

Valorizacija komine rajčice kao izvora antioksidansa

Ivić, Marija

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:163:558799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Ivić

**Valorizacija komine rajčice kao izvora
antioksidansa**

DIPLOMSKI RAD

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 se mentorici, prof.dr. sc. Dubravki Vitali Čepo, na iznimnoj susretljivosti, dobroj suradnji i stručnom mentorstvu. Također se zahvaljujem asistentici Nikolini Golub na strpljenju, potpori i korisnim savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebna zahvala mojim roditeljima, sestri i bratu na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

Hvala zaručniku Robertu što je uvijek bio uz mene i učinio razdoblje studiranja ljepšim.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Komina rajčice.....	2
1.2. Sastav komine rajčice.....	3
1.3. Nutraceutici	5
1.4. Upotreba komine rajčice	5
1.5. Antioksidativna aktivnost sastavnica komine rajčice	6
1.6. Kardioprotektivno djelovanje sastavnica komine rajčice	7
1.7. Neuroprotektivno i antikancerogeno djelovanje sastavnica komine rajčice	8
1.8. Metode sušenja komine rajčice i ekstrakcije bioaktivnih sastavnica.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Instrumenti.....	15
3.2. Dizajn istraživanja	16
3.3. Priprema uzoraka za analizu.....	17
3.4. Metode.....	19
3.4.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	19
3.4.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom.....	21
3.4.3. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti ORAC metodom.....	23
3.5. Statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Rezultati	27
4.2. Rasprava.....	30
4.2.1. Udio ukupnih fenola u ekstraktu komine rajčice	30
4.2.2. Antioksidativni potencijal ekstrakta komine rajčice određen TEAC metodom	32
4.2.3. Antioksidacijska učinkovitost ekstrakata komine rajčice određena ORAC testom.....	33
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	38
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	43
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Komina rajčice

Agro-industrijski nusprodukti dugo su bili neiskorišteni i kao takvi, zbog nepropisnog odlaganja, predstavljali ekološki problem. U posljednje vrijeme, trend održivog i ekološki prihvatljivog razvoja u sektoru proizvodnje hrane, doveo je do valorizacije otpadnih biljnih nusprodukata kao novih izvora „funkcionalnih sastojaka“ uključujući proizvodnju enzima, prehrambenih vlakana i fitokemikalija koji mogu biti korišteni u različitim sektorima. Navedeni sastojci, uz odgovarajuće metode ekstrakcije, mogu dati spojeve s dodanom vrijednošću kao što su antioksidansi (Abbasi-Parizad i sur., 2022).

Rajčica (lat. *Solanum lycopersicum*, *Solanaceae*) jedna je od najkultiviranijih biljaka na svijetu. Konzumira se svježa, no najveći dio koristi se za proizvodnju brojnih prehrambenih produkata kao što su paste, sokovi, umaci i brojni drugi prerađeni oblici. Procesuiranje rajčice praćeno je generiranjem velike količine otpadnog materijala kojeg nazivamo komina rajčice. Ona se sastoji od pokožice, koštica i ostataka usplođa (Kalogeropoulos i sur., 2012; Kumar i sur., 2021). Brojna istraživanja provedena na komini rajčice potvrdila su prisutnost fenolnih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću koji su većinski vezani za strukturalne komponente staničnog zida. Iskoristivost navedenih spojeva vezana je uz odgovarajuće metode sušenja i ekstrakcije potrebne za analizu fenolne bioaktivnosti. Valorizacija industrijske komine rajčice korištenjem različitih frakcija fenolnih antioksidativnih komponenata može generirati dodatan prihod raznim industrijama uključujući prehrambenu i farmaceutsku industriju te u isto vrijeme reducirati problem odlaganja bio-otpada (Perea-Domínguez i sur., 2018). Potrebno je uzeti u obzir okolišne aspekte (gospodarenje okolišom i zaštita okoliša od polutanata) i ekonomske aspekte (profitabilnost ekstrakcije) prije ekstrakcije iz komine rajčice kako bi ona mogla biti komercijalno iskoristiva te utvrditi biodostupnost i stvarne benefite takvih ekstrakata *in vivo* (Ćetković i sur., 2012).

1.2. Sastav komine rajčice

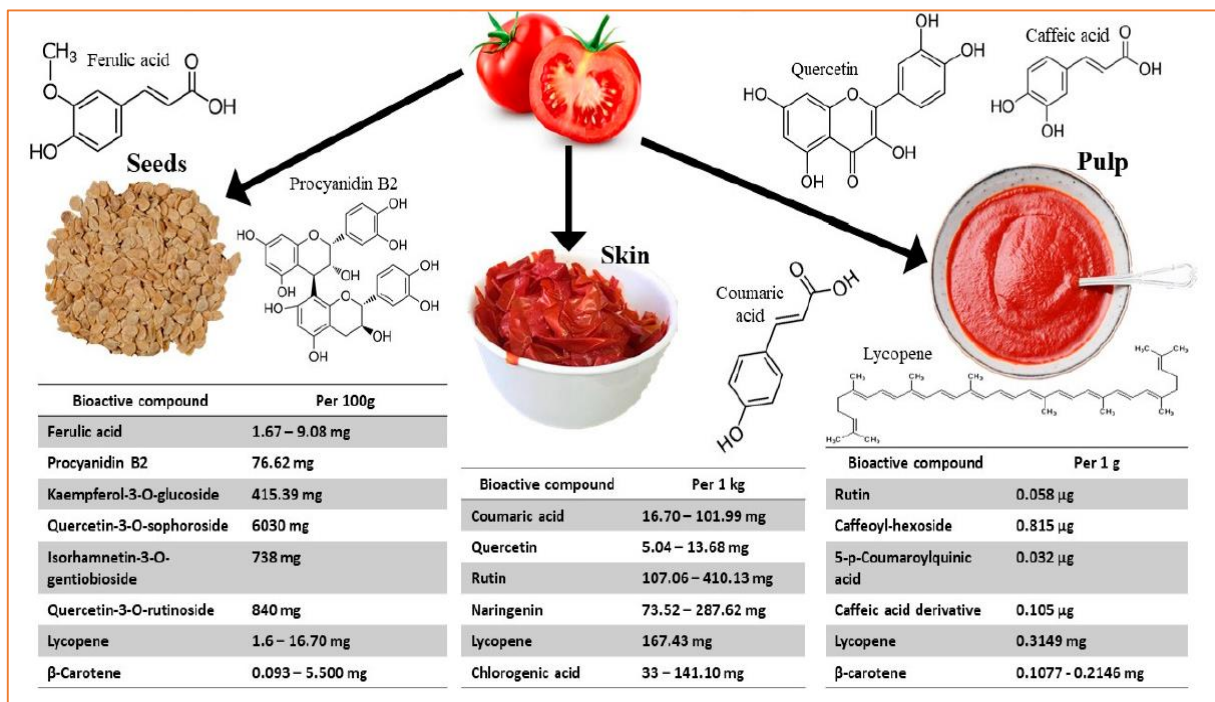
Sastav komine rajčice raznolik je te neke od sastavnica uključuju vlakna, ugljikohidrate, proteine, lipide, vitamine i minerale (Albanese i sur., 2014). Palomo i sur. (2019) detektirali su i kvantificirali bioaktivne komponente vodenog ekstrakta komine rajčice dobivenog liofilizacijom i ultrazvučnom ekstrakcijom s 75% metanolom koristeći spregnutu tehniku HPLC-MS (*eng. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) pokazujući bogat sastav neiskorištenog dijela, tj. otpada iz industrije proizvoda od rajčice. Iz vodenog ekstrakta sušene i mljevene komine rajčice identificirani su flavonoidi (kumarinska kiselina, floridzin, floretin, procijanidin B₂, luteolin-7-*O*-glukozid, kamferol i kvercetin) i nukleozidi (adenozin, inozin i gvanozin) među ostalima.

Kalogeropoulos i sur. (2012) uspoređivanjem i analiziranjem industrijske rajčice i njene komine, došli su do zaključka da komina rajčice na suhoj bazi sadrži niže koncentracije likopena, više koncentracije β -karotena, tokoferola, sterola i terpena te slične koncentracije masnih kiselina u usporedbi s neprocesuiranom rajčicom. Od 18 analiziranih polifenola, hidroksicinaminska kiselina prevladava u svježoj rajčici dok u komini prevladava naringenin koji čini 87% ukupnih flavonoida. Određeni su ukupni fenoli te su dokazani slični rezultati za svježju rajčicu i kominu. Takva komparativna studija potvrdila je kako se većina bioaktivnih fitokemikalija uspijeva sačuvati usprkos industrijskim procesnim metodama i pokazala antioksidativnu moć sastavnica komine rajčice, ponajprije tokoferola, polifenola, karotenoida te nekih terpena i sterola.

Košnice komine rajčice više su istraživane od ostalih dijelova ploda te su tako Kumar i sur. (2021) zaključili kako su košnice rezervoari makromolekula koje promiču zdravlje kao što su proteini (bioaktivni peptidi), karotenoidi (likopen), polisaharidi (pektin), fitomolekule (flavonoidi) i vitamini (α -tokoferol). Nutritivna kompozicija sjemenki rajčice uključuje proteine (32%), ukupne masti (27%) i vlakna (18%). Zbog tako visokog udjela proteina, sjemenke se koriste u proizvodnji hrane za životinje i kao zamjena u pekarskim proizvodima (Gebeyew i sur., 2015). Zahvaljujući termalnoj stabilnosti, antioksidativnim svojstvima i antimikrobnom djelovanju, ulje i ekstrakt koštica rajčice, pronalazi primjenu i u konzervaciji hrane (Taveira i sur., 2010). Ulje koštica rajčice, također se razmatra i u proizvodnji biogoriva te enzima i bioaktivnih komponenata (Giannelos i sur., 2005). Sjemenke sadrže vrijedne fitokemijske komponente kao što su galna kiselina, trans-cinaminska kiselina i kvercetin te nesaponinske tvari uključujući α - i γ -tokoferol te demetilsterole. Prisutni su i nukleozidi (gvanidin, inozin i adenozin). Veća koncentracija ukupnih fenolnih komponenata, flavonoida i cjelokupne antioksidativne aktivnosti dobiva se etanolnom ekstrakcijom umjesto ekstrakcijom

polarnim otapalom kao što je voda zato što vodotopljive komponente prisutne u komini rajčice mogu interferirati s fenolnim komponentama i na taj način utjecati na uspješnost ekstrakcije. (Azabou i sur., 2020).

Slika 1. prikazuje prevladavajuće komponente tri različita dijela rajčice (koštice, pokožica i usplođe). U košticama se ističe kvercetin-3-O-soforozid i izoramnetin-3-O-gentiobiozid; pokožica je bogata rutinom i naringeninom te u usplođu prevladava derivat kafeoila i likopen.



Slika 1. Glavne bioaktivne sastavnice različitih dijelova rajčice (preuzeto iz Agaj i sur. (2022)).

1.3. Nutraceutici

Funkcionalna hrana i nutraceutici su, prema definiciji Agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Association-FDA*), hrana i komponente hrane koje promiču zdravlje, u kombinaciji sa njihovom nutritivnom vrijednosti. Sve veća popularnost nutraceutika dobivenih iz nusprodukata proizvodnje hrane rezultat je mnogobrojnih istraživanja koje otkrivaju njihovu kvalitetu i korist u prevenciji bolesti. Biljna vlakna i antioksidansi dva su sastojka od interesa za funkcionalne obroke koji se mogu uvesti u prehranu ljudi s ciljem promicanja zdravlja i obrane od bolesti. Antioksidansi u nusproduktima proizvodnje hrane u obliku fenolnih komponenti i bioaktivnih fitokemikalija, povezuju se sa smanjenjem rizika od brojnih kroničnih bolesti zbog ispoljavanja protuupalnog, antimutagenog i antikancerogenog djelovanja. Komina rajčice, kao biootpad, pronalazi svoje mjesto u području nutraceutika zbog svog bogatog sastava te dodatno minimalizira ekološko zagađenje (Allaqaband i sur., 2022).

