti likopena u plodu rajčice te kombinirani učinak blanširanja, ultrazvučne obrade i obrade pulsirajućim električnim poljem visokog intenziteta na daljnje poboljšanje biodostupnosti likopena nakon cijedenja soka. Zaključili su da je samo tretman blanširanja praćen pulsničnim električnim poljem visokog intenziteta pokazao značajno otpuštanje trans- $(4,01 \pm 0,48)$ i cis- $(5,04 \pm 0,26)$ lg/g likopena čime se postiglo 15,6% ukupne biodostupnosti likopena. Stoga su zaključili da je obrada prethodno blanširanog soka iz obrađene rajčice korištenjem pulsničnog električnog polja visokog intenziteta najbolji pristup za postizanje najveće nutritivne vrijednosti (Jayathunge i sur., 2017).

Na Slici 8. nalazi se shematski prikaz različitih tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz otpada hrane i njihovih učinaka na zdravlje ljudi.



Slika 8. Shematski prikaz različitih tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz otpada hrane i njihovih učinaka na zdravlje ljudi (preuzeto iz Kumar i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

Otpad od hrane nastaje u svim fazama životnog ciklusa hrane - tijekom poljoprivredne proizvodnje, industrijske proizvodnje, prerade i distribucije. Osim što se na taj način neracionalno troše brojni resursi uloženi u proizvodnju hrane, nastanak otpada je i značajan ekološki problem. Stoga se korištenje otpada od hrane kao sekundarne sirovine za ekstrakciju spojeva s mogućnošću primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji istražuje sve više.

Tijekom industrijske prerade rajčice stvaraju se velike količine otpada koji se sastoji od kore, sjemenki, vlaknastih dijelova i ostataka pulpe. Iako ovaj otpad nema komercijalnu vrijednost, on je bogat izvor hranjivih tvari i visoko biološki aktivnih spojeva koji se mogu koristiti kao nutraceutici u funkcionalnoj hrani, i dodacima prehrani te koristiti kao prirodni aditivi.

Najzastupljeniji bioaktivni spojevi prisutni u rajčicama i njihovim industrijskim nusproizvodima su karotenoidi, a posebno likopen i beta karoten, fenoli, flavonoidi, steroli te tokoferoli. Ovi spojevi posjeduju iznimnu antioksidativnu aktivnost, stoga se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi za formulaciju funkcionalne hrane ili mogu poslužiti kao aditivi u prehrambenim proizvodima za produljenje njihovog roka trajanja.

Bioaktivni spojevi mogu se izdvojiti iz otpada rajčice konvencionalnim ili nekonvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Zelene ekstrakcijske tehnike smanjuju upotrebu toksičnih otapala, skraćuju vrijeme trajanja ekstrakcije i poboljšavaju učinkovitost ekstrakcijskog procesa. Nadalje, korištenje zelenih tehnika održiva je opcija za ekstrakciju bioaktivnih spojeva jer je moguće raditi sa „zelenim“ otapalima kao što je voda, a u nekim slučajevima čak i bez otapala. Kombinacija više od jedne tehnike zelene ekstrakcije daje bolje rezultate u smislu prinosa ekstrakcije i čistoće ekstrakta. Najčešće korištene tehnike zelene ekstrakcije su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom, zbog njihovih brojnih prednosti kao što je učinkovito razbijanje stanične stijenke u kraćem vremenu te istražen i razvijen proces kako na laboratorijskoj tako i na industrijskoj razini.

6. LITERATURA

Alancay MM, Lobo MO, Quinzio CM, Iturriaga LB. Extraction and physicochemical characterization of pectin from tomato processing waste. *Journal of Food Measurement and Characterization*, Berlin, Springer, 2017, 11(4), 2119–2130.

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996;88:1560–1570.

