

Antioksidacijska svojstva nusprodukata kod prerade rajčica

Manin, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:797252>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Laura Manin

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA NUSPRODUKATA KOD PRERADE
RAJČICA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Diplomski rad izrađen je u laboratoriju na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Zavodu za fizičku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.

Mentor rada: prof. dr. sc. Srećko Valić, prof.

Komentor: dr. sc. Jurica Jurec

Diplomski rad obranjen je dana 09.09.2024. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. (predsjednik Povjerenstva)
2. Izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.
3. Prof. dr. sc. Damir Muhvić, dr. med.
4. Prof. dr. sc. Srećko Valić, prof.

Rad ima 55 stranica, 35 slika, 6 tablica i 44 literaturna navoda.

ZAHVALA

Ovo je istraživanje financirano putem potpore IP-2022-10-9292 Hrvatske zaklade za znanost i uniri-iskusni-tehnic-23-217 Sveučilišta u Rijeci.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr. sc. Srećku Valiću koji me je prepoznao te mi je pružio jedinstvenu priliku da učim od njega. Veliko hvala na svim savjetima, diskusijama rezultata te na ukazanom povjerenju.

Zahvaljujem svojemu komentoru dr. sc. Jurici Jurecu i dr. sc. Tatjani Antonić Jelić s Instituta „Ruđer Bošković“ na nesebičnoj pomoći tijekom izvođenja ESR mjerenja i popratnim komentarima.

Posebnu zahvalnost iskazujem obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz cijeli ovaj proces te su ga učinili lakšim i ljepšim.

Sadržaj

SAŽETAK	I
SUMMARY	II
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJE	1
1.1 UVOD	1
1.1.1. Sastav sjemenki rajčica	2
1.1.2. Sadržaj fenolnih spojeva i nukleotida	4
1.1.3. Sadržaj karotenoida	5
1.1.4. Sadržaj proteina	7
1.1.5. Sadržaj lipida	7
1.1.6. Sadržaj minerala i vitamina	8
1.2. SLOBODNI RADIKALI	9
1.2.1. Antioksidansi	10
1.2.2. DPPH radikal	12
1.2.3. Reakcija DPPH radikala s fenolima kao antioksidansima	13
1.3. ZELENA KEMIJA	15
1.3.1. Ekološki prihvatljiva uporaba nusprodukata industrijske prerade rajčica	16
1.3.2. Mikrobna fermentacija u proizvodnji mliječne kiseline	16
1.3.3. Kemijska sinteza mliječne kiseline	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.2. Metoda	22
3.2.1. Izdvajanje i sušenje sjemenki	22
3.2.2. Priprema ekstrakta sjemenki	23
3.2.3. Elektronska spinska rezonancija (ESR)	24
4. REZULTATI	27
4.1. Antioksidacijska svojstva zamrznutih sjemenki dviju sorti rajčica, 0. mjesec	28
4.2. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi, 0. mjesec	30

4.3. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica, 0. mjesec	31
4.4. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 3 mjeseca	32
4.5. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 3 mjeseca	34
4.6. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 3 mjeseca skladištenja	35
4.7. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 6 mjeseci	36
4.8. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 6 mjeseci	38
4.9. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 6 mjeseci skladištenja	39
4.10. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 9 mjeseci	40
4.11. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 9 mjeseci	42
4.12. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 9 mjeseci skladištenja	43
5. RASPRAVA	45
5.1. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica nakon sušenja obzirom na uvjete skladištenja, 0. mjesec	45
5.2. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 3 mjeseca skladištenja	46
5.3. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 6 mjeseci skladištenja	47
5.4. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 9 mjeseci skladištenja	47
6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA	49
8. ŽIVOTOPIS	54

SAŽETAK

Rajčica (*Solanum lycopersicum L.*) zauzima važno mjesto u prehrani. Često se koristi svježa, ali i prerađena. Tijekom industrijske prerade rajčica, kao nusprodukt zaostaje velika količina sjemenki koja se uglavnom tretira kao biootpad. Sjemenke rajčica izuzetno su bogate različitim bioaktivnim spojevima kao primjerice likopenom, β -karotenom, polifenolima, askorbinskom kiselinom (vitamin C) te tokoferolima (vitamin E) koji su dobro poznati antioksidansi. Cilj istraživanja bio je ispitati antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica „cherry“ i „jabučar“. U istraživanju su korištene rajčice uzgojene na području sjeverozapadne Istre, 2023. godine. Mjerenja su provedena metodom elektronske spinske rezonancije (ESR), uporabom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Ova spektroskopska tehnika omogućuje precizno mjerenje koncentracije radikala u uzorku. Ispitan je utjecaj temperature skladištenja sjemenki na antioksidacijsku snagu (AP). Jedan dio sjemenki skladišten je pri sobnoj temperaturi, a drugi u hladnjaku pri +4 °C. Ispitan je i utjecaj zamrzavanja sjemenki pri –18 °C čime se suzbija neželjena pojava insekata. Ekstrakti su pripremljeni mljevenjem sjemenki, a zatim su iz njih ekstrahirane aktivne komponente miješanjem u etanolu tijekom 5 min. Uzorci su potom centrifugirani i izdvojen je tekućinski dio. Etanolnoj otopini DPPH poznate koncentracije dodani su ekstrakti te je mjereno gubitak signala tijekom 30 min. Rezultati su pokazali približno jednaku AP vrijednost obje vrste rajčica prije skladištenja. Tijekom skladištenja pri različitim temperaturama i zamrzavanjem došlo je do značajne promjene antioksidacijske aktivnosti i antioksidacijskog kapaciteta što je utjecalo na promjenu AP vrijednosti. Početne razlike u antioksidacijskoj snazi posljedica su različitog kemijskog sastava sjemenki rajčice jabučara i cherry rajčica. Sjemenke rajčice jabučara obiluju polifenolima, koji su osjetljivi na niske temperature skladištenja zbog čega najveću vrijednost antioksidacijske snage pokazuju upravo sjemenke rajčice jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi (24 °C) tijekom 3 mjeseca, za razliku od sjemenki cherry rajčica koje obiluju likopenom i askorbinskom kiselinom na čiji sadržaj pozitivno utječe niža temperatura skladištenja zbog čega sjemenke cherry rajčica skladištene u hladnjaku pri +4 °C prednjače u antioksidacijskoj snazi tijekom 6. i 9. mjeseca skladištenja.

Ključne riječi: antioksidacijska svojstva; antioksidacijska snaga; sjemenke rajčica; skladištenje; ESR spektroskopija; DPPH

SUMMARY

Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) occupies an important place in the diet. It is often used fresh, but also processed. During the industrial processing of tomatoes, a large amount of seeds are left behind as a byproduct, which are mostly treated as biowaste. Tomato seeds are extremely rich in various bioactive compounds such as lycopene, β -carotene, polyphenols, ascorbic acid (vitamin C) and tocopherols (vitamin E), which are well-known antioxidants. The aim of the research was to examine the antioxidant properties of the seeds of two varieties of tomatoes "cherry" and "apple". Tomatoes grown in the area of northwestern Istria in 2023 were used in the research. The measurements were carried out by the electron spin resonance (ESR) method, using the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. This spectroscopic technique enables precise measurement of the concentration of radicals in the sample. The influence of seed storage temperature on AP was examined. One part of the seeds was stored at room temperature, and the other in a refrigerator at +4 °C. The impact of freezing seeds at -18 °C, which suppresses the unwanted appearance of insects, was also tested. The extracts were prepared by grinding the seeds, and then the active components were extracted from them by stirring in ethanol for 5 min. The samples were then centrifuged and the liquid part was separated. Extracts were added to an ethanolic solution of DPPH of known concentration, and signal loss was measured for 30 min. The results showed an approximately equal AP value of both types of tomatoes before storage. During storage at different temperatures and by freezing, there was a significant change in antioxidant activity and antioxidant capacity, which affected the change in AP value. Initial differences in antioxidant power are due to the different chemical composition of apple and cherry tomato seeds. Apple seeds are rich in polyphenols, which are sensitive to low storage temperatures, which is why apple seeds stored at room temperature (24 °C) for 3 months show the highest antioxidant power, unlike cherry tomato seeds, which are rich in lycopene and ascorbic acid, the content of which is positively affected by lower storage temperatures which is why cherry tomato seeds stored in the refrigerator at +4 °C lead in antioxidant power during the 6th and 9th months of storage.

Keywords: antioxidant properties; antioxidant power; tomato seeds; storage; ESR spectroscopy; DPPH

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJE

1.1 UVOD

Rajčica je jedna od najkonzumiranijih poljoprivrednih kultura u svijetu, nalazi se na drugome mjestu odmah nakon krumpira. Konzumira se svježa, ali i prerađena u raznovrsnim poluproizvodima i gotovim proizvodima kao što su: umaci, koncentрати, pelati, kečap, sokovi i dr. Na svjetskoj razini godišnje se proizvede oko 200 milijuna tona rajčice, od čega se u Europskoj Uniji proizvede oko 20 milijuna tona [1]. U Republici Hrvatskoj je prema posljednjim podacima Državnog zavoda za statistiku u 2023. godini proizvedeno oko 26 tisuća tona rajčice. Industrijska prerada rajčica stvara značajne količine nusprodukata koji čine od 10 % do 40 % proizvedene mase, a uglavnom se tretiraju kao biootpad. Nusprodukti prerade rajčica su: komina, pulpa, pokožica, sjemenke i neiskorišteni dijelovi ploda. Među navedenim nusproduktima najzastupljenija je komina rajčice koja čini (2-5) % mase sirove rajčice, a sastoji se od pokožice, sjemenki te neznatne količine pulpe rajčica. Plod rajčice građen je pretežito od soka koji čini (94-96) %, ostatak otpada na pokožicu i vlakna koji čine (1,5-2,5) % te na sjemenke koje čine (1,0-1,5) % ploda [1]. Nusprodukti proizvodnje rajčica, osobito sjemenke bile su dosta dugo smatrane isključivo otpadom, tek se u novije vrijeme uvidio njihov nutritivan i farmaceutski značaj u vidu blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje. Sjemenke rajčica bogate su bioaktivnim spojevima kao što su: karotenoidi, polifenoli, dijetetska vlakna (pektin) masne kiseline, proteini, aminokiseline i drugim spojevima. Karotenoidi među kojima je najzastupljeniji likopen zaslužni su za sprječavanje karcinogeneze kao i za prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Polifenoli pokazuju antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje te preveniraju različite bolesti povezane s oksidativnim stresom, dok su aminokiseline neophodne za rast stanice te bitne za proizvodnju antitijela. Valorizacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda prerade rajčica je u posljednje vrijeme stekla značajan interes zbog povećane potražnje za prirodnim dodacima u proizvodnji hrane te u nutricionizmu. Ugradnja sjemenki rajčica u funkcionalnu hranu nedavno je revidirana. Dobivene formulacije hrane su dobro prihvaćene od strane potrošača. Ovi aspekti naglašavaju činjenicu da se revalorizacijom nusproizvoda od rajčica ostvaruju brojne dobrobiti u vidu smanjenja prehrambenog otpada, manje onečišćenje okoliša, isplativa prerada rajčice i proizvoda s dodanom vrijednošću u prehrambenoj industriji i tehnologiji [2].

1.1.1. Sastav sjemenki rajčica

Nutritivni sastav sjemenki rajčica obuhvaća bjelančevine (32 %), ukupne masti (27 %) i vlakna (18 %). Upravo zbog visokog udjela bjelančevina sjemenki rajčica koriste se kao zamjena za brašno u pekarskim proizvodima te kao dodatak u hrani za životinje. Također, sjemenke se mogu koristiti u proizvodnji biogoriva, enzima, bioaktivnih spojeva i ulja. Sjemenke obiluju i fitokemijskim spojevima poput kvercetina, galne kiseline, trans-cimetne kiseline, α - i γ -tokoferolima te demetilsterolima. Stoga i ne čudi da se sjemenke rajčica smatraju prirodnim rezervoarima bioaktivnih fenolnih spojeva kao što su flavonoidi i fenolne kiseline, karotenoidi među kojima su β -karoten i likopen te nukleozidima gvanidinom, inozinom i adenozinom. Fenolni spojevi ostvaruju antimikrobna, protuupalna, antioksidacijska, antikancerogena, antimutagena, antineurodegeneracijska, antitrombocitna i kardioprotektivna svojstva moduliranjem puteva prijenosa staničnih signala [3].



Slika 1. Morfologija sjemena rajčice.

Izvor: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0753332221008015-gr1.jpg>

Tablica 1. Bioaktivni spojevi iz sjemenki rajčice

Izvor: literaturni navod 3

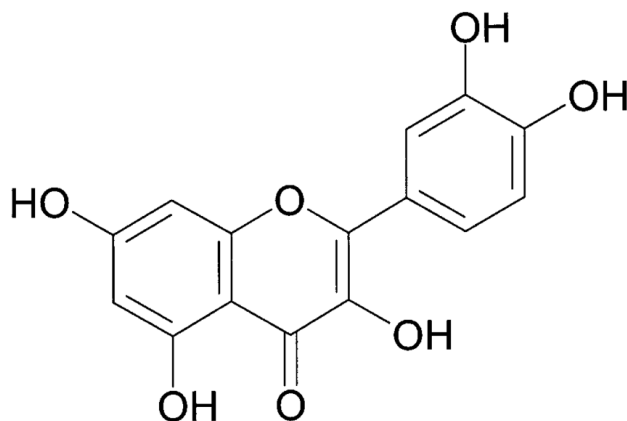
Skupina	Sastav
<i>Fenolni spojevi</i>	
Galna kiselina	(0,11-6,94) mg/100 g
Ferulinska kiselina	(1,67-9,08) mg/100 g
Kaempferol	< (0,001-2,01) mg/100 g
Kvercetin	< (0,001-0,900) mg/100 g
Rutin	(0,065-3,53) mg/100 g
Kumarinska kiselina	2,58 mg/100 g
Floridzin	1,35 mg/100 g
Floretin	26,72 mg/100 g
Procijanidin B2	76,62 mg/100 g
Apigenin-7-O-glukozid	0,196 mg/100 g
Kemferol-3-O-glukozid	415,39 mg/100 g
Luteolin-7-O-glukozid	55,77 mg/100 g
Genistein	0,196 mg/100 g
Daidzein	0,02 mg/100 g
Quercitrin	0,003 mg/100 g
Epikatehin	0,026 mg/100 g
Kvercetin-3- O -soforozid	6030 mg/100 g
Izorhamnetin-3- O -gentiobiozid	738 mg/100 g
Kvercetin-3- O -rutinozid	840 mg/100 g
Kvercetin-3- O -β-glukozid	(2,61-3,94) mg/100 g
Izorhamnetin	(0,34-1,36) mg/100 g
Naringenin	(0,16-0,35) mg/100 g

Miricetin	(0,34-0,88) mg/100 g
Kafeinska kiselina	(0,950-2,19) mg/100 g
Vanilinska kiselina	2,01 mg/100 g
Sinapska kiselina	(1,82-3,56) mg/100 g
Klorogenska kiselina	(0,050-1,41) mg/100 g
<i>p</i>-kumarna kiselina	(0,790-3,96) mg/100 g
Trans-cimetna kiselina	(0,100-3,01) mg/100 g
<i>Karotenoidi</i>	
Likopen cis 1	(0,058-0,134) mg/100 g
Likopen cis 2	(0,106-0,302) mg/100 g
Likopen cis 3	(0,785-0,943) mg/100 g
Likopen all trans	(0,7500-1,207) mg/100 g
Likopen	(1,6-16,70) mg/100 g
β-karoten	(0,0930-5,500) mg/100 g
Nukleozidi	
Adenozin	< 0,001 μ g/100 g
Inozin	42,21 μ g/100 g
Gvanozin	7,44 μ g/100 g

1.1.2. Sadržaj fenolnih spojeva i nukleotida

Fenolni spojevi pripadaju skupini malih bioaktivnih molekula čije je glavno obilježje kemijska struktura koja uključuje najmanje jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Najučestaliji oblici fenolnih spojeva u hrani su flavonoidi i fenolne kiseline [3]. Ferreres i sur. [4] određivali su fitokemijski sastav ekstrakta sjemenki rajčica te je identificirano 14 vrsta flavonoida koji predstavljaju derivate kvercetina, kemferola i izorhamnetina. Od pronađenih 14 vrsta flavonoida njih čak 13 je po prvi puta zabilježeno u sjemenkama rajčice. Ukupni sadržaj fenolnih spojeva iznosi 20,657 mg u 100 g ekstrakta sjemenki rajčice. Kvercetin-3-O-soforozid, kaempferol-3-O-soforozid i izorhamnetin-3-O-soforozid zastupljeni su u najvišim koncentracijama te pritom čine 59,1 % odnosno 29,2 % sadržaja ukupnih fenolnih spojeva. Od

ukupnog sadržaja flavonoida čak 37 % čine derivati kvercetina. Fenolni spojevi poput izorhamnetin-3-O-soforozid-7-O-ramnozida, izorhamnetin-3-O-soforozida, izoramnetin-3-O-gentiobiozida, kaempferol-3-soforozid-7-O-glukozida, kaempferol-3-soforozid-7-O-ramnozida, kemferol-3-O-(2-soforozil) glukozida, kvercetin-3-O-(2-pentozil) rutinozida, kemferol-3-O-soforozida, kemferol-3-O-(2-pentozil) glukozida, kvercetin-3-O-soforozid-7-O-glukozida, kvercetin-3-O-soforozid-7-O-ramnosida, kvercetin-3-O-gentiobiozid-7-O-glukozida i kvercetin-3-O-soforozida detektirani su prvi put u sjemenkama rajčice, koristeći pritom tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC). Kao detektor korišten je niz fotodioda koje su spregnute s elektrosprejnom ionizacijom spektrometrije mase (HPLC/UV-PAD/MSn-ESI) [4]. Od fenolnih kiselina identificirane su ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina te kafeinska kiselina u najvišim koncentracijama. U nešto manjim koncentracijama identificirane su galna kiselina, klorogenska kiselina, *trans*-cimetna kiselina te vanilinska kiselina [5]. Od nukleotida detektirani su adenzin, gvanozin i inozin, također bioaktivni spojevi koji pokazuju snažno antiagregacijsko djelovanje trombocita [6].