1.4. Upotreba komine rajčice

Nusprodukti proizvodnje hrane zbog visokog sadržaja vrijednih sastavnica pronalaze široku primjenu u smislu obogaćivanja prehrane i ostvarivanja zdravstvenih benefita uz istovremeno smanjenje negativnih učinaka proizvodnje hrane na okoliš. Eliopoulos i sur. (2022.) su u svom preglednom radu saželi glavne grane iskorištavanja bio-otpada hrane uključujući i kominu rajčice. Nusprodukti rajčice primjenjuju se u hranjenju i obogaćivanju hrane za životinje uključujući svinje, zečeve, koze, kokoši i piliće, promičući njihov rast, antioksidativnu aktivnost, poboljšani metabolizam i u konačnici kvalitetnije meso za ljudsku konzumaciju. Komina rajčice koristi se i u pekarskoj industriji tako što se osušena i samljevena inkorporira u sastav tijesta za kruh te služi kao nutraceutik koji obogaćuje kvalitetu kruha i pekarskih proizvoda bioaktivnim komponentama. Brašno sjemenki rajčice, komina rajčice, njezin prašak i sušeni oblik, u pekarskoj industriji, poboljšava fizikalne parametre, povećava količinu proteina, biljnih vlakana i koncentraciju vitamina C te sveukupno podiže razinu kvalitete pekarskih proizvoda. Osim mesne i pekarske industrije, komina rajčice nalazi svoj potencijal i u industriji mlijeka i mliječnih proizvoda (sirevi, maslac) te proizvodnji ulja (biljna ulja, rafinirano ulje masline, suncokretovo ulje) prvenstveno zbog antioksidativne aktivnosti u pogledu sprječavanja oksidacijskih procesa tijekom dužeg perioda skladištenja te poboljšanih senzornih atributa. Crveni pigmenti komine rajčice također se istražuju kao alternativa

sintetskim bojilima korištenim u prehrambenoj industriji. Zbog antitrombotske aktivnosti te drugih povoljnih zdravstvenih benefita komine rajčice, upotrijebljuje se i u farmaceutskoj industriji (Gebeyew i sur., 2015; Lu i sur., 2019; Castro i sur., 2021; Eliopoulos i sur., 2022).

1.5. Antioksidativna aktivnost sastavnica komine rajčice

Antioksidansi ispoljavaju svoje učinke primarno interakcijom sa slobodnim radikalima koji bi inače, prisutni u suvišku, uništavali vitalne molekule u tijelu. Oksidativni stres, uzrokovan reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima, smatra se jednim od glavnih pokretača raznih kroničnih bolesti kao što su tumori, dijabetes te kardiovaskularni i neurodegenerativni poremećaji (Socaci i sur., 2017).

Veća količina antioksidativnih sastavnica voća i povrća, nalazi se u kori, pokožici i sjemenkama, odnosno u dijelovima koji se uklanjaju tijekom proizvodnje i koji postaju bio-otpad. Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost komine rajčice ponajprije korelira s koncentracijom β -karotena i likopena, tj. prirodnih pigmenata (karotenoida) koji mogu biti inkorporirani u prehrambene proizvode zbog svojih antioksidativnih karakteristika važnih za stabilnost i dugotrajnost skladištenja te zbog svojstva bojila i nutritivnih vrijednosti jer djeluju kao prekursori vitamina A. Sastavnice koje prevladavaju u komini rajčice - polifenoli, također ispoljavaju antioksidativnu aktivnost gašenjem reaktivnih kisikovih spojeva (slobodnih radikala) te na taj način sprječavaju oksidativno kvarenje prehrambenih proizvoda (Kumar i sur., 2021).

Fenolni spojevi (fenolne kiseline i flavonoidi), grupa su bioaktivnih molekula s kemijskom strukturom koju karakterizira aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Pripadaju raznolikoj grupi sekundarnih metabolita univerzalno prisutnih u višim biljkama te posjeduju značajni antioksidativni kapacitet koji štiti organizam od zdravstvenih problema uzrokovanih oksidativnim stresom. Polifenoli također mogu mijenjati senzorne karakteristike hrane mijenjajući okus, boju i viskoznost (Ferrerres i sur., 2010; Haminiuk i sur., 2014).

Od fenolnih komponenata u komini rajčice pronađeni su derivati hidroksibenzojeve kiseline (galna i siringična kiselina), hidroksicinaminske kiseline (cinaminska, ferulična, p-kumarinska, kofeinska kiselina), flavanoni (naringenin), flavoni (apigenin), flavonoli (kamferol, kvercetin, rutin, kalkon) koji posjeduju zdravstvene benefite kao što su antioksidativno, antiinflamatorno

i antidijabetsko djelovanje te se koriste u konzervaciji i stabilizaciji hrane, kozmetici i farmaceutskoj industriji (Abbasi-Parizad i sur., 2022).

1.6. Kardioprotektivno djelovanje sastavnica komine rajčice

Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization-WHO*) definira kardiovaskularne bolesti (KVB) kao poremećaje srca i krvnih žila koji potječu od kroničnih upalnih vaskularnih procesa s utjecajem na arterije srednje veličine koji dovode do endotelne disfunkcije i ateroskleroze. Kardiovaskularne bolesti su trenutno među glavnim uzrocima morbiditeta i mortaliteta. Čimbenici rizika za razvoj KVB su pretilost, hiperkolesterolemija (dislipidemija), hipertenzija te pretjerana aktivacija i agregacija trombocita (stvaranje ugrušaka i tromba). Oksidativni stres važan je čimbenik rizika zbog neravnoteže oksidacijskih i antioksidacijskih procesa u tijelu. Antitrombocitna aktivnost ima ključnu ulogu u prevenciji ateroskleroze. Trombociti u patofiziologiji KVB potenciraju upalu tijekom ateroskleroze tako što induciraju ekspresiju membranom – povezanih proteina kao što su CD40 ligand, P-selektin i intracelularna adhezijska molekula-2. Prijanjanjem i agregacijom trombocita dolazi do sekrecije signalnih, upalnih molekula koje u konačnici dovode do oštećenja ateromatoznog plaka i moguće opstrukcije krvnog protoka uzrokujući disfunkcije organa i ishemična oštećenja (Roth i sur., 2020; Kumar i sur., 2021; Cámara i sur., 2022).

Palomo i sur., (2019) istraživali su utjecaj ekstrakta komine rajčice na agregaciju trombocita. Jednostruko slijepa, placebo kontrolirana klinička pilot studija na 99 ispitanika ukazuje da konzumacija 1 g ekstrakta komine rajčice dnevno kroz 5 dana značajno smanjuje agregaciju trombocita i kardiovaskularni rizik. Nukleozidi (adenozin, inozin i gvanozin) pronađeni u komini rajčice, pokazali su aktivno djelovanje prema adenzin difosfat (ADP) i kolagen – posredovanoj agregaciji trombocita. Takvo antitrombocitno djelovanje nukleozida povezano je s aktivacijom signalnog puta ovisnog o cikličkom adenzin-monofosfatu (cAMP/PKA), dok fenolne komponente i derivati flavonoida pokazuju inhibiciju u odgovoru na agregaciju trombocita posredovanu trombinom i arahidonskom kiselinom. Komina rajčice ostvaruje kardioprotektivnu ulogu i u smanjivanju hiperlipidemije te regulaciji crijevne mikrobiote. Fitosteroli prisutni u ulju sjemenki rajčice, zbog strukturalne sličnosti mogu suprimirati apsorpciju kolesterola (Fluentes i sur., 2012; Palomo i sur., 2019).

Camara i sur. (2022) u svom radu analiziraju relevantne studije povezane sa blagotvornim učincima proizvoda rajčice na prevenciju KVB i antitrombocitnu agregaciju. Jedina

zdravstvena tvrdnja odobrena od EFSA (eng. *European Food Safety Authority*) koja glasi: „pomaže u održavanju normalne funkcije trombocita što doprinosi zdravlju krvnog protoka“, odnosi se na koncentrirani ekstrakt rajčice otopljen u vodi pod patentiranim nazivom - Fruitflow®.

Zaključno, zbog svog bogatog sastava fitokemijskih i polifenolnih tvari, komina rajčice pronalazi primjenu u očuvanju zdravlja srca i krvnih žila te prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Camara i sur., 2022; Kumar i sur., 2021).

1.7. Neuroprotektivno i antikancerogeno djelovanje sastavnica komine rajčice

Angeloni i sur. (2023) u svom radu istražuju mogućnosti iskorištavanja komine rajčice u području neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, amiotrofna lateralna skleroza i Alzheimerova bolest). To su multifaktorijalne bolesti koje u svojoj podlozi sadrže abnormalnu proteinsku agregaciju, disfunkciju mitohondrijskih sustava, oksidativni stres i upalu. Navode kako komina rajčice sadrži vrijedne izvore bioaktivnih molekula uključujući likopen sa svojim antioksidativnim, protuupalnim i antiproliferativnim učincima te širok spektar potencijalno iskoristivih molekula (fenolne komponente, masne kiseline i tokoferoli) za zaštitu od neurodegenerativnih bolesti.

Preventivne i terapijske antikancerogene karakteristike rajčice i komine rajčice primarno se pripisuju karotenoidima (likopen i β -karoten) i fenolnim komponentama koji moduliraju razne signalne puteve važne za transformaciju malignih stanica i/ili razvoj tumora. Te komponente primarno ciljaju degranulirani inzulinu-sličan faktor rasta 1 (eng. *insulin-like growth factor-1* – IGF-1) i mitogeni put (Kaur i sur., 2015). Kvercetin-3-O-soforozid, jedan od glavnih flavonoida pronađenih u većim koncentracijama u sjemenkama rajčice, identificiran je kao potencijalna antikancerogena komponenta (Hashemzaei i sur., 2017). Nadalje, pronađeno je kako glikoalkaloid rajčice, α -tomatin, smješten u pokožici, inhibira rast tumorskih stanica kolona, jetre, dojke i želuca u in vitro uvjetima putem kaspaze-neovisnog signalnog puta (Kim i sur., 2015). Ulje sjemenki rajčice odličan je izvor linolenske, palmitinske i oleinske kiseline koje eksprimiraju citotoksičan učinak na različite stanične linije raka (Józwiak i sur., 2020; Agaj i sur., 2022).

Otpad generiran tijekom proizvodnje rajčice sadrži značajne količine bioaktivnih sastavnica koje mogu biti korištene kao antitrombocitne, antioksidacijske, antikancerogene, antimutagene, antimikrobne i neuroprotektivne komponente. Posljedično, komina rajčice ima veliki potencijal u razvoju funkcionalne hrane. Ipak, navedeni zdravstveni benefiti i potencijalna primjena u prevenciji i liječenju mora biti detaljnije istražena jer pretjerana konzumacija određenih bioaktivnih komponenti, može dovesti do neželjenih učinaka te su potrebni podaci o sigurnim razinama doziranja. Informacije o bioraspoloživosti i biodostupnosti određenih komponenata komine rajčice na ljudski organizam te klinički podaci o učinkovitosti i sigurnosti neophodni su kako bi se iskoristio puni potencijal komine i osigurala adekvatna primjena kod ljudi (Kumar i sur., 2021).

1.8. Metode sušenja komine rajčice i ekstrakcije bioaktivnih sastavnica

Bioaktivne sastavnice često su podložne kemijskoj modifikaciji/razgradnji, osobito nakon izlaganja svjetlu, visokoj koncentraciji kisika, vlagi, određenim koncentracijama pH te toplini. Zbog navedenog, u procesu valorizacije komine rajčice potrebno je optimirati procese ekstrakcije i prerade, kako bi se maksimalno zaštitile bioaktivne komponente. Najčešći načini sušenja sirovine su klasično sušenje u termostatu, sušenje raspršivanjem i liofilizacija. Sušenje raspršivanjem je jeftina i brza metoda koja omogućuje inkapsuliranje hidrofilnih i hidrofobnih sastavnica koja se sastoji od brze atomizacije otopine, disperzije ili emulzije u odjeljak s visokom temperaturom s ciljem stvaranja uzorka u obliku praška (Comunian i sur., 2021). Sušenje smrzavanjem, tj. liofilizacija je proces sušenja u kojem je otopljeni uzorak podvrgnut kristalizaciji na niskoj temperaturi nakon čega otapalo sublimira u paru ostavljajući kruti osušeni uzorak. Liofilizacija je pogodna metoda sušenja za uzorke čije su bioaktivne sastavnice podložne raspadanju pod utjecajem temperature te na taj način osigurava stabilan kemijski sastav i očuvanu antioksidativnu aktivnost (Liu i sur., 2008).