Amengual J, Coronel J, Marques C, Aradillas-García C, Vargas Morales JM, Andrade FCD, Erdman JW, Teran-Garcia M. β -Carotene Oxygenase 1 activity modulates circulating cholesterol concentrations in mice and humans. *J. Nutr.* 2020;150:2023–2030.

Arun KB, Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Pandey A, Reshmy R, Sirohi R. Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactives and biopolymers. *Ind Crops Prod.* 2020; 154

Bagarić M. Biodostupnost hidrokstirosola i tirosola iz ekstrakta komine masline, 2020.

Bandar H, Hijazi A, Rammal H, Hachem A, Saad Z, Badran B. Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*. *Am J Phytomed Clin Ther.* 2013; 6:507–513

Bayon B, Berti IR, Gagneten AM, Castro GR. Biopolymers from wastes to high-value products in biomedicine. U: Waste to health. Singhania RR, Agarwal RA, Kumar RP, Sukumaran RK, urednici, Singapore, Springer, 2017, str. 1-44.

Baysal T, Ersus S, Starmans D. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J Agric Food Chem.* 2000. 48:5507–5511

Bechor S, Relevy NZ, Harari A, Almog T, Kamari Y, Ben-Amotz A, Harats D, Shaish A. 9-Cis β -carotene increased cholesterol efflux to HDL in macrophages. *Nutrients.* 2016;8:435.

Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY. Nutrition intervention trials in linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:1483–1491.

Caffall KH., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 2009, 344, 1879-1900.

Calvo MM, Dado D, Santa-María G. Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *Eur Food Res Technol.* 2007; 224, 567-571.

Cicero AFG, Rizzo M. Nutraceuticals and Cardiovascular Disease. *Contemporary Cardiology*. Cham, Humana Press, 2021, str. 27-29, 38

Dhua, S, Kumar K, Sharanagat VS, Nema PK. Bioactive compounds and its optimization from food waste: review on novel extraction techniques. *Food Sci Nutr*. 2022; 1270-1288

Dranca F, Oroian M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Res. Int*, 2018, 113, 327–350.

Eh AL, Teoh SG. Novel modified ultrasonication technique for the extraction of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem*. 2012 Jan;19(1):151-9.

Eita AAB, Zaki AM, Mahmoud SA. Serum 8-Isoprostane Levels in Patients with Resistant Oral Lichen Planus before and after Treatment with Lycopene: A Randomized Clinical Trial. *BMC Oral Health* 2021, 21, 343.

Eliassen AH, Hendrickson SJ, Brinton LA, Buring JE, Campos H, Dai Q, Dorgan JF, Franke AA, Gao YT, Goodman MT. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: Pooled analysis of eight prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst*. 2012;104:1905–1916.

Filić Z. Interakcije prehrambenih vlakana s karotenoidima i kurkuminom iz biljnih ekstrakata: utjecaj na biodostupnost, 2022.

Gammone MA, Riccioni G, D' Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr Res*. 2015; 59:1-11.

Ge X, Xing M, Yu L, Shen P. Carotenoid intake and esophageal cancer risk: A meta-analysis. *Asian Pacific J. cancer Prev*. 2012;14:1911–1918.

Giuffrè AM, Capocasale M. Policosanol in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed Oil: the Effect of Cultivar. *J Oleo Sci*. 2015;64(6):625-31.

Gomes F. dos S, Silva LOM, Beres C, Pagani MM, Brígida AIS, Santiago MCP de A, Pacheco S, Godoy R. de O, Cabral LMC. Processing tomato waste as a potential bioactive compounds source: phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility studies, *Food tech*. 2022; 1678-4596

Guillon F, Champ M. Structural and physical properties of dietary fibers and consequences of processing on human physiology. *Food Resear Int*, 2020, 33, 237-244.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller VS. Biosynthesis of Pectin. *J. Plant Physiol*, 2010, 153, 384-395.

Ho KKHY, Ferruzzi MG, Liceaga AM, San MartínGonzalez MF. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *LWT - Food Science and Technology*. 2015; 62 (1):160–8.