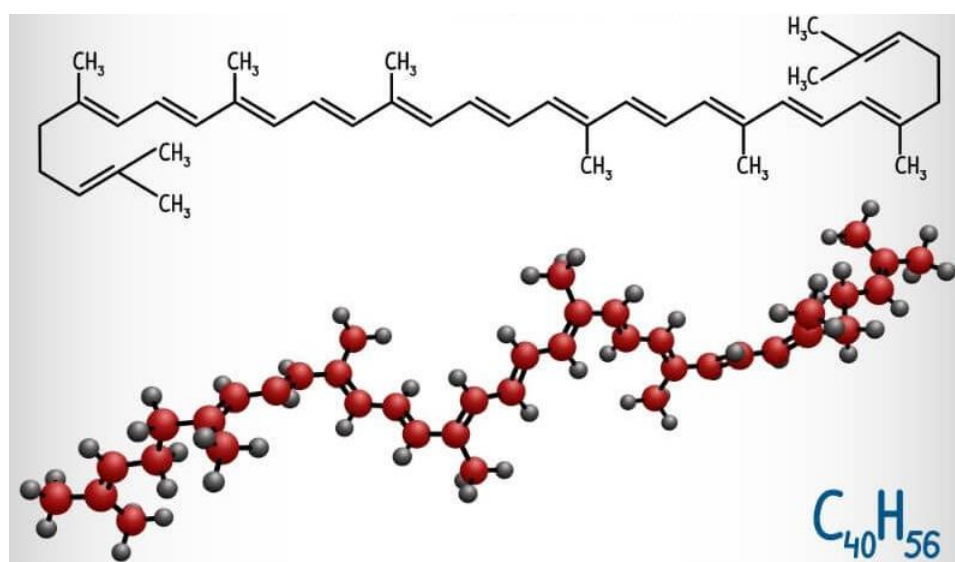
Slika 2. Struktura molekule kvercetina.

Izvor: <https://www.researchgate.net/publication/10841588/figure/fig13/AS:663497516011520@1535201543770/Chemical-structure-of-quercetin.png>

1.1.3. Sadržaj karotenoida

Karotenoidi su prirodni biljni pigmenti široko rasprostranjeni u obliku raznovrsnih molekula. Karotenoidi pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet zbog svoje sposobnosti sprječavanja reakcija oksidacije u organizmu, a samim time i nastanak slobodnih radikala koji mogu uzrokovati oštećenje stanice ili čak staničnu smrt [7]. Karotenoidni dodaci u prehrani pokazali

su se izuzetno važnima za onkološke bolesnike upravo zbog njihovog inhibitornog djelovanja na rast malignih stanica te zbog sposobnosti modulacije ekspresije gena i imunološkog odgovora organizma. Epidemiološke studije ukazale su na pozitivnu međuzavisnost prehrane bogate karotenoidima sa smanjenim rizikom obolijevanja od kolorektalnog karcinoma, raka vrata maternice, raka dojke, raka jajnika te od kardiovaskularnih i očnih bolesti [8]. Karotenoidni profil sjemenki rajčica sličan je profilu ploda rajčice. Među karotenoidima prisutnima u sjemenkama rajčice, najzastupljeniji je likopen te njegove izoforme kao što su likopen *cis* 1, likopen *cis* 2, likopen *cis* 3 i likopen all *trans*. β -karoten je drugi najzastupljeniji karotenoid nakon likopena te je ujedno i prekursor vitamina A [3]. Studija koju su proveli Stahl i sur. ukazala je da je β -karoten prevladavajući karotenoid u jetri, bubrezima, nadbubrežnoj žlijezdi te jajnicima, dok likopen prevladava u testisima [9]. Jedna od studija istražila je utjecaj suplemenata likopena na oštećenja kože odnosno nastanak eritema uzrokovanog ultraljubičastim (UV) zračenjem. Dokazano je kako svakodnevni unos 10 mg likopena dovodi do povećanja razine likopena i karotenoida kao što su fitofluen i fitoen u serumu i koži. Navedena dva karotenoida postižu maksimum apsorpcije u UV području te na taj način štite kožu od štetnog djelovanja UV zračenja [10].



Slika 3. Struktura molekule likopena.

Izvor: <https://www.zaper-zaperino.com/wp-content/uploads/2021/08/LIKOPEN-za-zdrave-zile-in-srce-je-antioksidant-karotenoid.jpg>

1.1.4. Sadržaj proteina

Proteini su prisutni u sjemenkama rajčice sa udjelom od 32 % [3]. Najzastupljenije aminokiseline u sadržaju ukupnih aminokiselina su glutaminska kiselina i asparaginska kiselina. Upravo su ove aminokiseline zaslužene za umami okus zbog čega se sjemenke rajčica ugrađuju u različite prehrambene proizvode radi poboljšanja okusa [11]. Od esencijalnih aminokiselina u sjemenkama rajčice nalazimo arginin, treonin, lizin i leucin [12]. Sjemenke rajčica sadrže 13 % više lizina od proteina soje što je izuzetno korisno za poboljšanje kvalitete proteina u proizvodima od žitarica [13,14]. Shao i sur. proveli su studiju u kojoj je dokazano da odmašćene sjemenke rajčica u plazmi hrčaka smanjuju koncentraciju lipoproteina niske gustoće (LDL) odnosno tzv. „loš kolesterol“ i ukupni kolesterol [12]. U proteinskom izolatu iz odmašćenih sjemenki rajčica identificirane su aromatske aminokiseline koje imaju sposobnost doniranja protona slobodnim radikalima. Od aromatskih kiselina identificirane su triptofan, fenilalanin i tirozin koje sudjeluju u van der Waalsovima interakcijama te pokazuju potencijal primanja i doniranja protona što upućuje da su proteini sjemenki rajčica potencijalni izvor antioksidansa [13]. Uspoređujući funkcionalna svojstva proteina soje i sjemenki rajčica, uočeno je da proteini sjemenki rajčica pokazuju bolju apsorpciju vode te sposobnost emulgiranja [12].

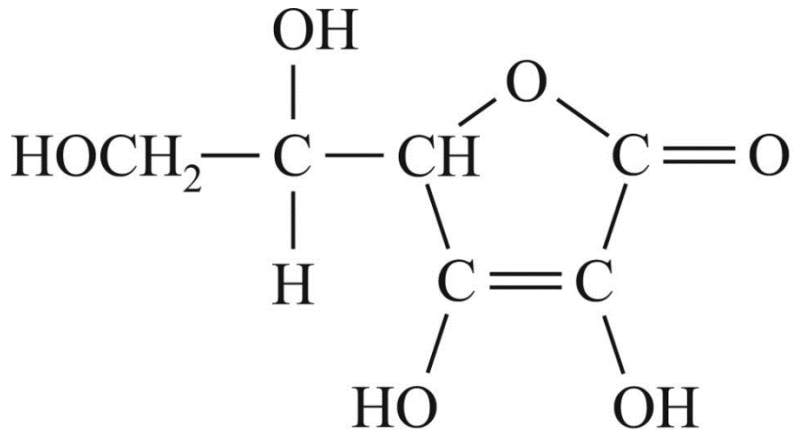
1.1.5. Sadržaj lipida

Sadržaj lipida kreće se u rasponu od 20 % do 37 %. U sastavu lipida prevladavaju nezasićene masne kiseline s 82 %. Najzastupljenije masne kiseline su linolna (C18:2), oleinska (C18:1), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) i linolenska (C18:3) [15]. Navedene masne kiseline predstavljaju gradivne jedinice stanične membrane te ujedno djeluju kao prekursori citokina [16]. Giuffrè i sur. odredili su fizikalno-kemijska svojstva 15 različitih vrsta ulja sjemenki rajčica te je utvrđen niski peroksidni broj i niska kiselost u čijem sastavu prevladavaju fenoli koji pokazuju izrazitu antioksidacijsku aktivnost. Zasićene masne kiseline identificirane su u izrazito niskim koncentracijama, dok je koncentracija kolesterola bila veća uspoređujući s ostalim biljnim uljima koja se koriste u svakodnevnoj prehrani [17]. Soxhlet-petrol eter ekstrakcijom dobiveno je ulje sjemenki rajčica te je pronađen polikozanol. Polikozanol

predstavlja mješavinu alkohola vrlo dugačkih ugljikovodičnih lanaca. Dokazano je sedam masnih alkohola: oktakoanol (C28-ol), heptakoanol (C27-ol), heksakoanol (C26-ol), pentakoanol (C25-ol), tetrakoanol (C24-ol), trikoanol (C23-ol) i dokozoanol (C22-ol). Ovi se alkoholi mogu koristiti kao učinkovito sredstvo za snižavanja razine lipida [18]. U neosapunljivoj frakciji ulja sjemenki rajčica pronađeni su β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol i δ -5-avenasterol kao najzastupljeniji steroli [19]. U ulju sjemenki rajčica prisutne su značajne količine esencijalnih masnih kiselina kao što su ω -6 i ω -9 masne kiseline [13]. Omjer polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina prisutnih u ulju sjemenki rajčica iznosio je 1,73. Utvrđeno je da rezultat omjera iznad 0,45 potvrđuje njegovu jestivost. Navedene studije ukazuju da se sjemenke rajčica mogu koristiti za proizvodnju jestivog biljnog ulja. Također konzumiranjem nezasićenih masnih kiselina koje potječu iz biljnih izvora postižu se blagotvorni učinci po ljudsko zdravlje, prevenirajući pritom koronarne bolesti srca, različite vrste raka te dijabetes [16].

1.1.6. Sadržaj minerala i vitamina

Minerali su kemijski elementi neophodni za normalno funkcioniranje organizma. Oni sudjeluju u brojnim biokemijskim reakcijama kao što su sinteza proteina, regulacija tjelesnih tekućina, kontrakcija mišića, izgradnja kostiju te provođenje živčanih impulsa. Sačma sjemenki rajčica sadrži 1074 mg/100 g P, 977 mg/100 g K, 504 mg/100 g Mg, 135 mg/100 g Ca, 24 mg/100 g Fe, 9,7 mg/100 g Zn, 7,8 mg/100 g Mn i 1,9 mg/100 g Cu [20]. Među mikronutrijentima važnu ulogu za održavanje homeostaze imaju i vitamini. U sjemenkama rajčice identificirani su u značajnim količinama vitamini topivi u mastima, a to su vitamin A, D, E i K [21]. Vitamin C (askorbinska kiselina) prisutan u sjemenkama rajčica ima snažno imunomodulacijsko djelovanje te posjeduje značajna antioksidacijska svojstva. Vitamin E odnosno njegov biološki najaktivniji oblik α -tokoferol također pronađen u sjemenkama rajčica sprječava štetno djelovanje slobodnih radikala na masne kiseline te omogućuje normalno funkcioniranje središnjeg živčanog sustava [22].



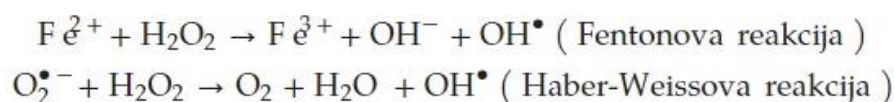
Slika 4. Struktura vitamina C.

Izvor: <https://media.lzmk.hr/he/slike/ASKORBINSKA%20KISELINA.jpg>

1.2. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su izrazito nestabilne molekule koje nastaju nizom reakcija u organizmu, a čijim se nakupljanjem prouzrokuje oksidativni stres. Oksidativni stres dovodi do razvoja niza kroničnih i degenerativnih poremećaja poput neurodegenerativnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, različitih autoimunih poremećaja, artritisa i katarakte [23]. Poznato je da je kisik nužan za proizvodnju stanične energije odnosno ATP-a (adenozin trifosfata) u mitohondrijama prilikom čega nastaju reaktivne vrste kisika (ROS), reaktivne vrste dušika (RNS) i reaktivne vrste sumpora (RSS) [23, 24]. Skupini slobodnih radikala pripadaju hidroksilni ($\text{HO}\cdot$), superoksidni anionski (O_2^-), alkoksilni ($\text{RO}\cdot$), dušikov oksid ($\text{NO}\cdot$) i peroksilni ($\text{ROO}\cdot$) radikali, dok se u skupinu neradikalnih reaktivnih vrsta ubrajaju dušikov monoksid (NO), singletni kisik ($^1\text{O}_2$), vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), dušikova kiselina (HNO_2), dušikov oksid (N_2O), lipidni hidroperoksid (LOOH) i hipoklorna kiselina (HOCl) [24]. Ukoliko su molekule slobodnih radikala prisutne u niskim koncentracijama one ostvaruju pozitivan učinak na imunološki sustav, dok u visokim koncentracijama uzrokuju oksidativni stres. Ljudski organizam se sam bori protiv oksidativnog stresa tako što samostalno proizvodi antioksidanse ili ih unosi putem hrane ili suplemenata, a zajedničko im je da „hvataju“ slobodne radikale te na taj način sprječavaju njihovo štetno djelovanje po zdravlje. Općenito se

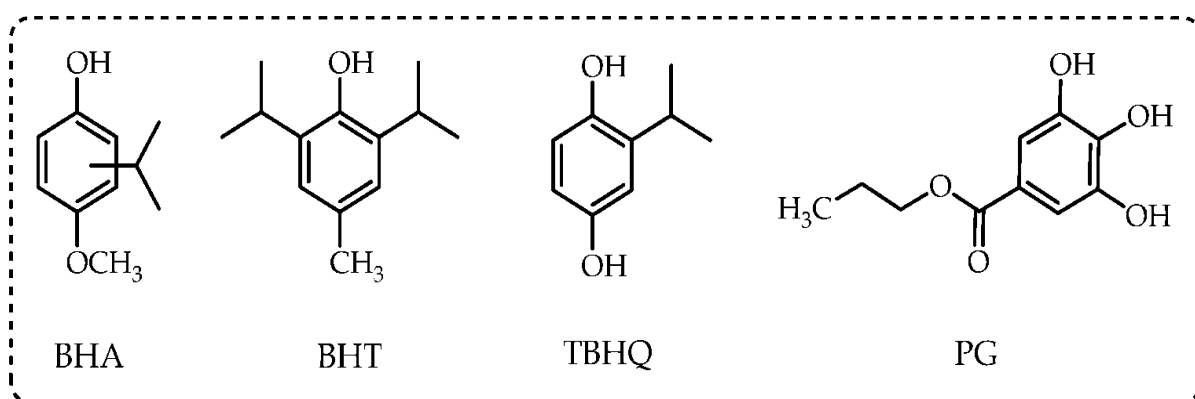
slobodnim radikalima smatraju molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci. Upravo ti nespareni elektroni stupaju u reakciju sa lipidima, proteinima i DNA [23]. Nastanku oksidativnog stresa pridonose i vanjski čimbenici poput izloženosti UV zračenju i različitim okolišnim zagađivačima, koji nedvojbeno negativno utječu na ljudsko zdravlje. Najčešće slobodni radikali stupaju u reakciju sa lipidima te uzrokuju peroksidaciju lipida u staničnoj membrani [24]. Fritz Haber objašnjava kako su glavni izvori slobodnih radikala Fentonove i Haber-Weissove reakcije. Fentonovom reakcijom u prisutnosti iona željeza i kisika koji reagiraju sa vodikovim peroksidom (H_2O_2) nastaje hidroksilni radikal ($OH\cdot$). Osim Fentonovom reakcijom hidroksilni radikal može nastati i Haber-Weissovom reakcijom iz $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 uz ione željeza kao katalizator [25].



1.2.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje već pri niskim koncentracijama mogu odgoditi ili u potpunosti spriječiti oksidaciju molekula supstrata. Njihov mehanizam djelovanja podrazumijeva doniranje elektrona slobodnim radikalima, koji postaju bezopasni te se pritom reducira oštećenje nastalo oksidacijom u stanicama. Antioksidansi onemogućuju nastanak slobodnih radikala tako što ometaju reakcije oksidacije u fazi inicijacije, propagacije i terminacije, a koje su potpomognute slobodnim radikalima. Učinkovitost antioksidansa ovisi o više čimbenika među kojima su najznačajniji: fizikalno stanje sustava, temperatura, kemijska svojstva antioksidansa, kemijska svojstva supstrata, osjetljivost supstrata prema oksidaciji, koncentracija antioksidansa, sinergistički učinak te prisutnost prooksidansa. Ključan čimbenik koji direktno utječe na učinkovitost antioksidansa je njegova kemijska struktura koja određuje reaktivnost i sposobnost molekule antioksidansa da „hvata“ slobodne radikale. Ono što također treba uzeti u obzir je i kinetika reakcije koja podrazumijeva termodinamiku reakcije između antioksidansa i oksidansa, brzinu reakcije i sposobnost antioksidansa da reagira sa oksidansom. Antioksidansi svojim djelovanjem odgađaju lipidnu peroksidaciju koja se događa tijekom obrade i skladištenja hrane, stoga se naveliko primjenjuju kao konzervansi u prehrambenim

proizvodima te se dodaju i farmaceutskim pripravcima kako bi se produžio rok trajanja. Antioksidansi mogu biti sintetskog ili prirodnog podrijetla. Farmaceutska industrija najčešće koristi upravo sintetske antioksidanse zbog njihove visoke čistoće i niske cijene, no dokazano je da ipak ostvaruju štetne učinke po zdravlje kao što su: karcinogeneza, atopijske bolesti kože i gastrointestinalne smetnje. Također sintetski antioksidansi koriste se i u prehrambenoj industriji. Najčešće korišteni sintetski antioksidansi koji sprječavaju oksidaciju lipida su: butilirani hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG), butilirani hidroksianizol (BHA) i tert-butilhidrokinon (TBHQ), iako se nastoji smanjiti njihovo korištenje te zamijeniti sa prirodnim antioksidansima [24].