Ekstrakcija je prvi i najvažniji korak u dobivanju bioaktivnih molekula iz bio-otpada. Uspješna ekstrakcija polifenola uvelike ovisi o karakteristikama ekstrakcijskog procesa koji mora osigurati zadovoljavajući prinos i sastav ekstrakta. Glavni čimbenici koji definiraju uspješnost procesa ekstrakcije su maseni omjer sirovine i otapala, vrsta i koncentracija otapala, pH, trajanje ekstrakcije i temperatura. Najčešće korištena ekstrakcijska sredstva su voda, alkoholna otapala, aceton, etil acetat te njihove kombinacije u različitim omjerima koji se odabiru s obzirom na

topljivost (i ostala fizikalno-kemijska svojstva) ciljanih sastavnica. Konvencionalne, tj. klasične metode ekstrakcije otapalom, široko su rasprostranjene zbog svoje jednostavnosti i dostupnosti jer ne zahtijevaju specifične uređaje i teško dostupna otapala već je dovoljna upotreba ekstrakcijske moći različitih otapala u kombinaciji sa zagrijavanjem i/ili potresivanjem. No, dobro je poznato kako takve metode zahtijevaju veće količine organskih otapala, vremenski su dugotrajne i energetski nepovoljne te mogu uzrokovati hidrolitičku degradaciju uzoraka. Osim konvencionalnih metoda ekstrakcije, sve je veći trend korištenja „zelenih“ metoda radi povoljnijeg utjecaja na okoliš. Takve metode su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalnim zrakama, enzimima potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim fluidima, ekstrakcija pulsним električnim poljem i još mnoge druge. Takve metode korištene su i za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kome rajčice, prvenstveno polifenolnih tvari. Prednosti takvih ekstrakcija su održivost, ušteda bio-materijala i kemikalija, bolji rezultati ekstrakcije te očuvanje okoliša, dok se negativne strane odnose na samu cijenu potrebnih uređaja i materijala, čestu nemogućnost ekstrakcije veće količine bio-otpada odjednom te teška adaptacija metode na industrijsku skalu.

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda koja koristi ultrazvučne valove koji potresaju uzorak potopljen u biološkom otapalu i temelji se na kavitacijskom fenomenu. Mjehurići stvoreni iz ultrazvučnih amplituda rastu tijekom vremena dok ne dosegnu kritičnu točku u kojoj su temperatura i tlak povoljni kako bi razorili staničnu membranu te na taj način ekstrahirali bioaktivne komponente. Na učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije utječu frekvencija, intenzitet, vrijeme i temperatura te veličina čestica uzorka, tip i omjer otapala.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima kombinacija je mikrovalne iradijacije i tradicionalne ekstrakcije otapalom. Elektromagnetski valovi generirani mikrovalnom energijom mijenjaju strukturu stanice i pomažu ekstrahiranju sastavnica.

Fenolne komponente mogu biti kovalentno vezane za staničnu stjenku i u biljnom materijalu većinski su vezane s celulozom i hemicelulozom, pektinima ili ligninima u različitim biljkama. Učinkovitost enzimima-asistirane ekstrakcije temelji se na aktivnosti enzima, koji kataliziraju reakcije u vodenim otopinama, da degradiraju stanične stjenke i membrane te na taj način povećavaju permeabilnost i otpuštanje željenih komponenata.

Subkritična ekstrakcija je novija metoda koja koristi vruća, tekuća otapala ili tekuća otapala pod visokim tlakom u kojoj temperatura pomaže u povećanju topljivosti dok superkritična tekuća ekstrakcija koristi ugljikov dioksid (CO₂) kao superkritično otapalo koje ima

karakteristike plina (difuzija, viskoznost i površinska napetost) i tekućine (gustoća, moć otapanja) (Azmir i sur., 2013; Abbasi-Parizad i sur., 2022).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prerada rajčice značajna je gospodarska aktivnost kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj gdje rajčica predstavlja primarnu povrtnu kulturu. Pri tome se, unatoč velikoj iskoristivosti rajčice, generiraju i veće količine otpada koji se sastoji od pokožice, koštica i dijelova usplođa koji se jednim imenom nazivaju komina rajčice. Iako se komina rajčice u manjoj mjeri iskorištava kao hrana za stoku ili kompostira, uglavnom se neprerađena odlaže u okoliš. Neprikladno odlaganje takvog otpada predstavlja ekološki problem. Mnogobrojnim istraživanjima zaključeno je kako komina predstavlja vrijedan, ali nedovoljno iskorišteni izvor biološki aktivnih komponenti, prvenstveno karotenoida i polifenola.

Glavni cilj ovog rada bio je usporedba udjela antioksidansa u različitim frakcijama komine rajčice (cjelokupna komina, samo pokožica i samo koštice) te istraživanje utjecaja različitih vrsta sušenja (sušenje u termostatu na 70°C i sušenje smrzanjem) na sadržaj sastavnica s antioksidativnim učinkom.

Rezultati ovog rada doprinijeti će postojećim saznanjima o potencijalu komine rajčice kao sekundarne sirovine što, u širem smislu, može doprinijeti boljem iskorištavanju komine rajčice kao vrijedne sekundarne sirovine za dobivanje bioaktivnih sastavnica s antioksidativnim djelovanjem.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.2. Kemikalije

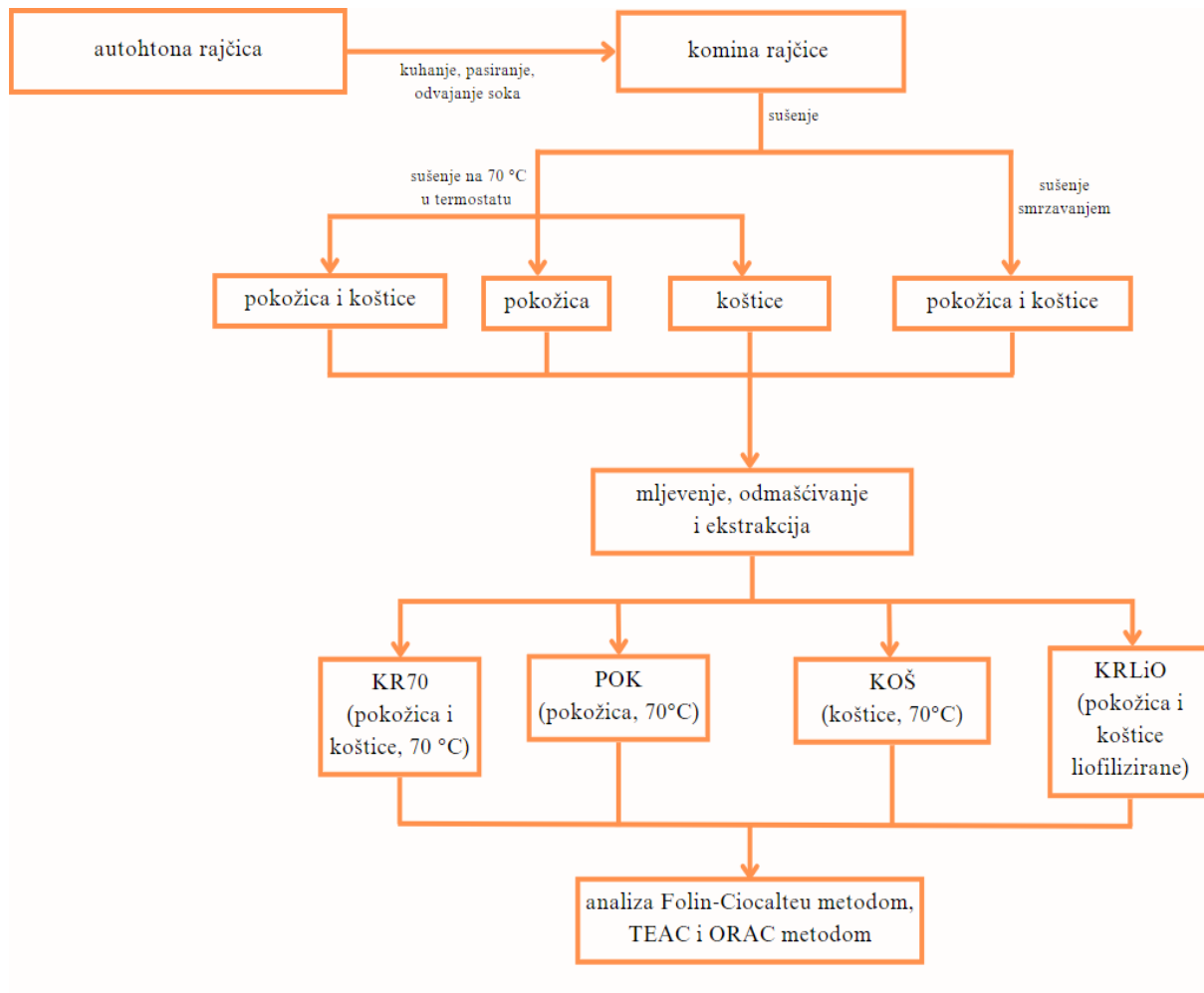
- Natrijev karbonat bezvodni, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol - ABTS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- 2,2'-azobis(2-metil-propionamidin)-dihidroklorid- AAPH (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Kalij hidrogenfosfat bezvodni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fluorescein (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska)
- Etanol (Kemika d.o.o.)
- Aluminiij klorid heksahidrat (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Destilirana voda

3.1.3. Instrumenti

- Čitač mikrotitarskih ploča, VictorX3, (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- Vortex miješalica, VTX-3000L Mixer Uzusio (LMS, Tokio, Japan)
- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- pH-metar, 702 SM Titrino (Metrohm AG, Herisau, Švicarska)
- Vodena kupelj (GFL 1086, Helago, Češka)
- Mlin (Polymix® PX-MFC 90 D, Kinematica AG, Malters, Švicarska)

3.2. Dizajn istraživanja

Eksperimentalni dio rada započinje pripremom uzoraka nakon čega slijedi određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom zatim određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom i konačno ispitivanje antioksidacijske učinkovitosti ORAC metodom (Slika 2).



Slika 2. Hodogram provedenih istraživanja

3.3. Priprema uzoraka za analizu

Osnovni uzorak korišten u istraživanju je komina različitih autohtonih vrsta rajčica s područja Republike Hrvatske koja je zaostala nakon obrade cjelovitog ploda kuhanjem (60 minuta nakon što proključa), pasiranjem i odvajanjem soka. Komina rajčice predstavlja ostatak ploda rajčice nakon dobivanja soka (sjemenke, kožica i dio perikarpa te placente ploda). Komina je sušena na dva načina - na 70°C u termostatu ili liofilizacijom tijekom 48 sati. Nakon sušenja, komina je samljevena pri brzini od 6000 rpm koristeći sito 2.00 mm pri čemu se dobije fini puderasti prah.

Komina rajčice odmašćena je korištenjem petroletera, semikontinuiranom ekstrakcijom po Soxhletu koja se temelji na izdvajanju lipidne komponente iz matriksa suhog ili zračno suhog uzorka pomoću petroletera u specijalnoj Soxhlet aparaturi. U okviru istraživanja analizirana su četiri uzorka opisana u Tablici 1.

Tablica 1. Oznake i opis pripreme uzoraka

OZNAKA	OPIS SASTAVA I PRIPREME UZORKA
KR _{70-š1}	mljevena, prosijana i odmašćena komina rajčice (pokožica i koštice) sušena na 70°C – šarža 1 (2021)
KR _{LIO-š1}	mljevena, prosijana i odmašćena komina rjačice (pokožica i koštice) sušena smrzavanjem (lioofilizirani) – šarža 1 (2021)
POK _{š2}	mljevena, prosijana i odmašćena pokožica sušena na 70°C - šarža 2 (2022)
KOŠ _{š2}	mljevene, prosijane i odmašćene koštice sušene na 70°C - šarža 2 (2022)

Šarža 1 predstavlja cjelovitu kominu koja je sakupljena tijekom 2021. godine i sušena na dva načina - sušenjem na 70°C i liofilizacijom. Šarža 2 predstavlja kominu koja je prikupljena tijekom 2022, sušena na 70°C i razdvojena na podfrakcije pokožice i frakciju koštice u svrhu usporedbe njihovog kemijskog sastava.

Ekstrakcija antioksidansa iz uzoraka provedena je postupkom klasične ekstrakcije otapalom na način da je 300 mg izvavano u Erlenmayerovu tikvicu od 50 mL, u duplikatu; na uzorke je dodano 20 mL 60% etanola te je otvor tikvice zatvoren tvrdom aluminijskom folijom. Tako pripremljeni uzorci postavljeni su u vodenu kupelj zagrijanu na temperaturu od 60°C, u trajanju od 2 sata uz protresanje od 120 min⁻¹. Nakon završene ekstrakcije, uzorci su profiltrirani kroz gusti filter papir u odmjerne tikvice od 20 mL (Slika 3).