Horvat M. Utjecaj ciklodekstrina na bioraspoloživost hidrokstirosola, tirosoila i oleuropeina iz ekstrakta komine masline, 2019.

- Jagodić AM, Karakterizacija pektina ekstrahiranih iz komine rajčice i mandarine, 2021.
- Jayathunge K, Stratakos AC, Cregenzán-Albertia O, Grant IR, Lyng J, Koidis A. Enhancing the lycopene in vitro bioaccessibility of tomato juice synergistically applying thermal and non-thermal processing technologies. *Food Chem.* 2017; 221:698–705
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Pyriochou V, Peristeraki A, Karathanos, VT. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT - Food Science and Technology.* 2012; 49(2), 213–216.
- Kaur D, Wani AA, Oberoi DP, Sogi DS. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chem.* 2008 May 15;108(2):711-8.
- Kehili M, Choura S, Zammel A, Allouche N, Sayadi S. Oxidative stability of refined olive and sunflower oils supplemented with lycopene-rich oleoresin from tomato peels industrial by-product, during accelerated shelf-life storage. *Food Chem.* 2018 Apr 25;246:295-304.
- Kehili M, Kammlott M, Choura S, Zammel A, Zetzl C, Smirnova I, Allouche N, Sayad S. Supercritical CO₂ extraction and antioxidant activity of lycopene and βcarotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) peels by-product of a Tunisian industry. *Food and Bioproducts Processing* 2017; 102(2), 340–349.
- Khamsucharit P, Laohaphatanalert K, Gavinlertvatana P, Sriroth K, Sangseethong K. Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. *Food Sci Biotechnol.* 2017; 27, 623–629.
- Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Hellövaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 1997;146:223–230.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002;76:560–568.
- Kumar K, Yadav AN, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal HS. Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresour. Bioprocess.* 2017; 4, 18
- Kushwaha R, Rauniar GP, Rimal J. Clinical Assessment of the Effects of Lycopene in the Management of Oral Lichen Planus. *Int. Dent. Med. J. Adv. Res.-Vol.* 2019, 5, 1–5.
- Kute AB, Mohapatra D, Kotwaliwale N, Giri SK, Sawant BP. Characterization of Pectin Extracted from Orange Peel Powder using Microwave-Assisted and Acid Extraction Methods. *Agric Res*, 2020, 9, 241-248.
- Lagiou P, Rossi M, Lagiou A, Tzonou A, La Vecchia C, Trichopoulos D. Flavonoid intake and liver cancer: A case-control study in Greece. *Cancer Causes Control.* 2008;19:813–818.

Lai WT, Khong, NMH, Lim SS, Hee YY, Sim BI, Lau KH, Lai OM. A review: modified agricultural by-products for the development and fortification of food products and nutraceuticals. *Trend. Food Sci. Technol.* 2017; 59, 148–160

Laranjeira T, Costa A, Faria-Silva C, Ribeiro D, de Oliveira JMPF, Simões S, Ascenso A. Sustainable Valorization of Tomato By-Products to Obtain Bioactive Compounds: Their Potential in Inflammation and Cancer Management. *Molecules.* 2022 Mar 4;27(5):1701.

Lianfu Z, Zelong L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem.* 2008 Jul;15(5):731-7.

Lipinski B, Hanson C, Lomax J, Kitinoja L, Waite, R, Searchinger T, 2013. Reducing Food Loss and Waste. Working Paper, Installment 2 of Creating a Sustainable Food Future

Liu C, Lian F, Smith DE. Lycopene supplementation inhibits lung squamous metaplasia and induces apoptosis via upregulating insulin-like growth factor-binding protein 3 in cigarette smoke-exposed ferrets. *Cancer Res.* 2003; 63:3138-3144

Loa J, Chow P, Zhang K. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009;63:1007–1016.

Löfgren C. Pectins-structure and gel forming properties, a literature review. SIK Institute for Food and Biotechnology, Švedska, 2000, 665.