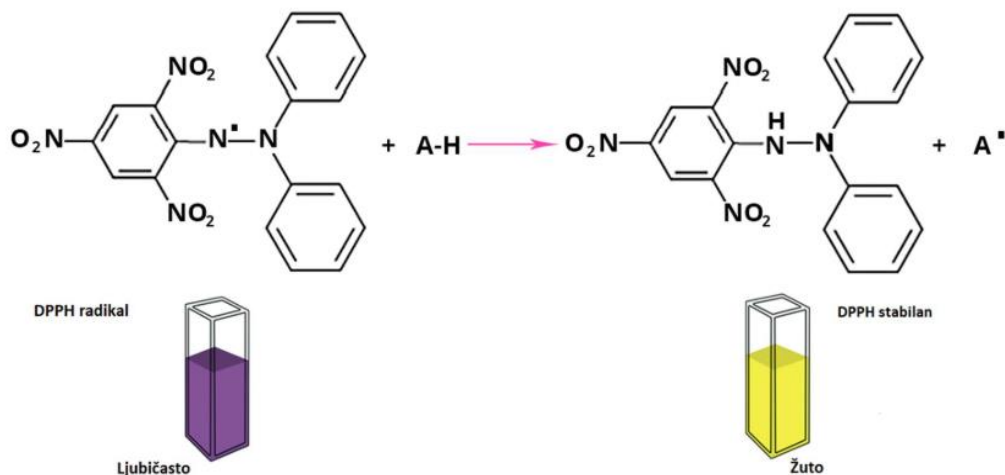
Slika 5. Kemijske strukture najkorištenijih sintetskih antioksidansa.

Izvor: https://www.mdpi.com/processes/processes-11-02248/article_deploy/html/images/processes-11-02248-g001-550.jpg

Najdostupniji izvori prirodnih antioksidansa su voće, povrće, začini i bilje. Najčešće korištene biljke su cimet, klinčić, lipa, komorač, anis i ružmarin upravo iz razloga što obiluju katehinima, taninima, fenolima, teinima te flavonoidima, koji pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Osim prirodnog izvora od kojeg potječe, na kvalitetu antioksidansa utječe i odabir postupka izolacije i ekstrakcije [24].

1.2.2. DPPH radikal

DPPH radikal punog naziva 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil otkrili su 1922. godine Goldschmidt i Renn [26]. Ova se metoda zasniva na spektrofotometrijskom mjerenju antioksidacijskog kapaciteta za eliminiranje DPPH radikala. Prvo svojstvo DPPH radikala je da se svaki pojedini elektron atoma dušika u DPPH reducira u hidrazin tako što uzima atom vodika iz molekule antioksidansa. Drugo svojstvo također iznimno važno da DPPH· radikal ima stabilnu i intenzivnu ljubičastu boju. Upravo zbog ova dva navedena svojstva DPPH radikal se uvelike upotrebljava. Ovaj se radikal često primjenjuje u kemiji polimera, a posebice u EPR spektroskopiji te kod određivanja antioksidacijskog kapaciteta [27]. Blois je 1958. godine prvi otkrio da se DPPH radikal može koristiti u određivanju antioksidacijskog kapaciteta [26]. Za stabilnost radikala odgovorna su sterička zbivanja na dvovalentnom N atomu prvog reda i efekt "push-pull" kojeg uzrokuju difenilamino skupina drugog reda kao donor elektrona te pikril kao akceptor elektrona. Push-pull efekt značajno stabilizira strukturu DPPH radikala. Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) mjeri gustoću spina na dva atoma hidrazila N. Uočene su dvije različite vrpce koje su vidljive u UV-VIS spektru DPPH· radikala koje su posljedica $\pi-\pi^*$ prijelaza, gdje je upravo nespareni elektron odgovoran za vrpce u vidljivom području spektra. Kada se otopina potencijalnog antioksidansa odnosno tvari koja može donirati vodik pomiješa s otopinom DPPH, ljubičasta boja DPPH radikala nestaje, a kao posljedica prelaska DPPH radikala u reducirani oblik DPPH-H. Prilikom nastanka hidrazina (DPPH-H) vidljiva traka nestaje zbog promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu [28]. Ova promjena boje nastaje zbog reakcije između DPPH radikala i antioksidansa kod koje molekula antioksidansa donira atom vodika DPPH radikal. UV-VIS spektroskopijom može se pratiti promjena intenziteta boje u ovisnosti o apsorbciji. DPPH metoda je jedna od najkorištenijih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta posebno pogodna za biljne ekstrakte bogate fenolnim spojevima [29].



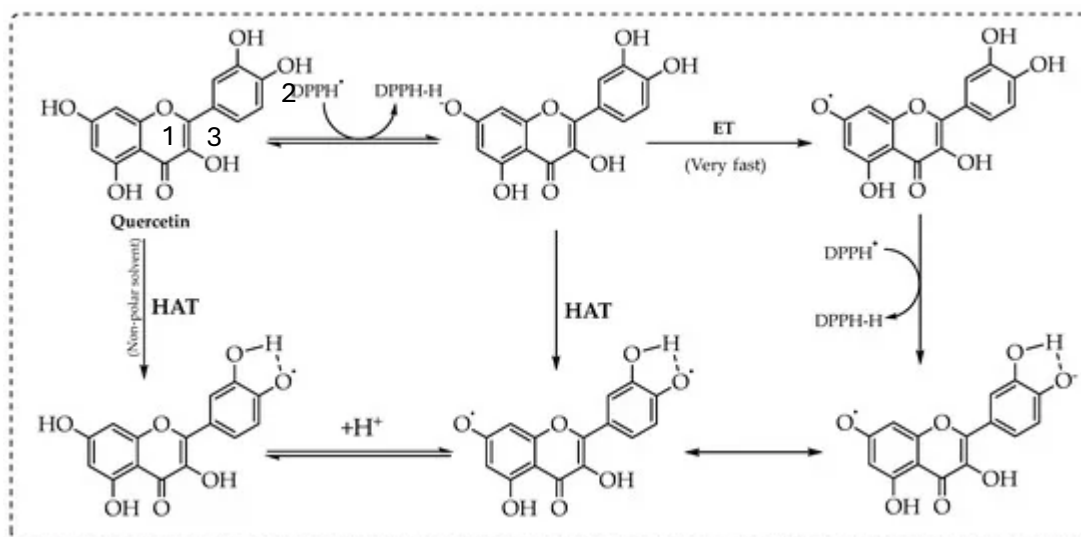
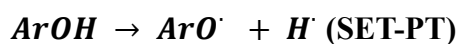
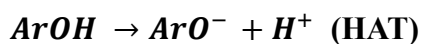
Slika 6. Reakcija DPPH radikala sa antioksidansom.

Izvor: <https://encrypted->

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTVOTt2RvYjvEWXYDt8qi290Ce1LRVV6RRm4HvArM_thiXccyHbO4brWnTuN3DGXmr3mQA&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTVOTt2RvYjvEWXYDt8qi290Ce1LRVV6RRm4HvArM_thiXccyHbO4brWnTuN3DGXmr3mQA&usqp=CAU)

1.2.3. Reakcija DPPH radikala s fenolima kao antioksidansima

Određene tvari vrlo lako stupaju u reakciju sa DPPH radikalima, donirajući pritom atom vodika ili prijenosom elektrona. Fenolni spojevi su najreaktivniji upravo prema DPPH radikalima. U prisutnosti fenolnih spojeva koji mogu donirati atom vodika, DPPH radikali apstrahiraju vodik. Primjenom DPPH metode može se dobiti informacija o ukupnom sadržaju antioksidanasa prisutnih u biljnim ekstraktima. Antioksidacijski učinci fenolnih spojeva (Ar–OH) ostvaruju se pomoću dva mehanizma. Prvi mehanizam tzv. HAT mehanizam podrazumijeva prijenos atoma vodika te je dominantan u nepolarnom otapalu. Drugi mehanizam tzv. SET-PT mehanizam podrazumijeva prijenos jednog elektrona nakon kojeg slijedi prijenos protona. Ponekad nije moguće u potpunosti prepoznati i odvojiti navedena dva mehanizma [24]. Postoji i treći mehanizam koji se naziva mehanizam prijenosa elektrona sekvencijalnim gubitkom protona (SPLET), a podrazumijeva dvostruki uzastopni prijenos protona i elektrona te je dominantan mehanizam u polarnome otapalu [30].



Slika 7. Reakcije između DPPH radikala i kvercetina.

Izvor: https://www.mdpi.com/processes/processes-11-02248/article_deploy/html/images/processes-11-02248-g006-550.jpg

Unutar prstenova 1 i 3 povećana je gustoća elektrona, što rezultira izrazito snažnim reakcijama između DPPH radikala i molekule kvercetina. Brzi prijenos elektrona s fenolatnog aniona ($C_6H_5O^-$) na DPPH radikal još jedan je mogući put reakcije. Prsten 1 ostvaruje pozitivan učinak na konjugaciju kao posljedica snažnog privlačenja elektrona u molekuli kvercetina. Kateholni dio unutar prstena 2 predstavlja mjesto otklanjanja odnosno transfera protona (H^+). Upravo zahvaljujući svojoj kemijskoj strukturi koja uključuje brojne –OH skupine molekule flavonoida nalazimo u vodenoj fazi različitih bioloških sustava. Reakcije između flavonoida i slobodnih radikala, čije je glavno obilježje nedostatak elektrona, mogu se ubrzati SPLET mehanizmom, a sve kako bi se smanjilo nakupljanje reaktivnih vrsta kisika unutar stanica [31]. Na uspješnost SPLET mehanizma izravno utječe izbor vrste otapala prilikom ekstrakcije različitih bioaktivnih spojeva. Metanol i etanol predstavljaju najpogodnija otapala među organskim otapalima jer

podržavaju ionizaciju. SPLET mehanizam omogućuje da fenolni spojevi s niskom konstantom disocijacije kiseline (pKa) reagiraju s radikalima koji pokazuju manju HAT aktivnost. Dosadašnja su istraživanja dokazala da DPPH radikal može reagirati i s fenolnim kiselinama [32].

1. 3. ZELENA KEMIJA

Zelena kemija ili održiva kemija predstavlja koncept koji se značajno razvija posljednjih trideset godina, a podrazumijeva primjenu zelenih tehnika ekstrakcije za dobivanje bioaktivnih komponenti. Zelena kemija se temelji na dvanaest načela, čiji su glavni ciljevi: sprječavanje nastanka otpada, izbaciti iz upotrebe štetne kemikalije u kemijskoj sintezi, smanjiti proizvodnju štetnih međuprodukata, korištenje obnovljivih biljnih izvora, smanjenje potrošnje energije, ekonomska dobit i ono najvažnije očuvanje okoliša i zdravlja ljudi [33]. Upravo zelena kemija pruža učinkovita rješenja za prevladavanje postojećih industrijskih nedostataka. Prehrambena industrija je rastuća industrija koja proizvodi velike količine biootpada zbog čega znanstvenici ulažu velike napore kako bi se dobiveni nusprodukti učinkovito iskoristili za boljitak ljudi [34].



Slika 8. Dvanaest temeljnih načela zelene kemije.

Izvor:

https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTtkNqFeNyEpm_y7eg4QEtJWZSZo1JPWPvA03jSit3g4Q&s

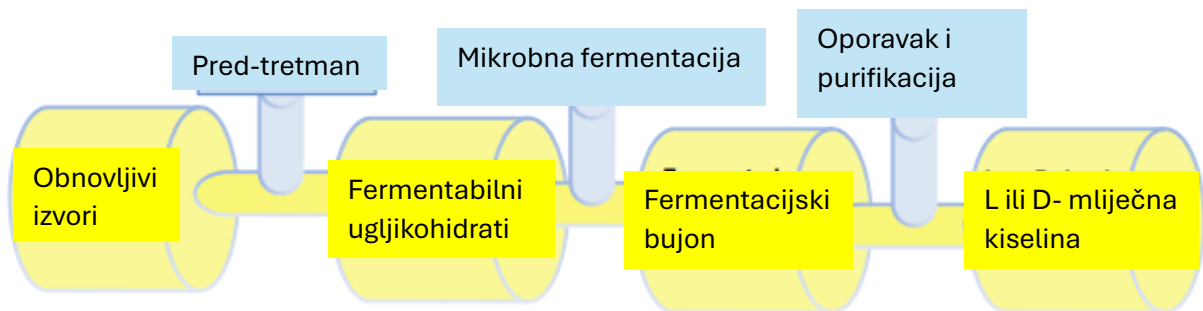
1.3.1. Ekološki prihvatljiva uporaba nusprodukata industrijske prerade rajčica

Zbog sve veće akumulacije biootpada glavni cilj mnogih studija je osmisliti te testirati nove sofisticirane procese i tehnologije za recikliranje i nadogradnju ovog otpada u svrhu oporabe utrživih materijala visoke dodane vrijednosti, a sve u skladu sa smjernicama Europske unije o održivom gospodarenju otpadom i kružnom gospodarstvu. Komina rajčica koja podrazumijeva i sjemenke rajčica koristi se najčešće kao stočna hrana, kao gnojivo za tlo ili se odlaže kao čvrsti otpad. Novija istraživanja ukazuju na velik potencijal nusprodukata industrijske prerade rajčica u proizvodnji mliječne kiseline koja se ugrađuje u hranu, zatim u proizvodnji lijekova, kozmetici, tekstilnoj industriji te u proizvodnji polimliječne kiseline koju nalazimo u bioplastičnim materijalima. Mliječna kiselina može se proizvesti dvjema ekstrakcijskim tehnologijama, a to su mikrobna fermentacija i kemijska sinteza. Manjkavost kemijske sinteze mliječne kiseline je dobivanje racemične smjese iz koje je potrebno izdvojiti čistu mliječnu kiselinu, za razliku od mikrobne fermentacije koja rezultira isključivo čistom mliječnom kiselinom. Stoga i ne čudi da je upravo mikrobna fermentacija najčešći način proizvodnje mliječne kiseline [35].

1.3.2. Mikrobna fermentacija u proizvodnji mliječne kiseline

Ovisno o sojevima korištenih bakterija tijekom fermentacije kao konačni produkt može nastati D(-) ili L(+) mliječna kiselina. L(+) mliječna kiselina može nastati iz fermentabilnih ugljikohidrata kao supstrata korištenjem bakterija roda *Lactobacillus*, *Rhizopus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Kluyveromyces* i *Saccharomyces* koje provode hemolaktičku fermentaciju. D(-) mliječna kiselina nastaje korištenjem sojeva kao što su *Lactobacillus bulgaricus* i *Leuconostoc*. Najčešće korišteni fermentabilni ugljikohidrati su glukoza, saharoza i laktoza. D(-) mliječna kiselina ne može biti metabolizirana od strane životinja zbog čega se L(+) mliječna kiselina primarno koristi u prehrambenoj industriji, kozmetici te u proizvodnji bioplastike. Također čista L(+) mliječna kiselina može se koristiti u proizvodnji polilaktičke kiseline. Nakon dobivanja mliječne kiseline potrebno ju je izdvojiti te pročistiti od fermentacijskog bujona, prilikom čega se koriste tehnike poput ionske izmjene, reaktivne ekstrakcije, destilacije, membranske tehnologije te elektrodijalize. Biootpad iz

industrijske prerade rajčica koji je pravilno predtretiran predstavlja zapravo izvor hrane za mikroorganizme koji provode fermentaciju te se na taj način iskorištavaju obnovljivi izvori energije. Carillo i sur. proveli su istraživanje u kojem je dokazano da se iz 1 kg otpada rajčice može proizvesti približno oko 0,07 do 0,14 kg mliječne kiseline. Što bi značilo da od 152 kt osušenog otpada rajčice može nastati od 10,6 kt do 21,2 kt mliječne kiseline. Procijenjena ekonomska dobit kretala bi se od 10,6 milijuna € do 21,2 milijuna €, ako se uzima u obzir cijena mliječne kiseline na tržištu koja iznosi oko 1000 €/t [35].

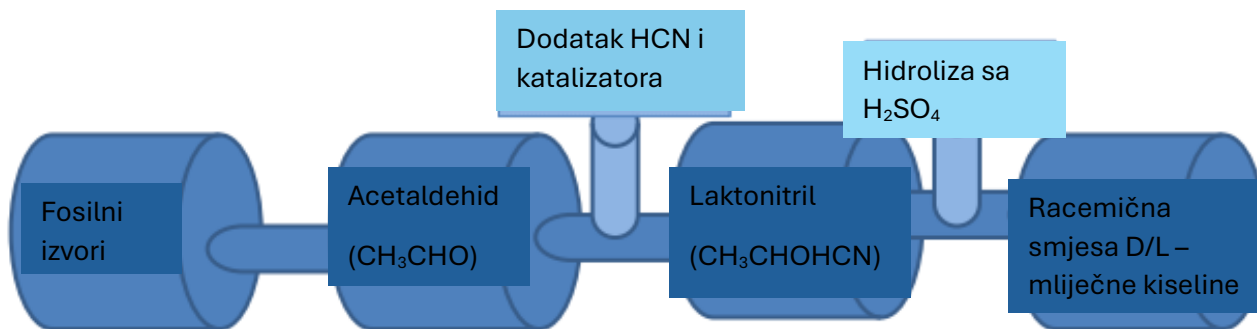


Slika 9. Proizvodnja mliječne kiseline mikrobnom fermentacijom.