Slika 1. Pripremljeni uzorci nakon ekstrakcije: KOŠ_{š2}1 i 2, POK_{š2}1 i 2, KR_{70-š1}1 i 2, KR_{LIO-š1}1 i 2, redom (slikano prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

3.4. Metode

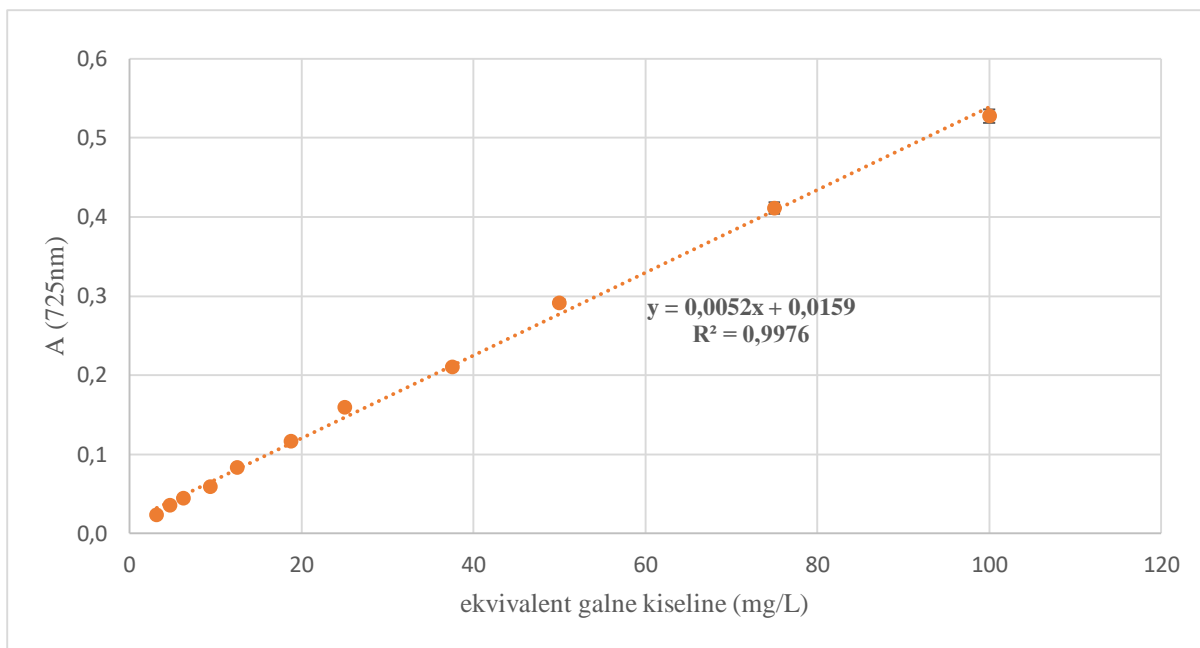
3.4.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu (F-C) metoda je jednostavna, reproducibilna i standardizirana metoda za rutinsku kontrolu kvalitete i mjerenje antioksidativnog kapaciteta prehrambenih proizvoda i suplemenata. F-C metoda temelji se na prijenosu elektrona, u alkalnom mediju, s fenolne komponente na kiseli, žuti kompleks fosfomolibdata i fosfovolframata u strukturi kolorimetrijskog F-C reagensa. Sadržaj fenolnih spojeva određuje se spektrofotometrijski na 765 nm. Hidroksilne skupine fenolnog uzorka reduciraju žuti kompleks F-C reagensa pri čemu nastaje plavo obojenje. Jači intenzitet takvog obojenja pokazatelj je višeg redukcijskog potencijala, samim time i više koncentracije antioksidansa u uzorku. F-C metoda nije specifična za fenolne komponente; naime ostale oksidirajuće supstance u uzorku mogu interferirati na inhibitorni, aditivni ili potencirajući način (Ainsworth i Gillespie, 2007). Galna kiselina koristi se kao standard te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (eng. *Gallic Acid Equivalence-GAE*).

Reagensi:

- 10% otopina F-C reagensa: 0.5 ml originalnog F-C reagensa pomiješa se s 4.5 ml destilirane vode
- 700 mM otopina Na_2CO_3 : izvaže se 1.4838 g bezvodnog Na_2CO_3 i otopi se u 20 ml destilirane vode

Za izradu baždarnog dijagrama pripremi se koncentracijski niz otopina galne kiseline u rasponu koncentracija 3 mg/l - 100 mg/l te se otopine analiziraju prema istom protokolu kao i ekstrakti uzoraka. Grafički se prikaže ovisnost apsorbancije otopine galne kiseline o koncentraciji (Slika 4).



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Postupak određivanja ukupnih fenola F-C metodom

20 μL razrijeđenog uzorka (10 μL uzorak + 10 μL destilirana voda) pipetira se u jažice mikrotitarske pločice te se doda 50 μL F-C reagensa. Pločica se inkubira na 37 °C tijekom 5 minuta što uključuje 60 sekundi potresivanja i 210 sekundi inkubacije u čitaču mikrotitarskih pločica. Potom se doda 160 μL 700 mM Na_2CO_3 u svaku jažicu te kreće potresivanje i inkubacija 30 minuta na 37 °C. Očita se apsorbancija na 750 nm i rezultati se prikazuju kao ekvivalenti galne kiseline. Svaki uzorak mjeri se u kvadriplikatu.

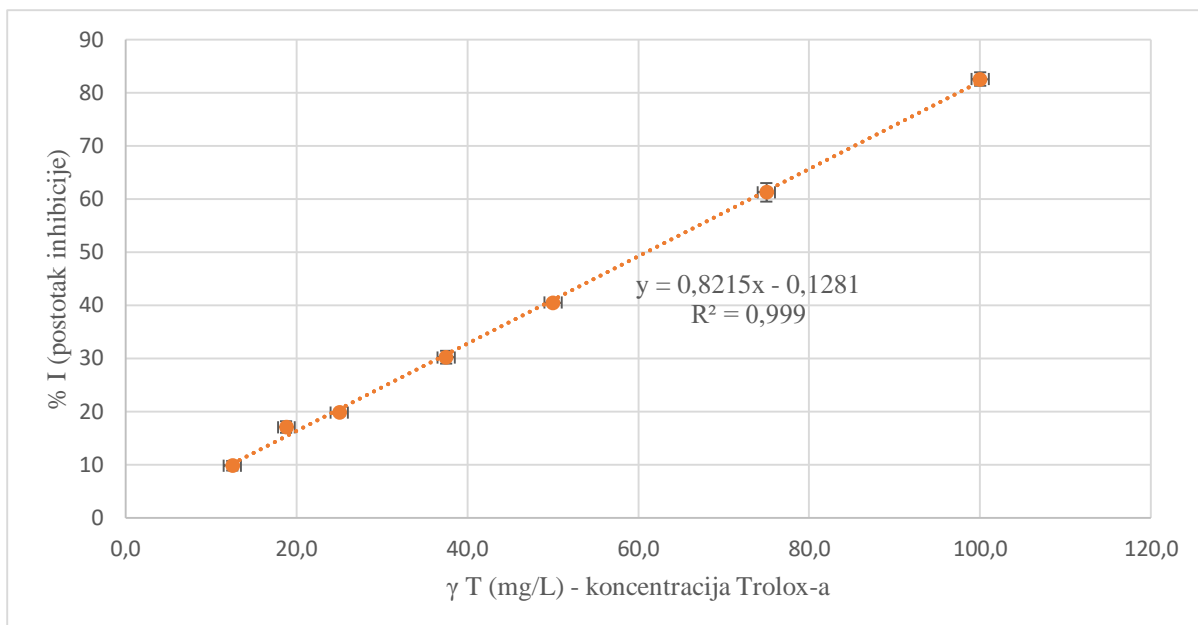
3.4.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC (eng. *Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity* - TEAC) metoda temeljena je na gašenju apsorbancije 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat (ABTS) radikal kationa u prisutnosti antioksidativne komponente. ABTS otopina za provođenje metode, dobiva se miješanjem jednake količine otopljene ABTS tablete i kalijevog persulfata te je nakon 12-satnog stajanja u frižideru plavo/zelene boje. U prisutnosti antioksidansa iz uzorka, ABTS otopina se obezboji što indicira da je došlo do gašenja apsorbancije koja se mjeri na 734 nm. Prednost metode je topljivost ABTS otopine u vodi i organskim otapalima što omogućuje određivanje antioksidativnog kapaciteta i hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Trolox® (vodotopljivi oblik vitamina E) standard je TEAC metode, korišten za izradu baždarnog dijagrama. Antioksidativni kapacitet izražava se kroz mikrograme ekvivalenta Trolox®-a u mililitru ekstrakta (TE(ml) (Re i sur., 1999).

Reagensi:

- ABTS otopina: 10 mg ABTS tablete otopi se u 2.604 mL destilirane vode.
- 1.63 Mm otopina kalijeva persulfata: 6.62 mg $K_2S_2O_8$ stavi se u odmjernu tikvicu od 10 mL i otopi se sa 5 mL destilirane vode te se nadopuni do oznake.
- ABTS radikal kation: pomiješa se jednaka količina ABTS otopine (2.60 mL) i otopine kalijeva persulfata (2.60 mL) te se ostavi na sobnoj temperaturi preko noći (12-16 sati). Otopina ABTS radikal kationa razrijedi se 25x kako bi apsorbancija na 734 nm bila u vrijednostima 0.700 ± 0.02 . Za 15 mL ABTS radikal kationa potrebno je 750 μ L radikala razrijediti sa 14250 μ L destilirane vode.
- 1g/L otopina Trolox-a: 5 mg Trolox®-a otopi se u 96% etanolu u odmjernoj tikvici od 5 mL te nadopuni do oznake.

Baždarni dijagram izradi se pomoću otopina Trolox®-a poznatih koncentracija (u rasponu 3-100 mg/l) pri čemu se svaka otopina analizira na isti način kao i ekstrakti uzoraka. Baždarni dijagram izradi se na način da prikaže ovisnost postotka gašenja apsorbancije otopine ABTS radikal kationa o koncentraciji Trolox®-a (Slika 5).



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti gašenja apsorbancije (postotka inhibicije) o koncentraciji Trolox®-a

Postupak određivanja TEAC antioksidacijskog potencijala

Adekvatno razrijeđeni uzorak (10 μ L uzorak + 10 μ L destilirana voda) pipetira se u jažice mikrotitarske pločice te se doda 200 μ L ABTS radikal kationa. Kontrolni uzorak sastoji se od 20 μ L destilirane vode i 200 μ L ABTS radikal kationa te je on potreban za mjerenje početne apsorbancije. Nakon 60 sekundi laganog potresivanja mikrotitarske pločice u čitaču započinje inkubacija na 30°C kroz 90 sekundi. Po završetku inkubacije očitava se apsorbancija na 734 nm. Svaki uzorak mjeren je u kvadriplikatu.

Antioksidativni kapacitet uzoraka izražava se kao postotak inhibicije (%I) ABTS radikal kationa te se izračunava preko jednadžbe:

$$\%I = [(A_0 - A_i)/A_0] * 100$$

gdje je A_0 apsorbancija ABTS kontrolne reakcije umanjena za apsorbanciju kontrolnog uzorka nakon 3 minute, a A_1 predstavlja apsorbanciju uzorka umanjenu za apsorbanciju kontrolnog uzorka nakon 3 minute.

3.4.3. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti ORAC metodom

ORAC test (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC) metoda je mjerenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta koja se temelji na prijenosu vodikovog atoma s antioksidativnog uzorka na slobodni radikal. Metoda mjeri antioksidativnu inhibiciju peroksilnog radikala nastalog iz hidrofilnog azo spoja 2,2-azobis-2-metilimidamid, dihidroklorid (AAPH) pod utjecajem termičke razgradnje u prisutnosti kisika. Promjena intenziteta fluorescencije nastaje zbog oksidacije novonastalih peroksilnih slobodnih radikala s fluorescentnom probom i antioksidansom te dolazi do gašenja fluorescencije i završetka provođenja metode. Ovisnost dinamičke promjene fluorescencije probe o vremenu stvara krivulju, a površina ispod krivulje - AUC (eng. *Area Under the Curve*) mjeri je antioksidativne učinkovitosti analita. ORAC metoda uzima u obzir inhibicijski stupanj i vrijeme tako što uspoređuje integral smanjenja fluorescencije uzrokovane uzorkom i standardom sa onim slijepe probe. Kao standard je korišten Trolox®, a rezultati se prikazuju kao TE. Metoda se provodi u crnoj mikrotitarskoj pločici u uređaju za mjerenje fluorescencije (VictorX3) (Shahidi i Zhong, 2015).