Lu Z, Wang J, Gao R, Je F, Zhao G. Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, 86, 172-187.

Maceracija 2023., <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=37829>, pristupljeno 15.5.2023.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727-47.

Marić M, Grassino AN, Zhu Z, Barba FJ, Brnčić M, Rimac Brnčić S. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and byproducts: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 7, 28-37.

Martí R, Roselló S, Cebolla-Cornejo J. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers (Basel).* 2016 Jun 20;8(6):58.

Marunica M. Određivanje luteina u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima, 2020.

Md Salim NS. 2017. Potential utilization of fruit and vegetable wastes for food through drying or extraction techniques. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science* 1 (2)

Mena-García A, Ruiz-Matute AI, Soria AC, Sanz ML. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *Trends Analyt Chem.* 2019; 119:115612.

Miletić V. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola izoliranih iz kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta, 2017.

Mohamed H. Extraction and characterization of pectin from grapefruit peels. *Food Process Technol*, 2016, 2, 3138.

Molteni C, La Motta C, Valoppi F. Improving the Bioaccessibility and Bioavailability of Carotenoids by Means of Nanostructured Delivery Systems: A Comprehensive Review. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Sep 28;11(10):1931.

Mondul AM, Sampson JN, Moore SC, Weinstein SJ, Evans AM, Karoly ED, Virtamo J, Albanes D. Metabolomic profile of response to supplementation with beta-carotene in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;98:488–493.

Mudgil D. The interaction between insoluble and soluble fiber. In: Dietary fiber for the prevention of cardiovascular disease. Academic Press, 2017. str. 35-59.

Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int. J. Biol. Macromol*, 2012, 51(4), 681–689.

Nawaz A, Li E, Khalifa I, Walayat N, Liu J, Nilofar, Muhammad Ahsan H, Irshad S, Barakat H, Lorenzo JM. Effect of Structurally Different Pectin on Dough Rheology, Structure, Pasting and Water Distribution Properties of Partially Meat-Based Sugar Snap Cookies. *Foods*. 2021; 10(11):2692.

Nikolić ME. Određivanje sadržaja masti u hrani za nesilice Soxhlet metodom, 2018.

Nobre BP, Palavra AF, Pessoa FL, Mendes RL. Supercritical CO₂ extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food Chem.* 2009; 116(3), 680-685.

Nour V, Panaite TD, Ropotă M, Turcu RP, Trandafir I, Corbu AR. Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste. *CyTA - Journal of Food*. 2018; 16, 222 - 229.

Olson JA. Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of β -Carotene into Vitamin A. *J. Nutr.* 1989; 119(1), 105–108.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH. Effects of a combination of beta carotene and vitamin a on Lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 1996;334:1150–1155.

Otpad hrane u Europi, 2023., <https://www.eufic.org/en/food-safety/article/food-waste-in-europe-statistics-and-facts-about-the-problem>, pristupljeno 4.5.2023.

Otpad od hrane, 2023.,

https://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/021_otpad/Upute/OTP_D_Sprjeca_vanje%20nastanka%20otpada%20od%20hrane.pdf, pristupljeno 2.5.2023.

Pantavos A, Ruiter R, Feskens EF, De Keyser CE, Hofman A, Stricker BH, Franco OH, Kiefte-De Jong JC. Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *Int. J. Cancer*. 2015;136:2178–2186.

Parisi OI, Puoci F, Restuccia D, Farina G, Iemma F, Picci N. Polyphenols and Their Formulations. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2014. str. 29–45.

Parker RS, Swanson JE, You CS, Edwards AJ, Huang T. Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58(01), 155–162.

Raiola A, Tenore GC, Barone A, Frusciante L, Rigano MM. Vitamin E Content and Composition in Tomato Fruits: Beneficial Roles and Bio-Fortification. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec 8;16(12):29250-64.