Preuzeto (prilagođeno) s : <https://doi.org/10.3303/CET1864038>

1.3.3. Kemijska sinteza mliječne kiseline

Kemijska proizvodnja mliječne kiseline temelji se na proizvodnji laktonitrila. Laktonitril nastaje u reakcijama između acetaldehida koji se dobiva iz fosilnih izvora te cijanovodične kiseline u lužnatom mediju. Navedene reakcije odvijaju se u uvjetima visokog tlaka u tekućoj fazi. Tako dobiven laktonitril pročišćava se destilacijom. Nakon što je laktonitril pročišćen slijedi hidroliza laktonitrila u mliječnu kiselinu i amonijevu sol dodatkom sumporne kiseline ili klorovodične kiseline. Mliječna kiselina se također pročišćava postupkom destilacije. Oporavak tako dobivene mliječne kiseline poprilično je težak zbog čega se provodi esterifikacija s metanolom što rezultira nastankom metil laktata. Dodatkom vode iz metil laktata nastaje laktat i metanol u reakciji hidrolize. Najveći nedostatak kemijske sinteze mliječne kiseline je nemogućnost kontrole količine L i D mliječne kiseline u nastaloj racemičnoj smjesi [35].



Slika 10. Proizvodnja mliječne kiseline kemijskom sintezom.

Preuzeto (prilagođeno) s: <https://doi.org/10.3303/CET1864038>

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati antioksidacijsku snagu nusprodukata prerade rajčica, specifično sjemenki dviju vrsta rajčica izdvojenih iz plodova rajčice jabučara i cherry rajčica; utvrditi razliku u kemijskom sastavu sjemenki te utjecaj vremenskog perioda i temperature skladištenja na antioksidacijska svojstva. Također je ispitan i utjecaj zamrzavanja sjemenki pri temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 24 h, postupka koji se koristi kako bi se suzbila nepoželjna pojava insekata, na antioksidacijsku snagu. U radu je korištena redukcijska metoda, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala te spektroskopska tehnika elektronska spinska rezonancija (ESR). U dosadašnjim znanstvenim istraživanjima antioksidacijskih svojstava sjemenki rajčica nije zabilježena zajednička primjena DPPH metode i ESR spektroskopije. Stoga je glavni cilj ovoga rada usporediti dobivene rezultate s dostupnim znanstvenim podacima o ispitivanim sjemenkama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Korištene sjemenke izdvojene su iz plodova jabučara i cherry rajčica uzgojenih na OPG-u ANA MANIN na području sjeverozapadne Istre, 2023. godine (Umag, Hrvatska). Oznake ispitivanih uzorka prikazane su u tablici 2. Pripremljena je koncentracija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, proizvođača „Sigma“ (St. Louis, MO, SAD), otopljenog u etanolu (p. a.), proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska), iznosila je $c = 0,10$ mmol/L.



Slika 11. Jabučar.



Slika 12. Cherry.

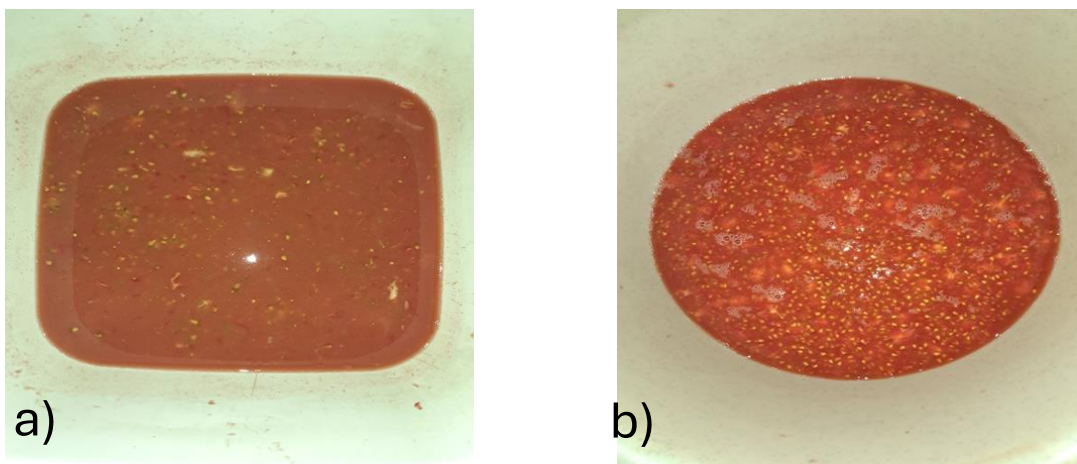
Tablica 2. Oznake uzoraka.

Uzorak	Oznaka
sjemenke jabučara pri sobnoj temperaturi, 0. mjesec	J0
sjemenke jabučara zamrznute, 0. mjesec	JZ0
sjemenke cherry rajčice pri sobnoj temperaturi, 0. mjesec	C0
sjemenke cherry rajčice zamrznute, 0. mjesec	CZ0
sjemenke jabučara pri sobnoj temperaturi, nakon 3 mjeseca skladištenja	J3
sjemenke jabučara iz hladnjaka, nakon 3 mjeseca skladištenja	JH3
sjemenke cherry rajčice pri sobnoj temperaturi, nakon 3 mjeseca skladištenja	C3
sjemenke cherry rajčice iz hladnjaka, nakon 3 mjeseca skladištenja	CH3
sjemenke jabučara pri sobnoj temperaturi, nakon 6 mjeseci skladištenja	J6
sjemenke jabučara iz hladnjaka, nakon 6 mjeseci skladištenja	JH6
sjemenke cherry rajčice pri sobnoj temperaturi, nakon 6 mjeseci skladištenja	C6
sjemenke cherry rajčice iz hladnjaka, nakon 6 mjeseci skladištenja	CH6
sjemenke jabučara pri sobnoj temperaturi, nakon 9 mjeseci skladištenja	J9
sjemenke jabučara iz hladnjaka, nakon 9 mjeseci skladištenja	JH9
sjemenke cherry rajčice pri sobnoj temperaturi, nakon 9 mjeseci skladištenja	C9
sjemenke cherry rajčice iz hladnjaka, nakon 9 mjeseci skladištenja	CH9

3.2. Metoda

3.2.1. Izdvajanje i sušenje sjemenki

Sjemenke su izdvojene ručno iz plodova rajčice jabučara i cherry rajčica nakon čega je uslijedila fermentacija. Fermentacija sjemenki se odvijala u vlastitom soku rajčica u trajanju od tri dana, sa ciljem poticanja razgradnje vanjske opne koja obavija sjemenke te da bi se eliminirali mogući prisutni patogeni .



Slika 13. Prikaz fermentacija: a) sjemenki jabučara b) sjemenki cherry rajčica.

Nakon provedene fermentacije uslijedilo je ispiranje fermentiranih sjemenki pod mlazom vode. Potom su sjemenke stavljene na sušenje pri sobnoj temperaturi od 24 °C u kartonske kutije, čije je dno prekriveno papirom koje upija zaostalu vodu iz sjemenki te se redovito mijenja. Sušenje sjemenki trajalo je 15 dana. Završetak procesa sušenja označilo je postizanje konstante mase sjemenki. Osušene sjemenke odjeljenje su na način da je jedan dio zamrznut na –18 °C kako bi se suzbila neželjena pojava štetnika, dok je ostatak pohranjen pri sobnoj temperaturi od 24 °C.



Slika 14. Prikaz osušenih i odijeljenih sjemenki jabučara i cherry rajčica.

3.2.2. Priprema ekstrakta sjemenki

Ekstrakti sjemenki rajčica pripremljeni su u laboratoriju na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

Priprema ekstrakata:

1. odvagano po 3 g sjemenki od svake vrste (zamrznute i sobne temp.) na tehničkoj vagi,
2. sjemenke su usitnjene u mlincu BOSCH FD0104 (20 s mljevene uz potresanje + 10 s pauze + 20 s mljevene uz protresanje),
3. odvagano je 2 g mljevenih sjemenki u Erlenmeyerovu tikvicu od 25 mL + dodano 10 mL EtOH (96 %),
4. tako pripremljeni uzorak stavljen je na magnetsku miješalicu TechnoKartell (500 okretaja/min) na 5 min,
5. po 1 mL supernatanta iz Erlenmeyerove tikvice preneseno je u svaku od 6 Eppendorf epruveta,

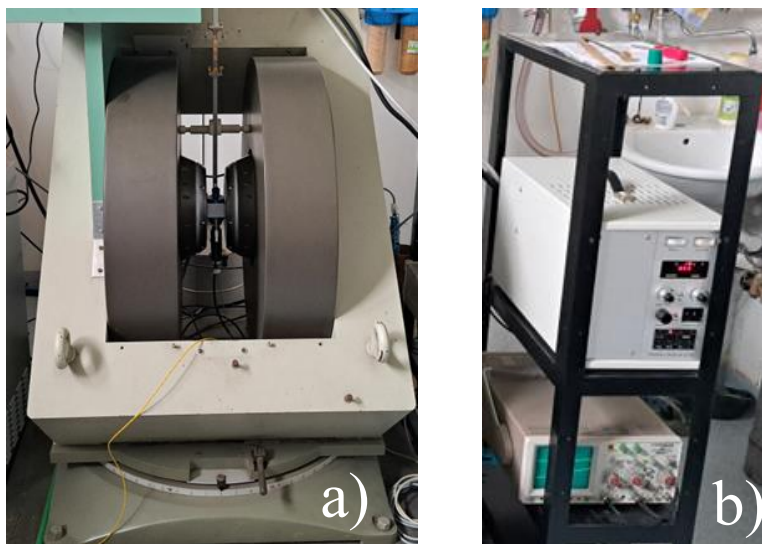
6. Eppendorf epruvete su smještene u centrifugu na 5 min,
7. iz svake Eppendorf epruvete 0,80 mL preneseno je u svaku od 4 Falcon epruvete (JZ0, CZ0, J0,C0).

Ostatak sjemenki rajčice jabučara i cherry rajčica koje su bile pri sobnoj temperaturi razdijeljene su na način da je polovica stavljena u hladnjak na +4 °C, dok je ostala polovica ostavljena pri sobnoj temperaturi. Navedeni postupci pripreme ekstrakata sjemenki ponovljeni su za svako pojedino mjerenje.

3.2.3. Elektronska spinska rezonancija (ESR)

ESR (Electron Spin Resonance) ili starijeg nazivlja EPR (Electron Paramagnetic Resonance) je metoda koja se koristi u svrhu detekcije nesparenih elektrona odnosno njihovih prijelaza unutar magnetskog polja. Spin elektrona je njegovo temeljno kvantno-mehaničko svojstvo koje dolazi do izražaja kad se elektron nađe u magnetskom polju. Stoga se nespareni elektroni smješteni u vanjskom magnetskom polju usmjeravaju paralelno ili antiparalelno u odnosu na smjer magnetskog polja. Tijekom usmjeravanja nesparenih elektrona dolazi do razdvajanja energijskih razina. Uporabom mikrovalnog zračenja određene frekvencije nastupa pobuđivanje elektrona te oni prelaze iz niže u višu energijsku razinu, što se detektira u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija. Kako bi se navedeni prijelaz mogao ostvariti, jakost magnetskog polja mora biti takva da energijska razlika između dviju energijskih razina odgovara energiji fotona mikrovalnog zračenja. Navedeni uvjet postiže se posmicanjem magnetskog polja za vrijeme trajanja izloženosti uzorka mikrovalnom polju konstantne frekvencije [36, 37].

Mjerenja su napravljena u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu na Bruker EMX spektrometru opremljenim mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG.



Slika 15. Prikaz određenih dijelova ESR spektrometra: a) magnetsko polje b) kontrola mikrovalnog polja.

Za praćenje antioksidacijske aktivnosti uzoraka sjemenki rajčica korišten je prethodno opisan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal. DPPH se prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva 2,2-difenil-1-(2,4,6)-trinitrofenil) hidrazin-1-il, kemijske formule $C_{18}H_{12}N_5O_6$.

Priprema uzoraka za ESR mjerenja:

1. pripravljena je otopina DPPH radikala u 96 % etanolu koncentracije $0,20 \text{ mmol/dm}^3$,
2. snimljen je spektar DPPH otopine radikala koncentracije $0,10 \text{ mmol/dm}^3$,
3. Volumenu od 0,5 mL otopine radikala dodan je određeni volumen ekstrakta sjemenki rajčica tako da je udio sjemenki rajčica u uzorku 0,2 %, 0,5 % i 0,7 % te EtOH do ukupnog volumena od 1,0 mL,
4. zabilježeno je vrijeme kada je radikalnoj otopini dodan ekstrakt sjemenki rajčica ($t = 0$),
5. nakon što je otopina miješana u trajanju od 3 s na vortex miješalici, dio otopine stavljen je u kapilaru te je kapilara stavljena u ESR cjevčicu,

6. spektri reakcijske otopine snimani su u periodu od 30 minuta, svake minute tijekom prvih 6 minuta, svake 2 minute između 6. i 15. minute te svakih 5 minuta između 15. i 30. minute.

ESR spektri snimani su pri središnjem polju od 331 mT (3310 G), korištenjem magnetskog posmaka od 10 mT (100 G), snage mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudne modulacije od 0,1 mT (1 G), pojačanja 800 te vremenskog posmaka od 20 s. Za pohranu i obradu snimljenih spektara korištena je WinEPR programska podrška. Za grafičko prikazivanje dobivenih rezultata korišten je program SigmaPlot. ESR spektrometar snima spektre u vidu prve derivacije apsorpcijskih linija pri čemu korišteni WinEPR programski paket računa iznos dvostrukih integrala ESR spektra DPPH radikala.

Vrijednosti dobivene dvostrukim integriranjem ESR spektara korigirane su za snagu mikrovalnog polja od 10 mW te za iznos pojačanja 800. Tako izračunate vrijednosti dvostrukih integrala proporcionalne su broju DPPH radikala u uzorcima.

Tijekom mjerenja praćen je pad intenziteta spektralnih linija u ovisnosti o vremenu koje je proteklo od dodatka ekstrakta sjemenki rajčica otopini DPPH radikala. Svi dobiveni rezultati normirani su na iznos dvostrukog integrala ishodne otopine (slijepe probe). Također valja istaknuti da je praćena stabilnost otopine DPPH radikala u ovisnosti o vremenu te je prije mjerenja svakog pojedinog uzorka s ekstraktom sjemenki rajčica izmjeren signal slijepe probe. Dobivene vrijednosti su na kraju svakog mjerenja normirane upravo za intenzitet signala slijepe probe u trenutku $t = 0$. Vrijednosti relativnog intenziteta signala u ovisnosti o vremenu iskazane su u postotcima.

4. REZULTATI

Mjerena je antioksidacijska snaga (AP) ekstrakata rajčica koja se temelji na redukcijskoj aktivnosti prema stabilnom radikalu. Korištene su metode ESR spektroskopije i DPPH radikala, no s temeljnom razlikom u određivanju antioksidacijskih svojstava gdje se koriste antioksidacijski kapacitet i antioksidacijska aktivnost sukladno izračunu koji su predložili Jung i suradnici. Antioksidacijska snaga (AP) izražava se u antioksidacijskim jedinicama (AU) pri čemu 1 AU odgovara antioksidacijskoj snazi otopine vitamina C koncentracije 1 ppm. Antioksidacijska snaga izračunava se kako slijedi:

$$AP = \frac{RA \times N_{spinovi}}{w_c \times t_r} (AU)$$

gdje je RA konstanta redukcijske amplitude ($1/e^2$), $N_{spinovi}$ količina reduciranih radikala, w_c karakteristična masa antioksidacijskog produkta iskazana u mg/ml te t_r redukcijско vrijeme iskazano u minutama. Reducijско vrijeme (t_r) odgovara zapravo antioksidacijskoj aktivnosti te je prikazano slijedećom formulom:

$$t_r = \frac{-\ln(1-1/e)}{k_{wn}} (min)$$

gdje je k_{wn} konstanta reakcije monoeksponencijalnog raspada, dok karakteristična težina (w_c) odgovara antioksidacijskom kapacitetu kako je dano slijedećom formulom:

$$w_c = \frac{-\ln(1-1/e)}{k_{tr}} (mg/ml)$$

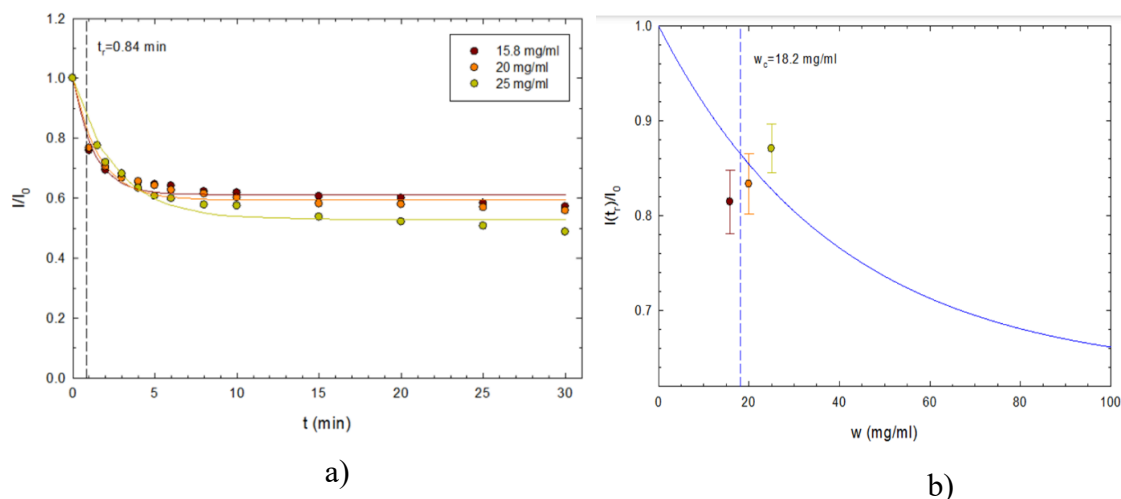
gdje je k_{tr} konstanta brzine monoeksponencijalnog opadanja [38]. Također prikazan je i relativni intenzitet (I) kao omjer intenziteta DPPH radikalne otopine u određenom vremenu t po dodatku uzorka (I_t) i intenziteta slijepe probe (I_0) kako je prikazano slijedećom jednačbom:

$$I = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \%$$

gdje je I_t iznos dvostrukog integrala spektra koji je snimljen po dodatku uzorka, a I_0 iznos dvostrukog integrala spektra slijepe probe. Relativni intenzitet izražava se u postocima [36].