Reagensi

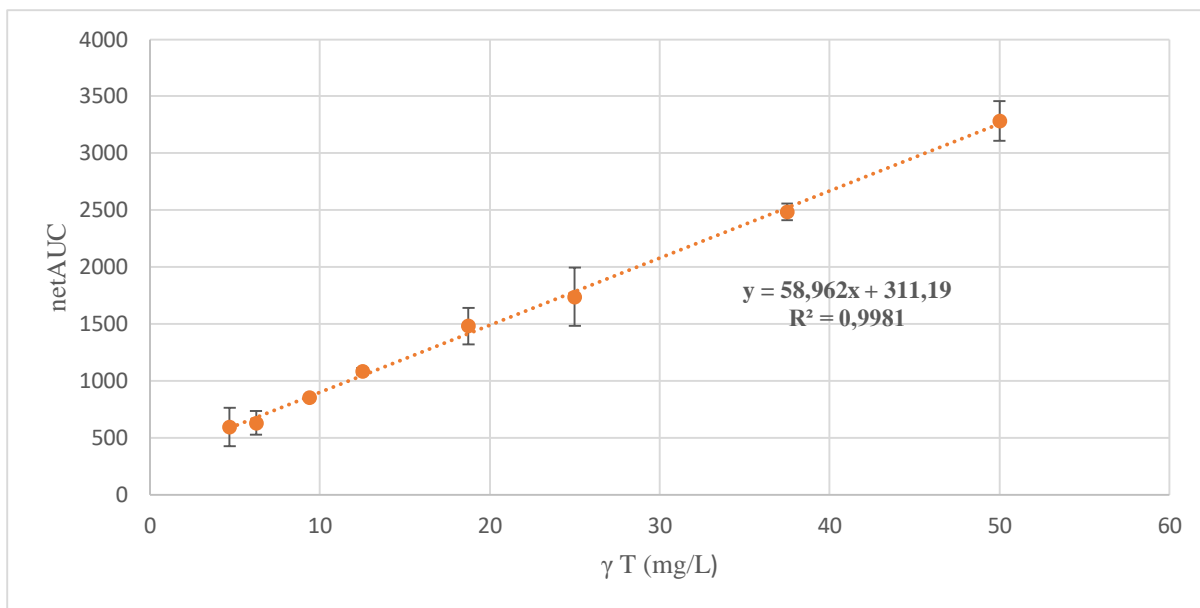
- (75 mM, pH 7.0) fosfatni pufer: za 250 mL fosfatnog pufera potrebno je otopiti 1.5786 g kalijevog dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) i 1.2454 g kalijevog hidrogenfosfata (K_2HPO_4) u destiliranoj vodi te slijedi prilagodba pH do 7.0 upotrebom natrijevog hidroksida pomoću pH-metra. Čuvanje pufera je na sobnoj temperaturi.
- 1mM otopina fluoresceina: za 5 mL otopine potrebno je otopiti 1.9 mg soli fluoresceina u 75 mM fosfatnom puferu. Napravljena otopina čuva se u frižideru (4°C) u tamnim uvjetima. Prije provođenja analize potrebno je razrijediti otopinu tako da se pipetira 25 μL 1 mM otopine fluoresceina u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni fosfatnim puferom.
- 1g/L otopina Trolox-a: 5 mg Trolox®-a otopi se u 96% etanolu u odmjernoj tikvici od 5 mL te nadopuni do oznake.
- AAPH otopina: priprema se svježa prije provođenja mjerenja tako da se otopi 203.4 mg AAPH u 5 mL 75 mL fosfatnog pufera u Falcon tubi od 15 mL do koncentracije od 150 mM te se čuva u mračnoj ledenoj kupelji.

Postupak

Za provođenje metode potrebno je postaviti čitač mikrotitarskih pločica na valnu duljinu ekscitacije od 485 nm te na valnu duljinu emisije od 530 nm. Temperatura se podesi na 37°C zbog osjetljive termalne razgradnje AAPH te se prije njegovog dodavanja reakcijska smjesa inkubira 10 minuta. Čitač se podesi na 5 sekundi potresivanja praćeno s 25 sekundi odgode nakon čega slijedi mjerenje fluorescencije koje se ponavlja 20 puta te završava pauzom od 150 sekundi.

Priprema uzoraka za ORAC test podrazumijeva razrjeđivanje s fosfatnim puferom tako da su prva dva uzorka (KR70-1 i KR70-2) razrijeđena 100 puta, dok su ostali uzorci (KRLio-1, KRLio-2, POK-1, POK-2, KOŠ-1 i KOŠ-2) razrijeđeni 50 puta. Nakon ispunjavanja jažica mikrotitarske pločice uzorcima i slijepim probama (fosfatni pufer), dodaje se 150 μL 1 μM otopine fluoresceina u svaku jažicu pomoću multikanalne pipete. Tako pripremljena pločica inkubira se 10 minuta na 37 °C nakon čega se dodaje 25 μL AAPH otopine i slijedi proces mjerenja prema navedenom protokolu.

Intenzitet fluorescencije mjeri se nakon svakog kruga mjerenja te podatke prikuplja u pivot tablici. Izmjerena fluorescencija preračunava se u postotak intenziteta fluorescencije koji opada s vremenom. Podaci pivot tablice uneseni su u program za statističku obradu podataka koji izračunava AUC za slijepu probu i za svaki analizirani uzorak . Razlika površina ispod krivulje (netAUC) dobije se oduzimanjem površine ispod krivulje slijepe probe od površine ispod krivulje uzoraka. Podatak za netAUC koristi se za izračunavanje antioksidativnog potencijala uzorka u ekvivalentima Trolox[®]-a pomoću baždarnog dijagrama. Baždarni dijagram prikazuje ovisnosti netAUC otopina Trolox[®]-a o koncentraciji (Slika 6).



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti netAUC o koncentraciji Trolox[®]-a

3.5. Statistička obrada podataka

Postupci ekstrakcije antioksidansa iz uzoraka provedene su duplikatu (n=2). Antioksidativna aktivnost svakog ekstrakta analizirana je u kvadriplikatu (n=8). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Uzorci su uspoređivani korištenjem jednosmjerne analize varijance i *post hoc* Bonferroni testa ili studentovog t-testa (ovisno o broju uzoraka). Za računanje srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije te izradu baždarnih dijagrama, korišten je programski paket Microsoft Office Exel (Microsoft Corporation, SAD). Za provođenje ostatka statističke analize rezultata korišten je programski paket GraphPad Prism 8,0 (GraphPad Software LLC).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Rezultati određivanja ukupnih fenola F-C metodom prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Rezultati određivanja ukupnih fenola F-C metodom

	KR _{70-š1}	KR _{LIO-š1}	POK _{š2}	KOŠ _{š2}
GAE (mg/L) 1	11.36	4.3	6.71	2.81
GAE (mg/L) 2	11.33	4.4	6.66	2.83
Odvaga (mg) 1	302.7	298.5	303.6	300.9
Odvaga (mg) 2	302.6	300.8	298.3	302.5
V (mL)	20	20	20	20
mg/100g SU 1	75.06	28.81	44.2	18.68
mg/100g SU 2	74.88	29.26	44.65	18.71
masti	7.84	9.21	3.89	25.87
mg/100g OU 1	69.18	26.16	42.48	13.84
mg/100g OU 2	69.02	26.56	42.92	13.87
srednja vrijednost (mg/100g)	69.1	26.36	42.7	13.86
STDEV	0.11	0.29	0.31	0.02
RSD (%)	0.16	1.08	0.72	0.13

KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; GAE – ekvivalent galne kiseline; V – volumen otopljenog uzorka; SU – suhi odmašćeni uzorak; OU – originalan uzorak; STDEV – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija

Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola (mg/100g GAE) u SU dobivene su iz jednadžbe [1].

$$\frac{mg}{100g} = \frac{GAE \left(\frac{mg}{L}\right) * V (mL)}{odvaga (mg)} * 100 \quad [1]$$

Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola (mg/100g GAE) u OU dobivene su pomoću jednadžbe [2].

$$\frac{mg}{100g} OU = \frac{(100 - masti) * mg/100g}{100} \quad [2]$$

Udjeli polifenola u analiziranim uzorcima kretali su se od 13.86 mg/100 g za uzorak KOŠš2 do 69.1 mg/100 g za uzorak KR70-š1. RSD vrijednosti kretale su se od 0.13 do 1.08 % što ukazuje na odličnu ponovljivost postupka .

Rezultati antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka određene TEAC metodom prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Rezultati određivanja sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

	KR _{70-š1}	KR _{LIO-š1}	POK _{š2}	KOŠ _{š2}
TE (μg/L) 1	143.98	63.63	86.53	50.98
TE (μg/L) 2	146.69	64.59	86.41	50.7
Odvaga (mg) 1	302.7	298.5	303.6	300.9
Odvaga (mg) 2	302.6	300.8	298.3	302.5
V (mL)	20	20	20	20
mg/100g SU1	951.3	426.31	570.03	338.85
mg/100g SU2	969.51	429.44	579.38	335.23
masti	7.84	9.21	3.89	25.87
mg/100g OU 1	876.76	387.06	547.84	251.18
mg/100g OU 2	893.54	389.9	556.83	248.49
srednja vrijednost (mg/100g)	885.15	388.48	552.33	249.84
STDEV	11.87	2.01	6.36	1.9
RSD (%)	1.34	0.52	1.15	0.76

KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; TE – ekvivalent Trolox®-a; V – volumen otopljenog uzorka; SU – suhi odmašćeni uzorak; OU – originalan uzorak; STDEV – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija

Vrijednosti za SU i OU dobivene su korištenjem jednadžbi [1] i [2]. Antioksidativni potencijal analiziranih uzoraka kretao se od 246.84 mg TE/100 g za uzorak KOŠš2 do 885.15 mg TE/100 g za uzorak KR_{70-š1}.

Rezultati antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka određene ORAC metodom prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja antioksidacijske učinkovitosti ORAC metodom

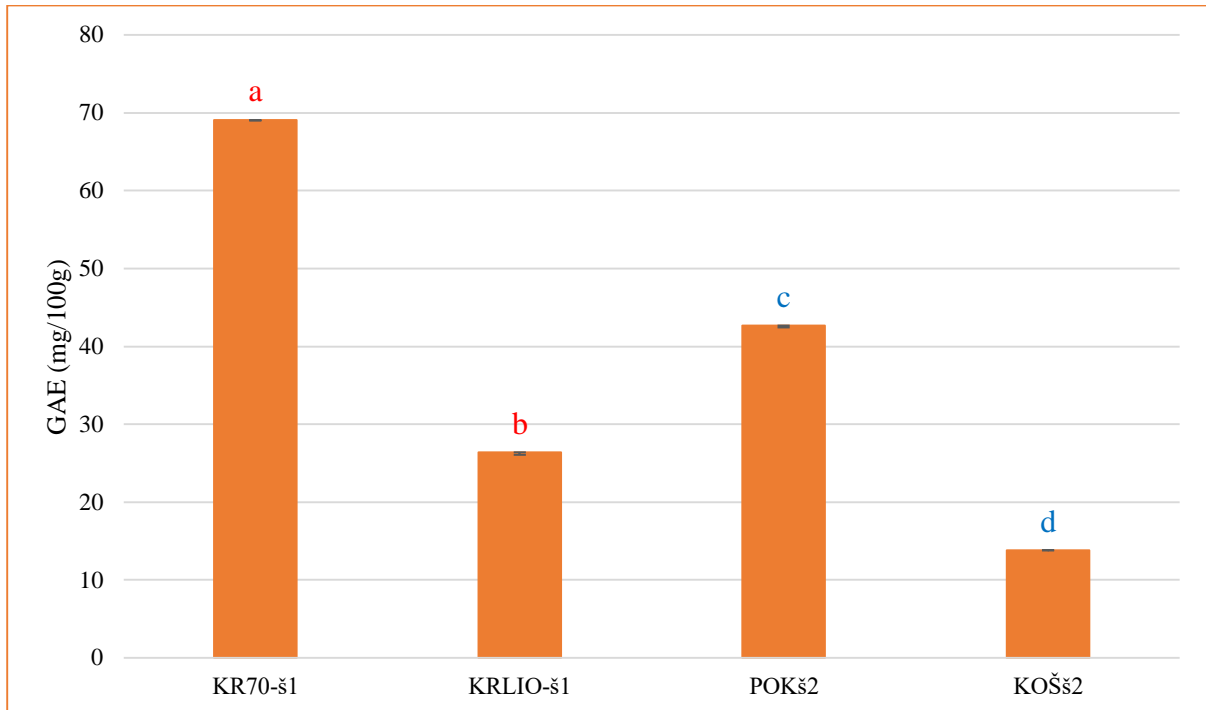
	KR _{70-š1}	KR _{LIO-š1}	POK _{š2}	KOŠ _{š2}
TE (mg/L) 1	1956.9	1543.9	1657.8	1219.7
TE (mg/L) 2	2630.8	1606.2	1827.3	913.5
Odvaga (mg) 1	302.7	298.5	303.6	300.9
Odvaga (mg) 2	302.6	300.8	298.3	302.5
V (mL)	20	20	20	20
mg/100g 1	12929.6	10344.4	10920.9	8107.01
mg/100g 2	17388	10679.5	12251.4	6039.67
masti	7.84	9.21	3.90	25.87
mg/100g OU 1	11916.4	9391.86	10495.9	6009.41
mg/100g OU 2	16025.4	9696.13	11774.6	4476.97
srednja vrijednost (mg/100g)	13970.9	9543.99	11135.2	5243.19
STDEV	2905.48	215.15	904.17	1083.6
RSD (%)	20.80	2.25	8.12	20.67

KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; TE – ekvivalent Trolox®-a; V – volumen otopljenog uzorka; SU – suhi odmašćeni uzorak; OU – originalan uzorak; STDEV – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija

Vrijednosti za SU i OU dobivene su korištenjem jednadžbi [1] i [2]. Antioksidativni potencijal analiziranih uzoraka dobiven ORAC metodom kretao se 5243.19 mg TE/100 g za uzorak KOŠš2 do 13970.90 mg TE/100 g za uzorak KR70-š1.