Rehmana A, Ahmadb T, Muhammad Aadilb R, Spottic MJ, Bakryd AM, Khana IM, Zhaoa L, Riaza T, Tonga Q. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 90, 35-46.

Ribeiro TB, Oliveira A, Coelho M, Veiga M, Costa EM, Silva S, Nunes J, Vicente AA, Pintado M. Are Olive Pomace Powders a Safe Source of Bioactives and Nutrients? *J. Sci. Food Agric*. 2021, 101, 1963-1978.

Rodríguez García SL, Raghavan V. Green extraction techniques from fruit and vegetable waste to obtain bioactive compounds-A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(23):6446-6466.

Rossi M, Negri E, Talamini R, Bosetti C, Parpinel M, Gnagnarella P, Franceschi S, Dal Maso L, Montella M, Giacosa A. Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2006;15:1555–1558.

Rozzi NL, Singh RK, Vierling RA, Watkins BA. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *J Agric Food Chem*. 2002 Apr 24;50(9):2638-43.

Sadh PK, Kumar S, Chawla P, Duhan JS. Fermentation: a boon for production of bioactive compounds by processing of food industries wastes (by-products). *Molecules*. 2018; 23, 2560.

Santos DI, Saraiva JMA, Vicente AA, Moldão-Martins M. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. 2019. str. 23–54.

Shi J, Khatri M, Xue SJ, Mittal GS, Ma Y, Li D. Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as affected by temperature and pressure. *Sep Purif Technol*. 2009; 66(2), 322-328.

Smith RM. Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A*. 2003 Jun 6;1000(1-2):3-27.

Soxhlet ekstraktor, 2023., <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor>, pristupljeno 8.5.2023.

Stajčić S, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Mandić A, Četojević-Simin D. Tomato waste: Carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. *Food Chem.* 2015 Apr 1;172:225-32.

Strati IF, Oreopoulou V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Res Int.*2014;65:311–321.

Strati IF, Oreopoulou V. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *Int J Food Sci*, 2011a; 46(1), 23-29.

Strati IF, Oreopoulou V. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chem.* 2011b Dec 1;129(3):747-52.

Strati IF, Oreopoulou V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products—a review. *Food res int.* 2014; 65: 311-321.

Szabo K, Cătoi AF, Vodnar DC. Bioactive Compounds Extracted from Tomato Processing by-Products as a Source of Valuable Nutrients. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018 Dec;73(4):268-277.

Tan H, Nie S. Deciphering diet-gut microbiota-host interplay: Investigations of pectin. *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, 106, 171-181.

Teodoro AJ, Oliveira FL, Martins NB, Maia Gde A, Martucci RB, Borojevic R. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2012 Aug 6;12(1):36.

Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends Analyt Chem.* 2015; 71:100–109.

Topal U, Sasaki M, Goto M, Hayakawa K. Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide: effect of operating conditions and solubility analysis. *J Agric Food Chem.* 2006 Jul 26;54(15):5604-10.

Utjecaj otpada hrane na okoliš, 2023., <https://earth.org/how-does-food-waste-affect-the-environment/>, pristupljeno 5.5.2023.

Vági E, Simándi B, Vásárhelyiné KP, Daood H, Kéry Á, Doleschall F, Nagy B. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J Supercrit Fluids.* 2007; 40(2), 218-226.

Vilas-Boas AA, Pintado M, Oliveira ALS. Natural Bioactive Compounds from Food Waste: Toxicity and Safety Concerns. *Foods.* 2021 Jul 6;10(7):1564.

Weber D, Grune T. The contribution of β -carotene to vitamin A supply of humans. *Mol Nutr Food Res.* 2012 Feb;56(2):251-8.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 2018 Apr 17;13:20.

Zhou F, Wu X, Pinos I, Abraham BM, Barrett TJ, von Lintig J, Fisher EA, Amengual J. β -Carotene conversion to vitamin A delays atherosclerosis progression by decreasing hepatic lipid secretion in mice. *J. Lipid Res*. 2020;61:1491–1503.

Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*. 1996;7:157–177.

Zuorro A, Fidaleo M, Lavecchia R. Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Enzyme Microb Technol*. 2011 Dec 10;49(6-7):567-73.

Žilić Lj. Hlapljivi spojevi smilja, 2019.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Tijekom uzgoja i industrijske prerade rajčice stvaraju se velike količine otpada koji se sastoji od kore, sjemenki i ostataka pulpe. Ovaj otpad bogat je bioaktivnim spojevima kao što su karotenoidi (posebno likopen i beta karoten), polifenoli i pektini koji pokazuju niz pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi pa se stoga mogu koristiti kao nutraceutici i/ili prirodni aditivi u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji za poboljšanje organoleptičkih svojstava i kvalitete hrane. Antioksidativna svojstva, protuupalno djelovanje i kemoprevencija najvažniji su biološki učinci polifenola i karotenoida pri čemu beta-karoten dodatno posjeduje i aktivnost provitamina A. Djelovanje pektina povezuje se s pozitivnim učincima na zdravlje probavnog sustava te prevencijom ateroskleroze i pretilosti, stoga je potražnja za navedenim spojevima u konstantnom porastu. Razvojem i optimizacijom održivih procesa ekstrakcije polifenola, karotenoida i pektina iz komine rajčice smanjio bi se trošak i ekološki otisak proizvodnje rajčice, ali i spomenutih bioaktivnih sastavnica. Ekstrakcijske tehnike koje se u tom smislu najviše istražuju su konvencionalna ekstrakcija vrućom razrijeđenom kiselinom za pektin, dok se za ekstrakciju polifenola i karotenoida najčešće primjenjuju zelene ekstrakcijske tehnike kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (koje karakteriziraju veći prinosi uz primjenu netoksičnih otapala). Uvođenje i optimizacija navedenih procesa na industrijsku razinu i pojednostavljivanje zakonske regulative vezane uz nutraceutike i novu hranu dobivenu iz sekundarnih sirovina rezultirali bi značajnim ekonomsko-ekološkim benefitima i značajno doprinijeli implementaciji principa kružne ekonomije u sektoru proizvodnje hrane i dodataka prehrani.

7.2. SUMMARY

During the cultivation and industrial processing of tomatoes, large amounts of waste consisting of peel, seeds and pulp remains are generated. This waste is rich in bioactive compounds such as carotenoids (especially lycopene and beta carotene), polyphenols and pectins that show a number of positive effects on human health and can therefore be used as nutraceuticals and/or

natural additives in the pharmaceutical or food industry to improve organoleptic properties and food quality. Antioxidant properties, anti-inflammatory action and chemoprevention are the most important biological effects of polyphenols and carotenoids, with beta-carotene also possessing provitamin A activity.

The activity of pectin is associated with positive effects on health of digestive system and prevention of atherosclerosis and obesity. Therefore, the demand for these compounds is constantly increasing. The development and optimization of sustainable processes for the extraction of polyphenols, carotenoids and pectin from tomato pomace would reduce the cost and ecological footprint of tomato production, as well as the aforementioned bioactive components. The most researched extraction techniques in this regard are conventional extraction with hot dilute acid for pectin, while for the extraction of polyphenols and carotenoids, green extraction techniques such as microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction (which are characterized by higher yields using non-toxic solvents) are most often used. The introduction and optimization of mentioned processes at the industrial level and the simplification of the legal regulations related to nutraceuticals and new food obtained from secondary raw materials would result in significant economic and environmental benefits and significantly contribute to the implementation of the principles of the circular economy in the sector of food production and nutritional supplements.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Mogućnosti primjene otpada rajčice kao nutraceutika