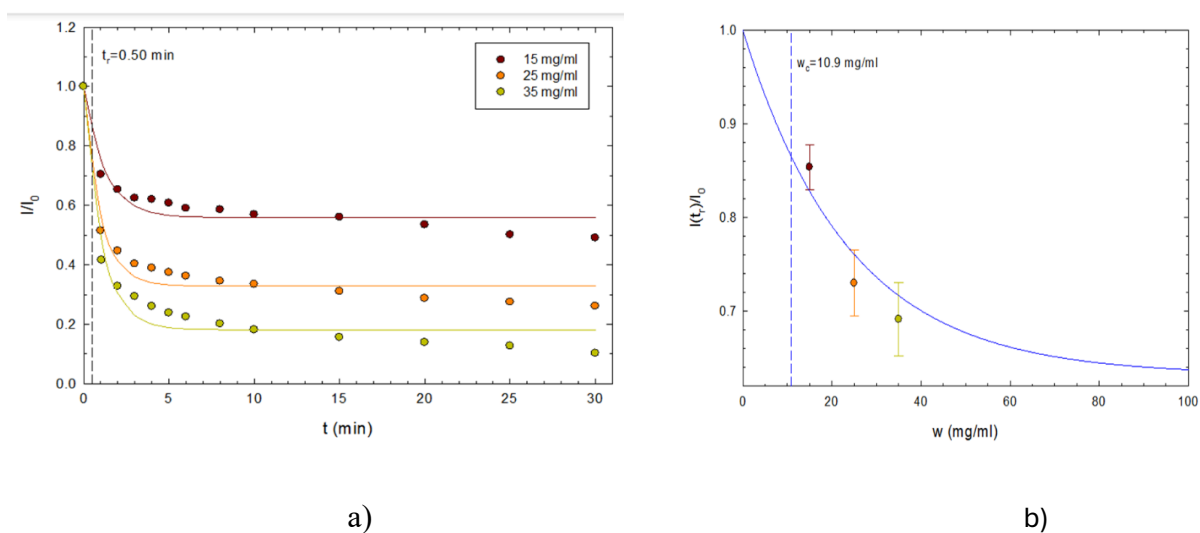
4.1. Antioksidacijska svojstva zamrznutih sjemenki dviju sorti rajčica, 0. mjesec

Prethodno osušene sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica do konstantne mase bile su pohranjene u zamrzivaču pri temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 h, nakon čega je uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR mjerenje. Slike 16 a) i 17 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala odnosno smanjenje broja DPPH radikala tijekom 30 min snimanja spektara pripremljenih uzoraka (JZ0, CZ0) različitih koncentracija. Uzorak zamrznutih sjemenki rajčice jabučara (JZ0) na slici 16 a) pokazuje pad intenziteta signala po dodatku ekstrakta sjemenki. Preostali relativni intenziteti signala nakon 30 min, u odnosu na početni intenzitet signala (I_0), iznosili su 57,1 % pri koncentraciji ekstrakta od 15,8 mg/ml; 55,8 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 48,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml. Najveći pad intenziteta ESR signala zabilježen je pri najvišoj koncentraciji ekstrakta zamrznutih sjemenki jabučara od 25 mg/ml. Na temelju gubitka signala u funkciji vremena za tri različite koncentracije ekstrakta, izračunato je redukcijsko vrijeme t_r koje iznosi 0,84 min. Slika 16 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi i izračun karakteristične mase w_c , koja za ovaj uzorak iznosi 18,2 mg/mL.



Slika 16. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta zamrznutih sjemenki jabučara (JZ0).

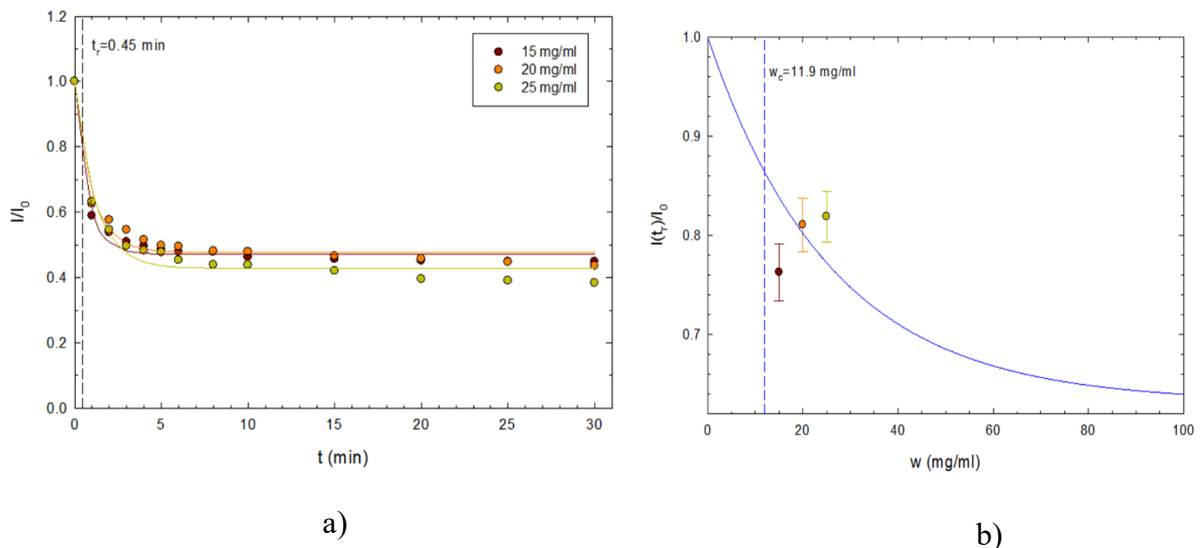
Slika 17 a) prikazuje relativni gubitak signala tijekom 30 min snimanja uzoraka zamrznutih sjemenki cherry rajčica. Relativni intenziteti preostali nakon 30 min iznose 49,1 % pri koncentraciji ekstrakta od 15 mg/ml, 25,4 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml te 10,2 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Najveći pad intenziteta ESR signala vidljiv je pri najvišoj koncentraciji ekstrakta zamrznutih sjemenki cherry rajčica od 35 mg/ml. Slika 17 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Na temelju eksperimentalnih podataka za uzorak CZ0 izračunate su vrijednosti $t_f = 0,50$ min i $w_c = 10,9$ mg/mL.



Slika 17. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta zamrznutih sjemenki cherry rajčica (CZ0).

4.2. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi, 0. mjesec

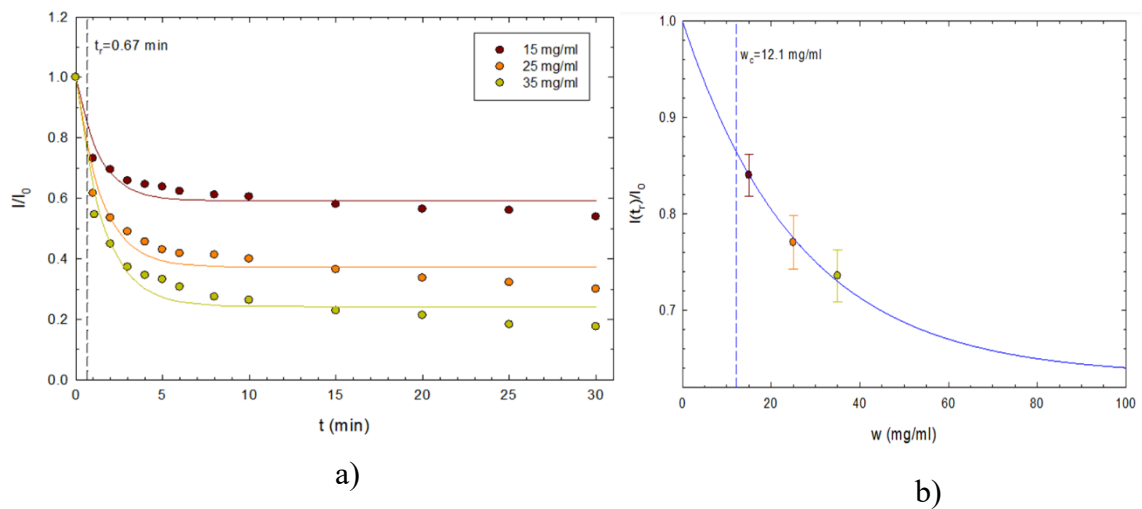
Prethodno osušene sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica bile su do početka prvog mjerenja (0. mjesec) spremljene pri sobnoj temperaturi od 24 °C. Nakon toga su pripremljeni njihovi alkoholni ekstrakti i uzorci za ESR mjerenja. Slike 18 a) i 19 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala tijekom 30 minuta za uzorke J0 i C0 različitih koncentracija. Nakon 30 minuta, za uzorak sjemenki rajčice jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi (J0) na slici 18 a) preostali relativni intenziteti iznosili su 44,8 % pri koncentraciji ekstrakta od 15 mg/ml; 43,6 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 38,3 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml. Najveći pad intenziteta signala uočava se pri najvišoj koncentraciji od 25 mg/ml. Računski dobivena vrijednost t_r za uzorak J0 iznosi 0,45 min. Slika 18 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi, iz koje je računski dobivena vrijednost w_c od 11,9 mg/ml.



Slika 18. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi (J0).

Slika 19 a) prikazuje gubitak signala u ovisnosti o vremenu tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi. Preostali signal nakon 30 min iznosi 53,8 % pri koncentraciji 15 mg/ml, 29,9 % pri koncentraciji 25 mg/ml te 17,5 % pri koncentraciji 35 mg/ml. Izračunato vrijeme redukcije (t_r) iznosi 0,67 min. Slika 19

b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Određena je i kritična masa (w_c) koja iznosi 12,1 mg/mL.



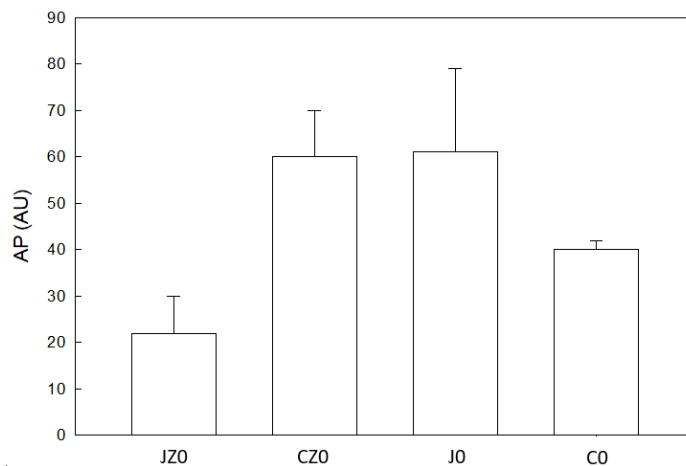
Slika 19. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi (C_0).

4.3. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica, 0. mjesec

Dobivena je antioksidacijska snaga sjemenki rajčice jabučara i cherry rajčica na temelju izračunate karakteristične mase i vremena redukcije, što je prikazano u tablici 3. Jedan dio navedenih sjemenki bio je zamrznut na 24 h dok je drugi dio tijekom tog vremena bio pri sobnoj temperaturi. Na slici 20 grafički je prikazana antioksidacijska snaga (AP) sjemenki dviju sorti rajčica. Najveću vrijednost AP (61 ± 18 AU) pokazuju sjemenke jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi (J0), dok zamrznute sjemenke jabučara pokazuju najmanju vrijednost (22 ± 8 AU). AP u uzorcima zamrznutih sjemenki cherry rajčica iznosi 60 ± 10 AU, dok kod sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi iznosi 40 ± 2 AU.

Uzorak	t_r (min)	w_c (mg/ml)	AP (AU)
JZ0	$0,84 \pm 0,18$	$18,2 \pm 5,1$	22 ± 8
CZ0	$0,50 \pm 0,04$	$10,9 \pm 1,6$	60 ± 10
J0	$0,45 \pm 0,06$	$11,9 \pm 3,2$	61 ± 18
C0	$0,67 \pm 0,03$	$12,1 \pm 0,3$	40 ± 2

Tablica 3. Vrijednosti t_r , w_c i AP za dvije sorte rajčica čije su sjemenke bile zamrznute i ostavljene pri sobnoj temperaturi.

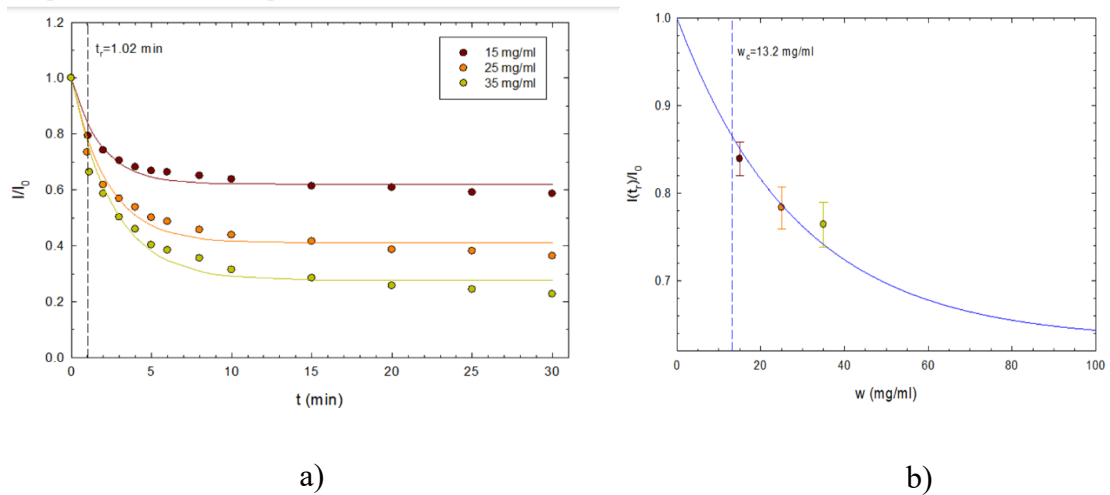


Slika 20. Grafički prikaz antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica zamrznutih te ostavljenih pri sobnoj temperaturi.

4.4. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 3 mjeseca

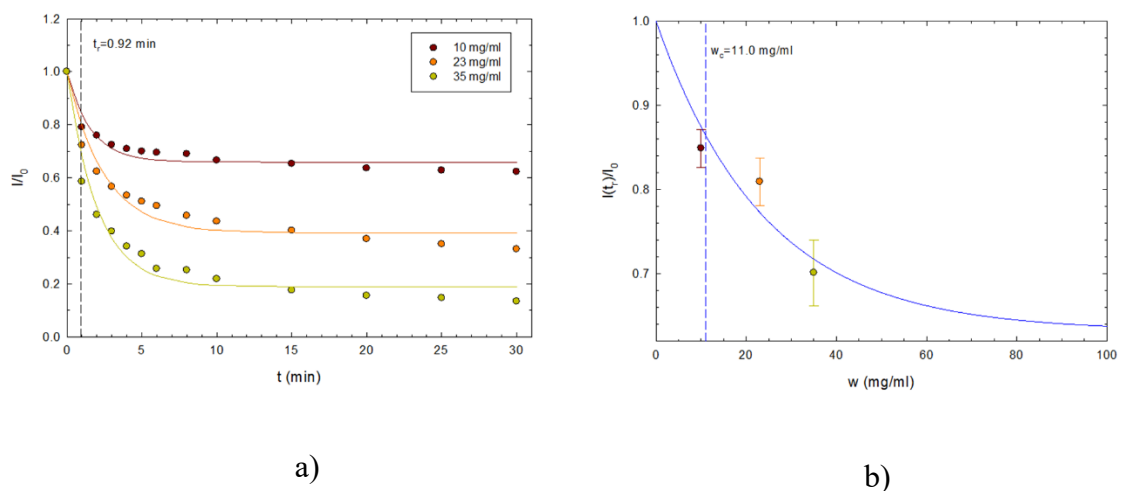
Dio sjemenki jabučara i cherry rajčica koje su skladištene pri sobnoj temperaturi izdvojene su te stavljene u hladnjak pri temperaturi od $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je poslije 3 mjeseca uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR snimanje. Slike 21 a) i 22 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala, odnosno smanjenje broja DPPH radikala, tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata uzoraka JH3 i CH3. Nakon 30 min, preostali signal uzorka JH3 iznosi 58,6 % pri koncentraciji ekstrakta od 15,8 mg/ml; 36,3 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml te 22,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml, slika 21 a). Slika 21 b) prikazuje

ovisnost relativnog intenziteta o masi. Računski dobivena vrijednost redukcijskog vremena t_r iznosi 1,02 min, a vrijednost karakteristične mase w_c 13,2 mg/mL.



Slika 21. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki rajčice jabučara skladištenih u hladnjaku tijekom 3 mjeseca (JH3).