4.2. Rasprava

4.2.1. Udio ukupnih fenola u ekstraktu komine rajčice



Slika 7. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; GAE-ekvivalenti galne kiseline. Stupići označeni različitim slovom pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$) (određeno provedbom jednosmjerne analize varijance i *post hoc* Bonferroni testa).

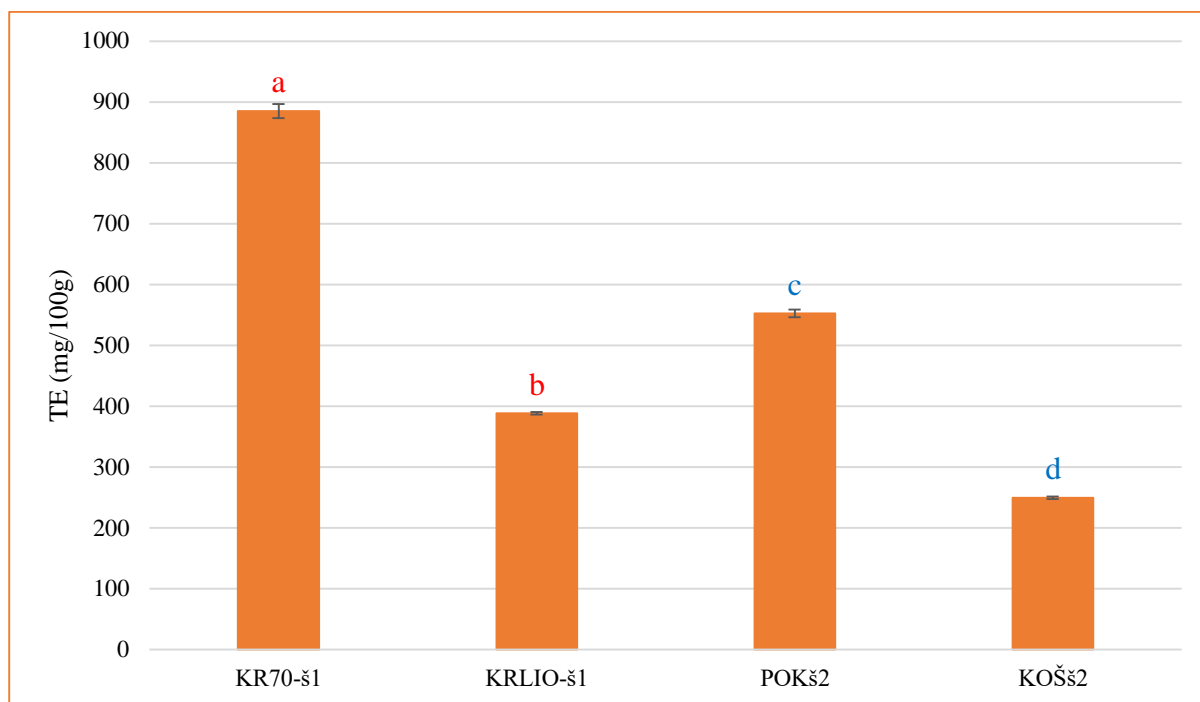
Vrijednosti sadržaja polifenola određene F-C metodom kreću se u rasponu od 13.86 do 69.1 mg GAE/100 g uzorka. Rezultati pokazuju kako najviši redukcijski potencijal, tj. najvišu koncentraciju antioksidansa predstavlja uzorak KR_{70-š1} (pokožica i koštice sušene na 70°C) koji iznosi 69.1 mg GAE/100 g uzorka. Nakon njega slijedi uzorak POK_{š2} (pokožica sušena na 70°C) sa vrijednosti od 42.7 mg GAE/100 g uzorka. Treći po redu je uzorak KR_{LIO-š1} (lioofilizirana komina) koji iznosi 26.36 mg GAE/100 g uzorka. Uzorak KOŠ_{š2} (koštice sušene na 70°C) pokazao je najmanju vrijednost koja iznosi 13.86 mg GAE/100 g uzorka. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako postupak sušenja može utjecati na udio polifenola, u korist sušenja na 70°C. Također vidljivo je kako frakcija pokožica sadržava više polifenola od frakcije koštica.

Dosadašnja istraživanja komine rajčice koja su koristila F-C metodu za određivanje ukupnih fenolnih komponenata variraju u vrijednostima i kreću se u rasponu od 43.43 do 1042.6 mg GAE/100 g (Navarro-González i sur., 2011; Robles-Ramírez i sur., 2016; Perea-Domínguez i sur., 2018). Gomes i sur. (2022) proveli su komparativnu studiju uspoređujući klasičnu ekstrakciju organskim otapalom i ultrazvučnu ekstrakciju na uzorku pokožice rajčice sušene na 60°C. Korišteno otapalo bio je 70% etanol te se ekstrakcija provodila u vodenoj kupelji na 57°C tijekom 40 minuta. Dobiven je rezultat od 445.95 ± 0.95 mg GAE/100 g uzorka za klasičnu ekstrakciju i 463.16 ± 1.58 mg GAE/100 g uzorka za ultrazvučnu ekstrakciju.

Sadržaj ukupnih polifenola određen u frakcijama komine rajčice u ovom diplomskom radu, nalaze se blizu donje granice gore navedenih raspona. Navedeno je možda posljedica činjenice da je osnovni cilj našeg istraživanja bila komparativna analiza frakcija i različitih postupaka sušenja pri čemu je postupak ekstrakcije proveden bez optimizacije koja bi za cilj imala maksimalno povećanje prinosa. Naime, izmjenama uvjeta ekstrakcije moguće je dobiti više udjele polifenola u ekstraktima. Nadalje, udio polifenola u uzorcima ovisi i o agroklimatskim uvjetima u kojima raste rajčica i stupnju zrelosti ubrane rajčice (Fuentes i sur., 2012) te načinu pripreme komine. Primjerice Gomes i sur. (2022) koristili su svježju rajčicu koju su usitnili i sušili na 60°C dok je komina rajčice korištena u ovom radu prokuhana prije samog sušenja i usitnjavanja što može utjecati na udio polifenola.

Uspoređujući međusobno frakciju pokožice i frakciju koštica, nedvojbeno je viši rezultat za frakciju pokožice što se slaže sa istraživanjem koje su proveli Toor i Savage (2005) koji su ispitivali antioksidativnu aktivnost različitih frakcija komine rajčice (pokožica, koštice i pulpa). Uzorci su liofilizirani te je provedena separirana ekstrakcija na hidrofilni i lipofilni ekstrakt. Otapala lipofilnog ekstrakta su heksan i aceton te hidrofilnog ekstrakta su heksan i aceton:voda:acetinska kiselina (70:29.5:0.5). Zaključeno je da pokožica ima značajno više vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, likopena, askorbinske kiseline i antioksidativne aktivnosti u usporedbi sa pulpom i košticama. Hidrofilni fenolni spojevi u pokožici kretali su se u rasponu od 26.9 do 30.3 mg GAE/100 g uzorka što je usporedivo sa rezultatom ovog rada (42.7 mg GAE/100 g uzorka). Također, ukupni fenoli u košticama iznosili su 22.0 ± 3.76 mg GAE/100 g uzorka što je malo više od rezultata ovog rada (13.86 mg GAE/100 g uzorka). Dokazana je veća prisutnost fenolnih spojeva u pokožici za razliku od koštica zato što fenolni spojevi imaju tendenciju nakupljanja u dermalnim tkivima biljke zbog potencijalne uloge u zaštiti od ultraljubičaste radijacije, fenoli služe kao kemijski spojevi u obrani biljke od patogena i predatora te djeluju kao atraktanti u procesu oplodnje i raspršivanja plodova (Strack, 1997).

4.2.2. Antioksidativni potencijal ekstrakta komine rajčice određen TEAC metodom



Slika 8. Grafički prikaz rezultata određivanja sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

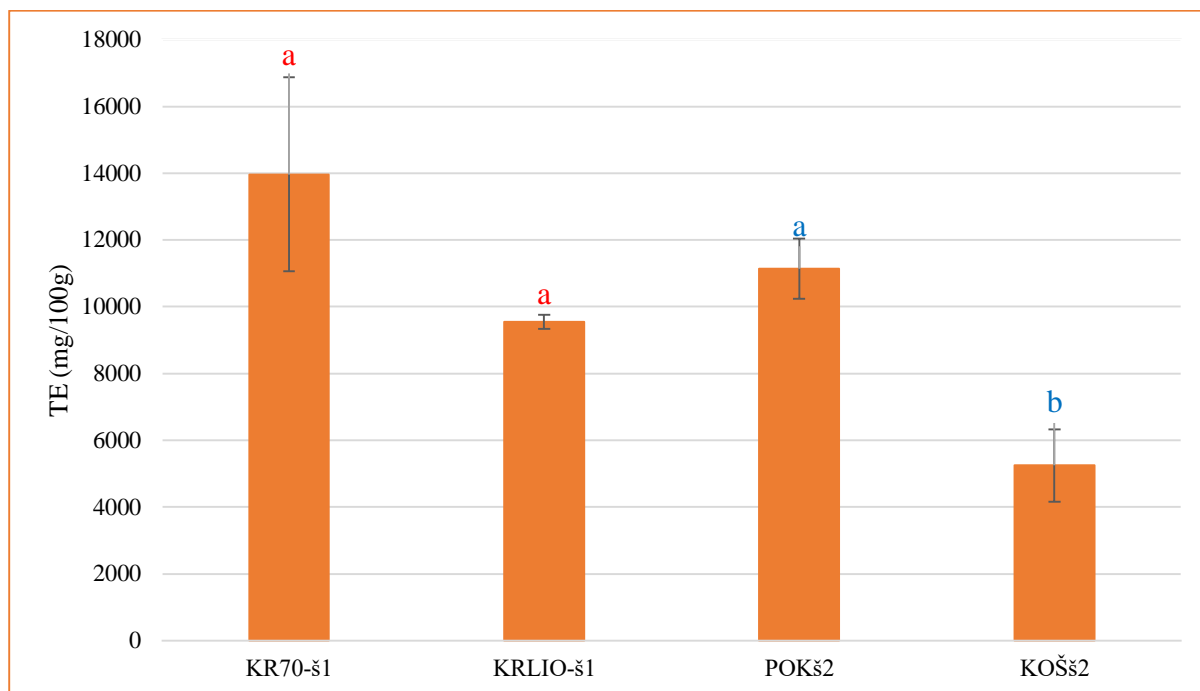
KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; TE – ekvivalent Trolox®-a. Stupići označeni različitim slovom pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$) (određeno provedbom jednosmjerne analize varijance i post hoc Bonferroni testa).