Reana Radovečki

SAŽETAK

Tijekom uzgoja i industrijske prerade rajčice stvaraju se velike količine otpada koji se sastoji od kore, sjemenki i ostataka pulpe. Ovaj otpad bogat je bioaktivnim spojevima kao što su karotenoidi (posebno likopen i beta karoten), polifenoli i pektini koji pokazuju niz pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi pa se stoga mogu koristiti kao nutraceutici i/ili prirodni aditivi u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji za poboljšanje organoleptičkih svojstava i kvalitete hrane. Antioksidativna svojstva, protuupalno djelovanje i kemoprevencija najvažniji su biološki učinci polifenola i karotenoida pri čemu beta-karoten dodatno posjeduje i aktivnost provitamina A. Djelovanje pektina povezuje se s pozitivnim učincima na zdravlje probavnog sustava te prevencijom ateroskleroze i pretilosti, stoga je potražnja za navedenim spojevima u konstantnom porastu. Razvojem i optimizacijom održivih procesa ekstrakcije polifenola, karotenoida i pektina iz komine rajčice smanjio bi se trošak i ekološki otisak proizvodnje rajčice, ali i spomenutih bioaktivnih sastavnica. Ekstrakcijske tehnike koje se u tom smislu najviše istražuju su konvencionalna ekstrakcija vrućom razrijeđenom kiselinom za pektin, dok se za ekstrakciju polifenola i karotenoida najčešće primjenjuju zelene ekstrakcijske tehnike kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (koje karakteriziraju veći prinosi uz primjenu netoksičnih otapala). Uvođenje i optimizacija navedenih procesa na industrijsku razinu i pojednostavljivanje zakonske regulative vezane uz nutraceutike i novu hranu dobivenu iz sekundarnih sirovina rezultirali bi značajnim ekonomsko-ekološkim benefitima i značajno doprinijeli implementaciji principa kružne ekonomije u sektoru proizvodnje hrane i dodataka prehrani.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 75 stranica, 8 grafičkih prikaza, i 102 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rajčica, otpad od rajčice, otpad od hrane, ekstrakcija, bioaktivni spojevi, pektin, likopen, nutraceutici, komina, kora, sjemenke, karotenoidi, beta karoten, polifenoli, nusproizvodi rajčice,

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lovorka Vujić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of food chemistry
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

Possibilities of using tomato waste as a nutraceutical

Reana Radovečki

SUMMARY

During the cultivation and industrial processing of tomatoes, large amounts of waste consisting of peel, seeds and pulp remains are generated. This waste is rich in bioactive compounds such as carotenoids (especially lycopene and beta carotene), polyphenols and pectins that show a number of positive effects on human health and can therefore be used as nutraceuticals and/or natural additives in the pharmaceutical or food industry to improve organoleptic properties and food quality. Antioxidant properties, anti-inflammatory action and chemoprevention are the most important biological effects of polyphenols and carotenoids, with beta-carotene also possessing provitamin A activity. The activity of pectin is associated with positive effects on health of digestive system and prevention of atherosclerosis and obesity. Therefore, the demand for these compounds is constantly increasing. The development and optimization of sustainable processes for the extraction of polyphenols, carotenoids and pectin from tomato pomace would reduce the cost and ecological footprint of tomato production, as well as the aforementioned bioactive components. The most researched extraction techniques in this regard are conventional extraction with hot dilute acid for pectin, while for the extraction of polyphenols and carotenoids, green extraction techniques such as microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction (which are characterized by higher yields using non-toxic solvents) are most often used. The introduction and optimization of mentioned processes at the industrial level and the simplification of the legal regulations related to nutraceuticals and new food obtained from secondary raw materials would result in significant economic and environmental benefits and significantly contribute to the implementation of the principles of the circular economy in the sector of food production and nutritional supplements.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 75 pages, 8 figures, and 102 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tomato, tomato waste, food waste, extraction, bioactive compounds, pectin, lycopene, nutraceuticals, pomace, peel, seeds, carotenoids, beta carotene, polyphenols, tomato byproducts

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.