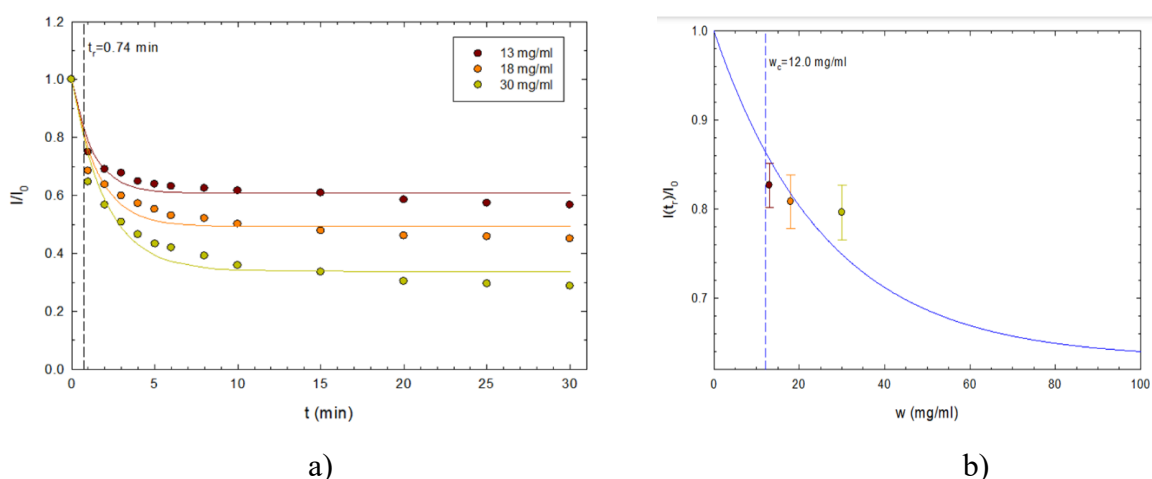
Slika 22 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku. Udio preostalog signala nakon 30 min iznosi 62,3 % pri koncentraciji od 10 mg/ml, 33,0 % pri koncentraciji od 23 mg/ml te 13,4 % pri koncentraciji od 35 mg/ml. Na slici 22 b) prikazana je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 0,92$ min i $w_c = 11,0$ mg/mL.



Slika 22. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w pri različitim koncentracijama ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 3 mjeseca (CH3).

4.5. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 3 mjeseca

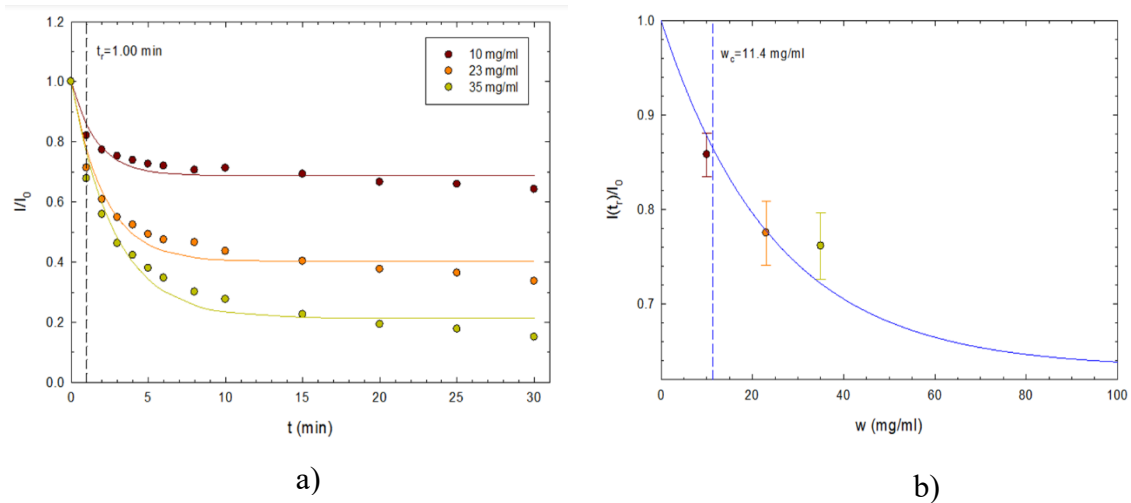
Sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica skladištene su pri sobnoj temperaturi od 24 °C, nakon čega je poslije 3 mjeseca uslijedila priprema ekstrakata i uzoraka za ESR mjerenja. Slike 23 a) i 24 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala DPPH radikala tijekom 30 min za uzorke J3 i C3 različitih koncentracija. Udio preostalog signala za uzorak J3 nakon 30 min iznosi 56,7 % za koncentraciju 13 mg/ml; 45,0 % za koncentraciju 18 mg/ml te 28,7 % za koncentraciju 30 mg/ml. Za uzorak J3, t_r iznosi 0,74 min. Na slici 23 b) prikazana je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Određena je kritična masa koja za ovaj uzorak iznosi 12,0 mg/mL.



Slika 23. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki rajčice jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 3 mjeseca (J3).

Slika 24 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 minuta za različite koncentracije ekstrakata sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi. Udio preostalog signala nakon 30 min iznosi 64,2 % pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg/ml, 33,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 23 mg/ml te 15,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Na slici 24 b) prikazana

je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 1,00$ min i $w_c = 11,4$ mg/ml.



Slika 23. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 3 mjeseca (C3).

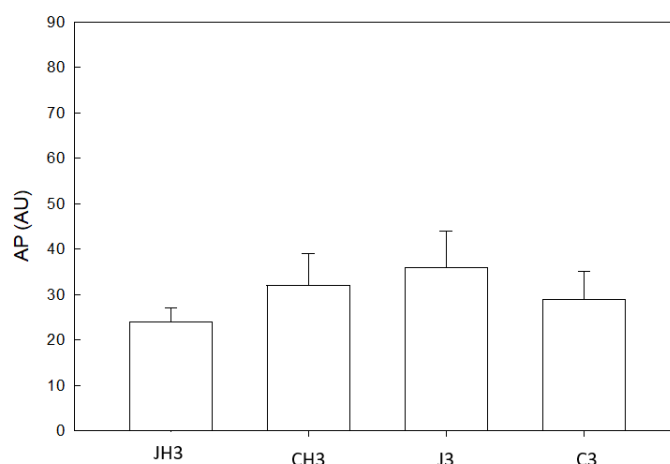
4.6. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 3 mjeseca skladištenja

Dobivena je antioksidacijska snaga sjemenki rajčice jabučara i cherry rajčica tijekom 3 mjeseca na temelju izračunate karakteristične mase i vremena redukcije, što je prikazano u tablici 4. Nakon prvog mjerenja jedan je dio sjemenki izdvojen te skladišten u hladnjaku, dok je preostali dio skladišten pri sobnoj temperaturi.

Na slici 25. grafički je prikazana antioksidacijske snage (AP) sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 3 mjeseca skladištenja. Najveću vrijednost AP (36 ± 8 AU) pokazuju sjemenke jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi (J3), dok sjemenke jabučara skladištene u hladnjaku pokazuju najmanju vrijednost (24 ± 3 AU). AP u uzorcima sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku iznosi 32 ± 7 AU, dok kod sjemenki cherry rajčica pri sobnoj temperaturi ona iznosi 29 ± 6 AU.

Uzorak	t_r (min)	w_c (mg/ml)	AP (AU)
JH3	$1,02 \pm 0,10$	$13,2 \pm 1,1$	24 ± 3
CH3	$0,92 \pm 0,12$	$11,0 \pm 1,9$	32 ± 7
J3	$0,74 \pm 0,10$	$12,0 \pm 2,2$	36 ± 8
C3	$1,00 \pm 0,15$	$11,4 \pm 1,7$	29 ± 6

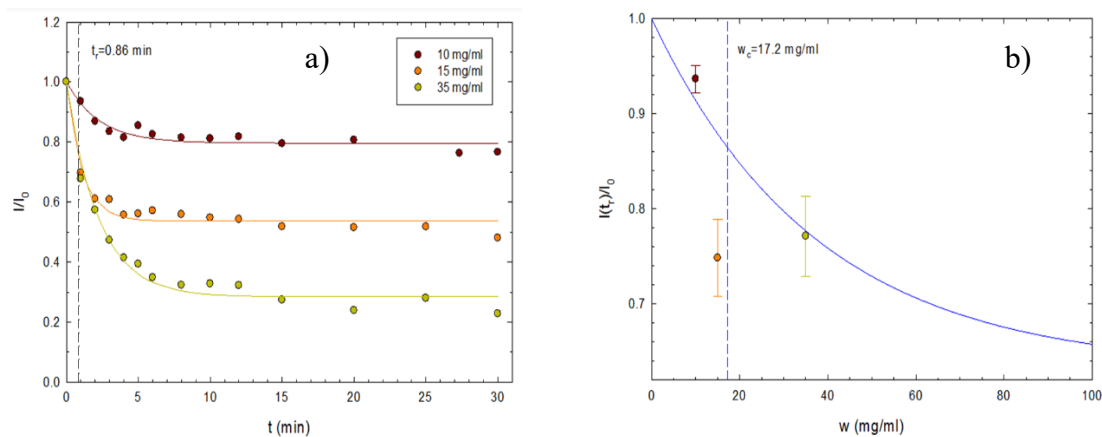
Tablica 4. Vrijednosti t_r , w_c i AP za dvije sorte rajčica čije su sjemenke ostavljene u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi.



Slika 25. Grafički prikaz antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica ostavljenih u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi.

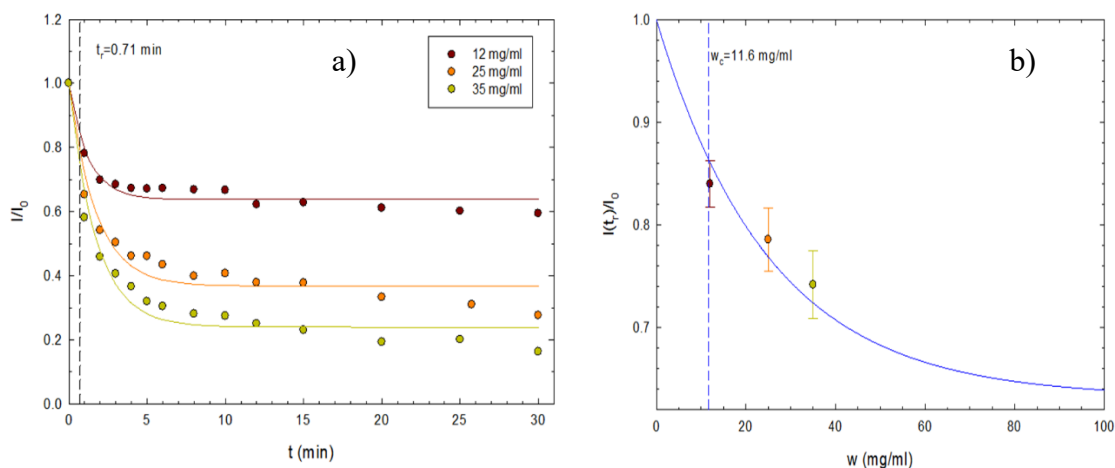
4.7. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 6 mjeseci

Sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica skladištene su u hladnjak pri temperaturi od + 4 °C, nakon čega je poslije 6 mjeseci uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR snimanje. Slike 26 a) i 27 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala, odnosno smanjenje broja DPPH radikala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata uzoraka JH6 i CH6. Nakon 30 min, preostali signal uzoraka JH6 iznosi 76,4 % pri koncentraciji ekstrakta od 10,0 mg/ml; 48,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 15 mg/ml te 22,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml, slika 26 a). Slika 26 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Računski dobivena vrijednost redukcijskog vremena t_r iznosi 0,86 min, a vrijednost karakteristične mase w_c 17,2 mg/ml.



Slika 26. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w pri različitim koncentracijama ekstrakta sjemenki jabučara skladištenih u hladnjaku tijekom 6 mjeseci (JH6).

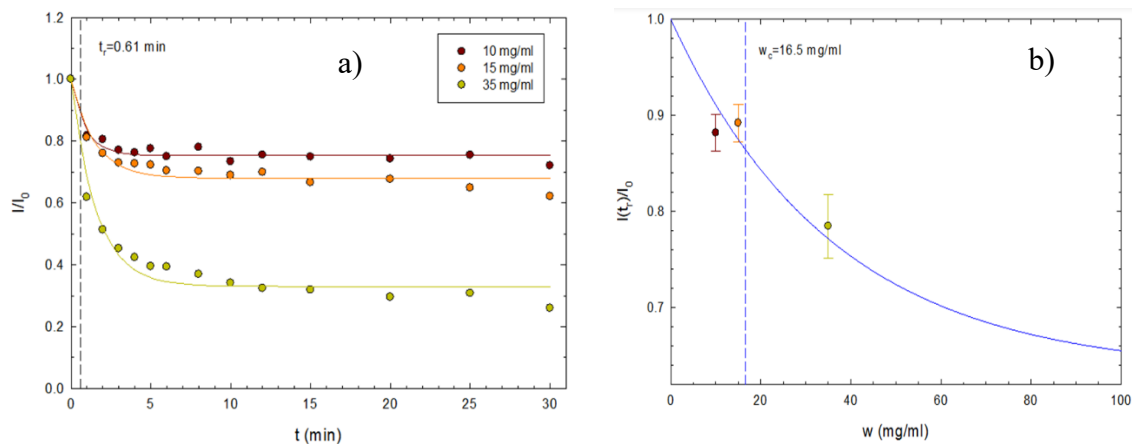
Slika 27 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku. Udio preostalog signala nakon 30 min iznosi 59,4 % pri koncentraciji ekstrakta od 12 mg/ml; 27,5 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml te 16,2 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Na slici 27 b) prikazana je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 0,71$ min i $w_c = 11,6$ mg/ml.



Slika 27. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w pri različitim koncentracijama ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 6 mjeseci (CH6).

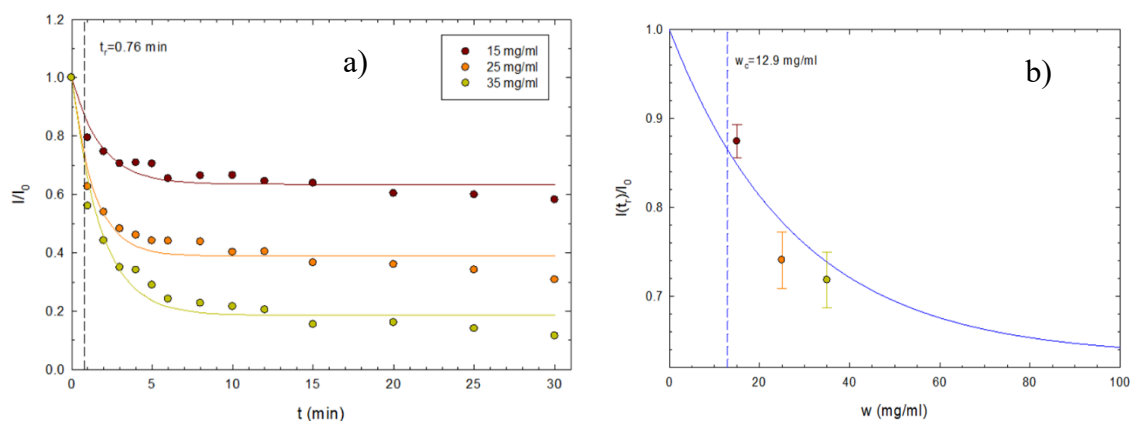
4.8. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 6 mjeseci

Sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica skladištene su pri sobnoj temperaturi od 24 °C, nakon čega je poslije 6 mjeseci uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR snimanje. Slike 28 a) i 29 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala, odnosno smanjenje broja DPPH radikala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata uzoraka J6 i C6. Nakon 30 min preostali signal uzorka J6 iznosi 72,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg/ml; 62,1 % pri koncentraciji ekstrakta od 15 mg/ml te 25,9 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml, slika 28 a). Slika 28 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Računski je dobiven vrijednost redukcijskog vremena t_r iznosi 0,61 min, a vrijednost karakteristične mase w_c 16,5 mg/ml.



Slika 28. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 6 mjeseci (J6).

Slika 29 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi. Udio preostalog signala nakon 30 min iznosi 58,2 % pri koncentraciji ekstrakta od 15 mg/ml; 30,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 25 mg/ml te 11,5 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Na slici 29 b) prikazana je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 0,76$ min i $w_c = 12,9$ mg/ml.



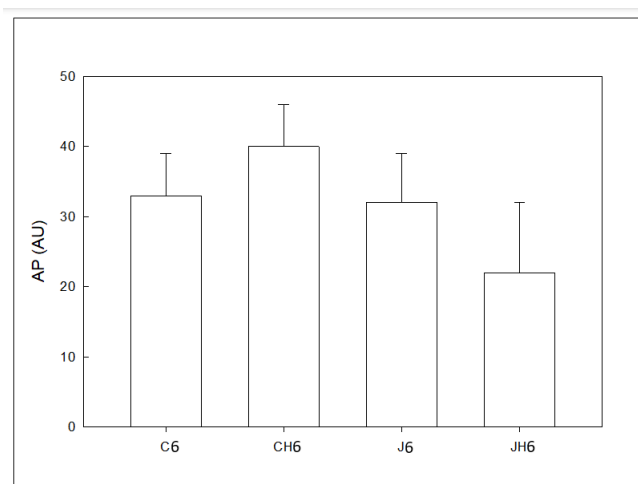
Slika 29. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 6 mjeseci (C6).