TEAC metoda potvrdila je trend rezultata dobivenih F-C metodom. Rezultati se kreću u rasponu od 249.84 do 885.15 mg TE/100g uzorka. Najveću antioksidativnu moć gašenja apsorbacije ABTS^{•+} pokazao je uzorak KR70-š1 (885.2 mg TE/100 g uzorka) zatim slijedi uzorak POKš2 (552.3 mg TE/100 g uzorka), nakon njega je liofilizirani uzorak KRLIO-š1 (388.5 mg TE/100 g uzorka) i uzorak s najmanjom vrijednosti je KOŠš2 (249.84 mg TE/100 g uzorka). Sušenje komine rajčice na 70°C, za razliku od sušenja smrzavanjem, pokazalo se kao bolja opcija za očuvanje antioksidacijskog potencijala.

Gomez i sur. (2022), klasičnom ekstrakcijom sušene pokožice, proveli su mjerenje antioksidativnog kapaciteta TEAC metodom te su dobili rezultat od 648.7 mg/100 g što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Toor i Savage (2005) mjerili su antioksidativni kapacitet liofiliziranog uzorka pokožice i koštica u hidrofilnom ekstraktu TEAC metodom. Uzorak pokožice pokazao je bolju antioksidativnu aktivnost (53,2 mg TE/100g) od uzorka

koštica (28,53 mg TE/100 g), tj. uzorak koštica daje dvostruko manje vrijednosti od uzorka pokožice što je u skladu s rezultatima ovog rada (iako su apsolutne vrijednosti TEAC antioksidativnog potencijala značajno niže od onih dobivenih u ovom radu).

4.2.3. Antioksidacijska učinkovitost ekstrakata komine rajčice određena ORAC testom



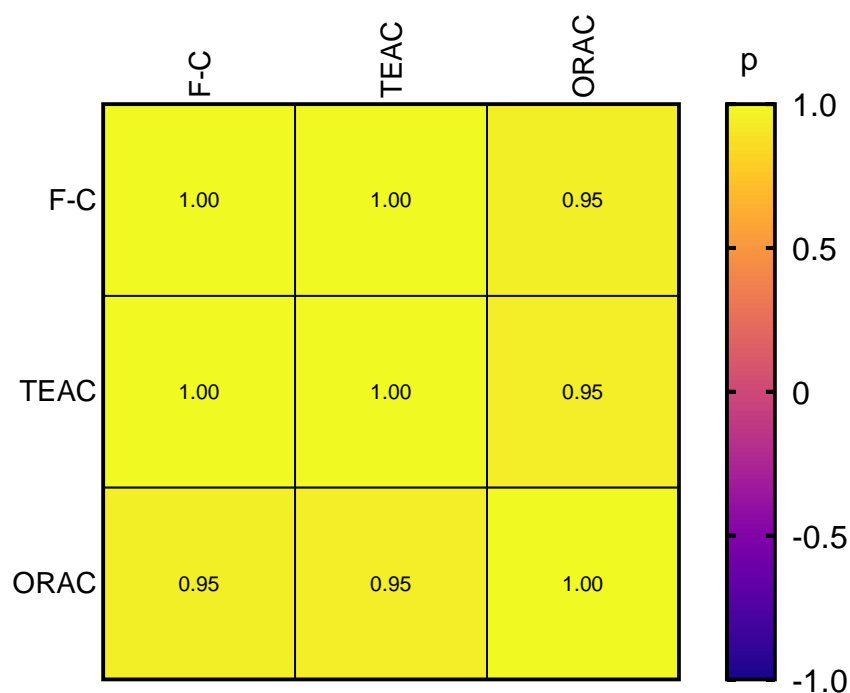
Slika 9. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske učinkovitosti ORAC metodom

KR70-š1-komina rajčice sušena na 70°C; KRLIO-š1-komina rajčice liofilizirana; POKš2-pokožica rajčice sušena na 70°C; KOŠš2-koštice rajčice sušene na 70°C; TE – ekvivalent Trolox®-a. Stupići označeni različitim slovom pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$) (određeno provedbom jednosmjerne analize varijance i post hoc Bonferroni testa).

ORAC metoda djelomično je potvrdila rezultate prethodnih metoda. Razlika dobivenih vrijednosti za uzorke KR_{70-š1}, KR_{LIO-š1} i POK_{š2} nije statistički značajna te iznosi 13970.90 mg TE/100 g za uzorak KR_{70-š1}, 9543.99 mg TE/100 g za uzorak KR_{LIO-š1} i 11135.20 mg TE/100 g za uzorak POK_{š2}. Uzorak KOŠ_{š2} daje najmanju vrijednost koja iznosi 5243.19 mg TE/100 g.

Tri odabrane metode određivanja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti na 4 različita uzorka pokazuju sličan trend rezultata. Statističkom analizom utvrđene su značajne korelacije između udjela polifenola i oba tipa antioksidativnog potencijala (Slika 10.) pri čemu su koeficijenti u svim slučajevima Pearsonovi koeficijenti korelacije bili > 0.954 (korelacija

TEAC i ORAC), a p vrijednosti ≤ 0.05 . Iz navedenog proizlazi zaključak kako se polifenoli mogu smatrati glavnim nositeljima antioksidativnog potencijala komine rajčice.



Slika 10. Korelacijski koeficijenti i razina značajnosti korelacije sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti uzoraka

F-C-Folin Ciocalteu metoda; TEAC-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; ORAC-Oxygen Radical Absorbance Capacity

Pojedine razlike među rezultatima metoda su očekivane zbog faktora kao što su kemijska struktura, molekularna veličina i koncentracija pojedinih komponenata u uzorku koji interferiraju u prijenosu elektrona ili prijenosu vodikovog atoma što su glavni mehanizmi mjerenja sposobnosti antioksidansa u gašenju radikala (Schaich i sur., 2015). Usporedbom sva 4 uzorka potvrđeno je kako najveće vrijednosti ostvaruje uzorak KR_{70-š1} dok najmanje vrijednosti pokazuje uzorak KOŠ_{š2}. Uzorak KR_{70-š1} (cjelokupna komina sušena na 70°C) i KR_{LIO-š1} (cjelokupna komina sušena smrzavanjem) odabrani su u ovom radu kako bi se usporedio način sušenja materijala i očuvanja antioksidativnih komponenata. Početna hipoteza išla je na stranu liofilizacije radi samog mehanizma te metode koja se koristi kod termoosjetljivih i nestabilnih supstanca, no rezultati su pokazali kako bolje vrijednosti ostvaruje sušenje komine na 70°C od sušenja smrzavanjem. Spomenuta opažanja mogu se objasniti činjenicom da pod utjecajem visoke temperature dolazi do pucanja strukture stanične stijenke i

razgradnje netopljivih kompleksa polifenola s matriksom uzorka pri čemu se povećava ekstraktibilnost istih (Juániz i sur., 2016).

Uzorci POK_{s2} (pokožica) i KOŠ_{s2} (koštice) odabrani su kako bi se usporedilo koja frakcija sadržava više antioksidativnog potencijala te se nedvojbeno potvrdila činjenica kako pokožica sadržava više polifenolnih komponenata zaduženih za antioksidaciju od samih koštica, što je u skladu sa mnogobrojnim dosadašnjim istraživanjima.

Na rezultate utječu mnogobrojni čimbenici, kao što su sorta rajčice, tehnološki proces obrade rajčice, temperatura, metoda sušenja, vrste otapala korištenih za ekstrakciju te metode ekstrakcija. Haminiuk i sur. (2014) navode važnost odabira odgovarajućeg otapala za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala te prema njihovom istraživanju metanol se pokazao najboljim što zahtijeva dodatna istraživanja na samom uzorku komine rajčice. U ovom radu korištena je klasična ekstrakcija otapalom, no provedena su istraživanja koja su koristila ostale vrste ekstrakcija. U ekstrakciji koštica rajčice korištene su mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija koje su dale povoljne rezultate, također je zaključeno kako temperatura ima pozitivan utjecaj na ekstrakciju, tj. više temperature povećavaju topljivost aktivnih komponenata zbog ubrzavanja difuzije otapala u matriks uzorka, posljedično povećavajući iskoristivost (Solaberrieta i sur., 2022). Gomes i sur. (2022) provodeći komparativnu studiju, između klasične ekstrakcije organskim otapalom i ultrazvučne ekstrakcije, dobili su bolje rezultate za ultrazvučnu ekstrakciju u trajanju od 10 minuta za razliku od klasične ekstrakcije koja se provodila 40 minuta. Uspoređivana je i mikrovalna ekstrakcija sa superkritičnom ekstrakcijom koštica rajčice te je veća iskoristivost i antioksidativni kapacitet uočen kod mikrovalne ekstrakcije (Solaberrieta i sur., 2022). Na temelju navedenog, potrebno je provesti dodatna istraživanja koja bi koristila novije („zelene“) vrste ekstrakcija te njihovu primjenjivost na industrijskoj razini.

Ovaj rad može pomoći u valorizaciji vrijedne sirovine koja zaostaje nakon obrade rajčice. Rezultati idu u prilog cjelokupne komine za razliku od pojedinačnih frakcija što je povoljnije kod razvijanja metoda na industrijske skale jer skraćuje postupak, tj. izostavlja se korak separacije pokožice od koštica te je na taj način vremenski i ekonomski veća isplativost. Osim iskorištavanja komine na industrijskoj razini, ovaj rad zajedno sa istraživanjima potvrđuje kako uklanjanje pokožice i koštica tijekom kuhanja i procesuiranja rajčice u domaćinstvima rezultira u značajnom gubitku važnih antioksidansa te se potiče konzumacija cjelokupne rajčice kako bi se iskoristio njezin puni potencijal na zdravlje ljudi (Toor i Savage, 2005).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- Udio polifenola i antioksidativni potencijal (frakcija) komine rajčice su u međusobnoj korelaciji.
- Proces sušenja značajno utječe na antioksidativni potencijal pri čemu se sušenjem komine rajčice u termostatu pri 70°C dobiju produkti bogatiji antioksidansima nego sušenjem komine rajčice postupkom liofilizacije
- Pokožica rajčice sadrži značajno veću količinu polifenolnih spojeva s antioksidativnom aktivnošću od koštice rajčice.
- Dobiveni rezultati u skladu su s dostupnim literaturnim podacima te doprinose trenutnim saznanjima o vrijednosti komine rajčice kao izvora antioksidansa kao i važnosti uvjeta procesuiranja.

6. LITERATURA

- Abbasi-Parizad P, Scarafoni A, Pilu R, Scaglia B, De Nisi P i Adani F. The recovery from agro-industrial wastes provides different profiles of anti-inflammatory polyphenols for tailored applications. *Front. Sustain. Food Syst*, 2022, 6:996562.
- Agaj A, Peršurić Ž, Pavelić SK. Mediterranean Food Industry By-Products as a Novel Source of Phytochemicals with a Promising Role in Cancer Prevention. *Molecules*, 2022, 27, 8655.
- Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2007, 2(4), 875–877.
- Allaqaband S, Dar AH, Patel U, Kumar N, Nayik GA, Khan SA, Ansari MJ, Alabdallah NM, Kumar P, Pandey VK, Kovács B, Shaikh AM. Utilization of Fruit Seed-Based Bioactive Compounds for Formulating the Nutraceuticals and Functional Food: A Review. *Front Nutr*, 2022, 9:902554.
- Albanese D, Adiletta G, D'Acunto M, Cinquanta L, Di Matteo M. Tomato peel drying and carotenoids stability of the extracts. *Int. J. Food Sci. Technol*, 2014, 49, 2458–2463.
- Angeloni C, Malaguti M, Prata C, Freschi M, Barbalace MC, & Hrelia S. Mechanisms Underlying Neurodegenerative Disorders and Potential Neuroprotective Activity of Agrifood By-Products. *Antioxidants*, 2023, 12(1), 94.
- Azabou S, Sebi H, Taheur FB, Abid Y, Jridi M, Nasri M. Phytochemical profile and antioxidant properties of tomato by-products as affected by extraction solvents and potential application in refined olive oils. *Food Biosci*, 2020, 36:100664.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 2013, 117(4), 426–436.
- Cámara M, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MC, Cámara RM, Domínguez L, Sesso HD. Scientific Evidence of the Beneficial Effects of Tomato Products on Cardiovascular Disease and Platelet Aggregation. *Front Nutr*, 2022, 9:849841.
- Castro TA, Leite BS, Assunção LS, de Jesus Freitas T, Colauto NB, Linde GA, Otero DM, Machado BAS, Ferreira Ribeiro CD. Red Tomato Products as an Alternative to Reduce Synthetic Dyes in the Food Industry: A Review. *Molecules*, 2021, 26(23):7125.
- Comunian TA, Silva MP, Souza CJ. The Use of Food By-Products as a Novel for Functional Foods: Their Use as Ingredients and for the Encapsulation Process. *Trends Food Sci. Techno*, 2021, 108, 269–280.