4.9. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 6 mjeseci skladištenja

Dobivena je antioksidacijska snaga sjemenki jabučara i cherry rajčica na temelju izračunate karakteristične mase i vremena redukcije, što je prikazano u tablici 5. Navedene sjemenke prethodno su skladištene pri različitim uvjetima. Na slici 30 grafički je prikazana antioksidacijska snaga (AP) sjemenki dviju sorti rajčica. Najveću vrijednost AP (40 ± 6 AU) pokazuju sjemenke cherry rajčica skladištene u hladnjaku (CH6), dok sjemenke jabučara također skladištene u hladnjaku pokazuju najmanju vrijednost (22 ± 10 AU). AP u uzorcima sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi iznosi 33 ± 6 AU, dok kod sjemenki jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi ona iznosi 32 ± 7 AU.

Uzorak	t_r (min)	w_c (mg/ml)	AP (AU)
C6	$0,76 \pm 0,06$	$12,9 \pm 2,2$	33 ± 6
CH6	$0,71 \pm 0,08$	$11,6 \pm 1,3$	40 ± 6
J6	$0,61 \pm 0,09$	$16,5 \pm 2,7$	32 ± 7
JH6	$0,86 \pm 0,18$	$17,2 \pm 6,6$	22 ± 10

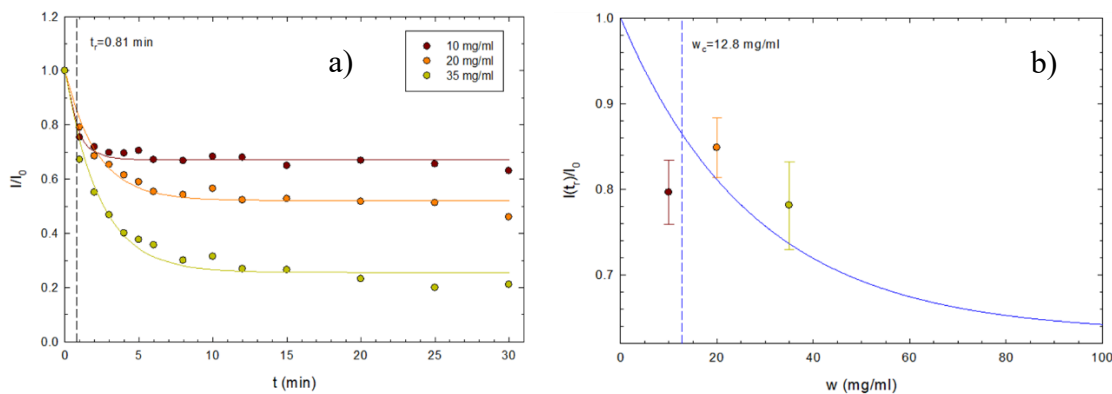
Tablica 5. Vrijednosti t_r , w_c i AP za dvije sorte rajčica čije su sjemenke ostavljene u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi.



Slika 30. Grafički prikaz antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica ostavljenih u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi.

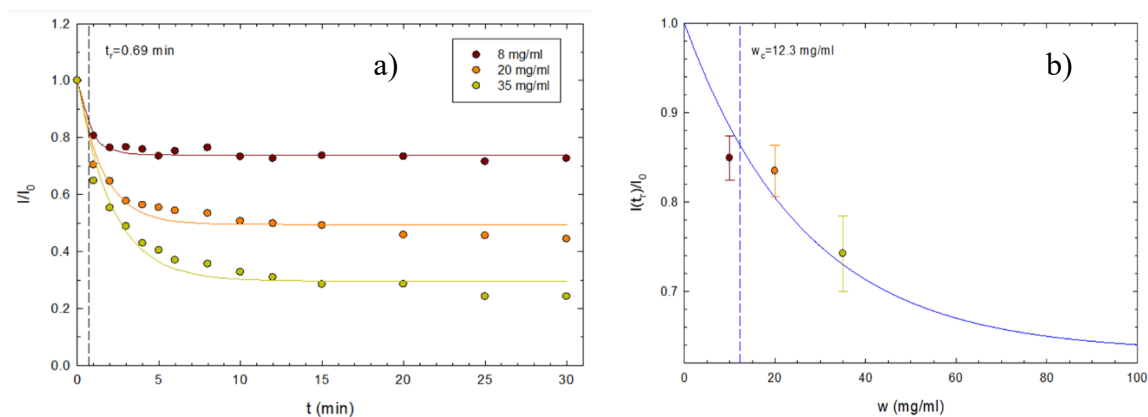
4.10. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 9 mjeseci

Sjemenke jabučara i cherry rajčica skladištene su u hladnjak pri temperaturi od + 4 °C, nakon čega je poslije 9 mjeseci uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR snimanje. Slike 31 a) i 32 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala, odnosno smanjenje broja molekula DPPH radikala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata uzoraka JH9 i CH9. Nakon 30 min, preostali signal uzorka JH9 iznosi 63,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 10,0 mg/ml; 46,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 20,5 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml, slika 31 a) Slika 31 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Računski je dobivena vrijednost redukcijskog vremena t_r iznosi 0,81 min, a vrijednost karakteristične mase w_c 12,8 mg/ml.



Slika 31. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w pri različitim koncentracijama ekstrakta sjemenki jabučara skladištenih u hladnjaku tijekom 9 mjeseci (JH9).

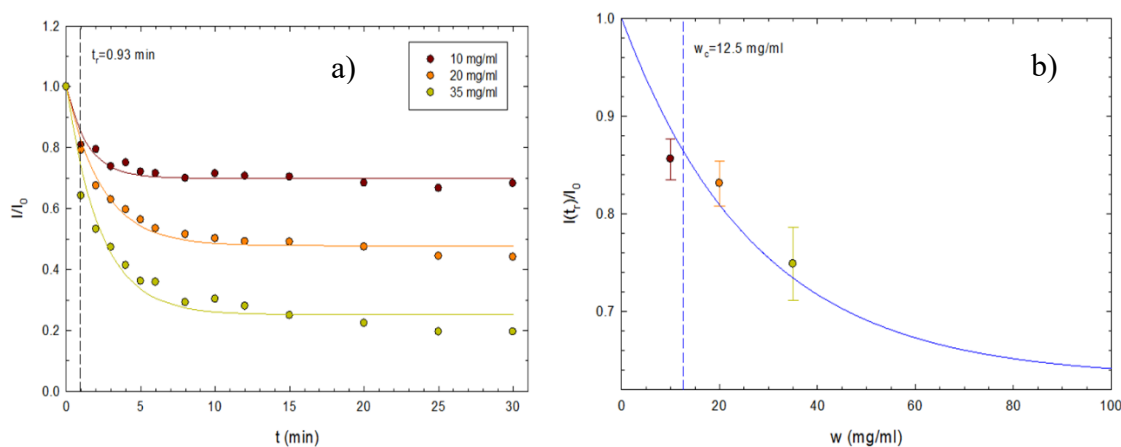
Slika 32 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku. Udio preostalog signala nakon 30 min iznosi 72,1 % pri koncentraciji ekstrakta od 8 mg/ml; 44,4 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 24,2 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Na slici 32 b) prikazana je ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 0,69$ min i $w_c = 12,3$ mg/ml.



Slika 32. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w pri različitim koncentracijama ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih u hladnjaku tijekom 9 mjeseci (CH9).

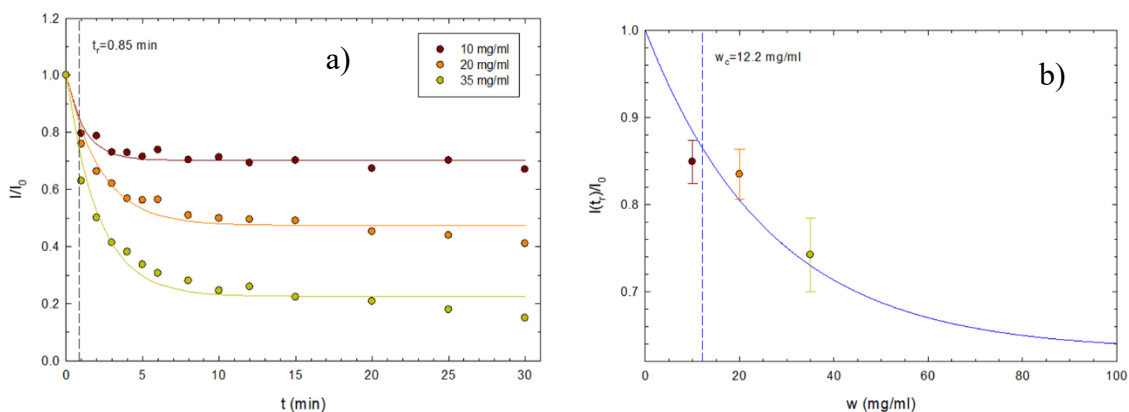
4.11. Antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 9 mjeseci

Sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica skladištene su pri sobnoj temperaturi od 24 °C, nakon čega je poslije 9 mjeseci uslijedila već opisana priprema ekstrakata i uzoraka za ESR snimanje. Slike 33 a) i 34 a) prikazuju pad relativnog intenziteta ESR signala, odnosno smanjenje broja molekula DPPH radikala tijekom 30 min za različite koncentracije uzoraka J9 i C9. Nakon 30 min, preostali signal uzorak J9 iznosi 67,7 % pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg/ml; 44,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 19,5 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml, slika 33 a). Slika 33 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Računski dobivena vrijednost redukcijskog vremena t_r iznosi 0,93 min, a vrijednost karakteristične mase w_c 12,5 mg/ml.



Slika 33. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 9 mjeseci (J9).

Slika 34 a) prikazuje pad intenziteta signala tijekom 30 min za različite koncentracije ekstrakata sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi za. Udio preostalog signala nakon 30 min 67,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg/ml; 41,0 % pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg/ml te 14,9 % pri koncentraciji ekstrakta od 35 mg/ml. Na slici 34 b) prikazuje ovisnost relativnog intenziteta o masi. Analizom rezultata dobivene su vrijednosti $t_r = 0,85$ min i $w_c = 12,2$ mg/ml.



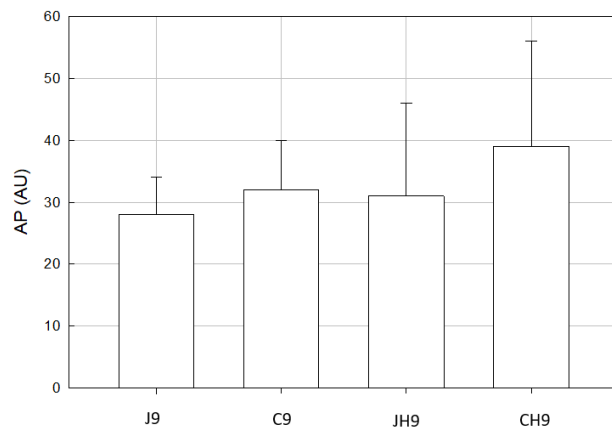
Slika 34. Ovisnost relativnog intenziteta o: a) vremenu t i b) masi w za različite koncentracije ekstrakta sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi tijekom 9 mjeseci (C9).

4.12. Antioksidacijska snaga sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 9 mjeseci skladištenja

Dobivena je antioksidacijska snaga sjemenki jabučara i cherry rajčica na temelju izračunate karakteristične mase i vremena redukcije, što je prikazano u tablici 6. Navedene sjemenke prethodno su skladištene pri različitim uvjetima. Na slici 35 grafički je prikazana antioksidacijske snage (AP) sjemenki dviju sorti rajčica. Najveću vrijednost AP (39 ± 17 AU) pokazuju sjemenke cherry rajčica skladištene u hladnjaku (CH9), dok sjemenke jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi pokazuju najmanju vrijednost (28 ± 6 AU). AP u uzorcima sjemenki cherry rajčica skladištenih pri sobnoj temperaturi iznosi 32 ± 8 AU, dok kod sjemenki jabučara skladištenih u hladnjaku ona iznosi 31 ± 15 AU.

Uzorak	t_r (min)	w_c (mg/ml)	AP (AU)
J9	$0,93 \pm 0,14$	$12,5 \pm 2,0$	28 ± 6
C9	$0,85 \pm 0,15$	$12,2 \pm 2,3$	32 ± 8
JH9	$0,81 \pm 0,22$	$12,8 \pm 5,0$	31 ± 15
CH9	$0,69 \pm 0,18$	$12,3 \pm 4,4$	39 ± 17

Tablica 6. Vrijednosti t_r , w_c i AP za dvije sorte rajčica čije su sjemenke ostavljene u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi.



Slika 35. Grafički prikaz antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica skladištenih u hladnjaku i pri sobnoj temperaturi tijekom 9 mjeseci.

5. RASPRAVA

Provedbom ovog istraživanja određena su antioksidacijska svojstva sjemenki izdvojenih iz dviju sorti rajčica, jabučar i cherry rajčice. Ispitane su razlike među dvjema korištenim sortama sjemenki skladištenih u različitim uvjetima tijekom različitih vremenskih razdoblja na antioksidacijsku snagu sjemenki. U istraživanju je korištena redukcijska metoda DPPH radikala u kombinaciji s tehnikom elektronske spinske rezonancije (ESR). Potrebno je napomenuti da su sjemenke izdvojene iz rajčica te osušene na tradicionalan način pri sobnoj temperaturi. Također, svi uzorci za ESR snimanja pripremljeni su na jednak način sukladno već opisanom postupku, a u svrhu usporedbe dobivenih rezultata.

Ispitani uzorci sjemenki jabučara i cherry rajčica pokazali su značajnu antioksidacijsku snagu, što samim time ukazuje na sposobnost redukcije odnosno inhibiranja DPPH radikala.

5.1. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica nakon sušenja obzirom na uvjete skladištenja, 0. mjesec

Sukladno rezultatima, počevši od najjače antioksidacijske snage prema najslabijoj, uzorci sjemenki dviju sorti rajčica poredani su kako slijedi: J0, CZ0, C0, JZ0. Dobiveni rezultati mogu se pripisati različitim sortama sjemenki rajčica te njihovu sastavu koji direktno utječe na količinu antioksidanasa. Također na dobivenu antioksidacijsku snagu utječu i korišteni uvjeti skladištenja.

Antioksidacijska svojstva sjemenki rajčica kao nusprodukata prerade rajčica, potječu od fenolnih spojeva (fenolnih kiselina i flavonoida), likopena, vitamina E i askorbinske kiseline [39,40]. Iz istraživanja Abdel-Gawad-a i suradnika dokazano je da su koncentracije ukupnih fenola, ukupnih flavonoida te vitamina E veće kod sjemenki rajčice jabučara sušenih zrakom (50 °C) tijekom 24h u odnosu na zamrznute sjemenke jabučara. Takav bi se trend mogao odnositi i na sjemenke rajčice jabučara koje su prethodno sušene 14 dana pri sobnoj temperaturi te skladištene također pri sobnoj temperaturi u odnosu na zamrznute. Skladištenje pri sobnoj temperaturi uzrokuje još veće vezanje polifenolnih spojeva koji se oslobađaju prilikom razgradnje staničnih komponenti. Prevladavajuće fenolne kiseline su protokatehinska, katehinska, kofeinska, galna i klorogenska kiselina. Koncentracija likopena se lagano povećava u sjemenkama rajčice jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi te zamrznutih u odnosu na

svježe sjemenke, za razliku od koncentracije askorbinske kiseline koja se smanjuje pri sobnoj temperaturi te raste zamrzavanjem [40].

Sadržaj ukupnih polifenola te ukupnih flavonoida u sjemenkama rajčice jabučara iskazan je kao maseni omjer u mg taninske kiseline na 100 g mokre mase sjemenki, odnosno kao maseni omjer u mg katehina na 100 g mokre mase prema istraživanju Abdel-Gawad-a [40]. Kod sjemenki cherry rajčica određen je sadržaj hidrofilnih polifenola te sadržaj lipofilnih polifenola koji su iskazani u mg galne kiseline na 100 g mokre mase [41]. Zbog navedenih razlika u prikazivanju sadržaja polifenola nemoguće ih je usporediti. Stoga bi se u budućim istraživanjima trebao odrediti sadržaj polifenola u sjemenkama rajčice jabučara. Može se pretpostaviti da je sadržaj polifenola veći kod sjemenki jabučara u odnosu na sjemenke cherry rajčica. U prilog tome govori veća antioksidacijska snaga sjemenki rajčice jabučara skladištenih pri sobnoj temperaturi u odnosu na sjemenke cherry rajčica također skladištenih pri sobnoj temperaturi.

Kada uspoređujemo sastav sjemenki rajčice jabučara i cherry rajčica moramo uzeti u obzir da je dokazano da sjemenke cherry rajčica imaju veći početni sadržaj likopena te askorbinske kiseline čiji se sadržaji prilikom zamrzavanja povećavaju [40, 41, 42]. Porast sadržaja tih komponenata primijećen je i kod sjemenki rajčice jabučara. Međutim, sjemenke rajčice jabučara sadrže manje količine likopena i askorbinske kiseline u odnosu na sjemenke cherry rajčica, a prisutni polifenoli u sjemenkama rajčice jabučara se razgrađuju prilikom zamrzavanja ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) [40, 41, 42]. Na temelju ovih činjenica, jasno je zašto zamrznute sjemenke cherry rajčica pokazuju veću antioksidacijsku snagu.

5.2. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 3 mjeseca skladištenja

Nakon tri mjeseca skladištenja, počevši od najjače antioksidacijske snage prema najslabijoj, glasi kako slijedi: J3, CH3, C3, JH3. Nakon 3 mjeseca, vidljiv je pad antioksidacijske snage kod svih uzoraka, što se može objasniti kao posljedica značajnog gubitka bioaktivnih spojeva [43]. Najveću antioksidacijsku snagu pokazuju ponovo sjemenke rajčice jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi upravo zahvaljujući većem sadržaju polifenola u odnosu na sjemenke cherry rajčica. Uzorak sjemenki cherry rajčica koje su skladištene u hladnjaku pri $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pokazuju veću antioksidacijsku snagu u odnosu na sjemenke iste vrste skladištene pri sobnoj temperaturi što možemo pripisati porastu sadržaja likopena [44]. Najnižu antioksidacijsku

snagu pokazuje uzorak sjemenki rajčice jabučara koje su skladištene u hladnjaku zbog degradacije polifenola te početno nižeg sadržaja likopena i askorbinske kiseline [40]. Početna koncentracija polifenola u sjemenkama rajčice jabučara koje su skladištene u hladnjaku (+4 °C) s vremenom se smanjuje što je posljedica oštećenja uzrokovanih niskim temperaturama u vakuolama stanica koje predstavljaju glavni odjeljak u kojem se nakupljaju polifenolni spojevi [44].

5.3. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 6 mjeseci skladištenja

Nakon 6 mjeseci skladištenja, krenuvši od najjače antioksidacijske snage prema najslabijoj, glasi kako slijedi : CH6, C6, J6, JH6. Nakon 6 mjeseci, u antioksidacijskoj snazi prednjači uzorak sjemenki cherry rajčica koje su skladištene u hladnjaku u odnosu na uzorak sjemenki rajčice jabučara pri sobnoj temperaturi. Uzrok ovakvog rezultata nalazi se u činjenici da period skladištenja od šest mjeseci pri sobnoj temperaturi uzrokuje još značajniji gubitak bioaktivnih spojeva prisutnih u sjemenkama u odnosu na tri mjeseca skladištenja [43]. Sjemenke rajčice jabučara i cherry rajčica skladištene pri sobnoj temperaturi pokazuju gotovo neznatnu razliku u antioksidacijskoj snazi u korist sjemenki cherry rajčica. Najnižu antioksidacijsku snagu ponovo ostvaruje uzorak sjemenki rajčice jabučara koje su skladištene u hladnjaku zbog već spomenute degradacije polifenola te početnog manjeg sadržaja likopena i askorbinske kiseline [40,44].

5.4. Usporedba antioksidacijske snage sjemenki dviju sorti rajčica tijekom 9 mjeseci skladištenja

Nakon 9 mjeseci skladištenja, počevši od najjače antioksidacijske snage prema najslabijoj glasi kako slijedi: CH9, C9, JH9, J9. Nakon 9 mjeseci, u antioksidacijskoj snazi i dalje prednjači uzorak sjemenki cherry rajčica koje su skladištene u hladnjaku. Sjemenke cherry rajčica skladištene pri sobnoj temperaturi pokazuju veću antioksidacijsku snagu u odnosu na sjemenke jabučara skladištene u istim uvjetima, što se može pripisati izraženoj degradaciji polifenola kod jabučara pri sobnoj temperaturi [44]. Upravo zbog izražene degradacije polifenola kod sjemenki rajčice jabučara nakon 9 mjeseci skladištenja pri sobnoj temperaturi, one pokazuju neznatno manju antioksidacijsku snagu u odnosu na sjemenke rajčice jabučara koje su skladištene u hladnjaku (+4 °C).

6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem potvrđeno je da sjemenke obiju sorti rajčica, rajčice jabučara te cherry rajčica pokazuju značajna antioksidacijska svojstva koja preveniraju karcinogenezu, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti te bolesti kože. Utvrđene su razlike u antioksidacijskoj snazi kod ispitivanih uzoraka sjemenki koje su u korelaciji sa sortom.

Praćen je utjecaj vremenskog razdoblja te uvjeta skladištenja na antioksidacijska svojstva sjemenki dviju sorti rajčica. Uočeno je da tijekom prva 3 mjeseca skladištenja najveću antioksidacijsku snagu pokazuju sjemenke rajčice jabučara skladištene pri sobnoj temperaturi (24 °C) zahvaljujući vjerojatno većem sadržaju polifenola te njihovoj prvotnoj većoj stabilnosti pri sobnoj temperaturi (24 °C) u odnosu na temperaturu hladnjaka (+4 °C) te zamrzavanje (-18 °C).

Nakon perioda od 3 mjeseca nastupa značajna razgradnja bioaktivnih spojeva u prvom redu polifenola, koji su u najvećoj mjeri zaslužni za antioksidacijska svojstva sjemenki rajčice jabučara, kako pri temperaturi hladnjaka (+4 °C) tako i pri sobnoj temperaturi (24 °C). Navedeno rezultira najvećom antioksidacijskom snagom sjemenki cherry rajčica, kako nakon 6 mjeseci tako i nakon 9 mjeseci skladištenja, pri temperaturi hladnjaka (+4 °C), što je uzrokovano početno većem sadržaju likopena i askorbinske kiseline.

Korištene metode DPPH radikala i ESR spektroskopije pokazale su se izuzetno efikasnim, kvalitetnim te preciznim u određivanju antioksidacijske snage sjemenki rajčica.

Na temelju svega navedenog, bitno je naglasiti kako su sjemenke rajčica često zanemarene kao nusprodukti industrijske prerade rajčica, a zapravo predstavljaju izuzetan izvor antioksidansa koji bi mogao imati višestruku primjenu.

7. LITERATURA

- [1] Z. Antunović, Ž. Klir Šalavardić, J. Novoselec, Upotreba nusproizvoda rajčice u hranidbi domaćih životinja, *Krmiva: časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, **65** (2023) 21-34. <https://hrcak.srce.hr/file/436699>
- [2] K. Szabo, V.F. Dulf, Z. Diaconeasa, D.C. Vodnar, Antimicrobial and antioxidant properties of tomato processing byproducts and their correlation with the biochemical composition, *LWT*, **116** (2019) 108588-108596. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108558>
- [3] M. Kumar, M. Tomar, D.J. Bhuyan, S. Punia, S. Grasso, A.G.A. Sá, B.A.M. Carciofi, F. Arrutia, S. Changa, Radha, s. Singh, S . Dhumal, M. Senapathy, V. Satankar, T. Anitha, A. Sharma, R. Pandiselvam, R. Amarowicz, M. Mekhemar, Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities, *Biomed. Pharmacother.*, **142** (2021), 112018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112018>
- [4] F. Ferreres , M. Taveira , D.M. Pereira , P. Valentão , B. Andrade , P., Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds: New Flavonols and Cytotoxic Effect, *J. Agric. Food Chem.*, **58** (2010) 2854-2861. doi: 10.1021/jf904015f
- [5] M. Valdez-Morales , L.G. Espinosa-Alonso , L.C. Espinoza-Torres , F. Delgado-Vargas , S. Medina-Godoy, Phenolic Content and Antioxidant and Antimutagenic Activities in Tomato Peel, Seeds, and Byproducts, *J. Agric. Food Chem.*, **62** (2014) 5281-5289. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5012374>
- [6] EJ. Fuentes , LA. Astudillo , MI. Gutiérrez , SO. Contreras , LO. Bustamante , PI. Rubio , R. Moore-Carrasco , MA. Alarcón , JA. Fuentes , DE. González , IF. Palomo, Fractions of aqueous and methanolic extracts from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) present platelet antiaggregant activity, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, **23** (2012) 109-117. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834d78dd>
- [7] A. Pérez-Gálvez , I. Viera , M. Roca, Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants, *Antioxidants*, **9** (2020) , 505. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/6/505>
- [8] A. Milani , M. Basirnejad , S. Shahbazi , A. Bolhassani, Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment , *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 1290-1324 <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13625>

- [9] W. Stahl, W. Schwarz, A. R. Sundquist & H. Sies, Cis-trans isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Archives of biochemistry and biophysics*, **294** (1992) 173-177. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90153-N](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90153-N)
- [10] O. Aust, W. Stahl, H. Sies, H. Tronnier & U. Heinrich, Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. *International journal for vitamin and nutrition research*, **75** (2005) 54-60. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.75.1.54>
- [11] N. Kalogeropoulos, A. Chiou, V. Pyriochou, A. Peristeraki, V.T. Karathanos, Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, **49** (2012) 213-216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.036>
- [12] D. Shao, G.G. Atungulu, Z. Pan, T. Yue, A. Zhang, Z. Fan, Characteristics of isolation and functionality of protein from tomato pomace produced with different industrial processing methods. *Food and bioprocess technology*, **7** (2014) 532-541. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-013-1057-0>
- [13] M. Mechmeche, F. Kachouri, M. Chouabi, H. Ksontini, K. Setti, M. Hamdi, Optimization of extraction parameters of protein isolate from tomato seed using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, **10** (2017) 809-819. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-016-0644-x>
- [14] F. Isik, A. Yapar, Effect of tomato seed supplementation on chemical and nutritional properties of tarhana, *Journal of Food Measurement and Characterization*, **11** (2017) 667-674. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-016-9436-7>
- [15] A. M. Giuffrè, C. Zappia, M. Capocasale, Tomato seed oil: A comparison of extraction systems and solvents on its biodiesel and edible properties. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, **94** (2017) 149-160. https://www.researchgate.net/profile/Angelo-Giuffre/publication/319623801_Tomato_seed_oil_a_comparison_of_extraction_systems_and_solvents_on_its_biodiesel_and_edible_properties/links/59b6602a458515a5b4945af4/Tomato-seed-oil-a-comparison-of-extraction-systems-and-solvents-on-its-biodiesel-and-edible-properties.pdf
- [16] N. R. Glick, M. H. Fischer, The role of essential fatty acids in human health. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, **18** (2013) 268-289. <https://doi.org/10.1177/2156587213488788>

- [17] A. M. Giuffrè, M. Capocasale, C. Zappia, Tomato seed oil for edible use: Cold break, hot break, and harvest year effects. *Journal of Food Processing and Preservation*, **41** (2017) 13309. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13309>
- [18] A. M. Giuffrè, M. Capocasale, Policosanol in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed oil: the effect of cultivar, *Journal of Oleo Science*, **64** (2015) 625-631. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15002>
- [19] E.S. Lazos, J. Tsaknis, S. Lalas, Characteristics and composition of tomato seed oil, *Grasas y Aceites*, **49** (1998) 440-445. <https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/755>
- [20] E. Fuentes, R. Carle, L. Astudillo, L. Guzmán, M. Gutiérrez, G. Carrasco, I. Palomo, Antioxidant and antiplatelet activities in extracts from green and fully ripe tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) and pomace from industrial tomato processing, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/867578/>
- [21] M.E. Persia, C.M. Parsons, M. Schang, J. Azcona, Nutritivna procjena suhих sјemenki rajčice. *Peradarstvo*, **82** (2003) 141-146. <https://doi.org/10.1093/ps/82.1.141>
- [22] K. Szabo, A.F. Cătoi, D.C. Vodnar, Bioactive compounds extracted from tomato processing by-products as a source of valuable nutrients, *Plant foods for human nutrition*, **73** (2018) 268-277. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-018-0691-0>
- [23] L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.*, **4** (2008) 89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614697/>
- [24] Í. Gulcin, H.S. Alwasel, DPPH radical scavenging assay. *Procesi*, **11** (2023) 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- [25] F. Haber, J. Weiss, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*, **147** (1934) 332-351. <https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221>
- [26] S. Goldschmidt, K. Renn, S. Zweiwertiger: Über das α,α -Diphenyl- β -trinitrophenyl-hydrazyl.(IV. Mitteilung über Amin-Oxydation). *Berichte der deutschen chemischen*

- Gesellschaft (A and B Series)*, **55** (1922) 628-643.
<https://doi.org/10.1002/cber.19220550308>
- [27] V. Bondet, W. Brand-Williams, C.L.W.T. Berset, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, **30** (1997) 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- [28] A. Kawai, K. Shibuya, Energy Separation between Quartet and Doublet Spin States of Radical– Triplet Encounter Pairs; Unusual Ferromagnetic Interaction in a 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl and Triplet Coronene Pair. *The Journal of Physical Chemistry A*, **106** (2002) 12305-12314. <https://doi.org/10.1021/jp021689s>
- [29] J. Xie, K.M. Schaich, Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity, *Journal of agricultural and food chemistry*, **62** (2014) 4251-4260. <https://doi.org/10.1021/jf500180u>
- [30] M. Palfi, K. Kolarić, A. Amić: Antioksidacijska aktivnost kvercetina: HAT vs SPLET mehanizam // *Knjiga sažetaka 5. Simpozij studenata kemičara*, Zagreb, Hrvatska, 2018. 54-54. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
<https://www.bib.irb.hr:8443/964528>
- [31] A.T. Diplock, *et al.* Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition*, **80** (1998) S77-S112.
<https://doi.org/10.1079/BJN19980106>
- [32] G. Litwinienko, K.U. Ingold, Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *The Journal of organic chemistry*, **70** (2005) 8982-8990. <https://doi.org/10.1021/jo051474p>
- [33] P. Sharma, R. Zalpouri: Chapter 16 - Microwave-assisted extraction of proteins and carbohydrates from marine resources. *Innovative and Emerging Technologies in the Bio-marine Food Sector*, Academic Press, (2022) 361-374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820096-4.00019-5>
- [34] A.A. Hussein, Chapter 62, Cold pressed green coffee oil. *Cold Pressed Oils*, Academic Press, (2020) 703-710. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818188-1.00062-1>.
- [35] P. Carillo, L.D. Amelia, E. Dell Aversana, D. Faiella, D. Cacace, B. Giuliano, B. Morrone, Eco-Friendly Use of Tomato Processing Residues for Lactic Acid Production in

- Campania, *Chemical Engineering Transactions*, **64** (2018) 223-228.
<https://doi.org/10.3303/CET1864038>
- [36] M.J.N. Junk, Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy, ur., *Springer*, Berlin (2012).
- [37] S. Valić, u Rubber Nanocomposites: Preparation Properties and Applications, S. Thomas and R. Stephan, ur., *John Wiley & Sons*, (2010) p. 391
- [38] K. Jung, J. Richter, K. Kabrodt, I.M. Lücke, I. Schellenberg, Th. Herrling, The antioxidative power AP - A new quantitative time dependent (2D) parameter for the determination of the antioxidant capacity and reactivity of different plants, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **63** (2006) 846-850. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.10.014>
- [39] S. Azabou, H. Sebi, F. Ben Taheur, Y. Abid, M. Jridi, M. Nasri, Phytochemical profile and antioxidant properties of tomato by-products as affected by extraction solvents and potential application in refined olive oils, *Food Bioscience*, **36** (2020), 100664
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100664>.
- [40] A.S. Abdel-Gawad, et al., Effect of drying processes on the antioxidant properties of tomato seeds, *J. Food and Dairy Sci.*, **1** (2010) 805-814.
https://journals.ekb.eg/article_82521_55595cf4f8ce763b7074afef28e173be.pdf
- [41] A.R. Bianchi *et al.*, Antioxidant Characterization of Six Tomato Cultivars and Derived Products Destined for Human Consumption, *Antioxidants*, **12** (2023) 761
<https://doi.org/10.3390/antiox12030761>
- [42] P.R. Prasanna *et al.*, Antioxidative properties of cherry tomato, *Journal of Crop and Weed*, **16** (2020) 8-17. <https://doi.org/10.22271/09746315.2020.v16.i2.1309>
- [43] B. Moldovan, A. Popa, L. David; Effects of storage temperature on the total phenolic content of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) fruits extracts, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **89** (2016) 208-211. 10.5073/JABFQ.2016.089.026
- [44] A.F. Vinha et al., Influence of the Storage Conditions on the Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Microbial Flora of Different Tomato(*Lycopersicon esculentum* L.) Cultivars, *Journal of Agricultural Science*, **5** (2013), 2
<http://dx.doi.org/10.5539/jas.v5n2p118>

8. ŽIVOTOPIS

Laura Manin rođena je 2. ožujka 2001. godine u Rijeci. Dolazi iz Umaga gdje je 2015. godine završila Osnovnu školu Marije i Line te Osnovnu glazbenu školu pri Pučkom otvorenom učilištu „Ante Babić“. Klasičnu gimnaziju završila je 2019. godine u Pazinskom kolegiju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisala je sveučilišni prijediplomski studij Sanitarnog inženjerstva u akademskoj godini 2019./2020., a na jesen 2022. godine upisala je sveučilišni diplomski studij Sanitarnog inženjerstva. Članica je Organizacijskog odbora Studentskog kongresa zaštite zdravlja – Sanitas i glavna urednica Knjige sažetaka istoimenog kongresa. Aktivno je sudjelovala usmenim izlaganjima na Studentskom kongresu zaštite zdravlja-Sanitas 2023. te 2024. godine, na Studentskom simpoziju sanitarnog inženjerstva u Mostaru, Bosna i Hercegovina te na Međunarodnom kongresu kemičara i kemijskih inženjera Bosne i Hercegovine u Sarajevu. Od studentskih poslova, tijekom 2022. te 2023. godine radila je od srpnja do rujna u Laboratoriju za kontrolu kvalitete ulaznih sirovina u Tvornici za preradu rajčica u Umagu, Podravka d.d. Također od 2023. godine do danas radila je kao demonstratorica na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju. U ožujku 2023. objavila je znanstveni rad pod nazivom “Patofiziološki mehanizmi djelovanja životinjskih i biljni toksina” u časopisu Journal of Applied Health Sciences. Dobitnica je zahvalnice grada Poreča za volonterski doprinos zajednici u 2023. godini. Završila je CEEPUS International Summer School pod nazivom „Food Safety and Healthy living (Session 2) FSHL2 – 2023“ u Ljubljani. Dobitnica je Dekanove nagrade za izvrsnost u akademskoj godini 2022./2023., Nagrade rektorice za izvrsnost te Nagrade rektorice za studenticu generacije u akademskoj godini 2023./2024. Ove je godine sudjelovala u projektu Erasmus +. Aktivno se snalazi i koristi programima MS Office paketa. Od jezika se služi engleskim i talijanskim.