- Četković G, Savatović S, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Vulić J, Mandić A, Četojević-Simin D. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*, 2012, 133(3), 938-945.
- Eliopoulos C, Markou G, Langousi I, Arapoglou D. Reintegration of Food Industry By-Products: Potential Applications. *Foods*, 2022, 11, 3743.
- Ferreres F, Taveira M, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect, *J. Agric. Food Chem*, 2010, 58 (5), 2854–2861.
- Fuentes E, Carle R, Astudillo L, Guzmán L, Gutiérrez M, Carrasco G, Palomo I. Antioxidant and Antiplatelet Activities in Extracts from Green and Fully Ripe Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum*) and Pomace from Industrial Tomato Processing. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:867578.
- Fuentes E, Castro R, Astudillo L, Carrasco G, Alarcon M, Gutierrez M, Palomo I. Bioassay-guided isolation and HPLC determination of bioactive compound that relate to the antiplatelet activity (adhesion, secretion, and aggregation) from *Solanum Lycopersicum*. *Evid. Based Complement. Altern. Med*, 2012, 147031.
- Gebeyew K, Animut G, Urge M, Feyera T. The effect of feeding dried tomato pomace and concentrate feed on body weight change, carcass parameter and economic feasibility on Hararghe highland sheep, eastern Ethiopia, *J. Vet. Sci. Technol*, 2015, 6 (2) 1.
- Giannelos PN, Sxizas S, Lois E, Zannikos F, Anastopoulos G. Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines, *Ind. Crop. Prod*, 2005, 22 (3), 193–199.
- Gomes FS, Silva LOM, Beres C, Pagani MM, Brígida AIS, Santiago MCPA, Pacheco S, Godoy RLO, Cabral LMC. Processing tomato waste as a potential bioactive compounds source: phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility studies. *Ciência Rural*, 2022, 52.
- Haminiuk CW, Plata-Oviedo MS, de Mattos G, Carpes ST, Branco IG. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(10):2862-6.
- Hashemzaei M, Far AD, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, Sadegh SE, Tsarouhas K, Kouretas D, Tzanakakis G, et al. Anticancer and Apoptosis-Inducing Effects of Quercetin in Vitro and in Vivo. *Oncol. Rep*, 2017, 38, 819–828.

- Józwiak M, Filipowska A, Fiorino F, Struga M. Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives. *Eur J Pharmacol*, 2020 Mar 15;871:172937.
- Juárez I, Ludwig IA, Huarte E, Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Cid C, De Peña MP. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem*, 2016, 197(Pt A):466-73.
- 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 G, Verma N. Nature Curing Cancer—Review on Structural Modification Studies with Natural Active Compounds Having Anti-Tumor Efficiency. *Biotechnol. Rep*, 2015, 6, 64–78.
- Kim SP, Nam SH, Friedman M. The Tomato Glycoalkaloid α -Tomatine Induces Caspase-Independent Cell Death in Mouse Colon Cancer CT-26 Cells and Transplanted Tumors in Mice. *J. Agric. Food Chem*, 2015, 63, 1142–1150.
- Kumar M, et al. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 142, 112018.
- Liu Y, Zhao Y, Feng X. Exergy Analysis for a Freeze-Drying Process. *Appl. Therm. Eng*, 2008, 28, 675–690.
- Lu Z, Wang J, Gao R, Ye F, Zhao G. Sustainable valorisation of tomato pomace: a comprehensive review, *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 86, 172–187.
- Navarro-González I, García-Valverde V, García-Alonso J, Periago J. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 2011, 44, 1528-1535.
- Palomo I, Concha-Meyer A, Lutz M, Said M, Sáez B, Vásquez A, Fuentes E. Chemical Characterization and Antiplatelet Potential of Bioactive Extract from Tomato Pomace (Byproduct of Tomato Paste). *Nutrients*, 2019, 11(2):456.
- Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(9):3453-3461.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.

- Robles-ramírez M, Monterrubio-López R, Mora-Escobedo R, Beltrán-Orozco M. Evaluation of extracts from potato and tomato wastes as natural antioxidant additives. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2016, 66(1), p.66-73.
- Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019. Update from the GBD 2019 study. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76:2982–3021.
- Schaich KM, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14, 111-125.
- Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 2015, 18, 757-781.
- Solaberrieta, I.; Mellinas, C.; Jiménez, A.; Garrigós, M.C. Recovery of Antioxidants from Tomato Seed Industrial Wastes by Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction. *Foods*, 2022, 11, 3068.
- Solaberrieta I, Mellinas AC, Espagnol J, Hamzaoui M, Jiménez A, Garrigós MC. Valorization of Tomato Seed By-Products as a Source of Fatty Acids and Bioactive Compounds by Using Advanced Extraction Techniques. *Foods*, 2022, 11(16):2408.
- Socaci SA, Ruginǎ DO, Diaconeasa ZM, et al. Antioxidant Compounds Recovered from Food Wastes. Functional Food - Improve Health through Adequate Food. *InTech*, 2017.
- Strack D. Phenolic metabolism. In P. M. Dey & J.B. Harborne (eds.), *Plant biochemistry*. London: Academic Press, 1997.
- Taveira M, Silva LR, Vale-Silva LA, Pinto E, Valentão P, Ferreres F, Guedes de Pinho P, Andrade PB. Lycopersicon esculentum Seeds: an industrial byproduct as an antimicrobial agent. *J. Agric. Food Chem*, 2010, 58 (17), 9529–9536.
- Toor RK, Savage GP, Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*, 2005, 38(5), 487-494.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Komina rajčice je otpadni materijal procesuiranja rajčice te se sastoji od pokožice, koštica i ostataka usplođa. Dosadašnja istraživanja potvrdila su prisutnost fenolnih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću koja omogućavaju valorizaciju komine rajčice za proizvodnju nutraceutika, odnosno spojeva s dodanom vrijednošću uz istodobno rješavanje problema odlaganja bio-otpada. Biološki aktivne komponente komine rajčice, prvenstveno karotenoidi i fenolni spojevi ispoljavaju protuupalno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje. Ovaj diplomski rad istražuje utjecaj različitih vrsta sušenja (sušenje u termostatu na 70°C i sušenje smrzanjem) na sadržaj bioaktivnih sastavnica s antioksidativnim djelovanjem te uspoređuje udio navedenih sastavnica u različitim dijelovima komine rajčice (cjelokupna komina, pokožica i koštice). Određivanje ukupnih fenola provedeno je Folin-Ciocalteu metodom, zatim je TEAC metodom određena sposobnost vezanja radikala te je ORAC metodom izmjerena antioksidacijska učinkovitost. Iz dobivenih rezultata proizlazi kako postupak sušenja značajno utječe na udio polifenola, tj. sušenje komine rajčice u termostatu na 70°C predstavlja bolju opciju za očuvanje antioksidativnog potencijala u odnosu na sušenje komine rajčice smrzanjem. Dokazana je korelacija između udjela polifenola i antioksidativnog potencijala. Također potvrđeno je kako pokožica rajčice sadrži značajno veću količinu polifenolnih spojeva s antioksidativnom aktivnošću od koštice rajčice. Rezultati mogu doprinijeti postojećim saznanjima o komini rajčice kao vrijedne sekundarne sirovine za njeno bolje iskorištavanje u vidu dobivanja bioaktivnih sastavnica s antioksidativnim djelovanjem.

Tomato pomace is a waste material from the processing of tomatoes and consists of the skin, seeds and remains of the pulp. Previous research has confirmed the presence of phenolic compounds with high antioxidant activity that enable the valorization of tomato pomace for the production of nutraceuticals, i.e. compounds with added value while also solving the problem of bio-waste disposal. Biologically active components of tomato pomace, primarily carotenoids and phenolic compounds exhibit anti-inflammatory, antimutagenic and anticancer effects. This diploma thesis investigates the influence of different types of drying (drying in a thermostat at 70°C and freeze drying) on the content of bioactive components with antioxidant activity and compares the proportion of said components in different parts of tomato pomace (whole pomace, skin and seeds). Total phenols were determined using the Folin-Ciocalteu method, radical binding capacity was determined using the TEAC method, and antioxidant efficiency was measured using the ORAC method. The obtained results show that the drying process significantly affects the content of polyphenols, i.e. drying tomato pomace in a thermostat at 70°C is a better option for preserving the antioxidant potential compared to drying tomato pomace by freezing. A correlation between the content of polyphenols and antioxidant potential has been proven. It was also confirmed that the skin of the tomato contains a significantly higher amount of polyphenolic compounds with antioxidant activity than the seeds of the tomato. The results can contribute to existing knowledge about tomato pomace as a valuable secondary raw material for its better utilization in the form of obtaining bioactive components with antioxidant activity.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Valorizacija komine rajčice kao izvora antioksidansa

Marija Ivić

SAŽETAK

Komina rajčice je otpadni materijal procesuiranja rajčice te se sastoji od pokožice, koštica i ostataka usplođa. Dosadašnja istraživanja potvrdila su prisutnost fenolnih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću koja omogućavaju valorizaciju komine rajčice za proizvodnju nutraceutika, odnosno spojeva s dodanom vrijednošću uz istodobno rješavanje problema odlaganja bio-otpada. Biološki aktivne komponente komine rajčice, prvenstveno karotenoidi i fenolni spojevi ispoljavaju protuupalno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje. Ovaj diplomski rad istražuje utjecaj različitih vrsta sušenja (sušenje u termostatu na 70°C i sušenje smrzanjem) na sadržaj bioaktivnih sastavnica s antioksidativnim djelovanjem te uspoređuje udio navedenih sastavnica u različitim dijelovima komine rajčice (cjelokupna komina, pokožica i koštice). Određivanje ukupnih fenola provedeno je Folin-Ciocalteu metodom, zatim je TEAC metodom određena sposobnost vezanja radikala te je ORAC metodom izmjerena antioksidacijska učinkovitost. Iz dobivenih rezultata proizlazi kako postupak sušenja značajno utječe na udio polifenola, tj. sušenje komine rajčice u termostatu na 70°C predstavlja bolju opciju za očuvanje antioksidativnog potencijala u odnosu na sušenje komine rajčice smrzanjem. Dokazana je korelacija između udjela polifenola i antioksidativnog potencijala. Također potvrđeno je kako pokožica rajčice sadrži značajno veću količinu polifenolnih spojeva s antioksidativnom aktivnošću od koštice rajčice. Rezultati mogu doprinijeti postojećim saznanjima o komini rajčice kao vrijedne sekundarne sirovine za njeno bolje iskorištavanje u vidu dobivanja bioaktivnih sastavnica s antioksidativnim djelovanjem.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 43 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina rajčice, antioksidansi, polifenoli, sušenje, liofilizacija, nutraceutik

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Petra Turčić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Marijana Zovko Končić, 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
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Valorization of tomato pomace as a source of antioxidants

Marija Ivić

SUMMARY

Tomato pomace is a waste material from the processing of tomatoes and consists of the skin, seeds and remains of the pulp. Previous research has confirmed the presence of phenolic compounds with high antioxidant activity that enable the valorization of tomato pomace for the production of nutraceuticals, i.e. compounds with added value while also solving the problem of bio-waste disposal. Biologically active components of tomato pomace, primarily carotenoids and phenolic compounds exhibit anti-inflammatory, antimutagenic and anticancer effects. This diploma thesis investigates the influence of different types of drying (drying in a thermostat at 70°C and freeze drying) on the content of bioactive components with antioxidant activity and compares the proportion of said components in different parts of tomato pomace (whole pomace, skin and seeds). Total phenols were determined using the Folin-Ciocalteu method, radical binding capacity was determined using the TEAC method, and antioxidant efficiency was measured using the ORAC method. The obtained results show that the drying process significantly affects the content of polyphenols, i.e. drying tomato pomace in a thermostat at 70°C is a better option for preserving the antioxidant potential compared to drying tomato pomace by freezing. A correlation between the content of polyphenols and antioxidant potential has been proven. It was also confirmed that the skin of the tomato contains a significantly higher amount of polyphenolic compounds with antioxidant activity than the seeds of the tomato. The results can contribute to existing knowledge about tomato pomace as a valuable secondary raw material for its better utilization in the form of obtaining bioactive components with antioxidant activity.

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

Thesis includes: 46 pages, 10 figures, 4 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tomato pomace, antioxidants, polyphenols, drying, liophilization, nutraceutical

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
Petra Turčić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2023.

